

水/有机溶剂双相体系中色氨酸合成酶酶法合成 2-甲基-L-色氨酸

徐礼生^{1,2}, 高贵珍¹, 曹稳根¹, 赵亮¹,
张兴桃¹, 焦庆才², 陈军¹, 宋曼¹

(1. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 本文作者研究了水/有机溶剂双相体系中利用色氨酸合成酶催化 L-丝氨酸和 2-甲基吡啶合成 2-甲基-L-色氨酸, 考察了有机溶剂、有机溶剂体积分数、pH、反应温度、表面活性剂、金属离子和底物浓度对色氨酸合成酶催化合成 2-甲基-L-色氨酸的影响。有机溶剂包括二甲苯、甲苯、乙酸乙酯、乙酸丁酯和辛醇, 表面活性剂包括吐温 80、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)、CTAB 和 Trion X-100, 金属离子包括 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 。结果表明, 酶法最佳转化条件为: 有机相溶剂为甲苯, 甲苯体积分数为 2%, 反应温度为 40 °C, 水相 pH 为 8, 底物 L-丝氨酸浓度为 150 mmol/L, 表面活性剂 Trion X-100 质量分数为 2%, 金属离子 Ca^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L, 色氨酸合成酶酶促反应 5 h, 2-甲基-L-色氨酸的质量浓度为 21.17 g/L。重组大肠杆菌 DM206 可作为 2-甲基-L-色氨酸生产菌, 具有较好的 2-甲基-L-色氨酸生产潜力。

关键词: 色氨酸合成酶; 2-甲基-L-色氨酸; L-丝氨酸; 2-甲基吡啶

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)05-0547-06

Enzymatic Synthesis of L-2-Methyltryptophan Catalyzed by Tryptophan Synthase in a Water/Organic Solvent Biphasic System

XU Lisheng^{1,2}, GAO Guizhen¹, CAO Wengen¹, ZHAO Liang¹,
ZHANG Xingtao¹, JIAO Qincui², CHEN Jun¹, SONG Man¹

(1. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China; 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: L-2-methyltryptophan plays an important role in many physiological processes. This paper investigated the synthesis of L-2-methyltryptophan in an aqueous/organic biphasic system, and optimized the synthetic method. The optimal transformation conditions were 150 mmol/L L-serine, 2% toluene, 0.1 mmol/L Ca^{2+} , 2% Trion X-100, 40 °C and pH 8, which resulted in a content of over

收稿日期: 2015-06-02

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2017A440); 安徽省质量工程项目(2015zjjh034、2015ckjh108、2016jyxm1038); 宿州区域发展协同创新中心(特色种植业方向)开放课题项目(2015SZXTZKXYB01)。

作者简介: 徐礼生(1980—), 男, 安徽安庆人, 理学博士, 副教授, 主要从事微生物与生化药学研究。E-mail: xulisheng111@163.com

引用本文: 徐礼生, 高贵珍, 曹稳根, 等. 水/有机溶剂双相体系中色氨酸合成酶酶法合成 2-甲基-L-色氨酸[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(05): 547-552.

21.17 g/L for L-2-methyltryptophan. Thus, the strain can be used to produce L-2-methyltryptophan and has an excellent converting capability of L-2-methyltryptophan.

Keywords: tryptophan synthase, L-2-methyltryptophan, L-serine, 2-methylindole

色氨酸在生物体非核糖体多肽和生物碱合成中具有重要作用^[1],一些色氨酸衍生物同样具有重要作用,例如 5-羟基色氨酸^[2-3],7-氯-色氨酸^[4]和 2-甲基-L-色氨酸^[5]。2-甲基-L-色氨酸是抗菌素硫链丝菌肽合成中重要的中间体^[6],含有 2-甲基色氨酸的寡肽化合物可以使亲躯体细胞(somatotrope)释放生长素,哺乳动物服用能诱导生长激素释放的化合物之后,动物体内的生长素提高,使动物生长速度加快^[5]。采用来源于 *Salmonella enterica* 的色氨酸合成酶法进行合成 2-甲基-L-色氨酸,但是反应收率低且反应时间长^[7]。由于底物 2-甲基吲哚在水中溶解度低,故在水相中酶反应速度相对较低。自 20 世纪 80 年代以来,Kirchner 等^[8]在水/有机溶剂体系中用脂肪酶催化合成酯、肽和手性醇等化合物,非水相酶催化已成为生物工程等领域中的研究热点之一,包括水/有机溶剂双相体系、反相胶团体系和超临界流体体系等^[9-14]。在酶催化过程中,双相体系对酶催化具有促进作用,如刘森林等人研究了水/有机溶剂双相中来源于杏仁的 (R)-醇腈酶催化苯甲醛与 HCN 不对称合成 (R)-苯乙腈醇,系统探讨了有机溶剂、水相与有机溶剂相体积比、水相 pH 值和反应温度对反应速度、产率和产物光学纯度的影响,在优化反应条件下反应产率和产物的光学纯度均高达 99% 以上^[14]。周华等人研究了双水相体系酶法合成 L-苯丙氨酸,以天冬氨酸转氨酶为催化剂,双水相体系质量组成为聚乙二醇 4 000 (质量分数 20%)/Na₂HPO₄ (质量分数 16%)。苯丙酮酸钠盐、细胞和 L-苯丙氨酸在双水相体系中的分配系数分别为 8.03,31.7 和 0.74,当底物质量浓度为 43.4 g/L 时,该体系酶法合成 L-苯丙氨酸得率为 78.1%,比在水溶液体系中提高了 27.4%^[15]。

本文作者在水/有机溶剂双相体系中,利用重组大肠杆菌 DM206 [pETDuet -trpBA +trpA/BL21 (DE3)]色氨酸合成酶催化 L-丝氨酸和 2-甲基吲哚合成 2-甲基-L-色氨酸(见图 1),优化了转化条件,为酶法合成 2-甲基-L-色氨酸提供了新思路。

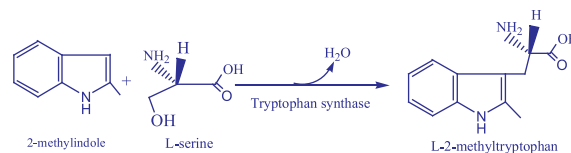


图 1 酶催化合成 2-甲基-L-色氨酸示意

Fig. 1 Synthesis of L-2-methyltryptophan from L-serine and indole catalyzed by tryptophan synthase

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-丝氨酸、2-甲基吲哚、2-甲基-L-色氨酸、甲醇、吐温 80、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)、CTAB 和 Trion X-100: 购于国药集团上海化学试剂有限公司;二甲苯、甲苯、乙酸乙酯、乙酸丁酯和辛醇: 购于合肥中皖化学试剂公司,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG): 天根生化科技有限公司产品;L-丝氨酸(质量分数 99.9%): 安徽华恒生物工程有限公司产品;2-甲基吲哚(质量分数 99%): 南京台硝生物质工程有限公司产品;重组大肠杆菌 DM206 [pETDuet-trpBA +trpA/BL21 (DE3)],作者所在实验室构建;将活化好的重组大肠杆菌种子液以体积分数 2%接种量接入装有 100 mL 无菌 LB 培养基的 250 mL 的摇瓶中,在 37 °C 和 170 r/min 条件下发酵 4 h 后,加入终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG,降至 28 °C 继续发酵 12 h,发酵完后离心收集菌体,用无菌水洗涤后,于 4 °C 保存备用。

LC-20AT 型岛津高效液相色谱仪,日本岛津公司产品;THZ-CK 型空气恒温振荡器,太仓博莱特实验仪器厂制造;THZ-CK 型空气恒温振荡器,太仓博莱特实验仪器厂制造。

1.2 酶法合成 L-2-甲基色氨酸及酶活测定

将 0.1 g 菌体加入 50 mL 双相反应体系中,水相含有 100 mmol/L L-丝氨酸(质量分数 99.9%),有机溶液相含有一定量 2-甲基吲哚(质量分数 99%),于设定 pH、温度和 170 r/min 振荡条件下反应;另以不加有机溶剂的纯水相作为对照,每组实验重复 3

次。定时取样,以高效液相色谱法测定 2-甲基-L-色氨酸生成量,液相条件为:分离柱为(5 μm ×250 mm×4.6 mm)岛津 C18,流动相分配比为 V(质量分数 0.025% 磷酸溶液):V(甲醇)=20:80,保留时间为 3.610 min,在检测波长为 263 nm 处检测 2-甲基-L-色氨酸。将酶活定义为在上述条件下,每 1 min 生成 1 mmol 的 2-甲基-L-色氨酸所用的酶量,单位 U/g。高效液相色谱仪测定 2-甲基-L-色氨酸生成量:

$$R = \frac{R_0}{R_1} \quad (1)$$

式(1)中, R 为 2-甲基-L-色氨酸产率; R_0 为 2-甲基-L-色氨酸实际生成量; R_1 为 2-甲基-L-色氨酸理论生成量。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂影响

有机溶剂是影响双相体系中酶催化合成 2-甲基-L-色氨酸反应,由于底物 2-甲基吡啶在水中溶解度较小,酶分子周围底物因浓度较低,而处于边反应边溶解的状态,传质过程受到限制,故反应速度相对较低,为了提高酶反应速度,通过增加底物 2-甲基吡啶在酶反应体系中溶解度,以提高酶反应速度;但另一方面有机溶剂往往会剥夺酶分子表面水化层,导致酶分子与有机溶剂接触而使酶活性降低,所以需要选择合适的有机溶剂和有机溶剂添加量,促进酶促反应。本文中选用二甲苯、甲苯、乙酸乙酯、乙酸丁酯和辛醇作为有机相,以不加有机溶剂纯水相的酶活设定为 100%,反应条件为 5 mmol L-丝氨酸和 5 mmol 2-甲基吡啶,质量分数 1% 磷酸吡哆醛(PLP)150 μL ,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体,不同有机溶剂 1 mL,pH 8.0,30 $^{\circ}\text{C}$,反应结果见图 2,可以看出以甲苯作为有机相时,色氨酸合成酶相对酶活最高,所以选择最合适的有机溶剂为甲苯。

2.2 有机溶剂体积分数影响

双相体系中甲苯体积分数对酶反应的影响见图 3,以不加有机溶剂纯水相的酶活设定为 100%(反应条件为 5 mmol L-丝氨酸和 5 mmol 2-甲基吡啶,质量分数 1% PLP 150 μL ,不同体积分数甲苯,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体,pH 8.0,30 $^{\circ}\text{C}$)。由图 3 可见,随着甲苯体积分数的增加,酶活逐渐增加,但体积分数超过 2% 时,酶活开

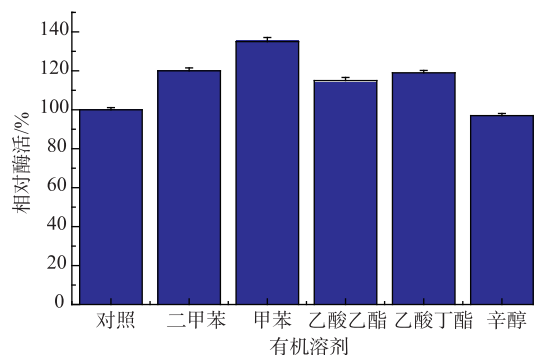


图 2 有机溶剂对酶活的影响

Fig. 2 Effect of organic solvents on the TSase activity

始降低。有机溶剂可提高底物 2-甲基吡啶的溶解度,增加酶分子与底物接触的机会,因而酶活增加,但过量有机溶剂往往会剥夺酶分子表面水化层而进入酶分子内部的活性中心,破坏了酶的稳定构象,因而酶活性降低。综上可见,甲苯体积分数以 2% 为宜,双相体系中酶活比水相中提高了 1.29 倍。

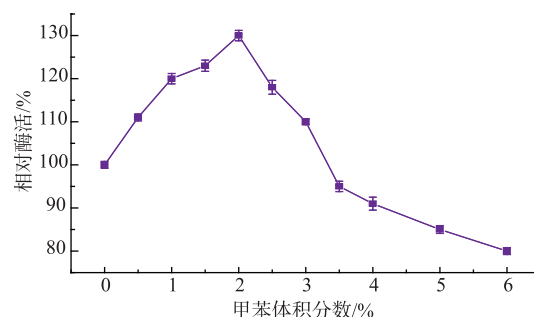


图 3 甲苯体积分数对酶活的影响

Fig. 3 Effect of volume fractions of toluene on the TSase activity

2.3 反应温度和 pH 影响

在反应条件为 5 mmol L-丝氨酸和 5 mmol 2-甲基吡啶,质量分数 1% PLP 150 μL ,体积分数 2% 甲苯,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体,pH 8.0,改变反应温度得到相对酶活曲线,结果见图 4,将测得的最高酶活设定为 100%。由图可见,纯水体系在 35 $^{\circ}\text{C}$ 反应时,色氨酸合成酶酶活均较高,温度过高或过低都使酶活下降。双相体系在 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应时,色氨酸合成酶酶活均较高,温度过高或过低都使酶活下降,尤其在 55 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活大幅度降低失活较严重。

有机介质中的酶具有刚性结构,能记住其存在过的水溶液的最适 pH 值,称为“pH 记忆”效应,在

双相体系中,酶处于水相中,酶微环境 pH 值与水相 pH 值一致。水相 pH 值可以改变酶活性部位上有关基团的解离状态,从而影响酶与底物的结合,因此,酶促反应需要在适宜的 pH 环境中进行。本文中在反应条件为 5 mmol L-丝氨酸和 5 mmol 2-甲基吲哚,质量分数 1%PLP 150 μ L,体积分数 2%甲苯,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体,35 $^{\circ}$ C 下考察了水相 pH 对酶活的影响,结果见图 5,将测得的最高酶活设定为 100%。由图可见,过低的 pH 值可能会影响酶的分子构象,使酶活偏低,当 pH=8 时,双相体系和纯水体系,酶活均较高,故反应水相 pH=8 为宜,双相体系中酶活高于纯水体系中酶活。

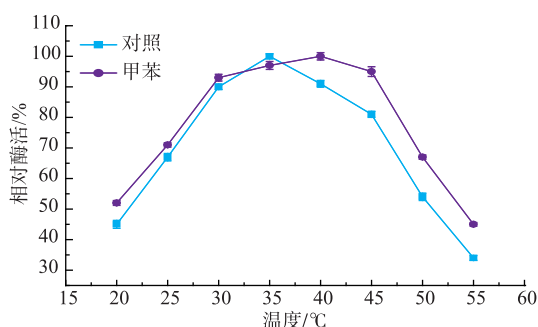


图 4 温度对色氨酸合成酶酶活的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the enzymatic activity.

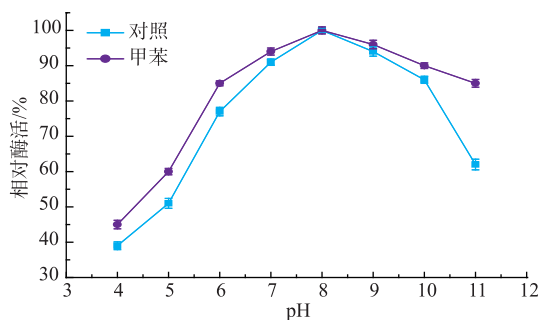


图 5 水相不同 pH 对色氨酸合成酶酶活的影响

Fig. 5 Effect of pH on the enzymatic activity

2.4 底物浓度对酶活影响

底物浓度会影响酶促反应进程,当底物质量分数较低时,酶活会随着底物浓度升高而增加,当底物浓度过高时,又会产生底物抑制,不利于酶促反应的进行。反应条件为不同浓度 L-丝氨酸和 2-甲基吲哚,质量分数 1%PLP 150 μ L,体积分数 2%甲苯,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体,35 $^{\circ}$ C, pH 8.0 下改变反应体系底物浓度,测得酶活曲线见图 6,由图可见,双相体系和纯水体系,底物

浓度为 150 mmol/L 时酶活最高,双相体系中酶活高于纯水体系中酶活。

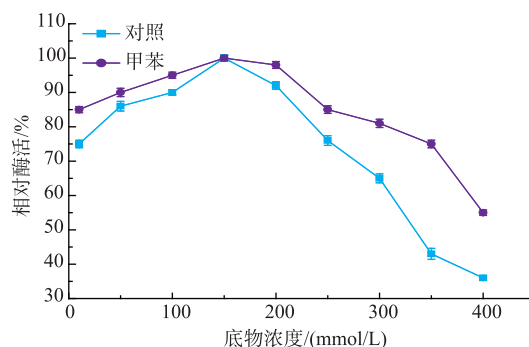


图 6 底物浓度对色氨酸合成酶酶活的影响

Fig. 6 Effect of substrate concentrations on the enzyme activity

2.5 表面活性剂对酶活影响

反应条件为 7.5 mmol L-丝氨酸和 7.5 mmol 2-甲基吲哚,质量分数 1%PLP 150 μ L,不同体积分数表面活性剂,质量分数 1 mL 甲苯,总反应体积 50 mL,0.1 g 色氨酸合成酶菌体, pH 8.0, 35 $^{\circ}$ C, 分别用不同浓度吐温 80、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)、CTAB 和 Trion X-100 处理菌体细胞,以不加表面活性剂的酶活设定为 100%,测得酶活曲线,结果见图 7。由图可见,经 Trion X-100 处理后,酶活明显高于其它两者,因此用质量分数 2%的 Trion X-100 处理菌体细胞为宜。

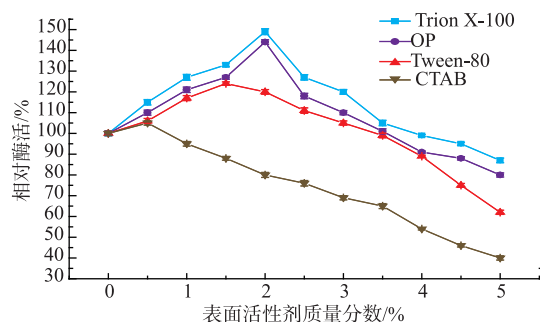


图 7 表面活性剂对色氨酸合成酶酶活的影响

Fig. 7 Effect of surfactants on the enzyme activity

2.6 金属离子对酶活影响

金属离子可以和酶分子结合,改变酶的分子构象,从而激活或抑制酶活力。在酶反应(反应条件为 7.5 mmol L-丝氨酸和 7.5 mmol 2-甲基吲哚,质量分数 1%PLP 150 μ L,质量分数 2% Trion X-100, 1 mL 甲苯,不同金属离子(10^{-4} mol/L),总反应

体积 50 mL, 0.1 g 色氨酸合成酶菌体, pH 8.0, 35 ℃)过程中添加不同的金属离子, 添加的离子包括 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 Zn^{2+} , 金属离子终浓度为 10^{-4} mol/L, 考察金属离子对酶活的影响。由图 8 可知, 与空白对照相比, Ca^{2+} 对酶促反应具有激活作用, 所以在酶促反应中添加 10^{-4} mol/L 的钙离子。

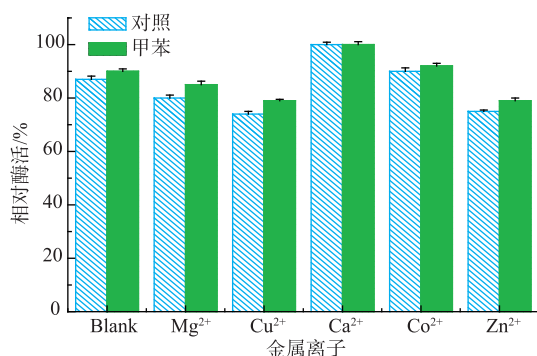


图 8 金属离子对色氨酸合成酶酶活的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on the enzyme activity

2.7 酶促反应进程

将 0.1 g 经 Trion X-100 处理过的湿菌体加到 50 mL 双相反应体系中, 水相加入 5 mmol 丝氨酸,

有机相加入 2-甲基吲哚 6 mmol, 甲苯体积分数为 2%, 10^{-4} mol/L Ca^{2+} , 170 r/min 震荡条件下反应; 另以不加有机溶剂作为对照, 定时取样计算 2-甲基-L-色氨酸的生产量。双相反应体系反应 5 h 内 2-甲基-L-色氨酸的生成量不断增加, 5 h 内反应基本完成, 故酶促反应 5 h 即可终止, 2-甲基-L-色氨酸的质量浓度为 21.17 g/L。纯水相体系反应 10 h 内 2-甲基-L-色氨酸的生成量不断增加, 至 10 h 时酶促反应基本完成, 2-甲基-L-色氨酸的质量浓度为 20.29 g/L。

3 结 语

在水/有机溶剂双相中, 以 L-丝氨酸和 2-甲基吲哚为底物, 利用重组大肠杆菌 DM206[pETDuet-trpBA+trpA/BL21(DE3)]色氨酸合成酶酶法合成 2-甲基-L-色氨酸, 并优化了其转化条件。在最佳工艺条件下酶促反应 5 h, 2-甲基-L-色氨酸的质量浓度为 21.17 g/L。通过增加水/有机溶剂双相体系中 2-甲基吲哚在酶反应体系中溶解度, 可提高酶反应速度, 缩短了反应时间, 提高了 2-甲基-L-色氨酸产率, 为酶法合成 2-甲基-L-色氨酸提供了新思路。

参考文献:

- [1] KEMPTER C, KAISER D, HAAG S, et al. CDA: calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) containing unusual residues[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1997, 36: 498-501.
- [2] TATSUO H, SHOJI M. Separation and assay methods for melatonin and its precursors [J]. *J Chromatography B*, 2000, 747: 95-110.
- [3] KEMA I P, ELISABETH G E V, MUSKIET F A J. Clinical chemistry of serotonin and metabolites [J]. *J. Chromatography B*, 2000, 747: 33-48.
- [4] DONG C, FLECK S, UNVERSUCHT S, et al. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination[J]. *Science*, 2005, 309: 2216-2219.
- [5] 奚文波, 秦丽星, 王卫国, 等. N-苄氧羰基-2-甲基色氨酸的合成方法: 中国, 101914605[P]. 2010-07-27.
- [6] FRENZEL T, ZHOU P, FLOSS H G. Formation of 2-methyltryptophan in the biosynthesis of thiostrepton: Isolation of S-adenosylmethionine: Tryptophan 2-methyltransferase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 278: 35-40.
- [7] GOSS R J M, NEWILL P L A. A convenient enzymatic synthesis of L-halotryptophans[J]. *Chem Commun*, 2006, 47: 4924-4925.
- [8] KIRCHNER G, SCOLLAR M P, KLIVANOV A M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents [J]. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 7072-7076.
- [9] SCHEWE H, HOLTSMANN D, SCHRADER J. P450BM-3-catalyzed whole-cell biotransformation of α -pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 849-857.
- [10] GUNAWAN C, BREUER M, HAUER B, et al. Improved (R)-phenylacetylcarbinol production with *Candida utilis* pyruvate decarboxylase at decreased organic to aqueous phase volume ratios[J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 281-286.
- [11] HILDEBRAND F, LUTZ S. Electroenzymatic synthesis of chiral alcohols in an aqueous-organic two-phase system [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, 18: 1187-1193.
- [12] FORESTI M L, PEDERNEIRA M, FERREIRA M L, et al. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems[J]. *Appl Catal A*, 2008, 334: 65-72.

- [13] ROSA P A J, FERREIRA I F, AZEVEDO A M, et al. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals[J]. **J Chromatography A**, 2010, 1217: 2296-2305.
- [14] WEI D Z, ZHU J H, CAO X J. Enzymatic synthesis of cephalixin in aqueous two-phase systems[J]. **Biochem Engin J**, 2002, 11: 95-99.
- [15] ZhOU Hua, YAO Zhong, SUN Guanghai, et al. Preparation of L-phenylalanine by an aqueous two-phase system [J]. **Chemical Reaction Engineering and Technology**, 2006, 22(2): 146-150. (in Chinese)

科技信息

欧盟允许聚蓖麻油酸聚甘油作为食品添加剂用于食品加工

2017年3月24日,欧洲食品安全局(EFSA)发布聚蓖麻油酸聚甘油(PGPR, E 476)作为食品添加剂的重新评估结论。

经风险评估, EFSA认为聚蓖麻油酸聚甘油科学使用对人体健康无害, 每天食用含 PGPR 4000 mg/kg 的乳化调味汁类食品, 也不会产生健康危害, 因此, EFSA继续同意聚蓖麻油酸聚甘油作为食品添加剂用于食品加工。同时, 评估小组认为在制订欧盟 PGPR 专业规范中应包括三氯丙醇(3-MCPD)的最大限量、活性蓖麻毒素的最大限量等。

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 欧盟允许聚蓖麻油酸聚甘油作为食品添加剂用于食品加工

[EB/OL]. (2017-4-6). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=54029>

欧盟批准一种赖氨酸硫酸盐作为饲料添加剂

据欧盟网站消息, 2017年3月14日欧盟发布 (EU) 2017/439 条例, 批准一种 L-赖氨酸硫酸盐作为饲料添加剂。

这种 L-赖氨酸硫酸盐由大肠杆菌发酵产生。用于饲料可作为动物赖氨酸的有效来源, 不会对动物、人体以及环境构成影响。

新条例同时规定了赖氨酸硫酸盐作为添加剂的组成、活性物质、检测方法以及最大残留量, 同时规定食品标签中需要标明赖氨酸硫酸盐的添加量。

新条例自公布后 20 日起生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准一种赖氨酸硫酸盐作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2017-3-17). <http://news.foodmate.net/2017/03/421928.html>

加拿大批准一种乳糖酶用于酶制剂与部分乳制品

2017年4月5日, 据加拿大卫生部消息, 加拿大卫生部发布通告, 批准一种来自地衣芽孢杆菌 PP3930 的乳糖酶用于低乳糖酶制剂与部分乳制品。

据了解, 目前加拿大已批准其他来源的乳糖酶作为食品酶, 用于低乳糖酶制剂与部分乳制品。然而, 尚未批准地衣芽孢杆菌 (*B.licheniformis*) PP3930 作为任何酶的来源生物。

加拿大卫生部经过评估认为, 现有数据支持地衣芽孢杆菌 PP3930 提取的乳糖酶在用于面包、面粉、全麦面粉和非标准化面包店产品时的安全性, 因此修订食品酶许可清单, 批准其用于低乳糖酶制剂与部分乳制品。按照最新规定, 该乳糖酶可用于低乳糖酶制剂、冰激凌混合物用乳、麦芽乳、部分脱脂乳等产品, 参照良好操作规范适量添加。

[信息来源] 食品伙伴网. 加拿大批准一种乳糖酶用于酶制剂与部分乳制品 [EB/OL]. (2017-4-12). <http://news.foodmate.net/2017/04/425073.html>