

· 生物育种与工艺优化 ·

双酶偶联转化富马酸制备 β -丙氨酸的工艺的建立与优化

高宇, 刘中美, 刘克, 周哲敏, 崔文璟

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

高宇, 刘中美, 刘克, 等. 双酶偶联转化富马酸制备 β -丙氨酸的工艺的建立与优化. 生物工程学报, 2017, 33(5): 875–879.

Gao Y, Liu ZM, Liu K, et al. Biocatalytic access to β -alanine by a two-enzyme cascade synthesis. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 875–879.

摘要: 酶转化法是生产 β -丙氨酸的重要途径, 但单一酶法转化存在底物价格较高的问题。通过构建双酶催化体系制备 β -丙氨酸, 即将来源于大肠杆菌的天冬氨酸酶 (AspA) 和来源于谷氨酸棒杆菌的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 偶联, 以富马酸和氨为底物进行酶促反应合成 β -丙氨酸。催化反应中 AspA 与 PanD 的最适加酶比例为 1 : 80, 其中 AspA 的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 转化温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 为 7.0; 浓度为 100 mmol/L 的富马酸可在 8 h 内被完全转化, 转化率为 100%, 摩尔产率为 90.9%, β -丙氨酸的产量为 90 mmol/L, 约为 7 g/L; 浓度为 200 mmol/L 的富马酸在反应 8 h 后, 体系中 β -丙氨酸的产量为 126 mmol/L, 约合 9.8 g/L, 继续延长反应时间, 转化率并没有明显提高。根据该研究提出的双酶偶联转化工艺可将价格低廉的富马酸一步转化为具有高附加值的 β -丙氨酸。

关键词: 天冬氨酸酶, L-天冬氨酸 α -脱羧酶, β -丙氨酸, 天冬氨酸酶, 双酶偶联

Biocatalytic access to β -alanine by a two-enzyme cascade synthesis

Yu Gao, Zhongmei Liu, Ke Liu, Zhemin Zhou, and Wenjing Cui

College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Enzymatic synthesis is an important way to produce β -alanine, but the biological method is expensive generally because of the high price of substrate. In this paper, a two-step enzymatic cascade system was developed, combining L-aspartase from *Escherichia coli* DH5 α and L-aspartate α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. This system catalyzes Fumarate and ammonia to β -alanine. The optimal ratio of AspA and PanD was 1:80 (*W/W*), and the concentration of AspA was 10 $\mu\text{g/mL}$, at 37 $^{\circ}\text{C}$ and pH 7.0. When the concentration of Fumarate was 100 mmol/L, the reaction reached its equilibrium after 8 h, and the yield of β -alanine was 90 mmol/L (7 g/L). The yield of β -alanine can reach 126 mmol/L (9.8 g/L) when the concentration of Fumarate increased to 200 mmol/L. Extending reaction time, the conversion rate did not change obviously. Using this two-step enzymatic cascade system, β -alanine from cheaper substrate Fumarate can be obtained.

Keywords: L-aspartase, L-aspartate α -decarboxylase, β -alanine, L-aspartase, enzyme cascade

β -丙氨酸是自然界中唯一存在的 β -型氨基酸, 也是一种非蛋白氨基酸, 存在于某些细菌、真菌和

植物中^[1]。 β -丙氨酸及其衍生物在医药、食品、化工等领域都有着广泛的应用。在医药方面, β -丙氨酸

Received: November 1, 2016; **Accepted:** January 24, 2017

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021304), National Natural Science Foundation of China (No. 31400078).

Corresponding author: Wenjing Cui. Tel/Fax: +86-510-85197551; E-mail: wjcui@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021304), 国家自然科学基金 (No. 31400078) 资助。

用于合成泛酸、泛酸钙、肌肽、帕米膦酸钠和巴柳氮等^[2]；在化工方面应用于电镀、铅中毒解毒剂及合成甜味剂^[3]。国内外 β-丙氨酸的生产主要以化学合成法为主^[4]，即以丙烯酸或丙烯腈为底物进行合成，此法生产过程中消耗大量能量，同时对环境和生物体都有一定的毒害作用。另一种生产方法是生物合成法，利用 L-天冬氨酸 α-脱羧酶 (L-aspartate α-decarboxylase, EC4.1.1.11, PanD)、以 L-天冬氨酸为底物催化生成 β-丙氨酸^[5]，此法专一性高且环保，缺点是 L-天冬氨酸价格偏高。

L-天冬氨酸 α-脱羧酶催化 L-天冬氨酸脱去 α 位的羧基生成 β-丙氨酸，是生物体内泛酸合成途径中重要的酶。诸多报道对不同来源的 PanD 进行了详细的研究^[6-8]，其中来源于谷氨酸棒杆菌的 PanD 酶是一类依赖于丙酮酰基的四聚体脱羧酶，其特点为酶活高且能够在菌体内进行自裂解。酶法制备 β-丙氨酸的研究中，浙江工业大学张潇潇^[9]通过将钝齿棒杆菌来源 panD 基因重组到大肠杆菌中进行表达并优化条件，最终 β-丙氨酸的产量达到 76.47 mg/L；华东理工大学范海洋^[10]优化大肠杆菌来源 PanD 重组菌，将产量提高至 130 mg/L；浙江工业大学楼坚等^[11]最终将发酵液中 β-丙氨酸的产量提高至 649 mg/L。

工业生产天冬氨酸，主要是由天冬氨酸酶 (L-Aspartase, EC4.3.1.1, AspA) 催化富马酸加氨合成 L-天冬氨酸。大肠杆菌来源 AspA 由 4 个相同的亚基组成，单体分子量为 50 kDa 左右。AspA 催化富马酸加氨合成 L-天冬氨酸的反应为可逆反应，所以富马酸不能完全转化为 L-天冬氨酸^[12-13]。

因为富马酸价格较天冬氨酸低廉，本研究以富马酸和氨水为底物，构建 AspA 和 PanD 双酶偶联制备 β-丙氨酸体系。通过条件优化，确定了最适酶比例和最适底物浓度，使整个反应体系中无中间产物 L-天冬氨酸积累，将价格低廉的富马酸转化为目的产物。本研究为制备 β-丙氨酸提供了新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基

重组菌株 *E. coli* BL21 pET-28a-*aspA* 和 *E. coli* BL21 pET-24a-*panD*，均为实验室前期构建。

E. coli 的种子培养基为 Luria-Bertani (LB) 培养基，诱导培养基为 Terrific-Broth (TB) 培养基。

1.1.2 生化试剂

富马酸、L-天冬氨酸钠、β-丙氨酸均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PanD 酶的表达

将重组大肠杆菌 BL21/pET24a-*panD* 接种于 4 mL 卡那霉素浓度为 100 μg/mL 的 TB 培养基，37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。将上述过夜培养物按 1% 的接种量接种于含卡那霉素浓度为 100 μg/mL 的 TB 培养基，37 °C、200 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600} 至 0.6–0.8，加入 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L，37 °C 诱导培养 16–20 h，收集菌体超声破碎，通过 Tris-tricine SDS-PAGE 方法^[14]分析鉴定重组蛋白表达水平。

1.2.2 AspA 酶的表达

将重组大肠杆菌 BL21/pET28a-*aspA* 接种于 4 mL 卡那霉素浓度为 100 μg/mL 的 TB 培养基，37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。将上述过夜培养物按 1% 的接种量接种于含卡那霉素浓度为 100 μg/mL 的 TB 培养基，37 °C、200 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600} 为 0.6–0.8，加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L，24 °C 诱导培养 16–20 h，收集菌体超声破碎，通过 SDS-PAGE 分析鉴定重组蛋白表达水平。

1.2.3 重组蛋白的纯化和鉴定

将重组菌体溶于结合缓冲溶液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 、50 mmol/L NaH_2PO_4 、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑)，超声破碎，离心，上清用 0.22 μm 滤膜过滤。用 10 倍柱体积的结合缓冲溶液平衡 5 mL 的 His Trap HF 柱，取 20 mL 的破碎上清上样，用 10 倍柱体积的结合缓冲溶液洗去非特异性吸附的蛋白，分别用 8 倍柱体积的 150、300 和 500 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱蛋白，收集样品后用透析袋密封，置于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中 4 °C 透析 6–8 h，去除残余咪唑，并用 SDS-PAGE 分析鉴定。

1.2.4 蛋白浓度的测定

蛋白质定量采用常规的 Bradford 法^[15]。

1.2.5 L-天冬氨酸及 β-丙氨酸的测定

反应液用苯基异硫酸酯 (PITC) 衍生，具体步骤为：取 500 μL 反应液于 1.5 mL 离心管，加入 250 μL 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液和 250 μL 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液，充分混匀，避光室温放置 0.5 h，加入 700 μL 正己烷溶液，涡旋振荡器振荡 1 min，静置 30–60 min，吸取下层溶液，经 0.22 μm 有机滤膜过滤，进样量为 10 μL^[16]。

β-丙氨酸衍生产物用 HPLC 测定^[17]。色谱柱为 La Chrom C18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm)；流动相 A 溶液为 80% (V/V) 己腈水溶液，B 溶液为 97 : 3 (V/V, pH 6.5) 的 0.1 mol/L 乙酸钠-乙腈溶液；采用

梯度洗脱：0–20 min，B 溶液由 95% 下降到 65%；20–30 min，B 液由 65% 上升到 95%；30–35 min，B 溶液梯度不变。检测波长为 254 nm，柱温为 40 °C。所测得衍生产物的含量等同于衍生前物质的含量。

1.2.6 富马酸的测定

反应液经 0.22 μm 有机滤膜过滤后用 HPLC 检测，色谱柱为 Prevail Organic Acid (OA) 有机酸分析柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm)。流动相为 20% 甲醇溶液 (磷酸调 pH 至 2.2)，流速为 0.6 mL/min，检测波长为 220 nm，柱温为 40 °C，检测时间为 15 min，进样量为 10 μL。

1.2.7 AspA 催化富马酸生成 L-天冬氨酸

取 20 μL AspA 酶液 (0.5 mg/mL) 加到终浓度为 50 mmol/L 的 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7.0) 缓冲液中，然后在该体系中加入 100 μL 浓度为 500 mmol/L 的富马酸 (NH₄调 pH 至 7.0)、10 μL 浓度为 100 mmol/L 的 MgCl₂、无菌水补足 1 mL 反应体系，37 °C、200 r/min 下进行酶促反应 (振荡反应)，终止反应时取适量反应液于 100 °C 煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，用 0.22 μm 微孔有机滤膜过滤，利用 HPLC 检测产物生成量。

1.2.8 PanD 催化 L-天冬氨酸合成 β-丙氨酸反应进程的测定

取 200 μL PanD 酶液 (2 mg/mL) 加到终浓度为 50 mmol/L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 7.0) 中，然后在该体系中加入 100 μL 浓度为 500 mmol/L 的 L-天冬氨酸溶液，最后用无菌水补足至 1 mL 反应体系，37 °C、200 r/min 下进行酶促反应 (振荡反应)，终止反应时取适量反应液于 100 °C 煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，用 0.22 μm 微孔有机滤膜过滤，利用 HPLC 检测产物生成量。

1.2.9 双酶串联反应

在含有一定浓度的底物富马酸和足量氨 (调 pH 至 7.0) 的 10 mL 反应液中，加入一定比例的两种酶，反应体系中含有 1 mmol/L 的 MgCl₂，50 mmol/L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 7.0)，37 °C、200 r/min 下进行酶促反应 (振荡反应)，终止反应时取适量反应液于 100 °C 煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，用 0.22 μm 微孔有机滤膜过滤，利用 HPLC 检测反应液中各成分的含量，计算 β-丙氨酸的产率。

2 结果与分析

2.1 酶的表达和纯化

携带 *aspA* 和 *panD* 目的基因的重组大肠杆菌经

IPTG 诱导后表达，细胞超声破碎后的细胞破碎液经亲和柱纯化后，得到电泳纯的重组蛋白。结果如图 1A 所示，纯化后的 AspA 蛋白为 50 kDa 左右，与 AspA 的理论分子量一致。

Tris-tricine 电泳 (图 1B) 结果显示大部分 PanD 单体已自身裂解为 α 亚基 (12.4 kDa) 和 β 亚基 (2.8 kDa)。β 亚基在 Tris-tricine 凝胶上发生一定的迁移，是由于分子量小的蛋白形成球形，其较高的多肽内部的电荷不能被结合的 SDS 电荷所覆盖，所以偏离了相对迁移率和分子量对数的相互关系。电泳结果表明，在大肠杆菌中成功表达了大肠杆菌来源的 *aspA* 和谷氨酸棒杆菌来源的 *panD*。

2.2 双酶偶联催化富马酸生成 β-丙氨酸

2.2.1 AspA 催化富马酸加氨生成 L-天冬氨酸

10 μg/mL 的 AspA 纯酶催化 50 mmol/L 的富马酸，结果如图 2 所示。催化反应在 2 h 后即达稳定状态，由于该反应是可逆反应，即使延长反应时间，L-天冬氨酸的摩尔产率仍为 75%。

2.2.2 PanD 催化 L-天冬氨酸合成 β-丙氨酸

400 μg/mL PanD 催化 L-天冬氨酸合成 β-丙氨酸的反应情况如图 3 所示，50 mmol/L 底物可在 8 h 内完全转化为 L-天冬氨酸，转化率约为 98%。

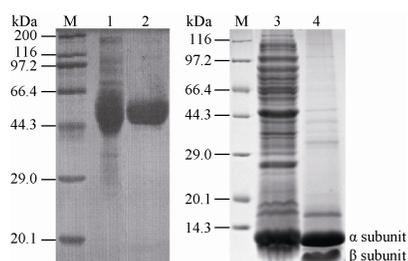


图 1 重组蛋白及纯化电泳鉴定

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins and purified proteins. M: marker; 1: supernatant of *E. coli* pET28a-*aspA* cell; 2: purified AspA; 3: supernatant of *E. coli* pET24a-*panD*; 4: purified PanD.

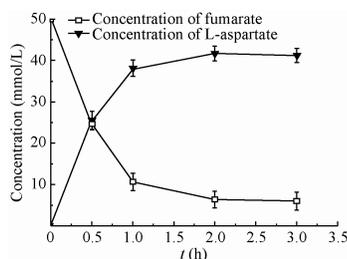


图 2 AspA 催化富马酸生成 L-天冬氨酸

Fig. 2 AspA catalyzes fumarate.

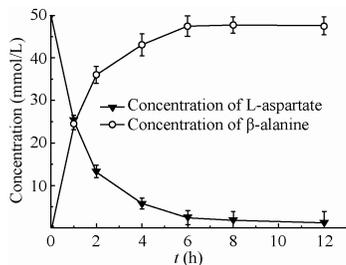


图3 PanD 催化 L-天冬氨酸生成 β -丙氨酸
Fig. 3 PanD catalyzes L-aspartate.

2.3 优化两种酶比例

上述结果可知, PanD 的酶活较 AspA 低, 催化反应进行较慢, 是双酶体系中的限速酶。PanD 的最适反应温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 为 7.0 左右^[18], 而 AspA 的最适条件分别为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 pH 8.0 左右^[19]。由于偶联反应时间较长, 考虑到蛋白酶在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的反应 12 h 酶活损失严重, 设定双酶偶联体系反应条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0。

在双酶偶联催化体系中, 固定富马酸浓度为 50 mmol/L , AspA 的添加浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, 调整 PanD 的添加量, 使 AspA 与 PanD 的加酶质量比分别为 1:40、1:60、1:80, 进行双酶偶联反应。

结果如图 4 所示, 在 1:40 和 1:60 (W/W) 的反应体系中, 反应 8 h, β -丙氨酸的产率只有 82% 和 93%, 且尚有部分中间产物未完全转化, 留在反应体系中, 反应至 12 h, 1:40 的反应体系中仍有中间产物。

而在 1:80 的反应体系中, 反应 8 h, 富马酸可完全转化为 β -丙氨酸, β -丙氨酸的产率 $>95\%$, 中间产物 L-天冬氨酸无残余。

随着 PanD 浓度的提高, β -丙氨酸的合成速度大大增加, 且中间产物 L-天冬氨酸的残余量减少。综合考虑选择 1:80 (W/W) 作为最适浓度比。

2.4 优化底物富马酸浓度

前期研究以 50 mmol/L 的富马酸为底物进行酶促反应研究, 此浓度无法满足高浓度制备 β -丙氨酸的要求, 故将 AspA 和 PanD 按照 1:80 (W/W) 的比例催化浓度为 50、100、200 mmol/L 的富马酸, HPLC 检测 β -丙氨酸含量 (表 1)。同时监测了 200 mmol/L 富马酸反应进程中富马酸、天冬氨酸与 β -丙氨酸的变化情况 (图 5)。

表 1 结果显示, 底物浓度为 50 mmol/L 时, 酶促反应能在 8 h 内转化率达 100%; 底物浓度为 100 mmol/L 时, 8 h 内摩尔生成率为 90%, 合成 β -丙氨酸的浓度为 90 mmol/L , 24 h 后 β -丙氨酸的产

率在 95% 左右; 当底物浓度增加至 200 mmol/L 时, 反应速度明显减缓, 8 h 内 β -丙氨酸的摩尔生成率为 62%, 体系中 β -丙氨酸的浓度为 126 mmol/L , 延长反应时间至 24 h 后, β -丙氨酸的摩尔生成率为 70%。图 5 结果显示底物浓度为 200 mmol/L 时, 反应 12 h 后残余约 40 mmol/L 的中间产物 L-天冬氨酸, 我们推测是由于高浓度的 β -丙氨酸对 PanD 酶有抑制作用, 使得 β -丙氨酸得率在高浓度底物条件下反而降低至 62%。

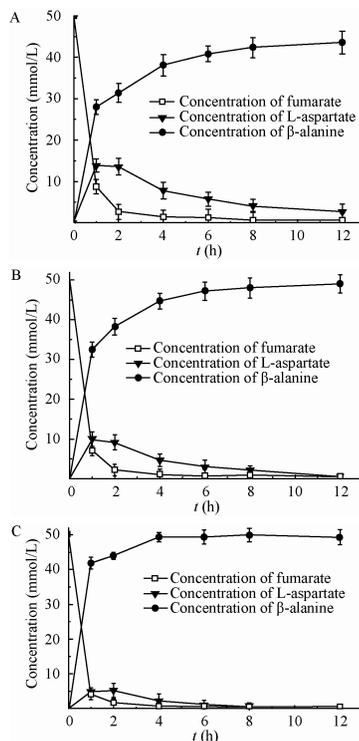


图4 不同酶浓度比例下的双酶偶联催化
Fig. 4 Enzyme cascade synthesis with different ratio. (A) AspA: PanD was 1:40 (W/W); (B) The ratio of AspA and PanD was 1:60 (W/W); (C) The ratio of AspA and PanD was 1:80 (W/W).

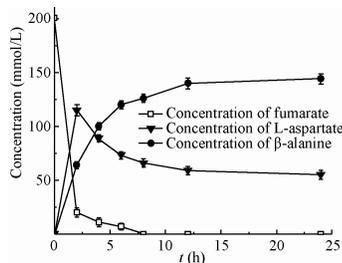


图5 双酶偶联体系催化 200 mmol/L 富马酸
Fig. 5 Enzyme cascade synthesis 200 mmol/L fumarate.

表1 不同底物浓度下双酶偶联体系转化生成 β -丙氨酸的浓度Table 1 The production of β -alanine under different concentration of fumarate

Fumarate (mmol/L)	6 h (mmol/L)	8 h (mmol/L)	12 h (mmol/L)	24 h (mmol/L)
50	49.3±2.1	49.5±1.8	49.6±1.2	49.9±1.1
100	87.2±4.4	89.5±3.8	90.9±2.5	94.1±2.6
200	120.0±5.6	126±3.4	140.6±4.6	143.4±3.2

双酶偶联酶促反应的转化率随着时间的延长而增加,但由于反应逐渐趋于平衡,且振荡反应过程中部分酶会失活,24 h后反应体系中可明显观察到白色悬浮物,推断为蛋白酶变性沉淀。

3 结论

本文利用 AspA 和 PanD 构建双酶偶联反应体系,催化底物富马酸合成 β -丙氨酸。通过优化反应条件,确定最佳反应条件:100 mmol/L 富马酸,AspA 与 PanD 比例为 1:80 其中 AspA 的浓度为 10 μ g/mL,温度 37 $^{\circ}$ C, pH 7.0。此条件下,8 h 时 β -丙氨酸的浓度为 90 mmol/L,约合 7 g/L。提高富马酸浓度为 200 mmol/L,8 h 底物的摩尔生成率为 63%, β -丙氨酸的浓度约为 126 mmol/L,约合 10 g/L,相较之前的研究有显著的提高。然而就工业生产而言, β -丙氨酸的产量仍有很大提升空间。有文献报道真核来源的 PanD 酶具有更高的催化活性,下一步将考虑用真核来源 PanD 酶替代谷氨酸棒杆菌来源的 PanD 酶,进一步提高 β -丙氨酸的产量。同时,细胞催化具有可重复利用、操作简便等优点,建立并优化全细胞催化工艺是下一步研究方向。

REFERENCES

- [1] Fouad WM, Altpeter F. Transplastomic expression of bacterial L-aspartate- α -decarboxylase enhances photosynthesis and biomass production in response to high temperature stress. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 707–718.
- [2] Stuecker TN, Tucker AC, Escalante-Semerena JC. PanM, an acetyl-coenzyme A sensor required for maturation of L-aspartate decarboxylase (PanD). *mBio*, 2012, 3(4): e00158-12.
- [3] Luo JX, Xue JP, Shen YC. Synthesis and application of β -alanine. *Amino Acids Biotic Resour*, 2005, 27(1): 52–55 (in Chinese). 罗积杏, 薛建萍, 沈寅初. β -氨基丙氨酸的合成与应用. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(1): 52–55.
- [4] Buc SR, Ford JH, Wise EC. An improved synthesis of β -alanine. *J Am Chem Soc*, 1945, 67(1): 92–94.
- [5] Shen Y, Zhao LZ, Li YR, et al. Synthesis of β -alanine from L-aspartate using L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(8): 1681–1686.
- [6] Williamson JM, Brown GM. Purification and properties of L-Aspartate- α -decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of β -alanine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1979, 254(16): 8074–8082.
- [7] Dusch N, Pühler A, Kalinowski J. Expression of the *Corynebacterium glutamicum* panD gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1530–1539.
- [8] Chopra S, Pai H, Ranganathan A. Expression, purification, and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* aspartate decarboxylase, PanD. *Protein Expr Purif*, 2002, 25(3): 533–540.
- [9] Zhang XX. Cloning and expression of L-aspartate α -decarboxylase gene in *C. crenatum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2008 (in Chinese). 张潇潇. 钝齿棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的克隆与表达[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2008.
- [10] Fan HY. Preparation and application of recombinant *Escherichia coli* L-aspartate- α -decarboxylase[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese). 范海洋. 重组大肠杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的制备及应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [11] Shi WX, Dunbar J, Jayasekera MMK, et al. The structure of L-aspartate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1997, 36(30): 9136–9144.
- [12] Lou J. Study on production β -alanine by biotransformation[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2006 (in Chinese). 楼坚. 生物转化法生产 β -丙氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2006.
- [13] Lin L, Zhang J. The isolation, purification and properties of high activity aspartase. *Acta Sci Nat Univ Jilinensis*, 1999, (2): 75–78 (in Chinese). 林琳, 张今. 高活力天冬氨酸酶分离提纯及性质. *吉林大学自然科学学报*, 1999, (2): 75–78.
- [14] Cao ZW. An effective method of Tricine-SDS-PAGE for separating the 1kDa peptide. *China Biotechnol*, 2004, 24(1): 74–76 (in Chinese). 曹佐武. 有效分离 1kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(1): 74–76.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [16] Yang Y, Qin Q, Guo WZ. Separation and quantitative analysis of amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high performance liquid chromatography (HPLC). *Chin J Chromatogr*, 1994, 12(4): 295–296 (in Chinese). 杨扬, 秦强, 郭伟忠. 苯基异硫氰酸酯衍生氨基酸的高效液相色谱分析. *色谱*, 1994, 12(4): 295–296.
- [17] Ramjee MK, Genschel U, Abell C, et al. *Escherichia coli* L-aspartate- α -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry. *Biochem J*, 1997, 323(3): 661–669.
- [18] Shi ZX, Cui WJ, Zhou L, et al. Cloning and characterization of L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bull*, 2013, (4): 110–115 (in Chinese). 石增秀, 崔文璟, 周丽, 等. 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶基因的克隆及重组酶性质研究. *生物技术通报*, 2013, (4): 110–115.
- [19] Ren HY, Li XJ, Yang DY, et al. Study on fusion expression of aspartase in *E. coli*. *Amino Acids Biotic Resour*, 2012, 34(1): 13–15, 20 (in Chinese). 任慧颖, 黎小军, 杨丹燕, 等. 天冬氨酸酶 *E. coli* 融合表达研究. *氨基酸和生物资源*, 2012, 34(1): 13–15, 20.

(本文责编 郝丽芳)