

FAD 为辅基的葡萄糖脱氢酶 发酵、纯化及酶学性质

林 荣, 宋祖坤, 张 玲, 王 男, 杨海麟*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 细菌来源的 FAD 为辅基的葡萄糖脱氢酶(FAD-GDH)较为罕见,作者利用乳糖为诱导剂,发酵 *E. coli* BL21(DE3)生产 FAD-GDH。7.5 L 发酵罐中培养该菌,通过分批补料,分阶段温度控制,酶活达到 1 341 U/L,菌体量达 12.4 g/L。通过镍柱、脱盐柱、阴离子交换柱三步层析对粗酶液分离纯化,获得比酶活 109 U/mg 的重组酶。SDS-PAGE 凝胶电泳显示,重组蛋白质纯化后呈单一条带,相对分子质量约 60 000。等电聚焦电泳检测酶的等电点 pI 为 5.3。酶标仪全波长扫描吸收光谱表明,该酶的辅基为 FAD,与酶非共价键结合。相比其它糖类,以葡萄糖为底物酶的 K_m 最小,为 2.56 mmol/L, k_{cat}/K_m 为 3 487.7 L/(mmol·s)。该酶在 pH 5.5~8.0 内稳定,最适反应 pH 7.0,当 pH 高于 8.0 时酶活迅速降低。差式扫描量热分析(DSC)测得酶的 T_m 值为 77 °C,热稳定性良好。本研究为该酶的进一步工业化生产应用提供参考与借鉴。

关键词: FAD;葡萄糖脱氢酶;乳糖诱导;分离纯化;酶学性质

中图分类号:Q 814 文章编号:1673-1689(2020)02-0104-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.014

Enzyme Characterization, Fermentation and Purification for FAD-Conjugated Glucose Dehydrogenase

LIN Rong, SONG Zukun, ZHANG Ling, WAN Nan, YANG Hailin*

(Key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Bacterial-derived FAD-conjugated glucose dehydrogenase is rare. Using lactose as an inducer, fed-batch fermentation of *E. coli* BL21 (DE3) was carried out to produce FAD-GDH in 7.5 L fermenter under stepped temperature control strategy. Enzyme activity and dry cell weight reached 1 341 U/L and 12.4 g/L respectively. By using HisTrap HP, HiPre TM 26/10 Desalting and DEAE anion exchange chromatography, a purified enzyme was obtained with a specific enzyme activity of 109 U/mg. The molecular weight conformed to the theory about approximately 60 000 as determined by SDS-PAGE. The isoelectric point of the enzyme was 5.3. Absorption spectroscopy of full wavelength scanning by microplate reader showed that the enzyme was FAD conjugated. Compared with other substances, the K_m of the enzyme was lowest of 2.56 mmol/L when glucose was used as substrate, and k_{cat}/K_m was 3 487.7 L/(mmol·s). The enzyme kept relatively stable when the pH

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 江苏省产学研基金项目(BY2016022-40);江苏省优秀青年基金项目(BK20160053)。

* 通信作者: 杨海麟(1971—),男,博士,教授,主要从事发酵工程和分离纯化研究。E-mail: 19891996@sina.com

ranged from 5.5 to 8.0, with optimal pH of 7.0. When the pH is higher than 8.0, the enzyme activity decreases rapidly. The T_m of the enzyme measured by differential scanning calorimetry (DSC) was 77 °C showing high thermal stability. This experiment provides reference for the further industrial production and application of the enzyme.

Keywords: FAD, glucose dehydrogenase, lactose induction, purification, enzyme properties

血糖水平是糖尿病临床诊断的主要和常规检测指标^[1]。葡萄糖氧化酶是葡萄糖检测试剂盒或葡萄糖传感器中应用最广泛的原料用酶,但其催化活性易受溶解氧的限制,会造成测量误差。目前发现葡萄糖脱氢酶具有替代葡萄糖氧化酶潜力,因其不以氧气为电子受体,不受溶解氧的限制,检测结果误差更小^[2]。

葡萄糖脱氢酶按照辅基或辅酶类型可分为4类^[3]: 1)以 NADP⁺为辅酶的葡萄糖六磷酸脱氢酶(EC1.1.1.49 简称 G6PDH); 2)以 NAD⁺为辅酶的葡萄糖脱氢酶(EC 1.1.1.47 简称 NAD-GDH); 3)以 PQQ 为辅基的葡萄糖脱氢酶(EC1.1.5.2 简称 PQQ-GDH); 4)以 FAD 为辅基的葡萄糖脱氢酶(EC1.1.99.10 简称 FAD-GDH)。G6PDH 和 NAD-GDH 辅因子结合不紧密,催化过程中需要不断添加辅酶^[4-5]。PQQ-GDH 热稳定性差,底物谱较广^[6],除葡萄糖外还能以多种单糖和二糖为底物,限制其检测血糖的应用。FAD-GDH 具有热稳定性好、催化效率高、辅基结合紧密等优势,可作为替代目前诊断用葡萄糖氧化酶的首选。

FAD-GDH 主要来源于真菌^[7],罕见于细菌。真菌分泌 FAD-GDH 较少,研究者主要研究其基因在 *Pichia pastoris* 和 *E.coli* BL21 中的异源表达。杨愈峰等人将来源于土曲霉的 FAD-GDH 基因在 *Pichia pastoris* 中进行表达,通过表达筛选及 15 L 发酵罐发酵,上清液酶活达 2.6×10^5 U/L^[8],但在酵母菌中表达的异源葡萄糖脱氢酶存在糖基化修饰,会干扰血糖检测电极的灵敏度,实际生产应用中需进行酶的去糖基化步骤^[9]。周立伟等人筛选克隆出来源于青霉的 FAD-GDH 基因,在 *E.coli* BL21 中表达的蛋白质大部分为包涵体^[10]。来源于真菌的葡萄糖脱氢酶在大肠杆菌中异源表达常常需要与分子伴侣共表达才能实现可溶性表达,蛋白质纯化和放大生产较

为困难。Koji Sode 等人发现并克隆了迄今唯一来源于细菌 *Burkholderia cepacia* 的 FAD-GDH 基因,并研究了分子伴侣对酶表达的影响^[11],但并未对其异源表达发酵生产、纯化和酶学性质做全面和深入研究。

作者将来源于 *Burkholderia cepacia* 的以 FAD 为辅基的葡萄糖脱氢酶基因^[12]在 *E.coli* BL21 (DE3) 中进行表达,选用工业生产上廉价的乳糖作为诱导剂,7.5 L 发酵罐放大培养,探索分离纯化工艺,研究其酶学特性,为其工业化生产及应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组 *E.coli* BL21 (DE3)/pTrc99a-GDH:由作者所在实验室构建。

1.1.2 培养基 LB(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10,氯化钠 5,加入 2 g/dL 的琼脂为 LB 固体培养基。

发酵培养基(g/L):酵母膏 10,蛋白胨 15,葡萄糖 0.5,甘油 5 mL/L,无机盐成分 Na₂HPO₂ 7.1, KH₂PO₄ 2, K₂HPO₄ 4, (NH₄)₂SO₄ 1.3, MgSO₄ 0.12, 微量元素^[11]。培养基均添加过滤除菌的氨苄青霉素 100 mg/L。

补料培养基(g/L):酵母膏 50,蛋白胨 50,甘油 100 mL。

乳糖诱导液(g/L):乳糖 200。

1.1.3 缓冲液 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0), 50 mmol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0), 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0~7.0), 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0)。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 种子液的制备:从平板挑取单菌落接种到 LB 培养基,于 37 °C、200 r/min 摇床培养 8 h。

7.5 L 罐发酵:7.5 L 发酵罐中加入 4 L 培养基,

115 °C 灭菌 30 min, 将活化的种子液按体积分数 5% 接入发酵罐分批培养, 溶氧迅速上升, 恒速 0.04 L/h 流加补料培养基 10 h, 温度从 37 °C 降到 30 °C, 恒速 0.015 L/h 流加乳糖诱导表达。pH 通过自动流加 50% 的磷酸和 25% 的氨水控制在 7.0, 通过搅拌转速及通气量调节溶氧维持在 30%^[13]。

1.2.2 菌体生物量测定 取不同 OD₆₀₀ 的适量菌液, 8 000 r/min 离心 10 min 清洗两次, 105 °C 烘干至恒定值, 称取细菌干重, 细胞干重与 OD₆₀₀ 成线性 $y=0.44x-0.036$ 。

1.2.3 酶的分离纯化 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体后, 用 pH 7.0、50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液重悬菌体, 冰水浴超声破碎菌体, 破壁后 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。利用融合在酶 C 末端的组氨酸标签, 将粗酶液分别过 HisTrap HP (镍柱)、HiPre TM 26/10 Desalting (脱盐柱) 和 DEAE FF (阴离子交换柱层析柱), 获得纯酶。

1.2.4 酶活测定 酶活定义: 在一定条件下, 每分钟还原 1 μmol 2,6-二氯酚钠所需的酶量定义为一个酶活单位。

以葡萄糖为底物, 取 100 μL 适当稀释的酶液, 加入 3 mL 显色液 (50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液, pH 7.0, 0.03 mmol/L 的 2,6-二氯酚钠, 1.6 mmol/L 的吩嗪硫酸甲酯, 100 mmol/L 的葡萄糖溶液) 轻轻混匀, 用重蒸水调零, 37 °C 每隔 1 分钟记录 600 nm 处吸光值的变化, 共记录 2~3 min^[7]。

比酶活为每毫克蛋白质具有的酶活力。蛋白质质量浓度用考马斯亮蓝法测定^[14]。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 凝胶电泳采用 5 g/dL 的浓缩胶与 12 g/dL 的分离胶, 电泳缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液, 当用电压 80 V 跑过浓缩胶, 调节电压至 100 V, 电泳后用考马斯亮蓝染色。胶的具体配置操作方法参照 SDS-PAGE 试剂盒。

1.2.6 等电聚焦凝胶电泳 将蛋白质样品加入到加样纸上, 将加样纸排放在电极间的凝胶中央, 恒压 60 V 电泳 15 min, 8 mA 恒流至电压升至 550 V, 关闭电源, 揭去加样纸, 然后恒压 550 V 电泳 3 h, 等电流降至接近零, 停止电泳。将胶在固定液中浸泡 40 min, 除去两性电解质 (降低考马斯亮蓝对两性电解质的染色), 用蒸馏水漂洗一次, 然后用染色工作液染色。胶使用 GE 的预制胶。

1.2.7 葡萄糖脱氢酶酶学性质分析 将纯化得到的酶液取 200 μL 进行 300~500 nm 范围的全波长扫描, 再加入 20 μL、1 mol/L 葡萄糖溶液反应 5 min, 再进行全波长扫描。

酶对不同糖类的催化差异: 分别选择葡萄糖、麦芽糖、木糖、半乳糖、海藻糖、果糖、山梨醇、蔗糖作为底物, 加入 0.1 U/mL 的酶液 100 μL, 以葡萄糖为底物测得的酶活为 100%, 计算其它底物的相对酶活。

酶动力学参数测定: 配置 0.2~4 mmol/L 不同浓度的葡萄糖、麦芽糖、木糖溶液为底物, 测定不同底物浓度下酶的活力, 计算相应的反应速度。用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk) 作图, 以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标, 求得 K_m 与 k_{cat} 。

最适反应 pH: 在 pH 5.0~9.0 条件下, 于 37 °C 测定酶活, 以酶活最高者为 100%, 计算其相对活性, 确定最适反应 pH。

pH 稳定性: 将纯酶置于 pH 5.0~9.0 不同缓冲液中, 25 °C 下放置 16 h, 测定其剩余酶活力。

最适反应温度: 以葡萄糖为底物, 在 pH 7.0 缓冲液中, 于不同温度 (30、37、40、45、50、55、60、65、70、75、80 °C) 测定酶活, 以酶活最高者为 100%, 计算其相对酶活, 确定其最适反应温度。

温度稳定性: 以葡萄糖为底物, 在 pH 7.0 缓冲液中, 于不同温度 (30、37、40、45、50、55、60、65、70、75、80 °C) 放置 30 min 后, 测定残余酶活。

2 结果与分析

2.1 7.5 L 罐发酵培养

相比真菌来源的 FAD-GDH 在 *E.coli* 中可溶性表达困难, 常常需要与分子伴侣系统共表达, 细菌来源的外源基因在 *E.coli* 可实现可溶性表达, 且产量可进一步通过发酵优化提升。

IPTG 由于价格昂贵且存在潜在的化学毒性, 限制了其在工业上的应用。乳糖作为天然的诱导剂无污染, 价格便宜, 诱导强度相比 IPTG 较小, 可以减少包涵体产生, 同时作为碳源还能促进菌体生长^[13-14]。作者选取乳糖作为诱导剂, 通过分批补料提高菌体浓度, 再通过分阶段温度控制促进蛋白质表达^[15]。

图 1 为 7.5 L 发酵罐培养。发酵过程分为 3 个阶段: 第一阶段初始的营养物质大约在 10 h 左右消

耗完,此时溶氧上升。第二阶段的补料开始,恒速 0.04 L/h 流加补料培养基。在这一阶段 400 mL 补料培养基大约 10 h 内被消耗。将温度调到 30 ℃,恒速 0.015 L/h 流加乳糖诱导开始第三阶段,乳糖终质量浓度 10 g/L。酶活达到 1 341 U/L,菌体量达 12.4 g/L。

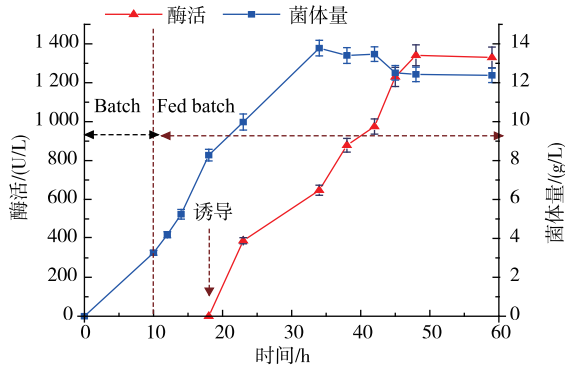


图 1 7.5 L 罐发酵培养

Fig. 1 7.5 L tank fermentation culture

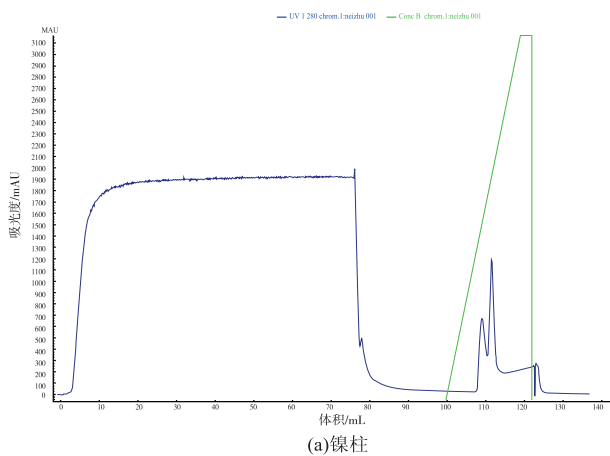
2.2 酶的分离纯化

通过镍柱、脱盐柱、阴离子交换柱三步层析对

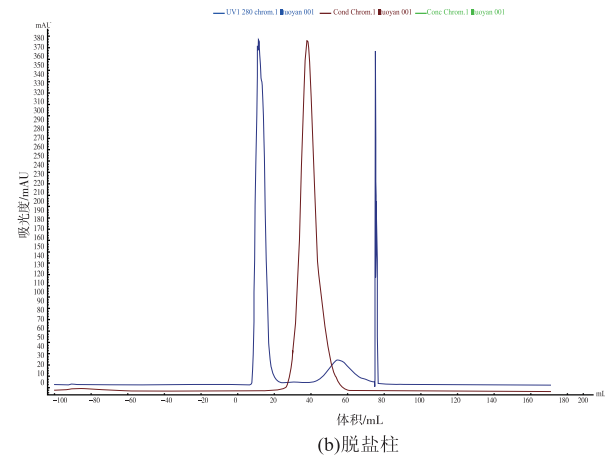
粗酶液进行分离纯化。

重组酶的 C 末端带有组氨酸标签,见图 2(a)。先经过镍柱纯化,去掉绝大多数的杂蛋白质,对目的蛋白质起到很好的浓缩效果,将这一步得到的酶液过脱盐柱去除多余的盐离子,见图 2 (b)。再经 DEAE 阴离子交换柱,见图 2(c)。紫外吸收峰较为明显,通过三步层析,获得纯化倍数为 40、总回收率为 40%的酶,分离纯化结果见表 1。利用 SDS-PAGE 检验最终所得的蛋白质纯度,图 2(d)显示最终样品呈现单一条带,说明该酶达到电泳纯。

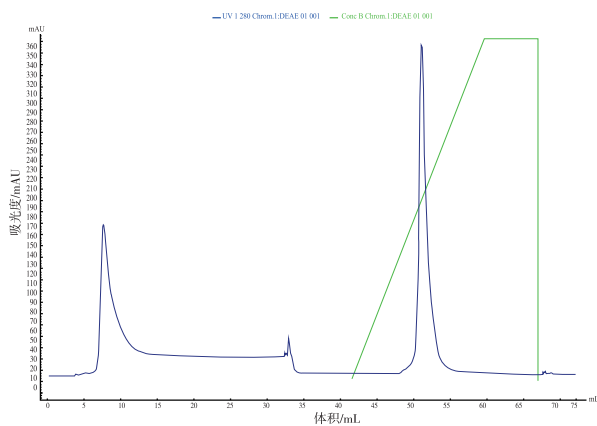
DEAE 纯化时要求酶缓冲液的 pH 高于酶的等电点,同时要求缓冲液盐离子浓度较低。DNAMAN 软件预测 FAD-GDH 的等电点为 6.71。镍柱层析时使用的是 pH 7.0 的磷酸钾缓冲液,经过脱盐柱层析缓冲液置换成 pH 8.2 的 Tris 缓冲液。DEAE 高盐洗脱及较高的缓冲液 pH 条件可能抑制部分酶活性,这可能是造成该酶经过 DEAE 纯化后比酶活及纯化倍数没有很大提升的原因。



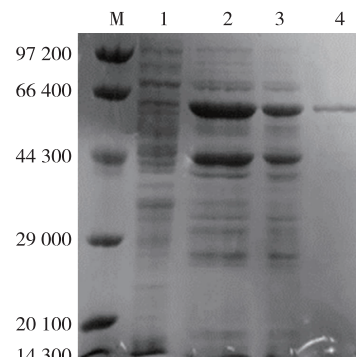
(a)镍柱



(b)脱盐柱



(c)DEAE阴离子交换柱



M:蛋白质 maker; 1:发酵上清液; 2:镍柱层析; 3:脱盐柱层析; 4:DEAE阴离子交换柱层析。

(d) SDS-PAGE

图 2 FAD-GDH AKTA avant 层析图谱及重组蛋白质纯化的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 Chromatogram of FAD-GDH by AKTA avant and SDS-PAGE analysis on purified protein

表 1 蛋白质的纯化

Table 1 Purification of protein

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
上清液	601.8	222.9	2.7	100	1
镍柱层析	428.48	4.1	104.5	71.2	38
脱盐柱层析	350	3.3	105	58	38.9
DEAE 层析	240.72	2.21	109	40	40

2.3 辅基 FAD 的检测

全波长扫描结果见图 3。可以看出, FAD-GDH 溶液在 385 nm 和 454 nm 左右有 2 个特征吸收峰(实线), 是由酶的 FAD 辅基造成的, 当加入足量的底物葡萄糖溶液, FAD 被还原成 FADH₂, 吸收峰消失(虚线), 这些结果证明该葡萄糖脱氢酶的辅基是 FAD。重组酶的氨基酸序列中含有一段 FAD 结合位点的甘氨酸保守序列(GXGXXG), 由此推测 FAD 与酶非共价键结合。

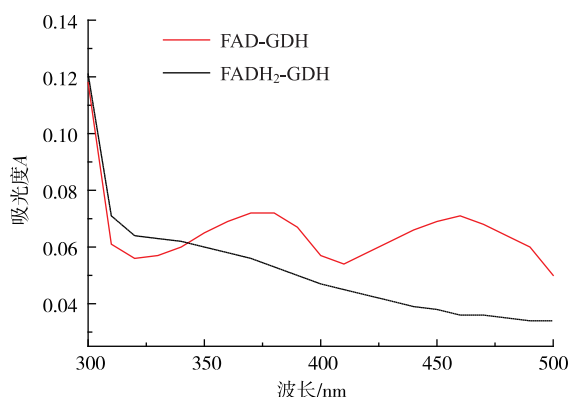


图 3 全波长扫描 FAD-GDH 酶液

Fig. 3 Whole-weight screen of FAD-GDH solution

2.4 酶学性质研究

2.4.1 酶的等电点 等电聚焦电泳见图 4。结果显示酶的等电点 5.3, DNAMAN 软件预测的等电点为

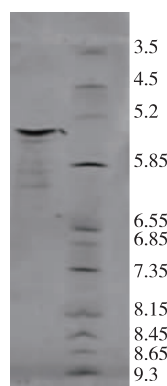


图 4 等电聚焦电泳图

Fig. 4 Isoelectric focusing electrophoresis pattern

6.71, 表明该酶的等电点偏酸性。对等电点的精确测量有助于提高分离纯化的效率及酶的稳定性。

2.4.2 酶对不同底物的催化差异 为了研究酶对不同底物的催化差异, 测定了酶对不同底物相对酶活及动力学参数。

对异源表达的 FAD-GDH, 以不同糖类为底物测定相对酶活, 结果见表 2。除对葡萄糖外仅对麦芽糖具有较高的催化活性, 可能是由于麦芽糖由两分子葡萄糖中间以 α -1,6 糖苷键连接, 水解产物为葡萄糖, 对其他糖的催化活性较低, 对果糖、山梨醇、蔗糖没有催化活性, 较好的葡萄糖催化特性使得 FAD-GDH 有较好的工业化应用前景。

表 2 FAD-GDH 对不同糖类的催化差异

Table 2 Catalytic differences by FAD-GDH to different sugars

底物	相对分子质量	相对酶活/%
葡萄糖	180.16	100
麦芽糖	360.32	41
木糖	150.129 9	23
半乳糖	180.16	10
海藻糖	378.3	3
果糖	180.16	0
山梨醇	182.17	0
蔗糖	342.3	0

K_m 是酶的一个特征常数, 在一定反应条件下 K_m 的大小与酶的浓度无关, 只与酶的性质有关。使用稀释成不同浓度的不同糖为底物进行酶活测定, 得到的双倒数曲线见图 5 和表 3。以葡萄糖为底物时, 经米氏方程计算得到 K_m 为 2.56 mmol/L, 相比麦芽糖和木糖, 半乳糖的 K_m 最小, 其对葡萄糖的亲和力最高。以葡萄糖为底物时, 最大反应速度 V_{max} 为 500 mmol/(L·s), k_{cat}/K_m 为 3 487.7 L/(mmol·s)。

2.4.3 酶 pH 稳定性 反应体系的 pH 会影响酶构象的稳定性, 也会影响酶活性中心必需基团及底物的解离状态, 进而影响酶的催化效果。由图 6 可知,

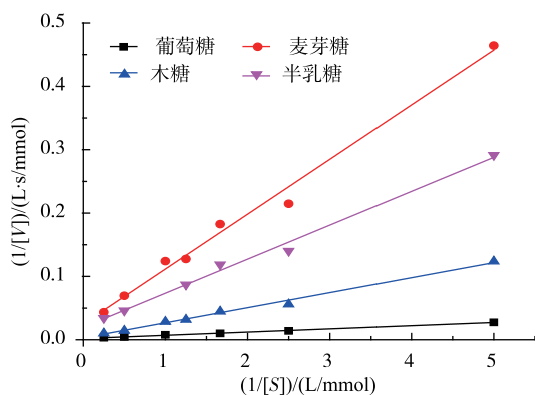


图 5 FAD-GDH 催化不同糖的 Lineweaver-Burk 关系
Fig. 5 Lineweaver-Burk graph of FAD-GDH catalyze different sugars

表 3 以不同糖为底物 FAD-GDH 动力学参数

Table 3 FAD-GDH kinetic parameters with different sugars as substrate

底物	K_m /(mmol/L)	V_{max} /(mmol/(L·s))
葡萄糖	2.56	500
麦芽糖	3.4	39.8
木糖	7.69	322
半乳糖	2.7	50

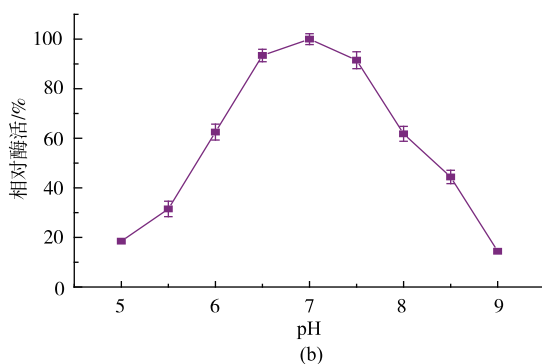
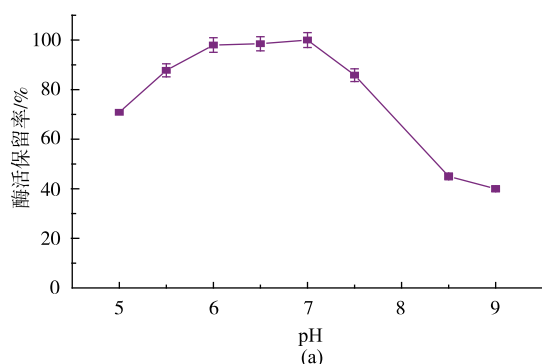


图 6 酶的 pH 稳定性及最适反应 pH

Fig. 6 pH stability of the enzyme and the optimum reaction pH

酶的最适反应 pH 为 7.0, 重组酶在 pH 为 5.5~8.0 时, 具有较好的稳定性。当 pH 大于 8.0 时酶活力迅速下降。2.2 中蛋白质纯化过程中 DEAE 阴离子交换层析使用的是 pH 8.2 的 Tris 缓冲液, 过碱的条件可能抑制了酶的活性, 所以纯化后比酶活及纯化倍数没有很大提升。

2.4.4 酶温度稳定性 温度升高导致溶液的扩散作用加剧, 一定程度上促使底物与酶分子的碰撞, 使得反应速率加快。温度的上升也会改变酶分子的结构, 从而影响酶的催化效率。温度过高使酶分子的结构被破坏, 最终失去催化活性。图 7 显示, 酶的最适反应温度在 70 °C, 55 °C 以内稳定。同时通过 DSC 测定该酶的 T_m 值为 77 °C, 该重组酶的热稳定性较好。

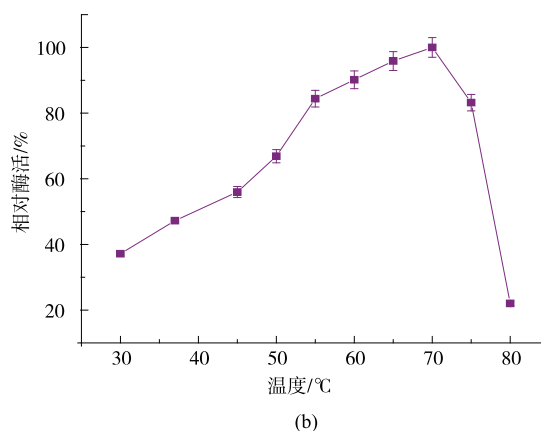
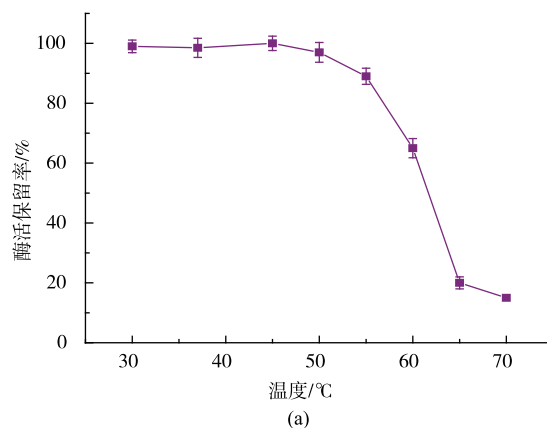


图 7 酶的温度稳定性及最适反应温度

Fig. 7 Temperature stability of the enzyme and the optimum reaction

3 结语

作者利用乳糖诱导改善来源于 *Burkholderia cepacia* 葡萄糖脱氢酶表达水平, 利用乳糖作为诱导

剂在 7.5 L 发酵罐放大,通过分批补料、分阶段温度控制,酶活达到 1 341 U/L,菌体量达 12.4 g/L。酶活及菌体量可通过发酵优化进一步提升。

将重组菌破碎得到的粗酶液利用镍柱、脱盐柱、阴离子交换柱三步层析,最终获得纯化倍数 40、比酶活 109 U/mg 的酶,这一系列方法达到较好的纯化效果。SDS-PAGE 凝胶电泳显示,重组蛋白质纯化后达到电泳纯,相对分子质量约 60 000,与理论值相符。等电聚焦电泳显示,该酶的等电点为 5.3,与 DNAMAN 软件预测的 6.71 相比更加精确。酶标仪全波长扫描吸收光谱表明,该酶的辅基为 FAD,通过保守位点(GXGXXG)推测辅基与酶非共价键结合。

酶学性质研究发现,该酶对葡萄糖的亲合力最高, K_m 为 2.56 mmol/L,与报道的 2.8 mmol/L^[8]有所差异,可能是因为文献中所用的表达宿主为 *E.coli* DH5 α ,质粒为 pUC18,与本研究中存在差异。最大反应速度 V_{max} 为 500 mmol/(L·s), k_{cat}/K_m 为 3 487.7 L/(mmol·s)。在 pH 5.5~8.0 内稳定,最适反应 pH 在 7.0,当 pH 大于 8.0 时酶活力迅速下降,55 °C 稳定,差式扫描量热分析(DSC)测得 T_m 值为 77 °C。

上述研究表明,该酶稳定性较好,催化效率高且不存在糖基化修饰,适用于高灵敏度电极的开发,该细菌源葡萄糖脱氢酶具有替代市场上葡萄糖氧化酶的潜力。本研究为该酶的进一步工业化应用提供参考与借鉴。

参考文献:

- [1] WANG H, NAGHAVI M, ALLEN C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015[J]. **Lancet**, 2016, 388: 1459-1544.
- [2] MONOSIK R, STRED'ANSKY M, LUSPAI K, et al. Amperometric glucose biosensor utilizing FAD- dependent glucose dehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012, 50(4-5): 227-232.
- [3] GALANT A L, KAUFMAN R C, WILSON J D. Glucose: detection and analysis[J]. **Food Chemistry**, 2015, 188: 149-160.
- [4] XIE Xian, XIE Chengjia, HE Bingfang. Cloning and high efficiency expression of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase gene [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(5): 75-78. (in Chinese)
- [5] YU Tao, HU Die, WU Minchen, et al. Enzymatic properties of recombinant glucose dehydrogenase and its coenzyme regeneration [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(9): 910-916. (in Chinese)
- [6] IGARASHI S, HIROKAWA T, SODE K. Engineering PQQ glucose dehydrogenase with improved substrate specificity site-directed mutagenesis studies on the active center of PQQ glucose dehydrogenase[J]. **Biomolecular Engineering**, 2004, 21(2): 81-88.
- [7] MORI K, NAKAJIMA M, KOJIMA K, et al. Screening of *Aspergillus*-derived FAD-glucose dehydrogenases from fungal genome database[J]. **Biotechnology Letters**, 2011, 33(11): 2255-2263.
- [8] YANG Y, HUANG L, WANG J, et al. Efficient expression, purification, and characterization of a novel FAD-dependent glucose dehydrogenase from *Aspergillus terreus* in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014, 24(11): 1516-1524.
- [9] MURATA K, AKATSUKA W, SADAKANE T, et al. Glucose oxidation catalyzed by FAD-dependent glucose dehydrogenase within Os complex-tethered redox polymer hydrogel[J]. **Electrochimica Acta**, 2014, 136: 537-541.
- [10] 周利伟. 青霉来源葡萄糖脱氢酶的克隆、表达及其酶学性质研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [11] YAMAOKA H, FERRI S, FUJIKAWA M. Essential role of the small subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia*[J]. **Biotechnology Letters**, 2004, 26: 1757-1761.
- [12] TSUYA T, FERRI S, FUJIKAWA M, et al. Cloning and functional expression of glucose dehydrogenase complex of *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2006, 123: 127-136.
- [13] LI Chuang, SUN Yan, ZHANG Ling. Lactose-induced recombinant *E.coli* expression of cholesterol oxidase research[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(3): 471-474. (in Chinese)
- [14] TONG Y J, YANG H L, XIN Y, et al. Novel integration strategy coupling codon and fermentation optimization for efficiently enhancing sarcosine oxidase (SOX) production in recombinant *Escherichia coli* [J]. **World Journal of Microbiology &**

- Biotechnology**, 2015, 31(5): 707-716.
- [15] BLOMME P G, BECKER K J, DUVNJAK P. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition[J]. **Biotechnology Progress**, 2007, 23: 585-598.
- [16] ZOU C, DUAN X, WU J. Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy[J]. **Bioresource Technology**, 2014, 172: 174-179.
- [17] WANG H L, LI X M, MA Y H, et al. Process optimization of high-level extracellular production of alkaline pectate lyase in recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2015, 93: 38-46.
- [18] CHRISTOPH S, PETRA S, MIRIAM K, et al. Heterologous overexpression of *Glomerella cingulata* FAD-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. **Microbial Cell Factories**, 2011, 10(106): 1-9.

科 技 信 息

欧盟评估一种 L-蛋氨酸作为添加剂的安全性和有效性

2019 年 12 月 3 日, 据欧盟食品安全局(EFSA)消息, 应欧盟委员会要求, 欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就一种 L-蛋氨酸(L-Methionine) 作为所有动物物种的饲料和饮用水添加剂的安全性和有效性发表科学意见。

据了解, 此种 L-蛋氨酸是由谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) KCCM 80184 菌株和大肠杆菌(*Escherichia coli*) KCCM 80096 菌株发酵产生的。经过评估, 专家小组认为, 该添加剂对目标物种、消费者和环境都是安全的。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估一种 L-蛋氨酸作为添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2019-12-3). <http://news.foodmate.net/2019/12/543261.html>

欧盟评估维生素 D2 蘑菇粉作为新型食品的安全性

2020 年 1 月 21 日, 应欧盟委员会的要求, 欧盟食品安全局(EFSA)营养、新型食品和食品过敏原小组(NDA)就维生素 D2 蘑菇粉(vitamin D2 mushroom powder)作为一种新型食品的安全性发布意见。

申请人拟将这种新型食品用于各种食品和饮料中, 包括特殊医疗用途的食品和食品补充剂。目标人群是普通人群, 但食品补充剂的目标人群是 7 个月以上的人群。经过评估, 在拟议的使用条件下, 这种新型食品是安全的。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估维生素 D2 蘑菇粉作为新型食品的安全性 [EB/OL]. (2020-1-21). <http://news.foodmate.net/2020/01/548052.html>