

过量表达枯草芽孢杆菌乙偶姻还原酶 提高 2,3-丁二醇产量

李秀鹏¹, 杨套伟², 徐美娟³, 张显⁴, 饶志明^{*}

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 是一株安全生产的菌株,但是在 2,3-丁二醇(2,3-BD)的发酵过程中,会积累较多的副产物乙偶姻(AC)。乙偶姻还原酶是催化 AC 合成 2,3-BD 的关键酶。为了提高 2,3-BD 合成效率,首先将乙偶姻还原酶基因 *acr* 克隆到 *B. subtilis* 168,构建了重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*。对重组菌进行摇瓶发酵实验,结果表明,相比出发菌,重组菌的 2,3-BD 产量和转化率分别提高 28.62%和 22.87%,主要副产物 AC 积累量下降了 20.01%。同时,分支路径的副产物甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸,也有不同程度的降低。

关键词: 乙偶姻还原酶;2,3-丁二醇;乙偶姻;枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)03—0252—06

Improved 2,3-Butanediol Production by Overexpressing Acetoin Reductase in *Bacillus subtilis* 168

LI Xiupeng¹, YANG Taowei², XU Meijuan³, ZHANG Xian⁴, RAO Zhiming^{*}

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* 168 is a safe strain for industrial-scale microbial production of 2,3-butanediol (2,3-BD). However, a large quantity of by-product of acetoin (AC) is accumulated during 2,3-BD fermentation process. Acetoin reductase (ACR) is the key enzyme which catalyzes the conversion of acetoin to 2,3-BD. In this study, in order to improve 2,3-BD production, we firstly cloned the *acr* gene of acetoin reductase into *B. subtilis* 168, and then further constructed the recombinant strain *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*. The results showed that the yield and conversion rate of the 2,3-BD were increased up to 28.62% and 22.87% by the recombinant strain, respectively. Whereas the accumulation of the main by-product of acetoin decreased by 20.01%. Furthermore, the molar yields of by-products of formic acid, acetic acid, lactic acid, and succinate were also decreased.

Keywords: Acetoin reductase, 2,3-Butanediol, Acetoin, *B. subtilis* 168

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB725202);国家自然科学基金项目(31400082,21276110);教育部重点科研项目(113033A);江苏高校优势学科建设工程资助和 111 引智工程项目(111-2-06)。

* 通信作者: 饶志明(1975—),男,江西临川人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD), 化学式是 $\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$, 其结构存在3种立体异构体^[1], 分别为 L-(+)-、D-(-)-和 meso-构型。作为一种重要的化工原料和液体燃料, 2,3-BD 被广泛应用于化工、能源、食品及航空航天等多个领域^[2]。随着经济社会的蓬勃发展和石油等不可再生资源的日益枯竭, 2,3-BD 逐渐受到世界的关注。由于 2,3-BD 结构特殊^[3], 利用化石原料生产 2,3-BD 成本高、条件苛刻、过程繁琐, 容易对环境造成污染, 并且化石原料日益枯竭, 因此化学合成法工业化生产较为困难。微生物转化法是利用可再生资源生产 2,3-BD, 既克服了化学法生产的原料问题, 又符合绿色化工的要求, 因此受到了人们越来越多的关注。通过代谢工程、合成生物学及其集成的方法改造微生物^[4], 同时, 通过优化发酵条件与分离纯化工艺来降低环境污染与生产成本, 对我国低碳经济和循环经济的建设, 具有重要的促进作用和潜在的经济效益^[5]。早在 1906 年, Harden 和 Walpole^[6]就研究了利用肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)发酵生产 2,3-BD; 1926 年, Donker^[7]提出了用多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)发酵生产 2,3-BD; 1933 年, Fulmer 等^[8]提高了产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)生物合成 2,3-BD 的水平, 并指出了其工业化生产的潜力。2,3-BD 高产菌株主要是克雷伯氏菌、产气肠杆菌和粘质沙雷氏菌^[3,9-10]。然而, 这些菌株都具有潜在致病性, 不符合工业化安全生产的要求。

作者所在实验室保藏的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 是一株安全生产 2,3-BD 的菌株, 其代谢产生的 2,3-BD 主要以 D-(-)-和 meso-两种构型存在^[1]。枯草芽孢杆菌的 2,3-BD 合成途径^[1,11]如图 1 所示, 以糖类为底物经丙酮酸、 α -乙酰乳酸、乙偶姻(Acctoin, AC)并最终转化为 2,3-BD, 此步反应需要 NADH 的参与^[5,9], 同时伴随着有机酸的合成^[12]。乙偶姻还原酶(Acctoin, reductase, ACR)作为一种双功能酶可催化 AC 和 2,3-BD 之间的相互转化^[12]; 在弱酸性的条件下, 该酶以催化 AC 向 2,3-BD 转化为主, 过程中消耗 NADH; 弱碱性时, 该酶则主要催化 2,3-BD 向 AC 逆向转化, 该过程生成 NADH^[13-14]。因此, 有机酸副产物如甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸的合成会与 2,3-BD 合成途径竞争碳源; 另外, 乳酸和琥珀酸的合成还会消耗 NADH^[1,11], 这可能会影响 AC 向 2,3-BD 转化的程度, 从而造成 AC 的大量积累。

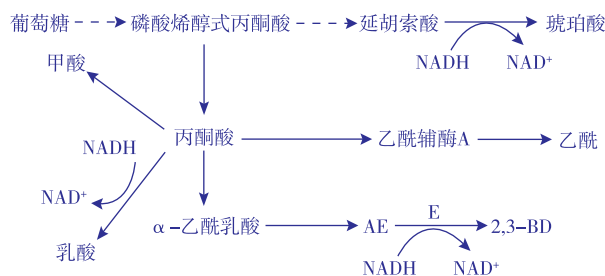


图 1 2,3-丁二醇代谢路径

Fig. 1 Metabolic pathway of 2,3-BD. E; acetoin reductase

以 *B. subtilis* 168 作为出发菌, 克隆乙偶姻还原酶基因 *acr*, 构建重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*, 并对其在弱酸性的条件下进行发酵试验, 研究过量表达 ACR 对发酵过程中 2,3-BD 积累的影响, 希望能达到 2,3-BD 提高、AC 和相关有机酸减少的目标, 为工业化应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

Bacillus subtilis 168 由作者所在实验室保藏, 表达载体 pMA5 亦由作者所在实验室保藏。

1.2 主要试剂与培养基

工具酶, 购自 TaKaRa 公司; 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、抗生素、咪唑, 购自上海 Sangon 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺, 购自 Ferments 公司; NADH, NAD⁺, 购自 Sigma Aldrich 公司; PCR 引物, 由上海 Sangon 公司合成; 其他试剂均为国产试剂。

活化培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10; 自然 pH 值。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 80, 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10; 自然 pH 值。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 140, 酵母膏 5, KH_2PO_4 6, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 14, 尿素 5, 玉米浆 20, 柠檬酸钠 8; pH 6.5。

1.3 主要试剂配制

A 液 (50 mmol/L 磷酸氢二钠溶液): 7.08 g Na_2HPO_4 , 加去离子水定容至 1 L。

B 液 (50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液): 5.99 g NaH_2PO_4 , 加去离子水定容至 1 L。

磷酸钠缓冲液 (pH 6.5): 将 A 液和 B 液按照 31.5:68.5 的体积比混匀。

PBS 缓冲液 (pH 7.0): NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.626 g/L, 用浓盐酸调至 pH 7.0。

根据 NCBI 中枯草芽孢杆菌全基因组核酸序列

表 1 文中所涉及的引物

名称	引物序列	酶切位点
Forward	5'- ACCGGGATCCATGAAGGCAGCAAGATGG-3'	<i>Bam</i> H I
Reverse	5'-ACCGACGCGTTTACTGCTGGTGGTGGTGGTTAGGTCTAACAAGG-3'	<i>Mlu</i> I

冲液洗柱,洗脱掉未与 Ni-NTA 结合的细胞体杂蛋白质,然后用不同浓度的咪唑(20~300 mmol/L)缓冲液进行梯度洗脱,在一定的咪唑浓度条件下,可以得到较纯的酶液。

利用 SDS-PAGE 分析重组菌的全细胞蛋白质^[15]。用 5 g/dL 的浓缩胶及 12~15 g/dL 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白质分离,考马斯亮兰 R-250 染色;总蛋白质浓度采用 Brandford 方法,以牛血清蛋白质(BSA)作为标准蛋白质^[16]。

将 20 μL 粗酶液加入到酶活力测定缓冲体系, 立即检测 340 nm 处吸光值在 3 min 内的变化。

乙偶姻还原酶活力测定缓冲体系:0.05 mol/L AC,5 mmol/L NAD⁺,磷酸钠缓冲液 pH 6.5。

总酶活力(U/mL)定义:每毫升粗酶液 OD_{600 nm} 每分钟消耗 1 μmol/L NADH 的酶量。

比酶活(U/g)定义:总酶活(U/mL)和粗酶液蛋白质质量浓度(g/mL)的相除值。

重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 和出发菌株 *B. subtilis* 168 经过 LB 液体培养基活化后, 按体积分数 1% 的接种量转接至 10 mL 种子培养基, 37 ℃ 培养 12 h 后按照体积分数 4% 的接种量转接至 50 mL 发酵培养基于 37 ℃ 培养, 发酵过程跟踪监测菌体浓度、葡萄糖含量、相关有机酸含量、AC 产量和 2,3-BD 产量。

1)AC 和 2,3-BD 含量测定:采用毛细管气相色谱法检测,仪器型号 GC1600(JieDao TECH),色谱柱规格为柱长 30 m,内径 0.32 mm,液膜厚度 0.50 μm ;检测条件为柱箱温度 160 $^{\circ}\text{C}$,进样器和检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$,进样量 0.2 μL ,采用 FID 检测器。

2) 葡萄糖含量测定: 采用 SBA 生物传感器测定, 发酵液经适当稀释后, 取 25 μL 直接进样到生

将构建好的表达载体 pMA5-*acr* 转化至 *B. subtilis* 168 中,在卡那霉素抗性平板上筛选阳性重组子并进行酶切验证。将验证正确的重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*, 接种至含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,次日以体积分数 1% 的接种量转接至 50 mL LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。发酵的菌液 8 000 r/min 离心 10 min, 用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 然后离心后的细胞重悬浮于 pH 7.0 的 PBS 缓冲液中,用超声波破碎仪破碎细胞,10 000 r/min 离心 30 min 沉淀细胞碎片,上清液即为粗酶液,置于 -4°C 保存,后续用于蛋白质纯化、SDS-PAGE 实验和 ACR 的酶活测定。

超声破碎制得粗酶液后,经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 Ni-NTA 蛋白纯化柱来纯化目的蛋白质,经过两次上样,蛋白质末端的 6 个 His 与 Ni-NTA 的金属离子整合。洗脱过程,首先用不含有咪唑的缓

物传感器中,根据葡萄糖标准样品浓度、仪器读数及发酵液稀释倍数计算发酵液中葡萄糖的含量。

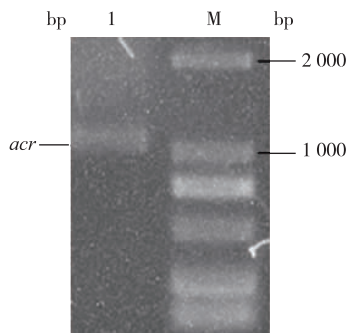
3)OD测定:取一定量的种子培养液或发酵液,以相应的培养基作对照液,在600 nm处测定OD值。

4)有机酸产物含量测量:采用高效液相色谱(HPLC)测定,流动相为含有体积分数5%甲醇的50 mmol/L的 KH_2PO_4 ,体积流量为1.0 mL/min,紫外检测器检测波长为210 nm,温度为30℃。

2 结果与分析

2.1 *acr* 的克隆及其表达载体的构建

提取 *B. subtilis* 168 的基因组为模板,以 Forward/Reverse 引物进行 PCR 扩增,得到包含 18 bp His 编码序列的基因片段,总长 1 041 bp,见图 2。



1:PCR products;M:DL2000 marker。

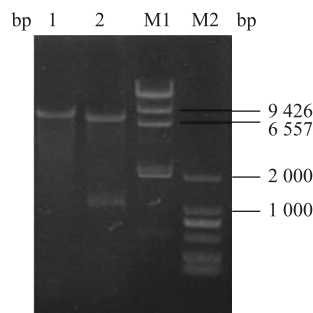
图 2 *acr* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *acr* gene

将目的基因片段,连接到经 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切的 pMA5 上,构建表达载体 pMA5-*acr*,并且转化至 *B. subtilis* 168 感受态中。获得的重组表达载体 pMA5-*acr* 经 *Bam*H I 和 *Mlu* I 双酶切验证(见图 3),得到约 7 200 bp 和 1 040 bp 大小的片段,刚好对应线性化的 pMA5 和 *acr* 的大小,表明外源基因 *acr* 已经正确连接到表达载体 pMA5 上。

2.2 ACR 在 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 中的表达

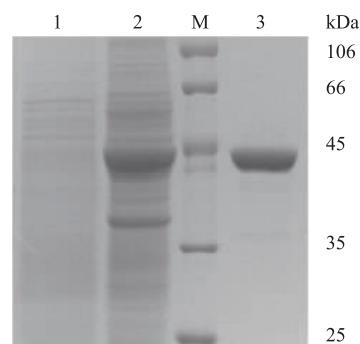
将重组载体 pMA5-*acr* 转化至 *B. subtilis* 168,在卡那霉素抗性平板上筛选阳性重组子,即得 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*,将其接种于 LB 液体培养基培养 24 h,收集菌体并破碎,菌体用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液悬浮,采用超声波破碎细胞,将破碎上清液及其纯化蛋白质进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示,ACR 的相对分子质量约为 39 kDa,与预期的蛋白质相对分子质量大小相符,表明 ACR 在 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 中成功获得了表达。



1:pMA5-*acr*/BamH I; 2:pMA5-*acr*/BamH I+*Mlu* I;
M1:λ-Hind III marker; M2:DL2000 marker。

图 3 重组质粒 pMA5-*acr* 的酶切验证

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pMA5-*acr* by enzyme digestion



1:*B. subtilis* 168; 2:*B. subtilis* 168/pMA5-*acr*; M:Protein Marker; 3:purified ACR from *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*。

图 4 ACR 表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed and purified recombinant ACR

2.3 ACR 在 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 中的酶活力测定

分别测定重组菌和原始菌破碎上清液中 ACR 的酶活力,结果如表 2 所示,与原始菌株相比,重组菌中 ACR 的比酶活提高了 3.48 倍,表明 ACR 在 *B. subtilis* 168 里成功过量表达。

表 2 *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 的 ACR 酶活
Table 2 ACR enzyme activities of *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*

菌	ACR 比酶活/(U/g)	ACR 比酶活变化
<i>B. subtilis</i> 168	41.21	100%
<i>B. subtilis</i> 168/pMA5- <i>acr</i>	184.9	448%

2.4 过量表达 ACR 对菌体生长、糖耗和 2,3-BD 积累的影响

对 *B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*

进行发酵实验,菌体量和葡萄糖变化曲线见图5,AC和2,3-BD发酵曲线见图6,发酵特征分析见表3。重组菌在前期的生长速度较慢,发酵培养16 h后,菌体生长速度加快,80 h达到最高菌体量。可能的原因是ACR的过表达,加重了菌体的负担,前期生长受到抑制。但是过量表达ACR后,对菌体生长有害的分支路径副产物有机酸等减少了,所以后半段的菌体长势较好,菌体量也比出发菌高,使得2,3-BD的合成具备良好的细胞基础。

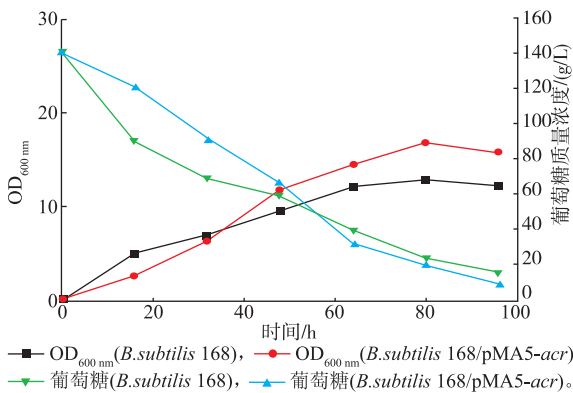


图5 发酵过程中OD和糖耗曲线

Fig. 5 Curves of OD and Glucose during the fermentation

从图5可以看到,重组菌的葡萄糖变化是一个前期下降平缓,中后期较为迅速的过程,而出发菌的糖耗曲线则较为均衡。这种现象表明,过量表达ACR,对菌体的生长造成负担。在前期,菌体生长缓慢,

对于碳源的消耗减少,葡萄糖质量浓度下降较为平缓;而当菌体进入2,3-BD合成期后,对碳源的需求大大加强,发酵培养16 h,葡萄糖质量浓度开始较快减少。

图6和表3显示,发酵培养80 h,重组菌的2,3-BD的产量达到最大值33.08 g/L,比出发菌提高了28.62%;转化率达37.56%,提高了22.87%;副产物AC 11.59 g/L,降低了20.01%;2,3-BD/AC比率为2.854,提高了60.79%。过量表达ACR,并且控制发酵条件在弱酸性,促进了由AC到2,3-BD的转化程度,成功地使主产物2,3-BD的产量提高,同时降低了副产物AC的积累。

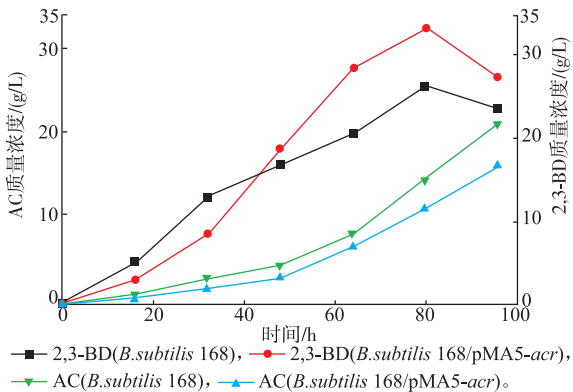


图6 发酵过程中AC和2,3-BD曲线

Fig. 6 Curves of AC and 2,3-BD during the fermentation

表3 发酵特征分析

Table 3 Analysis of fermentation results

菌	发酵周期/h	2,3-BD 质量浓度/(g/L)	2,3-BD 转化率/%	乙偶姻质量浓度/(g/L)	2,3-BD/AC 比率
<i>B. subtilis</i> 168	80	25.72	30.57	14.49	1.775
<i>B. subtilis</i> 168/pMA5-acr	80	33.08	37.56	11.59	2.854
重组菌对比出发菌的变化	0	28.62%	22.87%	-20.01%	60.79%

2.5 过量表达ACR对有机酸积累的影响

对*B. subtilis* 168和*B. subtilis* 168/pMA5-acr两株菌发酵液进行有机酸测定分析,结果如表4所示,相比出发菌,重组菌株发酵液中副产物甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸分别降低了15.21%、34.35%、35.39%、39.53%。ACR的活力和NADH的含量是2,3-BD合成的两个重要因素,过量表达ACR,促进了从AC到2,3-BD的合成效率。获得了更多2,3-BD就意味着有更多的NADH参与了AC向2,3-BD的转化,也就是说该过程需要消耗更多的NADH,而用于需要NADH参与的其他有机酸副产物的

NADH的量会相应减少,这可能是相关支路的有机酸积累量减少的原因所在。

表4 ACR过量表达对发酵过程有机酸质量浓度的影响

Table 4 Effects of overexpressing ACR on organic acids in fermentation

有机酸	菌		代谢再分配率/%
	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> 168/pMA5-acr	
甲酸质量浓度/(g/L)	0.355	0.301	-15.21
乙酸质量浓度/(g/L)	1.31	0.86	-34.35
乳酸质量浓度/(g/L)	2.113	1.365	-35.39
琥珀酸质量浓度/(g/L)	0.382	0.231	-39.53

3 结 语

以安全菌株 *B. subtilis* 168 为出发菌,克隆其乙酰还原酶基因 *acr*,构建重组质粒 pMA5-*acr*,将重组质粒转化入 *B. subtilis* 168,构建重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr*。测定了重组菌 ACR 的酶活,并在弱酸性条件下进行发酵试验。结果表明,ACR 在 *B. subtilis* 168/pMA5-*acr* 中实现了过量表达,主产物 2,3-BD 的产量得到提高,而副产物 AC 和相关有机酸的积累量则不同程度下降。2,3-BD 高产菌株主要是克雷伯氏菌、产气肠杆菌和粘质沙雷氏菌^[3,9-10],然而这些菌株都具有潜在致病性,不符合

工业化安全生产的要求。而枯草芽孢杆菌有长期制备发酵食品的历史,不产内毒素和致热敏蛋白质,是一种公认安全的微生物,无论是作为出发菌还是宿主菌都具有很强可行性^[17]。过量表达 ACR 和适当控制发酵 pH,增强了合成 2,3-BD 的碳源通量,消耗了更多的辅酶 NADH。相应地,AC 和需要 NADH 参与的相关有机酸合成所需的碳源流量和 NADH 则会减少,因而成功地实现了主产物 2,3-BD 产量提高和相关副产物产量减少的目标。虽然重组菌产 2,3-BD 的产量和国内外最高产量还有一定的差距^[1],但是相信通过进一步的分子改造和发酵条件优化,一定能实现微生物法高效安全生产 2,3-BD 的目标。

参考文献:

- [1] Ji X J, Huang H. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review[J]. **Biotechnology Advances**, 2011, 29(3):351.
- [2] Garg S K, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review[J]. **Bioresource Technology**, 1995, 51:103-109.
- [3] Syu M J. Biological production of 2,3-butanediol[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 55(1):10-18.
- [4] Jarboe L R, Zhang X, Wang X, et al. Metabolic engineering for enzymes in *Clostridium* [J]. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010:761042.
- [5] 付晶,王萌,刘维喜,等. 生物法制备 2,3-丁二醇的最新进展[J]. 化学进展, 2012, 24(11):2268-2276.
FU Jing, WANG Meng, LIU Weixi, et al. Latest advances of microbial production of 2,3-Butanediol [J]. **Progress in Chemistry**, 2012, 24(11):2268-2276. (in Chinese)
- [6] Magee R, Kosaric N. The microbial production of 2,3-butanediol[J]. **Advances in Applied Microbiology**, 1987, 32:89-161.
- [7] Long S K, Patrick R. Microbial production of 2,3-Butylene glycol from cheese whey [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1982, 43(5):1216-1218.
- [8] Fulmer E I, Christensen L M, Kendali A R J. Production of 2,3-Butylene glycol by fermentation[J]. **Industrial and Engineering Chemistry**, 1933, 25:798-800.
- [9] Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects [J]. **Biotechnology Advances**, 2009, 27:715-725.
- [10] Garg S K, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review[J]. **Bioresource Technology**, 1995:103-109.
- [11] Maddox I S. Microbial production of 2,3-butanediol[J]. **VCH Verlagsgesellschaft mbH**, 1996:269-291.
- [12] Larsen S H, Stormer F C. Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes* Kinetic mechanism and regulation by acetate of the reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1973, 34(1):100-106.
- [13] Machielsen R, Uria A R, Kengen S W M, et al. Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 62:233-238.
- [14] Wang Z, Song Q, Yu M, et al. Characterization of stereospecific acetoin (diacetyl) reductase from *Rhodococcus erythropolis* WZ010 and its application for the synthesis of (2S,3S)-2,3-butanediol[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2013:1.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**, 1970, 227:680.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72:248-254.
- [17] 李静静,徐美娟,张显,等. 一种耐低温 α -乙酰乳酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(5):522.
LI Jingjing, XU Meijuan, ZHANG Xian, et al. High-Level expression of Cold-Adapted α -acetolactate decarboxylase in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(5):522. (in Chinese)