

综述

微生物发酵生产丁二酸研究进展

刘嵘明, 梁丽亚, 吴明科, 姜岷

南京工业大学 生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

刘嵘明, 梁丽亚, 吴明科, 等. 微生物发酵生产丁二酸研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1386-1397.

Liu RM, Liang LY, Wu MK, et al. Progress in microbial production of succinic acid. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1386-1397.

摘要: 丁二酸是微生物三羧酸循环中重要的代谢中间产物, 广泛用于生物高分子、食品与医药等行业, 市场潜在需求量巨大。文中从3个方面归纳了国内外生物基丁二酸研究进展: 能够过量积累丁二酸的微生物的发现和筛选, 产丁二酸工程菌构建中所采用的基因工程策略及代谢工程技术, 丁二酸发酵过程控制与优化。最后, 讨论了微生物法生产丁二酸今后的研究方向。

关键词: 丁二酸, 菌种选育, 基因工程, 代谢工程, 过程强化

Progress in microbial production of succinic acid

Rongming Liu, Liya Liang, Mingke Wu, and Min Jiang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, Jiangsu, China

Abstract: Succinic acid is one of the key intermediates in the tricarboxylic acid cycle (TCA) and has huge potentials in biopolymer, food, medicine applications. This article reviews recent research progress in the production of succinic acid by microbial fermentation, including discovery and screening of the succinic-acid-producing microbes, the progress of genetic engineering strategy and metabolic engineering technology for construction of succinic acid-producing strains, and fermentation process control and optimization. Finally, we discussed the limitation of current progress and proposed the future research needs for microbial production of succinic acid.

Keywords: succinic acid, strain breeding, genetic engineering, metabolic engineering, process control and optimization

Received: June 25, 2013; **Accepted:** August 19, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), A Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-84172062; E-mail: bioengine@njut.edu.cn

国家自然科学基金(No. 21076105), 国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2009CB724701), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

丁二酸(Succinic acid)是一种重要的“C4 平台化合物”,广泛应用于食品、医药、农业领域,可作为合成 1,4-丁二醇、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮及可降解生物高分子材料聚丁二酸丁二醇酯(PBS)等的原料,具有广阔的应用前景^[1-2]。近年来,随着丁二酸新的应用领域的不断开拓,国际市场对于丁二酸的需求量猛增。传统的丁二酸生产方法主要为石化合成法^[3],这种化学合成法生产丁二酸是以不可再生的战略资源石油作为原料,成本高,环境污染严重,对于石油依赖性强,无法实现可持续发展,严重阻碍了丁二酸的发展潜力。在石油资源日益枯竭的今天,发展环境友好的绿色生物技术已经成为一种趋势,因此,微生物发酵法生产丁二酸越来越引起人们的兴趣^[4-5]。生物法制备丁二酸的过程中,温室气体 CO₂ 可以作为原料之一,被微生物吸收并利用,从而能够减少温室气体的排放,缓解由温室效应所导致的全球气候变暖的现状^[2]。由此可见,开发高效的生物合成丁二酸的方法具有非常重要的社会和环境效益。本文从能够过量积累丁二酸的微生物的发现和筛选,产丁二酸工程菌构建中所采用的基因工程策略及代谢工程技术,丁二酸发酵过程控制与优化等 3 个方面归纳了国内外关于丁二酸的研究进展。

1 过量积累丁二酸的微生物的发现和筛选

产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 是一种严格厌氧细菌,属于革兰氏阴性菌,从猎犬的口腔中分离得到,以丁二酸为主代谢产物^[6],可利用的发酵底物范围十分广泛^[7-9],如葡萄糖、乳糖、甘油等,但一般不能耐受高渗透压,最优葡萄糖底物浓度一般在 20~80 g/L 之间,而且不能耐受高浓度的丁二酸盐。Glassner 等^[10]以 *A. succiniciproducens* (ATCC29035)为出发

菌株,筛选得到了比出发菌株更耐单氟乙酸钠的突变株 FA-10 (ATCC 55617),此菌株对初始葡萄糖最高耐受浓度为 60 g/L,在最优发酵条件下丁二酸的产量可以超过 30 g/L,丁二酸得率超过 0.7 g/g。Lee 等^[11]从牛瘤胃中分离到一株产丁二酸的产琥珀酸曼氏杆菌 *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E,在含 20 g/L 的葡萄糖的培养基中进行厌氧发酵,丁二酸、乙酸和甲酸相应产量比为 2:1:1(W/W),丁二酸的产量达到 13.5 g/L,生产强度 1.87 g/(L·h)。

产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 是从瘤胃中分离得到的一种革兰氏阴性新菌株,经 16S rRNA 鉴定为巴斯德菌科放线杆菌属。它是一种兼性厌氧菌,能够利用多种碳源,并能够耐受高浓度的丁二酸盐^[12]。发酵产物主要有琥珀酸、乙酸以及少量的甲酸和乙醇。目前该菌也是国内外学者研究的焦点。Guettler 等^[13]从兼性厌氧的瘤胃菌 *A. succinogenes* 中筛选出了抗氟乙酸的变异株(能够耐受 1~8 g/L 的氟乙酸),在 2 L 厌氧发酵罐中分批发酵,以葡萄糖为碳源,能生成高达 105.8 g/L 的丁二酸,得率达 0.8~0.9 g/g,主要副产物是乙酸和丙酮酸。姜岷课题组^[14]利用硫酸二乙酯 (DES) 诱变产丁二酸放线杆菌,筛选到一株高浓度铵根离子耐受型菌株 YZ25,该菌株在 NH₄⁺浓度为 121 mmol/L 的发酵培养基中,丁二酸产量达到 32.68 g/L,转化率达到 65.4%,相对于出发菌株提高了 180.5%。同时姜岷课题组^[15]利用 NaCl 为渗透压调节剂,筛选到一株能耐受 0.7 mol/L 氯化钠的菌株 *A. succinogenes* CH050,丁二酸产量达到 66 g/L。

2 产丁二酸工程菌株的构建

从自然界筛选获得的野生型菌株在丁二酸的合成过程中,往往会伴有副产物的生成,因此,

采用基因工程和代谢工程技术, 针对具有清晰基因组信息以及成熟基因操作工具的大肠杆菌 *Escherichia coli* (图 1) 以及谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 等工程菌株进行改造, 以获得高效丁二酸生产菌株^[16-17]。

2.1 敲除或失活丁二酸竞争途径中的酶

针对丁二酸合成过程中副产物的大量积累, Chatterjee 等^[18]以大肠杆菌 W1485 为出发菌株通过敲除乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 和丙酮酸甲酰裂解酶 (*pflB*) 获得双突变株 NZN111, 在此基础上通过自发突变 *ptsG* 基因, 获得高产丁二酸的优良菌株 AFP111, 可生产 36 g/L 丁二酸, 得率达到 0.67 g/g, 无甲酸, 乳酸积累, 乙酸产量也很低。Andersson 等^[19]以大肠杆菌 C600(ATCC23724)为出发菌株, 通过敲除 *pfl*、*ldh* 和 *ptsG* 基因, 获得的菌株 AFP184 不仅能够同时利用五碳、六碳糖, 丁二酸浓度最高可达 48 g/L, 得率为 1.04 g/g。

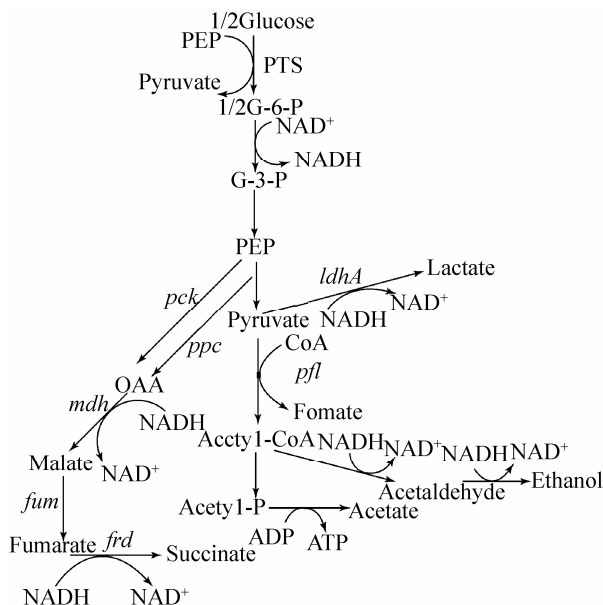


图 1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径

Fig.1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *E. coli*.

Jantama 等^[20]利用 *E. coli* C (ATCC 8739)作为模式菌株, 采用两次同源重组的方法失活乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*)、乙醇脱氢酶 (*adhE*)、乙酸激酶 (*ackA*)、甲酸转运子-丙酮酸甲酸裂解酶 (*focA-pflB*)、甲基乙二醛合成酶 (*mgsA*) 和丙酮酸氧化酶 (*poxB*) 得到 KJ073, 然后通过进化代谢提高细胞生长和丁二酸生产, 丁二酸浓度达到 80 g/L, 丁二酸得率和生产强度分别为 0.79 g/g 和 0.82 g/(L·h)。进一步在 KJ122 失活苏氨酸脱缩酶 (*tdcD*) 和 2-丁酮酸甲酸裂解酶 (*tdcE*)、柠檬酸裂解酶 (*citF*)、天冬氨酸转氨酶 (*aspC*) 和苹果酸酶 (*sfcA*) 等, 丁二酸浓度达到 83 g/L, 丁二酸得率和生产强度分别提高到 0.92 g/g 和 0.88 g/(L·h)。Sánchez 等^[21]通过敲除乙醇脱氢酶基因(*adhE*)、乳酸脱氢酶基因(*ldh*)、乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(*pta-ack*), 并敲除 *aceBAK* 操纵子阻遏物的基因(*iclR*)以激活乙醛酸途径, 获得琥珀酸生产菌株 *E. coli* SBS550MG, 发酵结果丁二酸得率为 1.1 g/g, 生产强度 10 mmol/(L·h)。Lin 等^[22-23]采用有氧发酵的方式来生产丁二酸, 在该项研究中, 重组大肠杆菌通过敲除丁二酸脱氢酶的基因 (*sdh*)、丙酮酸氧化酶的基因(*poxB*)、乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(*pta-ack*)和 *aceBAK* 操纵子阻遏物的基因(*iclR*)及编码磷酸转移酶系统的基因 (*ptsG*), 构建出了包含乙醛酸途径和 TCA 循环氧化支路的丁二酸合成途径。通过好氧分批发酵实验表明, 该菌株在 59 h 后丁二酸的生成量为 58.3 g/L, 丁二酸对葡萄糖的得率系数为 0.56 g/g, 另外, 发酵液中积累了 6.1 g/L 的丙酮酸和 3.0 g/L 的乙酸^[24]。Lee 等^[25]通过 373 个反应和 352 个代谢产物构建了基因组规模的代谢模型, 了解了不同条件下的代谢流分布, 并通过敲除 *ldhA*、*pflB*、*pta*、*ackA* 基因, 获得一株高产菌株 *M. succiniciproducens* LPK7, 几乎不产甲酸、乙酸和

乳酸,分批培养丁二酸产量可以达到 52.4 g/L,丁二酸得率和产率分别达到 0.76 g/g, 1.8 g/(L·h)^[26]。

2.2 增强丁二酸代谢途径中关键酶

在消除副产物大量积累的同时,通过增强丁二酸代谢途径中关键酶可进一步提高丁二酸的产量和得率,Okino 等^[27]通过失活 *C. glutamicum* 中乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 并表达来自于根瘤菌的丙酮酸羧化酶基因 (*pyc*),丁二酸产量达到 146 g/L,乙酸产量达到 16 g/L,丁二酸的质量得率和生产强度分别达到 0.92 g/g 和 3.2 g/(L·h)。Goldberg 等^[28]通过过量表达丁二酸形成支路的第一步中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC) 使重组大肠杆菌发酵后丁二酸对葡萄糖的得率从 0.08 g/g 提高到 0.22 g/g。Gokarn 等^[29]在野生 *E. coli* 中导入 pTrc99A-*pyc* 质粒,通过表达来自于根瘤菌 *Rhizobium etli* 的丙酮酸羧化酶 (PYC),使丁二酸对葡萄糖的得率和生产强度分别达到 0.11 g/g 和 0.17 g/(L·h)。姜岷课题组^[30]通过过量表达苹果酸脱氢酶 (MDH),使重组菌株 NZN111/pTrc99a-*mdh* 单一性厌氧条件发酵 48 h,能够消耗 13.5 g/L 葡萄糖并生产 4.3 g/L 丁二酸,辅酶 NADH/NAD⁺ 的比例从 0.64 下降到 0.26,部分恢复了 NZN111 厌氧条件下不能利用代谢葡萄糖的能力。在大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径中,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PPC)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(PCK)皆可催化由磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)到草酰乙酸(OAA)的反应。鉴于经由 PCK 催化的反应伴有 ATP 的生成,姜岷课题组^[31]通过在 *ppc* 缺陷菌株中过量表达来自于 *Bacillus subtilis* 168 中的 *pck* 基因,提高了 ATP 的供给,使重组大肠杆菌能够在厌氧条件下利用木糖代谢生长并合成丁二酸。Zhang 等通过基因改造 *pck* 基因启动子,加强 PCK 在重组大肠杆菌中的表达,提高重组大肠杆菌在厌氧条件下的丁二酸的生产能

力^[32-33],并在此基础上,通过协同利用 PCK 和 PPC,充分发挥各自催化优势,进一步提高重组大肠杆菌丁二酸的合成能力^[34]。

2.3 NAD(H)合成途径改造

丁二酸是厌氧发酵的还原性终端产物,系统还原力的强弱是其合成效率的重要影响因素,而 NAD(H)总量及 NADH/NAD⁺ 比例是调节还原力的分子基础,因此开展生产菌株 NAD(H)系统的改造与调控对实现其高效合成具有极其重要的理论意义与实际价值。大肠杆菌中 NAD(H)的生物合成及分解途径如图 2 所示,涉及其合成的基因主要有 3 个 (*pncB*, *nadD*, *nadE*),涉及分解代谢的基因主要有 2 个 (*yjaD*, *yrfE*),而 NAD⁺和 NADH 相互之间的转化反应则多达 300 多个,其中 *pncB* 基因编码的烟酸转磷酸核糖激酶是 NAD(H)生物合成途径中的关键酶。相关研究表明,利用 DNA 重组技术改造 NAD(H)生物合成途径是提高 NAD(H)总量的有效手段^[35-37]。细胞的生长需要充足的 NAD⁺来进行葡萄糖的氧化,大肠杆菌 NZN111 由于同时失活了丙酮酸甲酸裂解酶与乳酸脱氢酶,NADH 不能及时再生为 NAD⁺,引起胞内辅酶 NAD(H)的不平衡,最终导致厌氧条件下菌株不能利用葡萄糖代谢生长^[38]。姜岷课题组^[39-40]构建了重组大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-*pncB*,表明过量表达烟酸转磷酸核糖激酶,能够提高菌体内 NAD(H)的总量,在厌氧条件下,使菌株能够利用葡萄糖代谢生长,重组菌细胞干重是对照菌的 6.5 倍,NADH/NAD⁺ 的比例由 0.64 降低为 0.13,同时丁二酸的产量较出发菌有了极大的提高。姜岷课题组^[41]在恢复双敲菌株纯厌氧条件下的生长及代谢能力的同时,为了进一步减少丙酮酸的积累,过量表达了来源于 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 的丙酮酸羧化酶 (PYC) 基因 *pyc*,增加还原性 TCA 的碳流量,进一步增加丁二酸的生

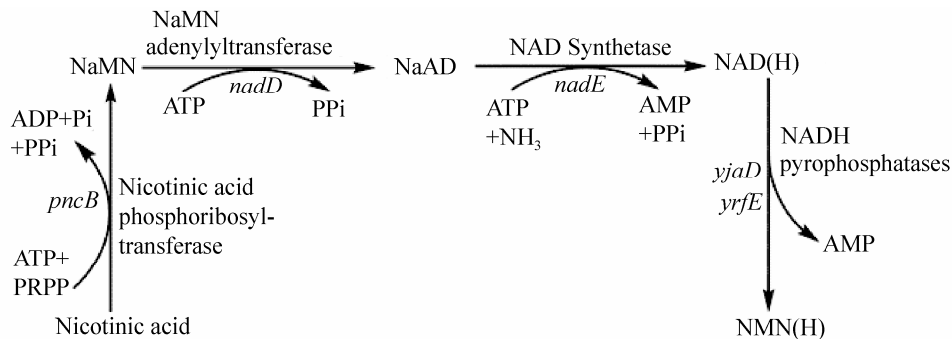


图 2 大肠杆菌 NAD(H)的生物合成与分解途径

Fig. 2 NAD(H) metabolism in *Escherichia coli*. NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NaAD: nicotinic acid adenine dinucleotide; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; NMN: nicotinamide mononucleotide.

成。厌氧摇瓶 48 h 后, *E. coli* BA016 (*E. coli* BA002/pTrc-*pncB*-*pyc*)能够消耗 17.5 g/L 葡萄糖生产 14.1 g/L 丁二酸, 几乎没有丙酮酸的积累, NADH/NAD⁺比例从 0.60 下降到 0.04。3 L 发酵罐实验数据表明, 发酵 112 h, *OD*₆₀₀ 达到 4.64, 耗糖 35.0 g/L, 丁二酸对葡萄糖的得率为 0.71 g/g, 厌氧发酵过程中葡萄糖的消耗速率为 0.42 g/(L·h), 丁二酸的生产强度为 0.28 g/(L·h)。

3 丁二酸发酵过程控制与优化

3.1 CO₂ 供给调控策略

在上述的生产菌株中, 丁二酸的合成过程中需要 CO₂ 的参与, 理论上每生成 1 mol 丁二酸要消耗 1 mol CO₂。不同微生物固定 CO₂ 生成琥珀酸的代谢途径有所差异, 涉及 CO₂ 固定的代谢途径关键酶主要有 PEP 羧化激酶 (*pck*)、PEP 羧化酶 (*ppc*) 和丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 等^[42]。PEP 羧化激酶是野生型菌株 *A. Succiniciproducens*、*A. Succinogenes*、*M. succiniciproducens* 厌氧合成丁二酸代谢途径中 C3 途径向 C4 途径转换的关键酶^[43]。而在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 中, 通过过量表达固定 CO₂ 的关键酶 PEP 羧化酶或引入丙酮酸羧化酶催化丙酮酸

合成草酰乙酸, 能够提高 CO₂ 固定效率, 提高 C4 途径的代谢通量^[27,44]。姜岷课题组^[45]在对 *A. succinogenes* NJ113 研究表明, 以 CO₂ 气体作为 CO₂ 供体时菌体生长、CO₂ 固定效率、琥珀酸产率以及琥珀酸得率均优于碳酸盐。同时 Wang 等^[46]的研究结果表明在 *E. coli* 中, 利用 HCO₃⁻ 如 NaHCO₃ 和 MgCO₃ 比单纯通入 CO₂ 更有效。在 *A. succiniciproducens* 中, CO₂ 浓度可以调节 PEP 羧化激酶的活性, 对琥珀酸的产量有着重要的影响。在高 CO₂ 浓度的培养环境下 (100 mol CO₂/100 mol 葡萄糖), PEP 羧化合成草酰乙酸的能力提高, 琥珀酸为主要还原性产物; 在低 CO₂ 水平下 (10 mol CO₂/100 mol 葡萄糖), *A. succiniciproducens* 以乳酸为主要还原性代谢产物, 而 *A. succinogenes* 以乙醇为主要还原性代谢产物^[47]。*A. succiniciproducens* 培养时增加可利用的 CO₂ 的供给可以提高琥珀酸的得率, 但是会导致菌体细胞量下降, 从而导致琥珀酸的生产速率下降。如果在 CO₂ 气体中混入 H₂ (H₂:CO₂=5:95, 体积比) 提供电子, 琥珀酸得率可以达到 0.60 g/g, 生产速率达到 1.8 g/(L·h)^[8]; 除了直接通入 CO₂, Nghiem 等^[48]研究的结果表明, *A. succiniciproducens* 发酵

所需 CO_2 可由浓度为 1.5 mol/L 的 Na_2CO_3 提供, 此时通入 CO_2 会对琥珀酸产率产生负影响, 但并不影响乙酸的产量。在 Lu 等^[49]对 *E. coli* AFP111 的研究中, 在 pH 值 6.4 的条件下, 当气相中的 CO_2 和 N_2 互相混合时, 将 CO_2 的浓度从 0 增加到 50%, 琥珀酸的产量从 0.04 g/g 增加到 0.75 g/g 。而当 CO_2 的浓度高于 50% 时, 琥珀酸的产量并没有继续增加。而在 *M. succiniciproducens* 中^[50], 当溶解 CO_2 浓度低于 8.74 mmol/L 时, 细胞生长受到严重抑制。而当溶解的 CO_2 从 8.74 mmol/L 增加至 141 mmol/L 时, 细胞生长与琥珀酸的产量与溶解的 CO_2 量成比例增加。溶解的 CO_2 浓度可以通过增加 NaHCO_3 、 MgCO_3 或 CaCO_3 等碳酸盐来实现, 这些碳酸盐对细胞生长和琥珀酸生产也有积极的促进作用。但过多时也会造成细胞生长抑制。McKinlay 等^[51]研究了 NaHCO_3 对产物的形成、菌体生长及代谢效率的影响。低浓度的 NaHCO_3 对其影响较大, 而高浓度基本没有影响, 当浓度在 25 mmol/L 时, 菌体生长速率最大。

3.2 NAD(H)供给调控策略

不同还原态碳源 (如糖, 糖醇, 糖酸) 提供不同量的代谢还原力, 影响代谢产物的分布。微生物厌氧合成丁二酸的代谢途径中, 以大肠杆菌 AFP111 为例, 1 mol 葡萄糖生成 2 mol 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 同时产生 2 mol NADH, 而 2 mol PEP 生成 2 mol 丁二酸需要 4 mol NADH^[52]。所以高还原性底物有利于提高胞内 NADH/NAD⁺ 比例, 提高丁二酸得率。以高还原性碳源甘露醇和阿拉伯糖醇为底物时, *Actinobacillus* sp. 130Z 生产丁二酸的得率明显高于其他碳源 (如葡萄糖, 果糖, 木糖等)^[53]。当重组大肠杆菌 NZN111(pTrcML) 分别以葡萄糖酸钠、葡萄糖、山梨醇等不同还原性碳源为底物时, 发酵得到相应的丁二酸得率分别为 0.1 、 0.3 和 1.1 g/g ^[54]。姜岷课题组^[55]以过量

表达苹果酸酶的大肠杆菌 NZN111 为出发菌株, 分别以甘露醇、葡萄糖和葡萄糖酸钠作为碳源进行发酵, 得到丁二酸得率分别为 1.00 、 0.83 、和 0.41 g/g 。

氧化还原电位 (Oxidation reduction potential, 简称 ORP) 作为控制参数能够反映许多有氧和厌氧发酵过程中发生的有价值的代谢信息。发酵体系中氧化还原电位是 pH 值、溶解氧浓度、平衡常数和大量溶解物质的氧化还原电位的综合反映^[56]。姜岷课题组^[57]在 3 L 发酵罐上利用铁氰化钾和二硫苏糖醇调节发酵体系氧化还原电位值在 $-100 \sim -450 \text{ mV}$, 发现 -350 mV 为产丁二酸放线杆菌 NJ113 细胞生长和产丁二酸的最佳电位, 丁二酸生产速率由 $0.75 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ 提高到 $1.18 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$, 产物丁二酸与副产物乙酸的质量浓度比由 2.5 提高到 3.9 ; 同时姜岷课题组^[58]利用代谢通量分析方法分析氧化还原电位调控对厌氧发酵产丁二酸过程的影响, 发现氧化还原电位调控可以改变 HMP 与 EMP 途径的代谢通量, 影响胞内 NADH/NAD⁺, 进而将丁二酸得率由 0.75 g/g 提高至 0.89 g/g 。

此外, 还原性气体 (氢气) 同样可以提高丁二酸得率。大肠杆菌中存在两种吸收氢气的酶——氢化酶 1 和氢化酶 2^[59-60], 在合适的条件下大肠杆菌可以利用氢气作为电子供体进行代谢、生长。早期文献报道^[61-62], 外源氢气可以为细胞转化苹果酸或富马酸到丁二酸提供还原力, 提高转化率。Lee 等^[8]发现在二氧化碳中添加 5% 的氢气可以同时提高丁二酸的生产强度和得率。Stols 等^[63]报道外源提供氢气可以为过量表达苹果酸酶的大肠杆菌 NZN111 提供大量的代谢还原力, 使丁二酸质量得率从 0.65 g/g 增长到 1.20 g/g 。外源提供氢气同样可以提高过量表达丙酮酸羧化酶的大肠杆菌 AFP111 的丁二酸得率, 并且还可以解除富马酸积累^[52]。

3.3 两阶段发酵条件优化

大肠杆菌作为兼性厌氧菌,其有氧条件下的比生长速率及细胞密度均高于厌氧,因此采用先有氧快速培养获得高密度的菌体细胞,进而厌氧发酵生产丁二酸的两阶段发酵模式,可大幅提高丁二酸的生产速率^[64]。Vemuri等^[52]对两阶段发酵过程中大肠杆菌的代谢途径进行了分析,即还原三羧酸途径和乙醛酸途径,发现理论上在不添加额外电子受体的条件下,重组菌株 *E. coli* AFP111 可消耗 1 mol 的葡萄糖产生 2 mol 的 PEP,当 71.4% 的 PEP 流向还原三羧酸途径,28.6% 的 PEP 流向乙醛酸途径时,得率可达到理论最大值 1.12 g/g。专一性厌氧发酵时由于乙醛酸途径未被激活,丁二酸得率很低,当采用两阶段发酵时,有氧阶段可诱导异柠檬酸裂解酶的表达,并且在厌氧阶段继续保持活性,从而激活了乙醛酸途径,产物的得率也大幅提高。由于有氧阶段的菌体活性影响厌氧阶段丁二酸生产效率,Vemuri等^[65]进一步考察了有氧转厌氧的时机对厌氧阶段丁二酸生产能力的影 响,发现在最佳转厌氧条件下,过量表达丙酮酸羧化酶基因的重组菌株 *E. coli* AFP111 (pTrc99a-*pyc*)可实现厌氧发酵 1.3 g/(L·h)的生产速率以及 1.10 g/g 的丁二酸得率,同时最终浓度可达 99.2 g/L。Martinez等^[66]在利用重组菌株 *E. coli* SBS550MG (pHL413)两阶段发酵产丁二酸过程中,考察了两种有氧培养条件,结果表明在低转速条件下能诱导丙酮酸甲羧裂解酶的表达,提高乙醛酸途径的代谢流通量,最终能实现 1.02 g/g 的丁二酸得率以及 1.3 g/(L·h)的生产速率。Wang等^[44]在利用过量表达 PPC 的 *E. coli* DC1515 时,采用乳糖替代 IPTG 诱导 PPC,结果表明可有效提高了还原三羧酸途径的代谢通量,进而提高了丁二酸的生产速率及得率。Wu等^[67]考察了利用丙酮酸、苹果酸、丁二酸等糖异生碳源有氧培养菌株

对厌氧过程的影响,结果表明均可大幅提高丁二酸的生产性能。而在有氧培养阶段采用乙酸作为碳源时, *E. coli* NZN111^[68]在厌氧阶段可实现 0.84 g/g 的丁二酸得率及 1.13 g/(L·h)的生产速率。以葡萄糖为碳源时,若采用限制性补糖的方式,控制菌体在较低的比生长速率,也可提高菌株的丁二酸生产能力,姜岷课题组^[69]在利用 *E. coli* AFP111 两阶段发酵时,有氧条件下采用限制性补糖的策略控制菌体比生长速率在 0.07 h⁻¹,提高丁二酸合成关键酶活,使丁二酸生产速率达到 1.89 g/(L·h),且丁二酸质量得率在 1.03~1.07 g/g。

在利用重组菌厌氧发酵产丁二酸过程中,由于有机酸的不断积累以及渗透压的持续增高,菌体活力和产酸能力明显下降,但此时菌体细胞仍然具有代谢活力。因此,Andersson等^[70]在发酵过程中通过去除产物丁二酸保持菌体的产酸能力,厌氧发酵 100 h 丁二酸产量相较于两阶段发酵提高了 60%以上。姜岷课题组^[71]通过连续转化法使用无菌水收集菌体置于 BM 培养基中重新发酵,3 次转化后菌体平均生产速率达 1.81 g/(L·h),得率为 0.85 g/g。在此基础上,姜岷课题组^[72]通过在转化后进行有氧诱导进一步提高菌体丁二酸合成关键酶活,在转化后进行 3 h 有氧诱导,菌体产酸能力比未诱导时提高了 45%,同时得率提高了 11%。

3.4 廉价生物质原料的利用

在丁二酸生产制备过程中,原料成本占有极其重要的比例,因此寻求廉价生物质原料作为碳氮源制备丁二酸成为经济型生产过程的重要因素。同时廉价生物质原料的使用可以为农业废弃资源的高效开发和利用提供一条可行的途径,具有深远的影响意义。Liu等^[3]以甘蔗渣糖蜜为碳源时 *A. succinogenes* CGMCC1593,48 h 可发酵产丁二酸 55.2 g/L,生产速率达到 1.15 g/(L·h)。Chen等^[73]

以麦麸水解液为碳源对钝齿棒状杆菌进行丁二酸乳酸混合发酵,初糖为 80 g/L,经过 10 h 发酵产酸,丁二酸产量和乳酸产量分别为 43.6 g/L 和 32 g/L。当以木质纤维素水解液为碳源时,利用 *A. succinicproducing*^[74]可产丁二酸 24 g/L,得率达到 88%。而利用 *M. succinicproducing* MBEL55E^[75]分别进行单批和连续发酵产丁二酸,产酸速率分别为 1.17 g/(L·h)和 3.19 g/(L·h)。作为基因工程菌,大肠杆菌也可以有效地利用一些廉价碳源。*E. coli* SD121^[76]用玉米秸秆酶解液作为碳源两阶段有氧发酵制备丁二酸,可产生 57.81 g/L 的丁二酸,两阶段总生产强度和产率分别为 0.96 g/(L·h)和 0.87 g/g。姜岷课题组^[77]考察了 *E. coli* BA204 纯厌氧和两阶段条件下利用蔗渣水解液产丁二酸的能力,经 72 h 厌氧发酵产丁二酸 15.85 g/L,而经有氧培养后,厌氧发酵阶段 24 h 产 18.88 g/L 丁二酸。同时,姜岷课题组^[78]考察了 *A. succinogenes* 利用米酒残渣产丁二酸的能力,产量最终达到 48 g/L,得率为 0.75 g/g。

在考察各种廉价碳源应用于丁二酸发酵的同时,寻求廉价氮源也是研究的热点之一。Lee 等^[4]利用 *A. succinicproducing* 发酵产丁二酸,通过添加 10 g/L 的玉米浆(CSL),可替代酵母粉和蛋白胨作为氮源,丁二酸产量达到 17.8 g/L,得率为 0.89 g/g。Liu 等^[3]考察了不同氮源对 *A. succinogenes* 发酵产丁二酸的影响,向培养基中添加 12 g/L 干酵母细胞后,丁二酸产量由 30 g/L 提高到 35 g/L。姜岷课题组^[79]以 *A. succinogenes* 为丁二酸生产菌株,以面包酵母的酶解液为氮源,替代进口酵母膏添加到培养基中,研究发酵生产丁二酸的能力,结果表明面包酵母水解液可以替代进口酵母粉作为丁二酸发酵的氮源,在葡萄糖浓度低于 100 g/L 时,丁二酸得率达到 0.68 g/g 以上。在以啤酒废酵母细胞酶解液作为氮源厌氧发酵制备丁二酸,产量达

到近 40 g/L,添加关键维生素后丁二酸产量提高到 47 g/L^[80]。

4 展望

为实现丁二酸低成本生物制造,今后应着重开发菌株适应几类极端工况的抗逆性能:1) 随着葡萄糖等原料成本的不断上涨,以廉价非粮生物质为原料的丁二酸制造工艺已成必然趋势。目前报道的生产菌株对低劣生物质资源的利用效率不高,还需要通过进一步的基因改造与进化筛选以提高菌株对纤维质水解混合糖液中有毒物质的抗逆能力及混合糖的利用效率;2) 高浓度的丁二酸会显著影响菌体生长和产酸效率,而添加大量的 Na_2CO_3 、 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 等碱中和剂也会造成菌体环境的高渗透压,利用合成生物学技术,通过组学分析挖掘关键抗逆元器件并实现生产菌株的适配组装,将极大改善菌株对高产物和高盐体系的抗逆能力;3) 酵母菌能够在偏酸性环境中生长与代谢,即使当 pH 值小于 3 时,其生长与代谢能力依然良好。DSM 与 Roquette 公司联合组建了 Reverdia 公司,并开发了丁二酸的低 pH 值酵母发酵技术,可大幅减少丁二酸生产过程中的酸碱用量,并有利于简化产品精制工艺,这对于构建合理、经济的丁二酸细胞工厂提供了良好的借鉴。

REFERENCES

- [1] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(3): 352-361.
- [2] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51(5): 545-552.
- [3] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol*,

- 2008, 99(6): 1736–1742.
- [4] Lee PC, Lee WG, Lee SY, et al. Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, 5: 379–381.
- [5] Wang QZ, Wu W, Zhao XM. Market analysis for bioconversion of succinic acid and its derivatives. *Chem Ind Eng Prog*, 2004, 23(7): 794–799 (in Chinese).
王庆昭, 吴巍, 赵学明. 生物转化法制取琥珀酸及其衍生物的前景分析. *化工进展*, 2004, 23(7): 794–799.
- [6] Wang QZ, Zhao XM. The research progress of succinic acid fermentation strains. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 570–576 (in Chinese).
王庆昭, 赵学明. 琥珀酸发酵菌种研究进展. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 570–576.
- [7] Lee PC, Lee WG, Kwon S, et al. Batch and continuous fermentation of succinic acid from whey by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54(1): 23–27.
- [8] Lee PC, Lee WG, Kwon S, et al. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂:CO₂ supply and glucose concentration. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 24(8/9): 549–554.
- [9] Lee PC, Lee WG, Lee SY, et al. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochem*, 1999, 35(1/2): 49–55.
- [10] Glassner DA, Datta R. Process for the production and purification of succinic acid: US, 5143834. 1992-09-01.
- [11] Lee PC, Lee SY, Hong SH, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(5): 663–668.
- [12] Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(1): 207–216.
- [13] Guettler MV, Jain MK, Rumler D. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants: US, 5573931. 1996-11-12.
- [14] Ye GZ, Jiang M, Chen KQ, et al. Isolation of NH₄⁺-tolerant mutants of *Actinobacillus succinogenes* for succinic acid production by continuous selection. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(8): 1219–1225.
- [15] Fang XJ, Li J, Zheng XY, et al. Enhancement of succinic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Actinobacillus succinogenes*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(12): 3009–3013.
- [16] Wendisch VF, Bott M, Kalinowski J, et al. Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J Biotechnol*, 2006, 124(1): 74–92.
- [17] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos, SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(5): 1140–1153.
- [18] Chatterjee R, Millard CS, Champion K, et al. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1): 148–154.
- [19] Andersson C, Hodge D, Berglund KA, et al. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(2): 381–388.
- [20] Jantama K, Zhang X, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 881–893.
- [21] Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 229–239.
- [22] Lin H, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng*, 2005, 7(2): 116–127.
- [23] Lin H, Bennett GN, San KY. Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: a study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity,

- and gene expression profile. *Metab Eng*, 2005, 7(5/6): 337–352.
- [24] Lin H, Bennett GN, San KY. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90(6): 775–779.
- [25] Lee SJ, Song H, Lee SY. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 1939–1948.
- [26] Lee SY, Kim JM, Song H, et al. From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(1): 11–22.
- [27] Okino S, Noburyu R, Suda M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(3): 459–464.
- [28] Goldberg I, Lonberg HK, Bagley EA, et al. Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45(6): 1838–1847.
- [29] Gokarn RR, Altman E, Eiteman MA. Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(8): 795–798.
- [30] Liang LY, Liu RM, Ma JF, et al. Increased production of succinic acid in *Escherichia coli* by overexpression of malate dehydrogenase. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(12): 2439–2444.
- [31] Liu RM, Liang LY, Chen KQ, et al. Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(4): 959–968.
- [32] Zhang XL, Jantama K, Shanmugam KT, et al. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(24): 7807–7813.
- [33] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20180–20185.
- [34] Tan ZG, Zhu XN, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improving succinate production. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 4838–4844.
- [35] Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the NADH/NAD⁺ ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 238–247.
- [36] San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 182–192.
- [37] Heuser F, Schroer K, Ltüz S, et al. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 343–353.
- [38] Singh A, Lynch MD, Gill RT. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 347–354.
- [39] Liang LY, Liu RM, Wang GM, et al. Regulation of NAD(H) pool and NADH/NAD⁺ ratio by overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase for succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(5): 286–293.
- [40] Liu RM, Ma JF, Liang LY, et al. Effect of overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Chin J Biotech*, 2011, 27(10): 1438–1447 (in Chinese).
刘嵘明, 马江锋, 梁丽亚, 等. 过量表达烟酸转磷酸核糖激酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(10): 1438–1447.
- [41] Ma JF, Gou DM, Liang LY, et al. Enhancement of succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* with co-expression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and pyruvate carboxylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6739–6747.
- [42] Lin H, San KY, Bennett GN. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(4): 515–523.
- [43] Oh IJ, Lee HW, Park CH, et al. Succinic acid production by continuous fermentation process using

- Mannheimia succiniciproducens* LPK7. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(5): 908–912.
- [44] Wang D, Li Q, Mao Y, et al. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *ptsG* mutant *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(6): 2025–2035.
- [45] Chen KQ, Jiang M, Su L, et al. CO₂ fixation by *Actinobacillus succinogenes* in succinic acid production. Chem Eng, 2009, 37(1): 49–52 (in Chinese).
陈可泉, 姜岷, 苏凛, 等. 产琥珀酸放线杆菌固定 CO₂ 制备丁二酸. 化学工程, 2009, 37(1): 49–52.
- [46] Wang D, Li Q, Li WL, et al. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. Enzyme Microb Technol, 2009, 45(6/7): 491–497.
- [47] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6651–6656.
- [48] Nghiem NP, Davison BH, Suttle BE, et al. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Appl Biochem Biotechnol, 1997, 63(5): 565–576.
- [49] Lu SY, Eiteman MA, Altman E. Effect of CO₂ on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. J Biotechnol, 2009, 143(3): 213–223.
- [50] Song HH, Lee JW, Choi S, et al. Effects of dissolved CO₂ levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. Biotechnol Bioeng, 2007, 98(6): 1296–1304.
- [51] McKinlay JB, Vieille C. ¹³C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO₃ and H₂ concentrations. Metab Eng, 2008, 10(1): 55–68.
- [52] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1715–1727.
- [53] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, et al. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. Arch Microbiol, 1997, 167(6): 332–342.
- [54] Hong SH, Lee SY. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58(3): 286–290.
- [55] Wang GL, Wang YN, Ma JF, et al. Effects of different reduced carbon sources on succinic acid production by anaerobic fermentation of recombinant *Escherichia coli*. China Brewing, 2009, 204(3): 16–19 (in Chinese).
王桂兰, 王益娜, 马江锋, 等. 不同还原性碳源对重组大肠杆菌厌氧发酵生产丁二酸的影响. 中国酿造, 2009, 204(3): 16–19.
- [56] Ishizaki A, Snibai H, Hirose Y, et al. Basic aspects of electrode potential change in submerged fermentation. Agric Biol Chem, 1974, 38: 2399–2405.
- [57] Li J, Jiang M, Chen KQ, et al. Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33(8): 911–920.
- [58] Jiang M, Huang XM, Li J, et al. Effect of redox potential regulation on metabolic flux distribution of succinate production by *Actinobacillus succinogenes*. CIESC J, 2009, 60(10): 2555–2561 (in Chinese).
姜岷, 黄秀梅, 李建, 等. 氧化还原电位调控对产丁二酸放线杆菌代谢通量分布的影响. 化工学报, 2009, 60(10): 2555–2561.
- [59] Menon Nandak, Chatelus Corinne Y, Dervartanian Marie. Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. J Bacteriol, 1994, 176(14): 4416–4423.
- [60] Ballantine SP, Boxer DH. Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol, 1985, 163(2): 454–459.
- [61] Macy Joan, Kulla Hans, Gottschalk Gerhard. H₂-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate: succinate formation. J Bacteriol, 1976, 125(2): 423–428.
- [62] Henderson C. The influence of extracellular hydrogen on the metabolism of *Bacteroides rurninicola*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantiurn*. J Gen Microbiol, 1980, 119(2): 485–491.

- [63] Stols L, Donnelly MI. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2695–2701.
- [64] Nghiem NP, Donnelly M, Millard CS, et al. Method for the production of dicarboxylic acids: US, 5869301. 1999-02-09.
- [65] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microb Biotechnol*, 2002, 28(6): 325–332.
- [66] Martinez I, Bennett GN, San KY. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab Eng*, 12(6): 499–509.
- [67] Wu H, Li Z, Zhou L, et al. Enhanced anaerobic succinic acid production by *Escherichia coli* NZN111 aerobically grown on gluconeogenic carbon sources. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(3): 165–169.
- [68] Wu H, Li Z, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7837–7843.
- [69] Jiang M, Liu S, Ma J, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *E. coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 76(4): 1298–1300.
- [70] Andersson C, Petrova E, Berglund K, et al. Maintaining high anaerobic succinic acid productivity by product removal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33(6): 711–718.
- [71] Ma JF, Jiang M, Chen KQ, et al. Succinic acid production with metabolically engineered *E. coli* recovered from two-stage fermentation. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(10): 1413–1418.
- [72] Ma JF, Jiang M, Chen KQ, et al. Strategies for efficient repetitive production of succinate using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011, 34(4): 411–418.
- [73] Chen XJ, Jiang ST, Li XJ, et al. Production of succinic acid and lactic acid by *Corynebacterium Crenatum* under anaerobic conditions. *Ann Microb*, 2013, 63(1): 39–44.
- [74] Lee PC, Lee SY, Hong H, et al. Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(2): 111–114.
- [75] Kim DY, Yim SC, Lee PC, et al. Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35(6/7): 648–653.
- [76] Wang D, Li Q, Yang MH, et al. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation. *Process Biochem*, 2011, 46(1): 365–371.
- [77] Liu RM, Liang LY, Cao WJ, et al. Succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* using sugarcane bagasse hydrolysate as the carbon source. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 574–577.
- [78] Chen KQ, Zhang H, Miao YL, et al. Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 47(5): 236–240.
- [79] Liu ZM, Chen KQ, Li J, et al. Utilization of yeast hydrolysates in succinic acid fermentation. *Food Sci*, 2009, 30(19): 236–239 (in Chinese).
刘忠敏, 陈可泉, 李建, 等. 酵母细胞的酶解及其在丁二酸发酵生产中的应用. *食品科学*, 2009, 30(19): 236–239.
- [80] Chen KQ, Li J, Ma JF, et al. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 1704–1708.

(本文责编 陈宏宇)