

3-羟基丙酸高产菌株的筛选及诱变选育

范俊英¹ 方慧英^{1*} 诸葛斌^{1*} 诸葛健^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室和工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】3-羟基丙酸是一种重要的化学平台化合物, 期望得到一株能够高产 3-羟基丙酸的菌株。【方法】从土壤及粪便筛选并对得到的菌株进行鉴定和复合诱变。

【结果】得到了一株能够利用丙酸发酵生产 3-羟基丙酸的酵母 Y-11, 经生理生化鉴定及 18S rDNA 序列分析确定其为 *Candida* sp. (假丝酵母)。以 Y-11 为出发菌株, 经紫外-亚硝基胍-⁶⁰Co γ 复合诱变得到了突变性状稳定且可遗传的高产菌株 5-13B, 其 3-羟基丙酸的产量为 11.78 g/L, 是出发菌株的 2.46 倍。【结论】对出发菌株和突变株的发酵特性进行了比较, 结果表明突变株的 3-羟基丙酸产量、对底物丙酸的转化率、产物 3-羟基丙酸的积累性能及丙酸的耐受性均优于出发菌株。

关键词: 假丝酵母, 3-羟基丙酸, 诱变, 发酵特性

Isolation, identification and mutation breeding of 3-hydroxypropionic acid high production strain

FAN Jun-Ying¹ FANG Hui-Ying^{1*} ZHUGE Bin^{1*} ZHUGE Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology of China, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] 3-HP is an important bio-based platform compound. We wanted to iso-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA020103, 2009AA02Z210)

*通讯作者: 方慧英: 函: fanghuiying@126.com

诸葛斌: 函: bzhuge@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-12; 接受日期: 2012-01-18

late a strain which can produce 3-HP. **[Methods]** We isolated samples of soil(17) and feces(10) and did physiological-biochemical identification and 18S rDNA sequence analysis with Y-11. Then we used UV-NTG-⁶⁰Co γ to generate mutations. **[Results]** A yeast Y-11 which can use propionic acid to produce 3-HP was screened by us. It was identified as *Candida* sp.. We used UV-NTG-⁶⁰Co γ to generate mutations in Y-11 and got a genetic stability mutant, designated as 5-13B. The mutant 5-13B showed the productivity of 3-hydroxypropionic acid is 11.78 g/L, 2.46 times as that of the primitive strain(Y-11). **[Conclusion]** The fermentation characters of primitive strain and mutant strain were compared. The results showed that the consumption rate of propionic acid, accumulation of 3-hydroxypropionic acid and tolerance of propionic acid of mutant strain are better than primitive strain.

Keywords: *Candida* sp., 3-Hydroxypropionic acid, Mutagenesis, Fermentation characters

3-羟基丙酸(3-Hydroxypropionic acid, 又称 β -Hydroxypropionic acid, 缩写为 3-HP, 分子式 $C_3H_6O_3$, CAS 号 503-66-2, pK 4.51, 分子量 90, 密度 1.08)是三碳、无手性有机酸, 与乳酸互为同分异构体^[1]。3-羟基丙酸具有羟基和羧基两个官能团, 是很多光学活性物质的前体^[2]。它脱水可以生成丙烯酸, 氧化生成丙二酸, 还原生成 1,3-丙二醇, 聚合生成高分子材料, 是一种重要的化工平台产品。2004 年美国能源部将其列为当今世界 12 种最具潜力的化工产品之一^[1]。

目前, 3-羟基丙酸的生产方法是化学合成法, 主要有水合丙烯酸法^[3]和 β -丙烯腈转化法^[4]。但在碳末端引入功能团有很大的难度, 且其产品不易分离提纯, 生产成本较高, 生产过程存在不安全因素, 而利用微生物发酵生产 3-羟基丙酸可以有效地避免这些不利因素。微生物转化法生产 3-羟基丙酸的研究始于 20 世纪 60 年代, 但一直处于实验室阶段, 主要包括构建基因工程菌法和野生菌发酵法。基因工程法生产 3-羟基丙酸有两条途径: 以葡萄糖^[12]为底物和以甘油^[13]为底物的生物转化路线。其中, 北京工商大学的王凤寰等^[32]通过在肺炎克雷伯杆菌(*K. pneumonia*)中表达来自酿酒酵母的乙醛脱氢酶(ALDH), 得到了一株能同时利用甘油耦连生产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的

重组菌, 其 3-羟基丙酸的产量为 5.0 g/L。已知的可发酵生产 3-羟基丙酸的野生菌株主要有: *Hansenula miso*^[6]、*Fusarium merismoides*^[7]、*Candida rugosa*^[8]、*Byssochlamys* sp.^[9]、*Rhodococcus erythropolis* LG12^[10]和 *Klebsiella terrigena*^[11]。其中, 李冰和裴疆森从自然环境中筛选可代谢产生 3-羟基丙酸的微生物菌株土生克雷伯氏菌(*Klebsiella terrigena*)^[11]可以以甘油为唯一碳源生产 3-羟基丙酸, 产酸能力为 1% (10 g/L), 初次实现野生菌种从甘油直接转化生成 3-羟基丙酸。

目前, 国内外研究的 3-羟基丙酸生产方法多为构建基因工程菌法, 野生菌发酵生产 3-羟基丙酸的报道还很少。本实验以筛选得到的酵母菌为出发菌株, 复合诱变得得到可稳定遗传的高产菌株, 其产量明显高于目前的报道, 为微生物发酵生产 3-羟基丙酸工业化提供可能。

1 材料与方 法

1.1 原料

土样, 采自海南三亚, 17 份; 人类粪便, 10 份; 3-羟基丙酸, 梯希爱(上海)化成工业有限公司。

1.2 培养基及培养条件

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母浸膏 10, 琼脂粉 20。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30.00, 酵母膏 10.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.00, KH_2PO_4 5.00, K_2HPO_4 2.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 丙酸 10.00, TES 5 mL^[14], 调节 pH 至 6.0。

筛选培养基: 在种子培养基的基础上添加 0.4%–2.0% 丙酸。

种子培养: 将斜面 *Candida* sp. 接种到种子培养基中, 回转式摇床 220 r/min、30 °C 培养 20 h。

发酵培养: 将种子以 4% 接种量接入发酵培养基中, 回转式摇床 220 r/min、30 °C 培养 96 h。

1.3 方法

1.3.1 3-羟基丙酸生产菌株的筛选: 分别取少许样品浸于无菌生理盐水中, 12 h 后取 0.2 mL 悬浮液涂布含 0.4% 丙酸的筛选培养基, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落分离纯化。涂布含 1% 丙酸的筛选培养基, 将得到的菌株转接种子培养基, 20 h 后接种发酵培养基, 30 °C 培养 48 h。

1.3.2 复合诱变方法紫外线照射: 取菌悬液 8 mL 置于直径 9 cm 的培养皿中, 在磁力搅拌下用 15 W 紫外灯照射 20、40、60、80、100、120 s。

亚硝基胍诱变: 称取亚硝基胍于无菌离心管中, 加入一定量的菌悬液(10^{11} 个/mL), 使亚硝基胍浓度为 0.5 mg/mL, 充分溶解后置于 30 °C 恒温振荡, 作用时间分别为 10、20、30、40、50、60 min。

⁶⁰Co γ 辐照: 将菌悬液分别在剂量为 250、500、750、1 000、1 250、1 500 Gy 的条件进行辐照。梯度稀释后, 取不同作用的菌悬液 200 μL 涂布种子培养基, 30 °C 培养 48 h。

1.3.3 致死率测定: 致死率=(1-诱变后长出菌落数/未经诱变长出菌落数) $\times 100\%$; 正突变率=正突变株数/突变株总数 $\times 100\%$ 。

1.3.4 初筛和复筛: 将 1.3.2 得到的菌株点种丙酸含量为 2% 的筛选培养基初筛, 30 °C 培养 48 h。将初筛得到的菌落进行发酵验证。

1.3.5 菌株的鉴定: 高倍镜下观察菌体形态, 点

种固体培养基, 观察巨大菌落形态。生理生化鉴定参照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[15]。用酵母通用引物(Primer 1: 5'-GCCTGAGAAACGGC TACCAC-3'; Primer 2: 5'-GGCAGGGACGTAA TCAACGC-3')进行 18S rDNA PCR 扩增。将得到的序列在 NCBI 中进行序列比对。

1.3.6 3-羟基丙酸/丙酸检测分析方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Ecosile C18 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 3% 甲醇, 用 H_3PO_4 调 pH 至 2.0; 检测条件: 紫外检测器 210 nm, 柱温 35 °C, 流速 0.8 mL/min, 进样量 20 μL 。

2 结果与分析

2.1 3-羟基丙酸产生菌的筛选与验证

按照 1.3 中的方法, 从 27 份样品中初筛得到 187 株菌株, 复筛得到 124 (Y1-Y124) 株。分别对这 124 株菌进行发酵培养, 其中有 23 株菌株能够以丙酸为底物生产 3-羟基丙酸, 产量较高的 8 株分别为: Y-4、Y-11、Y-12、Y-26、Y-49、Y-76、Y-118 和 Y-121; 3-羟基丙酸产量分别为: 2.54、4.78、3.10、2.67、4.09、3.33、3.94 和 3.04 g/L。后续实验选用产量相对较高的 Y-11 为出发菌株。

为进一步确定发酵产物, 本研究以 3-羟基丙酸标准品为对照, 对 Y-11 发酵液进行了 LC-MS 产物验证。结果表明(图 1): 发酵液中与 3-羟基丙酸标准品特征峰相同, 该图谱为负离子图谱, 检测到 3-羟基丙酸特征 m/z 89 以及 3-羟基丙酸 2C 和 3C 碳键断裂所产生的 m/z 59, 进一步确定 Y-11 能够发酵生产 3-羟基丙酸。

2.2 菌种鉴定

如图 2 所示, 显微镜下观察, Y-11 在液态发酵中呈椭圆状, 出芽生殖, 有假菌丝和有隔菌丝, 巨大菌落呈乳白色, 表面有褶皱, 边缘不整齐, 易挑起。同化碳源实验(表 1)表明: Y-11 可同化利用葡萄糖、蔗糖、甘油、麦芽糖、半乳糖、乳糖、

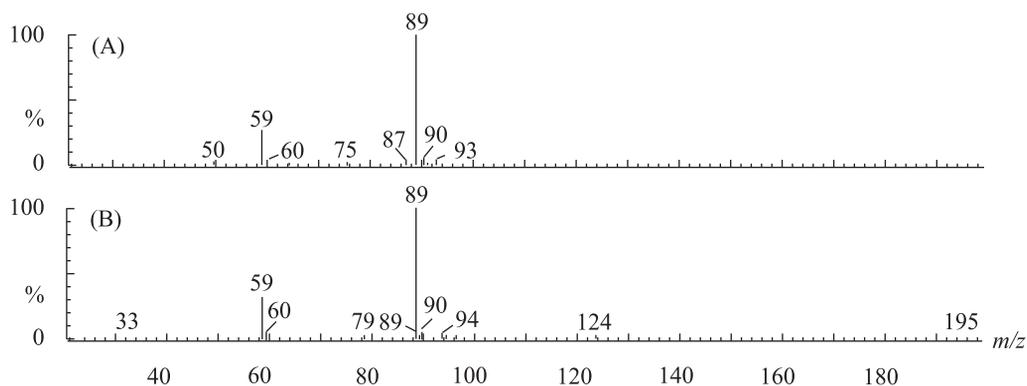


图1 3-羟基丙酸标样(A)和Y-11发酵液(B)的LC-MS图谱

Fig. 1 LC-MS of 3-HP standard substance (A) and Y-11 fermentation broth (B)

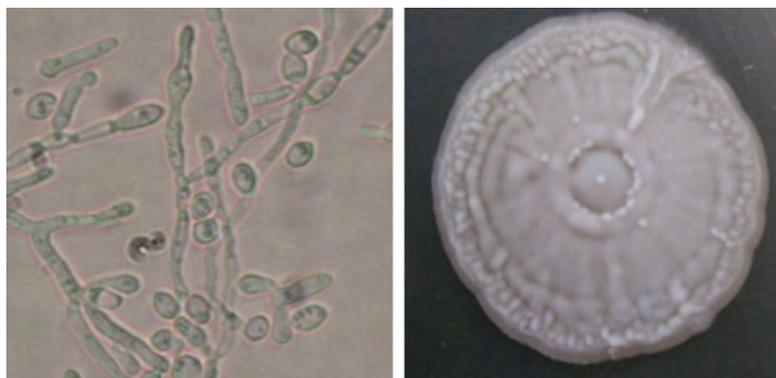


图2 Y-11显微镜(16×40)及巨大菌落形态(640×)

Fig. 2 Form of Y-11 under a microscope and giant colony (640×)

注: 两图均为5×图片。

Note: The figures amplification factor was 5 times.

D-甘露糖和木糖, 不能同化可溶性淀粉和丙酸。同化氮源实验表明: Y-11 可同化利用铵盐、乙胺和硝酸盐, 不可利用亚硝酸盐和尿素。糖发酵实验表明: Y-11 可发酵葡萄糖, 不能发酵蔗糖、麦芽糖、乳糖和半乳糖。

18S rDNA 鉴定分析显示, Y-11 的 18S rDNA 序列(GenBank 登录号 JQ231234)共 1 277 bp, 与 *Candida rugosa* ATCC 10571 相似性达到 99%, 综合《酵母菌的特征与鉴定手册》及其序列分析比对结果, Y-11 确定为 *Candida* sp. (假丝酵母属)。

2.3 复合诱变

将诱变后的菌悬液涂布固体平板培养并计算

致死率, 如图 3 (X 轴上 1-6 分别表示 UV 照射时间 20、40、60、80、100、120 s; NTG 作用时间 10、20、30、40、50、60 min; $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照剂量 250、500、750、1 000、1 250、1 500 Gy)所示, 致死率随作用时间(剂量)的延长而增加。从不同诱变时间(剂量)的初筛平板上随机挑选 30 个发酵复筛, 检测 3-羟基丙酸产量, 计算正突变率。正突变率较高的条件分别为: 15 W 紫外照射为 80 s, 0.5 g/L 亚硝基胍为作用 30 min, $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照剂量为 1 000 Gy。其中, 紫外诱变挑选的 30 株中, 突变株 8-5 (照射 80 s)产量最高的为 5.26 g/L; 亚硝基胍诱变挑选的 30 株中, 突变株 3-8 (作用 30 min)

表 1 生理生化鉴定			
Table 1 Physiological-biochemical identification			
项目	结果	项目	结果
Item	Result	Item	Result
碳源		氮源	
Carbon source		Nitrogen source	
葡萄糖	++	乙胺	+
Glucose	++	Ethylamine	+
甘油	+	硫酸铵	++
Glycerol	+	Ammonium sulfate	++
蔗糖	++	硝酸钠	+
Sucrose	++	Sodium nitrate	+
麦芽糖	+	亚硝酸钠	-
Maltose	+	Sodium nitrite	-
乳糖	(+)	尿素	-
Lactose	(+)	Urea	-
半乳糖	+	糖发酵	
Galactose	+	Carbohydrate fermentation	
D-甘露糖	(+)	葡萄糖	+
D-mannitol	(+)	Glucose	+
木糖	(+)	蔗糖	-
Wood sugar	(+)	Sucrose	-
可溶性淀粉	-	麦芽糖	-
Soluble starch	-	Maltose	-
丙酸	-	乳糖	-
Propanoic acid	-	Lactose	-
		半乳糖	-
		Galactose	-

注: ++: 生长良好; +: 生长一般/可发酵; (+): 生长较差; -: 不生长/不发酵。

Note: ++: Well; +: Common; (+): Bad; -: Not growth.

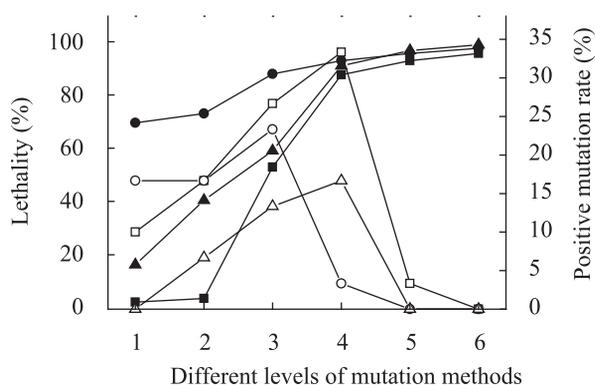


图 3 不同水平诱变方法的致死率及正突变率

Fig. 3 Lethality and positive mutation rate

注: 紫外(■)/亚硝基胍(●)/钴 60(▲)致死曲线; 紫外(□)/亚硝基胍(○)/钴 60(△)正突变率曲线。

Note: Lethality of UV ■/ NTG ●/ ⁶⁰Coγ ▲; Positive mutation rate of UV □/NTG ○/⁶⁰Coγ △.

表 2 UV-NTG-60Coγ 诱变突变株			
Table 2 UV-NTG-60Coγ mutagenesis mutants			
菌株编号	3-羟基丙酸	倍数	提高率
Strain number	3-HP (g/L)	Times	Increase rate (%)
Initial strain	4.78	1.00	0
1-1A	8.71	1.82	82
1-11A	9.18	1.92	92
5-4A	9.35	1.96	96
6-11A	9.99	2.09	109
2-7B	10.13	2.12	112
5-1A	10.72	2.24	124
5-10B	10.84	2.27	127
5-13B	11.78	2.46	146
6-3A	12.40	2.59	159

产量最高为 7.67 g/L; ⁶⁰Coγ 诱变挑选的 30 株中, 突变株 2-2 (1 000 Gy)产量最高为 6.21 g/L。结果显示, 3-羟基丙酸产量提高幅度最大的突变株也出现正突变率较高的条件下, 因此复合诱变处理方法确定为: 用 15 W 紫外照射 80 s 后, 用终浓度为 0.5 g/L 亚硝基胍作用 30 min, 之后用 1 000 Gy 的 ⁶⁰Coγ 辐照。涂布平板, 30 °C 培养 48 h。

丙酸对 *Candida sp.* 的生长有抑制作用, 故诱变前采用不同浓度的丙酸对其进行诱导驯化, 以提高菌株对丙酸的耐受性。将 *Candida sp.* 活化后, 用含 1%、2% 丙酸的液体培养基和平板对其进行反复驯化, 挑取长势良好的菌株作为诱变的出发菌株。复合诱变并对突变菌株进行初筛和复筛, 得到 132 株突变株, 对这些菌株进行发酵验证得到产量较高的 9 株突变株如表 2 所示, 其中菌株 5-13B (2.46 倍)、6-3A (2.59 倍)产量提高最明显。由于诱变可能存在不稳定遗传因素, 对产量相对较高的 6-3A、5-13B 两株菌进行 10 次传代实验, 结果如表 3 所示, 5-13B 具有良好的遗传稳定性。因此, 后续实验我们选用产量相对较高且稳定性良好的突变株 5-13B。

表3 突变株的遗传稳定性
Table 3 Genetic stability of mutagenesis mutants

代数 Generation number	3-羟基丙酸产量 Production of 3-HP (g/L)	
	5-13B	6-3A
1	11.78	12.40
2	11.47	11.57
3	11.29	11.47
4	11.35	11.21
5	11.41	11.15
6	11.27	11.07
7	11.58	10.91
8	11.25	10.77
9	11.57	10.64
10	11.29	10.60

2.4 出发菌株与突变株的 3-羟基丙酸产量及丙酸转化率比较

将出发菌株 Y-11 与高产突变株 5-13B 进行以丙酸为底物的发酵, 结果如图 4 所示。Y-11 发酵第 4 天 3-羟基丙酸产量已经趋于稳定(4.83 g/L) 丙酸转化率为 24.7%, 而 5-13B 的 3-羟基丙酸产量仍不断增加, 第 5 天达到最大值(11.78 g/L), 丙酸的转化率为 64.8%, 突变株 5-13B 具有更高的产量和转化率。

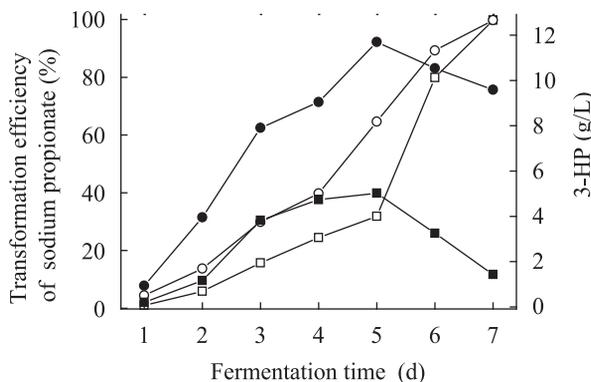


图4 3-羟基丙酸产量及丙酸转化率

Fig. 4 3-HP production and propionic acid consumption
注: 出发菌株(□)和 5-13B(○)的底物消耗速率; 出发菌株(■)和 5-13B(●)的 3-HP 产量。

Note: Substrate consumption rate of wild strain (□) and 5-13B (○); 3-HP of wild strain (■) and 5-13B (●).

2.5 出发菌株与突变株的静息细胞^[10]对 3-羟基丙酸的降解比较

将菌体在发酵培养基中培养 72 h 后, 离心, 用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤菌体 2 次。转接到含有 1% 的 3-羟基丙酸的磷酸盐缓冲液中, 回转式摇床 220 r/min、30 °C 培养。在无外源碳源存在的情况下, 添加初始浓度为 8.12 g/L 的 3-羟基丙酸, 每 12 h 取样检测菌体浓度及 3-羟基丙酸的含量, 结果(图 5)表明: 3-羟基丙酸被菌体降解用于维持自身正常的代谢。相比出发菌株 Y-11, 突变株 5-13B 的 3-羟基丙酸降解率明显降低, 具有良好的 3-羟基丙酸的积累性能。

2.6 出发菌株与突变株的丙酸耐受性比较

Candida sp. 能够以丙酸为底物发酵生产 3-羟基丙酸, 而丙酸是一种强有机酸, 对微生物的生长繁殖有抑制作用, 因此丙酸的耐受性是发酵的关键。出发菌株与突变株 5-13B 对不同浓度丙酸的耐受性如图 6 所示。菌体生长稳定期随着丙酸浓度的增加而滞后, 高浓度丙酸阻滞了菌体正常的生长代谢。未添加丙酸的情况下生长良好,

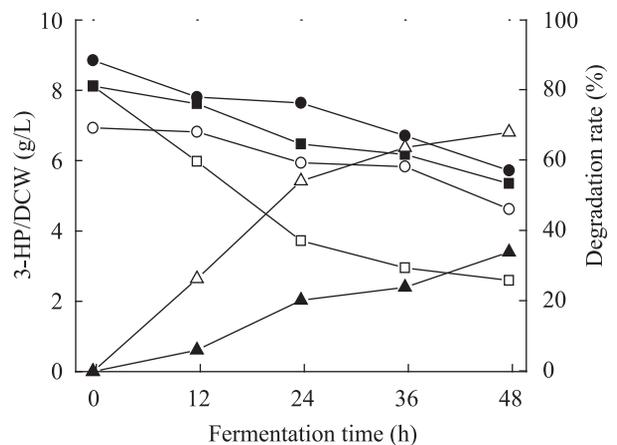


图5 静息细胞对 3-HP 的降解

Fig. 5 Degradation of 3-HP by resting cells

注: 野生菌(□)和 5-13B (■)的 3-羟基丙酸产量; 野生菌(○)和 5-13B(●)的细胞干重; △/5-13B(▲)。

Note: 3-HP of wild cell (□) and 5-13B (■); Dry cell weight of wild cell (○) and 5-13B (●); 3-HP degradation rate of wild cell (△) and 5-13B (▲).

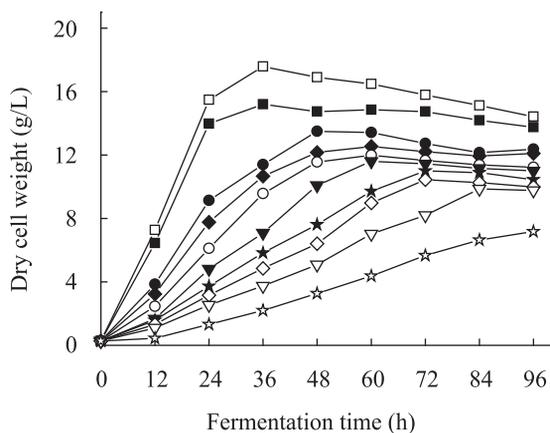


图6 丙酸耐受性

Fig. 6 Tolerance of propionic acid

注: 不同丙酸浓度下菌体干重 0 g/L 野生菌(□)/5-13B (■); 10 g/L 野生菌(○)/5-13B (●); 20 g/L 野生菌(◇)/5-13B (◆); 30 g/L 野生菌(▽)/5-13B (▼); 40 g/L 野生菌(☆)/5-13B (★).

Note: Propionic acid concentration 0 g/L wild cell (□)/5-13B (■), 10 g/L wild cell (○)/5-13B (●), 20 g/L wild cell (◇)/5-13B (◆), 30 g/L wild cell (▽)/5-13B (▼), 40 g/L wild cell (☆)/5-13B (★).

两菌培养 24 h 趋于稳定期, 且出发菌株的长势优于突变株 5-13B。在添加丙酸的情况下, 在菌体生长的前 48 h, 突变株的耐受性优于出发菌株。

3 结论

本文经土壤筛选得到 3-羟基丙酸生产菌株 Y-11, 生理生化鉴定及 18S rDNA 序列分析, 鉴定其为 *Candida* sp. 属假丝酵母属。通过复合诱变, 得到突变株 5-13B, 产量提高 2.46 倍, 且突变性状稳定遗传。同时, 对诱变前后菌株的发酵特性进行了对比, 相对出发菌株 Y-11, 突变株 5-13B 的优点在于: 高产 3-羟基丙酸, 丙酸转化率高, 3-羟基丙酸的降解率低, 同时对高浓度的丙酸具有良好的耐受性。

在目前研究的 3-羟基丙酸生产方法中, 大多数采用基因工程的方法导入外源基因, 产量较低。本研究以能够利用丙酸产 3-羟基丙酸的 *Candida* sp. 为出发菌株, 复合诱变得到高产菌株, 是目前文献报道的产量最高的野生菌。但该菌株

发酵生产 3-羟基丙酸的代谢机理尚未明确, 有待于进一步的研究证实, 因此, 从代谢途径上提高 *Candida* sp. 发酵产 3-羟基丙酸的产量将是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] Jiang XL, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(6): 995–1003.
- [2] 楼坚, 裘娟萍. 生物法合成 3-羟基丙酸的研究进展[J]. *工业微生物*, 2006, 36(4): 56–60.
- [3] Ishida H, Ueno E. Manufacture of 3-hydroxypropionic acid with good selectivity and yield[P]. *J P 2000159724 A2*, 2000: 1–2.
- [4] 沈长洲, 游思慧. β -羟基丙酸合成的新方法[J]. *河北化工*, 1995, (1): 10–11.
- [5] Meneely KM, Lamb AL. Biochemical characterization of a FAD dependent monooxygenase, ornithine hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*, suggests a novel reaction mechanism[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(42): 11930–11937.
- [6] Harada T, Hirabayashi T. Utilization of alcohols by *Hansenula miso*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1968, 32(9): 1175–1180.
- [7] Miyoshi T, Harada T. Utilization of 2-butyne-1, 4-diol by a strain of *Fusarium merismoides*[J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1974, 52(6): 196–199.
- [8] Hasegawa J, Ogura M, Kanema H, et al. Production of β -hydroxypropionic acid from propionic acid by a *Candida rugosa* mutant unable to assimilate propionic acid[J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1982, 60(6): 591–594.
- [9] Takamizawa K, Horitsu H, Ichikawa T, et al. β -Hydroxypropionic acid production by *Byssoschlamys* sp. grown on acrylic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 40(2/3): 196–200.
- [10] Lee SH, Park SJ, Park OJ, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from acrylic acid by

- newly isolated *Rhodococcus erythropolis* LG12[J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2009, 19(5): 474-481.
- [11] 李冰, 裴疆森. 3-羟基丙酸产生菌株的筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 28-31.
- [12] Gokarn RR. 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds[P]. WO, 02/42418 A2. 2004.
- [13] 张晓梅, 诸葛斌, 许正宏, 等. 产3-羟基丙酸重组菌的构建及其转化甘油的研究[J]. 生物技术通报, 2009(8): 104-108.
- [14] opment for the production of D(-)- β -hydroxyisobutyric acid[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 1997, 2(1): 23-26.
- [15] Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 20-25.

~~~~~  
(上接 p. 1305)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA, RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

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