

定点饱和突变改善米曲霉木聚糖酶的温度特性

吴芹¹, 臧嘉¹, 胡蝶¹, 王瑞¹, 邬敏辰^{*2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为改善米曲霉木聚糖酶 AoXyn11A 的温度特性, 基于其三维结构的同源建模和分子动力学模拟, 随机替换最高 B-factor 值位点处的 Gly²¹。以重组表达质粒 pET-28a-Aoxyn11A 为模板, 采用全质粒两步 PCR 技术对 AoXyn11A 基因 (*Aoxyn11A*) 中编码 Gly²¹ 的密码子实施饱和突变, 将 pET-28a-Aoxyn11A 各突变体转化 *E. coli* BL21(DE3), 构建了突变转化子文库。以酶的热稳定性为指标, 从文库中筛选出最优突变转化子 (*E. coli*/AoXyn11A^{G21I})。DNA 测序结果显示, *E. coli*/AoXyn11A^{G21I} 表达一种由 Ile²¹ 替换了 Gly²¹ 的突变酶 AoXyn11A^{G21I}。温度特性分析表明: 突变酶的最适温度由突变前的 55 °C 提高至 65 °C; AoXyn11A^{G21I} 在 55 °C 及以下稳定, 较 AoXyn11A 提高了 7 °C。另外, AoXyn11A 突变前后的 pH 特性改变不大。

关键词: 定点饱和突变; 木聚糖酶; 温度特性; 分子动力学模拟; B-factor 值

中图分类号: Q 936 文章编号: 1673-1689(2019)07-0065-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.009

Improvement in the Temperature Properties of Xylanase by Site-Saturated Mutagenesis

WU Qin¹, ZANG Jia¹, HU Die¹, WANG Rui¹, WU Minchen^{*2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To improve the temperature properties of AoXyn11A, a glycoside hydrolase family 11 mesophilic xylanase from *Aspergillus oryzae* CICC40186, the amino acid residue of Gly²¹ that possessing the highest B-factor value was replaced randomly based on the homology modeling of AoXyn11A and molecular dynamics (MD) simulation for its three-dimensional structure. Using the recombinant plasmid pET-28a-Aoxyn11A as a template, the codon of Gly²¹ in the xylanase-encoding gene (*Aoxyn11A*) was site-saturated mutagenesis with the two-stage whole-plasmid PCR technique. And then, the mutational transformant library was constructed by transforming the mutants of pET-28a-Aoxyn11A into *E. coli* BL21. In reference to the thermostability of enzymes, optimal mutational transformant (*E. coli*/AoXyn11A^{G21I}) was screened from library. The DNA sequencing results showed that *E. coli*/AoXyn11A^{G21I} expressed a mutant enzyme (AoXyn11A^{G21I}) with the amino acid residue of Gly²¹ changed by Ile²¹. The analytical results indicated that the optimal temperature

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。E-mail: biowmc@126.com

引用本文: 吴芹, 臧嘉, 胡蝶, 等. 定点饱和突变改善米曲霉木聚糖酶的温度特性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(07): 65-70.

(T_{opt}) of AoXyn11A^{G21I} was 65 °C, which was 10 °C higher than that of AoXyn11A. AoXyn11A^{G21I} was thermostable at or below 55 °C, being 7 °C higher than that of AoXyn11A. In addition, the pH properties of AoXyn11A^{G21I} did not obviously change compared with AoXyn11A.

Keywords: site-saturated mutagenesis, xylanase, temperature properties, molecular dynamics simulation, B-factor values

木聚糖酶(xylanases, EC 3.2.1.8) 从木聚糖主链的内部水解 β -1,4-D-木糖苷键, 是木聚糖降解酶系中的关键组分, 广泛存在于各种生物体中。随着低聚木糖生理功能的发现、加酶饲料的兴起及人类环保意识的增强, 木聚糖酶在许多工业领域如食品、饲料、纺织和造纸等中的应用潜力日趋凸显^[1-2]。目前商品化的木聚糖酶多为中温酶, 最适温度在 45~55 °C 范围内, 然而酶在使用过程中经常会遭遇或需要高温环境, 如在纸浆漂白和饲料造粒工艺中需要 60~80 °C 的温度, 因此耐热性差已成为制约木聚糖酶发展的瓶颈。

木聚糖酶主要归属糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase families, GHFs) 10 和 11, GHF11 木聚糖酶的三维结构由一个 α -螺旋、两个反向平行的 β -折叠片 A 和 B 及若干 loops 构成, 呈右手半握形状^[3]。随着人们对木聚糖酶的结构与功能及作用机理的认识不断深入, 采用基因工程技术改造酶分子以获得具有优良酶学性质的耐热木聚糖酶的研究得到了快速发展。Zhang 等^[4] 将 *Streptomyces olivaceoviridis* 木聚糖酶 SoxB 的 N 端与 *Thermomonospora fusca* 耐热酶 TfxA 的对应区域互换, 获得最适温度和温度稳定性大幅度提高的杂合木聚糖酶 STxAB。Ayadia 等^[5] 将位于 *Trichoderma reesei* 木聚糖酶三维结构表面的 Ser 单点和双点突变为 Thr, 其中双点突变酶(S80T-S149T) 在 55 °C 的半衰期由野生型酶的 20 min 延长至 37 min。Qian 等^[6] 对白蚁 GHF11 木聚糖酶 XYL7 实施定点饱和突变, 获得了两个最适温度均比野生型酶提高 10 °C 的突变酶(XYL7-TC 和 XYL7-TS)。

Aspergillus oryzae GHF11 木聚糖酶 AoXyn11A (GenBank: AFA51067) 是一种具有优良酶学性质的生物催化剂, 但其耐热性较差^[7]。本研究基于其三维结构的同源建模和分子动力学模拟, 拟将 Gly²¹ 随机替换为其他氨基酸。以 pET-28a-Aoxyn11A 为对象, 对 Aoxyn11A 中编码 Gly²¹ 的密码子实施饱和突变,

构建突变转化子文库, 并从中获得表达最高温度稳定性木聚糖酶的最优突变转化子。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) CICC40186; 购自中国工业微生物菌种保藏中心; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 和表达质粒 pET-28a (+): 购自 Novagen 公司; 重组表达质粒 pET-28a-Aoxyn11A 和大肠杆菌转化子 *E. coli*/Aoxyn11A: 由作者所在实验室构建和保藏。

1.1.2 主要试剂和引物 PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 Dpn I、DNA Marker 和蛋白质 Marker; 购自大连 TaKaRa 公司; IPTG、胰蛋白胨和酵母提取物: 购自上海 Sangon 公司; D-木糖、桦木木聚糖和考马斯亮蓝 R-250; Sigma 公司产品; 其他试剂均为分析纯。PCR 引物委托 Sangon 公司合成见表 1, 用于 Aoxyn11A 的定点饱和突变。

表 1 Aoxyn11A 定点饱和突变的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for the site-saturated mutagenesis of Aoxyn11A

名称	序列 (5' - 3')	长度/ bp
G21X-F	TTCTGGACCGACGGC[NNK]GGTGATGTGAC TTAC	33
X11-R	GCGGCCGCTCAATAAACACTGATAGCAG	28

注: 方框为饱和突变密码子 (N=A/C/G/T, K=T/G), 下划线为 Not I 酶切位点。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基: 1 g/dL 胰蛋白胨、0.5 g/dL 酵母提取物和 1 g/dL NaCl, pH 7.2; LB 固体培养基: 添加 1.8 g/dL 的琼脂粉; LB 抗性培养基: 添加终浓度为 100 μ g/mL 的卡那霉素。

1.2 实验方法

1.2.1 同源建模和分子动力学模拟 在 PDB 数据库中搜索与 AoXyn11A 一级结构同源性高的且已知

晶体结构的 GHF11 木聚糖酶,选取其中的 3 种晶体结构 (PBD:1TE1,2VUL 和 1ENX) 为模板,运用 SALIGN 多空间结构比对程序 (http://salilab.org/DBAli/?page=tools_&action=f_salign) 和 MODELLER 9.11 建模程序 (<http://salilab.org/modeller/>) 进行 AoXyn11A 三维结构的多模板同源建模及优化。运用 GROMACS 4.5 程序包 (<http://www.gromacs.org/>) 并参照 Yin 等^[8]的方法对 AoXyn11A 的三维结构进行分子动力学(molecular dynamics,MD)模拟,选择将最高温度因子 B-factor 值位点处的 Gly²¹ 随机替换为其他氨基酸。

1.2.2 突变转化子文库的构建和筛选 以 pET-28a-Aoxyn11A 为模板、G21X-F 和 X11-R 为引物,采用全质粒两步 PCR (two-stage whole-plasmid PCR)^[9]对 Gly²¹ 密码子实施饱和突变。将 pET-28a-Aoxyn11A 突变体用 Dpn I 消化,转化 *E. coli* BL21,构建突变转化子文库。从文库中挑选 96 个转化子 (*E. coli*/Aoxyn11A^{G21X},X 代表任意氨基酸),接种于 500 μ L LB 抗性培养基中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h,以 2%接种体积分数转接相同的培养基,培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8 时,加入 0.5 mmol/L IPTG,16 $^{\circ}$ C 诱导表达 8 h。离心收集菌体,用柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L、pH 5.5) 悬浮,反复冻融破碎细胞,上清液作为粗酶液。将酶液 60 $^{\circ}$ C 保温 20 min,适当稀释后取 5 μ L 加入 95 μ L 0.5 g/dL 桦木木聚糖溶液 (相同缓冲液配制) 中,借助 PCR 仪进行催化和显色反应 (50 $^{\circ}$ C 15 min,加 50 μ L DNS 试剂,95 $^{\circ}$ C 5 min,冷却至 10 $^{\circ}$ C)。加入 96 孔板中,用酶标仪测定 OD_{540 nm} 值。残余酶活性大于 50%的突变木聚糖酶所对应的转化子定义为正突变子,对其进行 DNA 测序。延长 60 $^{\circ}$ C 保温时间,从正突变子中获得最优突变转化子。

1.2.3 木聚糖酶的纯化 按上述方法分别将 *E. coli*/Aoxyn11A 和最优突变转化子在 30 mL LB 抗性培养基中进行诱导表达,用 3 mL 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液重悬菌体,冰浴超声波破碎细胞,上清液在 4 $^{\circ}$ C 用 Ni-NAT 亲和层析柱 (北京 Tiandz 公司) 纯化目的酶蛋白。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物。

1.2.4 木聚糖酶活性的测定 参照 Bai 等^[10]的方法并略作修改。在 2.4 mL 0.5%桦木木聚糖溶液 (pH 5.5、50 mmol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液配制) 中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 $^{\circ}$ C 反应 15 min,再加

入 2.5 mL DNS 试剂,沸水浴显色 7 min,测定 OD_{540 nm} 值。在上述反应条件下,1 个木聚糖酶活性单位(U) 定义为每分钟产生 1 μ mol 还原糖 (以 D-木糖计) 所需的酶量。

1.2.5 木聚糖酶酶学性质的分析

1) 温度对酶活性的影响:在不同温度 (45~75 $^{\circ}$ C) 下,按 1.2.4 的方法测定木聚糖酶活性。最适温度定义为最高酶活性(相对酶活性 100%) 所对应的温度。将酶液在 35~65 $^{\circ}$ C 下处理 1 h,按 1.2.4 的方法测定残余木聚糖酶活性,未经处理酶液的酶活性以 100%计。温度稳定性定义为残余酶活性大于 85%所对应的温度。

2) pH 对酶活性的影响:用 pH 3.5~7.5 的缓冲液配制 0.5%桦木木聚糖溶液,按 1.2.4 的方法测定木聚糖酶活性。最适 pH 定义为最高酶活性所对应的 pH 值。将酶液在 pH 3.5~7.5、35 $^{\circ}$ C 下处理 1 h,按 1.2.4 的方法测定残余木聚糖酶活性。pH 稳定性定义为残余酶活性在 85%以上所对应的 pH 范围。

1.2.6 统计学分析 实验结果以“均数 $\pm$ 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 20.0 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA) 和 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 AoXyn11A 三维结构的同源建模

已知晶体结构的 GHF11 木聚糖酶与 AoXyn11A 的一级结构同源性均小于 72%,因此本研究选取同源性相对较高、分别源自 *Penicillium funiculosum* (1TE1)、*E. coli* (2VUL) 和 *Hypocrea jecorina* (1ENX) 的 3 种木聚糖酶晶体结构作为模板,采用 SALIGN 和 MODELLER 9.11 进行 AoXyn11A 三维结构的多模板同源建模及优化,见图 1。已有研究表明,目标蛋白质三维结构同源建模的准确度主要取决于其与模板蛋白质的一级结构同源性高低,当同源性不高时,单模板同源建模的准确度较低^[11]。

2.2 拟随机替换位点的选定

蛋白质构象的刚性与其各位点处氨基酸的 B-factor 值成负相关性^[12]。运用 GROMACS 4.5 对 AoXyn11A 三维结构进行了 MD 模拟,计算出各氨基酸的 B-factor 值,见图 2。由图 2 可见,AoXyn11A 中 Gly²¹ 的 B-factor 值最高 (70.27 $\text{\AA}$),故选定将 Gly²¹ 随机替换为其他氨基酸。

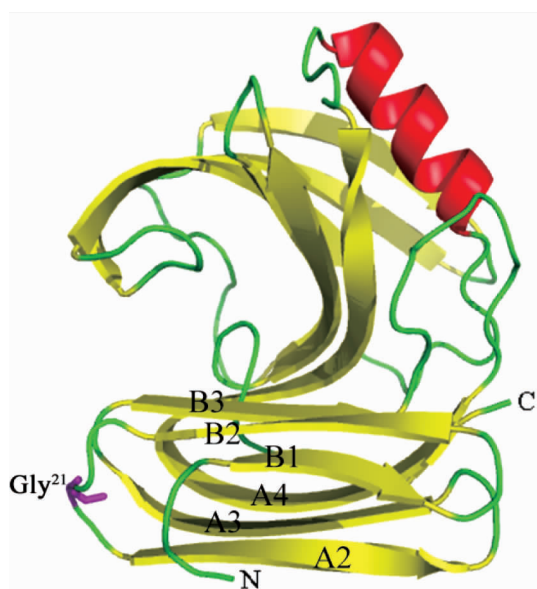
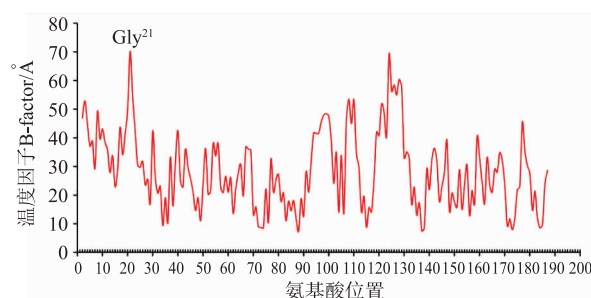


图1 AoXyn11A 的三维结构模型

Fig. 1 Three-dimensional structure model of AoXyn11A

图2 AoXyn11A 各位点处氨基酸残基的温度因子 B-factor 值
Fig. 2 B-factor values of amino acid residues in the sites of AoXyn11A

2.3 最优突变转化子的获得

将 *E. coli/Aoxyn11A* 和 96 个 *E. coli/Aoxyn11A*^{G21X} 所表达的木聚糖酶在 60 °C 保温 20 min, 测定残余酶活性。结果显示, AoXyn11A 活性完全丧失, 而 4 种突变酶 (AoXyn11A^{G21I}、AoXyn11A^{G21F}、AoXyn11A^{G21V} 和 AoXyn11A^{G21L}) 的残余活性大于 50%, 见图 3。延长保温时间至 30 min, 测得 4 种酶的残余活性分别为 57.3、39.3、30.5 和 37.1%, 从而获得了最优突变转化子 *E. coli/Aoxyn11A*^{G21I}。

2.4 木聚糖酶的纯化和分析

E. coli/Aoxyn11A 和 *E. coli/Aoxyn11A*^{G21I} 经 IPTG 诱导表达和超声波破碎细胞, 上清液采用 Ni-NAT 柱纯化目的酶蛋白。SDS-PAGE 分析显示, 纯化的 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I} 均约在相对分子质

量 24 100 处呈现单一条带(图 4 泳道 2 和 4)。

AoXyn11A	STPSSTGYNNGYYSFWTDGCGDVTYTNGN 30
AoXyn11A ^{G21I}	STPSSTGYNNGYYSFWTDGIGDVTYTNGN 30
AoXyn11A ^{G21F}	STPSSTGYNNGYYSFWTDGFGDVTYTNGN 30
AoXyn11A ^{G21V}	STPSSTGYNNGYYSFWTDGVGDVTYTNGN 30
AoXyn11A ^{G21L}	STPSSTGYNNGYYSFWTDGLGDVTYTNGN 30

图3 AoXyn11A 及其 4 种代表性突变酶 N 端的 30 个氨基酸残基

Fig. 3 N-terminal 30 amino acid residues of AoXyn11A and its four representative mutants

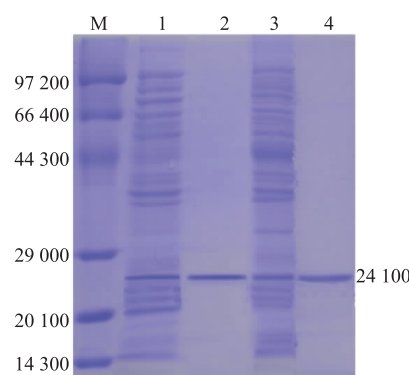
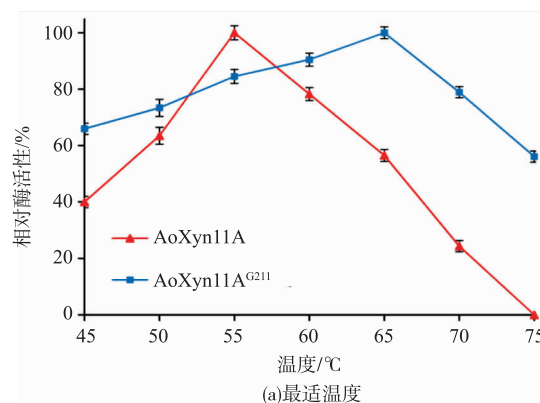
M: 蛋白质 Marker; 1, 3: *E. coli/Aoxyn11A* 和 *E. coli/Aoxyn11A*^{G21I} 上清液; 2, 4: 纯化的 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I}

图4 大肠杆菌转化子表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed products in *E. coli* transformants

2.5 木聚糖酶酶学性质的分析

2.5.1 最适温度和温度稳定性 温度对 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I} 活性的影响见图 5。由图 5 (a) 可见, AoXyn11A^{G21I} 的最适温度为 65 °C, 较 AoXyn11A 提高了 10 °C; 由图 5 (b) 可见, AoXyn11A^{G21I} 和 AoXyn11A 分别在 48、55 °C 及以下稳定。测定结果表明, 将 AoXyn11A 中的 Gly²¹ 替换为 Ile²¹ 明显改善了其温度特性。



(a)最适温度

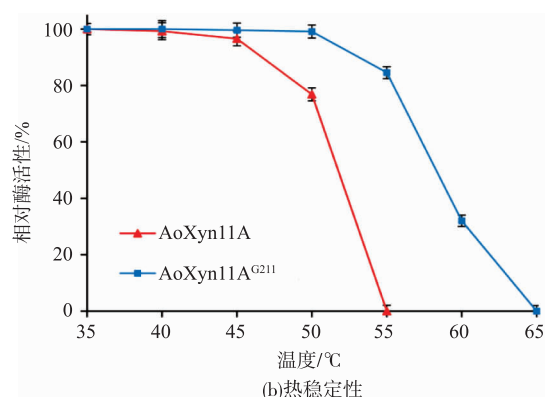


图5 AoXyn11A和AoXyn11A^{G21I}的最适温度和温度稳定性
Fig. 5 Temperature optima and stabilities of AoXyn11A and AoXyn11A^{G21I}

2.5.2 最适 pH 和 pH 稳定性 分析了 pH 对 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I} 活性的影响。AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I} 的最适 pH 均为 5.5; 在 pH 5.0~7.0 范围内残余酶活性均大于 85%。测定结果表明, Gly²¹ 替换为 Ile²¹ 对 AoXyn11A 的 pH 特性改变不大。

2.6 木聚糖酶三维结构的分析

Gly 侧链仅有一个氢原子, 由于缺乏长侧链的约束, 致使多肽链在 Gly 残基位点处呈现柔性构象; 另外, Gly 具有最高的构象熵, 在解折叠过程中所需能量最少。因此, 将特定位点处的 Gly 突变为其他氨基酸可有效改善 GHF11 木聚糖酶温度特性^[13]。由图 1 可见, Gly²¹ 使 AoXyn11A 在该位点处的柔性较强, 导致其温度稳定性较差。将 Gly²¹ 突变为 Ile²¹ (支链氨基酸) 提高了 AoXyn11A 构象的刚性并降低了熵, 对改善其温度特性起促进作用。

AoXyn11A 的 Gly²¹ 位于连接 β 折叠股 B2 和 A2 的 loop 上。运用 PIC 程序 (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) 分析 AoXyn11A 和 AoXyn11A^{G21I} 构象中存在的作用力。结果表明, 除了共同存在的疏水作用外, AoXyn11A 中 P3-F16 和 I58-V74 形成了 2 对疏水作用; 而 AoXyn11A^{G21I} 中 I21-V41、Y34-V172、Y71-L72、A73-I87、V74-V172、Y102-I115、Y113-I115、I115-L162 和 W157-Y160 形成了 9 对疏水作用。另外, AoXyn11A^{G21I} 较 AoXyn11A 多出了 3 对氢键和 1 对盐桥 (E84-R120)。许多研究表明, 疏水作用、氢键、盐桥和二硫键等对酶的热稳定性起重要作用^[14]。

3 结 语

酶在各领域的应用常受限于其热稳定性差, 如何获得性质优良的耐热酶已成为研究人员所面临的挑战。基因工程技术中的定点饱和突变在改善酶学性质如温度和 pH 特性、比活性、对映和区域选择性及底物特异性等方面备受关注。本研究基于生物数据库的相关数据并借助多种生物软件对 AoXyn11A 的三维结构进行多模板同源建模和分子动力学模拟, 设计将其最高温度因子 B-factor 值处的 Gly²¹ 随机替换为其他氨基酸, 采用定点饱和突变技术构建了转化子文库, 筛选获得了的最优突变酶转化子 AoXyn11A。与 AoXyn11A 相比, 突变酶 AoXyn11A^{G21I} 的最适温度和温度稳定性有明显的提高。本设计方案为木聚糖酶及其它酶蛋白的热稳定性定向改造提供了一种新的途径。

参考文献:

- [1] LIU Xiaotong, WU Minchen, YIN Xin, et al. Effect of disulfide bridge on thermostability improvement of the xylanase AoXyn11A[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(10): 1038-1043. (in Chinese)
- [2] POLIZELI M L T M, RIZZATTI A C S, MONTI R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 67(5): 577-591.
- [3] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2005, 29(1): 3-23.
- [4] ZHANG S, ZHANG K, CHEN X Z, et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010, 395(2): 200-206.
- [5] AYADI D Z, SAYARI A H, HLIMA H B, et al. Improvement of *Trichoderma reesei* xylanase II thermal stability by serine to threonine surface mutations[J]. **Biological Macromolecules**, 2015, 72: 163-170.
- [6] QIAN C L, LIU N, YAN X, et al. Engineering a high-performance, metagenomic-derived novel xylanase with improved soluble

- protein yield and thermostability[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2015, 70:35-41.
- [7] LI J F, GAO S J, LIU X T, et al. Modified pPIC9K vector-mediated expression of a family 11 xylanase gene, *Aoxyn11A*, from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*[J]. **Annals of Microbiology**, 2013, 63(3):1109-1120.
- [8] YIN X, LI J F, WANG J Q, et al. Enhanced thermostability of a mesophilic xylanase by N-terminal replacement designed by molecular dynamics simulation[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, 93(12):3016-3023.
- [9] REETZ M T, CARBALLEIRA J D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. **Nature Protocols**, 2007, 2(4):891-903.
- [10] BAI W Q, XUE Y F, ZHOU C, et al. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5[J]. **Biotechnology Letters**, 2012, 34(11):2093-2099.
- [11] SOKKAR P, MOHANDASS S, RAMACHANDRAN M. Multiple templates-based homology modeling enhances structure quality of AT1 receptor: validation by molecular dynamics and antagonist docking[J]. **Journal of Molecular Modeling**, 2011, 17(7):1565-1577.
- [12] REETZ M T, CARBALLEIRA J D, ANDREAS V. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B-factors as a strategy for increasing protein thermostability[J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2006, 45(46):7745-7751.
- [13] GRAY T M, MATTHEWS B W. Structural analysis of the temperature-sensitive mutant of bacteriophage T4 lysozyme, glycine 156→aspartic acid[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1987, 262(35):16858-16864.
- [14] YANG Haomeng, YAO Bin, FAN Liyun. Recent advances in structures and relative enzyme properties of xylanase[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2005, 21(1):6-11. (in Chinese)

科 技 信 息

澳新拟批准普鲁兰酶作为加工助剂

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,2019年6月6日,澳新食品标准局发布82-19号通告,拟批准来自转基因地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的普鲁兰酶(pullulanase)作为加工助剂用于酿造和淀粉加工。

据了解,此次申请是由DuPont Australia Pty Ltd提出。预计2019年9月11或12日,此申请得到全面批准,若无其他评审要求,预计2019年10月下旬刊登在澳新公报上。

[信息来源]食品伙伴网. 澳新拟批准普鲁兰酶作为加工助剂 [EB/OL]. (2019-6-11). <http://news.foodmate.net/2019/06/521875.html>