

# 基因组改组技术选育耐酸性琥珀酸放线杆菌

刘璇 郑璞\* 倪晔 董晋军 孙志浩

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以琥珀酸产生菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 为出发菌, 分别经过紫外线-甲基磺酸乙酯(UV-EMS)和紫外线-硫酸二乙酯(UV-DES)诱变处理, 得到 7 株耐酸性有所提高的突变株。以此作为候选菌库, 经 3 轮原生质体递进融合, 筛选获得 4 株可以在 pH 5.6 下生长的改组菌株。其中改组菌株 F3-21 在 pH 5.6 的完全液体培养基中生长的 OD 值是原始菌的 7 倍, 在 pH 5.2 条件下仍能生长; 其摇瓶发酵 48 h 琥珀酸产量较原始菌株提高 48%。在 5 L 发酵罐中进行分批发酵, 当控制 pH 在较低值(5.6~6.0)时, F3-21 厌氧发酵 48 h 积累琥珀酸 38.1 g/L, 较出发菌株提高了 45%; 当控制 pH 在 6.5~7.0 时, F3-21 厌氧发酵 32 h 积累琥珀酸 40.7 g/L。F3-21 在 5 L 发酵罐中进行补料分批发酵, 厌氧发酵 72 h, 产琥珀酸达 67.4 g/L。结果说明基因组改组技术能够改进琥珀酸放线菌的耐酸性能及其琥珀酸的产量。

**关键词:** 基因组改组, 琥珀酸放线杆菌, 耐酸性, 琥珀酸

## Breeding *Actinobacillus succinogenes* with Acid-tolerance by Genome Shuffling

LIU Xuan ZHENG Pu\* NI Ye DONG Jin-Jun SUN Zhi-Hao

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** A strain *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 was selected as the parent strain. After UV-EMS and UV-DES treatments respectively, seven mutated strains with subtle improvements in acid tolerance were obtained, and were subjected for recursive protoplast fusion. Through three rounds of genome shuffling, four shuffled strains with both higher yield and acid tolerance were obtained. The shuffled strain namely F3-21 could even survive at pH 5.2. The comparison of the shuffled strains and the parent strain for succinic acid production was also studied here. After 48 h of shake-flask fermentation, the succinic acid concentration of F3-21 was 48% higher than that of the parent strain. When F3-21 was carried out in a 5 liter stirred bioreactor with pH controlled 5.6~6.0, the accumulation of succinic acid in 48 h fermentation attained 38.1 g/L, which was increased by 45% compared with that of the parent strain (26.2 g/L). While pH was controlled at 6.5~7.0, the production of succinic acid in 32 h fermentation attained 40.7 g/L. When F3-21 was carried out in fed-batch fermentation, succinic acid concentration of 67.4 g/L was reached in 72 h fermentation. These results indicated that the genome shuffling could improve the acid tolerance and the succinic acid production of *A. succinogenes* CGMCC 1593.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z235); 江苏省自然科学基金前期预研项目(No. BK2005201); 长江学者创新团队发展计划项目(No. IRT0532)

\* 通讯作者: Tel: 86-510-85918252; ✉: zhengpu@jiangnan.ed.cn

收稿日期: 2009-03-30; 接受日期: 2009-06-01

**Keywords:** Genome shuffling, *Actinobacillus succinogenes*, Acid tolerance, Succinic acid

微生物菌种选育技术在现代生物技术中,特别是发酵产业中具有十分重要的地位。1998年美国Maxygen公司的Stemmer等提出DNA shuffling体外分子定向进化方法之后<sup>[1]</sup>,提出了一种新的体内分子育种方法——Genome shuffling(全基因组改组技术)<sup>[2]</sup>。该方法将重组的对象从单个基因扩展到整个基因组,从而可以在更为广阔的范围内对菌种的目的性状进行优化组合。2002年,Zhang等<sup>[3]</sup>成功运用基因组改组技术快速提高了弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)的泰乐菌素产量。Patnaik等<sup>[4]</sup>通过基因组改组的方法提高了乳杆菌的耐酸性能,通过5轮基因组改组得到在pH 3.8的酸性环境下生长良好的菌株。国内在提高*Lactobacillus rhamnosus*的耐酸性和乳酸产量<sup>[5]</sup>、扩展青霉碱性脂肪酶产量<sup>[6]</sup>、*Bacillus subtilis*的核黄素合成<sup>[7]</sup>、以及耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的选育<sup>[8]</sup>等研究中有成功的报道。基因组改组技术具有筛选周期短、正向突变率高、可以避免因长期使用诱变剂出现的“钝化效应”等优点,并且可以在菌株的基因型和表型的相关机制不很清楚的情况下,通过多轮循环的原生质体融合将决定某一理想表型的多个基因甚至十几个突变基因组合在一起从而达到菌种改造的目的。

琥珀酸作为食品的酸味成分和有机合成原材料、中间产物或专业化学制品,广泛应用于食品、饲料、医药、农药、染料、香料、油漆、塑料和材料工业等领域。由于石化资源的不可再生和石化工业对环境产生的负面影响,发酵法生产琥珀酸作为一种新兴的绿色工艺,已成为近年来研究的热点<sup>[9]</sup>。琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*) CGMCC 1593是本实验室从瘤胃中分离得到产琥珀酸的菌株<sup>[10]</sup>。由于琥珀酸发酵是一个典型的产物抑制型生物转化过程<sup>[11]</sup>,过多游离琥珀酸的积累会造成发酵液pH过低,从而抑制菌体的生长和产物的生成。前期研究表明用碳酸镁维持发酵体系的pH在6.7左右时,琥珀酸产量较高<sup>[12,13]</sup>。然而,碳酸镁的添加增加了发酵生产的成本,使琥珀酸的下游提取工艺更复杂成本更高<sup>[14]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种: 琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus suc-*

*cinogenes*) CGMCC 1593,由本实验室从牛的瘤胃中分离获得<sup>[15]</sup>。

**1.1.2 培养基:**完全液体培养基: TSB 25 g,葡萄糖 9 g,定容至1 L, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min; 低 pH 筛选平板: TSB 25 g,葡萄糖 9 g,琼脂 20 g,定容至1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min后,用灭过菌的饱和丁二酸溶液调节pH为5.6; 液体筛选培养基: TSB 25 g,葡萄糖 9 g,溴甲酚紫 0.01 g,定容至1 L,用灭过菌的饱和丁二酸溶液调节pH为5.6,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min; 再生培养基<sup>[16]</sup>: 下层: 蔗糖 103 g,  $K_2SO_4$  0.25 g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2.02 g,微量元素液 2 mL, TSB 25 g,葡萄糖 9 g,定容至800 mL,琼脂 20 g,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min,使用之前加入已灭菌的  $KH_2PO_4$ (0.5%) 1 mL/100 mL,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.86%) 10 mL/100 mL, TES 缓冲液(pH 7.2) 10 mL/100 mL; 上层: 同下层,琼脂改为6 g/L; 发酵培养基见参考文献<sup>[17]</sup>。

**1.1.3 主要试剂:**原生质体缓冲液 PB(Phosphate buffer, 磷酸缓冲溶液): 蔗糖 103 g,  $K_2SO_4$  0.25 g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2.02 g,微量元素液 2 mL,定容至800 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 15 min,使用前加入已灭菌的  $KH_2PO_4$ (0.5%) 1 mL/100 mL,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.86%) 10 mL/100 mL, TES 缓冲液(pH 7.2) 10 mL/100 mL; 酶溶液: 称取0.1 g溶菌酶溶解在10 mL PB溶液中,配制成浓度为10 mg/mL的酶溶液,膜滤器过滤除菌,4°C 冰箱保存备用; PEG 溶液: 4.44 g PEG 6000 溶解于10 mL PB溶液中,膜滤器过滤除菌。

### 1.2 方法

**1.2.1 筛选方法:**1) 初筛方法: 将筛选平板或再生平板上长出的单菌落点种至低pH筛选平板,再将能够稳定生长的单菌落挑入液体筛选培养基中,37°C 培养 12 h。2) 复筛方法: 选出在液体筛选培养基中快速变黄的菌株,置于100%  $CO_2$  环境中37°C 厌氧培养 48 h。进行厌氧瓶发酵。

**1.2.2 诱变方法<sup>[18]</sup>:**1) 紫外线-甲基磺酸乙酯(UV-EMS)诱变: 出发菌株 CGMCC 1593 在种子培养基中培养至对数期取出,离心(8000 r/min, 10 min),用2 mol/L pH 7.2的磷酸盐缓冲液洗涤2次,制成菌悬液。取菌悬液10 mL置于平皿中,在紫外灯下搅拌照射20 s后转入已灭菌的三角瓶中,加入EMS使其终浓度为2%(V/V),37°C 处理30 min,

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

用等体积 2% 的硫代硫酸钠终止反应。离心, 缓冲液重悬。取 0.1 mL 涂布于低 pH 筛选平板, 37°C 厌氧培养 3 d~5 d。2) 紫外线-硫酸二乙酯(UV-DES)诱变: 出发菌株的前处理过程和紫外诱变处理, 以及耐低 pH 菌的检出方法与上述相同。用 DES 代替 EMS 作用经紫外照射的菌液, DES 加入的终浓度为 0.8%(V/V), 处理 20 min。

**1.2.3 原生质体的制备:** 种子培养至对数生长期, 取 10 mL 菌液于 4°C 8000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PB 缓冲液洗涤 2 次。向菌液中加入溶菌酶溶液, 摇匀后于 37°C 水浴中酶解 30 min。6000 r/min 离心 10 min 去除酶液, 等体积 PB 液重悬, 即为制备好的原生质体。

**1.2.4 基因组改组:** 将制备的诱变突变菌株的原生质体, 等量混合后分成两等分, 分别进行紫外灭活 5 min 和 55°C 热灭活 5 min。从紫外灭活和热灭活的原生质体悬液中各取 0.5 mL 混匀, 6000 r/min 离心 10 min, 加 0.1 mL PB 缓冲液和 0.9 mL PEG 溶液, 37°C 水浴中融合 5 min, 离心洗涤, 适当稀释后涂布于再生平板, 37°C 培养 3 d~5 d。原生质体形成率、再生率及融合率的计算见参考文献[18]。将再生平板上长出的融合子用牙签点种至筛选平板, 将能够稳定生长的单菌落挑入液体筛选培养基中, 37°C 培养 12 h。选出快速变黄的菌株进行厌氧瓶发酵产酸复筛。所得产量高的突变株作为第 1 轮融合菌株 F1。将第 1 轮融合筛选的多个菌株(F1)进行下一轮的原生质体制备、融合与筛选, 所得到的突变株即为 F2, 以此类推进行 3 轮融合。

**1.2.5 发酵产物分析:** 葡萄糖及琥珀酸、乙酸、乳

酸和甲酸的测定见参考文献[19]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 筛选平板的 pH 确定

出发菌株 CGMCC 1593 在不同 pH 的完全液体培养基中的生长情况如图 1 所示。由图 1 可以看出, 当 pH 为 5.6 时, 出发菌株 CGMCC 1593 的菌体浓度为 0.027。当 pH 为 5.4 时, 菌体在完全培养基中不能生长。同时, 考虑到丁二酸的一级解离常数  $pK_2$  为 5.64, 故确定筛选培养基的 pH 为 5.6。

### 2.2 基因组改组候选菌库的筛选

分别对 CGMCC 1593 进行紫外线照射-EMS 与紫外照射-DES 复合诱变, 结果如图 2 所示。经低 pH 初筛选和摇瓶复筛, 从 38 株初筛菌株中, 得到 7 株

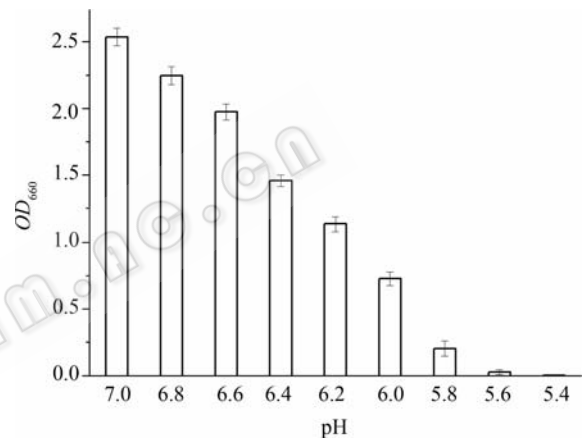


图 1 亲株 CGMCC 1593 在不同 pH 的完全培养基中的生长情况

Fig. 1 Effect of pH on growth of *A. succinogenes* CGMCC 1593

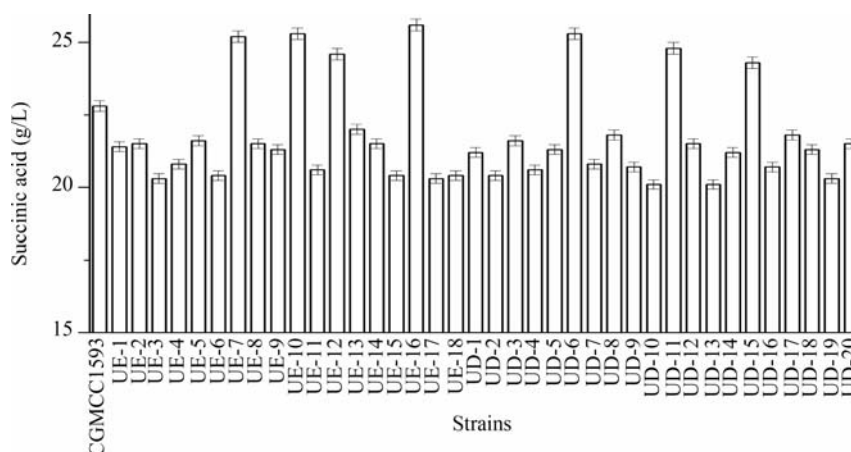


图 2 UV-EMS 和 UV-DES 诱变筛选结果

Fig. 2 Selection results of UV-EMS and UV-DES mutation

产量相对有所提高的正突变株 UE-7、UE-10、UE-12、UE-16、UD-6、UD-11、UD-15, 其琥珀酸产量比出发菌株 CGMCC 1593 平均提高了 12.3% 左右。

### 2.3 原生质体的制备、再生与融合

原生质体的形成率、再生率以及融合率受很多因素的影响。主要包括菌龄、溶菌酶的浓度和处理条件、热灭活和紫外灭活的条件、PEG 作用条件以及再生条件等。通过一系列实验(数据未列出)和参考相关文献<sup>[20-23]</sup>, 得出的原生质体制备融合的基本条件如表 1 所示。

表 1 原生质体制备再生及融合最佳条件的确定 Table 1 Optimum conditions of protoplasts production, regeneration and fusion		
项目 Item	条件 Condition	
制备条件 Preparation condition	Lysozyme concentration	0.1 mg/mL
	Enzymolysis condition	37°C 30 min
灭活条件 Inactivation condition	Heat inactivation	55°C 25 min
	Ultraviolet inactivation	5 min
融合条件 Fusion condition	PEG concentration	40%
	PEG fusion condition	37°C 5 min
再生平板中渗透压稳定剂 Osmotic stabilizer	0.3 mol/L 蔗糖	
融合平板 Fusion plate	Double-lay plate	

按表 1 中的条件进行原生质体的制备、灭活及融合, 其形成率和再生率分别达到 99.8% 和 9.8%, 灭活率可达 100%, 融合率为  $2.78 \times 10^{-5}$ 。

### 2.4 基因组改组

**2.4.1 三轮基因组改组菌株产酸比较:** 3 轮原生质体融合结果如图 3 所示, UE-7、UE-10、UE-12、UE-16、UD-6、UD-11、UD-15 的原生质体经第 1 轮融合, 从再生平板上长出的 24 个融合子中筛选到 5 株产酸略有提高的 F1 代重组菌 F1-6、F1-13、F1-17、F1-18、F1-19, 其产酸比出发菌平均提高 16.1%。以 F1 代出发进行第 2 轮融合, 从再生平板上长出的 22 个融合子中筛选到 5 株产酸有所提高的 F2 代重组菌 F2-3、F2-6、F2-13、F2-17、F2-19, 其产酸比出发菌平均提高 24.8%。3 轮基因组改组后, F3 代中的 4 株突变株琥珀酸产量较原始菌株有较大提高, 其中菌株 F3-21 的琥珀酸产量(34 g/L)较出发菌 CGMCC 1593 提高 48%。

**2.4.2 突变菌株 F3-21 和原始菌株的耐酸性比较:** 将第 3 轮改组获得的产量最高的菌株 F3-21 与原始

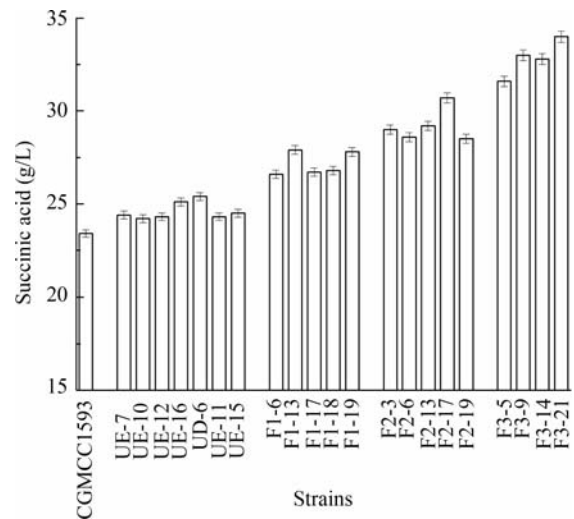


图 3 突变菌株与原始菌株发酵产酸的比较

Fig. 3 Comparison of the mutant and parent strains for succinic acid production

菌株 CGMCC 1593 一起接入 pH 分别为 7.0、6.8、6.6、6.4、6.2、6.0、5.8、5.6、5.4 和 5.2 的完全液体培养基中培养 24 h, 观察生长情况。图 4 表明改组菌株 F3-21 的耐酸性相对原始菌株 CGMCC 1593 有明显提高, 尤其是在 pH 6.0 以下更为显著。pH 5.8 时, F3-21 的 OD 值是原始菌的 2.5 倍; pH 5.6 时是原始菌的 7 倍。

**2.4.3 突变株 F3-21 和原始菌株在低 pH 下发酵产酸比较:** 在 5 L 搅拌发酵罐中进行厌氧发酵, 用  $MgCO_3$  控制发酵 pH 5.6~6.0。由图 5 可以看出, 在低 pH 的环境下发酵, 突变株 F3-21 生长的延迟期缩短, 4 h 便达到最高 OD 值, 达到的最大菌浓比出发菌的高(图 5b), 发酵前期糖耗速率也较出发菌快。发酵

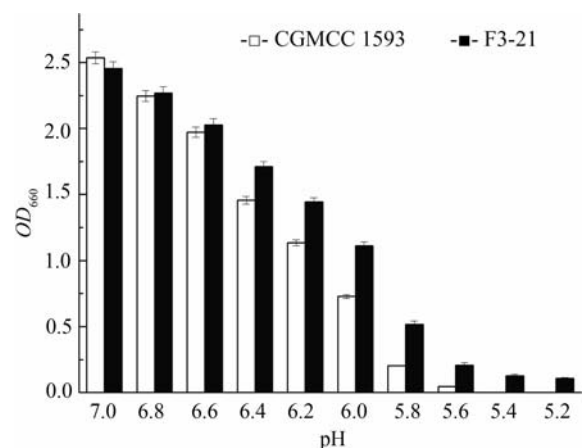


图 4 改组菌株 F3-21 与原始菌株 CGMCC 1593 的耐酸性比较

Fig. 4 Comparison of the mutant F3-21 and parent strains for acid tolerance at different pH

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

48 h, 出发菌产琥珀酸 26.2 g/L, 残糖 20.4 g/L, 而突变株 F3-21 产琥珀酸 38.1 g/L, 残糖 3.7 g/L。琥珀酸产量提高了 45%。并且  $\text{MgCO}_3$  总的用量也由原始菌的 120 g (40 g/L) 减少到改组菌的 95 g (31 g/L), 减少了 22.5%。另外, 改组菌 F3-21 发酵过程中乙酸等杂酸的浓度也较出发菌低。

**2.4.4 改组菌 F3-21 在 5 L 发酵罐中的发酵:** 用  $\text{MgCO}_3$  控制正常发酵 pH 6.5~7.0 时, 改组菌 F3-21 在 5 L 搅拌发酵罐中分批发酵, 发酵 32 h 产琥珀酸 40.7 g/L, 琥珀酸产率 81.4% (图 6a)。比原始菌 *A. succinogenes* 1593 在同样条件下发酵, 产琥珀酸 33.2 g/L, 琥珀酸产率 68%<sup>[17]</sup> 有明显提高; 与 NTG 诱变的氟乙酸抗性株 SF-9 在同样条件下发酵水平 (产琥珀酸 40.5 g/L, 琥珀酸产率 81%<sup>[17]</sup>) 相当。当采用补料分批发酵策略发酵时 (图 6b), 初糖浓度为 36 g/L, 发酵过程控制糖浓度在 20 g/L 左右, 共补加

6 次葡萄糖。从发酵过程图可以看出, 菌体生长较分批发酵旺盛, 发酵 32 h 时, 加入葡萄糖浓度 54 g/L, 产琥珀酸 43.9 g/L, 琥珀酸产率为 81.1%; 发酵 48 h 时加入葡萄糖浓度 72 g/L, 产琥珀酸 58.1 g/L, 琥珀酸产率 80.3%; 发酵 72 h 时, 总糖浓度 103 g/L, 琥珀酸最终产量达到 67.4 g/L。

### 3 结论

本研究通过 3 轮基因组改组技术筛选获得耐酸性琥珀酸放线杆菌。经基因组改组后, 获得改组菌株 F3-21, 在 pH 5.6 条件下生长的菌体 OD 值是原始菌的 7 倍, 甚至在 pH 5.2 条件下仍能生长。改组菌 F3-21 与原始菌 CGMCC 1593 在 5 L 发酵罐中进行分批发酵, pH 控制在 5.6~6.0 之间, 厌氧发酵 48 h, F3-21 积累琥珀酸 38.1 g/L, 较出发菌 (26.2 g/L) 提高了 45%, 并且发酵过程  $\text{MgCO}_3$  的用量也减少了

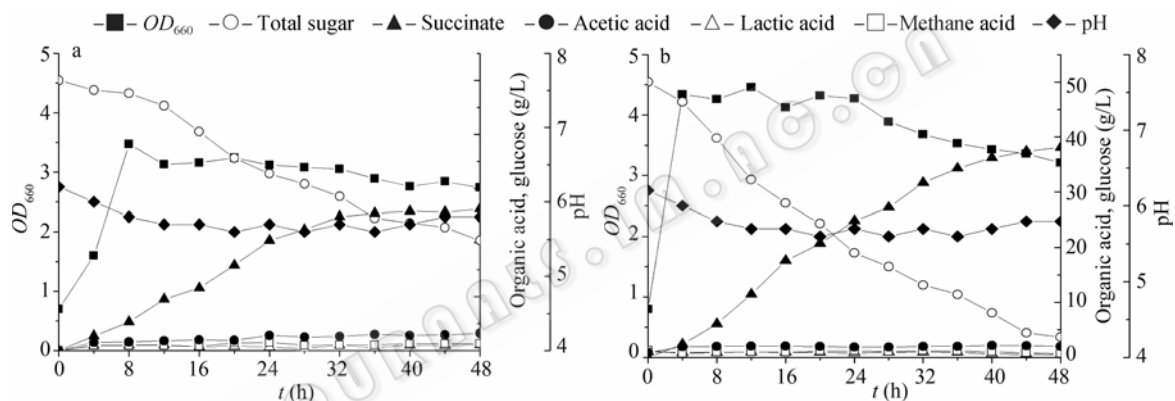


图 5 原始菌株 CGMCC 1593(a)与改组菌株 F3-21(b)在较低 pH 控制下的发酵曲线

Fig. 5 The time courses of the batch fermentation of CGMCC 1593(a) and F3-21(b) under lower pH

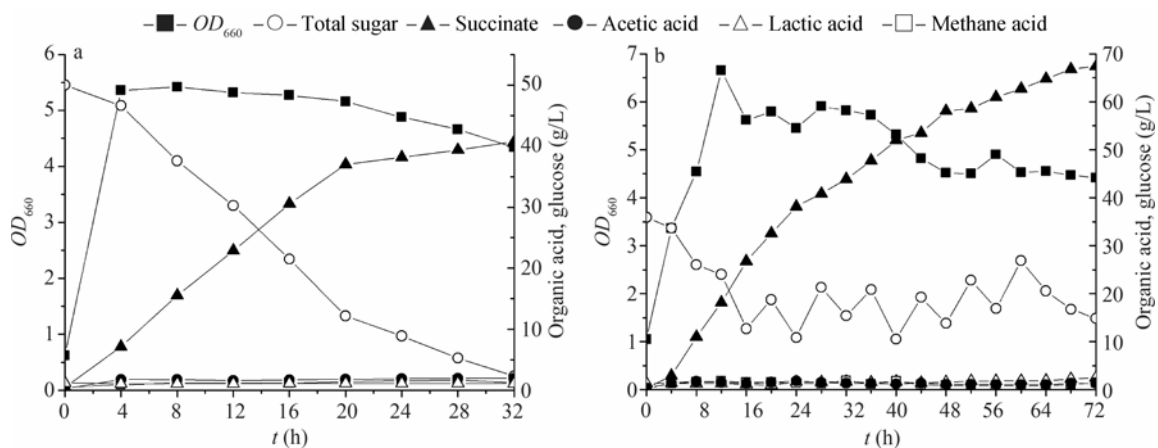


图 6 改组菌株 F3-21 在 5 L 发酵罐中分批发酵(a)与补料分批发酵(b)曲线

Fig. 6 Time course of cell growth and production of succinic acid in batch(a) and fed batch(b) fermentation

22.5%。当 pH 控制在 6.5~7.0 之间分批发酵时, 改组菌 F3-21 产琥珀酸 40.7 g/L, 琥珀酸产率 81.4%, 分别比出发菌(产琥珀酸 33.2 g/L, 琥珀酸产率 68%)提高 22%和 19%。补料分批发酵时, F3-21 最高积累琥珀酸达 67.4 g/L。实验表明了基因组改组技术能够用于耐酸性琥珀酸放线杆菌的选育。

## 参 考 文 献

- [1] Stemmer WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91**(22): 10747-10751.
- [2] Cramer A, Raillard SA, Bermudez E, *et al.* DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 1998, **391**(6664): 288-291.
- [3] Zhang YX, Kim P, Victor A, *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, **415**: 644-646.
- [4] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, *et al.* Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**: 707-712.
- [5] Wang YH, Li Y, Pei XL. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 2007, **129**: 510-515.
- [6] 林峻, 施碧红, 施巧琴, 等. 基因组改组技术快速提高扩展青霉碱性脂肪酶产量. *生物工程学报*, 2007, **34**(4): 672-676.
- [7] 陈涛, 陈洵, 王靖宇, 等. DNA 及基因组改组在代谢工程中的应用. *化工学报*, 2004, **55**(11): 1753-1758.
- [8] 王灏, 王航, 孟春, 等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(4): 705-708.
- [9] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **76**: 727-740.
- [10] 朱蕾蕾, 刘宇鹏, 郑璞, 等. 一株琥珀酸产生菌的筛选及鉴定. *微生物学通报*, 2007, **34**(1): 80-84.
- [11] Lin SKC, Du CY, Koutinas A, *et al.* Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering*, 2008, **41**: 128-135.
- [12] 郑璞, 周威, 倪晔, 等. 环境因素对琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 发酵丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2008, **24**(6): 1051-1055.
- [13] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, *et al.* Strategies of pH control and glucose fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, **87**: 722-729.
- [14] 徐敏, 郑璞, 倪晔, 等. 琥珀酸放线杆菌耐高浓度钠离子菌株的选育. *工业微生物*, 2008, **38**(3): 1-5.
- [15] 孙志浩, 郑璞, 刘宇鹏, 等. 一种微生物发酵生产丁二酸的菌种和方法: 中国专利, 200610038113.6.
- [16] 郑重谊, 谢达平, 谭周进. 影响微生物原生质体融合技术的因素. *湖南农业科学*, 2006, **4**: 35-38.
- [17] 刘宇鹏, 朱蕾蕾, 郑璞, 等. 琥珀酸发酵高产菌株的选育. *工业微生物*, 2007, **37**(2): 1-6.
- [18] 诸葛健, 王正祥. *工业微生物实验技术手册*. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, pp.388-390.
- [19] 刘宇鹏, 郑璞, 孙志浩. 离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(12): 119-122.
- [20] 岑沛霖. *工业微生物*. 北京: 化学工业出版社, 2001, pp.335-344.
- [21] 罗文生, 沈萍. 盐生盐杆菌灭活原生质体融合的研究. *武汉大学学报*, 1995, **41**: 751-756.
- [22] 李祥锴, 安志东, 朱非. 林肯链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究. *氨基酸和生物资源*, 2001, **23**(4): 24-27.
- [23] 王玉华, 李岩, 裴晓林, 等. 基因组改组提高干酪乳杆菌耐酸性生产 L-乳酸. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(2): 53-58.