

工业生物技术

重组大肠杆菌利用蔗糖及糖蜜发酵生产丁二酸

李凤, 马江锋, 吴明科, 冀亚亮, 陈吴方, 任心怡, 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

李凤, 马江锋, 吴明科, 等. 重组大肠杆菌利用蔗糖及糖蜜发酵生产丁二酸. 生物工程学报, 2015, 31(4): 534-541.

Li F, Ma JF, Wu MK, et al. Succinic acid production from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 534-541.

摘要: 富含蔗糖的甘蔗糖蜜可作为制备丁二酸的廉价原料。然而生产丁二酸的潜力菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* AFP111 不能代谢蔗糖。为了使其具有蔗糖代谢能力, 将 *E. coli* W 中非 PTS 蔗糖利用系统蔗糖通透酶的编码基因 *cscB*, 果糖激酶的编码基因 *cscK* 和蔗糖水解酶的编码基因 *cscA* 克隆并表达达到 AFP111 中, 获得重组菌株 AFP111/pMD19T-*cscBKA*。经厌氧发酵验证, 重组菌株 72 h 消耗 20 g/L 蔗糖, 丁二酸产量达到 12 g/L。在 3 L 发酵罐中采用有氧阶段培养菌体、厌氧阶段发酵的两阶段发酵方式, 厌氧发酵 30 h, 重组菌株以蔗糖和糖蜜为碳源丁二酸产量分别为 34 g/L 和 30 g/L。结果表明, 通过外源引入非 PTS 蔗糖利用系统, 重组菌株具有较强的代谢蔗糖生长及合成丁二酸的能力, 并且能够利用廉价糖蜜发酵制备丁二酸。

关键词: 大肠杆菌 AFP111, 非 PTS 蔗糖利用系统, 蔗糖, 糖蜜, 丁二酸

Succinic acid production from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli*

Feng Li, Jiangfeng Ma, Mingke Wu, Yaliang Ji, Wufang Chen, Xinyi Ren, and Min Jiang

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

Abstract: Sugarcane molasses containing large amounts of sucrose is an economical substrate for succinic acid

Received: July 9, 2014; **Accepted:** October 27, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733901), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A203), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, Program for New Century Excellent Talents in University.

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

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB733901), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A203), 江苏高校优势学科建设工程项目, 新世纪优秀人才支持计划资助。

production. However, *Escherichia coli* AFP111 cannot metabolize sucrose although it is a promising candidate for succinic acid production. To achieve sucrose utilizing ability, we cloned and expressed *cscBKA* genes encoding sucrose permease, fructokinase and invertase of non-PTS sucrose-utilization system from *E. coli* W in *E. coli* AFP111 to generate a recombinant strain AFP111/pMD19T-*cscBKA*. After 72 h of anaerobic fermentation of the recombinant in serum bottles, 20 g/L sucrose was consumed and 12 g/L succinic acid was produced. During dual-phase fermentation comprised of initial aerobic growth phase followed by anaerobic fermentation phase, the concentration of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses was 34 g/L and 30 g/L, respectively, at 30 h of anaerobic phase in a 3 L fermentor. The results show that the introduction of non-PTS sucrose-utilization system has sucrose-metabolizing capability for cell growth and succinic acid production, and can use cheap sugarcane molasses to produce succinic acid.

Keywords: *Escherichia coli* AFP111, non-PTS sucrose-utilization system, sucrose, sugarcane molasses, succinic acid

丁二酸 (Succinic acid) 是一些原核和真核微生物的主要中间代谢产物,作为重要的 C4 平台化合物广泛应用于食品、农业和制药行业^[1-3]。与化学合成法相比,生物转化法生产丁二酸具有利用可再生资源、能耗低、污染小且在发酵过程中可固定温室气体 CO₂ 等优点^[4-5]。

目前利用廉价废弃生物质作为碳源发酵生产丁二酸成为研究热点,木质纤维素原料如秸秆^[6]、玉米芯^[7]、甘蔗渣^[8]等经过处理后得到的水解液中含有大量可发酵糖如木糖、葡萄糖、阿拉伯糖等。利用水解液作为生产丁二酸的原料,能够降低生产成本并减少废弃生物质对环境造成的污染。制糖工业中主要的副产物甘蔗糖蜜,与秸秆等木质纤维素原料相比,不需要进行预处理即含有大量的可发酵糖,其中绝大多数为蔗糖,同时含有无机盐、维生素等成分,可提供微生物生长代谢所需的营养物质,是十分具有潜力的廉价生物质资源^[9-10]。

产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[11]、产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes*^[12] 等野生菌可以利用蔗糖生产较高浓度的丁二酸,但因甲酸、乙酸等副产物积累较多,且其发酵原料成本较高,其工业化进程受到了阻碍。大肠杆菌由于遗

传背景清晰、易操作、培养基要求简单和生长迅速等优点,被广泛研究来获得产丁二酸优秀菌株^[13-15]。但是目前报道的大多数大肠杆菌不能利用蔗糖。Lee 等^[16]通过外源引入来自产琥珀酸曼氏杆菌 *Mannheimia succiniciproducens* 的 *sacC* 使 *Escherichia coli* K12 具有代谢蔗糖的能力。*scrK*、*Y*、*A*、*B*、*R* 基因共同组成 PTS 蔗糖利用系统。通过导入质粒 PUR400 (包含 *scrK*、*Y*、*A*、*B*、*R* 基因), *E. coli* HD701 可以通过 PTS 蔗糖利用系统代谢蔗糖生产氢气^[17]。Wang 等^[18]也将 PTS 蔗糖代谢途径引入过量表达丙酮酸羧化酶的 *E. coli* SBS550MG 中,结果表明重组菌以蔗糖为碳源发酵产丁二酸 32.65 g/L,生产强度达到 0.34 g/(L·h)。除了 PTS 蔗糖利用系统,蔗糖的代谢途径还包含非 PTS 蔗糖利用系统^[19],该系统包含 *cscB*、*cscA*、*cscK*、*cscR* 基因及其自身的启动子 (图 1),基因 *cscR* 编码阻遏蛋白会影响蔗糖的利用^[20],所以 *csc* 基因簇克隆表达时,只克隆 *cscB*、*cscA*、*cscK* 三个基因。Olson 等^[21]将 *E. coli* ATCC 13281 的 *cscBKA* 引入产酪氨酸的大肠杆菌中,使其能够以蔗糖为碳源合成酪氨酸,减少生产酪氨酸的成本。

本研究通过引入来自 *E. coli* W 的非 PTS 蔗糖利用系统,得到重组菌 *E. coli* AFP111/pMD19T-

cscBKA, 使原先不能利用蔗糖生长代谢的 AFP111 具备代谢蔗糖生产丁二酸的能力, 其代谢途径如图 2 所示。并考察重组菌利用廉价废弃甘蔗糖蜜作为碳源经济高效制备丁二酸的可行性。

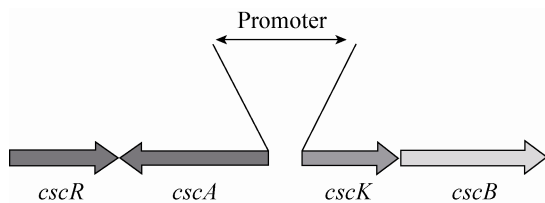


图 1 *E. coli* W 中 *csc* 蔗糖利用系统及其自身启动子
Fig. 1 *csc* sucrose-utilization operon and their native promoter in *E. coli* W.

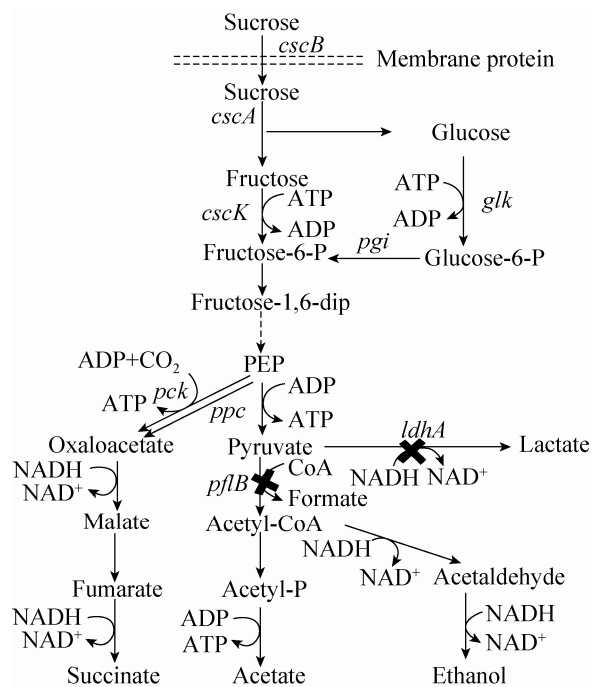


图 2 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 蔗糖代谢途径
Fig. 2 Mechanism of sucrose metabolism in AFP111/pMD19T-*cscBKA*.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* W (ATCC 9637) 由本实验室保藏; 菌株 *E. coli* AFP111 [F^+ λ -*rpoS396*(Am) *rph-1* Δ (*pflAB*::Cam) Δ (*ldhA*::Kan) Δ *ptsG*], 由南伊利诺伊卡本代尔大学 Clark 教授惠赠, 作为宿主菌和对照菌。质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂

氯苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素为上海生工生物工程技术有限公司产品; 基因组提取试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品; 加 A 试剂盒、限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 Solution I 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; CO_2 气体购自南京上元工业气体厂; 甘蔗糖蜜购自广州甘蔗糖业研究所; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *cscBKA* 基因簇的克隆

引物设计: 参照 *cscBKA* 基因簇序列 (来源于 *E. coli* W 基因组, *cscB*、*cscK*、*cscA* 对应的 GenBank Accession No. 分别为 ECW_m2594、ECW_m2595、ECW_m2596), 设计不带酶切位点的引物, 并由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 研究中所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer size (bp)
Forward	CCGGTTGAGGGATAT	27
	AGAGCTATCGAC	
Reverse	CTGTTGATCCGTTGT	25
	TCCACCTGAT	

PCR 反应体系：模板 DNA (*E. coli* W 基因组) (200 ng/ μ L) 0.5 μ L, 上下游引物 (50 μ mol/L) 各 1 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 4 μ L, 10 \times Pyrobest 缓冲液 II 5 μ L, Pyrobest DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 37.5 μ L。总体积 50 μ L。

PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ; 94 $^{\circ}$ C 45 s , 60 $^{\circ}$ C 45 s , 72 $^{\circ}$ C 4 min , 30 个循环 , 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 重组质粒的构建

加“A”反应体系：10 \times A-Tailing 缓冲液 5 μ L, dNTPs 4 μ L, PCR 回收产物 (末端平滑 DNA 片段 260 ng/ μ L) 10 μ L, A-Tailing 酶 0.5 μ L, ddH₂O 30.5 μ L。总体积 50 μ L。72 $^{\circ}$ C 反应 20 min, 最终片段平滑末端分别加“A”碱基。

经过加 A 反应后的片段, 与 pMD19-T 载体在 Solution I 的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 获得重组质粒 pMD19T-*cscBKA* 并转化于 *E. coli* AFP111 感受态中。涂布于含氨苄青霉素、氯霉素和硫酸卡那霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后挑选单菌落, 提取质粒后进行限制性内切酶 *Hind* III 单酶切鉴定。

1.2.3 培养基

种子培养基的配方为：蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 5 g/L, 氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素添加终浓度分别为 25、30、100 μ g/mL。

发酵培养基的配方为：柠檬酸 3 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 4 g/L, KH₂PO₄ 8 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 8 g/L, NH₄Cl 0.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.75 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, CaCl₂·2H₂O 10.0 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg/L, CuCl₂·2H₂O 0.25 mg/L, MnSO₄·H₂O 2.5 mg/L, CoCl₂·6H₂O 1.75 mg/L, H₃BO₃ 0.12 mg/L, Al₂(SO₄)₃ 1.77 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.5 mg/L, 柠檬酸铁 16.1 mg/L, 20.0 mg/L VB₁, 2.0 mg/L 生物素, 氯霉素、硫

酸卡那霉素和氨苄青霉素添加终浓度分别为 25、30、100 μ g/mL, 根据需要补加蔗糖或糖蜜。

1.2.4 培养方法

有氧摇瓶培养：将保存于-80 $^{\circ}$ C 的菌种在加有相应抗生素的 LB 平板上活化, 挑单菌落到 5 mL LB 试管, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 1% 接种量接种到含有 50 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6-8 h。

厌氧血清瓶发酵：10% 的菌液转接到含有 16 g/L 碱式碳酸镁和 20 g/L 蔗糖的发酵培养基中, 通入过滤除菌后的 CO₂ 气体 2 min, 保证血清瓶中为厌氧环境, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 厌氧发酵, 发酵周期 72 h。

3 L 发酵罐两阶段发酵：将种子液以 10% 的接种量接入装有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter; New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.)。初糖浓度为 30 g/L, 20% NaOH 调节 pH 6.8, 37 $^{\circ}$ C 有氧培养至初糖耗尽; 厌氧阶段, 无菌过滤条件下通 CO₂ 气体, 通气量 0.5 L/min, 20% 的 Na₂CO₃ 调节 pH 6.6, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 厌氧发酵 30 h。

1.2.5 发酵及代谢物分析

细胞生长量用紫外可见分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值, 细胞干重 (Dry cell weight, DCW) 由 OD₆₀₀ 换算得到, 换算公式为：DCW (g/L)=0.4 \times OD₆₀₀。发酵过程中糖及有机酸用高效液相色谱法 (HPLC) 检测。色谱柱 BP-100Pb⁺⁺ 用来分析发酵过程中的蔗糖、葡萄糖及果糖, 流动相为 ddH₂O, 流速 0.4 mL/min, 柱温 80 $^{\circ}$ C, 示差折光检测器检测。色谱柱 Prevail Organic Acid 用来分析发酵过程中的有机酸, 流动相为 25 mmol/L KH₂PO₄ (pH 2.5), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 紫外检测器检测, 检测波长 215 nm。

2 结果与分析

2.1 *csc* 基因簇的克隆与表达

PCR扩增后得到的 *cscBKA* 基因片段经过加 A 反应与载体 pMD19-T 进行连接, 构建重组质粒 pMD19T-*cscBKA*。

重组质粒 pMD19T-*cscBKA* 经 *Hind* III 酶切后得到的条带为 6 575 bp (图 3) 结果与预期一致。测序结果显示目的片段与公布的序列 100% 匹配。

2.2 重组菌株 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 与出发菌株 AFP111 厌氧摇瓶利用蔗糖生产丁二酸比较

以蔗糖为唯一碳源进行纯厌氧血清瓶发酵, 比较出发菌株 AFP111 和重组菌株 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 利用蔗糖生产丁二酸的能力, 结果如表 2 所示。

72 h 纯厌氧发酵结束后, 出发菌株 AFP111 细胞干重仅为 0.24 g/L, 没有蔗糖消耗且没有丁二酸的积累, 表明该菌株不能利用蔗糖生产丁二酸; 而 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 通过外源引入非 PTS 蔗糖利用系统, 细胞干重达到 1.51 g/L, 丁二酸产量为 12 g/L, 丁二酸得率为 1.1 mol/mol 单糖 (葡萄糖或者果糖), 表明重组菌株具有了代谢蔗糖并积累丁二酸的能力。

2.3 3 L 发酵罐中 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 利用蔗糖发酵制备丁二酸

大肠杆菌作为兼性厌氧菌, 其在有氧条件

下生长速度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菌体, 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。有氧阶段以 30 g/L 蔗糖为碳源培养重组菌株 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 细胞干重达到 12 g/L, 然后通入无菌 CO₂ 转成厌氧发酵阶段。发酵结果如图 4 所示。厌氧发酵 30 h 后, 丁二酸浓度达到 34 g/L, 丁二酸的得率为 1.16 mol/mol 单糖, 丁二酸的生产强度为 1.13 g/(L·h)。

非 PTS 蔗糖利用系统中, 蔗糖通透酶 (CscB) 将胞外的蔗糖转运至胞内, 胞内的蔗糖被蔗糖水解酶 (CscA) 水解为葡萄糖和果糖, 理论上胞外没有单糖的存在。重组菌株 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 生长及发酵的过程中, 显现出很高的分解蔗糖的能力, 当 DCW 达到

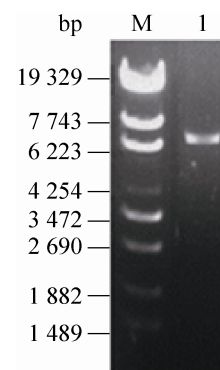


图 3 重组质粒 pMD19T-*cscBKA* 的单酶切鉴定
Fig. 3 Identification of pMD19T-*cscBKA* by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: pMD19T-*cscBKA* digested with *Hind* III.

表 2 对照菌与重组菌以蔗糖为唯一碳源厌氧发酵结果

Table 2 Anaerobic fermentation results of AFP111 and AFP111/pMD19T-*cscBKA* with sucrose

Strains	DCW (g/L)	Sucrose consumed (g/L)	Glucose residue (g/L)	Fructose residue (g/L)	Succinic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Productivity (g/(L·h))
AFP111	0.24±0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AFP111/pMD19T- <i>cscBKA</i>	1.51±0.04	20.48±0.20	2.01±0.10	2.91±0.10	12.00±0.16	1.19±0.09	0.17±0.01

ND: not detected. Each value is the mean of three parallel replicates±standard deviation ($\bar{x} \pm s$).

12 g/L 时, 30 g/L 的蔗糖 30 min 内全部分解为单糖, 细胞外即培养基中检测到大量的葡萄糖和果糖 (图 4A)。并且外源引入 PTS 蔗糖代谢途径的 *E. coli* SBS550MG pHL413 pUR400 在发酵过程中培养基里也有单糖的存在。这是由于外源引入蔗糖利用系统的重组菌株蔗糖分解的速度高于葡萄糖和果糖的利用速率, 胞内积累的单糖渗透到胞外^[18]。

2.4 3 L 发酵罐中 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 利用糖蜜发酵制备丁二酸

在 3 L 发酵罐中考察重组菌 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 以甘蔗糖蜜作为碳源发酵产丁二酸的情况。经 HPLC 测定, 糖蜜中糖的组分为 355 g/L 蔗糖、84 g/L 葡萄糖、84 g/L 果糖, 设定发酵初始糖浓度为 30 g/L, 其中 20.4 g/L 蔗糖、4.8 g/L 葡萄糖、4.8 g/L 果糖, 发酵结果见图 5。

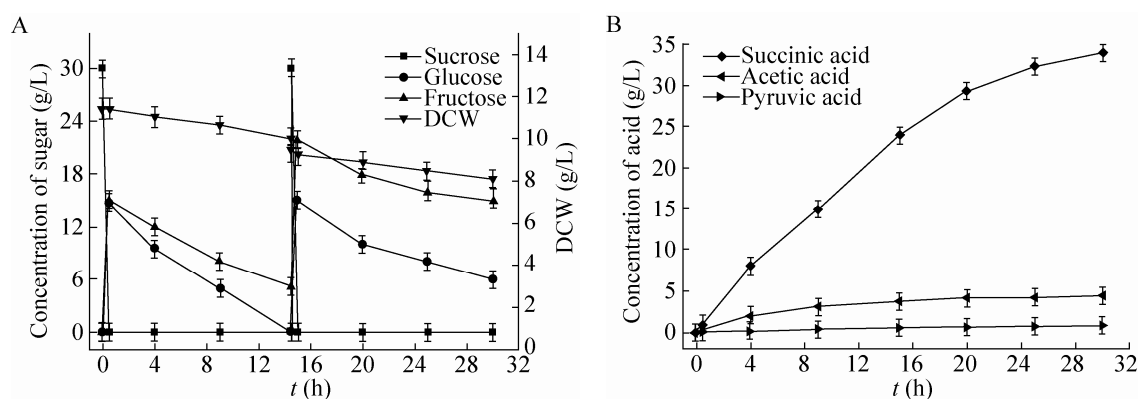


图 4 *E. coli* AFP111/pMD19T-*cscBKA* 在 3 L 发酵罐中以蔗糖为碳源厌氧发酵阶段的细胞干重、糖 (A) 及产物 (B) 浓度

Fig. 4 DCW, the concentrations of sugars (A) and the organic acids (B) in *E. coli* AFP111/pMD19T-*cscBKA* from sucrose after transition to anaerobic-phase fermentation in a 3 L fermentor.

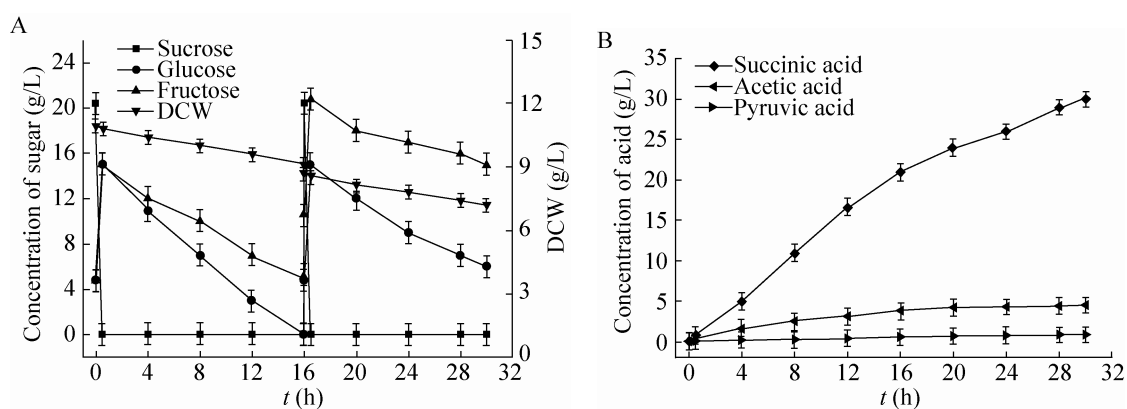


图 5 *E. coli* AFP111/pMD19T-*cscBKA* 在 3 L 发酵罐中以糖蜜为碳源厌氧发酵阶段的细胞干重、糖 (A) 及产物 (B) 浓度

Fig. 5 DCW, the concentrations of sugars (A) and the organic acids (B) in *E. coli* AFP111/pMD19T-*cscBKA* from molasses after transition to anaerobic-phase fermentation in a 3 L fermentor.

发酵过程中,糖蜜中的单糖没有影响蔗糖的分解,与纯蔗糖发酵过程相似,糖蜜中的蔗糖快速分解为葡萄糖和果糖,葡萄糖和果糖被同步利用,这由于宿主菌 AFP111 的磷酸转移酶系统 (PTS) 的 *ptsG* 基因自发突变,解除了碳分解代谢物阻遏现象,因此重组菌在利用葡萄糖和果糖时不存在顺序性。厌氧发酵 30 h,丁二酸浓度达到 30 g/L,丁二酸的得率为 1.13 mol/mol 单糖,丁二酸的生产强度为 1.0 g/(L·h)。通过甘蔗糖蜜与蔗糖发酵结果对比可知,以甘蔗糖蜜为碳源发酵制备丁二酸的生产强度略低于纯蔗糖发酵,这可能由于未经处理的糖蜜中含有金属离子、胶体等,这些物质不利于菌体生长代谢^[22]。

3 结论

Bruschi 等^[23]以 pCR2.1 为载体克隆来自 *E. coli* W 中 *cscBKA* 3 个基因及其自身启动子,使重组菌株能够以蔗糖为碳源生长。本研究证明 pMD19-T 也可以作为载体克隆表达 *cscBKA* 三个基因,且蔗糖利用系统转入到产丁二酸优秀菌株 AFP111 中,重组大肠杆菌 AFP111/pMD19T-*cscBKA* 具有利用蔗糖和廉价糖蜜发酵制备丁二酸的能力。厌氧摇瓶中,以 20 g/L 蔗糖为初始糖浓度,72 h 产生 12 g/L 丁二酸。采用有氧厌氧两阶段发酵,厌氧发酵 30 h 后,以蔗糖为碳源时产生了 34 g/L 丁二酸,丁二酸的得率为 1.16 mol/mol 单糖,丁二酸的生产强度为 1.13 g/(L·h);以糖蜜为碳源时产生了 30 g/L 丁二酸,丁二酸的得率为 1.13 mol/mol 单糖,丁二酸的生产强度为 1.0 g/(L·h)。

REFERENCES

- [1] Jang YS, Kim B, Shin JH, et al. Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(10): 2437–2459.
- [2] Wang QZ, Wu W, Zhao XM. Market analysis for bioconversion of succinic acid and its derivatives. *Chem Ind Eng Prog*, 2004, 23(7): 794–798 (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): 794–798.
- [3] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus GJ. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 727–740.
- [4] Cukalovic A, Stevens CV. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels Bioprod Biorefin*, 2008, 2(6): 505–529.
- [5] Xi YL, Chen KQ, Li J, et al. Optimization of culture conditions in CO₂ fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(9): 1605–1612.
- [6] Zheng P, Dong JJ, Sun ZH, et al. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol*, 2009, 100(8): 2425–2429.
- [7] Liang LY, Liu RM, Li F, et al. Repetitive succinic acid production from lignocellulose hydrolysates by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2013, 143: 405–412.
- [8] Wang D, Li Q, Yang MH, et al. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation. *Process Biochem*, 2011, 46(1): 365–371.
- [9] Liang L, Zhang Y, Zhang L, et al. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(12): 1605–1613.
- [10] Kotzamanidis CH, Roukas T, Skaracis G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World J Microb Biotechnol*, 2002, 18(5): 441–448.

- [11] Davis CP, Cleven D, Brown J, et al. *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 1976, 26(4): 498–504.
- [12] Jiang M, Dai WY, Xi YL, et al. Succinic acid production from sucrose by *Actinobacillus succinogenes* NJ113. *Bioresour Technol*, 2014, 153: 327–332.
- [13] Wu H, Li ZM, 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.
- [14] 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.
- [15] Jiang M, Liu SW, Ma JF, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1298–1300.
- [16] Lee JW, Choi S, Park JH, et al. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(4): 905–913.
- [17] Penfold DW, Macaskie LE. Production of H₂ from sucrose by *Escherichia coli* strains carrying the pUR400 plasmid, which encodes invertase activity. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(24): 1879–1883.
- [18] Wang J, Zhu J, Bennett GN, et al. Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Metab Eng*, 2011, 13(3): 328–335.
- [19] Sabri S, Nielsen LK, Vickers CE. Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(2): 478–487.
- [20] Arifin Y, Sabri S, Sugiarto H, et al. Deletion of *cscR* in *Escherichia coli* W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture. *J Biotechnol*, 2010, 156(4): 275–278.
- [21] Olson MM, Templeton LJ, Suh W, et al. Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(5): 1031–1040.
- [22] Calabria BP, Tokiwa Y. Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(9): 1329–1332.
- [23] Bruschi M, Boyes SJ, Sugiarto H, et al. A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1001–1010.

(本文责编 郝丽芳)