

Ogataea minuta 来源的内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的异源表达和纯化

贾元苓, 喜多岛敏彦, 李子杰, 高晓冬, 中西秀树*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在大肠杆菌中表达有活性的 *Ogataea minuta* 来源的内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo-Om), 利用 pET 系统过量表达 Endo-Om。在优化宿主菌及培养条件后, 镍柱纯化目的蛋白质, 并检测纯化后的 Endo-Om 对荧光标志的寡糖链的水解活性。经 IPTG 诱导后, 目的蛋白质可以很好地表达, 但大部分存在包涵体中。通过培养条件优化, 16 °C 在 Overnight Express™ Instant LB 培养基(默克)中培养, 实现了 Endo-Om 在大肠杆菌中的可溶性表达和纯化, 并检测到了纯酶的水解活性。在大肠杆菌中成功纯化了有活性的 Endo-Om 蛋白, 为加速研究该酶的结构和功能奠定了基础。

关键词: Endo-Om; 异源表达; 纯化

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)12-1313-06

Heterologous Expression and Purification of Endo-Beta-N-Acetylglucosaminidase from *Ogataea minuta*

JIA Yuanling, KITA JIMA Toshihiko, LI Zijie, GAO Xiaodong, NAKANISHI Hideki*

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

Abstract: To express active endo-beta-N-acetylglucosaminidase (ENGase) from methylotrophic yeast *Ogataea minuta* (Endo-Om) in *Escherichia coli*. The Endo-Om was overexpressed by using pET system. After optimizing host strain and culture condition, we purified the recombinant protein by using Ni²⁺ metal chelating column. Using the purified Endo-Om, ENGase activity against fluorescent-labeled oligosaccharide was measured. The recombinant protein was well expressed by IPTG induction, however, the majority remained in the insoluble fraction. The insolubility of the recombinant was improved by culturing the *E. coli* cells in Overnight Express™ Instant LB Medium (Merck Millipore) at 16 °C. The purified protein showed hydrolysis activity to the fluorescent-labeled oligosaccharide. The functional Endo-Om was successfully obtained in this study, it could

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 教育部科学技术研究重大项目(313027); 中央高校基本科研业务费资助(JUSRP11542)。

* 通信作者: 中西秀树(1973—), 男, 日本人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子生物学和酵母孢子方面的研究。

E-mail: hidekinakanishi@hotmail.com

引用本文: 贾元苓, 喜多岛敏彦, 李子杰, 等. *Ogataea minuta* 来源的内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的异源表达和纯化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1313-1318.

accelerate the study on its structural and biological function.

Keywords: endo-beta-N-acetylglucosaminidase, heterologous protein expression, purification

糖基化是一种普遍存在于真核生物中的蛋白质翻译后修饰^[1],糖链对糖蛋白的生化性质具有重要的作用。随着糖组学的发展,对糖链结构和功能的研究越来越多。然而,天然糖肽和糖蛋白上的糖链结构复杂,并呈现多样性,因而很难从中纯化出带有均一糖链的糖肽或糖蛋白^[2]。目前,化学酶合成法尤其是利用内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(ENGase)来合成此类糖肽或糖蛋白是发展较快且具有实践意义的方法^[3]。

ENGase(EC 3.2.1.96)是一类糖苷酶,其可以水解N糖链上两个N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)之间的 β -1-4糖苷键^[4]。在CAZY数据库中,ENGases被分成了糖苷水解酶(GH)两大家族,即GH18和GH85^[4]。褶皱链霉菌(*Streptomyces plicatus*)来源的Endo-H(Tarentino and Maley 1974),酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)来源的Endo-S(Collin and Olsén 2001),里氏木霉(*Trichoderma reesei*)来源的Endo-T(Stals et al 2010)等都从属于GH18家族,GH85家族的酶包括原玻璃蝇节杆菌(*Arthrobacter protophormiae*)来源的Endo-A(Takegawa et al 1997),肺炎双球菌(*Streptococcus pneumoniae*)来源的Endo-D(Muramatsu et al 2001)及冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)来源的Endo-M(Fujita, Kobayashi et al 2004)等。与GH18家族不同的是,GH85家族的酶不仅具有糖苷水解酶的活性,同时还具有将糖链转移到GlcNAc受体上的转糖基酶活性^[5]。近几年来,ENGases的转糖基活性成为研究的热点。利用该酶的活性合成带有均一糖链的糖蛋白或糖肽,可以用于糖链结构和功能的研究^[6-7]。Endo-M和Endo-A都已多次被应用,例如合成了糖基化的将血钙素^[8]、带有完整N-糖链的CD52抗原^[9]等。但它们也存在着局限性,如Endo-A倾向于识别高甘露型的糖链^[10],已经商业化的Endo-M虽作用的底物范围较广,但难获得大量的纯酶^[11],价格昂贵。

最近,Murakami等发现*Ogataea minuta*中存在内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo-Om),其从属于GH85家族,不仅可以识别高甘露糖型的糖链同时还可作用于复合型的糖链^[12]。Endo-Om是一种胞

质蛋白,并且没有被糖基化修饰。因此,我们选用大肠杆菌表达Endo-Om,以期解决ENGase产量低、成本高等问题。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和培养基

E. coli DH5 α : 由作者所在实验室保存;BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS: 均购于博迈德公司;pOMEA1-6H3F-Endo-Om、pET 30a: 日本AIST提供。

LB培养基: 酵母粉5 g,胰蛋白胨10 g,氯化钠10 g,琼脂粉20 g(固体),加水定容至1 L,121℃高压灭菌15 min;Overnight Express™ instant LB(O/N instant LB)培养基(novogen): 称取50 g粉末溶于1 L ddH₂O中,加入10 mL甘油,121℃灭菌15 min。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:T4DNA连接酶、KOD聚合酶、rTaq酶、各种限制性内切酶: 均购于TaKaRa公司;EasySee Western Marker: 购于北京金生物技术有限公司;Precision Plus Protein™ Standards: BIO-RAD。

主要仪器: 高效液相色谱仪: Waters;蛋白质纯化系统AVANT;AKTA; iMark酶标仪: BIO-RAD。

1.3 表达载体pET30-10H3F-EOm的构建

质粒pOMEA1-6H3F-Endo-Om(Murakami et al, 2013)作为模板,使用正向引物AAGGAGATATACATATGCATCACCATCACCATCACCATCACCATCCGACTACAAAGACCATGACGG和反向引物TGCTCGAGTGGCGCCGCTCACACCCAAACCTCACTC(下划线分别为Nde I和Not I的酶切位点)对其进行PCR扩增,获得编码N端带有10His和3Flag的Endo-Om基因片段。用Nde I和Not I限制性内切酶分别对基因片段和质粒pET30a双酶切,经T4DNA连接酶连接后转化大肠杆菌DH5 α ,并涂布LB卡那(50 μ g/mL)抗性平板。挑选单克隆进行PCR和限制性酶切的初步鉴定,将获得的阳性克隆送至上海六合华大基因测序。获得的序列结果与NCBI数据库中Endo-Om基因序列比对,从而得到正确编码的表达载体pET30-10H3F-EOm。

1.4 Endo-Om 在不同宿主菌的诱导表达

将重组表达载体 pET30-10H3F-Endo-Om 分别转化到 BL21 (DE3) 和 BL21 (DE3)pLysS 两种不同菌种的感受态细胞中,随机挑选 4 个转化子于 37 °C 过夜培养。次日,将菌液转接新的 LB 培养基,起始 OD₆₀₀ 从 0.02 到 0.06,37 °C 继续培养 OD₆₀₀ 至 0.6~1,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30 °C 培养 4 h。收集细胞稀释至 0.1 OD,加入上样缓冲液制备 SDS-PAGE 样品,电泳后分别进行考马斯亮蓝 (R250) 染色和蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 分析。

1.5 蛋白质免疫印迹分析 Endo-Om 在 BL21 (DE3)pLysS 的表达

收集 22.5 mL IPTG 诱导后的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS,加入 2 mL 破碎缓冲液 A (1 mmol/L 的 PMSF 溶于 PBS 中)。放置冰上 1 h,然后超声破碎细胞 (1 s 破碎,4 s 间歇 $\times$ 6)。15 000 g 离心 30 min,收集上清液与沉淀,做 Western blotting。Western blotting 具体操作步骤如下:首先将滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸由上到下的顺序放置到电转仪 (BIO-RAD),25 V、1.0 A、30 min 转膜,然后用 TBST 缓冲液 (150 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),0.05% 的吐温) 清洗 3 次后,5% 的脱脂牛奶 (上海生工) 封闭 1 h,再用牛奶稀释 4 000 倍的一抗 (anti-His Mouse mAb,TRANS) 室温孵育 3 h。TBST 清洗后加入稀释 4 000 倍的二抗 (Goat Anti-MouslgG,HRP,TRANS) 孵育 1 h,最后 TBST 清洗后,ECL 显色试剂 (BIO-RAD) 对其显色,放入 ImageQuant LAS 4000 凝胶成像系统中观察结果。

1.6 重组 Endo-Om 在 O/N instant LB 培养基中的可溶性表达

将含有重组转化子的 BL21 (DE3)pLysS 划线到卡那 (50 μ g/mL) 及氯霉素 (34 μ g/mL) 抗性的 LB 平板,待长出菌落后接种至 5 mL LB 抗性的液体培养基,37 °C 振荡培养过夜。次日,将菌液转接到 2 mL 含有卡那及氯霉素抗性的 Overnight Express Instant LB 培养基,起始 OD₆₀₀ 约 0.1,16 °C、200 r/min 培养 2 d。80 000 g、2 min 离心收集菌体,加入 300 μ L 破碎缓冲液 A,冰上超声破碎细胞 (1 s 破碎,4 s 间歇,2 min)。14 000 g 离心 10 min 收集上清液,同时用等量的 300 μ L 破碎缓冲液 A 重悬沉淀,分别取

40 μ L 的上清液和重悬沉淀与 10 μ L 的 5 $\times$ 上样缓冲液混合均匀,水中煮沸 5 min,制备 SDS-PAGE 电泳样品,电泳后进行 Western blotting 分析。

1.7 重组 Endo-Om 的纯化

收集 100 mL 培养于 O/N instant LB 中的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS,用 PBS (137 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄,2 mmol/L KH₂PO₄) 洗后重悬于 10 mL 的破碎缓冲液 B (18 mmol/L NaH₂PO₄,2 mmol/L Na₂HPO₄,0.5 mol/L NaCl,50 mmol/L 咪唑,1 mol/L pMSF),置于冰上超声破碎 (40% Amp,1 s 破碎,4 s 间歇,10 min),15 000 g、4 °C 离心 20 min,收集上清液,并用 0.45 μ m 的针头滤头器过滤。使用蛋白质纯化仪纯化上清液中蛋白质。首先,用结合缓冲液 (18 mmol/L NaH₂PO₄,2 mmol/L Na₂HPO₄,0.5 mol/L NaCl,50 mmol/L 咪唑,pH 7.4) 平衡镍亲和层析柱 1 mL HisTrp™ HP (GE),然后上清液以 1 mL/min 的流速流过镍柱。上样完毕后,用洗涤缓冲液 (18 mmol/L NaH₂PO₄,2 mmol/L Na₂HPO₄,0.5 mol/L NaCl,200 mmol/L 咪唑,pH 7.4) 洗去非特异性结合的杂蛋白质,最后使用洗脱缓冲液 (18 mmol/L NaH₂PO₄,2 mmol/L Na₂HPO₄,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH 7.4) 洗脱目的蛋白质,收集洗脱峰并取样进行 SDS-PAGE 检测。检测后剩余样品用透析袋 (国药集团化学试剂有限公司) 透析,除去高浓度的咪唑,并用 BCA 试剂盒 (Beyotime) 检测蛋白质质量浓度。

1.8 蛋白质的活性检测

蛋白质的酶活测定是在 10 μ L 体系中进行。首先以 100 pmol 的 NGA2-Asn-Fmoc (由日本 AIST 提供) 作为底物,加入 2 μ L 纯化的蛋白酶液 (质量浓度为 35 μ g/mL) 或 5 μ L 的细胞破碎液上清液 (总蛋白质的质量浓度为 7 mg/mL) 到含有 100 mmol/L 的醋酸钠 (pH 5.3)、0.5 mol/L 的氯化钠缓冲体系中,50 °C 反应 1 h (纯酶) 或 3 h (粗酶液),95 °C 加热 5 min 终止反应。然后进行高效液相色谱 (HPLC) 分析其酶活,检测条件为 ShodexAsahipak NH2P-50 4E 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm; Showa Denko K.K., Tokyo, Japan), 流动相为 0.3% 的醋酸铵溶于 57% 乙腈,洗脱 25 min,流速 1 mL/min,激发波长 265 nm,发射波长 315 nm,柱温 40 °C。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pET30-10H3F-Eom 在不同宿主菌的诱导表达

将表达载体 pET30-10H3F-Eom 分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 和 BL21(DE3)pLysS 两种宿主菌, 随机选取 4 个阳性克隆, 采用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 Endo-Om 表达。从图 1 可知, 在两种不同的菌种中, IPTG 都促进了 Endo-Om 的表达(对应的目的蛋白质条带约 91 000), 但是大量目的条带被降解。相比较而言, 虽带有质粒 pLysS 的 BL21(DE3) 菌株也存在着蛋白质被降解的现象, 但降解比例相对较低。同时其表达的 Endo-Om 的量明显多于 BL21(DE3) 菌株, 只通过考马斯亮蓝染色就可以确认目标蛋白质的表达。值得一提的是, 在没有 IPTG 诱导下, BL21(DE3) 仍然表达了许多目的蛋白质, 这可能是因为少量的 *lacUV5* 启动了 T₇ RNA 聚合酶, 存在着目的蛋白质的本底表达。而加入质粒 pLysS 之后, 由于其含有 T7 溶菌酶的基因, T₇ 溶菌酶可以与 T₇ RNA 聚合酶结合, 从而可以降低目的基因的背景表达水平。

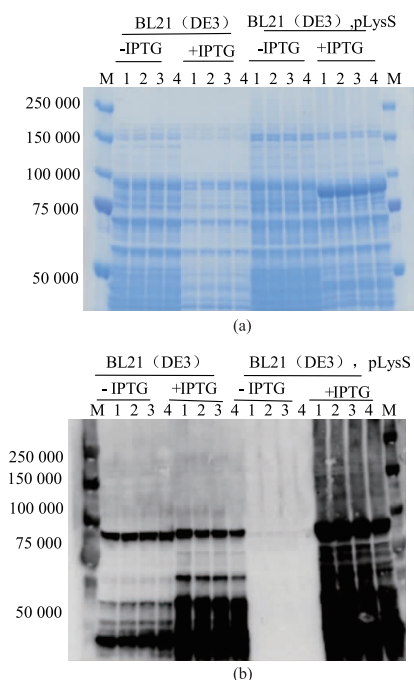
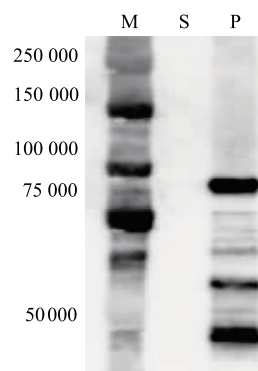


图 1 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析 IPTG 诱导重组 Endo-Om 的蛋白质表达

Fig. 1 Expression of recombinant Endo-Om by IPTG induction in various hosts

超声破碎宿主菌 BL21 (DE3)pLysS, 取其离心后的上清液及沉淀进行 Western blotting。从图 2 可以看出, 经 IPTG 诱导后, 虽然大量表达了 Endo-Om, 但其几乎全部出现在沉淀中。说明 Endo-Om 在大肠杆菌中表达时易被蛋白酶降解并且极易形成包涵体。



M: Mark; S: 破碎后的上清液; P: 沉淀

图 2 Western-blotting 分析 Endo-Om 在 BL21 (DE3)pLysS 中的表达

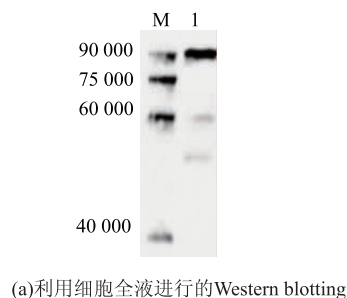
Fig. 2 Western blotting analysis of the expression of recombinant Endo-Om in BL21(DE3)pLysS

2.2 重组蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 的可溶性表达及活性检测

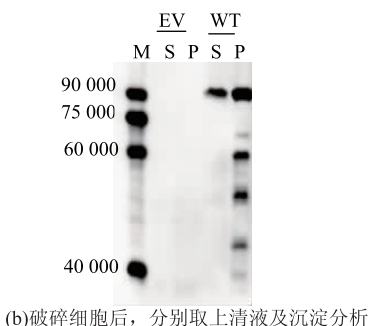
为了促进 Endo-Om 在大肠杆菌中可溶性表达, 我们对其培养条件进行了优化。当其在 O/N instant LB 中 16 °C 培养 48 h 后, 取细胞液做 western blotting 分析。图 3(a) 显示了在这种培养条件下, Endo-Om 蛋白质的降解明显地降低。同时破碎细胞后, 分别取等量的上清液与沉淀进行 Western blotting。图 3(b) 可以明显地看出, 与之前 IPTG 诱导表达使得几乎全部重组蛋白质形成包涵体不同, 约占 1/4 的蛋白质达到上清液里, 而且大部分的降解出现在沉淀中。Endo-Om 在 O/N instant LB 中低温培养不仅可以减少蛋白质的降解还可促进其可溶性表达。在低温的培养条件下, 菌体生长速度、代谢速度减缓, 使其有更充足的时间进行蛋白质的组装, 帮助外源蛋白质折叠^[13]。

已知 Endo-Om 具有糖苷水解酶的活性, 因此我们以 NGA2-Asn-Fmoc 为底物, 以水为空白对照, 测重组大肠杆菌粗酶液的活性, 见图 4(a)。从图 4 (b) 看出, 随着 NGA2-Asn-Fmoc 的峰 (约 16 min) 的降低, 酶切产物的峰 (约在 11 min) 出现, 即产物

GlcNAc-Asn-Fmoc。因而,可溶性表达到大肠杆菌上清液里的 Endo-Om 是有活性的。



(a)利用细胞全液进行的Western blotting



(b)破碎细胞后,分别取上清液及沉淀分析

M:Easy See TM Western Marker;1:全细胞液;S:上清液;P:沉淀;EV:空白质粒,对照;WT:野生型。

图 3 Western blotting 分析重组的 Endo-Om 16 °C在 O/N instant LB 培养基中的表达

Fig. 3 Expression of recombinant Endo-Om in O/N instant LB medium at 16 °C

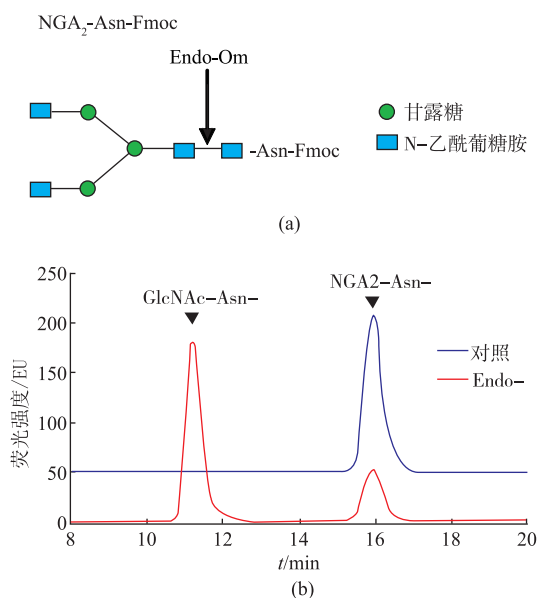
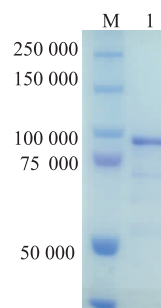


图 4 重组 Endo-Om 粗酶液的水解活性测定

Fig. 4 Detection of hydrolysis activity of Endo-Om from crude extracts

2.3 重组蛋白的纯化及活性鉴定

重组大肠杆菌超声破碎后,离心收集上清液,利用镍亲和层析柱 HisTrpTM HP 纯化。首先用 200 mmol/L 的咪唑洗去非特异性结合的杂蛋白质,然后,以 500 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白质,SDS-PAGE 分析纯化得到的蛋白质。从图 5 可以清楚的看到,在约 90 000 处有一条清晰的主条带,与预期的大小一致,成功实现了 Endo-Om 在大肠杆菌中的纯化。



M:Mark;1:纯化后的 Endo-Om

图 5 SDS-PAGE 分析纯化的重组 Endo-Om

Fig. 5 SDS-PAGE of purified Endo-Om

以 NGA₂-Asn-Fmoc 为底物,我们检测纯化后蛋白质的活性,图 6 显示纯化后的 Endo-Om 具有糖苷水解酶活性,可以水解 N-糖链中两个 GlcNAc 之间的 β -1-4 糖苷键,释放 N-糖链和带有 GlcNAc 的多肽。计算大肠杆菌中纯化的 Endo-Om 的比活力为 7.68 U/g,与 Murakami 等从 *Ogataea minuta* 酵母中纯化出的酶的比活力 9.92 U/g^[12]相比,并无较大的差别。酶活单位定义为在此反应条件下,每分钟生成 1 μ mol 的 GlcNAc-Asn-Fmoc 所需的酶量。

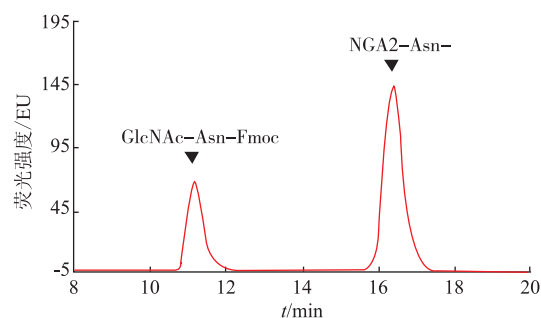


图 6 HPLC 检测纯化后 Endo-Om 水解活性

Fig. 6 HPLC analysis of hydrolysis activity of purified Endo-Om

3 结 语

糖链结构和功能的研究及糖蛋白药物、疫苗等都迫切需要带有均一糖链的糖蛋白和糖肽,化学酶合成法,尤其是利用 ENGase 的转糖基活性合成此类糖蛋白和糖肽成为了目前研究的热点^[3]。Endo-M 和 Endo-A 都已多次被应用,但存在着局限性^[14]。最近,有研究报道来源于 *Ogataea minuta* 的内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo-Om)从属于 GH85 家族,可识别高甘露糖型和复合型糖链。因此,Endo-Om 具有较为广泛的应用。Murakami 等将其在 *Ogataea minuta* 中过表达并进行了纯化,但较难得到大量的纯酶。我们研究了 Endo-Om 在大肠杆菌

中可溶性表达,并成功检测到纯化后的酶液对缺少半乳糖的双天线复合型糖链的水解活性。与从其本身酵母中纯化的酶的比活力相比较,并无较大的区别,但众所周知,大肠杆菌的异源表达易产生包涵体,本研究虽通过条件的优化,得到了可溶性的 Endo-Om,但其在 BL21(DE3)pLysS 中依旧形成了部分的包涵体,仍需继续研究。值得一提的是,在大肠杆菌中表达该酶,操作简单,我们可利用此法纯化该酶,用于其结构及功能的研究。同时接下来我们还需进一步研究 Endo-Om 的底物识别机制,水解和转糖基两种作用的催化机理,以期获得更高效的转糖基突变体,用于合成同源糖蛋白或糖肽。

参考文献

- [1] APWEILER R, HERMIAKOB H, SHARON N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, 1999, 1473(1): 4-8.
- [2] FUKUDA M, HINDSGAUL O. Molecular and Cellular Glycobiology[M]. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- [3] ZOU Yang, XUE Mengyang, ZHAO Yinhua, et al. Endoglycosidase-based chemoenzymatic synthesis of homogeneous glycopeptides and glycoprotein carrying defined N-glycans[J]. **China Biotechnology**, 2012, 32(2): 107-116.
- [4] FAN S Q, HUANG W, WANG L X. Remarkable transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo-D, an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pneumoniae*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(14): 11272-11281.
- [5] TARENTINO A L, MALEY F. Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1974, 249(3): 811-817.
- [6] WANG L X. Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides and glycoproteins through endoglycosidase-catalyzed transglycosylation [J]. **Carbohydrate research**, 2008, 343(10): 1509-1522.
- [7] WANG L X. The amazing transglycosylation activity of endo- β -N-acetylglucosaminidases[J]. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology: TIGG**, 2011, 23(129): 33.
- [8] MIZUNO M, HANEDA K, IGUCHI R, et al. Synthesis of a glycopeptide containing oligosaccharides: chemoenzymatic synthesis of eel calcitonin analogues having natural N-linked oligosaccharides[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 1999, 121(2): 284-290.
- [9] LI H, SINGH S, ZENG Y, et al. Chemoenzymatic synthesis of CD52 glycoproteins carrying native N-glycans[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2005, 15(4): 895-898.
- [10] TAKEGAWA K, NAKOSHI M, IWAHARA S, et al. Induction and purification of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae* grown in ovalbumin[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1989, 55(12): 3107-3112.
- [11] FUJITA K, KOBAYASHI K, IWAMATSU A, et al. Molecular cloning of *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase and some properties of the recombinant enzyme[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2004, 432(1): 41-49.
- [12] MURAKAMI S, TAKAOKA Y, ASHIDA H, et al. Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*[J]. **Glycobiology**, 2013, 23(6): 736-744.
- [13] WANG Jue, WANG Dang, ZHANG Bing, et al. Overexpression of *Rhizomucor miehei* lipase and activity assay[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(12): 1262-1268.
- [14] ESHIMA Y, HIGUCHI Y, KINOSHITA T, et al. Transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Coprinosia cinerea*[J]. **PloS One**, 2015, 10(7): e0132859.