

过量表达 *Bacillus subtilis* 磷酸烯醇式丙酮 酸羧化激酶对大肠杆菌产琥珀酸的影响

于丽 姜岷* 马江锋 岳方方 刘树文

(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 江苏 南京 210009)

摘要: 在大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径中, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PPC)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(PCK)皆可催化由磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)到草酰乙酸(OAA)的反应。鉴于经由 PCK 催化的反应伴有 ATP 的生成, 理论上更有利于菌体生长和产酸, 本研究以大肠杆菌 W3110 (Δpfl , Δldh)为出发菌株, 利用 λ -Red 同源重组系统构建了其 *ppc* 缺陷菌株并在此基础上过量表达了 *Bacillus subtilis pck* 基因。初步的厌氧发酵实验表明: 过量表达 *pck* 可在一定程度上恢复初始菌株厌氧代谢葡萄糖的能力。其中又以 *ppc* 缺陷株更为明显, 其耗糖能力和产酸能力分别为对照菌株的 4.2 和 15.3 倍。

关键词: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 大肠杆菌, 琥珀酸

Effect of Overexpression of *Bacillus subtilis* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase on Succinate Production in *Escherichia coli*

YU Li JIANG Min* MA Jiang-Feng YUE Fang-Fang LIU Shu-Wen

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

Abstract: Both of the phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) could catalyze the reaction from phosphoenolpyruvate (PEP) to oxaloacetic acid (OAA) in the pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *E. coli*. In addition, the reaction catalyzed by PCK generates ATP, which is more beneficial to the growth of the strain and the succinic acid production theoretically. In this study, we constructed a *ppc* defective strain using λ -Red homologous recombination system with the *E. coli* W3110 (Δpfl , Δldh) as the parent strain. Based on that, *Bacillus subtilis pck* was overexpressed. The preliminary anaerobic fermentation experiments showed that both strains partially recovered the ability to consume glucose through the overexpression of *pck*. Besides, the *ppc* defective strain showed the most excellent performance, the rate of glucose consumption and succinate production were 4.2 and 15.3 folds as much as those of the parent strain, respectively.

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2009CB724701); 国家自然科学基金项目(No. 20606017); 江苏省“青蓝工程”项目

*通讯作者: Tel: 86-25-83587330; 信箱: jiangmin@niut.edu.cn

收稿日期: 2009-11-02; 接受日期: 2009-12-14

Keywords: Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Phosphoenolpyruvate carboxylase, *E. coli*, Succinic acid

琥珀酸(又称丁二酸), 被广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品和塑料等行业, 同时, 作为优秀的 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琥珀酸, 价格低廉、污染小, 且在发酵过程中可吸收固定 CO_2 , 开辟了温室气体利用的新途径, 近年来成为研究的热点。

琥珀酸的生产菌株很多, 目前主要集中在 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[3]、*Actinobacillus succinogenes*^[4]、*Mannheimia succiniciproducens*^[5] 和重组 *E. coli* 上。其中, *E. coli* 由于具有遗传背景清楚、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琥珀酸优秀菌株。图 1^[6]显示了大肠杆菌的厌氧混合酸发酵途径。产琥珀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^[7]。

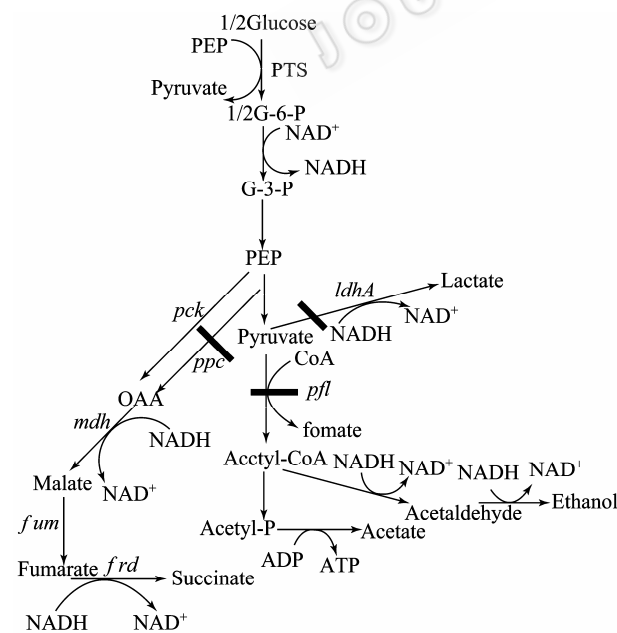


图 1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径^[6]

Fig. 1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *Escherichia coli*^[6]

其中, PEP 羧化酶(PPC)基因(*ppc*)和 PEP 羧化激酶(PCK)基因(*pck*)催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与草酰乙酸(OAA)之间的反应。Millard 等^[8]在大肠杆菌中过量表达 *E. coli ppc* 和 *pck*, 研究发现过量表达 *ppc* 可以使琥珀酸作为混合酸发酵的主要产物, 且产量较出发菌株提高 3.5 倍, 而过量表达 *pck* 对发酵结果没有影响, 但在 *ppc* 缺陷菌株中, *pck* 的过量表达能够提高琥珀酸的产量。因此, PPC 可能是催化 PEP 至 OAA 的最主要的酶, 而当 *ppc* 缺陷时, PCK 可催化该反应。San Yup Lee 等^[9]在大肠杆菌中过量表达 *E. coli pck*, 结果表明当培养液中 HCO_3^- 的浓度低时, 细胞中的羧化反应由 PPC 完成, 而 HCO_3^- 浓度高时, 主要由 PCK 完成该反应。向培养基中添加 20 g/L 的 NaHCO_3 时, 重组菌的琥珀酸产量比野生菌提高了 2.2 倍。

鉴于经由 PCK 催化的反应伴有能量的生成, 可能有利于琥珀酸的积累及副产物乙酸量的降低, 本研究以实验室自主构建的大肠杆菌 W3110 (Δpfl , Δldh) 为出发菌株, 利用 λ -Red 同源重组系统^[10], 成功构建了 *ppc* 缺陷菌株 W3110 (Δpfl , Δldh , $\Delta ppc::apra$)。同时构建了 *Bacillus subtilis pck* 的重组表达质粒 pTrc99a-BSpck, 该质粒具有耐受高浓度葡萄糖的特点。研究初步考察了过量表达 PCK 对重组大肠杆菌 W3110 (Δpfl , Δldh) 及 W3110 (Δpfl , Δldh , $\Delta ppc::apra$) 厌氧发酵产琥珀酸的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 W3110 (Δpfl , Δldh) 为本实验室自主构建并保藏, *Bacillus subtilis* 168 购自微生物菌种保藏中心, 本研究中构建的其他菌株如表 1 所示。质粒 pTrc99a、pIJ790 及 pIJ773 由邵蔚蓝老师(南京师范大学)惠赠, 如表 2 所示。

表 1 本研究中构建的重组菌株
Table 1 Recombinant strains constructed in this research

名称 Name	性状 Character
YL1	W3110 (Δpfl , Δldh , $\Delta ppc::apra$)
YL2	W3110 (Δpfl , Δldh ,)/ pTrc99a-BSpck
YL3	W3110 (Δpfl , Δldh , $\Delta ppc::apra$)/ pTrc99a-BSpck

1.1.2 引物: 扩增阿普拉霉素抗性基因的引物 P1、P2 分别由两部分组成。靠近 5'端加下划线的序列与 *ppc* 基因两翼序列同源, 靠近 3'端未加下划线的序列与质粒 pIJ773 上阿普拉霉素抗性基因两侧序列互补。在大肠杆菌染色体上 *ppc* 基因同源重组区域外侧, 设计引物 P3、P4, 用于检测重组菌株。扩增 *Bacillus subtilis pck* 基因的引物为 P5 和 P6, 加下划线的序列分别为限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xba* I 的酶切位点。各引物的详细序列如表 3 所示。

名称 Name	大小 (bp) Size (bp)	抗性 Resistance	抗生素浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration for <i>E. coli</i> ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
pIJ790	6084	Chloramphenicol	30
pIJ773	1382	Apramycin	50
pTrc99a	4176	Ampicillin	100

名称 Name	序列(5'→3') Sequence
P1	<u>ATGAACGAACAATATTC</u> CGCATTCGCGTAGTAATG TCAGTATGCTCGGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
P2	AGCACGAGGGTTTGCAGAAAGAGGAAGATTAGCCG <u>GTATTACGCATACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
P3	CAGGGCTATCAAACGATAAGATG
P4	AAAACGAGGGTGTAGAACAGAAG
P5	<u>CGAGCTCATGA</u> ACTCAGTTGATTTGACCG
P6	GCTCTAGAGCATTCCGTCAAATTAACAAG

1.1.3 主要试剂: 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; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.1.4 培养基: 有氧培养采用 LB 培养基; 厌氧培养基为 LB 添加 10 g/L 碱式碳酸镁和 12 g/L 葡萄糖。重组菌培养时, 阿普拉霉素、氯霉素和氨苄青霉素在培养基中的工作浓度分别为 50、30 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 诱导剂 IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 以质粒 pIJ773 为模板, P1、P2 为引物, 进行敲除用片段的扩增, 反应条件为: 94°C 10 min; 94°C 45 s, 50°C 45 s, 72°C 90 s, 10 个循环; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 90 s, 15 个循环。以平板筛选出的阳性单菌落为模板, P3、P4 为引物, 进一步采用菌落 PCR 鉴定, 反应条件为: 94°C 10 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 100 s, 35 个循环; 72°C 10 min。以 *Bacillus subtilis* 基因组 DNA 为模板, P5、P6 为引物, 进行 *pck* 片段的扩增, 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 100 s, 35 个循环; 72°C 10 min。

1.2.2 *ppc* 基因的敲除: 挑取 W3110 (Δpfl , Δldh)/pIJ790 的单菌落接种于新鲜的 LB 培养基(含氯霉素)中, 30°C 振荡培养过夜后转接于 50 mL 培养基, 培养至 $A_{600} = 0.2-0.3$ 时, 加入 L-阿拉伯糖诱导, 继续培养至 $A_{600} = 0.5-0.6$ 。将菌液置冰浴中 15-20 min 后, 于 4°C、8000 r/min 条件下离心 10 min, 用 10% 的无菌甘油洗涤菌体 3 次, 将菌体重悬于 0.5 mL 甘油中制成感受态细胞。移取上述敲除用 PCR 产物与感受态细胞混合, 电击后加入 1 mL 预冷的 LB 培养基, 30°C 培养 2 h, 移取 200 μL 涂布于含有氯霉素和阿普拉霉素的 LB 平板上, 30°C 培养, 筛选阳性转化子。

1.2.3 *ppc* 敲除菌株的鉴定及质粒 pIJ790 的消除: 分别以得到的阳性转化子和对照菌株的菌落为模板, P3、P4 为引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

质粒 pIJ790 具有氯霉素抗性, 其复制子具有温度敏感性, 高温条件下无法复制。将经过鉴定的重组菌株接种于 LB 培养基中, 42°C 振荡培养过夜后, 在 37°C 条件下进行划线分离培养, 对每个单菌落进行氯霉素和阿普拉霉素的抗性检测, 挑选对氯霉素敏感而对阿普拉霉素具有抗性的克隆, 得到消除质粒 pIJ790 的重组菌株。

1.2.4 pTrc99a-BSpck 质粒的构建: 用试剂盒提取 *Bacillus subtilis* 基因组 DNA, 以 P5、P6 为引物进行 PCR 扩增。纯化后的 *pck* 基因与 pTrc99a 质粒分别经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后, 用 T4 DNA 连接酶连接并电转化 W3110 (Δpfl , Δldh)感受态细胞, 涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板, 挑选抗性克隆, 提质粒进行双酶切鉴定。将鉴定后的质粒电转化 W3110

(Δpfl , Δldh)的 *ppc* 缺陷株, 构建菌株 W3110 (Δpfl , *ldh*, Δppc , pTrc99a-BSpck), 将其命名为菌株 YL3。

1.2.5 酶活检测: 将菌体转接至含有 IPTG 0.5 mmol/L 的 LB 培养基中, 30°C 振荡培养 6–8 h 后, 超声破碎取上清即粗酶液进行 PPC 和 PCK 酶活测定。总蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[11], 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。

各酶活测定的反应体系见文献[12]。通过测定样品在 340 nm 条件下的紫外吸光值, 计算反应体系中 NADH 的减少量并换算成酶的活性值。酶活定义为 1 min 内催化 1 μ mol NADH 转化为 NAD⁺所需要的酶量为 1 U。

1.2.6 发酵条件及代谢产物分析: 从甘油冻存管转接菌体至 LB 培养基, 37°C、200 r/min 培养过夜后, 按 10%的接种量转接有氧培养基, 37°C、200 r/min 培养 6 h 后按 10%的接种量转接厌氧培养基, 从 CO₂ 钢瓶中经 0.22 μ m 空气过滤器向培养基中通 CO₂ 约 2.5 min。

厌氧发酵结束后, 分别检测受体菌及各重组菌的菌体浓度和发酵液中的琥珀酸、乙酸含量等。葡萄糖用生物传感器(SBA40C)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 2.0, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 215 nm。

2 结果与讨论

2.1 敲除用 PCR 片段的制备

以质粒 pIJ773 为模板, P1、P2 为引物, 扩增出两端与 *ppc* 基因上下游序列同源, 中间为阿普拉霉素抗性基因的 DNA 片段, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定约为 1500 bp, 与理论值一致, 如图 2 所示。

2.2 *ppc* 基因缺陷株的鉴定

分别以从含有氯霉素和阿普拉霉素的平板上筛选到的转化子和对照菌株的菌落为模板, P3、P4 为引物, 进行 PCR 扩增, 对产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。电击入感受态细胞的线性 DNA 片段长度为 1465 bp, 而 *ppc* 基因的长度为 2766 bp, 同源重组后的片段长度约为 1500 bp。如图 3 所示, 阳性转化子 PCR 产物约为 1500 bp, 而假阳性转化子及对照菌株 PCR 产物约为 2700 bp, 与预计的理论值相符。说明重组菌染色体上的 *ppc* 基因已经被阿普拉霉素抗性基因所取代, *ppc* 基因被成功敲除。

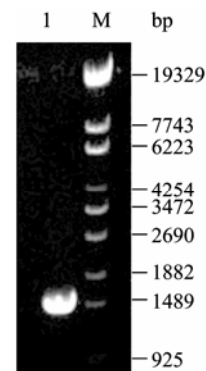


图 2 质粒 pIJ773 的阿普拉霉素抗性基因 PCR 扩增
Fig. 2 PCR amplification of apramycin resistance gene in plasmid pIJ773

注: M: DNA 分子量标准; 1: 目的基因 PCR 产物(1465 bp).

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of the target gene (1465 bp).



图 3 *ppc* 基因缺陷株的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of *ppc* mutants

注: M: DNA 分子量标准; 1、2、3 分别为对照菌株、阳性重组菌株和假阳性重组菌株的 PCR 产物(大小分别为 2766 bp、1552 bp、2766 bp)。

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of *ppc* gene in the host strain (2766 bp); 2: PCR product of *ppc* gene in the mutant strain (1552 bp); 3: PCR product of *ppc* gene in the false recombinant strain (2766 bp).

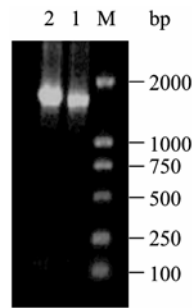
2.3 *Bacillus subtilis pck* 基因的克隆

图 4 为从 *Bacillus subtilis* 基因组上扩增出的 *pck* 片段, 大小约为 1600 bp, 与理论值相近。连接至 pTrc99a 后的重组质粒鉴定如图 5 所示, 双酶切鉴定的结果与预期一致。目的基因已成功插入至 pTrc99a 中。

2.4 各菌株的 PPC 和 PCK 酶活测定

对出发菌株和构建的各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 4 所示。

由表 4 可以看出, 出发菌株的 PPC 活力较高, 而 PCK 活力很低, 说明在正常情况下主要由 PPC 催

图4 *Bacillus subtilis pck* 基因 PCR 扩增Fig. 4 PCR amplification of *Bacillus subtilis pck* gene

注: M: DNA 分子量标准; 1、2: *Bacillus subtilis pck* 基因(1650 bp).

Note: M: DNA marker; 1,2: PCR product of *Bacillus subtilis pck* gene (1650 bp).

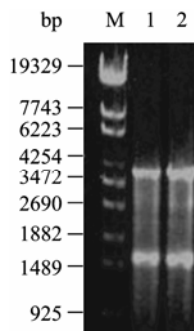


图5 质粒 pTrc99a-BSpck 的双酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pTrc99a-BSpck by restriction endonuclease digestion

注: M: DNA 分子量标准; 1、2: 重组质粒 pTrc99a-BSpck *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切产物(大小为 4159 bp 和 1647 bp).

Note: M: DNA marker; 1,2: Products of pTrc99a-BSpck digested by *Sac* I and *Xba* I (4159 bp and 1647 bp).

表4 各菌株的 PPC、PCK 酶活比较
Table 4 Activity of the enzymes PPC, PCK in crude extracts of the recombinants

菌株 Strains	PPC 酶活 PPC activity (U/mg)	PCK 酶活 PCK activity (U/mg)
W3110 (Δpfl , Δldh)	0.29	0.032
YL2	0.16	0.63
YL3	0	0.56

化 PEP 生成 OAA 的反应。过量表达 *Bacillus subtilis pck* 后, PCK 活力由 0.032 U/mg 升至 0.63 U/mg, 酶活提高了将近 20 倍, 而 PPC 活力与出发菌株相比则稍有下降。敲除 *ppc* 后过量表达 *Bacillus subtilis pck*, PCK 活力也有很大程度的提高, 为 0.56 U/mg。

2.5 各菌株的厌氧发酵结果分析

以出发菌株作为对照, 考察各重组菌株厌氧发酵产琥珀酸的情况。检测了厌氧发酵结束时发酵液的菌体细胞干重(DCW)、pH、葡萄糖含量及琥珀酸和乙酸的含量, 结果如表 5 所示。

出发菌株因为缺失了 *pfl* 和 *ldh* 基因, 造成丙酮酸的积累, 使得菌株代谢葡萄糖的速度非常缓慢。过量表达 *Bacillus subtilis pck* 在一定程度上恢复了出发菌株代谢葡萄糖的能力, 72 h 内可消耗 8.25 g/L 葡萄糖产 2.21 g/L 琥珀酸, 产酸能力为出发菌株的 6 倍, 同时也恢复了细胞的生长, DCW 较出发菌株提高了约 1.5 倍。敲除 *ppc* 后过量表达 *Bacillus subtilis pck*, 菌株代谢葡萄糖的能力进一步提高, 72 h 内消耗 10.5 g/L 葡萄糖产 5.52 g/L 琥珀酸, 产酸能力比出发菌株提高了约 15 倍, 琥珀酸对葡萄糖的质量收率达 54%, 且副产物乙酸的量极低。说明经由 PCK 催化 PEP 到 OAA 的应对菌株的生长和产酸更为有利。

3 结论

本研究以实验室自主构建的大肠杆菌 W3110 (Δpfl , Δldh) 为出发菌株, 利用 λ -Red 同源重组系统敲除了 *ppc* 基因, 并过量表达了 *Bacillus subtilis pck* 基因, 构建了一系列重组菌株, 初步考察了过量表达 *pck* 对大肠杆菌厌氧发酵产琥珀酸的影响。结果表明: 过量表达 *pck* 可以部分恢复对照菌株厌氧条件下代谢葡萄糖的能力, 其中又以 *ppc* 缺陷株最为明显, 其耗糖能力和产酸能力分别为出发菌株的 4.2

表5 各菌株的厌氧发酵结果
Table 5 Anaerobic fermentation results of the recombinants

菌株 Strains	初糖 Initial glucose (g/L)	时间 Time (h)	残糖 Residual glucose (g/L)	DCW (g/L)	pH	琥珀酸 Succinic acid (g/L)	乙酸 Acetic acid (g/L)
W3110 (Δpfl , Δldh)	11.75	72	9.25	0.712	7.52	0.36	0.37
YL2	12.00	72	3.75	1.730	7.09	2.21	0.52
YL3	11.25	72	0.75	1.780	6.98	5.52	0.07

和 15.3 倍, 且副产物乙酸的量很低。

鉴于 PCK 对底物 HCO_3^- 的亲和能力远远低于 PPC, 因此通过进一步考察细胞内碳酸氢盐的浓度, PCK 对碳酸氢盐的亲合力等因素, 可进一步提高各重组菌株的生长和产酸性能。此研究为利用基因工程手段进一步改造大肠杆菌生产琥珀酸奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王大勋, 马铁宁. 从深度氧化石蜡中提取琥珀酸. 化学工程师, 2003, **96**(3): 15–16.
- [2] 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.
- [3] Lee PC, Lee SY, Hong SH, *et al.* Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(2): 111–114.
- [4] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 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] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1989, **63**(3): 223–234.
- [7] 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.
- [8] Millard CS, Chao YP, Liao JC, *et al.* Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(5): 1808–1810.
- [9] Kwon, Deok Y, Lee SY, *et al.* Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase(PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, **16**(9): 1448–1452.
- [10] Kirril AD, Barry LW. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(12): 6640–6645.
- [11] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976(72): 248–254.
- [12] Wu Hui, Li Zhimin, Zhou Li, *et al.* Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB ldhA* double mutants as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(24): 7837–7843.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名, 造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱, 这大大影响了本刊在国际上的传播, 也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论, 以及主办单位批准, 本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”, 请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25