

# 碳源对琥珀酸放线杆菌发酵产丁二酸的影响及其代谢流量分析

刘宇鹏<sup>1,2</sup> 郑璞<sup>2</sup> 倪晔<sup>2</sup> 董晋军<sup>2</sup> 孙志浩<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学生命科学学院 生物工程研究所 河南 开封 475004)

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

**摘要:** 在厌氧条件下, *Actinobacillus succinogenes* 能够利用单糖、双糖和糖醇等碳水化合物发酵生成丁二酸, 其中以山梨醇为碳源时丁二酸的产量最高。代谢流量分析结果表明: 与葡萄糖发酵相比较, 由于代谢系统中积累了更多的 NADH, 使得代谢网络关键节点 PYR 和 AcCoA 处的代谢流量分配有了较大的变化, 导致更多的碳源流向丁二酸和乙醇, 而乙酸和甲酸的分泌相对减少。

**关键词:** 琥珀酸放线杆菌, 碳源, 代谢流量分析(MFA)

## Effect of Different Carbon Sources on Succinic Acid Production of *Actinobacillus succinogenes* and Metabolic Flux Analysis

LIU Yu-Peng<sup>1,2</sup> ZHENG Pu<sup>2</sup> NI Ye<sup>2</sup> DONG Jin-Jun<sup>2</sup> SUN Zhi-Hao<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Biotechnology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China)

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

**Abstract:** In anaerobic bottles fermentation, glucose, fructose, xylose, lactose, maltose, sucrose and sugar alcohols could be used to produce succinic acid with *Actinobacillus succinogenes*. When sorbitol was utilized as the carbon source in the batch fermentation, more succinate and ethanol were produced compared with those using glucose, while producing less acetate and formate. The metabolic flux analysis results showed that the flux partitioning at PEP node was stable when glucose was replaced by sorbitol, but the flux partitioning at PYR and AcCoA nodes changed a lot because more reducing power (NADH) was generated to meet the more requirement the synthesis of succinate and ethanol.

**Keywords:** *Actinobacillus succinogenes*, Carbon sources, Metabolic flux analysis (MFA)

丁二酸(Succinic acid)又称琥珀酸, 是一种重要的化工产品, 广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品、塑料和化学工业。化学合成的丁二酸因依赖石化原料等原因, 存在生产成本增高的趋势,

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z235); 长江学者和创新团队发展计划(No. IRT0532); 河南省教育厅自然科学基金研究计划项目(No. 2009B180004); 河南大学校内基金项目(No. 2008YBGG042)资助

\* 通讯作者: Tel: 86-510-85918252; ✉: sunw@public1.wx.js.cn

收稿日期: 2009-01-06; 接受日期: 2009-05-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

从而使微生物发酵可再生原料生产丁二酸的方法倍受重视。发酵法生产丁二酸是以可再生糖源(如葡萄糖)和二氧化碳作为主要原料,不仅摆脱了对石化原料的依赖,而且开辟了利用温室气体二氧化碳的新途径,使得丁二酸发酵成为一个新兴的、很有发展潜力的绿色工艺,成为近年来国内外的研究热点<sup>[1]</sup>。

代谢工程的实质在于对细胞代谢流量及其控制进行定量分析,并在此基础上对代谢过程进行合理调节,以最大限度地提高目的代谢产物的产率<sup>[2]</sup>。代谢流量分析(Metabolic flux analysis, MFA)是代谢工程基础研究中最重要的一种计算代谢途径中各种物质流量的手段。对于工业微生物细胞而言,在特定的生理条件下,其代谢表型(Metabolic phenotype)可以通过胞内代谢网络中各种代谢物的流量来进行表征。MFA为更好地设计反应器、调节发酵培养基组分和优化控制策略打下良好的基础;对未知途径而言,可以鉴别是否为主要代谢途径,以及了解副产物的产生途径,以达到提高目的产物积累、去除或减弱副产物产生途径目的。

丁二酸是许多厌氧微生物的代谢中间产物。自上世纪90年代美国报道了厌氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*) ATCC 29305<sup>[3]</sup>和琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*) ATCC 55618<sup>[4]</sup>发酵生产丁二酸技术有所突破以来,丁二酸发酵已经成为了国内外的研究热点,国内生物原料发酵法生产丁二酸的研究也已经取得了突破性进展,但目前还未见其工业化规模生产的报道。

本研究室从牛瘤胃中筛选获得了一株琥珀酸放线杆菌*Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593<sup>[5,6]</sup>,本文主要研究了*A. succinogenes* CGMCC1593对各种碳水化合物的利用情况,并首次分析了碳源的还原力对*Actinobacillus succinogenes*发酵代谢途径中关键节点的代谢流量分布的影响,为进一步深入了解丁二酸发酵的代谢调控机制提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株:琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)CGMCC 1593,由本实验室从牛的瘤胃中分离获得<sup>[5]</sup>。

1.1.2 培养基:种子培养基:TSB(大豆胰酪胨蛋

白)25 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 8 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3 g, pH调至7.0~7.2,定容至1 L。

发酵培养基:葡萄糖(或其它碳源)20 g,酵母膏6 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaCl 1 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g;另加混合维生素溶液3 mL,其组分为(1 L):叶酸20 mg,硫胺素20 mg,烟酸20 mg,硫辛酸20 mg,核黄素20 mg,VB<sub>12</sub>20 mg,VB<sub>6</sub>20 mg,泛酸50 mg。将培养基定容至1 L, pH调6.5。

### 1.2 方法

1.2.1 培养条件:将培养基装于150 mL厌氧瓶中(装液体积50 mL),接种量5%,充入100% CO<sub>2</sub>, 1×10<sup>5</sup> Pa灭菌15 min;并加膜滤过的无菌Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O(终浓度0.02%),以保证绝对的厌氧环境。置于100% CO<sub>2</sub>环境中37°C厌氧培养24 h。

1.2.2 发酵产物分析:采用离子排斥HPLC法分析葡萄糖、丁二酸、乙酸、乳酸、甲酸、乙醇等发酵产物<sup>[7]</sup>。生物量以660 nm处的吸光度来表示(OD<sub>660</sub>),每个OD<sub>660</sub>对应的菌体干重为510 mg±18 mg。丁二酸的产率(Yield)定义为每消耗1 g葡萄糖所产生丁二酸的克数<sup>[6]</sup>。

1.2.3 *A. succinogenes* 菌株发酵合成丁二酸过程的代谢网络构建:根据相关文献<sup>[8,9]</sup>,该菌株以葡萄糖为碳源时合成丁二酸的代谢网络主要包括糖酵解(EMP)、磷酸戊糖(PP)、部分TCA(TCA氧化支路和还原支路)、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、维持消耗以及生物量的合成途径。

1.2.4 代谢流量的计算:见参考文献<sup>[9]</sup>。

在本章代谢流量的计算中,均以100 mmol/g DCW/h的葡萄糖为计算基准,所有代谢流量*r*的单位均为mmol/g DCW/h;矩阵计算软件采用Excel 2003。

## 2 结果

### 2.1 不同碳源对发酵产丁二酸影响

碳水化合物对琥珀酸发酵具有重要的影响,不同的菌种对各种碳水化合物的利用情况也各不相同。本文中,以6 g/L的酵母膏为氮源,20 g/L的糖或糖醇为碳源,在厌氧瓶发酵条件下研究*A. succinogenes* CGMCC 1593菌株对不同碳源的利用情况,实验结果如表1所示。

由表1中可以看出,该菌株能够利用单糖(葡萄糖、果糖、木糖)、双糖(乳糖、麦芽糖和蔗糖)和糖

醇等碳水化合物发酵产生丁二酸, 杂酸主要是乙酸, 还有少量的甲酸或乙醇, 未检测到乳酸的生成。其中, 该菌不能利用甘油(数据略); 利用糖醇(山梨醇、木糖醇、麦芽糖醇)发酵时丁二酸产量明显较相应的糖类(葡萄糖、木糖、麦芽糖)发酵时更高, 但同时产生了更多的乙醇; 利用葡萄糖、果糖和各种双糖发酵时丁二酸的产量及产率基本相同。

此外, 在实验中也发现该菌不能够利用淀粉和纤维素等多糖类物质, 说明了 *A. succinogenes* 生长过程中不能分泌淀粉糖化酶或纤维素酶等酶类, 故不能降解天然高分子糖类物质。但需要指出的是, 尽管表 1 中利用木糖发酵时丁二酸的产量不高, 但可以看出该菌仍具有一定的利用木糖发酵产生丁二酸的能力, 这也为将来有效利用秸秆、木材下脚料等废料发酵生产丁二酸提供了一种可能。

根据表 1 中列出的实验数据, 以 3 种比较典型的碳源(葡萄糖、木糖和山梨醇)的发酵情况进行分析, 得到不同发酵过程中碳源平衡数据, 见表 2。已有国外学者就碳源对产丁二酸菌株发酵进行了一些研究。2005 年, 美国 Lin 等人<sup>[11]</sup>发现不同碳源能够影响 *E. coli* 丁二酸发酵的代谢产物分配。韩国 Lee 等人<sup>[12]</sup>也曾报道了碳源对 *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E 代谢流分布的有一定的影响。

在本研究中, 发现木糖( $C_5H_{10}O_5$ )发酵时代谢产物的分配与葡萄糖无明显差别, 该结果与 Lin 等人<sup>[11]</sup>的研究结果不同。据作者分析主要原因是 *Actinobacillus succinogenes* 与 *E. coli* 代谢途径有区别。据报道<sup>[10]</sup>, *E. coli* 代谢途径中磷酸转移酶(PTS)体系酶活力要明显高于 *Actinobacillus succinogenes*, 所以使用木糖发酵时能够节省 PEP 消耗; 而对于

表 1 *A. succinogenes* CGMCC1593 对不同碳源的利用情况<sup>a</sup>  
Table 1 The utilization of different carbohydrates by *A. succinogenes* CGMCC1593<sup>a</sup>

碳源 Carbon source	生物量 Biomass (OD <sub>660</sub> )	残余碳源 Residual carbon (g/L)	丁二酸 Succinic acid (g/L)	乙酸 Acetic acid (g/L)	甲酸 Formic acid (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	产率 Yield (%)
Glucose	4.6	0.3	13.9	3.7	1.8	ND <sup>b</sup>	71.5
Sorbitol	4.2	0.2	14.7	1.8	1.6	2.1	73.5
Fructose	4.3	0.7	13.6	3.5	1.8	ND	70.5
Xylose	3.7	1.8	12.6	3.6	1.7	ND	69.2
Xylitol	4.3	0.8	13.5	3.9	1.6	1.5	70.3
Maltose	4.9	ND	14.2	4.0	2.0	ND	71.7
Maltitol	3.4	ND	14.6	1.6	1.9	1.8	73.0
Lactose	5.0	0.2	14.3	4.3	1.7	ND	72.2
Sucrose	4.9	ND	14.4	4.1	1.9	ND	72.4

注<sup>a</sup>: 培养在 150 mL 厌氧瓶中进行, 碳源浓度为 20 g/L, 酵母膏浓度为 6 g/L, 培养时间 24 h; <sup>b</sup>: ND, 未测出, 表示其浓度低于 0.2 g/L。  
Note: <sup>a</sup>: Cells were grown in 150 mL anaerobic bottles for 24 h with an initial carbon source concentration of 20 g/L, and the yeast extract concentration was 6 g/L; <sup>b</sup>: ND showed that there was no product detected.

表 2 厌氧条件下碳源对 *A. succinogenes* CGMCC1593 发酵平衡的影响  
Table 2 Fermentation balances of *A. succinogenes* CGMCC1593 grown anaerobically with different carbon sources

碳源 Carbon source	Mol 产物/100 mol 消耗葡萄糖 Mol products/100 mol glucose consumed				碳源回收率 <sup>b</sup> Carbon recovery (%)	电子回收率 <sup>c</sup> Electronic recovery (%)
	生物量 <sup>a</sup> Biomass	丁二酸 Succinic acid	乙酸 Acetic acid	甲酸 Formic acid		
Glucose	102	104	56	54	98	101
Xylose	90	103	54	60	97	98
Sorbitol	96	112	28	50	102	96

注<sup>a</sup>: 生物量按照 510 mg/OD 值进行计算, 细胞组成参考相关文献<sup>[10]</sup>, 其分子式为  $CH_2O_{0.5}N_{0.2}$  (24.967 g/mol); <sup>b</sup>: 各代谢产物中碳原子与消耗碳源中碳原子之比, 以%表示(在进行碳平衡计算时丁二酸分子( $C_3H_6O_2$ )按照 3 mol 碳计算<sup>[10]</sup>); <sup>c</sup>: 电子回收率等于各代谢产物中的氢原子与消耗碳源中氢原子之比, 以%表示。

Note: <sup>a</sup>: Cell carbon was calculated with  $CH_2O_{0.5}N_{0.2}$ <sup>[10]</sup>; <sup>b</sup>: Mol of C per mol of consumed carbon source (Succinate was counted as having 3 mol carbon/mol product, and a structure formula of  $C_3H_6O_2$ ); <sup>c</sup>: Mol of H per mol of consumed carbon source.

*Actinobacillus succinogenes* 来说, 这种现象并不明显。而对于山梨醇发酵来说, 丁二酸的摩尔产率达到最高(每消耗 100 mol 的底物能够生成 112 mol 的丁二酸), 此外更多的碳源流向乙醇, 而乙酸和甲酸的分泌相对减少。

## 2.2 以葡萄糖和山梨醇为碳源发酵时的代谢流量比较

根据美国Lin等人<sup>[11]</sup>的报道, 利用*E. coli*发酵生产丁二酸时, 丁二酸的生成与系统还原力合成有着密切的关系。表 1 数据已经表明: 与糖类物质相比, 糖醇类物质具有更强的还原力, *A. succinogenes* CGMCC1593 利用糖醇发酵时能够生成更多的丁二酸。为了进一步揭示碳源的还原力对*A. succinogenes* 代谢途径关键节点的影响, 优化丁二酸的合成策略, 我们在本论文中就葡萄糖和山梨醇发酵合成丁二酸的代谢流量进行了对比研究。

本实验中, 以 20 g/L 的葡萄糖和山梨醇为碳源, 在分批发酵时指数生长中期(12 h)的代谢流量分布情况。在培养过程中, 分别取 11 h、11.5 h、12 h、12.5 h、13 h 的生物量、葡萄糖以及各有机酸数据, 根据方程的拟合求导就可以得到在 12 h 时各组分的浓度变化速率, 再以 100 mmol/g DCW/h 消耗葡萄糖的速率为计算基准, 可以计算得到 *A.*

*succinogenes* CGMCC1593 在分批发酵过程中的代谢流量分布(见图 1)。图 1 中的各代谢产物缩略语见表 3。

根据图 1 中的数据, 作者对节点处的代谢流量分布进行了分析, 结果见表 4。与葡萄糖发酵相比, 以山梨醇为碳源时 PEP 节点的流量分配几乎没有变化(只是  $r_4$  总流量较大), 这说明使用不同还原力的碳源对该节点的流量分布影响不大。然而, PYR 和 AcCoA 两个节点处的代谢流量分配有了较大的变化。其中, 以山梨醇发酵时, PYR 节点处流向甲酸的流量( $r_7$ )降低了 13%; AcCoA 节点处更多的碳源流向了乙醇, 流向乙酸处的流量( $r_8$ )从 100%降低到了 42%。

同时, 还对 2 种不同碳源发酵时的 NADH 供应情况进行了分析, 结果如表 5 所示。由表 5 可以看出, 梨醇( $C_6H_{14}O_6$ )分子比葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )多 2 个氢原子, 在代谢途径中山梨醇首先经过磷酸化生成了 G6P, 并在该过程中能够释放出 1 mol 的 NADH, 因而比葡萄糖能够产生更多的还原力。我们可以看到, 按照 100 mmol/g DCW/h 的消耗葡萄糖量为计算基准, 在 NADH 流量的供应中, 山梨醇比葡萄糖多产生了约 100 mmol/g DCW/h, 其中  $r_1$  在总比例中占

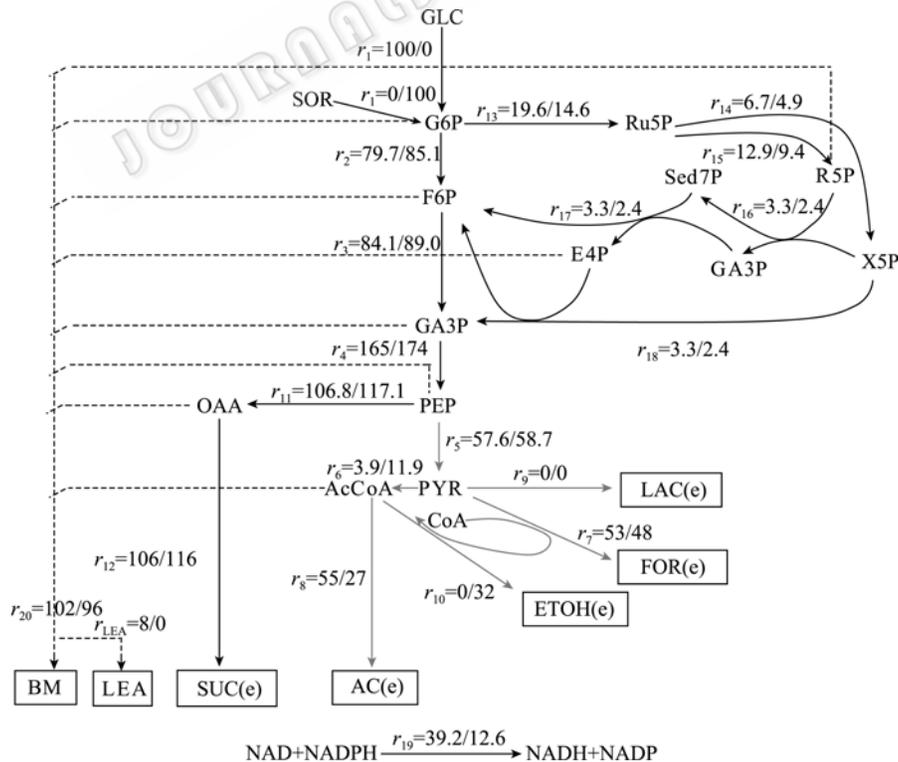


图 1 *A. succinogenes* CGMCC1593 利用不同碳源分批发酵过程的代谢流量(葡萄糖/山梨醇, 12 h)分布

Fig. 1 Metabolic flux distribution of *A. succinogenes* CGMCC1593 grown anaerobically with glucose and sorbitol

表 3 缩略语表  
Table 3 Abbreviations

缩略语 Abbreviations	全称 Fullnames	缩略语 Abbreviations	全称 Fullnames
AC(e)	Extracellular acetate	NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced
AcCoA	Acetylcoa	NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ADP	Adenosine-5'-Diphosphate	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate	OAA	Oxaloacetate
CoA	Coenzyme A	PEP	Phosphoenolpyruvate
E4P	Erythrose 4-Phosphate	PYR	Pyruvate
ETOH(e)	Extracellular Ethanol	R5P	Ribose 5-Phosphate
F6P	Fructose 6-Phosphate	Ru5P	Ribulose 5-Phosphate
FOR(e)	Formate	Sed7p	Sedoheptulose 7-Phosphate
G6P	Glucose 6-Phosphate	SOR	Sorbitol
GA3P	Glyceraldehyde 3-Phosphate	SUC(e)	Extracellular succinate
GLC	Glucose	X5P	Xylulose 5-Phosphate
A-KG	A-Ketoglutarate	BM	Biomass
LA(e)	Extracellular Lactate	LEA	Life maintaince, energy and amino acids, Etc
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide		

表 4 *A. succinogenes* 以葡萄糖和山梨醇为碳源发酵时在 PEP、PYR 和 AcCoA 节点处的代谢流量分布  
Table 4 Metabolic flux partitioning at PEP, PYR and AcCoA nodes in the fermentation of *A. succinogenes* with glucose and sorbitol

碳源 Carbons resource	Flux at PEP node ( $r_4 = 100$ )		Flux at PYR node ( $r_5 = 100$ )			Flux at AcCoA node ( $r_6 + r_7 = 100$ )	
	$r_5$	$r_{11}$	$r_6$	$r_7$	$r_9$	$r_8$	$r_{10}$
Glucose	35	65	7	93	0	100	0
Sorbitol	34	66	20	80	0	42	58

表 5 利用葡萄糖和山梨醇分批发酵时 NADH 产生途径的流量分配

Table 5 Flux distribution of NADH generation pathway with glucose and sorbitol

碳源 Carbons resource	总 NADH 流量 Total NADH flux (mmol/g DCW/h)	NADH流量 <sup>a</sup> = 100 Total NADH flux = 100			
		$r_1$	$r_4$	$2r_6$	$r_{19}$
Glucose	212	0	78	4	18
Sorbitol	311	32	56	8	4

Note: <sup>a</sup>: Total NADH flux =  $r_1 + r_4 + 2r_6 + r_{19}$ .

32%，在GA3P→PEP途径( $r_4$ )中生成的NADH在总还原力所占的比例仅为 56%。在琥珀酸放线杆菌代谢途径中，生成丁二酸和乙醇均需要 2 mol NADH，乳酸需要 1 mol NADH，而生成甲酸和乙酸则不需要还原力。由于以山梨醇发酵时积累了更多的还原力，所以其代谢过程中的碳流量更多地流向了需要更多还原力来合成的丁二酸及乙醇。从图 1 中可以看出，以葡萄糖为碳源发酵时，丁二酸和乙醇的流量为 106 mmol/g DCW/h和 0；而山梨醇发酵时两者的流量升高到 116 mmol/g DCW/h和 32 mmol/g DCW/h。同时，甲酸和乙酸的流量均有明显降低。以上结果表明，尽管山梨醇不能改变代谢关键节点

PEP 的流量分配，但是由于代谢系统中积累了更多的 NADH，使得更多的碳源流向了丁二酸和乙醇。

### 3 讨论

通过对 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 对不同碳源的利用情况研究，发现该菌能够利用单糖和双糖发酵生成丁二酸，也能以糖醇为碳源。与糖类物质相比，糖醇类物质由于具有更强的还原力，在代谢过程中能够多放出 1 mol NADH，因而发酵丁二酸的产量高于相应的糖类物质。代谢流量分析结果表明，尽管糖醇发酵不能改变代谢关键节点 PEP 的流量分配，但由于代谢系统中积累了更多的 NADH，使得 PYR 和 AcCoA 两个节点处的代谢流量分配有了较大的变化，导致更多的碳源流向了需要更多还原力的丁二酸和乙醇。此外，我们将对氧化还原电位对丁二酸放线杆菌生长与产酸的影响情况做更深入的研究(另文发表)。本研究内容对于深入研究 *A. succinogenes* 的代谢途径、优化丁二酸发酵策略具有一定的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 545–552.
- [2] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**: 1668–1674.
- [3] Glassner DA, Datta R. Process for the production and purification of succinic acid. United States Patent: 5143834, 1992.
- [4] Guettler MV, Jain MK, Soni BK. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. United States Patent: 5504004, 1996.
- [5] 孙志浩, 郑 璞, 刘宇鹏. 一种微生物发酵生产丁二酸的菌种和方法. 中国专利, 公开号: CN1814747, 2006.
- [6] 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 and Biotechnology*, 2008, **83**: 722–729.
- [7] 刘宇鹏, 郑 璞, 孙志浩. 采用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): 119–123.
- [8] Sridhar J, Eiteman MA. Metabolic flux analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001, **94**: 51–69.
- [9] 刘宇鹏, 郑 璞, 倪 晔, 等. *Actinobacillus succinogenes* 抗氟乙酸突变株的选育及其代谢流量分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(3): 460–467.
- [10] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, *et al.* Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 332–342.
- [11] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**: 87–93.
- [12] Lee PC, Lee SY, Hong SH, *et al.* Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 663–668.

## 征订启事

## 2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人:《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量