研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.11.006

糖蜜对重组谷氨酸棒杆菌产 L–丝氨酸的影响

姚丽萍[1]， 陈紫薇[1]， 张晓梅[1]， 许正宏*[1]， 陆茂林[2]

（1. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122；2. 江苏省微生物研究所有限公司，江苏 无锡 214063）

摘要： 重组谷氨酸棒杆菌 SYPS–062 33aΔSSA–PS 能够利用蔗糖直接发酵产 L–丝氨酸。本文比较了不同的糖蜜预处理方法及其添加量对该重组菌的生长及产 L–丝氨酸的影响，并进一步分析了糖蜜对丝氨酸合成相关途径中关键酶基因转录水平的影响。结果表明，糖蜜替代蔗糖作为唯一碳源时对产物合成并不利，但在蔗糖培养基中添加少量硫酸预处理的糖蜜有利于该菌的生长和产物积累。当其添加量为总糖量 0.24%时，菌株生长最好，OD_{562} 可达 76.37，L–丝氨酸产量为 32.76 g/L，比未添加糖蜜的对照组分别提高了 23.82%和 29.44 %。qRT–PCR 结果表明，添加低质量分数糖蜜可显著提高 EMP 途径中关键酶基因的转录水平，这可能是促进产物积累的主要原因之一。

关键词： L–丝氨酸；谷氨酸棒杆菌；糖蜜；预处理方法

中图分类号：TQ 922　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2018)11—1153—07

Effect of Molasses on L–Serine Production by Recombinant *Corynobacterium glutamicum*

YAO Liping[1]， *CHEN Ziwei*[1]， *ZHANG Xiaomei*[1]， *XU Zhenghong*[*1]， *LU Maolin*[2]

（1. School of Pharmaceutics Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Institute of Microbiology Corporation Limited, Wuxi 214063, China）

Abstract: The recombinant *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 33aΔSSA-PS was an L-serine producing strain on sucrose. To study the effects of molasses, different pretreatment techniques and concentrations of molasses were tested on the growth of the strain and L-serine accumulation. For endogenous regulation, the effect of the transcription of genes in EMP pathway was studied. The result indicated that molasses as the sole carbon was not favorable to the synthesis of L-serine. While, with the addition of molasses with 0.24% sugar by the pretreatment with H_2SO_4, the strain showed a significant improvement in the cell growth (OD_{562}=76.37) and L-serine (32.76 g/L) after 120 h of fermentation. Compared to the control, the cell growth and L-serine were improved by 23.82 % and 29.44%, respectively. The results of qRT-PCR showed that the addition of molasses

收稿日期： 2016–02–25

基金项目： 国家 863 计划重点项目(2012AA022102)；广东省产学研项目(2012B091000083)。

* **通信作者：** 许正宏(1971—)，男，江苏泰州人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物制药方面的研究。

E–mail：zhenghxu@jiangnan.edu.cn

引用本文： 姚丽萍，陈紫薇，张晓梅，等. 糖蜜对重组谷氨酸棒杆菌产 L–丝氨酸的影响[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(11)：1153–1159.

could significantly improve the transcription of genes in the EMP pathway,which was one of the reason why molasses could improve the production of L-serine.

Keywords: L-serine,*Corynebacterium glutamicum*,molasses,pretreatment techniques

L-丝氨酸（L-serine）是人类非必需氨基酸之一,主要应用于医药、化工及食品等多种相关领域。此外,L-丝氨酸作为生物体内重要的一碳单位,是嘧啶、嘌呤等有机物的主要供体[1-2]。L-丝氨酸具有广泛的市场前景及开发潜力[3]。

目前,L-丝氨酸生产方法主要有化学合成法、蛋白水解法及微生物发酵法等[4-8]。其中,微生物发酵法与化学合成法及蛋白水解法相比,具有绿色环保、高效、产物易分离提取等优点[3]。近年来,微生物直接发酵法生产L-丝氨酸的研究主要集中在大肠杆菌（*Escherichia coli*）及谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）上[9-12]。谷氨酸棒杆菌SYPS-062 33a ΔSSA-PS是本实验室经代谢改造构建的能发酵蔗糖高产L-丝氨酸的菌株,其利用全合成培养基摇瓶发酵120 h,L-丝氨酸产量达25.31 g/L。利用廉价原料发酵一直是生物工程领域的研究热点[13-14],糖蜜作为制糖工业的副产物,含有大量可发酵糖类,同时含有大量的微生物生长所需的微量营养物质,且价格低廉,可作为微生物发酵的替代原料。Wang等[15]利用*Bacillus* sp.XZL9发酵糖蜜可以获得74.7 g/L的乳酸;Kotzamanidis等[16]以糖蜜为原料,利用*Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130发酵生产乳酸,产量达88.0 g/L;Xu等[17]以糖蜜为原料,利用*Corynebacterium glutamicum*发酵产L-赖氨酸,产量达34.5 mmol/L。但在将糖蜜作为微生物发酵原料时,需进行预处理,以去除其中可能影响微生物发酵的胶体、钙质、灰分等[18-19]。

本文考察了不同的糖蜜预处理方法、添加量对谷氨酸棒杆菌SYPS-062 33a ΔSSA-PS生长及产L-丝氨酸的影响,并初步探讨了糖蜜对丝氨酸合成相关途径中关键酶基因转录水平的影响,为该菌株高效发酵生产L-丝氨酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蔗糖蜜：由山东正信集团提供，总糖量48.20%。

重组谷氨酸棒杆菌（*Corynbacterium glutamicum* SYPS-062 33aΔSSA-PS）为江南大学药学院制药工程研究室构建并保藏。

1.1.1 试剂 氢氧化钠、二胺四乙酸二钠盐（EDTA）、无水葡萄糖、磷酸二氢钠、琼脂粉、阳离子交换树脂均为分析纯等，均购于国药试剂有限公司;脑心浸液（BHI）、原儿茶酸、生物素、盐酸硫胺素等购于sigma公司；硫酸卡那霉素购于上海生物工程有限公司。

1.1.2 培养基 种子培养基(g/L)：

A:无水葡萄糖20,115 ℃,7 min进行灭菌。

B:BHI 37,$(NH_4)_2SO_4$ 10,$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.5,K_2HPO_4 0.2,NaH_2PO_4 0.3,自然pH,115 ℃,7 min进行灭菌。

A+B混匀使用。

发酵全合成培养基(g/L):蔗糖100,$(NH_4)_2SO_4$ 30,KH_2PO_4 3,$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.5,$FeSO_4\cdot7H_2O$ 0.02,$MnSO_4\cdot H_2O$ 0.02,原儿茶酸0.03,生物素0.5×10^{-3},硫酸硫胺素4.5×10^{-3}。灭菌条件:115 ℃,7 min。添加糖蜜时,通过换算随后替代蔗糖加入或者添加一定量的糖蜜,定容,分装,灭菌。

1.2 糖蜜预处理方法

1.2.1 EDTA法 糖蜜预先加水稀释成质量比为1:1的混合溶液,用1 mol/L的HCl调pH至7.0,于沸水中加热30 min，加入质量分数100×10^{-6}的EDTA以加速重金属物质的沉积。将混合物于室温下静置24 h,然后12 000 r/min离心20 min,取上清进行下一步实验。

1.2.2 硫酸法 糖蜜预先加水稀释成质量比为1:1的混合溶液,用1 mol/L的H_2SO_4调pH至3.0。将混合物于室温下静置24 h，然后12 000 r/min离心20 min,取上清。将上清用10 mol/L的NaOH调pH至5.5,取上清进行下一步实验。

1.2.3 磷酸法 糖蜜预先加水稀释成质量比为1:1的混合溶液,用1 mol/L的H_2PO_4调pH至3.0。于沸水中加热30 min，将混合物于室温下静置24 h,然后12 000 r/min离心20 min，取上清。将上清用

10 mol/L 的 $Ca(OH)_2$ 调pH 至 5.5,12 000 r/min 离心 30 min,取上清进行下一步实验。

1.2.4 活性炭法 糖蜜预先加水稀释成质量比为 1:1 的混合溶液,于 60 ℃下静置 24 h,经活性炭吸附处理后,12 000 r/min 离心 30 min, 上清进行抽滤,除杂,滤液进行下一步实验。

1.2.5 澄清法 糖蜜预先加水稀释成质量比为 1:1 的混合溶液,利用聚丙烯酰胺(PAM)作为糖蜜预处理的澄清剂, 于 100 mL 的糖蜜溶液中分别加入 5 mL 的 21.9 g/L 乙酸锌溶液和 10.6%的亚铁氰化钾,于室温下静置过夜,促进澄清剂沉积。混合物于 12 000 r/min 离心 20 min,取上清进行下一步实验。

1.2.6 阳离子交换树脂法 糖蜜预先加水稀释成质量比为 1:1 的混合溶液,100 mL 糖蜜溶液中加入 20 g 阳离子交换树脂, 混合体系于恒温振荡器中,250 r/min,30 ℃振荡 6 h,12 000 r/min 离心 20 min,上清用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 5.5,取上清进行下一步实验。

1.3 培养方法

1.3.1 发酵前处理 分别测定原糖蜜及不同预处理后的糖蜜的总糖含量,调总糖含量至 10%。

1.3.2 谷氨酸棒杆菌活化 甘油管接种划线于固体种子培养基平板,30 ℃培养 3~4 d。

1.3.3 种子培养 接种一环平板种子于液体种子培养基,30 ℃,120 r/min 培养 28 h,使其 OD_{562}=25。

1.3.4 发酵培养 将种子液接入发酵培养基中,使其初始 OD_{562}=1,30 ℃,120 r/min 培养 120 h,每 12 h 取一次样,进行数据测定。

1.4 qRT-PCR

RNA 提取采用 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物有限公司); 逆转录和 qRT-PCR 分别采用 RayScript cDNA Synthesis Kit 和 Power qPCR PreMix 试剂盒(上海捷瑞生物公司)。

选择 16s(RNA)作为内参基因,并设计相应的扩增引物。根据 *C.glutamicum* ATCC 13032 的基因序列,使用 DNAMEN 软件设计 EMP 途径相关基因的引物,如表 1 所示。

1.5 分析方法

生物量测定: 取 100 μL 发酵液用 1 mol/L HCl 稀释到适宜质量浓度, 利用分光光度计于波长 562 nm 处测定。

氨基酸含量和糖浓度的测定:将不同时间的发酵液于 4 ℃、14 000 r/min 离心 10 min,上清液用于氨基酸含量和糖浓度的测定。发酵液中蔗糖和果糖及氨基酸含量均采用 HPLC 测定[20-21]。糖蜜中总糖和葡萄糖含量采用菲林试剂法测定[19]。

表 1 相关基因的引物

Table 1 Primers list

引物名称	引物序列(5′-3′)
pgi-F	ATTACTCAAACTTCCAGGCA
pgi-R	GCAGATTCTTCGACAGGT
pfkA-F	TTGCTACTCTCACGTCAG
pfkA-R	AGTCCTTCCCAACCGTCT
glpX-F	ATGACGCACAACCACAAG
glpX-R	CATTCACAAGGAGACGAC
gap-F	CGTAACTTCTTCCGCGCA
gap-R	AGGGTCTTGTTGTCGGTG
pgk-F	ACTTCAATGTTCCCCTCA
pgk-R	ATGACCTTTGCGCCACCT

2 结果与分析

2.1 预处理方法对糖蜜中总糖含量的影响

糖蜜作为制糖工业的副产物,可作为微生物发酵的替代原料[19]。作为微生物发酵原料时,糖蜜需进行预处理,去除其中的胶体、钙质、灰分等。不同的预处理方法使得糖蜜组分及含量具有一定的差异。采用不同方法对糖蜜进行预处理,预处理前后糖蜜中的总糖和葡萄糖含量如表 2 所示。糖蜜采用硫酸预处理后,促使多糖水解形成单糖形式,菌体可直接利用葡萄糖含量比预处理前增加了 4.51 倍。采用活性炭法、澄清法和阳离子交换树脂法对糖蜜进行预处理后, 总糖及葡萄糖含量与未处理时变化不大。采用磷酸预处理糖蜜可去除大量的灰分和胶体成分,去除杂质较彻底,但同时也损耗了大量的糖类物质,与余炜等[18]研究结果一致。

2.2 糖蜜代替蔗糖为碳源对重组谷氨酸棒杆菌生长及 L-丝氨酸生产的影响

摇瓶发酵考察糖蜜对重组菌生长及生产 L-丝氨酸的影响,以总糖为 10%的糖蜜代替全合成发酵培养基中的蔗糖为碳源进行发酵性能测定,实验结果如表 3 所示。采用硫酸法、EDTA 法和澄清法预处理的糖蜜对重组菌的菌体生长较为有利,而磷酸法和树脂法处理的糖蜜则对其生长不利。但所有预处理后的糖蜜作为唯一碳源时均不利于该重组菌积

表 2　不同方法处理后糖蜜中糖类含量变化

Table 2　Concentration of sugar by different methods of molasses

糖类	未处理	预处理					
		EDTA 法	硫酸法	磷酸法	活性炭法	澄清法	阳离子交换树脂法
总糖/%	48.20	29.13	30.47	20.29	43.20	35.16	42.79
葡萄糖/%	3.97	16.35	21.89	13.82	5.13	6.19	4.31

累 L-丝氨酸。总体而言,硫酸法处理的糖蜜对重组菌生长和产酸较好。以糖蜜为原料时,谷氨酸棒杆菌发酵产赖氨酸也有相似的结果[19]。

表 3　不同预处理方法对重组菌株生长及 L-丝氨酸产量的影响

Table 3　Effects of different methods of molasses on cell growth and L-serine production

糖蜜预处理方法	总糖含量 / %	发酵时间 / h	生物量 OD_{562}	L-丝氨酸 / (g/L)
对照组	10	120	61.68	25.31
EDTA 法	10	120	79.91	16.32
硫酸法	10	120	82.84	18.72
磷酸法	10	120	49.54	10.44
活性炭法	10	120	65.73	7.11
澄清法	10	120	74.31	7.49
阳离子交换树脂法	10	120	45.62	7.91

注:对照组为重组菌在以 10%蔗糖为发酵原料的全合成培养基上的发酵情况。

2.3　糖蜜的添加量对重组菌株谷氨酸棒杆菌生长及 L-丝氨酸生产的影响

进一步考察了硫酸法预处理的糖蜜的不同添加量对重组菌生长及 L-丝氨酸生产的影响,结果如表 4 所示。蔗糖中添加少量糖蜜有利于菌株生长和产物积累,当培养基中糖蜜的糖量为 1%,蔗糖量为 9%时为最好。这可能是由于糖蜜中含有的多种营养因子(生物素、维生素等可在一定的质量分数范围内促进微生物生长和产物合成。

进一步考察了低质量分数糖蜜对重组菌生长和 L-丝氨酸生产的影响,结果如图 1 所示。当全合成培养基中添加糖蜜总糖量为 0.24%的硫酸预处理糖蜜时,重组菌生物量最高,OD_{562} 可达 76.37,且 L-丝氨酸产量最高,可达 32.76 g/L,糖酸转化率为 0.33 g/g(表 5),比对照组提高了 29.44%。上述结果充分说明了糖蜜在该重组菌生长和产物合成中更多发挥了促进剂的作用,而非作为碳源。

表 4　糖蜜和蔗糖为混合碳源对菌株生长和 L-丝氨酸产量的影响

Table 4　Effects of the carbon of molasses and sucrose on cell growth and L-serine production

糖蜜中总糖添加质量分数/%	蔗糖添加质量分数/ %	生物量 OD_{562}	L-丝氨酸产量/(g/L)	生产强度/(g/(L·h))
0	10	61.68	25.31	0.21
1	9	73.18	26.79	0.22
2	8	73.08	25.17	0.21
5	5	77.20	22.36	0.19
8	2	80.29	18.99	0.16
10	0	82.84	18.72	0.16

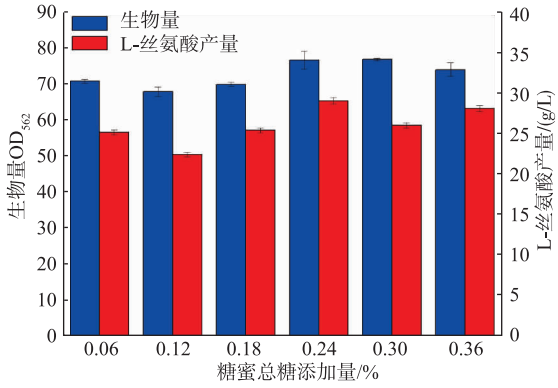


图 1　低质量浓度糖蜜添加对菌体生长和 L-丝氨酸产量的影响

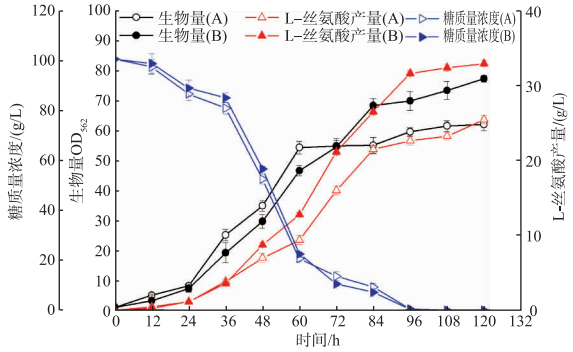
Fig. 1　Effects of different molasses addition on cell growth and L-serine production

表 5　糖蜜添加量对菌体糖酸转化率和生产强度的影响

Table 5　Effects of different molasses addition on productivity and yield of L-serine

糖蜜总糖添加量/%	糖酸转化率/(g/g)	生产强度/(g/(L·h))
0	0.25	0.21
0.06	0.28	0.24
0.12	0.25	0.21
0.18	0.29	0.24
0.24	0.33	0.27
0.30	0.29	0.24
0.36	0.32	0.26

在全合成培养基和添加总糖为 0.24%的硫酸预处理糖蜜后的发酵过程结果表明(图 2),添加少量的糖蜜对菌株生长的迟滞期无明显影响, 发酵至 84~120 h 时,菌株的生长速度较对照组好,发酵至 120 h 时,实验组 OD_{562} 可达 76.37,较对照组提高了 23.82%;L-丝氨酸产量可达 32.76 g/L, 较对照组(25.31 g/L)提高了 29.44%。



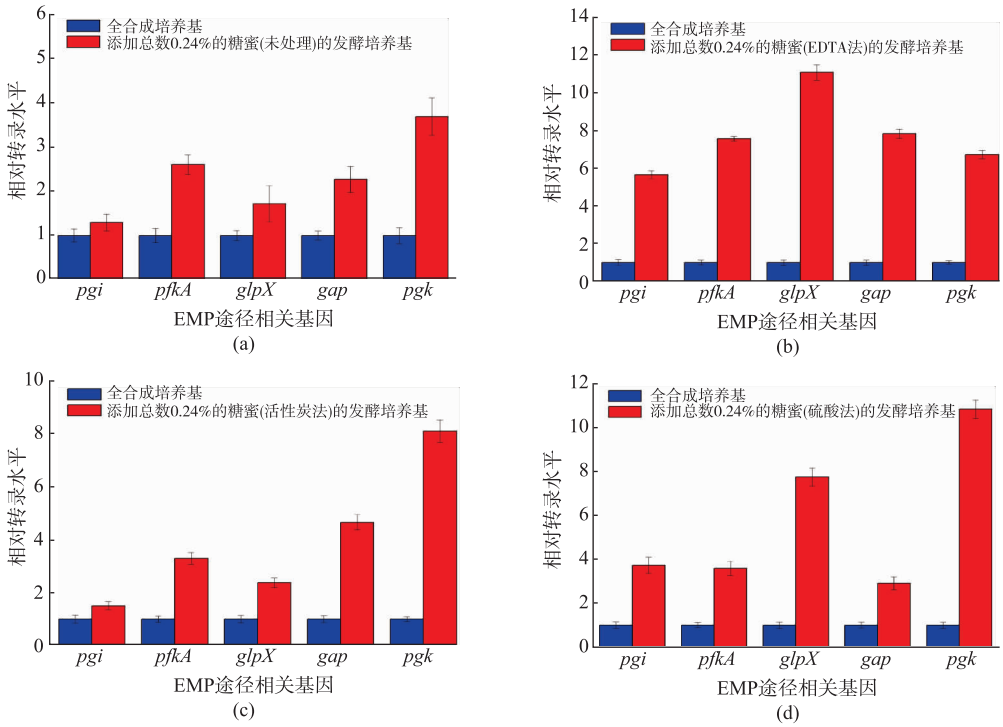
A-全合成培养基中菌株的发酵性能;B-添加总糖为 0.24%的糖蜜的全合成培养基中菌株的发酵性能

图 2 重组菌在不同发酵培养基中的发酵过程

Fig. 2 Fermentation process of different mediums by the recombinant strain

2.4 糖蜜对 EMP 途径相关基因转录水平的影响

谷氨酸棒杆菌以蔗糖为碳源,经糖酵解(EMP)途径,以 3-磷酸甘油酸为前体合成 L-丝氨酸。EMP 途径与菌体生长有密切关系,实验表明微量糖蜜的添加对菌体生长和积累 L-丝氨酸均有促进作用,为此考察了添加总糖量为 0.24%的糖蜜 (不同预处理方法)对 EMP 途径相关基因转录水平的影响,结果如图 3 所示。添加少量添加糖蜜可促进 EMP 途径中相关酶基因的转录水平,这可能是促进产物积累的主要原因之一。在实验组(糖蜜处理方法:未处理、活性炭法、硫酸法)中,甘油酸激酶的编码基因 pgk 的转录水平提高最显著,分别提高了 2.68、7.11 和 9.83 倍。在实验组(糖蜜处理方法:澄清法、磷酸法、阳离子交换树脂法)中,甘油醛-3-磷酸脱氢酶的编码基因 *gap* 的转录水平提高最显著, 分别提高了 5.67、7.05 和 3.34 倍。EMP 途径的上调可能是由于糖蜜中含有大量的有机酸(柠檬酸、苹果酸和琥珀酸等)、吡啶、金属离子(Ca^{2+}、K^{+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+})[22]。吡啶衍生物是维生素、酶的重要组成部分,金属离子可参与酶促反应,提高酶活,增加蛋白表达,蛋白质表达量与基因转录水平在全局层面上有较高的相关性[23-24]。添加糖蜜提高 EMP 途径相关基



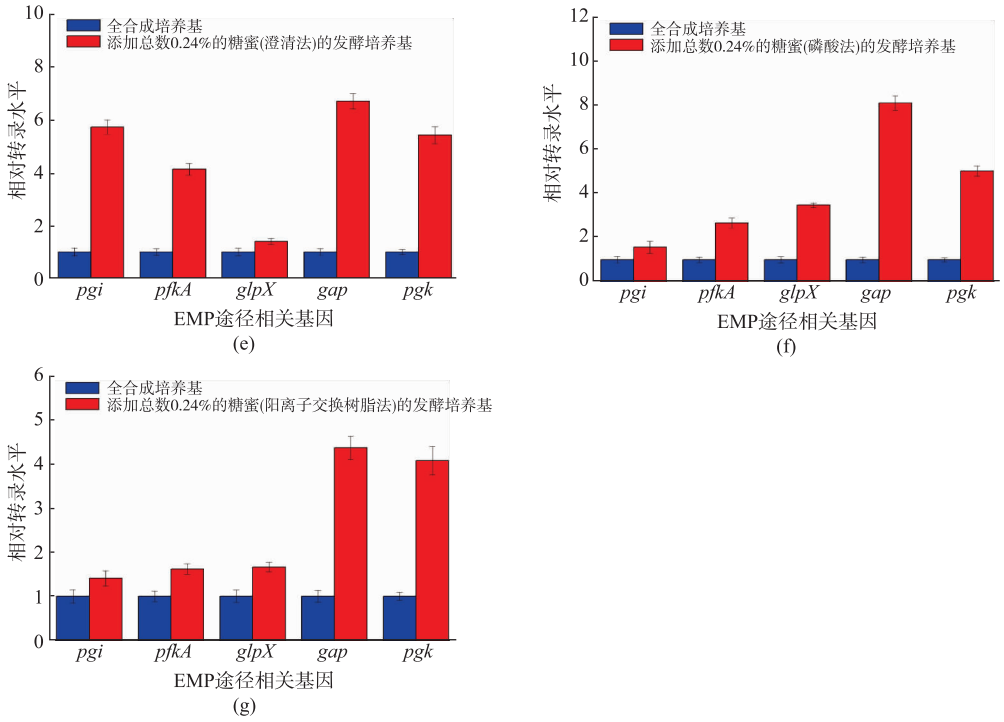


图 3　qRT-PCR 分析糖蜜对 EMP 途径相关基因转录的影响

Fig. 3　Analysis of the effect of molasses on transcription of genes encoding in EMP by qRT-PCR

因转录水平的相关机理,本课题组目前有人员正在进行相关研究。

3 结　语

本文考察了糖蜜预处理方法及糖蜜添加量对 *C.glutamicum* SYPS-062 33a ΔSSA-PS 发酵产 L-丝氨酸过程的影响。以质量分数为 9%蔗糖和 1%糖蜜总糖为混合碳源有利于菌体生长及产 L-丝氨酸。在以 10%蔗糖作为碳源时，添加总糖为 0.24%的硫酸法预处理糖蜜时,对重组菌株的生长及产 L-丝氨酸最有利。同时,低质量分数糖蜜的添加提高了 EMP 途径关键基因(*pgi*、*pfkA*、*glpX*、*gap* 及 *pgk*)的转录水平。在优化的发酵条件下,发酵 120 h,菌体生物量 OD_{562}、L-丝氨酸产量和糖酸转化率分别为 76.37、32.76 g/L 和 0.33 g/g 蔗糖，较对照组分别提高了 23.82%、29.44%和 29.44%。

参考文献:

[1] FENG Meiqing,CAO Xiuge,LU Yonghui. A brief introduction of preparation of L-Serine [J]. **Amino Acids and Biotic Resources**,2000,22(3):42-44.(in Chinese)

[2] DE KONING T,SNELL K,DURAN M,et al. L-serine in disease and development [J]. **Biochemical Journal**,2003,371(3):653-661.

[3] LAI Shujuan,ZHANG Yun,LIU Shuwen,et al. Metabolic engineering and flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. **Science China Life Sciences**,2012,42(4):295-303.(in Chinese)

[4] FU Li,LIU Xinhong,XU Chunyan. Monitoring a process for preparing DL-serine by HPLC[J]. **Journal of Beijing University of Chemical Technology**,2003,30(4):105.(in Chinese)

[5] FU Jianhong,CUI Chunsheng,XIE Yuqing,et al. The studies on fermentation of L-serine [J]. **Xinjiang Agricultural Sciences**,2004,41(3):169-172.(in Chinese)

[6] MORINAGA Y,YAMANAKA S,TAKINAMI K. L-Serine production by methanol-utilizing bacterium *Pseudomonas* MS 31[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,1981,45(6):1419-1424.

[7] BASSIGNANI L,BIANCINI B,BRANDT A,et al. Syntheses of DL-serine and of precursors thereof (Glycolaldehyde and "Masked" Glycolaldehydes)[J]. **Chemische Berichte**,1979,112(1):148-160.
[8] HSIAO H Y,WEI T,CAMPBELL K. Enzymatic production of L-serine [J]. **Biotechnology and Bioengineering**,1986,28(6):857-867.
[9] LIU Yan,WANG Hui,SHI Jiping,et al. Research progress on metabolic engineering for microbial production of L-serine[J]. **Biotechnology Bulletin**,2015,31(8):44-49.(in Chinese)
[10] LAI S J,ZHANG Y,LIU S W,et al. Metabolic engineering and flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. **Science China Life Sciences**,2012,55(4):283-290.
[11] GU P,YANG F,SU T,et al. Construction of an L-serine producing *Escherichia coli* via metabolic engineering [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2014,41(9):1443-1450.
[12] XU Guoqiang,DOU Wenfang,XU Hongyu,et al. Breeding of high-yield L-serine producing strains which can ferment sugar directly[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(11):1191-1195.(in Chinese)
[13] 林辉. 真菌发酵转化废弃秸秆生产微生物油脂技术的研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.
[14] ZHANG Liang,SHI Kongquan,SHI Guiyang. Progress in L-lactic acid production from waste biomass [J]. **Food and Machinery**,2007,23(5):138-141.(in Chinese)
[15] WANG L,ZHAO B,LIU B,et al. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses,a waste by-product in xylitol production,by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain[J]. **Bioresource Technology**,2010,101(20):7908-7915.
[16] KOTZAMANIDIS C H,ROUKAS T,SKARACIS G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2002,18(5):441-448.
[17] XU J,ZHANG J,GUO Y,et al. Improvement of cell growth and L-lysine production by genetically modified *Corynebacterium glutamicum* during growth on molasses[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2013,40(12):1423-1432.
[18] YU Wei,WU Shihua,DAI Zhouxing,et al. Pretreatment methods about waste molasses used for L-leucine fermentation [J]. **Journal of Guangxi University of Technology**,2006,16(3):15-18.(in Chinese)
[19] BAI Jie,ZHAO Yingchu,XIE Hequn,et al. The effect of molasses on L-lysine production [J]. **Bulletin of Fermentation Science and Technology**,2013,42(1):22-25.(in Chinese)
[20] CHEN Q,WANG Q,WEI G,et al. Production in *Escherichia coli* of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2011,77(14):4886-4893.
[21] 朱勤健. 谷氨酸棒杆菌 L- 丝氨酸竞争途径的代谢改造[D]. 无锡:江南大学,2015.
[22] WANG Xiangru,YU Shujuan. The pretreatment of sugarcane molasses and analysis on component [J]. **China Condiment**,2010,35(2):64-68.(in Chinese)
[23] 王境岩. 生物化学(下册)[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002:68-71.
[24] 徐沙. 光滑球拟酵母耐受高渗透压胁迫的生理机制研究[D]. 无锡:江南大学,2011.