

大肠杆菌 DH5 α 及其耐乙酸突变株 DA19 在氮源限制下的代谢和关键酶特性研究

Study on the Metabolism of *Escherichia coli* DH5 α and Its Acetate-tolerant Mutant DA19 Based on Key Enzyme Activity Analysis

张晓云, 张艳军, 李志敏, 叶 勤*

ZHANG Xiao-Yun, ZHANG Yan-Jun, LI Zhi-Min and YE Qin*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

摘 要 在氮源限制的基本培养基中对大肠杆菌 DH5 α 及其耐乙酸突变株 DA19 进行连续培养, 通过测定中心代谢途径关键酶的活性分析二者代谢差异。结果表明, DA19 的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)和异柠檬酸脱氢酶(ICDH)活性高于 DH5 α , 而磷酸果糖激酶(PFK)和乙酸激酶(ACK)活性低于 DH5 α , 反映了 DA19 进入磷酸戊糖途径(PPP)的碳流增加, 而进入酵解和乙酸产生(Ack-Pta)途径的碳流减少。因此, 关键酶活差异与 DA19 菌体关于葡萄糖得率提高、副产物乙酸和丙酮酸的生成减少相一致。添加腺嘌呤后, DH5 α 的 G6PDH 和 ICDH 活性增加, PFK 和 ACK 活性降低, 而 DA19 各酶活变化不明显。乙酸钠的添加导致除 PFK 外的其他酶活性均降低, 尤其是 DH5 α 的 ICDH 明显降低, 这些结果反映的中心代谢途径流量变化也与二者生长和代谢副产物积累的变化一致。

关键词 大肠杆菌, 连续培养, 乙酸, 酶活

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0896-06

Abstract The differences in metabolism in *Escherichia coli* DH5 α and its acetate-tolerant mutant DA19 were analyzed based on the activity of key enzymes involved in central metabolism when both strains were continuously cultured in nitrogen source-limited defined media. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) in DA19 increased as compared with those in DH5 α , while acetate kinase (ACK) and phosphofructokinase (PFK) decreased. These indicated that more carbon flux of DA19 entered the phosphopentose pathway (PPP) and less entered the glycolytic (EMP) pathway and acetic acid production (Ack-Pta) pathway. Therefore, the differences in activity of key enzyme coincided with increased cell yield based on consumed glucose ($Y_{X/G}$) and decreased production of acetic acid and pyruvate of DA19. G6PDH and ICDH in DH5 α were up-regulated by addition of adenine, while ACK and PFK were down-regulated. On the other hand, adenine had little effect on those in DA19. The enzymes except PFK in both strains were down-regulated by sodium acetate, especially the activity of ICDH in DH5 α . These results suggested changed flux of central metabolic pathways were also consistent with the changes of growth properties and byproducts formation.

Key words *Escherichia coli*, continuous culture, acetic acid, enzyme activity

Received: December 31 2006; Accepted: January 31 2007.

This work was supported by a grant from the 863 Program (No. 2002AA217021).

* Corresponding author. Tel: +86-21-64252095; E-mail: qye@ecust.edu.cn

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2002AA217021)资助。

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

生物体会对外界环境的变化如营养状况、氧的限制等做出响应,引起代谢的改变^[1],对菌株进行改造,例如敲除单个基因也会导致细胞中心代谢调控发生变化^[2]。而从根本上来说,代谢过程的调控最终依赖于对酶活性的调节。因此,通过测定胞内的酶活水平也可以反映细胞代谢的改变。Peng 等^[1]通过测定中心代谢途径大多数酶的活性,结合双向电泳的结果,发现大肠杆菌通过改变酶活或酶蛋白的表达量调节代谢,以响应碳源和培养条件的改变。Kabir^[3]等利用蛋白质组分析工具和酶活测定发现,*icd* 敲除导致 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶以及 NADP⁺-苹果酸酶活性增加,因此突变株的 CO₂ 比生成速率提高,异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶活性增加,导致乙酸产量降低。

大肠杆菌作为表达外源基因应用最广泛的宿主菌之一,已经应用于许多具有药用价值的蛋白生产。但是大肠杆菌在以葡萄糖为碳源的培养过程中,会分泌乙酸。乙酸累积到一定浓度时,不仅抑制菌体生长,而且降低外源基因表达效率,严重地影响大肠杆菌的生产能力^[4,5]。本实验室由大肠杆菌 DH5 α 筛选出的耐乙酸突变菌 DA19 生长改善,乙酸产量明显降低^[6],外源蛋白人表皮生长因子(EGF)的表达量比 DH5 α 提高了 89.4%^[7],在乙酸浓度高达 12g/L 时 EGF 表达不受影响^[8],但代谢改善的原因仍然不清楚。本文对大肠杆菌 DH5 α 和 DA19 中心代谢途径中关键酶活性进行研究,以分析二者代谢特性差异的原因。

分批培养中,细胞处于一个变化的外界环境中,细胞生理状态也不稳定,因此比较分析生理特性和代谢调控的特点比较困难。而连续培养达到稳态时,细胞处于稳定的生理状态。因此比较分析处于稳态的细胞的酶活特性可以较合理地反映细胞的代谢状况。但 DH5 α 在基本培养基中生长缓慢,容易发生代谢效率高的自发突变。在连续培养中,以碳源作为限制性底物时, DH5 α 会因生长的劣势被突变菌淘汰。而在氮源限制下,这类突变菌不能显示生长优势而不被富集,使 DH5 α 保留,而且氮源限制条件下有利于比较葡萄糖过量时细胞乙酸的产生和对生长影响。因此,本研究选择以氮源作为限制性底物的基本培养基对大肠杆菌 DH5 α 及其耐乙酸突变株 DA19 进行连续培养,比较了二者代谢特性的差异,并通过酶活测定分析了二者代谢差异的原因。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 DH5 α [*supE44* Δ *lacU169*(80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*], DA19 是 DH5 α 的耐乙酸突变株,由本实验室筛选^[6]。DH5 α 和 DA19 均于 25% 甘油中 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基:MN 培养基(g/L):Na₂HPO₄·12H₂O 15.12, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCl₂ 0.011, 葡萄糖 8, 氯化铵 0.3, 1% 维生素 B1 0.2mL, 微量元素(TE)混合液 0.2mL, pH 7.0。微量元素混合溶液含(g/L):FeSO₄·7H₂O 80, MnSO₄·H₂O 10, AlCl₃·6H₂O 10, CoCl₂ 4g, ZnSO₄·7H₂O 2, Na₂MoO₄·2H₂O 2, CuCl₂·2H₂O 1, H₃BO₃ 0.5。

MNAd 培养基为 MN 培养基添加 10 mg/L 腺嘌呤。

MNA 培养基为 MN 培养基添加 3 g/L 乙酸钠。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胍 10, 酵母抽提物 5, NaCl 10, pH 7.2。胰蛋白胍和酵母抽提物均为英国 Oxoid 公司产品。

1.2.2 培养方法:1mL 在 25% 甘油中冷冻保存的 DH5 α 或 DA19 转接入装有 30mL LB 的 250mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}$ C 250r/min 摇床培养过夜。然后转接 3mL 此培养液至装有 100mL MN 培养基的 500mL 摇瓶中, DA19 培养 10h, DH5 α 培养 17h, 作为连续培养二级种子。

连续培养使用 5L 玻璃发酵罐(RIBE-5), 装液量 2.5L, 搅拌转速 500r/min, 培养温度 30 $^{\circ}$ C, 通气量 4L/min, 控制系统采用国家生化工程技术研究中心(上海)开发的 Tophawk 控制软件。蠕动泵控制流加进发酵罐的新鲜培养基及抽出培养液的流速, 使连续培养总体积维持在 2.1L。每隔 4h 取样测定 OD₆₀₀、葡萄糖和 pH 以及副产物乙酸、丙酮酸和乙醇的浓度, 连续三次不变即认为达到稳态。

1.3 分析方法

菌体浓度采用浊度法测定。将细胞培养液适当稀释后, 在 600nm 测定其光密度(OD₆₀₀), 并根据 OD₆₀₀ 与菌体干重的线性关系计算干重。葡萄糖浓度用葡萄糖试剂盒测定。铵离子采用 Berthelot 比色法测定。副产物乙酸和丙酮酸浓度用离子色谱法(Dionex ICS1500 离子色谱仪, Ionpac AS11-HC 4mm \times 250mm 阴离子分析柱, Ionpac AG41-HC 4mm \times 50mm

保护柱,电导检测器)测定,乙醇浓度用气相色谱法测定。

1.4 酶活测定

1.4.1 样品制备:一定体积的发酵液自发酵罐中取出后迅速用冰水浴冷却,4°C 8 000r/min 离心 15min,弃上清液。菌体用 4°C 100mmol/L pH 7.0 Tris-HCl (含 20mmol/L KCl, 5mmol/L MnSO₄, 2mmol/L DTT 和 0.1mmol/L EDTA)洗涤并离心 3 次。菌体再重悬于相同的洗液中(大约 0.2g 湿菌体重悬于 1mL 洗液)。用超声波粉碎机破碎细胞(φ6 变幅杆,功率为 200W,工作时间为 3s,间歇时间为 10s,工作次数为 35 次)。破碎时样品置于冰水浴冷却。破碎后于 4°C, 15 000 r/min 离心 20min,收集上清液,立即测定酶活。

1.4.2 测定方法:酶活的测定采用 37°C(乙酸激酶 30°C)恒温反应,记录 OD 值变化的分光光度法。1 个单位(u)的酶活定义为在测定条件下每分钟形成 1μmol 产物所需要的酶量。本文采用比酶活(即单位干菌体的酶活, U/mg DCW)。反应体系的总体积为 1.5mL,每一种酶的酶活为三次测定的平均值。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)^[9] pH 7.5 Tris-HCl 50 mmol/L, NADP⁺ 0.38mmol/L, MgCl₂ 6.3mmol/L, 6-磷酸葡萄糖 3.3mmol/L, 马来酰亚胺 5mmol/L。磷酸果糖激酶(PFK)^[10] pH 8.2 Tris-HCl 80mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L 6-磷酸果糖 6.7mmol/L, 醛缩酶、α-磷酸甘油脱氢酶和磷酸丙糖异构酶各 1u, NADH 0.15mmol/L, ATP 1mmol/L。异柠檬酸脱氢酶(ICDH)^[11] pH 7.3 三乙醇胺缓冲液 65mmol/L, MnCl₂ 1.67mmol/L, NADP⁺ 0.42mmol/L, D-异柠檬酸 6.7mmol/L。乙酸激酶(ACK)^[12] pH 7.2 咪唑-HCl 缓冲液 57mmol/L, ATP 10mmol/L, PEP 1.92mmol/L, NADH 0.45mmol/L,

MgCl₂ 20mmol/L, KCl 75mmol/L, PK 4u, LDH 55u, 乙酸钠 15mmol/L。异柠檬酸裂解酶(ICL)^[13] pH 7.0 磷酸钾缓冲液 100mmol/L, MgCl₂ 5mmol/L, DTT 1mmol/L, NADH 0.3mmol/L, LDH 20u, 异柠檬酸 5mmol/L。

2 结果与讨论

2.1 DH5α 和 DA19 在基本培养基中连续培养

DH5α 和 DA19 在氮源限制的 MN、MNAd 和 MNA 培养基中进行连续培养,使 DH5α 和 DA19 在相同的稀释率(D)下达到稳态。二者在同样比生长速率(μ)下的稳态代谢特性见表 1。

可以看出,在三种培养基中,相同 μ 下 DA19 菌体关于葡萄糖的得率(Y_{X/G})都高于 DH5α,而以菌体为基准的乙酸生产(Y_{AX})低于 DH5α,葡萄糖的比消耗速率(Q_G)和乙酸的比生成速率(Q_A)都比 DH5α 低;二者都有丙酮酸积累,但 DA19 丙酮酸的比生成速率(Q_{pyr})低于 DH5α。在 MN 和 MNAd 培养基中连续培养时, DH5α 有乙醇积累,而 DA19 没有。添加腺嘌呤对 DH5α 的影响较大, Q_G 和 Q_A 都降低, Y_{X/G} 和 Q_{pyr} 增加;而 DA19 仅 Q_{pyr} 增加。添加乙酸钠后, DH5α 和 DA19 的 Q_A 均比在 MN 培养基中低,但 DH5α 的 Q_A 仍然比 DA19 高;二者的 Y_{X/G} 均下降,而 Q_G 和 Q_{pyr} 增加,并且 DH5α Q_{pyr} 增加了 60%, 增加幅度大大超过了 DA19,但 DH5α 和 DA19 发酵液中均没有乙醇积累。在 MNAd 培养基中,提高 μ 后二者 Q_G 和 Q_A 增加,而 Q_{pyr} 却大大降低, DH5α 降低了 41%, 而 DA19 降低了 60%。

表 1 DH5α 和 DA19 在基本培养基中连续培养的代谢特性

Table 1 The metabolic performances of DH5α and DA19 continuously cultured in defined media

Medium	Strain	D /h ⁻¹	X (g/L)	Acetate (g/L)	Y _{X/G} (g/g)	Q _G (g/g·h)	Y _{AX} (g/g)	Q _A (g/g·h)	Y _{X/NH4Cl} (g/g)	Y _{pyr/X} (g/g)	Q _{pyr} (g/g·h)	Y _{eth/X} (g/g)
MN	DH5α	0.13	0.638	0.496	0.181	0.708	0.777	0.099	2.304	1.477	0.189	0.058
	DA19	0.13	0.632	0.332	0.223	0.600	0.525	0.070	2.297	0.820	0.110	0
MNAd	DH5α	0.13	0.625	0.361	0.197	0.666	0.577	0.076	2.316	1.502	0.197	0.066
	DA19	0.13	0.618	0.333	0.219	0.612	0.539	0.072	2.331	1.287	0.172	0
	DH5α	0.16	0.626	0.466	0.200	0.815	0.745	0.121	2.303	0.891	0.145	0.099
	DA19	0.16	0.632	0.350	0.226	0.742	0.555	0.093	2.209	0.515	0.086	0
MNA	DH5α	0.13	0.573	0.255	0.178	0.755	0.445	0.060	2.249	2.360	0.316	0
	DA19	0.13	0.530	0.200	0.203	0.642	0.378	0.049	2.254	1.047	0.136	0

2.2 DH5α 和 DA19 关键酶活的比较

在大肠杆菌中,参与糖代谢的重要的中心代谢

途径包括糖酵解途径(EMP)、磷酸戊糖途径(PPP)、三羧酸(TCA)循环和乙醛酸支路(GS)以及代谢副产

物乙酸的产生途径 Pta-AckA 途径(图 1)。葡萄糖经 PTS 系统摄取到胞内后变成 6-磷酸葡萄糖,6-磷酸葡萄糖分别进入 EMP 和 PPP。PFK 和 G6PDH 分别是这两条途径的限速酶^[14]。进入 EMP 的碳源在乙酰 CoA 节点分支,一部分进入三羧酸循环,超过三羧酸循环容量的部分进入乙酸形成途径。进入三羧酸循环的碳流在形成异柠檬酸后有两个流向:继续三羧酸循环或者进入乙醛酸支路。ICDH 是三羧酸循环与乙醛酸支路分支后的第一个酶,也是三羧酸循环的一个重要酶,而异柠檬酸裂解酶(ICL)是乙醛酸支路的一个重要酶。通过比较 DH5 α 和 DA19 这几种酶的活力,可以从一定程度上反映它们代谢的差异,酶活测定结果见图 2。

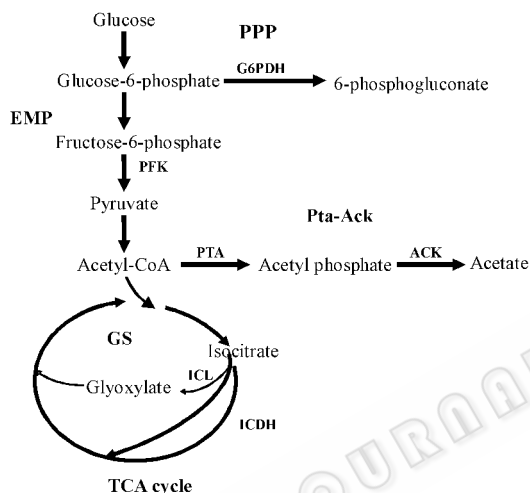


图 1 葡萄糖的主要代谢途径

Fig.1 The pathways involved in glucose metabolism

在三种培养基中,相同 μ 下 DA19 的 G6PDH 活性都比 DH5 α 高,而 EMP 的关键酶——PFK 的活性

都低于 DH5 α ;TCA 循环的 ICDH 的活性高,而乙酸形成途径的 ACK 的活性低。乙醛酸支路的 ICL 的活性很低(数据未显示),与文献 [1,15] 中以乙酸为碳源时的活性相比较可以忽略不计,主要是因为葡萄糖对异柠檬酸裂解酶存在阻遏作用。添加腺嘌呤后, DH5 α G6PDH 活性增加,PFK 和 ACK 活性都降低,而 DA19 各酶的活性没有明显变化。添加乙酸钠后,除 PFK 外 DH5 α 和 DA19 各种酶活性都降低,尤其是 ACK 和 ICDH, DH5 α 的 ICDH 活性比没有添加乙酸钠时降低了 29%,只有 DA19 的 70%。随着 μ 的提高, DH5 α 和 DA19 这几种酶的活性都增大(ICL 除外)。

PPP 提供菌体合成所必需的前体物质和还原力(NADPH),对于菌体合成和抵抗氧化压力是非常重要的^[16,17]。在 MN 培养基中,相同 μ 下 DA19 的 G6PDH 活性明显高于 DH5 α ,而 EMP 的 PFK 活性低于 DH5 α ,表明 DA19 PPP 的流量增大而 EMP 的流量减小,因此菌体关于葡萄糖的得率高于 DH5 α 。依赖于 NADP⁺ 的 ICDH 活性高反映 TCA 流量大,从而可提供更充分的 NADPH 和 NADH,有利于菌体合成和能量产生^[18]。产生乙酸的 Ack-Pta 途径是除氧化磷酸化外可以为细胞提供最高能量的途径^[19,20]。DA19 的 ICDH 活性高于 DH5 α ,而 ACK 活性低于 DH5 α ,反映 DA19 EMP 形成的丙酮酸更多地通过 TCA 循环为细胞提供结构物质前体、还原力和能量,而通过乙酸形成途径提供能量的碳流减少,表明 DA19 TCA 循环/电子传递链的能力高于 DH5 α 。超过 TCA 循环和乙酸形成途径的碳流则以丙酮酸的形式积累,对于 DH5 α ,可能由于 TCA 循环/电子传递链的

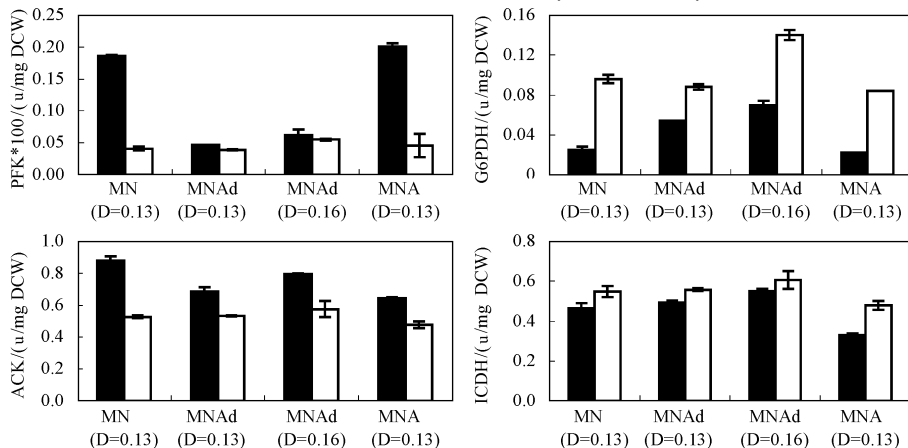


图 2 DH5 α 和 DA19 在基本培养基中连续培养的关键酶的活性

Fig. 2 The activities of key enzymes in DH5 α and DA19 continuously cultured in defined media

The solid columns denote the activities of key enzymes in DH5 α , the blank columns denote the activities of

key enzymes in DA19. The activity of every key enzyme was the average of three measurements.

有限能力导致一部分碳流通过乙醇产生途径氧化 NADH。

添加腺嘌呤后(MNAd 培养基),DH5 α 的 G6PDH 活性增加而 PFK 活性降低,因此 EMP 流量减少而 PPP 的流量增加,更多的碳源用于菌体合成;ICDH 活性提高而 ACK 活性降低,表明通过 EMP 的碳源更多地进入 TCA 循环,而进入乙酸形成途径提供能量的部分减少,因而菌体得率提高。DA19 的酶活在添加腺嘌呤后没有明显改变,因此 DA19 菌体关于葡萄糖的得率和乙酸的比生成速率变化不明显。存在外源腺嘌呤时,细胞从头合成途径被关闭,细胞利用补救合成途径—主要是在磷酸核糖转移酶的作用下合成嘌呤核苷酸^[14-21]。因而 DH5 α 和 DA19 在 MNAd 培养基中,嘌呤从头合成途径流量减少或完全受阻,嘌呤核苷酸从头合成途径所需的甘氨酸减少,导致由 3-磷酸甘油酸进入甘氨酸的流量减少,因此进入丙酮酸的流量加大而丙酮酸比生成速率增加。

在 MN 培养基中添加乙酸钠后(MNA 培养基),DH5 α 和 DA19 G6PDH 活性均有所降低而 PFK 活性均有增加,因此二者用于菌体合成的碳源流量减少,而进入 EMP 的流量增加,但 ICDH 和 ACK 活性均降低,反映进入 TCA 循环和乙酸形成途径的碳流均减少,所以尽管乙酸产生减少,但丙酮酸比生成速率增加,因而菌体关于葡萄糖得率降低。但 DH5 α 的 G6PDH 和 ICDH 活性仍然低于 DA19,而 PFK 和 ACK 活性高于 DA19,因此 DH5 α 菌体得率低于 DA19,而乙酸和丙酮酸得率高于 DA19。在 MNA 培养基中,二者乙酸生成减少与 Polen^[22]的实验结果一致,Polen 认为存在外源乙酸时细胞倾向于避免自身乙酸的生成。

对大肠杆菌 K-12 来说,同一菌株 PP 途径的 G6PDH 和 6PGDH 是依赖于其生长速率的^[23-24]。随着比生长速率的提高,DH5 α 和 DA19 的 G6PDH 活性提高,进入 PPP 的碳流量增加以满足菌体更快的生长需求;PFK 活性增加,ICDH 和 ACK 的活性也增加,表明通过 TCA 循环为细胞提供还原力和能量的碳流增加,由乙酸形成途径提供能量的碳流也增加,以满足更快的菌体生长需求,因此丙酮酸的积累减少。

3 结论

在氮源限制的基本培养基中连续培养,相同稀释率下 DA19 菌体关于葡萄糖的得率高于 DH5 α ,而

副产物乙酸、丙酮酸的比生成速率低于 DH5 α 。添加腺嘌呤使 DH5 α 菌体得率提高,乙酸产生减少,DH5 α 和 DA19 丙酮酸比生成速率均增加。添加乙酸钠后二者菌体得率均降低,乙酸产生减少而丙酮酸积累增加。

酶活分析结果表明,相同比生长速率下 DA19 的 G6PDH 和 ICDH 活性高于 DH5 α ,而 PFK 和 ACK 活性低于 DH5 α ,显示 PPP 流量提高使菌体得率高而乙酸产量降低。添加腺嘌呤后 DH5 α G6PDH 和 ICDH 活性增加,而 PFK 和 ACK 活性降低,菌体得率增加而乙酸产量降低,而 DA19 各酶活变化不明显,代谢特性也没有明显变化,显示 DH5 α 腺嘌呤从头合成能力的限制。在 MN 培养基中添加乙酸钠,PFK 活性有所增加,而 G6PDH、ICDH 和 ACK 活性降低,所以二者菌体得率和乙酸产量均降低。

综上所述,耐乙酸突变株 DA19 中心代谢途径酶活改变,使其菌体生长增加而乙酸产量降低,这对于控制大肠杆菌发酵中乙酸的产生具有重要的指导意义,为改造菌种提供理论依据。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Peng L, Shimizu K. Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **61**: 163–178.
- [2] Zhao J, Tomoya B, Hirotada M. Analysis of metabolic and physiological responses to *gnd* knockout in *Escherichia coli* by using C-13 tracer experiment and enzyme activity measurement. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **220**: 295–301.
- [3] Kabir MM, Shimizu K. Metabolic regulation analysis of *icd*-gene knockout *Escherichia coli* based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, **65**: 84–96.
- [4] Lee SY. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 1996, **14**: 98–105.
- [5] Brown SW, Meyer HP, Fiechter A. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, **23**: 5–9.
- [6] Zhu CQ (朱才庆), Ye Q (叶勤). Selection of acetate-tolerant mutants from *Escherichia coli* DH5 α and the metabolic properties of mutant DA19. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2003, **43**: 460–465.
- [7] Zhu CQ (朱才庆). Research on selection and metabolic properties of acetate-tolerant mutants from *Escherichia coli* DH5 α . Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学

- [8] Han Y(韩云). Fed-batch culture of acetate-tolerant *Escherichia coli* for secretory expression of human epidermal growth factor (hEGF). Shanghai: East China University of Science and Technology(华东理工大学硕士学位论文),2005.
- [9] Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis. Berlin:Verlag Chemie, 1983, V3:190-196.
- [10] Willis A. Methods in Enzymology. New York:Academic Press, 1982, V90:91-93
- [11] Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis. Berlin:Verlag Chemie, 1983. V3:183-188.
- [12] Willis A. Methods in Enzymology. New York:Academic Press, 1982, V90:179-183.
- [13] Mariët J, Van der W, Michael VG. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, 1997, **167**:332-342
- [14] Shen T(沈同), Wang JY(王镜岩). Biochemistry. 2nd ed, Beijing:High Education Press, 1990.
- [15] Gerstmeir R, Wendisch VF, Schnicke S. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2003, **104**:99-122.
- [16] Zhao J, Baba T, Mori H. Effect of *zuf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metabolic Engineering*, 2004, **6**:164-174.
- [17] Giro M, Carrillo N, Krapp AR. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2006, **152**:1119-1128.
- [18] Holms WH. The central metabolic pathways in *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branchpoint, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, 1986, **28**:69-105.
- [19] Chang DE, Shin S, Rhee JS. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**:6656-6663.
- [20] Andersen KB, von Meyenburg K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology*, 1980, **144**:114-123.
- [21] Hochstadt-Ozer J, Stadtman ER. The regulation of purine utilization in bacteria II adenine phosphoribosyltransferase in isolated membrane preparations and its role in transport of adenine across the membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971, **246**(17):5304-5311.
- [22] Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, et al. DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**:1759-1774.
- [23] Pease AJ, Wolf RE. Determination of the Growth Rate-Regulated Steps in expression of the *Escherichia coli* K-12 *gnd* Gene. *Journal of Bacteriology*, 1994, **176**(1):115-122.
- [24] Wolf RE Jr, Prather DM, Shea FM. Growth-rate-dependent alteration of 6-Phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1979, **139**(3):1093-1096.