

过量表达异柠檬酸裂解酶对 *ldh*⁻¹ 谷氨酸棒状杆菌产丁二酸的影响

杨超, 郝宁, 严明, 高璐, 许琳

南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009

杨超, 郝宁, 严明, 等. 过量表达异柠檬酸裂解酶对 *ldh*⁻¹ 谷氨酸棒状杆菌产丁二酸的影响. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1696-1700.

Yang C, Hao N, Yan M, et al. Effect of overexpressing isocitrate lyase on succinate production in *ldh*⁻¹ *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1696-1700.

摘要: 谷氨酸棒状杆菌 SA001 是缺失了乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 的菌株。为了增加厌氧条件下经异柠檬酸到丁二酸的代谢通量, 以提高丁二酸的产量。将来自大肠杆菌 *Escherichia coli* K₁₂ 的异柠檬酸裂解酶基因导入谷氨酸棒状杆菌 SA001 (SA001/pXMJ19-*aceA*) 中。该菌经 0.8 mmol/L 的 IPTG 有氧诱导 12 h 后, 转入厌氧发酵 16 h, 丁二酸的产量为 10.38 g/L, 丁二酸的生产强度为 0.83 g/(L·h)。与出发菌株比较, 异柠檬酸裂解酶的酶活提高了 5.8 倍, 丁二酸的产量提高了 48%。结果表明过量表达异柠檬酸裂解酶可以增加由乙醛酸途径流向丁二酸的代谢流。

关键词: 异柠檬酸裂解酶, 谷氨酸棒状杆菌, 丁二酸

Effect of overexpressing isocitrate lyase on succinate production in *ldh*⁻¹ *Corynebacterium glutamicum*

Chao Yang, Ning Hao, Ming Yan, Lu Gao, and Lin Xu

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: *Corynebacterium glutamicum* SA001 is a mutant with lactate dehydrogenase (*ldhA*) deletion. In order to increase metabolic flux from isocitrate to succinate, and to improve the production of succinate under anaerobic conditions, we transduced the gene *aceA* coding isocitrate lyase (ICL) from *Escherichia coli* K₁₂ into *Corynebacterium glutamicum* SA001 (SA001/pXMJ19-*aceA*). After 12 h aerobic induction by adding 0.8 mmol/L of IPTG, the recombinant strain was transferred to anaerobic fermentation for 16 h. Succinate reached 14.84 g/L, with a productivity of 0.83 g/(L·h). Compared to *C. glutamicum* SA001, the activity of ICL of the recombinant strain was increased 5.8-fold, and the succinate productivity was increased 48%. Overexpression of isocitrate lyase will increase the metabolic flux of glyoxylate bypass flowing to succinate.

Keywords: isocitrate lyase, *Corynebacterium glutamicum*, succinate

Received: December 20, 2012; **Accepted:** April 24, 2013

Supported by: Natural Science Foundation of the Higher Education Institutions of Jiangsu Province, China (No. 13KJB530008), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00807).

Corresponding author: Lin Xu. Tel: +86-25-58139919; E-mail: xulin@njut.edu.cn

江苏省高校自然科学研究面上项目 (No. 13KJB530008), 国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2011CBA00807) 资助。

丁二酸作为四氢呋喃 (THF)、1,4-丁二醇、 γ -丁内酯等重要化学品的生产原料,具有良好的经济和环境效益,市场潜力约 245 000 t/年,被广泛应用于食品和医药工业等^[1-2]。以可再生资源为原料的发酵法产丁二酸具有反应条件温和、能耗低、污染少且能固定二氧化碳减少温室效应等优点^[3]。尽管已报道多种微生物可以发酵生产丁二酸,但大多数生产菌在简单培养基中无法生长,用于培养的有机氮源以及产物纯化的费用昂贵^[4]。作为背景最为清楚,各领域研究和应用最多的微生物 *Escherichia coli*^[5-6],经过国内外大量的研究工作,可使 *E. coli* 产丁二酸的产量达到较高水平^[7],但 *E. coli* 对高浓度底物(如葡萄糖和 NH_4^+ 等)及产物耐受性较差,发酵生产丁二酸过程需要补充大量的 Na_2CO_3 或 MgCO_3 等低成本碳酸盐,增加了生产成本和后续处理的难度。

为实现低成本生物法制备丁二酸,获得培养条件简单、耐受性强、副产物少及丁二酸产率高的菌种成为了关键问题。谷氨酸棒状杆菌是一种生长迅速,培养条件简单,具有高渗透压、高糖、高盐的耐受力,能够利用多种碳水化合物作为发酵底物的革兰氏阳性菌,广泛应用于工业生产氨基酸、核苷酸等,在生产价格低廉的丁二酸工艺中,有较明显的优势^[8]。谷氨酸棒状杆菌全基因组测序的完成,推动了基因工程定向改造谷氨酸棒状杆菌的进程^[9]。日本科学家 Yukawa 研究发现 *C. glutamicum* R 在厌氧条件下,虽然生长停滞但保留了主要的代谢功能^[10],能够利用葡萄糖合成乳酸、丁二酸及乙酸,通过基因工程改造及发酵优化,最终提高丁二酸产量^[11]。

C. glutamicum 主要通过葡萄糖形成磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和丙酮酸,在羧化酶作用下合成草酰乙酸进入三羧酸循环,经苹果酸及富马酸,最终生成丁二酸。在此过程中最主要限制因素为 NADH 的供给^[6]。

异柠檬酸裂解酶 (ICL) 是许多以乙酸盐和脂肪酸为碳源的微生物进行乙醛酸循环的关键限速酶^[12]。异柠檬酸裂解酶在谷氨酸棒状杆菌中的活性很低^[13],而在 *E. coli* 中的活性较高^[12],可催化异柠檬酸产生琥珀酸和乙醛酸,改变碳流的流向,使其进入乙醛酸循环。通过乙醛酸途径,每消耗 2 mol 的乙酰辅酶 A 和 1 mol 的草酰乙酸产生 1 mol 的丁二酸和 1 mol 的苹果酸,苹果酸进一步转换为丁二酸,既能提高丁二酸产率,又能减少乙酸形成。1 mol 葡萄糖通过两条合成途径(草酰乙酸-

苹果酸途径和乙醛酸途径) 最优代谢流分布,有可能实现生成 1.71 mol 丁二酸理论产率^[14]。而该方面的研究报道在 *C. glutamicum* 的研究中较为少见,因此我们在 *C. glutamicum* SA001 中诱导表达来自大肠杆菌的异柠檬酸裂解酶,引入乙醛酸代谢途径,提高代谢过程中辅酶 NADH 含量,增加由乙醛酸循环途径到丁二酸的代谢流,考察丁二酸产量及产率的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保藏;质粒 pXMJ19 由本实验室保藏;*C. glutamicum* SA001 由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂

氯霉素、基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购、质粒小量快速提取试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品;DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶、DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为大连宝生物有限公司产品;酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品;其余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 ICL 基因的克隆

引物设计:参照来源于 *E. coli* K12 基因组的 ICL 基因序列设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。并分别在上下游引物的 5'端引入了 *Hind* III 和 *Sma* I 的酶切位点。PCR 反应体系:模板 DNA (50 ng/ μL) 1 μL ; dNTPs (1 mmol/L) 4 μL ;上下游引物 (100 pmol/ μL) 各 1 μL ; DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL) 0.5 μL ; 5 倍缓冲液 10 μL ; ddH₂O 32.5 μL , 总体积 50 μL 。反应程序设计: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 重组质粒的构建

纯化后的 ICL 基因片段以及质粒 pXMJ19 用 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切,把双酶切后得到的产物在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下经 T4 DNA 连接酶作用连接 12 h 以上,在 *E. coli* DH5 α 中转化构建重组质粒 pXMJ19-*aceA*。经含氯霉素平板涂布后挑选抗性克隆,然后提取质粒并进行 *Hind* III 单酶切及 *Sma* I /*Hind* III 的双酶切鉴定。

1.2.3 重组异柠檬酸裂解酶在谷氨酸棒状杆菌 SA001 中的诱导表达

利用电穿孔法进行菌体转化。有氧诱导: 30 °C、220 r/min 培养菌体到 OD_{600} 约 0.9 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 30 °C、220 r/min 诱导 10 h。

1.2.4 酶活检测

具体方法依照参考文献[13]。

1.2.5 培养基

LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 7.0, 氯霉素、氨苄青霉素的终浓度分别为 20 μ g/mL、100 μ g/mL。

种子与好氧发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 尿素 2.5 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $MgSO_4$ 0.4 g/L, Mn^{2+} 0.02 g/L, Fe^{2+} 0.02 g/L, $ZnCl_2$ 100 μ L, $CuSO_4$ 20 μ L, $CaCl_2$ 20 μ L, 生物素 100 μ g/L, VB_1 200 μ g/L (400 μ L), pH 为 7.0。

厌氧发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $MgSO_4$ 0.4 g/L, Mn^{2+} 0.02 g/L, Fe^{2+} 0.02 g/L, $ZnCl_2$ 100 μ L, $CuSO_4$ 20 μ L, $CaCl_2$ 20 μ L, 生物素 100 μ g/L, VB_1 200 μ g/L (400 μ L), pH 为 7.0。

1.2.6 培养条件与方法

有氧摇瓶发酵: 将保藏菌种于 LB 固体抗性培养基活化, 30 °C 培养 24 h。转至 500 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。3% 接种量接种于 500 mL 摇瓶中, 加入 0.5‰ IPTG, 30 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。

厌氧摇瓶发酵: 将菌液全部转至摇管中, 7 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。用厌氧发酵培养基将菌泥充分混匀, 转入 100 mL 摇瓶中, 充入氮气, 添加 28 g/L 碳酸氢钠, 30 °C、220 r/min 振荡, 厌氧培养 16 h。

厌氧补料分批发酵: 补料培养基为 20 g/L 葡萄糖、28 g/L 碳酸氢钠, 在给定时间进行补料。

1.2.7 发酵代谢产物分析

菌体密度是用紫外可见分光光度计在波长 600 nm 处测吸光度值, 细胞干重 (DCW) 是由 DCW 与 OD_{600} 测定的标准曲线换算得到, 换算公式为: DCW (g/L) = $0.4 \times OD_{600}$ 。培养基中的葡萄糖用 DNS 法检测, 有机酸用高效液相色谱法 (HPLC) 检测, 色谱柱为 Thermo Organic Acid, 流动相为 50 mmol/L KH_2PO_4

(pH 2.8), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 210 nm。

2 结果与分析

2.1 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 的克隆与表达

将 PCR 扩增后的目的基因片段 *aceA* 和载体 pXMJ19 分别进行 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 构建表达载体 pXMJ19-*aceA*。

重组质粒经单酶双切鉴定, 结果与预期一致。经测序确定目的基因序列与公开的序列匹配率为 100%。

重组菌与对照菌经 IPTG 诱导好氧培养总蛋白的 SDS-PAGE 分析如图 1 所示。可以看出 ICL 蛋白成功表达, 大小约 43 kDa, 与预期一致。

2.2 ICL 酶活测定

30 °C、220 r/min 培养菌体至 $OD_{600}=0.9$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L, 30 °C、220 r/min 诱导 10 h 后对出发菌株和构建的重组菌株进行粗酶液的相应酶活测定, 计算出粗酶液的比酶活, 结果如表 1 所示。

2.3 厌氧发酵

将重组菌株有氧培养至细胞干重达到 9.6 g/L, 洗菌后转入厌氧发酵瓶中 (细胞干重约为 9 g/L), 加入 28 g/L 碳酸氢钠, 通氮气, 30 °C、220 r/min 培养, 进行厌氧发酵。厌氧发酵 16 h, 取样测 OD_{600} 、残糖、酶活并留样测有机酸含量。通过厌氧发酵 16 h, 葡萄糖消耗为 14.84 g/L, 丁二酸浓度达到 10.38 g/L, 丁二酸的得率为 0.7 g/g 葡萄糖, 丁二酸的生产强度为 0.83 g/(L·h)。厌氧 16 h 后, 出发菌 ICL 的酶活为 0.13 U/mL, 比酶活为 0.12 U/mg; 重组菌 ICL 的酶活依然维持在较高的水平为 0.75 U/mL, 比酶活为 0.45 U/mg, 约为出发菌株的 5.8 倍 (表 2)。

2.4 不同初始糖浓度对 *C. glutamicum* SA001/pXMJ19-*aceA* 厌氧发酵糖耗速率的影响

葡萄糖不但为菌体生长提供原料, 还为厌氧发酵生成丁二酸提供碳源。因此谷氨酸棒状杆菌对葡萄糖的利用率、消耗速率直接与丁二酸的产率相关。重组菌株经好氧培养 12 h 后, 经洗菌后细胞干重达 9 g/L, 在给定碳酸氢钠浓度的条件下, 转入含有不同糖浓度 (10、20、30、40 和 50 g/L) 的摇瓶中, 通入氮气, 30 °C、220 r/min 培养, 进行厌氧发酵。

特定时间取样,测生物量、残糖及有机酸。结果由图 2 可知,不同初始糖浓度对菌的糖耗速率、产酸速率的影响不太明显,生物量也基本维持在 9.6 g/L;初步选择最佳初始糖浓度为 20 g/L,葡萄糖的消耗速率为 0.93 g/(L·h),丁二酸的产率为 0.65 g/(L·h)。

2.5 厌氧补料分批发酵

重组菌株好氧培养 12 h,经洗菌后细胞干重达 9 g/L,转入摇瓶中,通入氮气,30 °C、220 r/min 培养,进行厌氧发酵。给定时间补加葡萄糖和碳酸氢钠,厌氧发酵持续 96 h,取样测 OD_{600} 、残糖并留样测有机酸含量。通过厌氧发酵 96 h,葡萄糖消耗为 74.84 g/L,乙酸浓度达到 11 g/L,丁二酸浓度达到 55 g/L,丁二酸的得率为 0.73 g/g 葡萄糖(图 3),

表 1 对照菌与重组菌的蛋白浓度、ICL 酶活及比酶活

Table 1 Concentration of protein, enzyme activity and specific enzyme activity of ICL in the control strain and in the recombinant strain

Strains	Enzyme activity (U/mL)	Concentration of protein (mg/mL)	Specific enzyme activity (U/mg)
<i>C. glutamicum</i> SA001/pXMJ19	0.1353±0.016	1.257±0.046	0.108±0.044
<i>C. glutamicum</i> SA001/pXMJ19- <i>aceA</i>	0.8433±0.025	1.112±0.098	0.758±0.056

表 2 *C. glutamicum*SA001/pXMJ19 和谷氨酸棒状杆菌 SA001/pXMJ19-*aceA* 厌氧发酵过程中 ICL 酶活、葡萄糖的摄取速率、丁二酸与乙酸的摩尔比和丁二酸的生产速率的对比

Table 2 Comparison of enzyme activity of ICL, glucose uptake rate, succinate titre/acetate titre and succinate production rate between *C. glutamicum* SA001/pXMJ19 and *C. glutamicum* SA001/pXMJ19-*aceA* in anaerobic fermentation process

	<i>C. glutamicum</i> SA001/pXMJ19	<i>C. glutamicum</i> SA001/pXMJ19- <i>aceA</i>
Enzyme activity (U/mL)	0.13 ±0.01	0.75 ±0.02
Specific enzyme activity (U/mg)	0.12±0.02	0.45±0.03
Glucose uptake rate (mmol/(g CDW·h))	0.67±0.04	0.78±0.06
Succinate titre/acetate titre	1.33±0.03	2.18±0.04
Succinate production rate (mmol/(g CDW·h))	0.62±0.03	0.83±0.07

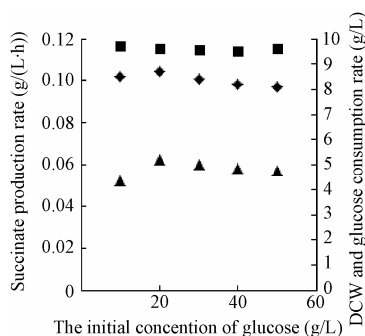


图 2 不同初始糖浓度对 *C. glutamicum* SA001/pXMJ19-*aceA* 厌氧发酵过程菌体干重(■)、糖耗速率(◆)和产酸速率(▲)的影响

Fig. 2 Effect of DCW(■), sugar consumption rate(◆) and the production of succinate(▲) in *C. glutamicum* SA001/pXMJ19-*aceA* anaerobic fermentation process.

除此还积累丙酮酸 2 g/L, α -酮戊二酸 2 g/L, 乙醛酸 1 g/L, 极少量的富马酸。

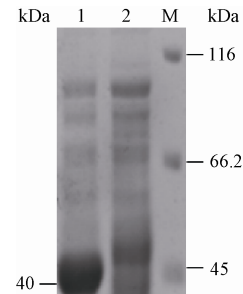


图 1 重组菌与对照菌蛋白电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant strains and the original strains. 1: the recombinant strains; 2: the original strains.

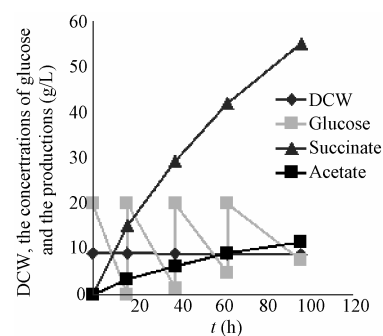


图 3 谷氨酸棒状杆菌 SA001/pXMJ19-*aceA* 厌氧补料发酵过程中的细胞干重、葡萄糖及产物浓度

Fig. 3 DCW, the concentrations of glucose and the organic acids in *C. glutamicum* SA001/pXMJ19-*aceA* after anaerobic batch fermentation. DCW: dry cell weight.

3 结果与讨论

本研究构建了重组谷氨酸棒状杆菌 SA001/pXMJ19-*aceA*, 有氧条件下酶活比出发菌提高了 7 倍, 并在厌氧发酵过程中仍然保持一定活性^[15]。经厌氧发酵 16 h, 葡萄糖消耗 14.84 g/L, 丁二酸浓度达到 10.38 g/L。丁二酸与乙酸的摩尔比为 2.2, 相对于出发菌株提高了 69%, 说明过量表达异柠檬酸裂解酶可以增加由乙醛酸途径流向丁二酸的代谢流。

好氧阶段通过添加终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导异柠檬酸裂解酶在谷氨酸棒状杆菌 SA001 中表达, 在厌氧发酵 16 h 后, 重组菌中的异柠檬酸裂解酶酶活是出发菌株的 6.2 倍, 尽管丁二酸和苹果酸都对异柠檬酸裂解酶有一定的抑制作用^[16]。重组菌在厌氧摇瓶补料发酵 96 h 积累丁二酸 55 g/L, 相对于出发菌株提高了 15%; 乙酸浓度为 11 g/L, 占有机酸总量的 15.5%, 占副产物总量的 68.8%, 说明仅通过过量表达丁二酸生成途径的关键酶, 不能有效降低副产物的含量, 还需敲除或抑制副产物 (如乙酸) 合成途径, 进一步减少流向副产物的代谢流, 降低产量, 并增加丁二酸的产量^[17]; 仅过量表达异柠檬酸裂解酶只能激活谷氨酸棒状杆菌部分乙醛酸循环途径, 还需过量表达苹果酸合成酶打通整个乙醛酸循环, 并希望降低副产物乙酸的含量^[18]。

通过过量表达异柠檬酸裂解酶进行厌氧发酵产丁二酸, 重组菌丁二酸的产量、生产能力相对于出发菌分别提高 48% 和 29%, 但仍有不少副产物, 可进一步通过代谢途径的改造和优化, 增加流向丁二酸的代谢流通量, 过量表达苹果酸合成酶的工作正在进行中。

REFERENCES

- [1] Skorokhodova AY, Gulevich AY, Morzhakova AA. Comparison of different approaches to activate the glyoxylate bypass in *Escherichia coli* K-12 for succinate biosynthesis during dual-phase fermentation in minimal glucose media. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(4): 577–583.
- [2] Wieschalka S, Blombach B, Bott M. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Biotechnol*, 2013, 6(2): 87–102.
- [3] Hermann BG, Patel M. Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 136(3): 361–388.
- [4] Litsanov B, Kabus A, Brocker M, et al. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnol*, 2012, 5(1): 116–128.
- [5] Lin H, Bennett GN, San KY, et al. 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(1): 116–127.
- [6] 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.
- [7] 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 Microbiol Biotechnol*, 2002, 28(6): 325–332.
- [8] Vertès AA, Inui M, Yukawa H. Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 7633–7642.
- [9] Nesvera J, Patek M. Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(3): 459–464.
- [10] Kaori Yasuda, Toru Jojima, Masako Suda, et al. Analysis of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(4): 853–860.
- [11] 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.
- [12] Reinscheid DJ, Eikmanns BJ, Sahm H. Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J Bacteriol*, 1994, 176(12): 3474–3483.
- [13] Prasad MR, Yu PL, Seeto S, et al. The role of isocitrate lyase and the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* growing under glucose limitation. *Res Microbiol*, 2005, 156(2): 178–183.
- [14] Sánchez AM, Bennett GN, San KY, et al. Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains. *Metab Eng*, 2006, 8(3): 209–226.
- [15] Fischer E, Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 46446–46451.
- [16] Michaj G. *Biochemical pathways (part 1)*. 3rd Ed. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH-Biochemica, 1993.
- [17] Renilla S, Bernal V, Fuhrer T, et al. Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 2109–2124.
- [18] Isabel M, Maria-Teresa P, Josefa B, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G. *Europ J Biochem*, 1994, 224(2): 541–548.

(本文责编 郝丽芳)