

## 谷氨酸棒杆菌生产琥珀酸的代谢工程研究进展

夏慧华<sup>1</sup> 尹国民<sup>2</sup> 朱年青<sup>1</sup> 陈涛<sup>1\*</sup>

(1. 天津大学 化工学院 教育部系统生物工程重点实验室 天津 300072)

(2. 烟台只楚药业有限公司 山东 烟台 264002)

**摘要:** 琥珀酸是一种具有重要应用价值的四碳平台化合物。微生物法发酵生产琥珀酸以其社会、环境和经济优势展现出良好的发展前景。谷氨酸棒杆菌被广泛应用于氨基酸、核苷酸等高附加值化学品的工业化生产,在厌氧条件下细胞处于生长停滞状态,但仍能高效利用碳源合成有机酸,通过代谢工程改造的谷氨酸棒杆菌有望成为理想的琥珀酸生产菌株。结合近年来谷氨酸棒杆菌生产琥珀酸取得的最新成果,本文综述了构建高产琥珀酸工程菌株的代谢工程策略、底物的扩展利用,并展望了将来的研究方向。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌, 琥珀酸, 代谢工程, 底物利用

## Progress in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for succinate production

XIA Hui-Hua<sup>1</sup> YIN Guo-Min<sup>2</sup> ZHU Nian-Qing<sup>1</sup> CHEN Tao<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2. Yantai Zhichu Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai, Shandong 264002, China)

**Abstract:** Succinic acid is an important four-carbon platform compound that is widely applied in the pharmaceutical, agricultural and food industry. Biological processes for succinic acid production show a good prospect for its social, environmental and economic benefits. *Corynebacterium glutamicum* is broadly used for industrial production of value-added chemicals such as amino acid and nucleotide. Under anaerobic conditions, *C. glutamicum* cell growth is arrested, but the cells retain the capability to metabolize sugars to various organic acids efficiently. It is thus becoming a desired succinate-production strain by means of metabolic engineering. Combining with the latest achievements of succinic acid production with *C. glutamicum*, this mini-review summarized the metabolic engineering strategies of constructing an efficient succinate-production strain, the expansions of substrate utilization, and the prospects of future research.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*, Succinic acid, Metabolic engineering, Substrates utilization

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CBA00804, 2012CB725203); 天津市自然科学基金项目(No. 12JCYBJC12900); 教育部博士点基金项目(No. 20100032120014)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-22-27406770; 邮箱: chentao@tju.edu.cn

收稿日期: 2013-06-09; 接受日期: 2013-07-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

琥珀酸,学名丁二酸,在化学工业中是合成多种重要大宗化学品如四氢呋喃、1,4-丁二醇、 $\gamma$ -丁内酯和己二酸的基本原料<sup>[1]</sup>。传统的琥珀酸生产是以不可再生资源石油为原料。近年来,随着石油价格的不断增长以及环境污染的压力,生物法制备琥珀酸以其利用可再生资源,固定温室气体二氧化碳等优点成为世界各国关注的焦点<sup>[2-3]</sup>。

琥珀酸是三羧酸循环(TCA)的中间物之一,同时也是微生物代谢途径中的共同中间物,因此微生物成为琥珀酸生物合成的理想宿主。微生物合成琥珀酸指的是通过细菌或者真核生物的发酵方法,以淀粉、糖、甘油或其它微生物能够利用的农林废弃物为原料生产琥珀酸。目前研究最集中的有产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)<sup>[4]</sup>、产琥珀酸厌氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)<sup>[5]</sup>、产琥珀酸曼氏杆菌(*Mannheimia succiniciproducens*)<sup>[6]</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[7]</sup>和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[8-9]</sup>等。

谷氨酸棒杆菌是一种兼性厌氧、生长快速的革兰氏阳性菌。由于其遗传背景清晰且基因操作手段成熟,已被广泛应用于氨基酸、核苷酸、生物塑料以及其它专用化学品的工业化生产。在厌氧的条件下谷氨酸棒杆菌能够高效利用葡萄糖生成各种有机酸。此外,丙酮酸脱氢酶复合体在厌氧条件下处于激活状态,能够提供更多的还原力用于琥珀酸的合成。因此,利用谷氨酸棒杆菌作为宿主生产琥珀酸尤为合适。

本文主要综述谷氨酸棒杆菌生产琥珀酸的研究进展,包括关键酶和代谢途径的分析,高产琥珀酸工程菌株的代谢工程改造以及各种底物的拓展利用等方面。

## 1 谷氨酸棒杆菌的琥珀酸合成途径

在厌氧条件下,野生型谷氨酸棒杆菌主要的发酵产物是乳酸、琥珀酸和乙酸<sup>[10]</sup>。如图1所示,多种碳源经糖酵解和磷酸戊糖途径生成磷酸烯醇

式丙酮酸和丙酮酸;一方面磷酸烯醇式丙酮酸在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*)的催化作用下生成草酰乙酸,另一方面丙酮酸在丙酮酸羧化酶(*pyc*)作用下也转化成草酰乙酸;草酰乙酸继而进入TCA还原臂,经苹果酸脱氢酶(*mdh*)、延胡索酸酶(*fum*)和琥珀酸脱氢酶复合体(*sdhABCD*)的催化最终生成琥珀酸。

在好氧条件下,野生型谷氨酸棒杆菌不积累琥珀酸,失活琥珀酸脱氢酶复合体后,TCA氧化臂被截断,琥珀酸能够少量积累<sup>[9-11]</sup>。

## 2 谷氨酸棒杆菌产琥珀酸的代谢工程改造

### 2.1 琥珀酸的厌氧生产

Dominguez等<sup>[10]</sup>于1993年首次发现在供氧受限的条件下,*C. glutamicum* ATCC 17965大量积累乳酸、琥珀酸和乙酸;当培养基中溶氧充足时,所生成的有机酸又被再次利用。利用代谢通量分析后发现,在氧气供应不足时,磷酸戊糖途径的通量急剧降低,通过生成大量的有机酸维持系统的氧化还原平衡。随后日本地球科学研究所的Yukawa课题组在谷氨酸棒杆菌厌氧生产有机酸方面进行了深入的研究<sup>[12-14]</sup>。Inui等<sup>[15]</sup>利用单基因敲除的方法鉴定出厌氧条件下菌株*C. glutamicum* R的琥珀酸生成途径,失活*C. glutamicum* R中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*)和苹果酸脱氢酶(*mdh*),葡萄糖的消耗和琥珀酸的合成显著降低;失活丙酮酸羧化酶(*pyc*)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(*pckA*)和异柠檬酸裂合酶(*aceA*)对琥珀酸的合成几乎没有影响;同时失活磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶,突变株几乎失去葡萄糖的厌氧代谢能力,从而揭示出磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶为主要的羧化酶,而丙酮酸羧化酶仅参与了部分羧化反应。在培养基中添加 $\text{NaHCO}_3$ 后,葡萄糖的消耗速率提高2.5倍,琥珀酸生产率提高3.6倍;添加丙酮酸同样能够提高葡萄糖的消耗速率和 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 的比例。过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶对琥珀酸的合成没有影响;而过表达丙酮酸羧化酶,琥珀酸产量提高了2倍。

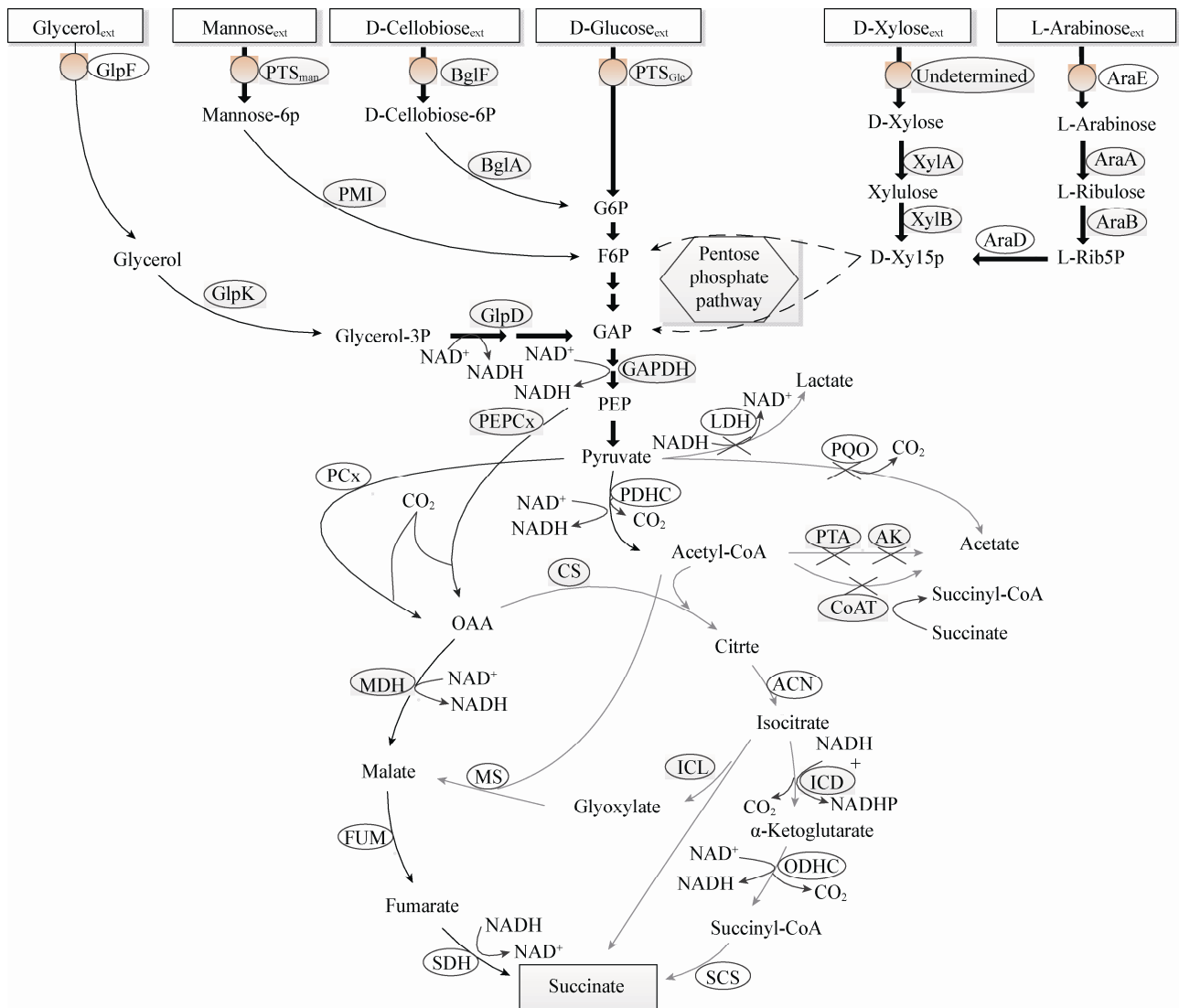


图 1 谷氨酸棒杆菌以各种底物生产琥珀酸的代谢途径

Figure 1 The metabolic pathway of succinate production from various substrates in *C. glutamicum*

Inui等<sup>[16]</sup>进一步对好氧条件下和厌氧条件下的全局转录物组进行了比较,从而更加深入地阐述了谷氨酸棒杆菌在厌氧条件下大量积累有机酸的机理。他们发现当从好氧转入厌氧时,糖酵解途径和有机酸合成途径中一些基因的转录水平显著提高,并在整个厌氧过程中维持较高的转录水平,包括:*gapA*、*pgk*、*tpi*、*ppc*、*ldhA*和*mdh*,同时细胞表现出相对于好氧更高的糖消耗速率。

以*C. glutamicum* R  $\Delta$ *ldhA*-pCRA717为出发菌株,Okino等<sup>[17]</sup>研究了影响琥珀酸产量和得率的相

关因素,发现葡萄糖的初始浓度对琥珀酸的合成几乎没有影响,而 $\text{NaHCO}_3$ 的加入可以显著提高琥珀酸的得率和生产率,生物量越大琥珀酸的生产率越高。采用两阶段的发酵方式:首先好氧条件下进行菌体生物量的富集,然后离心转入到小型厌氧发酵瓶中进行高密度分批补料发酵46 h(初始菌体浓度为50 g CDW/L),琥珀酸产量达到146 g/L,平均得率为1.4 mol/mol glucose。琥珀酸浓度为迄今所报道的最高产量,但是仍然伴随有0.29 mol/mol glucose的乙酸作为主要副产物生成。

为了解决乙酸积累和氧化还原不平衡限制琥珀酸得率这两个问题, Litsanov等<sup>[18]</sup>以 *C. glutamicum* ATCC 13032为出发菌株, (1) 敲除乳酸脱氢酶(*ldhA*)、丙酮酸氧化还原酶(*pqo*)、乙酸激酶(*ackA*)和乙酰辅酶A转移酶(*cat*)得到谷氨酸棒杆菌突变株 BOL-1 (*C. glutamicum*Δ*ldhA*Δ*pqo*Δ*cat*Δ*ackA*); (2) 过表达丙酮酸羧化酶(*pyc*)得到谷氨酸棒杆菌突变株 BOL-2 (*C. glutamicum*Δ*ldhA*Δ*cat*Δ*ackA*Δ*pqo*::*Ptuf-pyc*); (3) 过表达(染色体整合)来源于假丝酵母的甲酸脱氢酶(*fdh*)得到谷氨酸棒杆菌突变株 BOL-3; (4) 以质粒形式过量表达三磷酸甘油醛脱氢酶(*gapA*)。 *C. glutamicum* BOL-2突变株的琥珀酸得率为1.0 mol/mol glucose, 仅积累微量乙酸。以葡萄糖和甲酸为共同底物, *C. glutamicum* BOL-3突变株的琥珀酸得率提高了20%。在以葡萄糖和甲酸盐为碳源的生理盐水培养基中, 初始 $OD_{600}$ 等于50, 通过分批补料发酵53 h, 琥珀酸最终产量为133.8 g/L, 平均琥珀酸比生产率为1.59 mmol/(g CDW·h), 琥珀酸得率为1.67 mol/mol glucose。

## 2.2 琥珀酸的好氧生产

虽然谷氨酸棒杆菌在厌氧条件下合成琥珀酸具有诸多优点, 例如高得率、高产量等。但是由于很难达到最佳氧化还原平衡和最佳ATP平衡<sup>[19-20]</sup>, 所以仍然积累一定量的副产物。此外, 从大规模生产的角度看, 两阶段高密度发酵过程的第一阶段培养菌体需要大型的发酵罐和大型离心机, 对于发酵设备的要求较高, 也不利于控制成本。而这些问题可以通过全程好氧培养来解决。

Litsanov等<sup>[21]</sup>以野生型 *C. glutamicum* ATCC 13032为出发菌株, 首先失活琥珀酸脱氢酶复合体(*sdhCAB*)后发现菌体的生长速率降低了9%, 生物量合成降低了28%, 琥珀酸得率为0.18 mol/mol glucose, 乙酸得率为0.56 mol/mol glucose。与同样基因型的大肠杆菌和酿酒酵母相比, 琥珀酸得率相对较高。进一步失活丙酮酸氧化还原酶(*pqo*)、乙酸激酶-磷酸转乙酰酶操纵子(*ackA-pta*)和乙酰辅酶A转移酶(*cat*)后, 副产

物乙酸的得率显著降低到0.09 mol/mol glucose。过表达乙醛酸循环相关合成酶(*aceA*、*aceB*)对琥珀酸的合成和副产物的合成几乎没有影响, 反而降低了比生长率和葡萄糖消耗速率。单独过表达丙酮酸羧化酶(*pyc*)对琥珀酸的得率没有影响, 共表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*)和丙酮酸羧化酶(*pyc*)却显著提高琥珀酸得率到0.36 mol/mol glucose, 琥珀酸比生产率为1.60 mmol/(g CDW·h), 这是目前所报道的好氧琥珀酸生产的最大比生产率。通过发酵优化, 使得生物量的合成和琥珀酸的生产不偶联, 琥珀酸得率提高到0.45 mol/mol glucose, 琥珀酸最终产量为10.6 g/L, 但是琥珀酸的生产率相对较低[0.77 mmol/(L·h)]。

2013年 Zhu等<sup>[22]</sup>同样以 *C. glutamicum* ATCC 13032为出发菌株, 失活琥珀酸脱氢酶复合体、乙酸和乳酸生成途径, 过表达丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 引入来自于枯草芽孢杆菌的乙酸利用途径, 过表达自身的柠檬酸合酶后, 以丰富培养基培养, 突变株 *C. glutamicum* ZX1(pEacsAglTA)在好氧条件下的琥珀酸得率为0.61 mol/mol glucose。在分批补料好氧培养过程中, 琥珀酸浓度达到241 mmol/L (28 g/L), 这一产量是目前为止所有好氧发酵谷氨酸棒杆菌的研究中琥珀酸产量最高的, 得率为0.63 mol/mol glucose。

## 3 底物的扩展利用

低成本的碳源是工业发酵生产琥珀酸经济、可持续化及规模化的一个重要指标。谷氨酸棒杆菌能够利用多种碳源, 包括单糖(如葡萄糖、乳糖、核糖)、二糖(蔗糖、甘露糖、麦芽糖)、醇类(肌醇、乙醇)、有机酸(丙酮酸、丙酸、乳酸、乙酸、葡糖酸)和氨基酸(L-谷氨酸、L-谷氨酰胺), 但并不自发地利用戊糖(木糖和阿拉伯糖)、甘油或其他生物原料如淀粉(来源于玉米、小麦、木薯或土豆)、半纤维素和乳浆等。利用可再生的非食物原料, 如农业和林业废弃物及生物能源作物, 柳枝稷、麦秆和玉米秸秆, 扩大底物利用范围、进一步降低底物成本是生物法合成琥珀酸的发展趋势。

(1) 甘露糖。Sasaki等<sup>[23]</sup>在谷氨酸棒杆菌中过表达甘露糖-6-磷酸异构酶(*manA*)和果糖渗透酶(*ptsF*), 得到菌株CMR3, 在以甘露糖(18 g/L)和葡萄糖(36 g/L)为共底物的无机盐培养基上厌氧发酵12 h, 积累了100 mmol/L的琥珀酸, 400 mmol/L的乳酸以及少量的乙酸(30 mmol/L)。

(2) 戊糖。包括木糖和阿拉伯糖在内的戊糖作为半纤维素的重要组成成分, 近来在谷氨酸棒杆菌中的利用吸引了很多注意<sup>[24-25]</sup>。Kawaguchi等<sup>[26]</sup>在谷氨酸棒杆菌中以质粒的形式过表达来自大肠杆菌的木糖利用基因 *xyIA* 和 *xyIB*, 得到菌株CRX2, 以36 g/L的木糖为底物进行厌氧发酵时, 琥珀酸生产率约为17 mmol/(L·h), 得率达到理论得率的25%。另外, Kawaguchi等<sup>[27]</sup>在谷氨酸棒杆菌中过表达来自大肠杆菌的阿拉伯糖利用操纵子 *araBAD*, 得到菌株CRA1。CRA1能够以阿拉伯糖为单一底物或以阿拉伯糖和葡萄糖为共底物的无机盐培养基上生长, 但随着阿拉伯糖浓度的降低其消耗速率逐渐降低。CRA1在阿拉伯糖为单一底物的无机盐培养基上厌氧发酵生产琥珀酸得率为0.57 mol/mol arabinose。之后Sasaki等<sup>[28]</sup>将 *C. glutamicum* ATCC 31831的L-阿拉伯糖运输基因 *araE* 分别整合到菌株CRA1和CRX2中, 使得CRA1-AraE能够在低浓度的L-阿拉伯糖(3.6 g/L)中生长, 并且CRX2-AraE在低浓度的木糖(3.6 g/L)中生长速率提高2.9倍。发酵12 h CRX2-AraE和CRA1-AraE积累琥珀酸均约为50 mmol/L。

(3) 甘油。甘油是生物柴油和生物乙醇生产中的主要副产物<sup>[29]</sup>, Litsanov等<sup>[11]</sup>将来源于大肠杆菌的甘油利用基因 *glpFKD* 以质粒形式引入谷氨酸棒杆菌BL-1中, 菌株BL-1/*glpFKD* 积累了9.3 g/L (79 mmol/L) 琥珀酸, 达到理论得率的42% (0.21 mol/mol glycerol)。

(4) 混合糖。Sasaki等<sup>[30]</sup>率先构建了混合糖共利用的菌株X5C1, 在 *C. glutamicum* R的染色体上整合木糖代谢基因 *xyLAB* 和D-纤维二糖代谢基因 *bgIF<sup>317A</sup>* 和 *bgIA*, 得到菌株X5C1。厌氧条件下, 在

含有40 g/L葡萄糖、20 g/L木糖和10 g/L纤维二糖的无机盐培养基上, 菌株X5C1在12 h内同时并完全消耗所有糖, 积累超过450 mmol/L的乳酸和超过100 mmol/L的琥珀酸。此外, 他们又构建了另一个混合糖利用的平台菌株ACX-AraE, 即在菌株X5C1的基础上分别整合了代谢和运输L-阿拉伯糖的基因 *araBAD* 和 *araE*<sup>[28]</sup>。厌氧条件下, 在含有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和纤维二糖的无机盐培养基上, 菌株ACX-araE能同时并且消耗完所有的糖, 主要产物为乳酸和琥珀酸。为谷氨酸棒杆菌在好氧条件下利用混合糖生产琥珀酸提供了一个极有价值的方法和方向。

## 4 展望

谷氨酸棒杆菌代谢工程改造生产琥珀酸取得了良好的进展, 摆脱了常规化学合成法对不可再生资源石油的依赖, 极具发展前景。但目前仍然存在一些问题, 今后的研究方向可以从以下几个方面着手: (1) 基于基因组尺度代谢网络的模拟预测进行琥珀酸合成途径的优化; (2) 重构更加高效的乙醛酸循环; 表达不受胞内代谢物抑制的异柠檬酸合酶和苹果酸合酶; (3) 优化发酵方式。有必要研究单一罐体中好氧和厌氧相组合的发酵方式生产琥珀酸, 对好氧到厌氧阶段的过渡进行优化控制, 提升竞争力; (4) 发展琥珀酸发酵与分离耦合工艺。由于琥珀酸的下游分离纯化成本占总成本的比例较高, 开发新的技术、对原有技术进行深入的改进和耦合, 及时将琥珀酸转移出来, 能够消除高渗透压对细胞的抑制; (5) 以廉价粗原料为发酵底物, 降低琥珀酸发酵生产的底物利用成本。尽管到目前为止, 尚未有直接以粗原料为底物发酵谷氨酸棒杆菌生产琥珀酸报道, 而以粗原料如纤维素(Hemicellulose)<sup>[31]</sup>、淀粉(Starch)<sup>[32-34]</sup>、乳浆<sup>[35]</sup>、青贮(Silage)<sup>[36]</sup>、主要成分为蔗糖和果糖的糖蜜(Molasses)<sup>[37]</sup>、稻秆(Rice straw)和麦麸(Wheat bran)水解液<sup>[38]</sup>等厌氧发酵生产包括尸胺和氨基酸等产品的研究较多, 这为发酵谷氨酸棒杆菌生产琥珀酸的底物扩展利用提供了研究方向和方法。

## 参考文献

- [1] Cheng KK, Zhao XB, Zeng J, et al. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(3): 302-318.
- [2] Bozell JJ, Petersen GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited[J]. *Green Chemistry*, 2010, 12(4): 525-554.
- [3] Wilke D. What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16(1995): 89-100.
- [4] Zou W, Zhu LW, Li HM, et al. Significance of CO<sub>2</sub> donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 87-116.
- [5] Bretz K, Kabasci S. Feed-control development for succinic acid production with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2012, 109(5): 1187-1192.
- [6] Lee JW, Lee SY. Proteome-based physiological analysis of the metabolically engineered succinic acid producer *Mannheimia succiniciproducens* LPK7[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, 33(1): 97-107.
- [7] Thakker C, San KY, Bennett GN. Production of succinic acid by engineered *E. coli* strains using soybean carbohydrates as feedstock under aerobic fermentation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 398-405.
- [8] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [9] Litsanov B, Kabus A, Brocker M, et al. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(1): 116-128.
- [10] Dominguez H, Nezondet C, Lindley ND, et al. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction[J]. *Biotechnology Letters*, 1993, 15(5): 449-454.
- [11] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Glycerol as a substrate for aerobic succinate production in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 6(2): 189-195.
- [12] Okino S, Inui M, Yukawa H. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(4): 475-480.
- [13] Okino S, Suda M, Fujikura K, et al. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 449-454.
- [14] Yamamoto S, Sakai M, Inui M, et al. Diversity of metabolic shift in response to oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum* and its close relatives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 1051-1061.
- [15] Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 7(4): 182-196.
- [16] Inui M, Suda M, Okino S, et al. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions[J]. *Microbiology*, 2007, 153(8): 2491-2504.
- [17] Okino S, Noburyu R, Suda M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 459-464.
- [18] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Towards homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic succinate production from glucose and formate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [19] Chen X, Jiang S, Zheng Z, et al. Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(8): 1250-1255.
- [20] Singh A, Cher Soh K, Hatzimanikatis V, et al. Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 13(1): 76-81.
- [21] Litsanov B, Kabus A, Brocker M, et al. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 5(1): 116-128.
- [22] Zhu N, Xia H, Wang Z, et al. Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60659.
- [23] Sasaki M, Teramoto H, Inui M, et al. Identification of mannose uptake and catabolism genes in *Corynebacterium glutamicum* and genetic engineering for simultaneous utilization of mannose and glucose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(6): 1905-1916.
- [24] Gopinath V, Murali A, Dhar KS, et al. *Corynebacterium glutamicum* as a potent biocatalyst for the bioconversion of pentose sugars to value-added products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 95-106.
- [25] 叶菁, 许敬亮, 肖波, 等. 谷氨酸棒杆菌戊糖代谢利用研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(11): 132-136.
- [26] Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, et al. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3418-3428.
- [27] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertes AA, et al. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77(5): 1053-1062.
- [28] Sasaki M, Jojima T, Kawaguchi H, et al. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(1):

- 105-115.
- [29] Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(3): 213-219.
- [30] Sasaki M, Jojima T, Inui M, et al. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(4): 691-699.
- [31] Buschke N, Schroder H, Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose[J]. *Journal Biotechnology*, 2011, 6(3): 306-317.
- [32] Tateno T, Fukuda H, Kondo A. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying alpha-amylase on its cell surface[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(6): 1213-1220.
- [33] Song Y, Matsumoto K, Tanaka T, et al. Single-step production of polyhydroxybutyrate from starch by using alpha-amylase cell-surface displaying system of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(1): 12-14.
- [34] Vertès AA. Protein secretion systems of *Corynebacterium glutamicum*[M]//*Corynebacterium glutamicum*. Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 351-389.
- [35] Barrett E, Stanton C, Zelder O, et al. Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of Lysine in whey[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2861-2866.
- [36] Neuner A, Heinzle E. Mixed glucose and lactate uptake by *Corynebacterium glutamicum* through metabolic engineering[J]. *Biotechnology Journal*, 2011, 6(3): 318-329.
- [37] Dominguez H, Rollin C, Guyonvarch A, et al. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 254(1): 96-102.
- [38] Gopinath V, Meiswinkel TM, Wendisch VF, et al. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 985-996.



## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！