

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 7/40
C12P 7/54



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98802169.2

[45] 授权公告日 2003 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1121500C

[22] 申请日 1998.1.30 [21] 申请号 98802169.2
[30] 优先权
[32] 1997. 1.31 [33] US [31] 08/792,655
[86] 国际申请 PCT/US98/01877 1998.1.30
[87] 国际公布 WO98/33930 英 1998.8.6
[85] 进入国家阶段日期 1999.7.29
[71] 专利权人 UT - 巴泰尔有限公司
地址 美国田纳西州
共同专利权人 芝加哥大学
[72] 发明人 N·P·恩希姆 M·唐纳利
C·S·米勒德 L·斯托尔斯
[56] 参考文献
CN1125961A 1996.07.03 C12P7/40
CN1130404A 1996.09.04 C12P7/40
US4624920A 1986.11.25 C12P7/40

审查员 谢 妍
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称 一种生产二羧酸的方法
[57] 摘要

本发明是通过发酵来经济地生产羧酸的方法，该方法包括下列步骤：a) 将生产羧酸的生物体接种到含碳源的培养基中；b) 在有氧气氛下培养产生羧酸的生物体，以促进生物体迅速生长，从而增加生物体的生物量；c) 有控制地释放氧气以维持有氧气氛；d) 有控制地将含有碳源的溶液加入生物量已有增加的生物体中，以维持培养基中的碳源浓度约为 0.5 - 1 克/升；e) 除去有氧气氛中的氧气，产生无氧气氛，使生物体进行无氧代谢；f) 有控制地在生物量已有增加的生物体中加入含有碳源的溶液，维持培养基中的碳源浓度大于等于 1 克/升；和 g) 利用生物体的无氧代谢将碳源转变成羧酸。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种生产羧酸的方法，该方法包括下列步骤：

a)将生产羧酸的生物体接种到含碳源的培养基中；

5 b)在有氧气氛下培育所述生物体；

c)有控制地将氧气释放入培养环境中以维持所述有氧气氛；

d)有控制地将含有所述碳源的溶液加入所述生物体中，以维持所述培养基中的所述碳源浓度为 0.5-1 克/升；

10 e)除去所述有氧气氛中的所述氧气，产生无氧气氛，使所述生物体进行无氧代谢；

f)有控制地在所述生物体中加入含所述碳源的所述溶液，维持所述培养基中的所述碳源浓度大于等于 1 克/升；和

g)利用所述生物体的所述无氧代谢将所述碳源转变成羧酸。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物体选自大肠杆菌和乳杆菌。

15 3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物体是耐渗透的，所述生物体因而能产生有机酸而所述生物体的代谢不会受到抑制。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述生物体是从缺失丙酮酸甲酸裂解酶和乳酸脱氢酶基因的亲代生物体中衍生获得的大肠杆菌菌株。

20 5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述生物体用基因工程方法改造成能表达使所述生物体可以将丙酮酸转变成二羧酸的酶。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述酶是苹果酸酶。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生琥珀酸、乙酸和乙醇，其中所述琥珀酸是主要产物。

25 8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生苹果酸、乙酸和乙醇，其中所述苹果酸是主要产物。

9. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生延胡索酸、乙酸和乙醇，其中所述延胡索酸是主要产物。

10. 一种生产羧酸的方法，该方法包括：

a)将一定生物量的生产羧酸的生物体接种到含碳源的培养基中；

30 b)在具有 6.2, 6.6-7.0 和 7.4 的维持 pH 值和有氧气氛的环境下培育所述生物体；

c)有控制地将氧气释放入培养环境中以维持所述有氧气氛；

d)有控制地将含所述碳源的所述溶液加入所述生物体中，以维持所述培养基

中的所述碳源浓度为 0.5-1 克/升；

e)将生物量已有增加的所述生物体转移到具有无氧气氛的生产发酵罐中，使所述生物体进行无氧代谢；

f)有控制地在生物体中加入含所述碳源的溶液，维持所述生产发酵罐中的所述碳源浓度大于等于 1 克/升；和

g)利用所述生物体的所述无氧代谢将所述碳源转变成羧酸。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述生物体选自大肠杆菌和乳杆菌。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述生物体是耐渗透的，所述生物体因而能产生有机酸而所述生物体的代谢不会受到抑制。

10 13. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述生物体是从缺失丙酮酸甲酸裂解酶和乳酸脱氢酶基因的亲代生物体衍生获得的大肠杆菌菌株。

14. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述生物体用基因工程方法改造成能表达使所述生物体将丙酮酸转变成二羧酸的酶。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述酶是苹果酸酶。

15 16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生琥珀酸、乙酸和乙醇，其中所述琥珀酸是主要产物。

17. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生苹果酸、乙酸和乙醇，其中所述苹果酸是主要产物。

20 18. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述生物体通过所述无氧代谢产生延胡索酸、乙酸和乙醇，其中所述延胡索酸是主要产物。

一种生产二羧酸的方法

5

发明领域

本发明涉及一种生产二羧酸的方法，更特别涉及一种用大肠杆菌菌株生产诸如苹果酸、延胡索酸和琥珀酸的二羧酸的发酵方法。

发明背景

10

羧酸及其衍生物作为精细化学物质广泛用于聚合物、食物、药物和化妆品。例如，琥珀酸可用来生产塑料前体如 1,4-丁二醇(BDO)、四氢呋喃和 γ 丁内酯。从琥珀酸衍生获得新产品仍继续在开发中，包括聚酯的开发。聚酯通过连接琥珀酸和 BDO 来制得。通常，琥珀酸的酯能作为新的“绿色”溶剂来代替更有害的溶剂，作为每年总市场值超过 10 亿美元的数百万磅化学品的的前体。

15

从可再生原料(在这里是通过发酵方法)生产羧酸(如苹果酸、琥珀酸和延胡索酸)代替了从不可再生资源获得这些酸的耗能更大的方法。琥珀酸是丙酸产生菌厌氧发酵的中间产物，但是这些方法获得的产量和浓度很低。

20

已经分离出许多生产琥珀酸的生物体，例如应用的瘤胃细菌 *Bacteroides ruminicola* 和 *Bacteroides amylophilus*。然而，瘤胃生物在发酵过程中的性质不稳定。另一类生产琥珀酸的生物体是产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*(*A. Succiniciproducens*)。已经公布了几个专利关于在厌氧发酵过程中用该生物体生产琥珀酸。其中一个专利(Glassner 等，美国专利 No. 5,143,834)描述了在发酵过程中用该生物体天然产生适中量的琥珀酸。然而，采用产琥珀酸厌氧螺菌的发酵过程有许多问题。一个问题是，该生物是一种严格的厌氧菌，它的培育必须在绝对没有氧的环境下进行。在工业发酵中，该生物体的繁殖很困难，并且需要高技术工作人员。产琥珀酸厌氧螺菌甚至在实验室规模的实践中也很难操作，并且容易在不利的条件下退化。其退化不可逆。该生物体从没有用于工业发酵过程。换句话说，该特定生物的生产规模的发酵试验不存在。另外，该生物体需要外部供应二氧化碳来获得高产量的琥珀酸。在发酵过程中，必须将纯二氧化碳气流喷入发酵培养基内。产琥珀酸厌氧螺菌产生了琥珀酸和乙酸的混合物，琥珀酸和乙酸的摩尔比约为 2。发酵培养基中高浓度乙酸的存在增加了琥珀酸纯化的成本。乙酸副产物的产生表明，三分之一的昂贵的葡萄糖没有被

25

30

转变成琥珀酸。另外，已经表明，产琥珀酸厌氧螺菌没有很高的耐渗透能力，因为它不能耐受高浓度的盐，而且它还会被适中浓度的产物抑制。采用产琥珀酸厌氧螺菌的另一个问题是，在制备用于接种的培养基时需要加入色氨酸，并且需要混合四种不同的溶液，其中一种溶液含有具腐蚀性和毒性的 H_2S 。

5 很早就知道，大肠杆菌发酵产生了酸的混合物，如 J.L. Stokes 在 1949 年“大肠杆菌悬浮发酵葡萄糖” (*J. Bacteriol.*, 57:147-158) 中描述的那样。然而，对于发酵一摩尔葡萄糖，仅仅产生了 1.2 摩尔甲酸、0.1-0.2 摩尔乳酸和 0.3-0.4 摩尔琥珀酸。因此，通过发酵生产羧酸的努力导致相当大量的生长底物(如葡萄糖)没有被转变成所需的产物。

10 Fairoz Mat-Jan 等在 *J. Bacteriol.*, 171 卷(1989)中描述了对于发酵中与 NAD 关联的乳酸脱氢酶(ldh)缺陷的大肠杆菌突变株的研究，该突变株已经被分离出，并表明在厌氧条件下没有生长缺陷，除非同时存在丙酮酸甲酸裂解酶(pfl)缺陷。双重突变株(pfl ldh)在厌氧条件下即使是补加了乙酸也不能在葡萄糖或其它糖类中生长，而 pfl 突变株却能生长。该研究没有讨论也没有调查琥珀酸或二羧酸的产生。

15 尽管琥珀酸离子是一些厌氧微生物代谢途径中常见的中间体，但是本领域中仍需要有一种发酵方法来经济地大量或高产量生产琥珀酸和其它羧酸(如苹果酸和延胡索酸)。该方法应采用低成本的营养物和底物，发酵速度应实现高的产量，且发酵液中的产物浓度应当较高。

20

发明目的

因此，本发明的一个目的是提供一种改进的、实用的和经济的方法来生产二羧酸，该方法能克服已有技术中存在的缺点和问题。

25 本发明的另一个目的是提供一种改进的、实用的和经济的方法来大量生产琥珀酸、苹果酸和延胡索酸。

本发明还有一个目的是提供一种采用大肠杆菌突变株来大量生产琥珀酸、苹果酸和延胡索酸的发酵方法。

30 本发明的另一个目的是提供一种改进的、实用的和经济的方法，该方法采用大肠杆菌突变株来大量生产琥珀酸、苹果酸和延胡索酸，其中发酵在独立容器内进行，从而能精确地控制溶氧、葡萄糖含量、pH 和营养物加入速度。

本发明的其它目的可从本文所含描述部分中明显看出。

概述

根据本发明的一个方面，前述及其它目的通过一种生产羧酸的方法来实现，该方法包括下列步骤：a)将生产羧酸的生物体接种到含碳源的培养基中；b)在有氧气氛下培养生产羧酸的生物体，促进生物体迅速生长，从而增加生物体的生物量；c)有控制地释放氧气以维持有氧气氛条件；d)有控制地将含有碳源的溶液加入生物量已有增加的生物体中，以维持培养基中的碳源浓度约为0.5-1克/升；e)除去有氧气氛中的氧气，形成无氧气氛条件，使生物体进行无氧代谢；f)有控制地在生物量已有增加的生物体中加入含有碳源的溶液，维持培养基中的碳源浓度大于等于1克/升；和g)利用生物体的无氧代谢将碳源转变成羧酸。

根据本发明的另一个方面，其它目的通过一种生产羧酸的方法来实现，该方法包括下列步骤：a)将生产羧酸的生物体接种到含碳源的培养基中；b)在维持pH值和有氧气氛的环境下培育该生物体，促进生物体迅速生长，从而增加生物体的生物量；c)有控制地释放氧气以维持有氧气氛的条件；d)有控制地将含有碳源的溶液加入生物体中，以维持培养基中的碳源浓度约为0.5-1克/升；e)将生物量已有增加的生物体转移到无氧气氛下的生产发酵罐中，使生物体进行无氧代谢；f)有控制地在生物体中加入含有碳源的溶液，维持生产发酵罐中的碳源浓度大于等于1克/升；和g)利用生物体的无氧代谢将碳源转变成羧酸。

附图简述

为了更好地理解本发明及其其它目的、优点和性能，在阅读下列内容和所附权利要求时应结合附图，其中：

图1显示了实施例1所述实验的结果。

图2显示了实施例2所述实验的结果。

图3显示了实施例3所述实验的结果。

图4显示了实施例4所述实验的结果。

图5显示了实施例5所述实验的结果。

图6显示了实施例6所述实验的结果。

图7显示了实施例7所述实验的结果。

发明详述

本发明是一种在可控发酵过程中大量生产琥珀酸、延胡索酸和苹果酸的实用、经济的新方法。在本发明的发酵过程中已经用大肠杆菌菌株(*Escherichia*

coli)(指 AFP-111)克服了本领域中存在的问题。

AFP-111 是 NZN-111 大肠杆菌突变株,它是一种兼性生物体,大肠杆菌非常容易操作。现已知道其详细的分子生物学和生理学性质。因此,通过分子生物学或改进过程参数或培养基很容易改进该方法。另外,大肠杆菌已经广泛用于发酵
5 生产生物药物和化学物质。该生物体有许多生产规模的实践。

大肠杆菌也生产琥珀酸和乙酸的混合物,但是在未优化的条件下,琥珀酸和乙酸的摩尔比约为 3 或更高。该比例可大大提高。发酵液中更低的乙酸浓度将大大减少琥珀酸纯化成本。另外,大肠杆菌不需要外部供应二氧化碳就可大量生产琥珀酸。在不喷入二氧化碳下,生产峰值期间的琥珀酸产量与产琥珀酸厌氧螺菌
10 采用二氧化碳喷入时所得的产量相当。

通常,野生型大肠杆菌在无氧条件下产生了发酵产物的混合物,其中琥珀酸是较少的组分。然而,当 AFP111 在无氧条件下生长时,主要的代谢产物却是琥珀酸。AFP-111 含有独特的自发的染色体突变,它产生了琥珀酸、乙酸和乙醇的混合物,其中琥珀酸是主要产物。用 AFP-111,每份重量的葡萄糖最高产量为 99%
15 重量的琥珀酸。用 AFP-111 可大大降低发酵生产琥珀酸的成本。

大肠杆菌发酵过程由两个阶段组成。首先,AFP-111 菌株在发酵罐中在低葡萄糖环境和有氧条件下生长至高细胞密度。在本发明中,葡萄糖既作为生物体生长的碳源,又用来生产二羧酸。当达到所需细胞密度时,停止通入空气,使生物体变为无氧代谢,从而产生二羧酸(包括苹果酸、延胡索酸和琥珀酸)作为最终产
20 物。在本发明的一个实例中,该两阶段发酵过程在单个容器中发生。

大肠杆菌中的琥珀酸产生生化途径涉及一系列转变步骤。丙酮酸首先被转变成草酰乙酸,然后变成苹果酸、延胡索酸,最终变成琥珀酸。在这些酸中,苹果酸、延胡索酸和琥珀酸在工业上是很重要的。AFP-111 累积琥珀酸作为最终产物。如果延胡索酸是所需的产物,则使编码将延胡索酸转化为琥珀酸的酶的基因
25 缺失,这样,所得生物体将累积延胡索酸而不是琥珀酸。同样,如果苹果酸是所需的产物,则使编码将苹果酸变为延胡索酸的酶的基因缺失,以获得生产苹果酸的生物体。根据分子生物学技术目前的水平和对全部大肠杆菌连锁图谱的了解,特定基因的缺失只是一项简单的工作。分别采用生产苹果酸和延胡索酸的生物体,运用生产琥珀酸的发酵过程可以容易地用于生产苹果酸和延胡索酸。

30 整个过程是补料分批式。在该过程中,以足够的速度将浓缩的葡萄糖溶液加入发酵罐中以维持参与葡萄糖浓度小于等于 1 克/升,其中葡萄糖溶液还含有淡玉米浆(light steep water)作为有机氮源、生长因子和无机营养物。需要低葡萄糖浓度

来防止形成过多乙酸。在有氧生长阶段期间形成高浓度的乙酸最终会使生物体的生长停止，从而不能获得高的细胞密度。在无氧生产阶段，高的乙酸浓度会降低琥珀酸产生的速度并最终使其完全停止。用 AFP-111 可大大减少发酵生产琥珀酸的成本。

- 5 计算机根据尾气分析或在线葡萄糖分析控制葡萄糖进料速度，很容易在工业发酵罐中维持低的葡萄糖浓度。这已经成为非常普通的工业实践。

厌氧发酵是从燃料(如葡萄糖)获得能量的最古老的途径。在厌氧细胞中，这是唯一的能量产生过程。在大多数兼性细胞中，这是葡萄糖代谢中必须经历的第一阶段，然后通过三羧酸循环来有氧氧化发酵产物。

- 10 使用最广泛的一类发酵是糖酵解，其产生丙酮酸作为次末级产物。丙酮酸的处置取决于生物体中的基因。在有乳酸脱氢酶存在时，当丙酮酸被 NADH 和 H^+ 还原成乳酸时，糖酵解终止。在丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶存在时形成乙醇。在丙酮酸甲酸裂解酶(pfl)存在时，发酵终止并产生乙酸、乙醇和甲酸，或氢和二氧化碳。

- 15 如果细菌基因组中的一个或多个突变除去了生物体中起丙酮酸分解代谢作用的基因，则丙酮酸会累积。在大肠杆菌无氧生长时，这些基因是丙酮酸甲酸裂解酶(pfl)和乳酸脱氢酶(ldh)。研究人员可从 Southern Illinois University, Carbondale, Ill. 62901 获得大肠杆菌菌株 NZN111，该菌株中这两个酶的基因均有突变，由于大肠杆菌染色体 DNA 序列的改变导致 pfl 和 ldh 被灭活。因此，NZN 111 不能在发酵中生长。AFP-111 是通过 NZN-111 进行附加的基因改变而获得的，它在无氧条件下产生了琥珀酸、乙酸和乙醇的混合物，其中琥珀酸是主要产物。

已经发现，对 NZN111 作其它改变(无论是通过选择性培育还是通过质粒转化自发产生的)，最终都将获得产生琥珀酸作为主要产物的菌株 AFP-111。

- 25 在系列培养方法中采用选择性环境时，NZN111 会自发产生导致 AFP-111 型特性的染色体突变。在第一个步骤中，在富含培养基(如 Luria Bertaini(LB)肉汤(0.5%酵母抽提物，1%胰蛋白胨和 1%氯化钠，pH7.5))中有氧条件下增加 NZN111 生物量。希望产量约在 10^9 至 10^{10} 个细胞/毫升之间。尽管培养时间可以改变，但是在 37 °C、标准气压下 5-7 小时的生长时间就可产生上述浓度。

- 30 第二步骤是，现在使累积的生物物质处于富含葡萄糖的无氧条件下，仅使能分解丙酮酸的那些细胞(突变株)生长。例如，将细胞涂布在 1.5%琼脂板上，该板含有约 1-30 克/升(g/l)葡萄糖(较佳的还有 10g/l 葡萄糖)和 30 微克(μ g)/毫升卡那霉素。在 NZN111 中的乳酸脱氢酶中插入卡那霉素抗性基因。使培养物在有控制的

无氧气氛下 37℃ 生长 24 小时。产生良好结果的一种无氧气氛是二氧化碳和氢的混合物，它由商业上可从 Becton-Dickinson, Cockeysville, Maryland 以 GASPAK™ 购得的气氛控制装置来提供。

5 培养期间产生了许多 AFP 111 菌落(每 10⁷ 个细胞约 2 个)，其中约有一半能在液体培养基中生长，来产生所需的混合产物。

在质粒转化情况下，当用含编码突变型苹果酸脱氢酶的基因 *mdh* 的质粒 pMDH13 转化 NZN111 时，丙酮酸的分解代谢继续产生乳酸。连续培育该转化子 (NAN111(pMDH13))，获得含有染色体自发突变的 AFP111。AFP111 产生琥珀酸、乙酸和乙醇的混合发酵产物，与培养基中所用的葡萄糖重量相比，琥珀酸产率高达 99%。pMDH13 的开发和转化过程与 W. E. Boernke 等, (1995 年 9 月 10 日) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322, No. 1 43-52 页中描述的类似，该文纳入本文作参考。

为了对本文所述的菌株进行实验评价，使细胞在无葡萄糖的生长培养基 (Luria 肉汤) 中作有氧培养，直至细胞密度达到 0.5-1.0 OD₆₀₀。

15 一旦 AFP 111 到达该合适的生物量时，将细胞注射或转移到密封的发酵反应容器中。使肉汤与葡萄糖或其它一些合适的糖类(例如木糖、半乳糖或阿拉伯糖，糖浓度在约 10-30 克/升之间)混合。现在，所含混合物所处的气氛发生变化，变为无氧条件。实现该气氛改变的一种方法是利用通气系统将环境空气转换成二氧化碳。

20 在将混合物加入发酵反应容器之前，在容器内加入适量的缓冲培养基(例如 MgCO₃、CaCO₃ 或 CaMg(CO₃)₂)来维持 pH 近中性。通常用大约为 4 至 8% 重量的缓冲培养基提供合适的缓冲能力。当缓冲培养基以固体形式存在时可获得特别佳的结果，因为这可以赋予发酵液缓释的缓冲性能。

上述过程将产生高产量的琥珀酸。例如，获得的琥珀酸与乙酸的重量比为 25 6:1，得率为 99%。当发酵在浓度约为 25-100% 的氢气中进行时，琥珀酸与乙酸之比会更高。这些结果表明，与已有技术的生物体不同，突变型 AFP111 采用外源氢气作为还原剂。例如，当 luria 肉汤、葡萄糖、缓冲剂和氢气与二氧化碳(二氧化碳从缓冲剂中释放出来)的混合物存在时，获得的琥珀酸与乙酸之比达到 9。这个结果反映了将葡萄糖分解代谢确定到所需产物的另一个优点，即，没有产生 30 非目的乙酸的副反应。

下表 1 描述了原始亲代 W1485(也从 Southern Illinois University 获得)、NAN111 和 AFP111 的二羧酸产物的分布情况。

表 1

产物得率(以摩尔得率表示), 即 AFP111 及其祖先的最初葡萄糖(摩尔百分数)

产物	原始亲代 W1485	直接亲代 NZN 111	突变株 AFP111
琥珀酸	17	2	109
乳酸	24	0	0
丙酮酸	1	17	0
甲酸	26	0	0
乙酸	51	6	49
乙醇	80	15	47
总产物	193%	41%	206%*

*摩尔得率的理论值可以是 200%，因为一分子葡萄糖可提供两分子所有产物。

- 5 当采用 100%的二氧化碳气氛时，可促进琥珀酸生产，每升溶液中的琥珀酸浓度达到大约为 45 克，产量约为每小时每升 1.6 克，琥珀酸克数与葡萄糖克数的得率百分数达到 99%，琥珀酸和乙酸的重量比约为 6。

当 NZN111 中产生大肠杆菌 NAD 依赖型苹果酸酶(通过导入基因 *maeA*)时，它也产生琥珀酸。在这种情况下，用可诱导的质粒 pMEE2-1 使苹果酸酶基因在转化体 NZN111(pMEE2-1)表达。

10 将从大肠杆菌 MC1061 中分离出来的基因组 DNA 作为 PCR 法克隆苹果酸酶的模板。用限制性核酸内切酶 Hind III 和 PstI 消化大肠杆菌 MC1061，所得消化物在 1%TAE 琼脂糖凝胶上分离。如上所述，用 Photo Nucleic Acid Detection System(目录号 8192SA)通过 Southern 印迹分析测定含苹果酸酶基因的基因组 DNA 片段的大小。

引物是根据基因的公开的部分 DNA 序列：

有义：CGAAG AACAA GCGGA ACGAG CAT；

反义：GGCAG CAGGT TCGGC ATCTT GTC；

20 在标准的 100 微升(μl)PCR 反应中，将 1 微升(μM)引物与约 20 纳克(ng)基因组 DNA 混合，该反应产生了预计位 0.8 千碱基(kb)苹果酸酶的内部片段。用 Qiaex Gel Extraction 试剂盒(Qiagen, Inc., Chatsworth, California)纯化 PCR 产物，用 BioNick Labelling System(GibcoBRL, Gaithersburg, Maryland)生物素化。将生物素化的 PCR 产物用作 Southern 印迹分析大肠杆菌基因组 DNA 中的探针，大肠杆菌

基因组 DNA 已用 Hind III 和其它一种第二内切核酸酶切割。测得苹果酸酶基因位于含有 2.0-2.5kb 的由 Hind III 和 Pst I 消化的 DNA 片段的区域内。

用 Hind III 和 Pst I 消化 1 微克大肠杆菌 DNA，并在 1%的制备性 TAE 琼脂糖凝胶上分离。用 Qiaex Gel Extraction 试剂盒分离纯化出位于 2.0-2.5kb 区域中的
5 大肠杆菌 DNA 片段。将纯化的 DNA 片段连接到 pUC19 的多接头区域中，pUC19 已经用 Pst I 和 Hind III 断裂并用虾碱性磷酸酶处理。然后用连接物作为模板，用 PCR 反应来扩增整个苹果酸酶基因。将 1 微升连接混合物用作模板，并用 1 μ M 靶向苹果酸酶基因的有义引物 GATGCC CCATGG ATATTC AAAAAA GAGTG AGT，以及 0.25 μ M 靶向连接的 pUC19 DNA 的反义引物 TTTT CCCA GTCA
10 GTTG。扩增参数为 94 $^{\circ}$ C 变性、55 $^{\circ}$ C 杂交 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟，总共循环 35 次。在 1%TAE-琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物，用 Qiaex Gel Extraction 试剂盒分离纯化获得 1.8kb 片段。用 *Bcl* 和 *Bgl* 消化一部分 PCR 产物，以证明产物确实含有苹果酸酶基因。用 Pst I 和 NcoI 消化其余的 PCR 产物，凝胶分离，再次纯化，然后连接到已经用 Nco I 和 Pst I 断裂的表达载体 pTRC99a(Pharmacia, Piscataway,
15 New Jersey)的多接头区域。通过标准方法用连接混合物转化大肠杆菌菌株 NZN111，通过限制性片段分析用 *Xmn*(预计为 0.7kb, 1.4kb 和 3.9kb 片段)筛选所得菌落(四个菌落来自实验，2 个菌落来自对照)的苹果酸酶基因。含有克隆的苹果酸酶基因的质粒命名为 pMEE3。

使 100 毫升 NZN(pMEE3)培养物培养过夜生长，用 Qiagen 质粒试剂盒分离
20 出质粒。将分离出的质粒用作 PCR 反应的模板。设计新的引物，使其 N 端为位于第一次克隆苹果酸酶时所用引物下游的 81 个碱基对。用 20 纳克质粒作为模板，并用 1 μ M 有义引物 AGGAT CCAT GGAAC CAAA AACAA AAAAC 和反义引物 CGCCA GGGT TTTCC CAGTC ACGAC。扩增参数如上所述。再次用 *Bcl* I 和 *Bgl* II 的限制性图谱鉴定一部分 PCR 产物，确证产物含有苹果酸酶基因。用
25 *Pst* I 和 *Nco* I 消化其余 PCR 材料，凝胶分离，重新纯化，然后连接到已经用 Nco I 和 Pst I 断裂的表达载体 pTRC99a(Pharmacia, Inc. Piscataway, N.J.)的多接头区域中。通过标准方法用连接混合物转化大肠杆菌 JM 109，通过限制性片段分析筛选所得菌落(三个为实验克隆，一个为对照克隆)中所需的插入物。含有这种苹果酸酶基因的质粒称为 pMEE2。

30 将 1.5 毫升的 pMEE2 过夜培养物接种到 30 毫升含 100 微克/毫升氨苄青霉素的 LB 肉汤中。生长 2 小时后，将 30 毫升培养物分成 3 份 10 毫升的等份。用 0、100 μ M 和 10 μ M 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导酶活性。在 0、1、2、3、4

小时从各培养物中取出 2 毫升样品。根据标准方法分离蛋白，如上所述测定活性。

随时间产生的酶如下表 2 所示：

表 2

5	LB 肉汤中由 IPTG 诱导的苹果酸酶生产			
	时间(小时)	没有 IPTG	100μM IPTG	10μM IPTG
		μg/分钟/毫克蛋白		
	0	3.09		
	1	4.83	26.5	5.84
	2	4.26	38.2	10.06
	3	8.46	75.3	32.7
	4	9.92	88.2	38.95

使两份 NZN 111(pMEE2)培养物以及 NZN 111(pTRC99a)(作为对照)在 2 毫升含氨苄青霉素的 LB 培养基中有氧生长。各培养物的一份用 10μM IPTG 诱导。3 小时后，OD₆₀₀ 由 0.6 增加到 4.8。将 1 毫升培养物注射到密封的含 10 毫升 LB 培养基的 58 毫升小瓶中，确证 LB 培养基含有 20 克/升的葡萄糖、1 克/升乙酸和 10 0.5 克固体碳酸镁。气氛由高于环境压力 1 个大气压的压力下的空气、氢气和二氧化碳(比例为 1：1：2)组成。立即取样，并在 37℃、100rpm 振荡培育时定期取样。下表 3 提供了当 NZN 111 用原来的载体(pTRC99a)和 pMEE2 转化时的产物产量。

表 3

15	NZN 111(pMEE2)中对 NZN 111(pTRC99a)中的苹果酸酶表达效果		
	产物	载体	<i>maeA</i>
		克/升	
	琥珀酸	0.3	6.5
	乳酸	0.4	0.4
	乙酸	0	0
	乙醇	0	0.2

表 3 所示结果是培育时间约为 9 至 42 小时的结果。

作为琥珀酸前体的苹果酸在原则上是比琥珀酸更佳的最终产物，因为其生产所需还原步骤少一步。苹果酸生产的理论化学计量比为 1 摩尔葡萄糖和 2 摩尔二氧化碳变成 2 摩尔苹果酸。因此，苹果酸的生产可使葡萄糖没有浪费，也可形成

延胡索酸，它是还原途径中苹果酸的脱氢产物和琥珀酸的前体。苹果酸和延胡索酸均能在不产生副产物下形成，但是苹果酸的更高的溶解度使得其适用于大规模生产过程。

5 用能产生苹果酸酶的基因(如 *maeA*)转化合适的细菌可产生多余的苹果酸。通常，理想的细菌缺少乳酸脱氢酶活性和使丙酮酸代谢的其它酶，从而导致丙酮酸的累积。相反，可用 *maeA* 转化细菌来直接产生苹果酸。为了维持高水平地产生苹果酸，细菌必须不能将苹果酸变回乳酸或变成延胡索酸或琥珀酸。由于一些乳酸杆菌缺少起这些转变作用的苹果酸乳酸酶(malolactate enzyme)、延胡索酸酶和延胡索酸还原酶，因此这些菌株是发酵生产苹果酸中特别合适的候选者。由于乳

10 酸杆菌具有高度耐渗透性，因此它的适合性进一步增强。 *Lactobacillus gasseri* 是一种用于这些应用的近期宿主(near term host)，因为它已经显示在葡萄糖发酵时不会使苹果酸代谢，并且在基因水平已被很好地鉴定。干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*)也具有相当大的潜力，因为它表现出的耐渗透性比 *L. gasseri* 更高。

15 通常，合适的乳酸杆菌表达载体(如诱导入缺少功能性乳酸脱氢酶的乳酸杆菌宿主中的 pTRK327)中的苹果酸酶基因可形成苹果酸。这可通过将苹果酸酶基因插入宿主中乳酸脱氢酶基因来实现。

用于下列实施例来生产羧酸的化学物质包括：酵母抽提物和胰蛋白胨(Difco)、葡萄糖(A. E. Staley)、淡玉米浆(A. E. Staley 玉米加工厂，在 Loudon, Tn.)、

20 无机化学物质(E. Merck Science 或 J.T. Baker，试剂级)。所用装置包括：1 升发酵罐(Virtis)、5 升发酵罐(New Brunswick, Bioflow 3000)、泵(Cole-Parmer, Master Flex)、pH 探头(Cole-Parmer)、pH 控制器(Cole-Parmer, Chem Cadet)、溶氧计(Cole-Parmer, 01971-00)、溶氧探头(Ingold)、高压蒸汽灭菌器(Amsco, Eagle 3000)、摇床(New Brunswick)、低温管(Cole Parmer)。

25 葡萄糖分析仪来自 Yellow Springs Instrument Company(YSI 2700 选型)。另外，用来测定 OD 的分光光度计来自 Milton Roy(SPEC 21D)。

大肠杆菌 AFP-111 菌株得自 Argonne National Laboratory。AFP-111 菌株从 NZN-111 衍生获得。原种培养物这样制得，将 1 克碳酸镁($MgCO_3$)放入 250 毫升摇瓶中，用泡沫塞盖住并在 121 °C 下高压灭菌 20 分钟。然后，配制含胰蛋白胨

30 10 克/升、酵母抽提物 5 克/升、葡萄糖 5 克/升、氯化钠(NaCl)10 克/升、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)7 克/升、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)3 克/升的培养基 500 毫升。再将培养基 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟，使其冷却至室温。将 50 毫升培养基无菌转移到含

碳酸镁的第一摇瓶中。然后从来自 Argonne National Laboratory 的琼脂斜面用接种环取满环 AFP-111 接种到摇瓶内。然后将接种好的摇瓶在摇床上 250rpm 37 °C 培育。

5 然后，配制含胰蛋白胨 10 克/升、酵母抽提物 5 克/升、葡萄糖 5 克/升、氯化钠 10 克/升、 K_2HPO_4 7 克/升、 KH_2PO_4 3 克/升和硫酸镁($MgSO_4$)0.2 克/升的培养基 1 升。使培养基在 121 °C 下高压蒸汽灭菌 20 分钟，并使其冷却。然后，将 850 毫升无菌转移到 1 升发酵罐中。

10 当 250 毫升摇瓶培养 16 小时后，将全部培养液无菌转移到 1 升发酵罐中。发酵罐维持在 37 °C、pH7.0 下。空气从发酵罐底部底部喷入，搅拌速度设定为 500rpm 或更高，以确保充分向发酵液传递氧气，避免受氧气限制。用 pH 控制器维持 pH 为 7，该控制器根据需要开启泵以在发酵罐中加入碱溶液。

15 碱溶液这样制得：用搅拌棒将 250 毫升去离子水加入 500 毫升量筒中。用两层覆盖纸盖住量筒并于 121 °C 下高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后使其冷却至室温。然后，加入 250 毫升 30% 的氢氧化铵(NH_4OH)。然后加入油层以防止氨气逃逸。油在加入量筒中之前先经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟。溶液通过在磁板上搅拌来混合。所得碱溶液为 15% 氢氧化铵溶液。

为了制得甘油溶液，将 15 克甘油置于先加入 15 毫升去离子水的小摇瓶中。在摇瓶中加入小的搅拌棒，然后用泡沫塞盖住烧瓶并在磁板上混合，制得 50% 甘油溶液。甘油溶液于 121 °C 下高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后将其冷却至室温。

20 当发酵罐中的葡萄糖浓度约为 1 克/升时，从发酵罐中无菌地取出 30 毫升，并加入 50% 甘油烧瓶中。然后在磁板上搅拌混合物。然后将混合物无菌转移到低温冷冻管(在包装前经生产商灭菌)，每管约 1.2 毫升。将小管密封并保藏在 -70 °C 冷冻箱中。这些小管作为 AFP-111 原种培养物用于下列实施例。

25 实施例 1

30 从摇瓶中取出接种物。培养基含有胰蛋白胨 10 克/升、酵母抽提物 5 克/升、葡萄糖 5 克/升、氯化钠 10 克/升、磷酸氢二钾 14 克/升、磷酸二氢钾 6 克/升、硫酸铵 2 克/升和硫酸镁 0.2 克/升。将 50 毫升培养基置于 250 毫升摇瓶中。给摇瓶盖塞，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟，冷却至室温并用 1 毫升原种培养物小管接种。然后在 200rpm 下 37 °C 培育 16 小时。发酵培养基含有胰蛋白胨 10 克/升、酵母抽提物 5 克/升、葡萄糖 5 克/升、氯化钠 10 克/升、磷酸氢二钾 1.4 克/升、磷酸二氢钾 0.6 克/升、硫酸铵 2 克/升和硫酸镁 0.2 克/升。制得 1 升培养基，121 °C 高

压蒸汽灭菌 20 分钟，使其冷却至室温，然后将 850 毫升转移到 1 升发酵罐内。将摇瓶中的全部物质接种到发酵罐中。(发酵罐培养基含有低于 10 克/升的低浓度葡萄糖)。发酵在 37 °C、pH7.0、搅拌下进行。在需要时通过 pH 控制器的作用加入 15%NH₄OH 溶液，维持 pH 在 7.0。当发酵液中的原始葡萄糖耗尽时，打开
5 进料泵，向发酵罐中加入补料液。

将 250 克葡萄糖和 50 克淡玉米浆溶于 400 毫升去离子水中，制得补料液(溶液 1)。使溶液 1 于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后冷却至室温。然后制备溶液 2，将氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸铵和硫酸镁溶解在 1000 毫升去离子水中至浓度分别为 5 克/升、7 克/升、3 克/升、22.5 克/升和 1 克/升。使
10 该溶液于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后冷却至室温，并加入溶液 1 中。所得溶液用作发酵罐补料液。

进料泵的速度由人工控制，以使发酵罐中的葡萄糖残余浓度保持在小于等于 1 克/升。当葡萄糖浓度升高至高于 1 克/升时，减少泵速。若葡萄糖浓度太高(约为 5 克/升或更高)，则关闭泵，直至葡萄糖浓度降低至低于 1 克/升。在前 24 小时，
15 对发酵罐通气，以提供有氧环境使生物体生长至高细胞密度。在 24 小时时 660nm 下测得的光密度(OD₆₆₀)为 24。然后关闭通气，建立无氧环境，迫使生物体进行无氧代谢产生琥珀酸。维持无氧条件直至试验结束。在无氧阶段，葡萄糖浓度维持在大于等于 1 克/升。

图 1 显示了实施例 1 的结果，该结果归纳在下表 4 中。

20	表 4
琥珀酸最终浓度(克/升)	40.5
总产量(克琥珀酸/克葡萄糖)	0.54
生产阶段的产量(克琥珀酸/克葡萄糖)	0.95
总生产率(克/升-小时)	0.21
生产阶段的生产率(克/升-小时)	0.24
47 小时时的琥珀酸浓度(克/升)	17.9
47 小时时的生产率(克/升-小时)	0.38
琥珀酸与乙酸的最终摩尔比	1.35

实施例 2

本实施例中的实验基本上与实施例 1 中的方式相同，只是在 6 小时而不是 24 小时后关闭空气。在关闭空气时，OD₆₆₀ 为 6。

图 2 描绘出本实施例的结果, 该结果归纳在下表 5 中。

表 5

发酵时间(小时)	24	47
琥珀酸浓度(克/升)	16.0	29.20
生产率(克/升-小时)	0.67	0.62

结果表明, 较早地将发酵罐从有氧变为无氧条件可使结果有显著改善。

5

实施例 3

本实施例含有的培养基含有下列物质: 酵母抽提物 2 克/升、胰蛋白胨 15 克/升、氯化钠 2 克/升、硫酸铵 2 克/升、氯化钙 2 克/升、硫酸镁 0.2 克/升、磷酸二氢钾 1.3 克/升、氯化锰 0.01 克/升。在 5 升发酵罐中进行 4 种发酵。通过在需要时加入 5N NaOH, 将这些试验中的 pH 控制在 6.2, 6.6, 7.0 和 7.4。接种物用调节至 pH7.0 的相同培养基在摇瓶中培育。在发酵罐中, 细胞在有空气通入、搅拌速度为 500rpm 的有氧条件下生长至 OD₆₆₀ 为 6(约 5 至 6 小时)。将搅拌速度降低至 250rpm, 将喷入的气体改为纯二氧化碳。

图 3 描绘了实施例 3 的结果, 该结果归纳在表 6 中。表 6 是不同 pH 值下 100 小时时的发酵结果比较。

表 6

pH	6.2	6.6	7.0	7.4
琥珀酸(克/升)	23.3	35.7	30.1	27.5
乙酸(克/升)	3.3	5.3	6.3	6.0
葡萄糖用量(克)	126	224	193	184
发酵液体积(升)	3.6	4.3	4.4	4.5
产量(克琥珀酸/克葡萄糖)	0.67	0.68	0.69	0.67
琥珀酸:乙酸摩尔比	3.6	3.4	2.4	2.3

结果表明, 在大范围 pH 内(较佳的在约 6.6-7.0 内)可产生琥珀酸。

实施例 4

在本实验中, 酵母抽提物和胰蛋白胨均被淡玉米浆代替, 后者是一种低成本的玉米加工工业的副产物。用 50%NaOH 调节淡玉米浆的 pH 至 7.0, 制得淡玉米浆。通过 Whatman 2 号滤纸过滤, 除去悬浮的固体。该澄清的滤液用于发酵试验。

接种物在摇瓶中培育获得。配制含有下列物质的溶液：氯化钠 20 克/升、磷酸氢二钾 28 克/升、磷酸二氢钾 12 克/升、硫酸铵 4 克/升和硫酸镁 0.4 克/升。然后将该溶液于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟。然后，在 250 毫升摇瓶中加入 30 毫升淡玉米浆滤液。盖上瓶塞，于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后使其冷却至室温。然后在瓶内加入 30 毫升溶液 1(来自实施例 1)。因此，该培养基含有 50% 淡玉米浆滤液。将 0.1 毫升甘油原种培养物(实施例 1)接种到烧瓶中，35 °C、200rpm 下培育 16 小时。

配制含有下列物质的溶液 2：氯化钠 20 克/升、磷酸氢二钾 2.8 克/升、磷酸二氢钾 1.2 克/升、硫酸铵 4 克/升和硫酸镁 0.4 克/升。然后使该溶液于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 分钟并冷却至室温。在 1 升发酵罐中加入 425 毫升淡玉米浆滤液。使发酵罐在 121 °C 下高压蒸汽灭菌 20 分钟，并使其冷却至室温。然后，在 1 升发酵罐中加入 425 毫升溶液 2，导致发酵培养基中含有 50 淡玉米浆滤液。发酵罐用摇瓶的全部量接种。发酵在 37 °C、pH7.0 下进行。在需要时通过加入 1.5M 碳酸钠溶液来维持 pH 为 7.0。通过 121 °C 高压蒸汽灭菌来对该溶液灭菌。在发酵罐中通入空气 6 小时，使细胞最初有氧生长。在此期间监测溶氧。溶氧水平偶尔低于 5%饱和度，但是通过连续通入空气，发酵罐内仍为有氧环境。在此期间结束时，关闭空气，通过生物体的无氧代谢开始生产琥珀酸。同时，打开泵，在发酵罐中加入含约 500 克/升葡萄糖的溶液。人工调节进料泵的速度，使发酵液中葡萄糖浓度大于等于 1 克/升。

图 4 显示了实施例 4 的结果，该结果归纳在表 7 中。表 7 显示了琥珀酸在 50% 淡玉米浆发酵培养基中的累积情况。

表 7

发酵时间(小时)	24	48	99
琥珀酸浓度(克/升)	11.9	25.5	51.0
生产率(克/升-小时)	0.50	0.53	0.52

这些结果表明，琥珀酸可在廉价的培养基中产生，培养基中用低成本的淡玉米浆代替了昂贵的酵母抽提物和胰蛋白胨。

实施例 5

在本实施例中，将摇瓶和发酵培养基中的淡玉米浆浓度降低至 25%。其它条件与实施例 4 描述的完全相同。加入水以弥补采用较少量淡玉米浆引起的体积缺少。

图 5 描绘了本实施例的结果，该结果归纳在表 8 中。表 8 显示琥珀酸在 25% 淡玉米浆发酵培养基中的累积情况。

表 8

发酵时间(小时)	24	48	97
琥珀酸浓度(克/升)	20.9	35.7	46.3
生产率(克/升-小时)	0.87	0.74	0.48

结果表明，琥珀酸甚至可在更经济的培养基中生长，培养基中淡玉米浆减少至 25%。

实施例 6

在本实施例中，摇瓶和发酵培养基中的淡玉米浆浓度为 25%，碱为 1.5M 碳酸铵。其它条件与实施例 4 所述类似。

图 6 显示了本实施例的结果，该结果归纳在表 9 中，其显示了琥珀酸在 25% 淡玉米浆发酵培养基中用碳酸铵作为 pH 控制时的累积情况。

表 9

发酵时间(小时)	24	48
琥珀酸浓度(克/升)	14.8	24.9
生产率(克/升-小时)	0.62	0.52

结果表明，在琥珀酸发酵过程中，可用碳酸钠以外的碳酸盐(如碳酸铵、碳酸镁等)来控制 pH。

实施例 7

本实施例中描述了四个试验。在两个试验中，摇瓶和发酵培养基中的淡玉米浆浓度为 25%，碱为 2M NaOH。在另两个试验中，淡玉米浆浓度为 50%，碱为 15% NH₄OH。在采用相同的用于控制 pH 的碱的每组的两个试验中，在一个试验中，在通过无氧代谢生产琥珀酸的无氧阶段，在发酵罐中喷入约 100 毫升/分钟的纯二氧化碳。

图 7 显示了这些结果，并归纳在表 10 中。表 10 显示了在淡玉米浆发酵培养基中用氢氧化铵和氢氧化钠控制 pH 时的琥珀酸累积情况。

表 10

碱 = NaOH	有 CO ₂	没有 CO ₂
----------	-------------------	--------------------

发酵时间(小时)	48	72	48	72
琥珀酸浓度(克/升)	17.5	23.9	6.0	6.0
生产率(克/升-小时)	0.36	0.33	0.13	0.08

碱 = NH_4OH

	有 CO_2		没有 CO_2	
发酵时间(小时)	48	72	48	52
琥珀酸浓度(克/升)	22.5	33.4	8.7	8.4
生产率(克/升-小时)	0.47	0.46	0.19	0.16

结果表明, 如果用非碳酸盐的碱来控制 pH, 则在无氧阶段需要在发酵罐中通入二氧化碳气体才能大量生产琥珀酸。

本发明还提供了一种通过发酵来生产苹果酸的方法。作为琥珀酸前体的苹果酸在原则上是比琥珀酸更佳的最终产物, 因为其生产所需还原步骤少一步。苹果酸生产的理论化学计量比为 1 摩尔葡萄糖和 2 摩尔二氧化碳变成 2 摩尔苹果酸。因此, 苹果酸的生产可使葡萄糖没有浪费。也可形成延胡索酸, 它是还原途径中苹果酸的脱氢产物和琥珀酸的前体。苹果酸和延胡索酸均能在不产生副产物下形成, 但是苹果酸更高的溶解度使得其适用于大规模生产过程。

10 本发明也可以是一种连续发酵方法, 该方法包括发酵罐和沉降槽。沉积在沉降槽底部的细胞返回发酵罐, 以增加细胞浓度, 从而增加生产率。已经大限, 当混合停止时, 细胞能非常好地絮凝和沉降。

15 琥珀酸也通过由发酵罐和超滤单元组成的连续发酵方法来生产。将超滤单元收集的细胞返回发酵罐以增加细胞浓度, 从而增加生产率。通过超滤单元从发酵液中除去片段化产物减少了产物抑制, 增加了得率。

琥珀酸还通过一种连续发酵方法来生产, 其中连续地将吸附剂加入发酵罐并从中除去。发酵产物从发酵液中的除去减轻了产物的抑制, 增加了得率。

20 琥珀酸还通过一种由两个发酵罐串联组成的分批发酵过程来生产。在第一个发酵罐(生长发酵罐)中, 使生物体在有氧条件下生长至高细胞密度。然后将生物物质转移到第二个发酵罐(生产发酵罐)中, 施加无氧条件以促进琥珀酸的生产。然后清洗生长发酵罐, 并用来生长更多的生物物质来转移到另一个生产发酵罐中。由于生产时间比生长时间长的多, 因此一个生长发酵罐可用来为多个生产发酵罐提供生物物质。

25 尽管已经显示和描述了目前认为是本发明的较佳的实例, 但是本领域技术人员显然可在不脱离所附权利要求定义的本发明范围内对其作各种变化和改动。

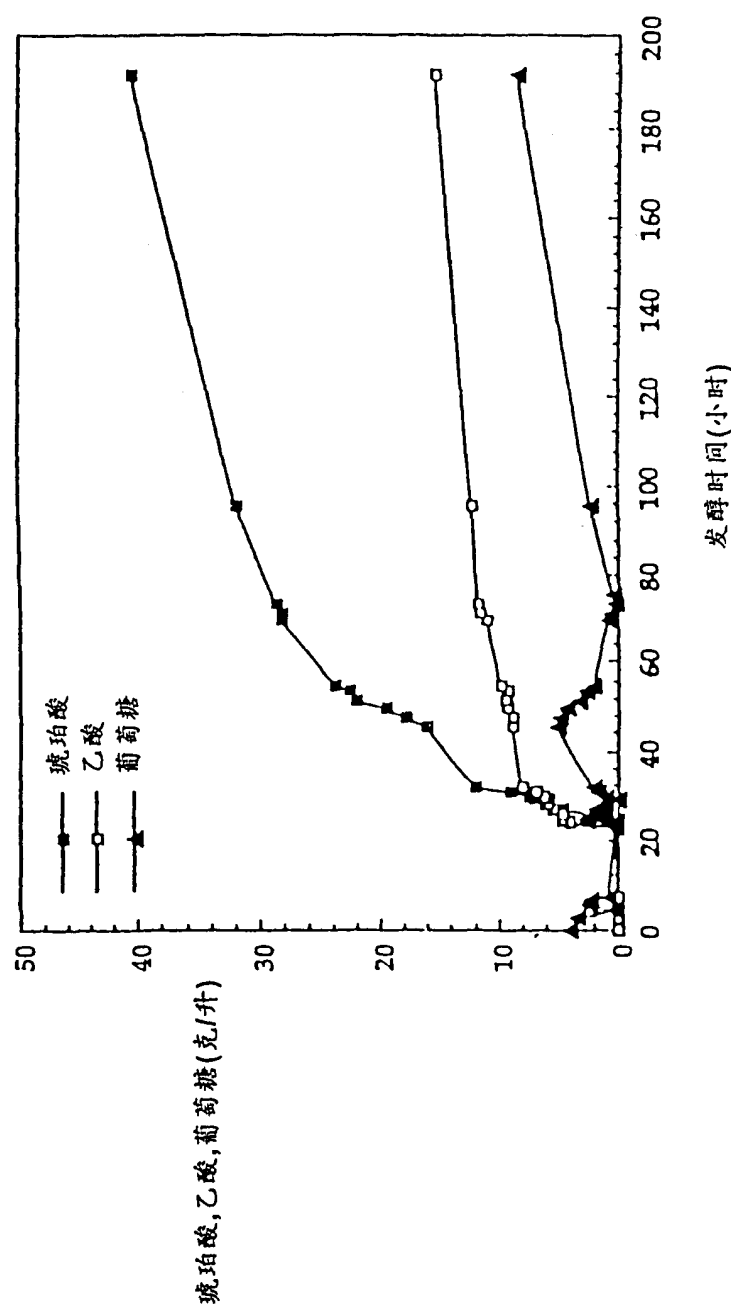


图 1

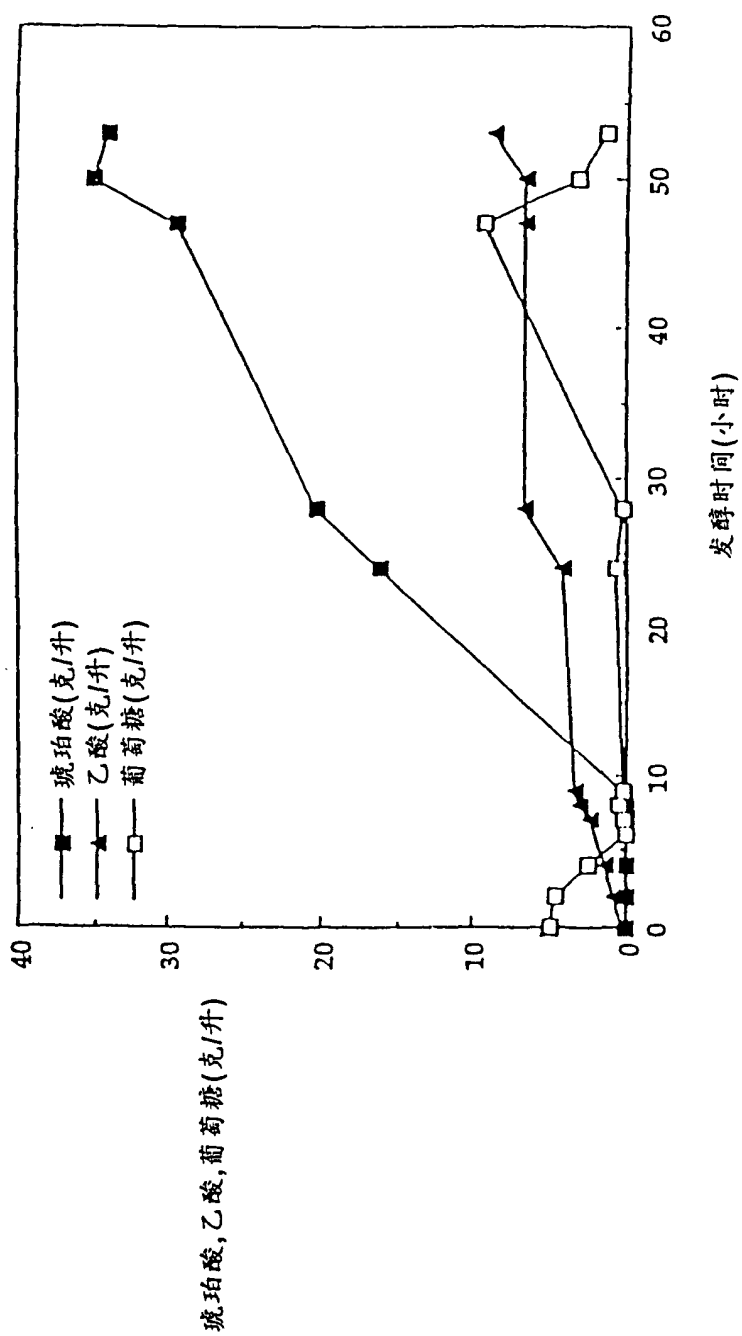
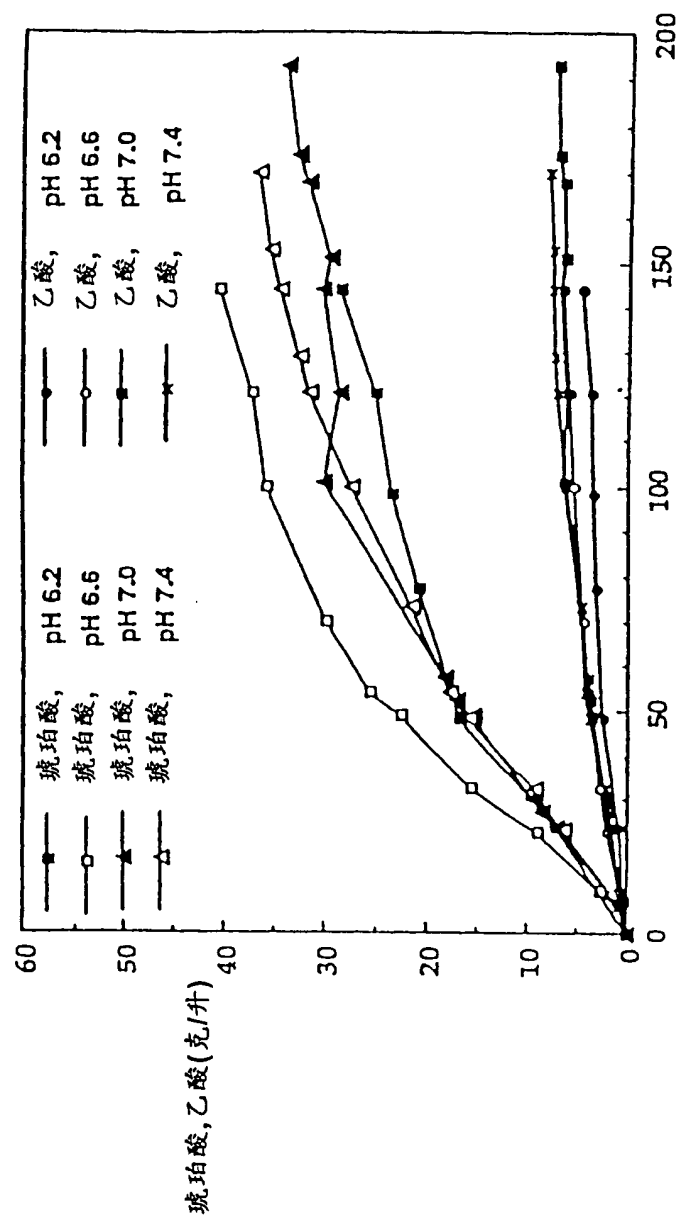


图 2



发酵时间(小时)

图 3

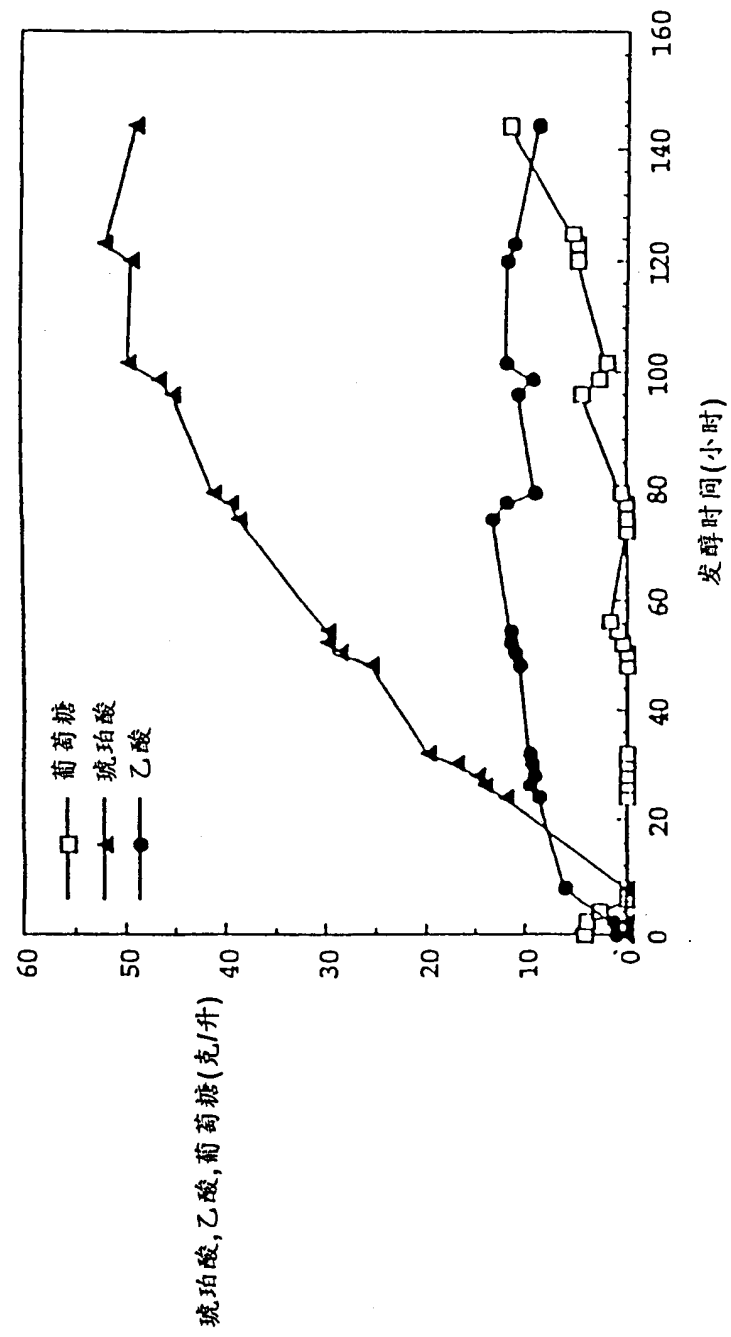


图 4

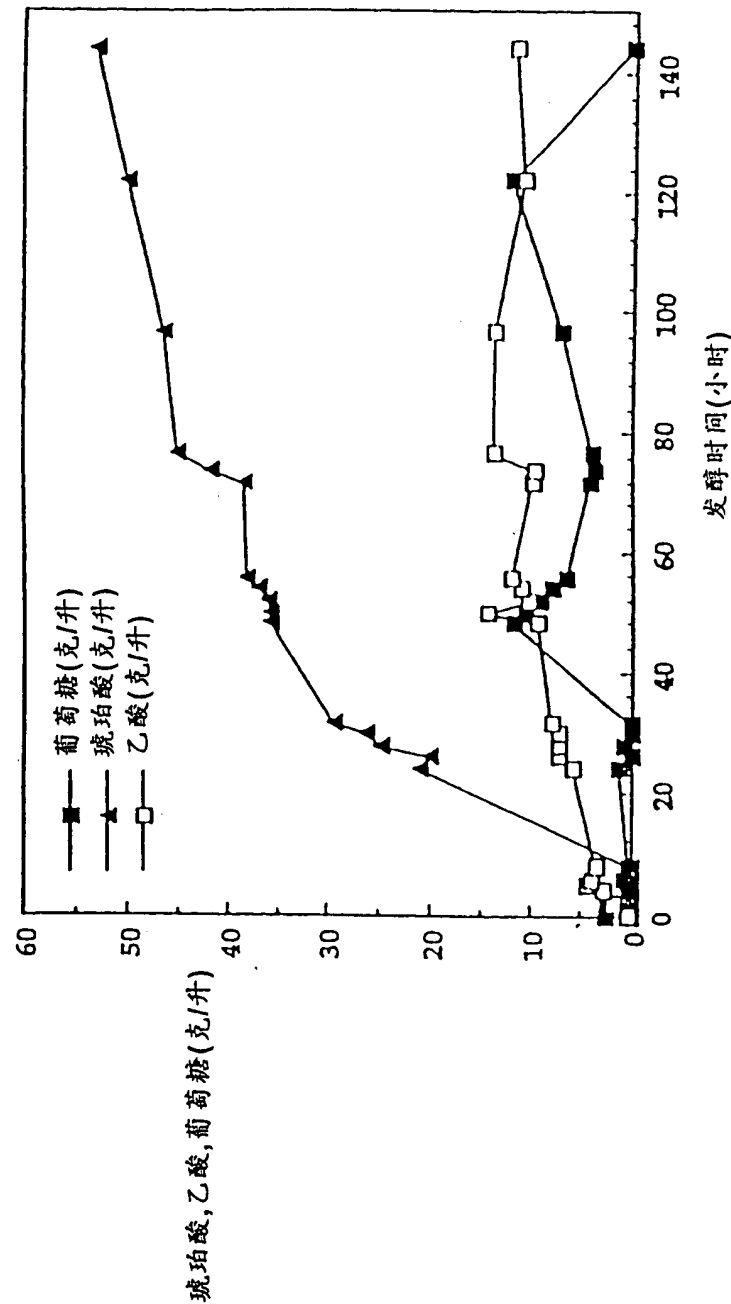


图 5

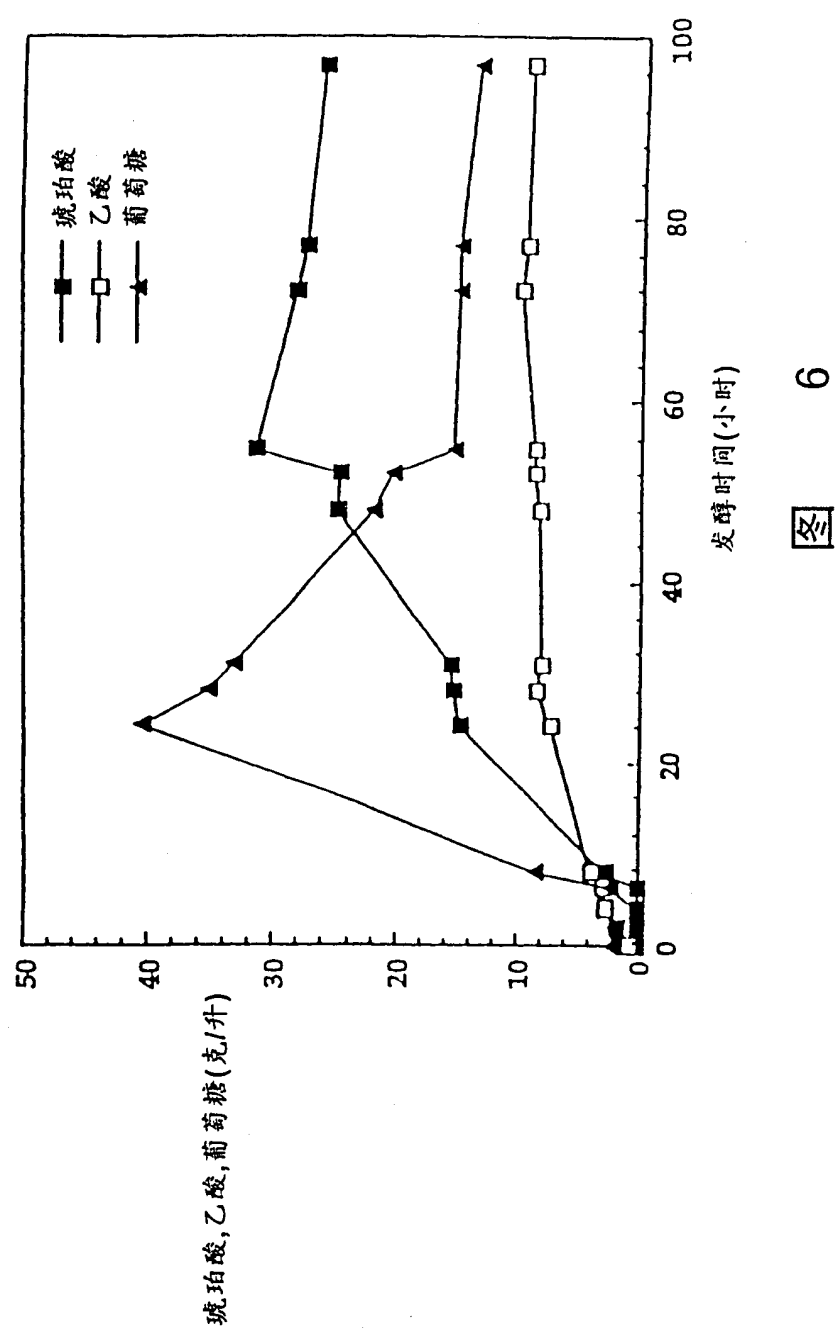


图 6

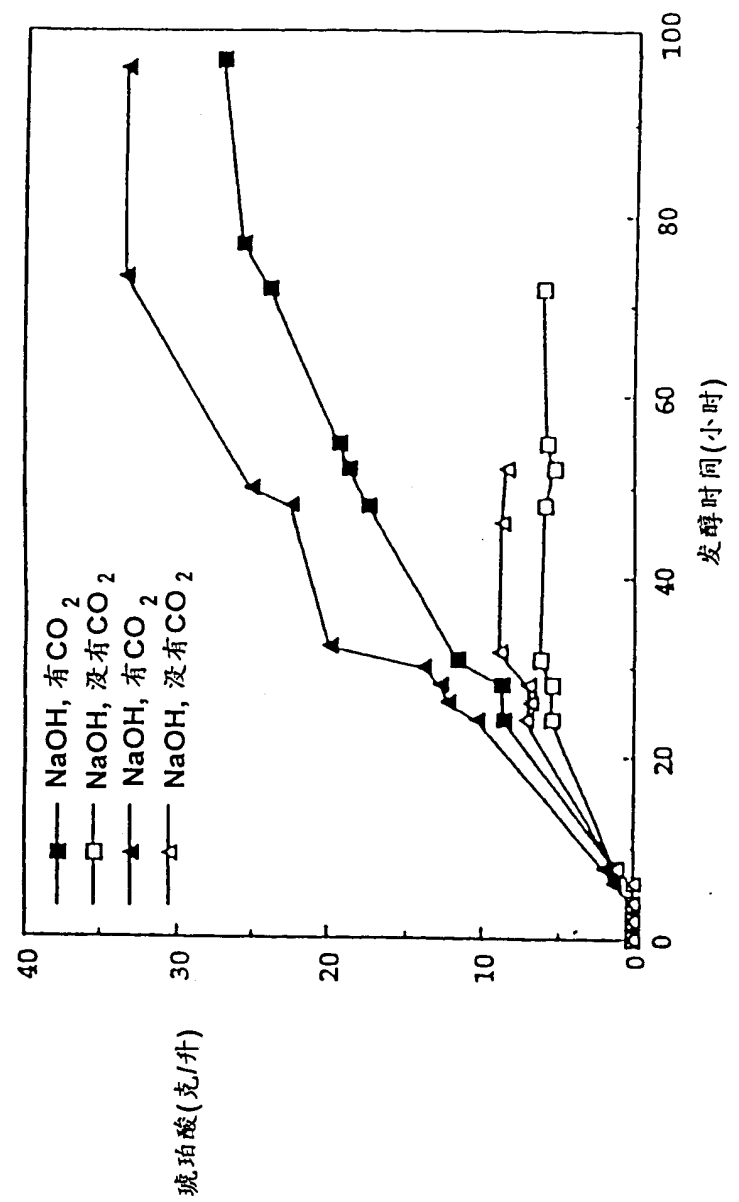


图 7