

# 酿酒酵母蔗糖酶基因的克隆、异源表达及重组酶学性质研究\*

## Cloning, Expression and Characterization of Gene Encoding Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*

杜丽琴<sup>1</sup>, 杨键<sup>1</sup>, 朱绮霞<sup>1</sup>, 杨登峰<sup>2</sup>, 韦宇拓<sup>1</sup>, 黄日波<sup>2\*</sup>

DU Li-qin<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>, ZHU Qi-xia<sup>1</sup>, YANG Deng-feng<sup>2</sup>, WEI Yu-tuo<sup>1</sup>, HUANG Ri-bo<sup>2\*</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到蔗糖酶基因 (*suc 2*), 并将其克隆到表达载体 pSE380 中, 将得到的重组质粒 pSE-*suc 2* 转化进 *E. coli* BL21 中, 利用镍金属螯合层析方法分析测定其酶学性质。重组菌株的 SDS-PAGE 结果显示重组蔗糖酶基因 (*suc 2*) 有 60kDa 目的蛋白出现, 纯化的 SDS-PAGE 分析得到均一的蛋白条带; 重组蔗糖酶的  $K_m$  值为 47.73mmol/L, 最大反应速率为 79.59mg 还原糖  $\text{mg}^{-1}$  蛋白  $\text{min}^{-1}$ , 最适温度为 42°C, 最适 pH 值为 5.5,  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对重组蔗糖酶酶活有较强的抑制作用,  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对重组蔗糖酶酶活稍有激活作用。

**关键词:** 蔗糖酶 克隆 表达 酶学性质

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)02-0184-05

**Abstract** The gene encoded invertase from *Saccharomyces cerevisiae* was amplified by PCR, and inserted into the expression vector pSE380, then introduced into *E. coli* BL21. The recombinant protein was purified by immobilized metal affinity chromatography. It was presented as a single protein band on SDS-PAGE with molecular weight of 60kD. The recombinant enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with an apparent  $K_m$  of 47.73mmol/L. Its  $V_{max}$  value was 79.59mg reducing sugar  $\text{mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ . The optimum activity of the recombinant invertase was found to be at pH value 5.5 and 42°C. The invertase activity was increased slightly by addition of  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ , while inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ .

**Key words** invertase, cloning, expression, characterization

从 20 世纪 90 年代初开始, 利用可再生资源生产非食品产品的发展, 促进了相关的研究与发展, 这类研究越来越受到来自工业界和政界的关注<sup>[1,2]</sup>。蔗糖是一个可再生的能源物资, 是由  $\alpha$ -D-葡萄糖和  $\beta$ -D-果糖通过 1,2 糖苷键组成的二糖。蔗糖是一种营养很丰富的底物, 可通过发酵将其转化为诸如有机醇、氨

基酸及生物聚合物等高附加值的化合物<sup>[3]</sup>。

广西是我国最大的甘蔗产区, 占全国蔗糖产量的 52.8%。因此通过发酵甘蔗蔗糖, 特别是使用糖厂的副产物糖蜜发酵生产燃料乙醇有着得天独厚的优势<sup>[4]</sup>。发酵甘蔗蔗糖生产乙醇不但能解决目前的能源危机, 而且还能带动中国尤其是广西的蔗糖业发展, 同时大大降低乙醇的生产成本, 但是目前酿酒酵母在以废糖蜜生产酒精过程中还存在着多种缺陷<sup>[5,6]</sup>。

目前的研究认为能够作用于蔗糖的酶主要有三类, 即糖基转移酶、蔗糖水解酶和蔗糖磷酸化酶<sup>[7,8]</sup>。蔗糖水解酶又称蔗糖酶, 可以将蔗糖不可逆水解成

收稿日期: 2007-11-12

作者简介: 杜丽琴 (1975-), 女, 讲师, 主要从事生物技术研究工作。

\* 广西科技攻关项目 (桂科攻 0630003 A2), 广西科学基金项目 (桂科青 0640006), 广西大学科研基金项目 (X061060) 资助。

\*\* 通讯作者。

D果糖和 D葡萄糖。蔗糖酶广泛存在于植物当中,有着重要的生理功能<sup>[9,10]</sup>。一些微生物中也含有蔗糖酶。目前,国外已经对某些细菌<sup>[11,12]</sup>、酵母<sup>[13,14]</sup>和丝状真菌<sup>[15-17]</sup>的蔗糖酶的特性和功能进行了相关报道。酿酒酵母的蔗糖酶基因 (*suc 2*)可以转录出两种不同的 mRNA,具有分泌型和组成型两种表达方式,人们对其工业应用尤为感兴趣<sup>[18-20]</sup>。

蔗糖酶是酿酒酵母蔗糖代谢途径中的关键酶之一,也是降解蔗糖的第一个酶。为了提高蔗糖酶转化废蜜的效率,本研究通过基因工程的方法将酿酒酵母的蔗糖酶基因 *suc 2*在大肠杆菌中进行高效表达,期望获得能高效转化蔗糖的工程菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)为本实验室保存。质粒载体 pSE380购自 Invitrogen公司。

#### 1.1.2 培养基

YPD培养基 (2% 蛋白胨, 1% 酵母提取物, pH值 7.0)用于培养酿酒酵母。LB培养基 (1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl, pH值 7.0)用于大肠杆菌培养。

#### 1.1.3 酶与化学试剂

RNase A dNTP购自上海生工生物工程有限公司。Pfu DNA聚合酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶、限制性内切酶 *Eco*R、*Hind*III、大肠杆菌 DNA聚合酶I 为大连 TaKaRa 宝生物工程公司产品。小量胶回收试剂盒及小量 DNA纯化试剂盒为华舜试剂盒产品。PCR引物委托上海生物工程有限公司合成。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 酿酒酵母培养及其总 DNA提取

将酿酒酵母接种到液体 YPD培养基中,30℃摇床培养 18h,然后取 1.5ml 培养液收集菌体,参照文献 [21] 提取总 DNA。

### 1.2.2 质粒酶切、连接、转化 大肠杆菌感受态制备

质粒的酶切、连接、转化、大肠杆菌感受态制备等均按照文献 [22] 进行。

### 1.2.3 酿酒酵母蔗糖酶基因的克隆和表达载体

pSE-*suc2*构建

根据 GenBank 中查到的 *S. cerevisiae* 的蔗糖酶基因 (*suc2*)序列设计用于扩增寡核苷酸引物。

上游引物: 5'-AGAGAATTCATGCACCAC  
CACCACCACCACACAAACGAAACTAGCGA-3'

下游引物: 5'-ACGAAGCTTCTATTTTAC  
TTCCCTTACTTG-3'

为了便于与载体 pSE380连接,在上、下游引物中分别引入 *Eco*R、*Hind*III酶切位点(下划线部分),并且在上游引物中引入 6个组氨酸 (CAC),以便于纯化。PCR条件按照 94℃ 2min,然后 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 2min完成 30个循环,72℃延伸 10min,扩增得到 1.5kb片段用试剂盒纯化后用 *Eco*R、*Hind*III进行消化,然后与用同样酶切过的 pSE380载体连接,转入大肠杆菌 JM109感受态细胞中,经提取质粒,酶切电泳验证,筛选得到重组质粒,命名为 pSE-*suc2*重组质粒经测序分析正确后用于表达。

### 1.2.4 重组菌的表达及其产物的 SDS-PAGE分析

将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21中,同时以 pSE380空载体为对照,挑取单菌落到含氨苄青霉素液体 LB培养基中,37℃振荡培养至 OD<sub>600</sub>为 0.6时,加 IPTG到终浓度 0.1mmol/L,20℃,220r/min摇床中进行诱导表达,20h后取 1.5ml培养液离心收集菌体,分别加 30% 双蒸水和 2× 蛋白电泳上样缓冲液,在沸水上放置 10min,然后 10000r/min离心 1min,取 5μl 进行 SDS-PAGE电泳分析。

### 1.2.5 包含体检测

取 4ml诱导表达后菌液离心收集菌体,用双蒸水洗涤 2次,加入 1.5ml pH值为 6.8的磷酸缓冲液,超声波破胞 10min,菌液变澄清时破胞完全。12000r/min离心 10min,弃上清,沉淀用 500μl 8mol/L尿素溶解,取溶解液进行 SDS-PAGE。

### 1.2.6 粗酶的制备与纯化

将收集到的菌体重悬于 100ml的 0.1mol/L pH值为 6.8的磷酸缓冲液中,加入溶菌酶 0.2g TritonX-100 100μl,37℃摇床破胞 18h,10000r/min离心 15min,取上清液即得粗酶液。

将粗酶液用 0.45μm的滤膜过滤得上清液,通入亲和层析柱 (Amersham, 1.5cm× 5cm),调节流速约每分钟 10滴,通入 200ml结合缓冲液 (含 5mM 咪唑和 300mM 的氯化钠的 50mM 磷酸缓冲液, pH值为 6.8)、200ml洗涤缓冲液 (含 20mM 咪唑和 300mM 的氯化钠的 50mM 磷酸液, pH值为 6.8)去除杂蛋白,最后用洗脱缓冲液 (含 200mM 咪唑、300mM 的氯化钠的 50mM 磷酸缓冲液, pH值为 6.8)洗脱柱子,收集洗脱液。SDS-PAGE电泳检测收集情况及其纯度,所得纯酶液用于酶学性质研究。

### 1.2.7 酶活力测定

以蔗糖为底物,酶反应总体积为 1.0ml (含 0.9ml, pH值 5.0, 0.2mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓

冲液, 90% 1%蔗糖, 10% 1纯酶液), 在 42°C 恒温水浴中保温 30min, 然后用 DNS法测定形成的还原糖量。

蛋白含量的测定采用 Bradford法<sup>[23]</sup>, 以 BSA为 标准样品

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pSE-suc2的构建

以酿酒酵母总 DNA为模板, 用设计引物扩增出 1.5kb大小的片段与实际酿酒酵母的蔗糖酶基因 (suc2)大小相符(图 1) 将扩增到的片段克隆到表达载体 pSE380上, 经 EcoRI、HindIII 酶切鉴定的结果(图 2)表明, 目的片段已经连接到载体 pSE380上。测序分析结果与 GenBank 数据库公布的序列一致, 可以用于表达。该重组质粒命名为 pSE-suc2 该重组质粒的特点是 tac 启动子控制下的蔗糖酶基因与 6个组氨酸融合, 产生的 6x His标记的蛋白就能利用金属螯合层析进行纯化

### 2.2 重组蔗糖酶基因的表达、包含体的检测及诱导条件的优化

重组质粒 pSE-suc2转化到大肠杆菌 BL21, 37°C 经 IPTG 诱导 8h后, 收集菌体, 超声波破胞, 离心收集上清液和沉淀进行 SDS-PAGE的结果是蔗糖酶形成包含体 对含有 pSE-suc2的重组大肠杆菌进行诱导条件优化的结果是: 1mmol/L IPTG, 37°C、220r/min 诱导 8h的产物形成包含体, 0.1mmol/L IPTG, 20°C, 220r/min 诱导 20h的产物则不形成包含体(见图 3)。

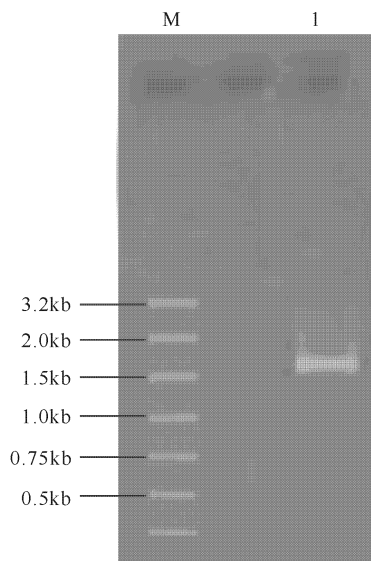


图 1 suc 基因 PCR产物电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1 蔗糖酶基因的 PCR产物。

M: DNA Marker DL2000; 1 PCR products of suc2 gene.

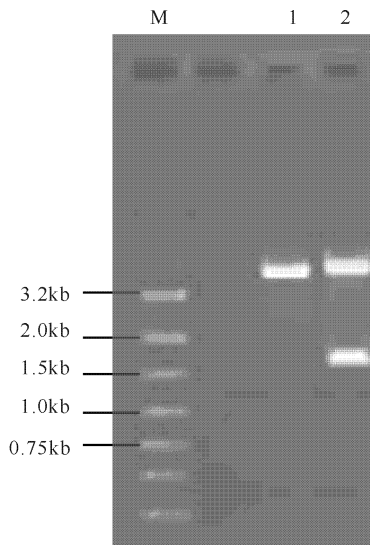


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pSE-suc2 digested EcoRI and HindIII

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1 EcoRI 和 HindIII 酶切 pSE380; 2 EcoRI 和 HindIII 酶切 pSE-suc2

M: DNA Marker DL2000; 1 pSE380 / EcoRI、HindIII ; 2 pSE-suc2 / EcoRI、HindIII.

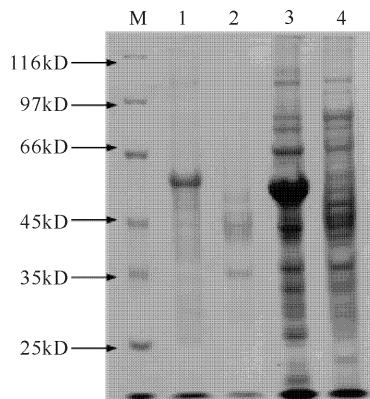


图 3 检测包含体的 SDS-PAGE(10%) 分析结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of inclusion body

M: 蛋白质分子量标准; 1 37°C E. coli BL21/pSE-suc2 超声波破胞后的沉淀物; 2 20°C E. coli BL21/pSE-suc2 超声波破胞后的沉淀物; 3 E. coli BL21/pSE-suc2 的粗酶液; 4 E. coli BL21/pSE380 的粗酶液。

M: Protein marker; 1 Precipitation of E. coli BL21/pSE-suc2 after treatment of ultrasonic(37°C); 2 Precipitation of E. coli BL21/pSE-suc2 after treatment of ultrasonic(20°C); 3 Crude extract of E. coli BL21/pSE-suc2; 4 Crude extract of E. coli BL21/pSE380.

### 2.3 重组蔗糖酶的纯化

在优化的诱导条件下对重组大肠杆菌进行诱导表达, 超声波破胞后离心取上清液进行亲和层析分析, 检测不同柱流分中的蔗糖酶和进行 SDS-PAGE 分析的结果表明, 洗脱缓冲液中检测到蔗糖酶酶活, SDS-PSGE中有单一的目的表达条带(图 4)。

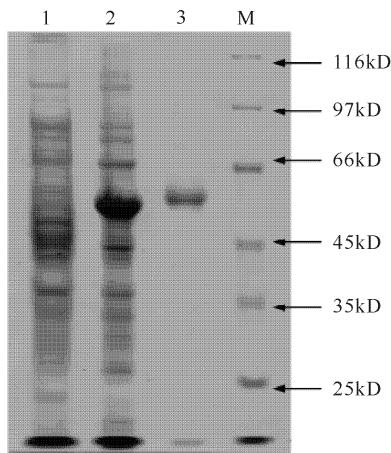


图 4 重组蔗糖酶纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant invertase

M: 蛋白质分子量标准; 1 *E. coli* BL21/pSE380 的粗酶液; 2 *E. coli* BL21/pSE-*suc2* 的粗酶液; 3 亲和层析柱纯化的蔗糖酶。

M: Protein Marker; 1 Crude extract of *E. coli* BL21/pSE380; 2 Crude extract of *E. coli* BL21/pSE-*suc2*; 3 Purification immobilized metal affinity chromatography.

## 2.4 重组蔗糖酶的酶学性质

### 2.4.1 最适的 pH 值和温度

在 pH 值 2~8 缓冲液中进行蔗糖酶酶活测定的结果表明: 重组蔗糖酶的最适 pH 值在 5.5 左右, 在 pH 值为 2 和 8 时, 残留酶活只有 15% (图 5)。

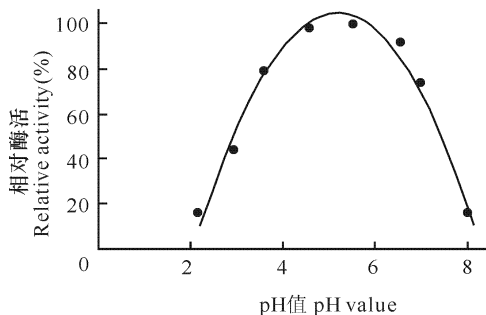


图 5 不同 pH 值对蔗糖酶酶活力的影响

Fig. 5 Effects of pH value on recombinant invertase activity

在 16~70°C 之间测定蔗糖酶催化活性的结果表明, 重组蔗糖酶的最适温度是 42°C, 在 20°C 时, 酶活剩余 75%, 在 70°C 时, 残留酶活为 62% (图 6)。

### 2.4.2 米氏常数 $K_m$

用 1%~6% 的蔗糖在 pH 值 5.5 温度 42°C 条件下与纯酶液作用 30min, 用双倒数作图法求得重组蔗糖酶的表观米氏常数  $K_m$  为 47.73mmol/L, 最大反应速率  $V_{max}$  为 79.59mg 还原糖  $mg^{-1}$  蛋白  $min^{-1}$  (图 7)。

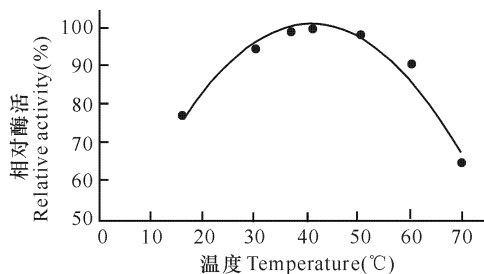


图 6 不同温度对蔗糖酶酶活力的影响

Fig. 6 Effects of temperature on recombinant invertase activity

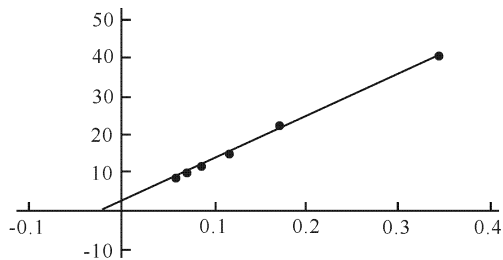


图 7 重组蔗糖酶的表观米氏常数  $K_m$

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot for  $K_m$  value of recombinant invertase

$$y = 112.36x - 2.3539, R^2 = 0.9975$$

### 2.4.3 不同金属离子对酶活的影响

将配制好的 5mmol/L 二价金属离子 ( $Co^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) 三价金属离子 ( $Fe^{3+}$ ) 溶液 25 $\mu$ l 与 10 $\mu$ l 的纯酶液混合, 37°C 作用 1h 后, 加入 90 $\mu$ l 底物反应 30min 后测定产生还原糖含量 (以不加金属离子而加等体积酶反应体系作对照) 的结果 (图 8) 表明,  $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对重组蔗糖酶稍有激活作用, 而  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对重组蔗糖酶酶活有较强的抑制作用, 当  $Zn^{2+}$  存在时重组蔗糖酶的酶活剩余 2%,  $Cu^{2+}$  存在时重组蔗糖酶残留酶活只有 55%。

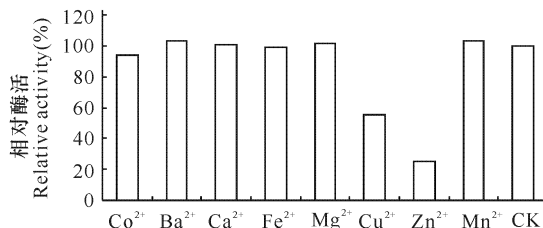


图 8 金属离子对蔗糖酶酶活的影响

Fig. 8 Effects of metal ions on invertase activity

## 3 结论

以酿酒酵母总 DNA 为模板, 用设计引物扩增出 1.5kb 大小的片段与实际酿酒酵母的蔗糖酶基因 (*suc2*) 大小相符。应用基因工程的方法可以克隆出酿酒酵母的蔗糖酶基因。

克隆到的酿酒酵母蔗糖酶 *suc2* 基因在大肠杆菌中成功地得到高效表达, SDS-PAGE 结果显示, 20°C

诱导重组酶的表达量占总蛋白的 35% ,实现了 *suc 2* 在大肠杆菌中的高效可溶性表达。

重组蔗糖酶的最适 pH 值为 5.5,最适温度是 42°C ,  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对重组蔗糖酶酶活有较强的抑制作用,当  $Zn^{2+}$  存在时重组蔗糖酶的酶活剩余 22% , $Cu^{2+}$  存在时重组蔗糖酶残留酶活只有 55%。这是造成工业生产中酵母发酵蔗糖糖蜜生产酒精转化率降低的主要原因。工业生产中使用酵母发酵的废糖蜜中含有各种重金属离子,尤其是  $Cu^{2+}$  含量特别高<sup>[24]</sup>, $Cu^{2+}$  抑制蔗糖酶的酶活,从而导致蔗糖的转化效率大大降低。

大肠杆菌遗传背景清楚,分子生物学操作方便,因此,本研究以大肠杆菌为宿主,克隆和高效表达了酵母的蔗糖酶基因,并测定得知重组蔗糖酶的酶学性质,其目的就是为下一步利用计算生物学对蔗糖酶的活性位点进行理性进化改造,使得该蔗糖酶对某些金属离子,特别是对重金属  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  不敏感,从而将会大大改进酵母发酵糖蜜生产酒精的抑制程度,提高酒精产率。

#### 参考文献:

[1] Eggersdorfer M, Meyer J, Eches P. Use of renewable resources for non-food materials [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1992, 103(2-4): 355-364.

[2] Morris D J, Ahmed I. The carbohydrate economy: making chemicals and industrial materials from plant matter [M]. Washington D C: Institute of Local Self Reliance, 1992.

[3] Birgit Kamm, Patrick R Gruber, Michael Kamm. Biorefineries-industrial processes and products [M]. Wiley-VCH Verlag GmbH, Co K Ga A, Weinheim, Germany, 2006.

[4] 黎锡流,曾利容. 甘蔗糖厂综合利用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998 2

[5] Hu X H, Wang M H, Tan T. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The Genetics Society of America Genetics, 2007, 175(3): 1479-1487.

[6] Simona Belviso, Laura Bardi, Alessandra Biondi Bartolini, et al. Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(9): 669-674.

[7] Steinmetz M. Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution [M] // Sonenshein A L(ed). *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. ASM, Washington, 1993 157-170.

[8] Kitaoka M, Hayashi K. Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes [J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2002, 14(75): 35-50.

[9] Winter H, Huber S C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 35(4): 253-289.

[10] Vargas W, Cumino A, Salerno LS. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases: Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol [J]. Planta, 2003, 216(6): 951-

960.

[11] V´asquez-Bahena J M, Vega-Estrada J, Santiago-Hern´andez J A, et al. Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 40(1): 61-66.

[12] Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, et al. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(18): 18903-18910.

[13] Belcarz A, Ginalska G, Lobarzewski J, Penel C. The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594(1): 40-53.

[14] Herwig C, Doerries C, Marison I, et al. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 76(3): 247-258

[15] Montiel-Gonz´alez A M, Fern´andez F J, Viniestra-Gonz´alez G, et al. Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 102-103(1-6): 63-70.

[16] Chaudhuri A, Maheshwari R. A novel invertase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: its requirement of thiol and protein for activation [J]. Archive Biochemistry and Biophysics, 1996, 327(1): 98-106.

[17] Nuero O M, Reyes F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture [J]. Letter in Applied Microbiology, 2002, 34(6): 413-416.

[18] Tanaka H, Kamogawa T, Aoyagi H, et al. Invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts immobilized in strontium alginate gel beads [J]. Journal Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(5): 498-500.

[19] Valencia C, Espinosa G, Giral J, et al. Optimization of invertase production in a fed-batch bioreactor using simulation based dynamic programming coupled with a neural classifier [J]. Computers and Chemical Engineering, 2007, 31(9): 1131-1140.

[20] Tomotani E J, Vitolo M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(2): 662-667.

[21] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short protocols in Molecular Biology (3rd ed) [M]. [S. l. ] John Wiley & Sons Inc, 1995.

[22] Sambrook J, W Russell D. Molecular cloning-A laboratory manual [M]. third edition. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

[23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[24] 王进,刘慧霞,李坚斌,等. 糖蜜酒精废液回用中重金属对酒精发酵的影响 [J]. 酿酒, 2004, 31(3): 22-24.

(责任编辑: 邓大玉)