

文章编号: 1673-1689(2011)05-0700-05

# VC 混菌发酵中大菌不同胞外组分对小菌的影响

吕淑霞<sup>1</sup>, 牛建双<sup>1</sup>, 马 镒<sup>1</sup>, 张良<sup>1</sup>, 陈宏权<sup>2</sup>, 张忠泽<sup>3</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 东北制药总厂 VC 公司, 辽宁 沈阳 110028; 3. 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

**摘 要:** 在维生素 C(VC) 二步混菌发酵中, 巨大芽孢杆菌可显著促进氧化葡萄糖酸杆菌产 VC 前体 2-酮基-L-古龙酸(2-KLG)。采用硫酸铵分级盐析沉淀、柱层析及电泳技术对巨大芽孢杆菌胞外液中的活性物质进行了分离纯化。通过测定氧化葡萄糖酸杆菌生长细胞转化 L-山梨糖为 2-KLG 的生成量、产酸菌关键酶 L-山梨糖脱氢酶(SDH) 酶活性及产酸菌的活菌数, 研究了 VC 两步发酵中大菌不同胞外组分对小菌的作用。结果表明: 大菌胞外 36 000 和 44 300 两个组分蛋白质对小菌产酸、SDH 酶活具有促进作用。

**关键词:** 氧化葡萄糖酸杆菌; 巨大芽孢杆菌; 2-酮基-L-古龙酸; L-山梨糖脱氢酶

中图分类号: Q 939.9

文献标识码: A

## Effect of Different Components of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* Mix-Cultured of Vitamin C Fermentation

LU Shu-xia<sup>1</sup>, NIU Jian-shuang<sup>1</sup>, MA DI<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>1</sup>,  
CHEN Hong-quan<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-ze<sup>3</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Northeast Pharmaceutical General Factory of Vitamin C Company, Shenyang 110028, China; 3. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** In the process of vitamin C two-step fermentation, *Bacillus megaterium* (*B. m*) can enhance the ability of *Gluconobacter oxydans* (*G. o*) in converting L-sorbose into 2-Keto-L-gulonic acid (2-KLG). In this study, isolated and purified active proteins were conducted by salting out of using ammonium sulfate fractionation, column chromatography and electrophoresis technology from the supernatant of *B. megaterium*. The effects of different components from the supernatant of *B. megaterium* on *Gluconobacter oxydans* growth and the ability of its L-sorbose dehydrogenase and yield of 2-KLG were investigated, respectively. Among which the separated metabolites with molecular weight of 36 000 and 44 300 from *B. megaterium* significantly enhance the *G. oxydans* growth and 2-KLG production.

**Key words:** *Gluconobacter oxydans*, *Bacillus megaterium*, 2-Keto-L-gulonic acid, L-sorbose dehydrogenase

收稿日期: 2010-11-22

基金项目: 沈阳市科学技术计划项目(F10-205-1-55); 沈阳农业大学国家自然科学基金启动基金项目(20102002)。

作者简介: 吕淑霞(1963), 女, 辽宁沈阳人, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物生物化学与分子生物学方面的研究。Email: lushuxia@hotmail.com

维生素C(VC)又称L-抗坏血酸,是人体必需的一种维生素和抗氧化剂。随着VC应用范围不断扩大,其生产工艺也得到了不断地改进<sup>[1]</sup>。我国首创的VC“二步发酵法”主要利用氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*)俗称小菌和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium* 俗称大菌)混合菌体系将L-山梨糖转化为VC的前体2-酮基-L-古龙酸(2-Ket-L-gulonic acid, 2-KLG),并应用于VC的工业生产<sup>[2]</sup>。目前对混合菌发酵体系中大、小菌关系比较明确的认识是:大菌单独培养容易,本身不产酸;小菌可将L-山梨糖转化为VC前体2-KGA<sup>[3]</sup>,其中L-山梨糖脱氢酶(SDH)是生产2-KLG的关键酶<sup>[4]</sup>。中科院离子束生物工程重点实验室将低能离子注入原始混合菌系的伴生菌,得到的突变菌株可使产酸菌的L-山梨糖脱氢酶酶活较之前提高50%<sup>[5]</sup>。马成新等认为混菌发酵时大菌产生蛋白酶,蛋白酶活性高时小菌产酸量高<sup>[6]</sup>。但是大、小菌的确切作用机制尚不清楚,对此方面研究也相对较少<sup>[7]</sup>。吕淑霞等认为,大菌在发酵过程中会产生几种蛋白质,这些蛋白质共同作用从而促进小菌产生2-KLG<sup>[8]</sup>。作者对大菌25-B活性物质分离纯化,研究不同组分对小菌生长与产酸的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 混合菌种** 氧化葡萄糖酸杆菌(*G. oxydans*),巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*, 25-B):由东北制药总厂提供。

### 1.1.2 培养基

1) 斜面培养基(组分 g/dL):山梨糖 0.5, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 1.0, 玉米浆 0.5, 牛肉膏 0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.02, 琼脂 2.5,  $10\ \mu\text{g/g FeSO}_4$  0.1 mL/L。

2) 分离培养基(组分 g/dL):山梨糖 2.0, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 1.0, 玉米浆 0.3, 牛肉膏 0.3,  $\text{MgSO}_4$  0.02, 琼脂 2.3,  $10\ \mu\text{g/g FeSO}_4$  0.1 mL/L, 碳酸钙 0.1, 尿素 0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1。

3) 种子培养基(组分 g/dL):山梨糖 2.0, 葡萄糖 0.2, 尿素 0.1, 玉米浆 0.5, 碳酸钙 0.1。

4) 大菌培养基(组分 g/dL):葡萄糖 0.2, 玉米浆 0.5, 尿素 0.1。

5) 发酵培养基(组分 g/dL):山梨糖 8.0, 玉米浆 1.0, 尿素 1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.02,  $10\ \mu\text{g/g FeSO}_4$  0.1 mL/L, 碳酸钙 0.5。

各种培养基均以30% NaOH调节pH 6~7.0, 121℃灭菌30 min<sup>[9]</sup>。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 大菌胞外液的制备** 取培养24 h的大菌液, 4000 r/min 离心15 min, 上清液即为大菌胞外液<sup>[10]</sup>。

**1.2.2 大菌胞外不同组分与小菌共培养** 将大菌不同胞外蛋白质组分真空冷冻干燥后溶解, 以考马斯亮蓝G-250法测蛋白质质量分数, 后稀释到相同浓度, 并以0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 各取5 mL大菌不同胞外蛋白质组分分别与小菌种子一起接入25 mL发酵培养基, 29℃、180 r/min 摇床培养72 h。

**1.2.3 2-酮基-L-古龙酸含量测定** 吸取2 mL发酵液样品于试管中, 加入2 mL、7 mol/L 浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$  摇匀。100℃沸水浴中煮沸30 min, 自来水冷却后加入250 mL三角瓶中, 以1%淀粉溶液作指示剂(用量约为3 mL/dL), 用0.05 mol/L的 $\text{I}_2$ 溶液滴定至蓝色为反应终点。按下式计算2-KGA的生成量。

$$2\text{KGA}(\text{mg/mL}) = \frac{M \times V \times 0.08806 \times 1000}{A \times B \times 0.9072} \\ = 7.6916V$$

式中,  $M$  为 $\text{I}_2$ 溶液浓度(0.05 mol/L $\times 2$ );  $V$  为0.05 mol/L  $\text{I}_2$ 溶液消耗的体积(mL);  $A$  为2-KLG转化为VC的转化率(%) (以63.10%计算);  $B$  为所取发酵液毫升数(2 mL); 0.9072 为VC相对分子质量/2-KLG相对分子质量; 0.08806 为每毫升0.05 mol/L 碘液相当880.6 mg VC<sup>[11]</sup>。

**1.2.4 L-山梨糖脱氢酶(SDH)活力测定** 基本反应液3 mL, 测定酶活性的基本反应液由含0.3% Triton X-100的100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)、0.45 mL、2.5 mmol/L DCIP 溶液和4.95 mL  $\text{H}_2\text{O}$  组成, 于测定前现配。取基本反应液1.6 mL、1 mol/L 山梨糖溶液0.4 mL 置于1 cm光程的比色杯中, 另加入产酸菌无细胞抽提酶液0.6 mL, 测定第一分钟内600 nm 处的光吸收度变化率。一个酶活力单位(U)定义为每分钟催化还原1  $\mu\text{mol}$  DCIP的酶量<sup>[12]</sup>。

**1.2.5 小菌无细胞抽提液制备** 由分离平皿挑出产酸菌单菌落若干个, 以0.01 mol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 7.5)洗涤2~3次, 8000 r/min 离心, 然后将菌沉悬浮于同种缓冲液中, 冰浴下进行超声波破碎10 min, 间隔10 s。菌体碎后, 再于12000 r/min 冷冻离心40 min, 收集上清液即得产酸菌无细胞提取液<sup>[13]</sup>。

**1.2.6 小菌活菌数测定** 平板菌落计数法计算活菌数, 将发酵液稀释至 $10^7 \sim 10^9$ , 然后取0.1 mL均匀涂布在分离培养基上, 48 h后计算活菌数<sup>[14]</sup>。

**1.2.7 蛋白质质量分数测定** 考马斯亮蓝G-250

法。采用紫外可见分光光度计测定样品在 595 nm 处吸光度值,以牛血清白蛋白为标准样品绘制标准曲线<sup>[15]</sup>。

**1.2.8 伴生菌活性物质分离纯化** DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析: 分别用含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mol/L NaCl 的 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液梯度洗脱。Sephadex-G100 凝胶过滤柱层析分离: 用 0.020 mol/L、pH 7.6 磷酸缓冲溶液(内含 0.1 mol/L NaCl)平衡和洗脱<sup>[8]</sup>。

**1.2.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳** 将韦霄等<sup>[16]</sup>方法略改动,凝胶制备为 15 g/dL 分离胶和 5 g/dL 浓缩胶,上样量为 10  $\mu$ L 样品浓缩液,电泳完毕用考马斯亮蓝 R250 对其染色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大菌胞外蛋白质粗提液不同组分对小菌单独发酵的影响

采用硫酸铵对大菌胞外蛋白质分级沉淀,取等量不同硫酸铵饱和度沉淀蛋白质分别与小菌共培养,碘量法测定 2-KLG 含量。DCIP 法测定不同蛋白质对产酸菌 SDH 酶活影响,并检测不同蛋白质共培养下小菌活菌数。结果见表 1。硫酸铵分级沉淀的 3 个饱和度范围中,35%~60% 硫酸铵饱和度沉淀蛋白质对小菌产酸及 SDH 酶活促进作用最显著,说明促进小菌产酸的物质主要集中在饱和度 35%~60% 这个范围内。表 1 结果还显示,产酸量与活菌数呈正比。

表 1 不同硫酸铵饱和度沉淀蛋白对产酸菌的影响  
Tab. 1 Effects of fractions under the different ammonium sulfate saturation on *G. oxydans*

| 菌系                             | 72 h 发酵液<br>2-KGA<br>质量浓度/<br>(mg/mL) | SDH<br>酶活提高/<br>% | 72 h 发酵液<br>小菌活菌数/<br>(cfu $\times 10^{10}$ ) |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|
| <i>G. o</i>                    | 3.08                                  |                   | 0.092                                         |
| <i>G. o</i> + 25-B             | 61.23                                 |                   | 4.23                                          |
| 胞外液+ <i>G. o</i>               | 32.30                                 | 12.5              | 2.72                                          |
| 0~35% 沉淀<br>蛋白质+ <i>G. o</i>   | 31.15                                 | 10.00             | 2.43                                          |
| 35%~60% 沉淀<br>蛋白质+ <i>G. o</i> | 36.54                                 | 25                | 3.04                                          |
| 60%~85% 沉淀<br>蛋白质+ <i>G. o</i> | 33.45                                 | 15                | 2.79                                          |

注: *G. o* 代表小菌,调整各分离蛋白质质量浓度为 5.00  $\mu$ g/mL,加入量为 25 mL 发酵培养基加入 5 mL。

### 2.2 促进小菌产酸的大菌胞外活性物质分离纯化

#### 2.2.1 离子交换层析

选取 35%~60% 硫酸铵

饱和度沉淀蛋白质进行 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析,结果见图 1。共出现 7 个峰,分别收集,记做 A1~A7,其中 A1 为没有结合的杂蛋白质。分别测定峰 A2~A7 对小菌 SDH 酶活的影响及各蛋白质峰对小菌产酸的影响,结果见表 2。表明 0.2 mol/L NaCl 洗脱峰 A3 对小菌产酸及 SDH 酶活促进作用最显著。

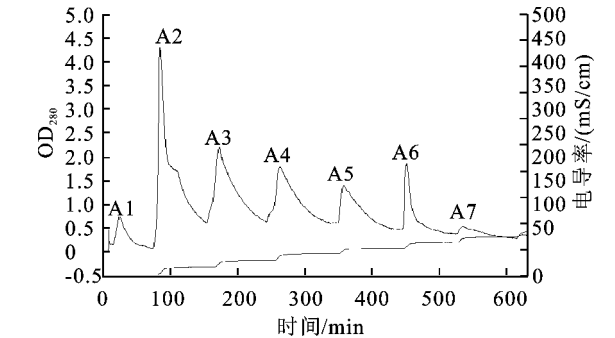


图 1 35%~60% 饱和度沉淀蛋白质的 DEAE-Sepharose FF 柱层析图

Fig. 1 Profile on DEAE-Sepharose FF of precipitate protein at 35%~60% ammonium sulfate

表 2 离子交换各洗脱峰对小菌产酸及 SDH 酶活的影响  
Tab. 2 Effects on acid production and enzyme activity of *G. oxydans* by different fraction from ion-exchange chromatography

| 菌系               | 72 h 发酵液<br>2-KGA<br>质量浓度/<br>(mg/mL) | SDH 酶活<br>提高/ % | 72 h 发酵液<br>小菌活菌数/<br>(cfu $\times 10^{10}$ ) |
|------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------|
| <i>G. o</i> + A2 | 34.31                                 | 22.22           | 2.81                                          |
| <i>G. o</i> + A3 | 42.06                                 | 55.55           | 3.35                                          |
| <i>G. o</i> + A4 | 34.67                                 | 22.22           | 2.86                                          |
| <i>G. o</i> + A5 | 31.89                                 | 11.11           | 2.70                                          |
| <i>G. o</i> + A6 | 31.72                                 | 11.11           | 2.66                                          |
| <i>G. o</i> + A7 | 36.09                                 | 33.33           | 2.98                                          |

注: *G. o* 代表小菌,调整各分离蛋白质质量浓度为 5.00  $\mu$ g/mL,加入量为 25 mL 发酵培养基加入 5 mL。

**2.2.2 Sephadex-G100 凝胶过滤柱层析分离** 图 2 为 A3 蛋白峰的 Sephadex-G100 洗脱曲线,分别收集 280 nm 处洗脱峰 B1、B2,测定其对小菌发酵产酸及 SDH 酶活的影响,结果见表 3。表明伴生菌胞外活性物质峰 B2 对产酸菌产酸及 SDH 酶活有显著促进作用。

#### 2.3 将纯化的大菌胞外蛋白质真空冷冻干燥浓缩,并进行 SDS-PAGE

结果见图 3 所示。在 36 000 左右存在一条电泳谱带,与前人报道一致,在标准蛋白质相对分子质量为 44 300 处还存在一条电泳谱带,尽管用了离子

交换层析和凝胶过滤柱层析分离,但始终不能得到单一条带,考虑可能因为凝胶层析柱长度不够,所以没有分开,分离条件还待进一步优化。

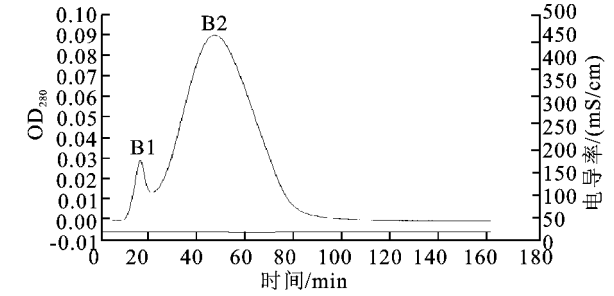


图 2 A3 蛋白质峰的 Sephadex G100 洗脱曲线  
Fig. 2 Profile of A3 fraction from Sephadex G100

表 3 Sephadex G100 各洗脱峰对小菌产酸及酶活的影响

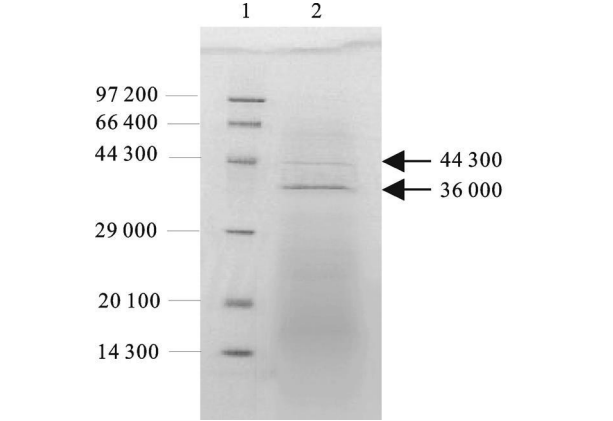
Tab. 3 Effects of different fraction from Sephadex G100 on the acid production and enzyme activity by *G. oxydans*

| 菌系               | 72 h 发酵液<br>2-KGA<br>质量浓度/<br>(mg/mL) | SDH 酶活<br>提高/ % | 72 h 发酵液<br>小菌活菌数/<br>( cfu× 10 <sup>10</sup> ) |
|------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|
| <i>G. o</i> + B1 | 30 46                                 | 10 00           | 2 16                                            |
| <i>G. o</i> + B2 | 48 57                                 | 72 50           | 3 87                                            |

注: *G. o* 代表小菌, 调整各分离蛋白质质量浓度为 5 00 μg/mL, 加入量为 25 mL 发酵培养基加入 5 mL。

### 3 结 语

在 VC 两步发酵中, 巨大芽孢杆菌 25-B 胞外液中存在促进小菌转化 L-山梨糖为 2-KLG 的活性物质。经硫酸铵分级沉淀、柱层析及电泳技术, 得到



1 低相对分子质量标准蛋白; 2 纯化后的蛋白质样品浓缩液  
图 3 B2 峰的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of the peak B2

相对分子质量约为 36 000 和 44 300 两个大菌胞外蛋白质, 可显著促进小菌生长和产酸及 SDH 酶活。冯树<sup>[10]</sup>等分离出的活性物质为 35 000 单一蛋白质组分和大于 100 000 两部分, 与本研究的纯化结果有差别, 原因可能为所用巨大芽孢杆菌种类和纯化方法不同所致。本研究纯化结果并非单一条带, 纯化条件待进一步优化。本研究结果显示, 添加此组分的小菌发酵液中 2-KLG 质量浓度是小菌单菌发酵条件下的 15.78 倍, SDH 酶活比小菌单菌发酵条件下提高 72.5%。此组分是大菌产生的代谢物, 是小菌生长和产酸所必需的。作者研究分析了大菌不同胞外组分对小菌相关生理生化指标的影响, 为进一步研究 VC 二步发酵中大、小菌的确切作用机制奠定了基础。

### 参考文献(References):

[ 1 ] 张静, 刘立明, 刘杰, 等. 生物技术法生产维生素 C 的研究进展[ J ]. 食品与生物技术学报, 2008, 27 ( 5 ): 1- 7.  
ZHANG Jing, LIU Li-ming, LIU Jie, et al. Progress in biotechnological production of vitamin C[ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27 ( 5 ): 1- 7. (in Chinese)

[ 2 ] 尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生 Vc 前体 2-KLG 的研究[ J ]. 微生物学报, 1980, 20: 246- 251.  
YIN Guang-lin, TAO Zeng-xin, YU Long-hua, et al. The researches of L-sorbose fermentation produce 2-KLG of Vc precursor[ J ]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1980, 20: 246- 251. (in Chinese)

[ 3 ] Yang F, Jia Q, Xiong Z H. Complete genome analysis of *Ketogulonigenium* sp. WB0104[ J ]. **Chinese Science Bulletin**, 2006, 51 ( 8 ): 941- 945.

[ 4 ] Zhang W, Yan B, Wang J. Purification and characterization of membrane-bound L-sorbose dehydrogenase from *Glucanobacter oxydans* GO112[ J ]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 38: 643- 548.

[ 5 ] 赵世光, 王陶, 余增量. 维生素 C 发酵中离子注入诱变巨大芽孢杆菌的生物学效应[ J ]. 激光生物学报, 2007, 16 ( 4 ): 455 - 459.

ZHAO Shi-guang, WANG Tao, YU Zeng-liang. Bio-effects of *Bacillus megaterium* induced by ion implantation in two-step fermentation for Vitamin C[ J ]. **Acta Laser Biology Sinica**, 2007, 16 ( 4 ): 455- 459. (in Chinese)

[ 6 ] 马成新, 薛德林, 李越中, 等. 维生素 C 二步发酵过程中蛋白酶的发现及其作用[ J ]. 辽宁医药, 2000, 15 ( 2 ): 2- 4.

- MA Cheng-xin, XU E De-lin, LI Yue-zhong, et al. Proteases and its role in two-step fermentation process of vitamin C [J]. **Liaoning Medicine**, 2000, 15 (2): 2- 4. (in Chinese)
- [ 7 ] Patrick S M, Neil B M, Harvey L M. By-product formation in the D-sorbitol to L-sorbose biotransformation by *Gluconobacter suboxydans* ATCC621 in batch and continuous cultures[ J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40: 2113- 2122.
- [ 8 ] 吕淑霞, 冯树, 张忠泽, 等. Vc 二步发酵中伴生菌的作用机制[J]. 微生物学通报, 2001, 28 (5): 10- 13.
- LU Shu-xia, FENG Shu, ZHANG Zhong-ze, et al. The effect of *Bacillus megaterium* in vitamin C two-step fermentation [J]. **Microbiology**, 2001, 28(5): 10- 13. (in Chinese)
- [ 9 ] 冯树, 孙传宝, 张忠泽, 等. 维生素 C 二步发酵中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌生长和产酸的影响[J]. 微生物学杂志, 1998, 18 (1): 6- 9.
- FENG Shu, SUN Chuan-bao, ZHANG Zhong-ze, et al. Effects of *Bacillus megaterium* on growth and 2KGA synthesizing of *Gluconobacter oxydans* in Vitamin C two-step fermentation process[ J]. **Journal of Microbiology**, 1998, 18 (1): 6- 9. (in Chinese)
- [ 10 ] 冯树, 张舟, 张成刚, 等. 混合培养中巨大芽孢杆菌对氧化葡萄糖酸杆菌的作用[ J]. 应用生态学报, 2000, 11 (1): 119- 122.
- FENG Shu, ZHANG Zhou, ZHANG Cheng-gang, et al. Effect of *Bacillus megaterium* on *Gluconobacter oxydans* in mixed culture[ J]. **Chinese Journal of Applied Ecology**, 2000, 11 (1): 119- 122. (in Chinese)
- [ 11 ] 宋祺, 何建明, 任双喜, 等. 新组合菌系 SCB329-SCB933 利用 L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的研究 [J]. 工业微生物, 1997, 27 (3): 6- 10.
- SONG Qi, HE Jian-ming, REN Shuang-xi, et al. Production of vitamin C precursor 2-L-Keto-Gulonic acid from L-sorbose by a novel bacterial components system of SCB329-SCB933[ J]. **Industrial Microbiology**, 1997, 27 (3): 6- 10. (in Chinese)
- [ 12 ] 薛震役, 尹光琳. L-山梨糖脱氢酶的纯化及性质的研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27 (2): 89- 92.
- XUE Zhen-yi, YIN Guang-lin. Study on the purification of L-sorbose dehydrogenase and its physical chemical and enzyme properties[ J]. **Microbiology**, 2000, 27 (2): 89- 92. (in Chinese)
- [ 13 ] 张刚, 杨光, 裴海生, 等. 质粒平均分配基因 *parDE* 对甲酸脱氢酶 NADH 再生系统稳定性的影响[J]. 过程工程学报, 2008, 8 (2): 345- 349.
- ZHANG Gang, YANG Guang, PEI Hai-sheng, et al. Effect of plasmid distribution gene *parDE* on the stability of formate dehydrogenase NADH regeneration system[ J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2008, 8 (2): 345- 349. (in Chinese)
- [ 14 ] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ18 的发酵条件优化[ J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (2): 58- 62.
- ZHANG Si-ping, LIU Sheng-ming, WANG Jian-xin, et al. Optimizing fermentation condition for the antagonistic *Bacillus subtilis* NJ218 strain[ J]. **Journal of Nanjing Agricultural University**, 2010, 33 (2): 58- 62. (in Chinese)
- [ 15 ] 李志江. 考马斯亮蓝 G250 染色法测定啤酒中蛋白质含量[J]. 酿酒, 2008, 35 (1): 70- 72.
- LI Zhi-jiang. Study on determination of protein content of beer by Coomassie brilliant G- 250 dye binding[ J]. **Liquor Making**, 2008, 35 (1): 70- 72. (in Chinese)
- [ 16 ] 韦霄, 张志勇, 何敏, 等. 两种分离人血清蛋白质电泳技术的比较研究[ J]. 中国热带医学, 2007, 7 (9): 1550- 1551.
- WEI Xiao, LIU Zhi-yong, HE Min, et al. Comparative study on separating of protein in human serum with two electrophoretic techniques[ J]. **China Tropical Medicine**, 2007, 7 (9): 1550- 1551. (in Chinese)