

过量表达苹果酸脱氢酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响

梁丽亚, 马江锋, 刘嵘明, 王光明, 徐冰, 张敏, 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, 南京 210009

摘要: 大肠杆菌 NZN111 是敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*) 和丙酮酸-甲酸裂解酶的编码基因 (*pf1B*) 的工程菌, 厌氧条件下由于辅酶 NAD(H) 的不平衡导致其丧失了代谢葡萄糖的能力。构建了苹果酸脱氢酶的重组菌大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-*mdh*, 在厌氧摇瓶发酵过程中通过 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导后重组菌的苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase, MDH) 酶活较出发菌株提高了 14.8 倍, NADH/NAD⁺ 的比例从 0.64 下降到 0.26, 同时 NAD⁺ 和 NADH 浓度分别提高了 1.5 倍和 0.2 倍, 厌氧条件下重组菌株具有生长和代谢葡萄糖的能力。采取两阶段发酵, 有氧培养至细胞干重 6.4 g/L, 转厌氧后 15 h, 葡萄糖消耗 14.75 g/L, 丁二酸浓度达到 15.18 g/L, 丁二酸的得率为 1.03 g/g 葡萄糖, 丁二酸的生产强度为 1.012 g/(L·h)。

关键词: 苹果酸脱氢酶, 大肠杆菌 NZN111, 丁二酸, 两阶段发酵

Effect of overexpression of malate dehydrogenase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111

Liya Liang, Jiangfeng Ma, Rongming Liu, Guangming Wang, Bing Xu, Min Zhang, and Min Jiang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: *Escherichia coli* NZN111 is a double mutant with lactate dehydrogenase (*ldhA*) and pyruvate formate-lyase (*pf1B*) inactivated. Under anaerobic conditions, disequilibrium of coenzyme NADH and NAD⁺ causes *Escherichia coli* NZN111 losing the glucose utilizing capability. In this study, we constructed a recombinant strain *E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* and overexpressed the *mdh* gene with 0.3 mmol/L of IPTG under anaerobic fermentation condition in sealed bottles. The specific malate dehydrogenase (MDH) activity in the recombinant strain was 14.8-fold higher than that in *E. coli* NZN111. The NADH/NAD⁺ ratio decreased from 0.64 to 0.26 and the concentration of NAD⁺ and NADH increased 1.5-fold and 0.2-fold respectively. Under anaerobic conditions, the recombinant strain possessed the capability of growth and glucose absorption.

Received: December 10, 2010; **Accepted:** January 20, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701).

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

国家自然科学基金 (No. 21076105), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701) 资助。

We took dual-phase fermentation for succinate production. After the dry cell weight (DCW) reached 6.4 g/L under aerobic conditions, the cell culture was changed to anaerobic conditions. After 15 h, 14.75 g/L glucose was consumed and succinic acid reached 15.18 g/L. The yield of succinic acid was 1.03 g/g Glu and the productivity of succinic acid was 1.012 g/(L·h).

Keywords: malate dehydrogenase, *Escherichia coli* NZN111, succinic acid, dual-phase fermentation

丁二酸 (又称琥珀酸), 被广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品和塑料等行业, 作为 C4 平台化合物, 可用于合成 1,4-丁二醇、四氢呋喃、 γ -丁内酯等有机化学品以及聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 类生物可降解材料, 被美国能源部认为是未来 12 种最有价值的生物炼制产品之一^[1-2]。利用微生物发酵法转化可再生资源生产丁二酸, 价格低廉、污染小, 且在发酵过程中可吸收固定 CO₂, 开辟了温室气体利用的新途径, 近年来成为研究的热点。

丁二酸的生产菌株很多, 目前研究的热点主要集中在产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[3]、产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus*

succinogenes^[4]、产琥珀酸曼氏杆菌 *Mannheimia succiniciproducens*^[5] 和重组大肠杆菌 *Escherichia coli*^[6-7]。利用野生菌株生产丁二酸虽然获得了较高的产物浓度, 但培养基成本较高, 且甲酸、乙酸等副产物积累较多, 阻碍了其工业化进程。大肠杆菌由于遗传背景清楚、易操作、易调控、培养基要求简单和生长迅速等优点, 近年来被广泛用于研究以获得产丁二酸优秀菌株。图 1 是大肠杆菌的厌氧混合酸发酵途径^[8]。产丁二酸大肠杆菌基因改造策略主要有: 增强代谢途径中的关键酶 (如 PPC)、失活或敲除竞争途径中的酶 (如 LDH、PFL)、引入新的代谢途径 (如乙醛酸循环) 等^[9]。

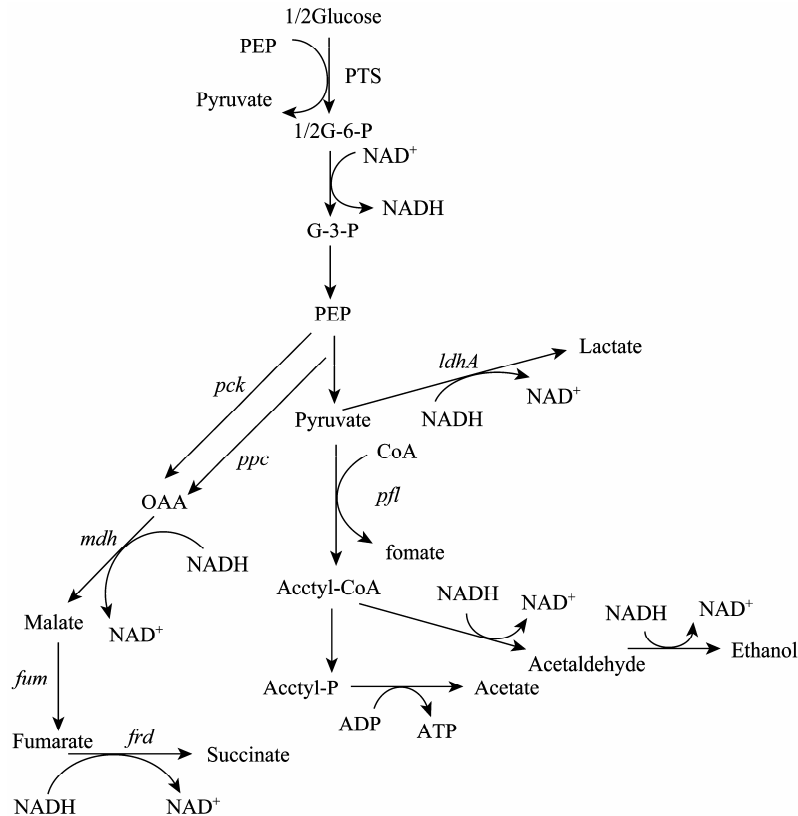


图 1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径^[8]

Fig. 1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *Escherichia coli*^[8].

大肠杆菌 NZN111 由于缺乏了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*) 和丙酮酸-甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*) 而使副产物乳酸和甲酸的生产途径阻断, 具有潜在生产丁二酸的能力。但同时由于 NADH 依赖的乳酸脱氢酶 (LDH) 无法合成而限制了糖酵解过程中形成的 NADH 再生为 NAD⁺ 的过程, 造成辅酶不平衡, 导致该菌株厌氧条件下不能利用葡萄糖进行生长。其中 Stols 和 Donnelly^[10-11] 将大肠杆菌中 NAD⁺ 依赖的苹果酸酶过量表达于 *E. coli* NZN111 后可以进行丁二酸的厌氧发酵, 初始 20 g/L 葡萄糖产生 12.8 g/L 丁二酸, 转化率达到 64%, 本实验是通过过量表达另一个 NAD⁺ 依赖的苹果酸脱氢酶使重组菌恢复了厌氧条件下代谢葡萄糖的能力, 且通过测定细胞干重及辅酶 NAD(H) 的含量从而验证了辅酶不平衡导致 *E. coli* NZN111 无法代谢葡萄糖的假设。Hong 和 Lee 选择还原性糖山梨醇作为碳源, 当以 CO₂ 为气相时, 20 g/L 山梨醇发酵产生 10 g/L 丁二酸, 转化率达到 50%^[12-13]。

苹果酸脱氢酶 (MDH) 在厌氧条件下主要催化草酰乙酸 (OAA) 到苹果酸 (Malate) 的反应过程, 该过程伴随着 1 分子的 NADH 再生为一分子的 NAD⁺, 在 *E. coli* NZN111 中过量表达该基因将有利于 NADH 再生为 NAD⁺, 从而维持该菌株胞内的辅酶平衡, 恢复其在厌氧条件下的生长及耗糖能力, 促进丁二酸的合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保藏; 质粒 pTrc99a 由南京师范大学邵蔚蓝教授惠赠; *E. coli* NZN111 (*ldhA::Kan Pfl::cam*) 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。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素, 购自上

海生工生物工程有限公司; 基因组提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品; DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 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; CO₂ 气体购自南京上元工业气体厂; 发酵罐购自美国 NBS 公司 BIOFLO110 系列 7 L 发酵罐。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *mdh* 基因的克隆

引物设计: 参照 MDH 基因序列 (来源于 *E. coli* K12 基因组, Gene Accession No. ECK3225) 设计, 由上海申能博彩生物科技有限公司合成。分别在上下游引物的 5' 端引入了 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点 (下划线标示), 引物序列如下: Forward (5'-3'): GGAATTCACACATTCTTGAGATGTGGTC ATT; Reverse (5'-3'): CCCAAGCTTAATATCCGGC AACCAATTAAGTC。PCR 反应体系: 上下游引物 (50 pmol/ μ L) 各 1 μ L; 模板 DNA (100 ng/ μ L) 0.5 μ L; 10 倍缓冲液 5 μ L; dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L; DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L; ddH₂O 38.5 μ L, 总体积 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 重组质粒的构建

将纯化后的 *mdh* 基因片段以及质粒 pTrc99a 进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切反应, 把双酶切后得到的片段在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组质粒 pTrc99a-*mdh* 并转化于 *E. coli* NZN111 中。涂布含氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素平板后挑选抗性克隆, 提取质粒后进行 *Hind* III 单酶切及 *EcoR* I 和 *Hind* III 的双酶切鉴定。

1.2.3 重组苹果酸脱氢酶的诱导表达

菌体转化: CaCl₂ 法^[14]。有氧诱导: 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养菌体到 OD₆₀₀ 约 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C、170 r/min 诱导 8 h。

1.2.4 酶活检测

样品处理：采取超 3 s 停 5 s 的策略共超声破碎 3 min，4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，取上清即粗酶液，测定酶活并进行 SDS-PAGE 分析。

总蛋白浓度测定按照 Bradford 法^[15]，以 BSA (牛血清白蛋白) 为标准。

标准反应体系如下^[16]：0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)，0.2 mmol/L 的 NADH，2 mmol/L 的草酰乙酸。30 °C 连续监测 340 nm 处吸光值的变化，根据测定的标准曲线换算成底物浓度。

酶活定义为：30 °C 时 1 min 内催化 1 μmol 的草酰乙酸转化为苹果酸所需要的酶量，即 1 U。比酶活定义为每毫克蛋白含有的酶活 (U/mg)。

1.2.5 辅酶 NADH 与 NAD⁺ 浓度的测定

参考文献[17]方法：反应时依次添加 150 μL 上述的细胞提取液、0.9 mL 的纯水、1.8 mL 的混合反应液 (等体积的 1.0 mol/L Bicine buffer、纯乙醇、40 mmol/L EDTA、4.2 mmol/L MTT 和双倍体积的 16.6 mmol/L PES 混合，30 °C 水浴 10 min) 和 150 μL 的乙醇脱氢酶 (500 U/mL)，迅速混匀后，测定波长 570 nm 处的吸光度值 A_{570} ，将 A_{570} 随时间变化曲线斜率带到标准曲线，得到待测样品中 NADH 与 NAD⁺ 的浓度。

1.2.6 培养基及培养条件

LB 培养基：酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，氯化钠 5 g/L，pH 7.0，氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的终浓度分别为 25、30、100 μg/mL。

30 mL LB 液体培养基，添加 0.48 g 碱式碳酸镁，20 g/L 葡萄糖，抗生素添加同有氧培养，添加终浓度为 0.3 mmol/L 的诱导剂 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 以诱导表达 MDH。

3 L 发酵液组成：LB 培养基，好氧培养阶段添加抗生素浓度同上，5 mol/L NaOH 外源流加调节 pH 值至 7.0，根据需要补加葡萄糖。厌氧发酵阶段采用分批补料的方式补加葡萄糖，并加入灭过菌的碱式

碳酸镁内源调节 pH 值为 6.80。

1.2.7 培养方法

有氧摇瓶培养：将保存于-80 °C 的菌种在加有相应抗生素的平板上活化，挑单菌落到 5 mL LB 试管，37 °C、200 r/min 培养 10 h，1% 接种量接种到好氧培养基中，37 °C、200 r/min 培养 6 h。

厌氧血清瓶发酵：转接 10% 的菌液到血清瓶中，通入过滤除菌后的 CO₂ 气体 2 min，保证血清瓶中为厌氧环境，厌氧发酵 30 °C、170 r/min，发酵周期 48 h。

7 L 发酵罐两阶段发酵：在发酵罐上采用的是先在有氧条件下通入无菌空气来培养菌体，37 °C、500 r/min 振荡培养，初始葡萄糖浓度为 10 g/L，当葡萄糖几乎耗尽时开始以低流速 2.0 g/(L·h) 流加 600 g/L 的葡萄糖，当 OD_{600} 达到 16 左右时，以 0.5 L/min 的流速通入 CO₂ 气体，37 °C，200 r/min，补加葡萄糖，使厌氧起始葡萄糖浓度为 15 g/L 左右，并加入 48 g 灭菌后的碱式碳酸镁。

1.2.8 发酵及代谢物分析

细胞生长是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 (DCW) 是由 DCW 与 OD_{600} 测定的标准曲线换算得到，换算公式为：DCW (g/L)=0.4× OD_{600} 。培养基中的葡萄糖用生物传感仪 (SBA40C) (生产厂家是山东省科学院生物研究所) 检测，有机酸用高效液相色谱法 (HPLC) 检测，色谱柱为 Prevail Organic Acid，流动相为 25 mmol/L KH₂PO₄，pH 2.5，流速 1.0 mL/min，紫外检测波长 215 nm。

2 结果与分析

2.1 苹果酸脱氢酶 (MDH) 的克隆与表达

将 PCR 扩增后的目的基因片段 *mdh* 和载体 pTrc99a 分别进行 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切 (图 2)，酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接，构建表达载体 pTrc99a-*mdh*。

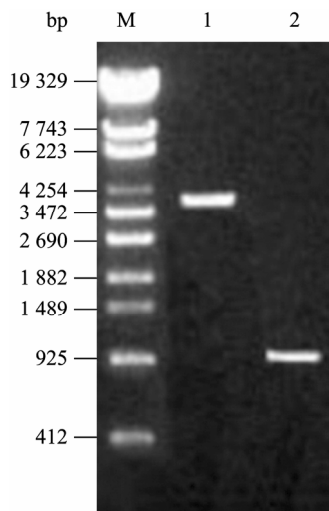


图2 质粒 pTrc99a 和 *mdh* 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pTrc99a and *mdh* by restriction endonuclease digestion. M: DNA marker; 1: pTrc99a digested with *EcoR* I and *Hind* III (4 125 bp); 2: *mdh* digested with *EcoR* I and *Hind* III (939 bp).

重组质粒经单、双酶切鉴定 (图 3), 结果与预期一致。进行测序后发现目的基因序列与公布的序列 100% 匹配。

2.2 MDH 酶活测定

37 °C、200 r/min 培养菌体到 $OD_{600}=0.6$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 30 °C、170 r/min 诱导 8 h 后对出发菌株和构建的重组菌株进行粗酶液的相应酶活测定, 计算出粗酶液的比酶活, 结果如表 1 所示。

由表 1 可知: 重组菌苹果酸脱氢酶比酶活最高为 39.84 U/mg, 而对应的受体菌仅为 3.112 U/mg, 重组菌的比酶活提高了 11.8 倍, *E. coli* NZN111/pTrc99a 的比酶活为 3.074 U/mg, 重组菌的比酶活提

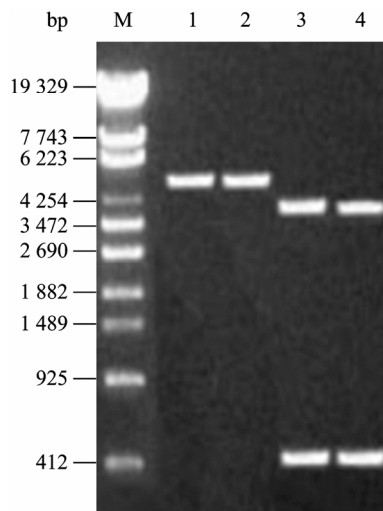


图3 重组质粒 pTrc99a-*mdh* 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pTrc99a-*mdh* by enzyme digestion. M: DNA marker; 1,2: pTrc99a-*mdh* digested with *Hind* III; 3,4: pTrc99a-*mdh* digested with *EcoR* I and *Hind* III.

高了 12 倍, 可见重组菌中的苹果酸脱氢酶基因得到了过量表达。

2.3 厌氧摇瓶发酵

有氧培养菌液 10% 转接厌氧血清瓶, 48 h 后测定细胞干重、MDH 的酶活及辅酶 $NAD^+/NADH$ 的量, 并测定残糖及有机酸的含量。结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 过量表达苹果酸脱氢酶恢复了厌氧条件下 *E. coli* NZN111 的生长, 重组菌细胞干重是对照菌的 3.8 倍, 在一定程度上也恢复了出发菌株代谢葡萄糖的能力, 48 h 内可以消耗 10 g/L 的葡萄糖, 产 2.5 g/L 的丁二酸, 而对照菌几乎没有丁二酸生成。MDH 比酶活提高了 14.8 倍。辅酶 NAD^+ 与 $NADH$ 的总量提高了 2 倍, $NADH/NAD^+$ 的比例由 0.64 降低为 0.30。

表1 对照菌与重组菌的蛋白浓度、MDH 酶活及比酶活

Table 1 Concentration of protein, enzyme activity and specific enzyme activity of MDH in the control strain and in the recombinant strain

Strains	Enzyme activity (U/mL)	Concentration of protein (mg/mL)	Specific enzyme activity (U/mg)
<i>E. coli</i> NZN111	1.474±0.081	0.473±0.012	3.112±0.048
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a	1.414±0.006	0.460±0.024	3.074±0.084
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a- <i>mdh</i>	26.542±0.028	0.666±0.004	39.840±0.124

厌氧摇瓶分别于 18 h、28 h 和 48 h 结束培养，分别测定细胞干重 (DCW)、耗糖及 NAD(H) 的含量，进而计算 NADH/NAD⁺，结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出 18 h 时重组菌 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* 与对照菌 *E. coli* NZN111 的 DCW 均未有所增加，两者均未耗糖，NADH/NAD⁺ 均为 0.65 左右。发酵 28 h 和 48 h 后，*E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* 的 DCW 比对照菌分别提高了 1.2 倍和 1.8 倍，

耗糖分别提高了 2 倍和 7 倍，说明过量表达苹果酸脱氢酶恢复了 *E. coli* NZN111 厌氧条件下的生长及耗糖能力。图 4C 显示，28 h 和 48 h 时 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* NADH/NAD⁺ 分别为 0.26 和 0.33，而对照菌 NADH/NAD⁺ 均为 0.76，说明过量表达苹果酸脱氢酶使 NADH 氧化为 NAD⁺，恢复了氧化还原平衡，从而恢复了其厌氧条件下的生长及耗糖能力。

表 2 厌氧血清瓶培养后各种参数的测定结果

Table 2 Results of these parameters on anaerobic fermentation in sealed bottles

Strains	<i>t</i> (h)	DCW (g/L)	MDH (U/mg)	NAD ⁺ (μmol/g)	NADH (μmol/g)	Glucose consumed (g/L)
<i>E. coli</i> NZN111	48	0.444±0.012	4.841±0.122	3.004±0.162	1.924±0.012	0±0.000
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a- <i>mdh</i>	48	1.700±0.028	71.737±0.081	7.517±0.042	2.312±0.124	10±0.486

DCW: dry cell weight.

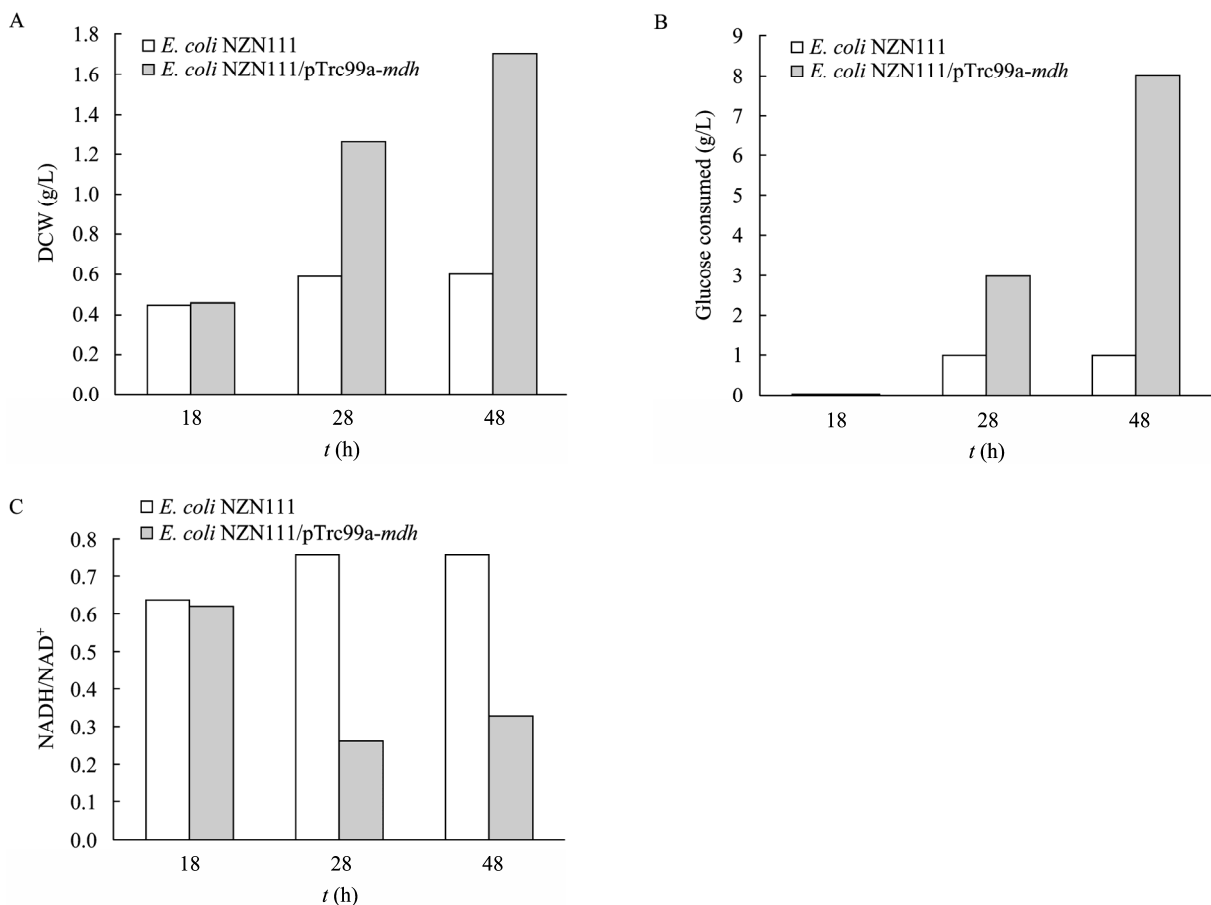


图 4 不同时间 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* 与 *E. coli* NZN111 细胞干重 (A)、耗糖 (B) 和 NADH/NAD⁺ (C) 的比较
Fig. 4 Comparison of DCW (A), consumed glucose (B) and NADH/NAD⁺ (C) between *E. coli* NZN111/pTrc99a-*mdh* and *E. coli* NZN111 at different time. DCW: dry cell weight.

2.4 两阶段发酵

有氧培养可快速提高菌体密度, 从而提高发酵过程的生产强度, 本研究将重组菌株先有氧培养至细胞干重达到 6.4 g/L, 然后通入 CO₂ 转成厌氧发酵状态, 并加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG。每隔 2 小时取样测 OD₆₀₀、残糖并留样测有机酸含量 (图 5)。转厌氧后 15 h, 葡萄糖消耗为 14.75 g/L, 丁二酸浓度达到 15.18 g/L, 丁二酸的得率为 1.03 g/g 葡萄糖, 丁二酸的生产强度为 1.012 g/(L·h)。

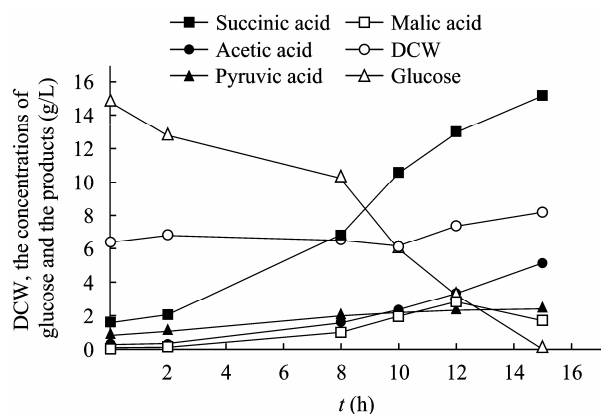


图 5 *E. coli* NZN111/pTrc99a-mdh 在 7 L 发酵罐中转厌氧发酵阶段的细胞干重 (DCW)、葡萄糖及产物浓度

Fig. 5 DCW, the concentrations of glucose and the organic acids in *E. coli* NZN111/pTrc99a-mdh after transition to anaerobic-phase fermentation in a 7 L fermentor. DCW: dry cell weight.

3 讨论

本研究构建了重组大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-mdh, 有氧诱导时比酶活比对照菌提高了 11.8 倍。厌氧摇瓶发酵过程中通过添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导使苹果酸脱氢酶在大肠杆菌 NZN111 胞内得到过量表达, 苹果酸脱氢酶 (MDH) 酶活较对照菌提高了 14.8 倍, NADH/NAD⁺ 的比例从 0.64 减少到 0.26, 同时 NADH 与 NAD⁺ 的总量提高了 2 倍, 恢复了厌氧条件下 *E. coli* NZN111 的生长及耗糖能力。通过两阶段发酵, 厌氧发酵阶段, 15 h 内葡萄糖消耗为 14.75 g/L, 丁二酸浓度达到 15.18 g/L,

丁二酸的得率为 1.03 g/g 葡萄糖, 丁二酸的生产强度为 1.012 g/(L·h)。与国内外有关大肠杆菌 NZN111 研究报道的发酵结果相比, 通过过量表达苹果酸脱氢酶后进行两阶段发酵, 丁二酸的得率及丁二酸的生产强度都有很大提高, 为丁二酸的工业化生产提供了一个新的平台。

REFERENCES

- [1] 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.
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.
- [2] Zhan XB, Zhun YH, Wang DH. Succinic acid production and potential market. *Food Sci Technol*, 2003, 2: 44–49.
詹晓北, 朱一晖, 王东海. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场. *食品科技*, 2003(2): 44–49.
- [3] Lee PC, Lee SY, Hong SH, et al. Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(2): 111–114.
- [4] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(11): 6651–6656.
- [5] Lee JW, Lee SY, Song H, et al. The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics*, 2006, 6(12): 3550–3556.
- [6] Jiang M, Liu SW, Ma JF, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *E. coli*. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(4): 1298–1300.
- [7] Ma JF, Jiang M, Chen KQ, et al. Succinic acid production with metabolically engineered *E. coli* recovered from two-stage fermentation. *Biotech Lett*, 2010, 32(10): 1413–1418.
- [8] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 1989, 63(3): 223–234.
- [9] Jiang M, Ma JF, Chen KQ, et al. The progress of recombinant *Escherichia coli* for production of succinic acid. *Microbiol China*, 2009, 36(1): 120–124.
姜岷, 马江锋, 陈可泉, 等. 重组大肠杆菌产琥珀酸研

- 究进展. 微生物学通报, 2009, 36(1): 120-124.
- [10] Stols L, Donnelly MI. Expression of ascarissuum malic enzyme in a mutant *Escherichia coli* allows production of succinic acid from glucose. *Appl Biochem Biotech*, 1997, 65(1): 153-158.
- [11] Stols L, Donnelly MI. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺ - dependant malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microb*, 1997, 63(7): 2695-2700.
- [12] Hong SH, Lee SY. Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74(2): 89-95.
- [13] Hong S, Lee S. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(3): 286-290.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 24-25.
- [15] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1998: 240-251.
- [16] Boernke WE, Millard CS, Stevens PW, et al. Stringency of substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Acta Biochim Biophys*, 1995, 332(1): 43-52.
- [17] Li J, Chen KQ, Huang XM, et al. Establishment of the determination of NAD⁺ and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Sci Technol*, 2008, 33(12): 254-257.
- 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD⁺和 NADH 测定方法的建立. *食品科技*, 2008, 33(12): 254-257.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

英语科技论文撰写与投稿 (第二版)

任胜利 著

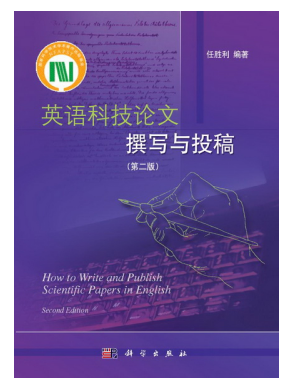
开本: B5 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-031305-8/H•529 ¥35.00 2011年6月出版

内容简介

本书是科技论文写作与投稿的指南读物, 书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量的实例分析介绍了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则, 分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写, 举例说明了致谢及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。本书还较为全面地介绍了国际单位制 (SI) 及其使用中应注意的问题, 从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达, 全面总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外, 还从 PPT 制作、会议演讲等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材; 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目