

# 增大罐压提高脱氮假单胞菌发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的产量

刘玉伟\* 王建 王泽建 黄明志

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 国家生化工程技术研究中心(上海) 上海 200237)

**摘要:** 【目的】提高发酵罐的罐压, 增加维生素 B<sub>12</sub> 的产率。【方法】利用常规代谢通量分析(MFA)方法, 对脱氮假单胞菌生产维生素 B<sub>12</sub> 的发酵过程进行研究。【结果】发现随着 VB<sub>12</sub> 合成速率的加快, 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化生成草酰乙酸(OAA)的通量明显加大, 以满足维生素 B<sub>12</sub> 合成对前体的需求。根据该分析结果, 对发酵工艺进行了改进, 即在脱氮假单胞菌进入合成维生素 B<sub>12</sub> 阶段时, 提高发酵罐的罐压, 增加发酵液中二氧化碳的溶解度, 从而强化了羧化回补途径。维生素 B<sub>12</sub> 的产率明显增加, 发酵 160 h 的产物浓度为 176 mg/L, 比对照批次终浓度 147 mg/L 高出了 19.7%。【结论】通过增大罐压提高了脱氮假单胞菌进入合成维生素 B<sub>12</sub> 的产量。

**关键词:** 脱氮假单胞菌, 罐压, 羧化途径, 合成速率

## Improvement of the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Pseudomonas denitrifican* through increasing the fermenter pressure

LIU Yu-Wei\* WANG Jian WANG Ze-Jian HUANG Ming-Zhi

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST, National Engineering Research Center for Biotechnology (Shanghai), Shanghai 200237, China)

**Abstract:** [Objective] The pressure of fermenter was enhanced in order to increase the concentration of vitamin B<sub>12</sub>. [Methods] Metabolic flux analysis (MFA) was used to analyse the fermentation process of vitamin B<sub>12</sub> production by *Pseudomonas denitrifican*. [Results] The results indicated that the metabolic flux of oxaloacetic acid from phosphoenolpyruvate carboxylation was increased when the synthesis rate of vitamin B<sub>12</sub> increased, in order to meet the demand for precursor supply to vitamin B<sub>12</sub> production. A novel control strategy was designed

基金项目: 国家科技支撑计划课题(No. 2011BAF02B05)

\*通讯作者: ✉ liuyuwei213@sohu.com

收稿日期: 2011-08-04; 接受日期: 2011-10-25

as following. The pressure of fermenter was enhanced in order to increase the solubility of carbon dioxide in aqueous solution at steady phase of fermentation, so more carbon dioxide was carboxylated to oxaloacetic acid. The result showed that the concentration of vitamin B<sub>12</sub> was 176 mg/L, 19.7% higher than the control batch (147 mg/L) at 160 hours. **[Conclusion]** the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Pseudomonas denitrifican* was improved by increasing the fermenter pressure.

**Keywords:** *Pseudomonas denitrifican*, The pressure of fermenter, Carboxyl route, Synthesis rate

维生素 B<sub>12</sub> 又名钴胺素, 是一类带咕啉环的化合物, 具有重要的生物学活性, 作为辅酶参与分子内重排、核苷酸还原成脱氧核苷酸和甲基转移的反应, 临床上常用于治疗恶性贫血<sup>[1]</sup>。由于维生素 B<sub>12</sub> 的合成步骤繁多, 化学合成成本高, 只能通过发酵实现工业化生产<sup>[2]</sup>。目前主要通过利用费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)和谢氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*)的厌氧发酵以及利用脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)进行的好氧发酵进行维生素 B<sub>12</sub> 的工业生产<sup>[3]</sup>。近年来, 由于好氧菌发酵单位高于厌氧菌而得到广泛关注。

基于化学计量学的代谢途径通量分析(即常规 MFA)在微生物的代谢网络改造和发酵过程的优化控制方面起着重要的指导作用。代谢途径通量分布直接反映了生物体的生理状态, 是基因遗传、环境条件和代谢调控策略等因素综合作用的结果。研究细胞内代谢流对菌种的改造, 对发酵过程调控具有积极的指导意义<sup>[4]</sup>。近年来许多学者利用常规代谢流分析方法来指导发酵工艺的优化, 取得了显著的效果<sup>[5-9]</sup>, 但其在维生素 B<sub>12</sub> 上的应用少有报道。本文在合成培养基的基础上, 在 5 L 发酵罐对维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程两个不同阶段的代谢通量进行分析。根据代谢通量分析结果, 在 50 L 罐中对发酵工艺进行改进, 最后维生素 B<sub>12</sub> 的效价提高了近 20%, 代谢通量分析指导发酵过程调控取得了不错的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养基

菌株脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*), 由华东理工大学国家生物工程技术中心保存。

种子培养基和发酵培养基按文献[10]配制。

### 1.2 培养方法

摇瓶种子培养: 将保藏好的甘油管菌种, 接种于配制好的斜面, 置于 28 °C 恒温培养箱培养 48 h。以无菌水洗下斜面上的菌体, 制成菌悬液。取菌悬液 1 mL 接种至装量为 100 mL/500 mL 三角瓶的种子培养基中, 32 °C、260 r/min 培养至菌体光密度值(*OD*<sub>700</sub>)为 8-10。

5 L 发酵罐培养: 接种量 8%, 将 200 mL 摇瓶种子液接入装液量为 2.5 L 的 5 L 发酵罐中。

50 L 发酵罐培养: 将培养好的镜检无菌的种子液按 5% 接种量火焰保护接种到装有 25 L 培养基的 50 L 发酵罐中, 发酵罐为二级平叶搅拌桨, 温度 32 °C, 通气量 1 vvm, 罐压 0.05 MPa, 发酵过程中根据菌体生长、残糖以及甜菜碱残余情况来连续补加葡萄糖和甜菜碱。

### 1.3 实验装置

发酵培养装置[发酵罐和过程参数检测与控制系统 FUS-50L(A)]是由国家生化工程技术研究中心(上海)提供; 尾气过程质谱仪 MAX 300-LG 购于美国 Extrel 公司; pH 和溶氧(DO)电极为 METTIER TOLEDO 电极。

## 1.4 参数检测与分析方法

**1.4.1 细胞干重(DCW)、菌体光密度(OD)与维生素 B<sub>12</sub> 的测定:** 参照文献[10]。

**1.4.2 发酵液中有机的测定:** 参照文献[11]。

**1.4.3 尾气测定采用过程质谱法:** 发酵过程进气和排气中 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 浓度通过过程质谱仪 MAX-300 LG (Extrel, USA)测定, 将所获得的在线尾气数据通过生物过程软件“发酵之星”(华东理工大学)进行处理, 在线计算出 O<sub>2</sub> 消耗速率 OUR、CO<sub>2</sub> 释放速率 CER 和呼吸商 RQ。

## 1.5 基于化学计量学的代谢流通量分析(MFA)

代谢流通量分析的原理见文献[12], 为了降低代谢网络的复杂性, 本文基于以下原则建立了代谢网络: (1) 只考虑糖酵解、磷酸戊糖、三羧酸循环和氧化磷酸化等中心代谢途径和维生素 B<sub>12</sub> 的合成代谢途径; (2) 假设中间代谢物处于拟稳态, 除了生成菌体外, 有积累时直接分泌到胞外; (3) 生成的 NADPH、NADH 和 FADH 全部通过氧化磷酸化生成 ATP。根据代谢网络中的物质守恒原理写出符合该代谢网络的化学计量矩阵方程, 再通过测量胞外底物消耗速率和代谢物分泌速率, 最后可计算得出代谢网络的流量分布。

## 2 结果与分析

### 2.1 维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程的动力学分析

图 1 为维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程动力学参数。从图 1 中可以看出, 在 0–44 h 菌体处于生长期阶段, 表现为菌体干重(DCW)在短暂的迟滞期后迅速增大, OUR 和 CER 两个表现活菌体的生理状态参数也随着菌体的生长处于对数增加, 而维生素 B<sub>12</sub> 浓度没有什么变化, 基本为零。到 40 h 左右 OUR 和 CER 分别达到了 42 mmol/(L·h)和 44 mmol/(L·h)左右, 菌体浓度维持在 20 g/L 左右, 即已经达到稳定期; DO 在此期间迅速下降, 46 h 之后, DO 一直维持在低点 5% 左右, 在菌体稳定

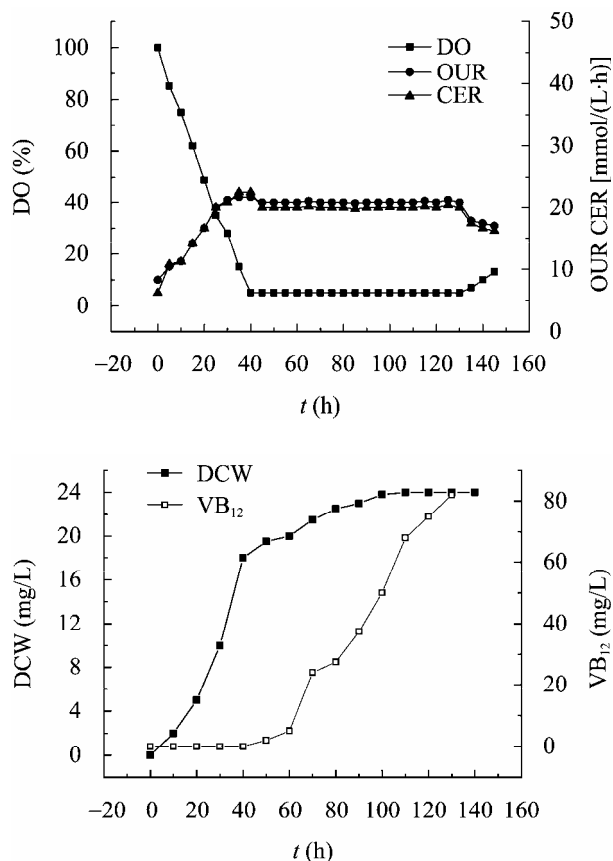


图 1 脱氮假单胞菌生产维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程动力学分析

Fig. 1 Parameter analysis of vitamin B<sub>12</sub> fermentation with *Pseudomonas denitrificans*

期 OUR 和 CER 一直保持在 36 mmol/(L·h)和 33 mmol/(L·h)左右, 此时维生素 B<sub>12</sub> 开始大量合成。

### 2.2 代谢通量结果分析

按照 2.1 参数分析, 可以了解维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程代谢特性, 掌握菌体生长以及产物合成的时间。在本文的常规代谢流通量分析中, 选择以下两个具有代表性的时间段进行代谢通量计算: 56–60 h 菌体处于稳定前期, 此时菌体刚刚开始产维生素 B<sub>12</sub>; 105–110 h 菌体处于稳定中期, 菌体产维生素 B<sub>12</sub> 的速率较大。图 2 为脱氮假单胞菌发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的代谢途径, 图中带方框的中间代谢物为菌体生长的前体物质。附录 1 是该代谢网络包含的代谢反应式, 附录 2 是从该代谢网络推导出的代谢方程组。代谢通

量平衡矩阵方程组中有 23 个未知数和 23 个方程, 因此方程有唯一解, 用 MATLAB 求解  $AX=b$  可以解出维生素 B<sub>12</sub> 合成前期与维生素 B<sub>12</sub> 合成中期两个不同时间段的代谢通量, 表 1 即为以上所述的两个具有代表性的时间段内的代谢通量分布。

从表 1 可以看出, 对于脱氮假单胞菌的维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段, 随着维生素 B<sub>12</sub> 合成速率的增加, 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化生成草酰乙酸(OAA)的通量明显加大, 由 55–60 h 的 8.2% 增大为 105–110 h 的 14.0%; 通过图 2 代谢网络可以看出, 5-氨基乙酰丙酸(ALA)是维生素 B<sub>12</sub> 合成的关键前体, 而 ALA 的合成有两种途径: 一种是由琥

珀酰辅酶 A 和甘氨酸通过 5-氨基乙酰丙酸合酶反应生成 5-氨基乙酰丙酸(称为“C4 途径”); 另一种途径是由谷氨酸的完整碳骨架开始, 首先是 tRNA 与谷氨酸相连形成谷氨酸-tRNA, 再被谷氨酸-tRNA 还原酶还原形成谷氨酸-半醛, 然后通过分子内的转移作用, 醛基和氨基互换, 氨基从谷氨酸-半醛的 C-2 转移到 C-1 上, 从而形成 5-氨基乙酰丙酸(称为“C5 途径”)<sup>[13]</sup>。这两种途径的启动都需要 TCA 循环中的碳骨架, 于是推测, 当脱氮假单胞菌发酵过程进入维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段后, 随着维生素 B<sub>12</sub> 合成速率的增加, 客

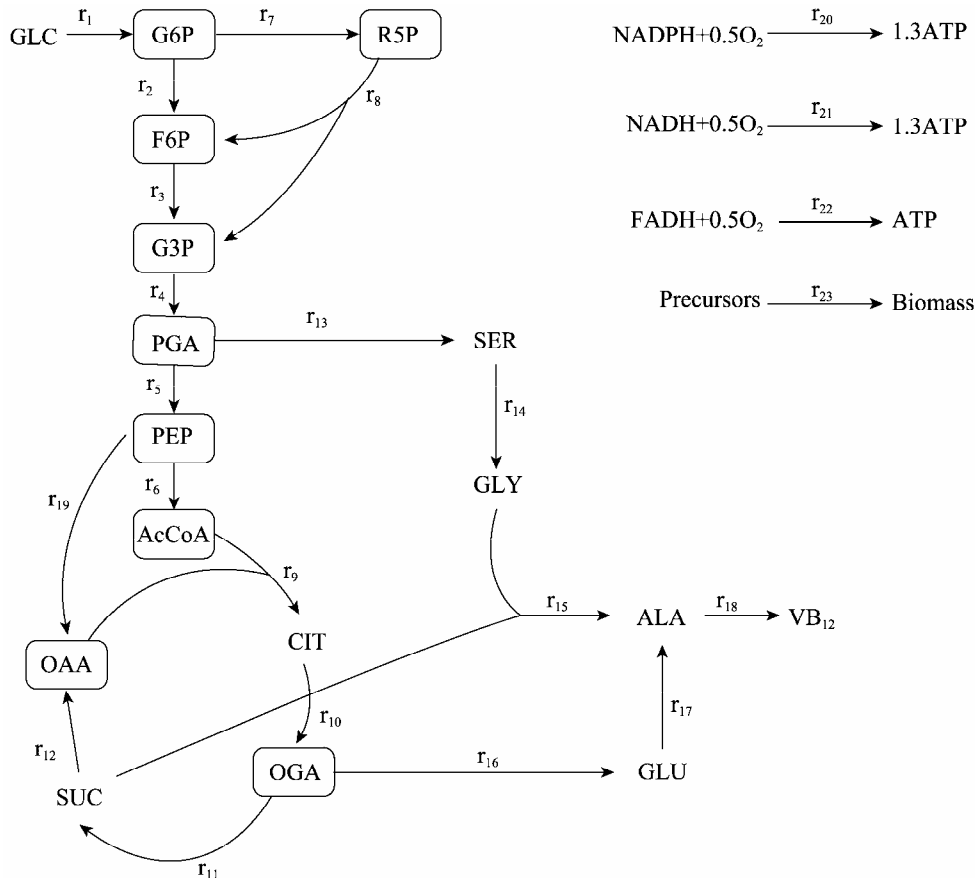


图 2 脱氮假单胞菌生产维生素 B<sub>12</sub> 的代谢途径

Fig. 2 The metabolic route during vitamin B<sub>12</sub> production with *Pseudomonas denitrificans*

Note: GLC: Glucose; G6P: Glucose-6-phosphate; F6P: Fructose-6-phosphate; G3P: Glycerinaldehydes-3-phosphate; PGA: 3-Phospho-d-glycerate; PEP: Phospho-enol-pyruvate; R5P: Ribose-5-phosphate; AcCoA: Acetyl-coenzyme-A; CIT: Citric acid; OGA: 2-Oxoglutaric acid; SUC: Succinate; OAA: Oxaloacetate; SER: Serine; Gly: Glycine; GLU: Glutamate; ALA:  $\delta$ -aminolevulinic acid; VB<sub>12</sub>: Vitamin B<sub>12</sub>.

表 1 脱氮假单胞菌生产维生素 B<sub>12</sub> 的两个时间段的代谢通量分布

Table 1 The metabolic flux distributions of vitamin B<sub>12</sub> production with *Pseudomonas denitrificans* at two different phases (%)

Reaction	56–60 h	105–110 h
r <sub>1</sub>	100.0	100.0
r <sub>2</sub>	84.3	68.8
r <sub>3</sub>	94.7	89.7
r <sub>4</sub>	194.6	189.7
r <sub>5</sub>	194.4	189.4
r <sub>6</sub>	185.9	175.4
r <sub>7</sub>	15.7	31.2
r <sub>8</sub>	15.6	31.2
r <sub>9</sub>	185.7	175.4
r <sub>10</sub>	185.7	175.4
r <sub>11</sub>	177.7	161.7
r <sub>12</sub>	177.6	161.4
r <sub>13</sub>	0.1	0.3
r <sub>14</sub>	0.1	0.3
r <sub>15</sub>	0.1	0.3
r <sub>16</sub>	7.9	13.7
r <sub>17</sub>	7.9	13.7
r <sub>18</sub>	1.0	1.75
r <sub>19</sub>	8.2	14.0
r <sub>20</sub>	182.0	175.1
r <sub>21</sub>	736.0	688.2
r <sub>22</sub>	177.7	161.7
r <sub>23</sub>	3.0	0

观上要求 TCA 循环中更多的碳元素流入 5-氨基乙酰丙酸(ALA), 于是 TCA 循环过程中的四碳单位供给平衡不断被打破, 最终通过 PEP 羧化生成 OAA 的四碳回补途径通量增加以满足 TCA 循环达到新的平衡状态。

### 2.3 在 50 L 发酵罐中加大罐压以增大维生素 B<sub>12</sub> 的产量

根据 2.2 节代谢流分析结论, 我们断定在脱氮假单胞菌发酵过程进入维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段, PEP 羧化生成 OAA 的四碳回补途径是一个关键

调控点。由于羧化途径需要大量的二氧化碳参与固定化反应, 因此在 50 L 罐中将发酵工艺进行如下改进: 在脱氮假单胞菌发酵产维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段, 通过提高罐压来加大发酵液中二氧化碳的溶解浓度, 同时保持发酵过程中其他关键参数不变, 考察仅增加发酵液中二氧化碳的浓度对维生素 B<sub>12</sub> 效价的影响。

发酵过程中改进的控制策略为: 在脱氮假单胞菌进入维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段 40–45 h 时将罐压由 0.05 MP 增加到 0.1 MP。当罐压增加时, 发酵液的 pH 会迅速降低 0.30–0.35。同时尾气中二氧化碳浓度 ECO<sub>2</sub> 明显增加, 如图 3A 所示, 调整策略情况下尾气中的二氧化碳浓度在菌体的快速合成期为 1.75%, 比原工艺的 1.5 倍还多, 这说明优化工艺中发酵液中溶解的二氧化碳的浓度增加; 该生产菌为高耗氧菌, 其对氧的消耗大大增加, 而现有的设备条件无法增大供氧, 因此发酵过程中一直处于氧限制状态, 如图 3B 所示, 此时环境参数溶氧浓度(DO)已经不能再真实地反应发酵过程的代谢状态变化, 而菌体的摄氧速率(OUR)几乎等于发酵液中的氧传递速率 OTR, 此时如果增大供氧, 菌体会立即耗氧进行生长, 表现在 OUR 的迅速改变, 因此 OUR 是发酵过程中活细胞的一个重要生理状态参数。为了能够与原工艺进行对比, 我们通过改变搅拌转速来调节供氧, 从而实现优化工艺与原工艺在发酵过程中维持比较接近的 OUR 和菌浓度(图 3B)。连续三批的实验结果表明, 维生素 B<sub>12</sub> 的产率明显增加, 发酵 160 h 的产物浓度平均为 176 mg/L, 比对照批次终浓度 147 mg/L 高出了 19.7%, 可见利用该控制策略对提高维生素 B<sub>12</sub> 发酵产量非常有效, 如图 3C 所示。

## 3 结论

本文在 5 L 发酵罐中, 对发酵过程中两个不

同时间段 56–60 h、105–110 h 进行了常规代谢流分析, 结果发现在脱氮假单胞菌发酵过程进入维生素 B<sub>12</sub> 合成阶段, 随着维生素 B<sub>12</sub> 合成速率的增加, PEP 羧化生成 OAA 的通量也增加。我们推测,

随着维生素 B<sub>12</sub> 合成速率的增加, 客观上要求 TCA 循环中更多的碳元素流入 5-氨基乙酰丙酸 (ALA), 于是 TCA 循环过程中的四碳单位供给平衡不断被打破, 最终通过 PEP 羧化生成 OAA 的

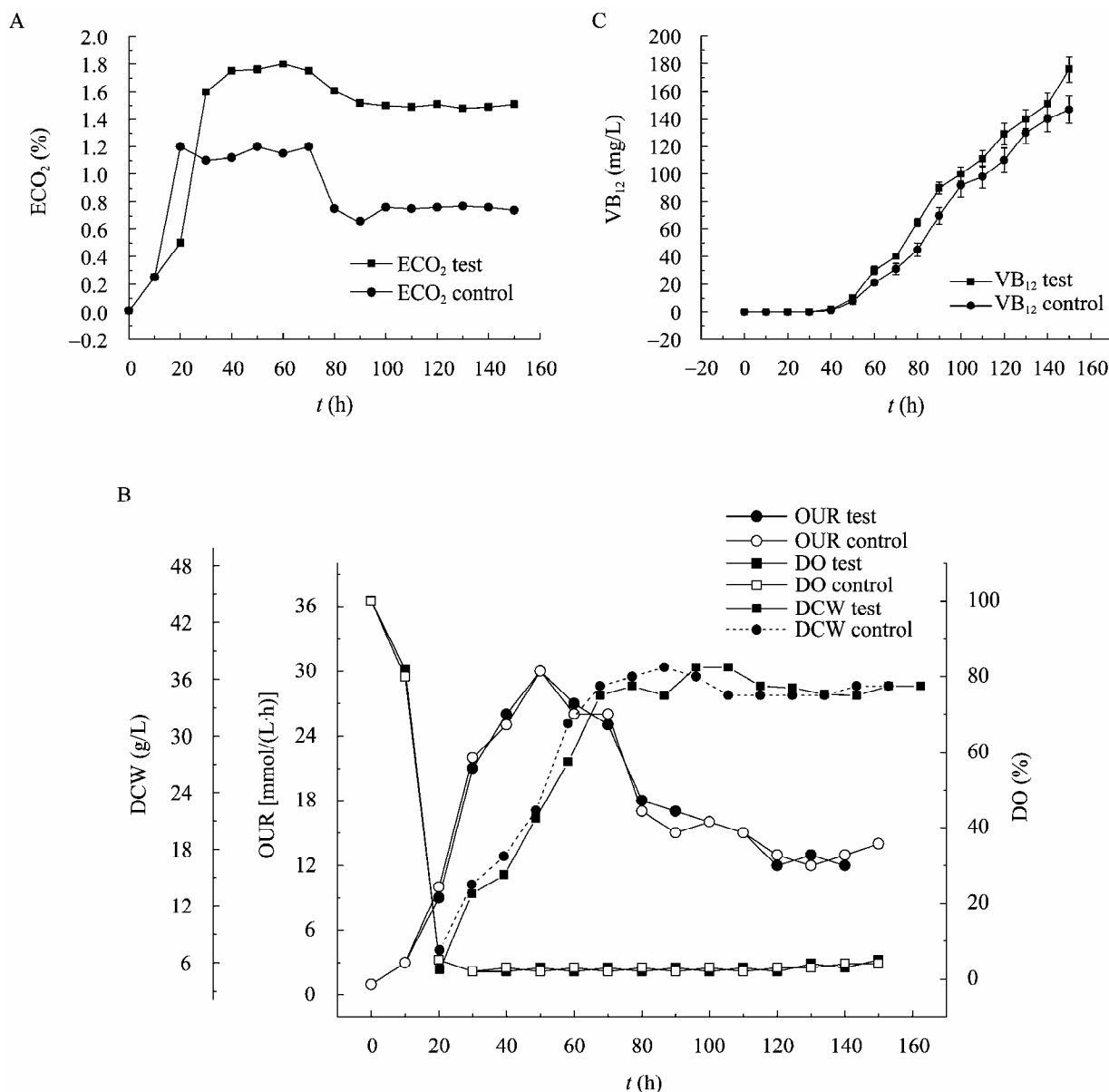


图3 优化前后维生素 B<sub>12</sub> 发酵过程各参数的比较

Fig. 3 Comparison of vitamin B<sub>12</sub> fermentation between optimal strategy and normal condition

注: A: 排气二氧化碳浓度; B: 耗氧率、溶氧和菌体浓度; C: 维生素 B<sub>12</sub> 浓度。

Note: A: The carbon dioxide concentration in off-gas  $ECO_2$ ; B: Oxygen uptake rate OUR, The dissolved oxygen cells concentration DO and Biomass concentration OD; C: Vitamin B<sub>12</sub> concentration.

四碳回补途径通量增加, 以满足 TCA 循环达到新的平衡状态。针对以上代谢通量分析, 我们在 50 L 罐中将发酵工艺进行如下改进: 当菌体生长进入稳定期, 通过提高罐压来加大发酵液中二氧

化碳的溶解浓度, 保持发酵过程中其他关键参数不变, 最后维生素 B<sub>12</sub> 的效价提高了近 20%。实验结果表明, 代谢通量分析方法指导发酵过程调控取得了不错的效果。

附录 1 脱氮假单胞菌生产维生素 B<sub>12</sub> 代谢网络中的化学计量反应  
Appendix 1 Metabolic reactions of Vitamin B<sub>12</sub> production with *Pseudomonas denitrificans*

No.	Reaction equation
r1	GLC + ATP → G6P
r2	G6P → F6P
r3	F6P + ATP → G3P + G3P
r4	G3P → PGA + NADH + ATP
r5	PGA → PEP
r6	PEP → AcCoA + CO <sub>2</sub> + NADH + ATP
r7	G6P → R5P + CO <sub>2</sub> + NADPH
r8	R5P → 2/3 F6P + 1/3 G3P
r9	OAA + AcCoA → CIT
r10	CIT → OGA + CO <sub>2</sub> + NADPH
r11	OGA → SUC + CO <sub>2</sub> + NADH + FADH + ATP
r12	SUC → OAA + NADH
r13	PGA + NADPH → SER
r14	SER → GLY
r15	GLY + SUC → ALA + CO <sub>2</sub>
r16	OGA + NADPH → GLU
r17	GLU → ALA
r18	8 ALA + 10 NADPH + 17 ATP → VB <sub>12</sub>
r19	PEP + CO <sub>2</sub> → OAA
r20	NADPH + 0.5 O <sub>2</sub> → 1.3 ATP
r21	NADH + 0.5 O <sub>2</sub> → 1.3 ATP
r22	FADH + 0.5 O <sub>2</sub> → ATP
r23	0.004 2 G6P + 0.005 1 F6P + 0.005 2 G3P + 0.037 7 PGA + 0.086 4 PEP + 0.057 6 AcCoA + 0.030 3 R5P + 0.028 9 OGA + 0.051 9 OAA + 0.441 0 NADPH → Biomass + 0.054 7 CO <sub>2</sub> + 0.097 1 NADH

附录 2 代谢通量平衡矩阵方程组[单位: mmol/(g·h)]

Appendix 2 Metabolic stoichiometric equations in *Pseudomonas denitrificans* [Unit: mmol/(g·h)]

No.	Metabolite	Balanced equation
1	Glc	$r_1 = -r_{\text{glc}}$
2	G6P	$r_1 - r_2 - r_7 - 0.004 2 r_{23} = 0$
3	F6P	$r_2 - r_3 + 0.67 r_8 - 0.005 1 r_{23} = 0$
4	G3P	$2 r_3 + 0.33 r_8 - r_4 - 0.005 2 r_{23} = 0$
5	PGA	$r_4 - r_5 - r_{13} - 0.037 7 r_{23} = 0$
6	PEP	$r_5 - r_6 - r_{19} - 0.086 4 r_{23} = 0$
7	AcCoA	$r_6 - r_9 - 0.057 6 r_{23} = 0$
8	R5P	$r_7 - r_8 - 0.030 3 r_{23} = 0$
9	CIT	$r_9 - r_{10} = 0$
10	OGA	$r_{10} - r_{11} - r_{16} - 0.028 9 r_{23} = 0$
11	SUC	$r_{11} - r_{12} - r_{15} = 0$
12	OAA	$-r_9 + r_{12} + r_{19} - 0.051 9 r_{23} = 0$
13	SER	$r_{13} - r_{14} = 0$
14	GLY	$r_{14} - r_{15} = 0$
15	GLU	$r_{16} - r_{17} = 0$
16	ALA	$r_{15} + r_{17} - 8r_{18} = 0$
17	VB <sub>12</sub>	$r_{18} = r_{\text{vb}_{12}}$
18	CO <sub>2</sub>	$r_6 + r_7 + r_{10} + r_{11} + r_{15} - r_{19} + 0.054 7 r_{23} = r_{\text{CO}_2}$
19	NADPH	$r_7 + r_{10} - r_{13} - r_{16} - 10r_{18} - r_{20} - 0.441 r_{23} = 0$
20	NADH	$r_4 + r_6 + r_{11} + r_{12} - r_{21} + 0.097 1 r_{23} = 0$
21	FADH	$r_{11} - r_{22} = 0$
22	O <sub>2</sub>	$r_{20} + r_{21} + r_{22} = -2 r_{\text{O}_2}$
23	Biomass	$r_{23} = r_{\text{Biomass}}$

## 参 考 文 献

- [1] 罗伟, 郝常明. 维生素 B<sub>12</sub> 的研究及其进展[J]. 中国食品添加剂, 2002(3): 15-18.
- [2] Warren MJ. Finding the final pieces of the vitamin B<sub>12</sub> biosynthetic jigsaw[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(13): 4799-4800.
- [3] Scott AI. Discovering nature's diverse pathways to vitamin B<sub>12</sub>: a 35-year odyssey[J]. Journal of Organic Chemistry, 2003, 68(7): 2529-2539.
- [4] Shimizu H. Metabolic engineering—Integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(6): 563-573.
- [5] 吴祖芳, 堵国成, 陈坚. 从代谢流量分析角度探讨培养条件改变下对放射型根瘤菌 WSH2601 合成辅酶 Q<sub>10</sub> 的影响[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 231-235.
- [6] 白亚磊, 徐庆阳, 谢希贤, 等. 溶氧控制对黄色短杆菌 YILW 合成 L-异亮氨酸的影响[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(1): 5-9.
- [7] Cai GQ, Jin B, Monis P, et al. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(4): 375-387.
- [8] 李智涛, 卢志洪, 吕扬勇, 等. 谷氨酸棒杆菌 S9114 在不同溶氧条件下发酵生产谷氨酸的代谢



- 流分析[J]. 中国酿造, 2010(10): 72-76.
- [9] Niu K, Zhang X, Tan WS, et al. Effect of culture conditions on producing and uptake hydrogen flux of biohydrogen fermentation by metabolic flux analysis method[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(15): 7294-7300.
- [10] 赵琳琳, 王泽建, 刘玉伟, 等. 甜菜碱对脱氮假单胞菌发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的影响及其过程控制[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2011, 37(5): 28-32.
- [11] 李友元, 陈长华, 陶萍. 高效液相色谱法测定螺旋霉素发酵液中的有机酸[J]. 色谱, 2002, 20(1): 46-48.
- [12] 黄明志, 蔡显鹏, 陈双喜, 等. 鸟苷发酵过程的定量和优化: 抑制 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>离子积累提高了苷产量 70%[J]. 生物工程学报, 2003, 19(2): 200-205.
- [13] Piao YZ, Yamashita M, Kawaraichi N, et al. Production of vitamin B<sub>12</sub> in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98(3): 167-173.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 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

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

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

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413