

过表达 *hom* 基因对谷氨酸棒杆菌发酵 L-异亮氨酸的影响

徐庆阳, 孙家凯, 谢希贤, 陈 宁

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中 *hom* 基因编码的高丝氨酸脱水酶为 L-异亮氨酸合成过程的关键酶,本研究通过在 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW 中过表达高丝氨酸脱水酶,考察过表达高丝氨酸脱水酶对发酵 L-异亮氨酸产量的影响.以 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW 基因组为模板克隆 *hom* 基因,将 *hom* 基因与表达载体 pXMJ19 连接构建出重组质粒 pXMJ19-*hom*,再转入 *C. glutamicum* YILW 构建 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*).通过 5 L 罐发酵研究重组质粒对工程菌的生长、耗糖、L-异亮氨酸产量及副产物积累等方面的影响.结果显示,重组酶的表达使菌株对 L-苏氨酸的抗反馈抑制作用得到加强.最终 L-异亮氨酸和 L-蛋氨酸积累量分别为 36.5 g/L 和 2.8 g/L,分别较出发菌株提高 7%和 33%,同时 L-赖氨酸合成量仅为 2.1 g/L,较出发菌株降低了 63.8%.

关键词: L-异亮氨酸; 高丝氨酸脱水酶; 过表达; 谷氨酸棒杆菌

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2012)05-0001-06

Effects of Overexpression of Homoserine Dehydratase on L-Isoleucine Production in *Corynebacterium glutamicum*

XU Qingyang, SUN Jiakai, XIE Xixian, CHEN Ning

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Homoserine dehydratase, a key enzyme of L-isoleucine synthesis process, is encoded by the *hom* gene in *Corynebacterium glutamicum*. The effect of overexpressed homoserine dehydratase in *C. glutamicum* YILW on the production of L-isoleucine was studied. The *hom* gene was PCR amplified using *C. glutamicum* YILW genomic DNA as template and then inserted into a multicopy plasmid pXMJ19 to construct a recombined expression plasmid pXMJ19-*hom*. The recombined plasmid was then transformed into *C. glutamicum* YILW to construct recombined *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*). The effects of pXMJ19-*hom* on cell growth, glucose consumption rate, yield of L-isoleucine and accumulation of byproducts were investigated by using 5 L batch fermentation. Enzyme studies showed that the recombined homoserine dehydratase expressed in *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) strain was much less sensitive to threonine inhibition. Compared with the original strain, the yields of L-isoleucine and L-methionine by using *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) were 36.5 g/L and 2.8 g/L, which indicated on increase of 7% and 33% respectively, but the yield of L-lysine was only 2.1 g/L, decreased by 63.8%.

Key words: L-isoleucine; homoserine dehydratase; overexpression; *C. glutamicum*

L-异亮氨酸(L-isoleucine)属于分支链氨基酸,是人体必需的八种氨基酸之一,具有多种生理功能,广泛应用于医药、食品及其调味剂、动物饲料、化妆品的制造,尤其是在医学研究和治疗中有十分重要的

作用^[1].目前,利用微生物生产 L-异亮氨酸的方法主要为直接发酵法,L-异亮氨酸产生菌大多由谷氨酸棒杆菌、乳糖发酵短杆菌及大肠杆菌选育而来^[2].工业化生产中广泛应用的 L-异亮氨酸高产菌多为经过

收稿日期: 2012-03-06; 修回日期: 2012-04-07

基金项目: 国家发改委高技术产业化专项项目

作者简介: 徐庆阳(1980—),男,安徽萧县人,助理研究员;通信作者: 陈 宁,教授,ningch@tust.edu.cn.

传统诱变育种获得的谷氨酸棒杆菌,但其副生杂酸比较多,尤其是赖氨酸、丙氨酸等,加大了后期提取获得高纯度 L-异亮氨酸的难度^[3]。

高丝氨酸脱水酶 (homoserine dehydrogenase, EC1.1.1.3) 是谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中 L-异亮氨酸的合成途径中的关键酶之一,由 *hom* 基因编码,受苏氨酸的反馈抑制和蛋氨酸的反馈阻遏。在 L-异亮氨酸生物合成过程中,天冬氨酸半醛是合成赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸的共同代谢中间体,在谷氨酸棒杆菌中 L-蛋氨酸和 L-异亮氨酸均不同程度地阻遏 *hom-thrB* 操纵子的转录,阻断天冬氨酸半醛进入 L-异亮氨酸生物合成途径,从而在一定程度上促进了赖氨酸的生物合成^[4]。通过过表达关键酶解除其反馈抑制可以提高目的产物的代谢流量,减少中间产物的积累及副产物形成^[5]。

前期实验中,史建明等^[6]通过在 *C. glutamicum* YILW 中过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶使得 L-异亮氨酸产量增加了 10.3%,达到 32 g/L,副产物 L-蛋氨酸及 L-赖氨酸积累均有一定程度下降;在前期实验基础上,本文通过在 *C. glutamicum* YILW 中过量表达解除反馈抑制的高丝氨酸脱水酶,考察其对 L-异亮氨酸产量及副产物积累等方面的影响,为进一步构建 L-异亮氨酸高产菌奠定了实验及理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* ATCC13032, L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW (α -氨基- β -羟基戊酸抗性),大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19 (氯霉素抗性),均保存于天津科技大学代谢工程研究室。

1.2 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶, TaKaRa 公司; PCR 引物, 华大基因有限公司; 1 kbp DNA marker, Fermentas 公司; DNA 片胶回收试剂盒、基因组 DNA 的提取试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒, 北京博大泰克生物公司; 氯霉素, 北京索莱宝公司; 蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司; 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为国产分析纯。

JY92-IIN 型细胞超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; PTC-1148 型 PCR 仪, 美国 BIO-

RAD 公司。

1.3 培养基

LB 培养基、种子培养基及发酵培养基, 见参考文献[7]。

1.4 方法

1.4.1 pXMJ19-*hom* 表达载体的构建

以 *C. glutamicum* YILW 染色体 DNA 为模板, 使用 P₁ (5'-CGGCTAGAGCTCGTTCAATTGCCATGT CAGT-3', 划线处为 *Sac* I 酶切位点) 和 P₂ (5'-GCGCCGATCTAGAGTAATAGGACAACAACGC TC-3', 划线处为 *Xba* I 酶切位点) 为引物 PCR 扩增出高丝氨酸脱水酶编码基因 *hom*。使用 *Sac* I 和 *Xba* I 对 PCR 产物及质粒 pXMJ19 进行双酶切, 连接产物化学转化法转入 *E. coli* DH5 α , 在终浓度为 25 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养。用引物 P₃ (5'-GACA ATTAATCATCGGCTCG-3')、P₄ (5'-CAGGCTGAAA ATCTTCTCTC-3') 鉴定长出的转化子, 挑选阳性克隆, 双酶切验证, 测序。

将测序验证正确的重组质粒 pXMJ19-*hom* 和对照质粒 pXMJ19 分别电转法转化 *C. glutamicum* YILW 感受态细胞 (*C. glutamicum* 感受态细胞的制备与电转化方法见文献[8]), 用含有氯霉素的 LB 平板进行筛选并用引物 P₃、P₄ 鉴定阳性转化子, 所得阳性转化子即为工程菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*), 保存菌株。

1.4.2 SDS-PAGE 分析

分别挑取含有 pXMJ19 和 pXMJ19-*hom* 质粒的谷氨酸棒杆菌单菌落接种到含氯霉素抗性的 LB 液体培养基中, 32 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h 后, 以 1% 接种量转接至新鲜 LB 摇瓶培养基中, 继续培养至吸光度为 0.6 ~ 0.8, 加 IPTG (终浓度 0.1 mmol/L) 诱导 4 h 后取适量菌液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析^[9]。采用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白分离, 以 *C. glutamicum* ATCC13032 作为对照, 比较 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 空质粒对照与 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) 重组质粒蛋白表达情况。

1.4.3 酶活性分析方法

通过测定受氢体为 2, 3, 5-氯化三苯基四唑 (TTC) 的脱氢酶活性来反映高丝氨酸脱水酶活性, 酶活性具体测定方法及酶活力单位定义见文献[10]。每 1 mL 粗酶液 1 h 产生 1 μ g 三苯基甲腈 (TF) 的量作为一个酶活力单位 1 U。

L-苏氨酸对重组酶活性反馈抑制的测定: 在反

应体系中加入不同浓度的 L-苏氨酸,按标准酶活测定方法测定酶活。

1.4.4 其他分析方法

菌体生物量的测定方法见文献[11]。

氨基酸含量的测定^[12-13]: L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸及 L-缬氨酸含量采用高效液相分析系统测定,色谱分离条件: Agilent C₁₈(15 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 2, 4-二硝基氟苯柱前衍生测定,乙腈与 NaAc 溶液进行梯度洗脱,柱温 33 °C,流动相流量 1 mL/min,检测波长 360 nm。

2 结果与分析

2.1 构建 pXMJ19-*hom* 表达质粒

以 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW 基因组 DNA 为模板克隆 *hom* 基因片段,将纯化后的 PCR 产物双酶切后连接到表达载体 pXMJ19 上,构建出重组质粒 pXMJ19-*hom*(图 1)。分别进行 *Xba* I 单酶切及 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切验证,结果如图 2 所示。

重组质粒 pXMJ19-*hom* 单酶切后得到一条大小约为 8 000 bp 的特异性条带;双酶切后在约 6 600 bp 和 1 400 bp 处观察到目的条带,分别为酶切后的 pXMJ19 载体与 *hom* 基因。结合测序结果表明重组质粒构建成功。

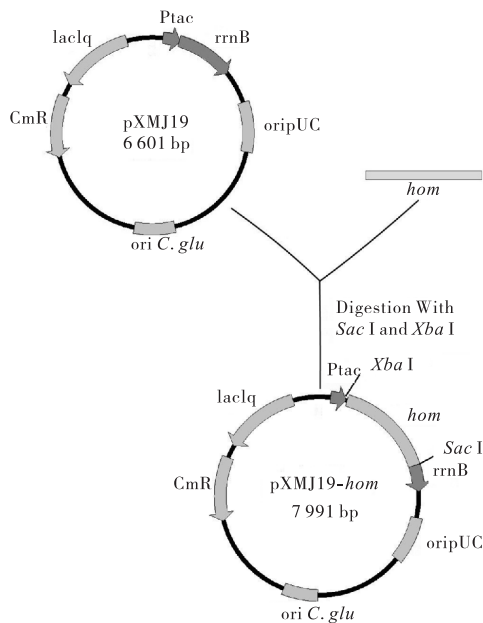
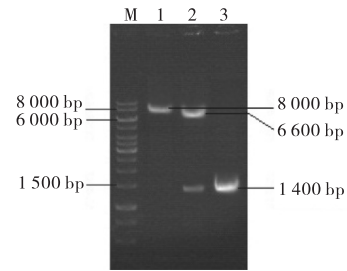


图 1 pXMJ19-*hom* 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pXMJ19-*hom*



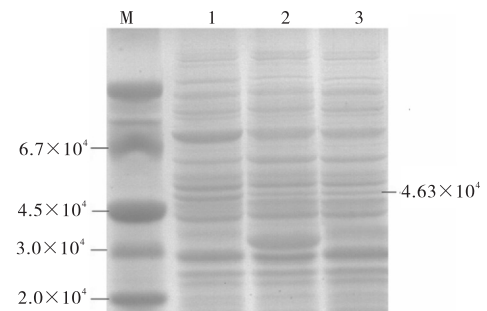
M. 1 kbp DNA marker; 1. pXMJ19-*hom* digested by *Xba* I; 2. pXMJ19-*hom* digested by *Xba* I and *Sac* I; 3. PCR product of *hom* gene

图 2 重组质粒 pXMJ19-*hom* 的酶切验证

Fig. 2 Restriction digest confirmation of recombinant plasmid pXMJ19-*hom*

2.2 重组质粒的诱导表达

以 *C. glutamicum* ATCC13032 为对照,比较重组菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) 及 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 的蛋白表达情况。超声破碎菌体后,收集上清液,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,结果如图 3 所示。



M. protein marker; 1. *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*); 2. *C. glutamicum* ATCC13032; 3. *C. glutamicum* YILW (pXMJ19).

图 3 粗酶液 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of crude cell extracts

高丝氨酸脱水酶的相对分子质量为 4.63×10^4 ; 可以看出 3 种菌株在相对分子质量约为 4.63×10^4 处均有特异性条带,但蛋白表达量有一定差异(蛋白上样量一致),*C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 与 *C. glutamicum* ATCC13032 的蛋白表达量差别不大,这可能是由于 ATCC 标准菌株和宿主菌中高丝氨酸脱水酶的表达量本身就比较少;但重组菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) 蛋白表达量明显较前两者增多,证明表达载体 pXMJ19-*hom* 构建成功,并且高丝氨酸脱水酶得到过量表达。

2.3 L-苏氨酸对重组酶的反馈抑制作用

将 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*) 和 *C. glutamicum* ATCC13032 分别培养至对数中期,收集细

胞,超声波破碎后,离心取上清液检测高丝氨酸脱水酶活性. 反应体系中加入不同浓度的 L-苏氨酸后,再分别加入适量的重组酶及野生型酶,按标准酶活测定方法测定酶活,结果如图 4 所示. 可以看出,在未添加 L-苏氨酸时,野生型酶与重组酶的活性分别为 0.21 U 和 0.45 U,与对照菌相比,带有质粒 pXMJ19-hom 的 *C. glutamicum* YILW 高丝氨酸脱水酶酶活性提高了 2.1 倍,此结果表明,高丝氨酸脱水酶基因能在 *C. glutamicum* YILW 中有效表达. 此外,随着 L-苏氨酸浓度的增加,酶活力均出现明显下降的现象,尤其是野生型酶,当 L-苏氨酸浓度达到 14 mmol/L 时,其酶活力完全丧失,而此时重组酶仍具有一定的活性,大约为 0.09 U;当 L-苏氨酸浓度进一步增加时,重组酶活力丧失速率明显减缓,当 L-苏氨酸浓度达到 16 mmol/L 时,重组酶仍维持 0.07 U 的活性. 可以看出,与标准菌相比,重组菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-hom) 对 L-苏氨酸的抗反馈抑制作用得到有效加强,这可能是由于 *C. glutamicum* YILW 具有 α -氨基- β -羟基戊酸(AHV)抗性,AHV 是苏氨酸的结构类似物,从而在一定程度上解除了苏氨酸对高丝氨酸脱氢酶的反馈抑制,因而过表达 *hom* 基因可强化重组菌对 L-苏氨酸的抗反馈抑制作用.

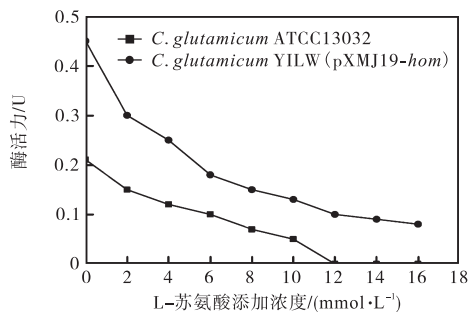


图 4 L-苏氨酸浓度对重组酶与野生型酶活力的影响
Fig. 4 Effects of L-threonine concentration on the activities of recombinant and native homoserine dehydratases

2.4 重组质粒对菌体生长和耗糖的影响

将 *C. glutamicum* YILW、*C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 和 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-hom) 这 3 株菌进行 5 L 发酵罐分批补料发酵 68 h,每隔 4 h 测定生物量及比耗糖速率等参数,结果如图 5 所示.

C. glutamicum YILW 菌体的延滞期最短,10 h 后即进入对数生长期,且具有相对较高的比生长速率,菌体生长 34 h 左右进入稳定期,至发酵结束时最大生物量可达 32.5 g/L. 而 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 菌体延滞期相对较长,且进入对数生长期

后维持较低的比生长速率,菌体最大生物量为 30.1 g/L,较前者低 7.3%,说明空质粒 pXMJ19 对 *C. glutamicum* YILW 的生长有一定滞后作用,但是影响作用较小;而 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-hom) 菌体延滞期最长,并且进入对数生长期后最大比生长速率也较小,发酵结束时菌体的最大生物量仅为 28.4 g/L,分别较前两者低 12.6%和 5.6%. 这可能是由于重组质粒 pXMJ19-hom 复制和表达增加了菌体的代谢负担,从而导致菌体的生物量降低.

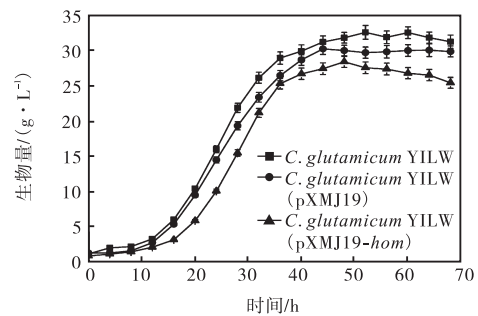


图 5 重组质粒对菌体生物量的影响
Fig. 5 Effects of recombinant plasmid on biomass

就耗糖速率而言,如图 6 所示,在一定范围内菌体生物量与耗糖速率成正比.

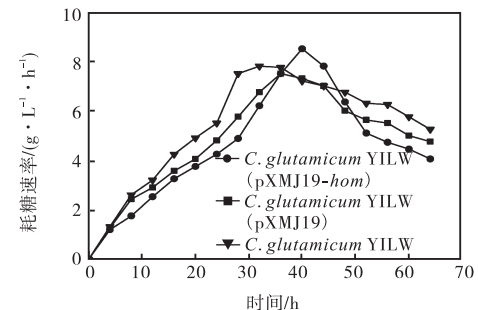


图 6 重组质粒对菌体耗糖速率的影响
Fig. 6 Effects of recombinant plasmid on sugar consumption rate

当菌体进入衰退期后,耗糖速率均明显下降. *C. glutamicum* YILW 在整个发酵过程中具有较高的耗糖速率,其最大耗糖速率为 7.8 g/(L·h),且在发酵后期仍能维持较高的耗糖速率. 而重组菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-hom) 和 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19) 耗糖速率明显较 *C. glutamicum* YILW 缓慢,且两者在整个发酵过程中耗糖趋势相似,但前者在发酵中后期耗糖速率明显加快,在 40 h 左右达到最大耗糖速率 8.5 g/(L·h),这可能是由于中后期外源基因的表达使菌体能耗增加,耗糖速率快速增加,而在发酵后期耗糖速率快速下降,说明在发酵

后期菌体衰退较快;此外, *C. glutamicum* YILW (pXMJ19)最大耗糖速率仅为 7.5 g/(L·h),且在发酵后期也有一定程度的衰退.这说明外源质粒的加入对菌体的生长和耗糖均有一定的不利影响,同时重组菌容易发生衰退现象.

2.5 重组酶对 L-异亮氨酸发酵的影响

不同菌株发酵生产 L-异亮氨酸过程中 L-异亮氨酸及副产物积累差异情况如图 7 所示.

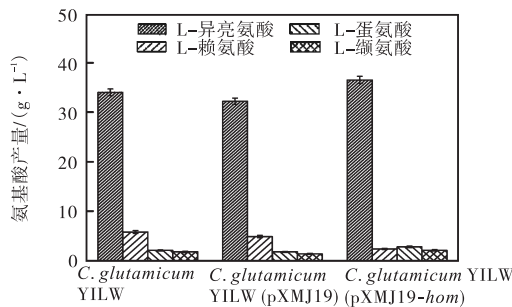


图 7 不同菌株发酵生产氨基酸的产量

Fig. 7 Yield of amino acid fermentation by different strains

由图 7 可知,出发菌株 *C. glutamicum* YILW 可积累 L-异亮氨酸 34.1 g/L, L-赖氨酸 5.8 g/L, L-蛋氨酸也有一定程度的积累.而 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19)的 3 种氨基酸产量均有下降,其中 L-异亮氨酸及 L-赖氨酸产量分别为 32.2 g/L 和 5.3 g/L,分别较出发菌株下降 5.6%和 8.6%,表明空质粒的转入对于菌体合成氨基酸有一定的影响,这可能是由于菌体代谢负担加重的原故.此外,重组菌 *C. glutamicum* YILW (pXMJ19-*hom*)除 L-赖氨酸积累有明显下降外,其余氨基酸积累量均有明显增加.其中 L-异亮氨酸和 L-蛋氨酸积累量分别为 36.5 g/L 和 2.8 g/L,分别较出发菌株提高 7%和 33%,而 L-赖氨酸积累量仅为 2.1 g/L,较出发菌株降低了 63.8%.此外, L-缬氨酸的积累量基本没有变化.可以看出,通过在 *C. glutamicum* YILW 过表达高丝氨酸脱水酶成功强化了苏氨酸生物合成途径的代谢流,在一定程度上相对弱化了 L-赖氨酸的生物合成,降低了 L-赖氨酸积累量,使 L-异亮氨酸的积累得到相对提高.

3 讨论

本研究使用的 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW 为经过传统诱变育种获得的谷氨酸棒杆菌,其发酵过程中积累赖氨酸比较多,从而使葡萄糖对 L-异亮氨酸的转化率降低,也不利于后期提取获得高纯

度 L-异亮氨酸.若进一步经过传统诱变方法选育赖氨酸缺陷型菌株会产生大量次级突变,造成菌体生长缓慢等弱点^[14],这是目前工业生产中难以解决的问题之一.随着分子生物学和基因工程技术的兴起,基因敲除、基因重组等技术的成熟, L-异亮氨酸高产工程菌的构建也越来越受到重视.

本研究发现,在 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW 中过表达高丝氨酸脱水酶可以明显降低副产物赖氨酸的积累量,但 L-异亮氨酸产量却没有得到有效提高,这可能是因为 L-异亮氨酸生物合成途径较长,高丝氨酸脱水酶的过表达同时增加了分支代谢途径的流量(L-蛋氨酸积累量提高 33%).大量研究表明,代谢流的控制分布在多个酶上,在任何情况下解除单个酶的反馈抑制作用是有限的^[15]. Sahm 等^[16]通过扩增对反馈调节不敏感的高丝氨酸激酶及苏氨酸脱水酶基因,获得谷氨酸棒杆菌的 L-异亮氨酸高产菌株,产量可达 30 g/L,而在本实验中优化过后的菌株产量为 36.5 g/L.如果利用基因工程技术将 L-异亮氨酸生物合成途径中的其他关键酶基因如高丝氨酸激酶、苏氨酸脱水酶及乙酰乳酸合成酶的基因等进行串联表达,或者通过强化关键酶的启动子以及敲除代谢支路等途径使得碳、氮源以及能量代谢流尽可能多地进入中心代谢途径,就可以进一步强化 L-异亮氨酸合成代谢途径.

参考文献:

- [1] 宋文军,陈宁,魏春,等.基于代谢流导向与分析的 L-异亮氨酸发酵条件优化[J].天津轻工业学院学报,2003,18(2):15-19.
- [2] 李光霞,李宗伟,陈林海,等.发酵法生产 L-异亮氨酸的研究进展[J].食品与发酵工业,2006,32(1):57-61.
- [3] 孙家凯,吴晓娇,王晶,等.磷酸盐对大肠杆菌发酵异亮氨酸的影响[J].食品与发酵工业,2012,38(1):20-24.
- [4] 张蓓.代谢工程[M].天津:天津大学出版社,2003:322-328.
- [5] Morbach S, Kelle R, Winkels S, et al. Engineering the homoserine dehydrogenase and threonine dehydratase control points to analyse flux towards L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45(5):612-620.
- [6] 史建明,徐兰兰,徐庆阳,等.过量表达苏氨酸脱水酶对谷氨酸棒杆菌合成 L-异亮氨酸的影响[J].天津科技大学学报,2011,26(3):6-11.

- [7] 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.
- [8] van der Rest M E, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4):541-545.
- [9] 史建明,徐兰兰,徐庆阳,等. 谷氨酸棒杆菌 YILW 苏氨酸脱水酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 生物加工过程,2011,9(1):55-60.
- [10] 张君胜,王扬,杨晓志,等. 谷氨酸棒杆菌关键酶活性与苏氨酸高产的关系[J]. 湖南农业科学,2011(9):23-25.
- [11] 程立坤,黄静,秦永锋,等. 代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响[J]. 微生物学通报,2010,37(2):166-173.
- [12] 何晨光,马雷,徐庆阳,等. 用高效液相色谱定量分析分支链氨基酸[J]. 生物技术通讯,2009,20(4):556-558.
- [13] 许彦芳,许新民,王永利. 高效液相色谱柱前自动衍生法测定氨基酸含量[J]. 河北医科大学学报,1996,17(3):132-134.
- [14] 苏静,邓培生,谢希贤,等. 基于 cdd 基因敲除和噬菌体操纵子转移的胞苷产生菌的研究[J]. 天津科技大学学报,2010,25(5):1-5.
- [15] 吴晓娇,孙家凯,霍文婷,等. 过表达 *carAB* 和 *pyrBI* 对大肠杆菌发酵胞苷的影响[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(2):39-44.
- [16] Sahm H, Eggeling L, Morbach S, et al. Construction of L-isoleucine overproducing strains of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Naturwissenschaften, 1999, 86(1):33-38.

责任编辑:郎婧

《天津科技大学学报》2013年征订启事

《天津科技大学学报》创刊于1986年,其前身是《天津轻工业学院学报》,由于主办单位的更名,经主管部门批准,从2004年更名为《天津科技大学学报》.本刊主要刊登轻工技术与工程、食品工程与生物技术、材料科学与化学工程、机械及自动化、海洋科学与工程等学科的理论及应用的研究论文、研究报告,已被国内外多家重要文献检索系统收录,是中国科技核心期刊、RCCSE中国核心学术期刊(扩展版).本刊为双月刊,逢双月末25日出版,定价8元/期(全年48元),其邮发代号6-196.欢迎读者通过邮局订阅.

未及时订阅本刊者,可与本刊编辑部联系订阅事宜.

地 址:天津市河西区大沽南路1038号《天津科技大学学报》编辑部

邮 编:300222

电 话:(022)60273316

电子信箱:tjkdx@tust.edu.cn

本刊编辑部