

产果聚糖蔗糖酶重组枯草芽孢杆菌的构建及表达

孙惟沁, 沐万孟, 张涛, 江波*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 果聚糖蔗糖酶能够将蔗糖和乳糖转化为具有益生元功能的低聚乳果糖。为了实现果聚糖蔗糖酶在重组枯草芽孢杆菌中的高效表达, 将两种启动子比较并进行串联操作, 确定生产果聚糖蔗糖酶的最佳启动子并对重组菌的生长条件进行探索。构建 WB-PH、WB-P、WB-H、1A-PH、1A-P、1A-H 六种重组枯草芽孢杆菌, 其中 WB-PH 发酵酶活明显优于其他重组菌。研究生长条件对重组菌 WB-PH 产酶的影响, 采用大豆蛋白胨作为氮源, 果聚糖蔗糖酶的表达量明显增加, 发酵过程中保持较高的溶氧水平也对产酶量有较大的提高。优化后的发酵酶活最高可达 108.34 U/mL, 相比优化前提高了 25.92 倍。

关键词: 果聚糖蔗糖酶; 高效表达; 基因工程菌; 发酵

中图分类号: Q 814 文章编号: 1673-1689(2019)10-0079-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.012

Construction and Expression of a Recombinant *Bacillus subtilis* Producing Levansucrase

SUN Weiqin, MU Wanmeng, ZHANG Tao, JIANG Bo*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lactosucrose is a rare trisaccharide with prebiotic effect, which can be formed from lactose and sucrose by levansucrase. In this study, levansucrase expression was efficiently carried out by comparing two different promoters and making them tandem. Six different strains with different promoters had been successfully constructed, including WB-PH, WB-P, WB-H, 1A-PH, 1A-P, 1A-H. Amongst them, WB-PH exhibited a higher production level. The effect of growing condition on WB-PH was studied. Using soy peptone as nitrogen source and a higher dissolved oxygen level can enhance levansucrase expression. The enzyme activity reached 108.34 U/mL, which was 25.92 times higher than it before optimization.

Keywords: levansucrase, efficient expression, genetically engineered bacterium, fermentation

低聚乳果糖(lactosucrose, LS)是由半乳糖、葡萄糖和果糖构成的一种三糖。低聚乳果糖的吸湿性高、持水力强、在酸性条件下稳定、甜度为蔗糖的

30%^[1], 与其他低聚糖甜味剂相比, 低聚乳果糖的甜味质量与蔗糖最为相近^[2]。低聚乳果糖不能被人和小鼠肠道酶系水解^[3], 但能够被双歧杆菌选择性利

收稿日期: 2017-02-23

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶学方面的研究。E-mail: bjiaing@jiangnan.edu.cn

引用本文: 孙惟沁, 沐万孟, 张涛, 等. 产果聚糖蔗糖酶重组枯草芽孢杆菌的构建及表达[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 79-86.

用^[2,4-5],从而改善肠道微环境,摄入低聚乳果糖还能够促进钙吸收^[6],抑制体脂积聚,预防肥胖^[7],调节免疫^[8-9]。因此,低聚乳果糖被认为是一种具有益生元效果的功能性低聚糖。在日本,低聚乳果糖被批准作为特定保健食品(FOSHU)的功能性配料。

以蔗糖和乳糖为底物,酶法生产低聚乳果糖有两种方法,一是通过环状芽孢杆菌^[10]来源的 β -半乳糖苷酶将乳糖分解产生的 β -半乳糖转移到蔗糖中葡萄糖 C4 位羟基上;二是通过多种来源(*Aerobacter levanicum*^[11]、*Bacillus natto*^[12]、*Bacillus subtilis* KCCM 32835^[13]、*Paenibacillus polymyxa* IFO 3020^[14]、*Sterigmatomyces elviae* ATCC 18894^[15]等)的果聚糖蔗糖酶或节杆菌 *Arthrobacter* sp. K-1^[16]来源的 β -呋喃果糖苷酶将蔗糖分解产生的果糖基转移到乳糖还原性末端 C1 位羟基上。目前,针对这些具有合成低聚乳果糖能力的酶的研究主要在高效野生菌株的筛选、化学试剂修饰^[17]、固定化^[15,18]、基因工程菌株的构建^[19-22]几方面。

枯草芽孢杆菌有着长期制备发酵食品的历史,被美国 FDA 和中国农业部等部门批准为食品级安全菌株^[23],它具有培养简单快速、蛋白分泌能力强、产物不易形成包涵体、非致病性、遗传背景清楚、密码子偏好性不明显^[24]的特点,是目前生产各种工业用酶,如淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶的理想表达宿主^[25]。目前对基因工程菌的研究报道均是以大肠杆菌作为表达系统,尚未有枯草芽孢杆菌表达。本研究拟将肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC^[25]编码的果聚糖蔗糖酶基因分别克隆到单启动子、双启动子表达载体上,并将质粒导入枯草芽孢杆菌 WB600 和 1A751 中,构建无抗菌株。对重组菌的发酵条件进行优化,以实现果聚糖蔗糖酶的高效表达,为该酶的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 实验所用菌株和质粒详见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strain and plasmid

菌株与质粒		特性	来源
枯草芽孢杆菌	<i>B.subtilis</i> 1A751 (dal-)	D-丙氨酸缺陷型	本实验室保存
	<i>B.subtilis</i> WB600 (dal-)	D-丙氨酸缺陷型	本实验室保存
质粒	pET-22b-LEME	表达果聚糖蔗糖酶	文献[26]
	pUB-P43-DPE-dal	含有双启动子(P43,HPAII),D-丙氨酸消旋酶筛选标记	文献[27]
	pUB-P43-HPAII-LEME-dal	含有双启动子(P43,HPAII),表达果聚糖蔗糖酶,D-丙氨酸消旋酶筛选标记	本实验
	pUB-P43-LEME-dal	含有单启动子(P43),表达果聚糖蔗糖酶,D-丙氨酸消旋酶筛选标记	本实验
	pUB-HPAII-LEME-dal	含有单启动子(HPAII),表达果聚糖蔗糖酶,D-丙氨酸消旋酶筛选标记	本实验

1.1.2 试剂和培养基 DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 和 DL10 000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司;SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖等其他常用试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

LB 培养基(g/L):NaCl 10,胰蛋白胨 10,酵母提取物 5。

基础发酵培养基(g/L):酵母提取物 20,胰蛋白胨 25,K₂HPO₄ 3,葡萄糖 30。

1.2 实验方法

1.2.1 果聚糖蔗糖酶目的基因的克隆与重组质粒

的构建

1)双启动子重组质粒构建。以 pET-22b-LEME 质粒为模版,用引物 P1 和 P2 扩增果聚糖蔗糖酶基因 LEME 片段,以 pUB-P43-DPE-dal 质粒为模版,用引物 P3 和 P4 扩增双启动子载体骨架 pUB-P43-HPAII-dal 片段,胶回收纯化 PCR 产物,用 NanoDrop 测定 DNA 浓度,按照摩尔比 1:1 互为模版 PCR,得到多聚体片段 Poly-PH,将其转化到枯草芽孢杆菌 WB600 感受态细胞中,构建重组菌株 WB-PH。参照 SanPrep 柱式质粒DNA 小量抽提试剂盒方法提取重组菌株质粒 pUB-P43-HPAII-LEME-dal。

2)单启动子重组质粒构建。单启动子(P43 和 HPAII)以 pUB-P43-HPAII-LEME-dal 质粒为模

版,分别用引物 P5、P6 和 P7、P8 扩增果聚糖蔗糖酶基因 LEME+P43 片段和 LEME 片段,分别用引物 P9、P10 和 P11、P12 扩增单启动子载体骨架 pUB-dal 片段和 pUB-HPAII-dal 片段,同上述双启动子方法一样构建多聚体片段 Poly-P、Poly-H。

PCR 反应条件:98 ℃预变性 2 min;98 ℃解链 10 s,60 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 2 min,共 30 个循环;72 ℃延伸 5 min。

预期得到 3 种不同启动子组合的质粒见图 1。引物列表见表 2。

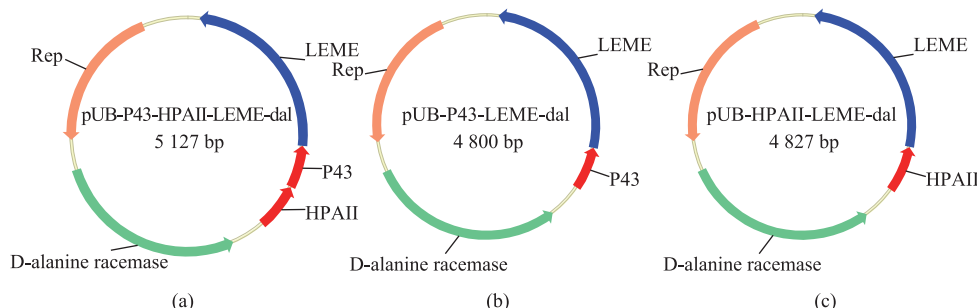


图 1 不同启动子组合质粒

Fig. 1 Plasmids with different promoters

表 2 引物列表

Table 2 List of primers

引物	序列 5'-3'
P1	5'-TTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGAAAAGCACCCCTGAGAAATTTG-3'
P2	5'-CGTCTGTACGTTCCCTTAAGGAATTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGA-3'
P3	5'-TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAATTCCTTAAGGAACGTACAGACG-3'
P4	5'-CAAAATTTCTCAGGGGTGCTTTTCATGTGTACATTCTCTTACCTATAA-3'
P5	5'-GTTTAAAGGTGGAGATTTTTTTCAGTTGATAGGTGGTATGTTTTTCGCTTGA-3'
P6	5'-CGTCTGTACGTTCCCTTAAGGAATTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGA-3'
P7	5'-TTGTAGAATGCAAAAAGTCAAATCAATGAAAAGCACCCCTGAGAAATTTG-3'
P8	5'-CGTCTGTACGTTCCCTTAAGGAATTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGA-3'
P9	5'-TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAATTCCTTAAGGAACGTACAGACG-3'
P10	5'-TCAAGCGAAAACATACCACCTATCAACTCAAAAAATCTCCACCTTTAAAC-3'
P11	5'-TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAATTCCTTAAGGAACGTACAGACG-3'
P12	5'-CAAAATTTCTCAGGGGTGCTTTTCATTGATTCACTTTTTGCATTCTACAA-3'

1.2.2 重组枯草芽孢杆菌的构建 枯草芽孢杆菌感受态按照文献[28]制备。将 Poly-PH、Poly-P、Poly-H 分别转入枯草芽孢杆菌 WB600 (dal⁻) 和 1A751 (dal⁻) 感受态细胞中,37 ℃、100 r/min 培养 1 h,离心并用无菌水洗涤 3 次,再用 400 μL 无菌水重悬。取 200 μL 菌液涂布在无抗 LB 固体平板上,37 ℃ 12 h 培养,次日检查并筛选成功转化的阳性转化子,表达在枯草芽孢杆菌 WB600(dal⁻)中的命名分别为 WB-PH、WB-P、WB-H,表达在枯草芽孢杆菌 1A751(dal⁻)中的命名分别为 1A-PH、1A-P、1A-H。

1.2.3 培养与表达 将构建成功的重组菌在 LB 平板上划线活化,挑取单菌落接种于 4 mL LB 培养基

中,37 ℃、200 r/min 培养 12 h 作为种子液。按照 2% 接种量接种于 25 mL 发酵培养基中,37 ℃ 200 r/min 培养 15 h,收集发酵液。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(SDS-PAGE) 取 1 mL 发酵液离心取菌体,加入 1 mL 水重悬并煮沸 10 min,冷却后加入 50 μL 浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶溶液,置于 37 ℃水浴中 1 h 进行裂解。离心后取 40 μL 上清液,向其中加入 10 μL 5×SDS-PAGE Loading Buffer,沸水浴 5 min。使用 5%的浓缩胶,12%的分离胶进行蛋白电泳,考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.5 果聚糖蔗糖酶发酵酶活检测 果聚糖蔗糖酶发酵酶活检测:1 mL 反应体系包括:15%蔗糖、

15%乳糖、PBS 50 mmol/L pH 6.5、80 μ L 发酵液。反应条件:4 0℃,10 min。反应完成后沸水浴 10 min 灭酶。

将灭酶的反应液离心后取上清 200 μ L 加入 800 μ L 超纯水中稀释,用 0.22 μ m 滤膜过滤后上液相色谱检测。

测定条件:高效液相色谱 Agilent 1260 Infinity, 色谱柱 Waters Spherisorb Amino(NH₂) Column,示差折光检测器,流动相 乙腈:甲醇:水=77:13:10(V:V:V),流速 1 mL/min,柱温 35 ℃。

一个酶活单位(U)定义为 pH 6.5,40 ℃条件下,每分钟生成 1 μ mol 低聚乳果糖产物所需要的酶量。

1.2.6 菌体量测定 湿菌体重:取 2 mL 发酵液于预先称重的 2 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃去上清后再次称重,得到湿菌体质量浓度,计算每毫升湿菌体重。

1.2.7 发酵条件优化 氮源优化:保持总氮含量不变,分别使用大豆蛋白胨、胰蛋白胨、鱼粉蛋白胨、酵母提取物、尿素、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、柠檬酸氢二铵、NH₄H₂PO₄、CH₃COONH₄ 作为唯一氮源进行发酵,测定菌体量和发酵酶活。确定最佳氮源后,改变氮源添加量,进行发酵培养,测定菌体量和发酵酶活。

碳源优化:保持总碳含量不变,分别使用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、糊精、可溶性淀粉、甘油作为唯一碳源进行发酵,测定菌体量和发酵酶活。确定最佳碳源后,改变碳源添加量,进行发酵培养,测定菌体量和发酵酶活。

接种量:采用最佳碳源、氮源配制发酵培养基,按 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%接种量接种,进行发酵培养,测定菌体量和发酵酶活。

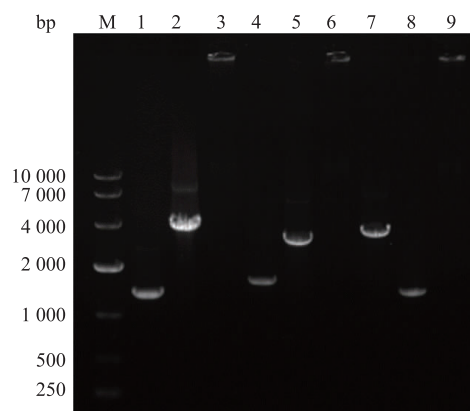
装液量:在 250 mL 三角瓶和 500 mL 三角瓶中分别装 25、50、75、100 mL 发酵培养基,进行发酵培养,测定菌体量发酵酶活。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与重组质粒的构建

通过 PCR 方法,成功扩增得到 6 条基因片段,分别为 pUB-P43-HPAII-LEME-dal 质粒的目的基因片段(1 275 bp)、载体骨架片段(3 852 bp)、pUB-P43-LEME-dal 质粒的目的基因片段(1 575 bp)、载

体骨架片段(3 225 bp)、pUB-HPAII-LEME-dal 质粒的目的基因片段(1 275 bp)、载体骨架片段(3 552 bp)。再以扩增片段互为引物进行 PCR,成功得到了 3 条多聚体片段 Poly-PH、Poly-P、Poly-H,见图 2。



注:M 核酸标准分子质量;1、2、3 分别为 pUB-P43-HPAII-LEME-dal 质粒的目的基因片段、载体骨架片段、Poly-PH 片段;4、5、6 分别为 pUB-P43-LEME-dal 质粒的目的基因片段、载体骨架片段、Poly-P 片段;7、8、9 分别为 pUB-HPAII-LEME-dal 质粒的载体骨架片段、目的基因片段、Poly-H 片段

图 2 基因片段 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products of different genes

2.2 重组质粒在枯草芽孢杆菌中的表达

使用化学转化方法,将 Poly-PH、Poly-P、Poly-H 导入枯草芽孢杆菌 1A751 和 WB600 中。将阳性转化子进行发酵培养,测定其发酵酶活,结果如图 3 所示,6 种重组菌均有酶活,其中双启动子质粒对于果聚糖蔗糖酶表达的效果均优于单启动子质粒,其中 WB-PH 的发酵酶活最高(4.179 U/mL),是 WB-P 的 17.3 倍,WB-H 的 55.7 倍;1A-PH 的发酵酶活是 1A-P 的 7 倍,1A-H 的 8.8 倍。文献[29]将启动子 HPAII 多次串联,经串联后的启动子介导的纳豆激酶活性较单个启动子最多提高了 92.51%。文献[30]将两个病原诱导物启动子串联并与编码 β -葡萄糖苷酸酶的基因 uidA 融合,双启动子的诱导表达活性比单启动子高了 9 倍。结果表明,启动子串联能够提高蛋白的表达量。

两种枯草芽孢杆菌表达载体相比,WB-PH 的发酵酶活是 1A-PH 的 9.4 倍,其原因是与 1A751 相比,WB600 敲除了 6 个自身蛋白酶基因,因而外源蛋白能够更稳定的表达。综上,后续实验采用 WB-PH

作为研究对象。

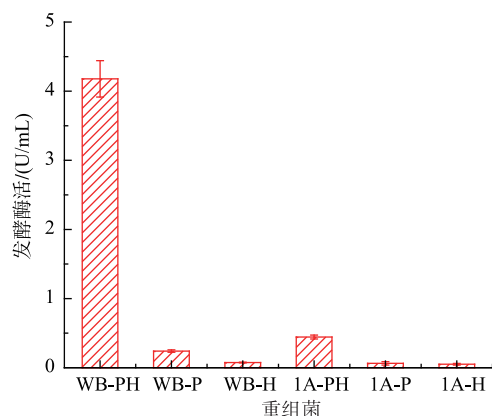


图3 重组菌的发酵酶活

Fig. 3 Enzyme activity of different recombinant strains

2.3 发酵条件优化结果分析

2.3.1 氮源种类及用量 不同氮源对发酵酶活和菌体质量浓度的影响见图4。如图4所示,以大豆蛋白胨作为氮源能够获得最高发酵酶活(66.82 U/mL),其次是以酵母提取物作为氮源(13.38 U/mL)。有机氮源能明显提高菌体量,其中以酵母提取物作为氮源,菌体量最大,其次是大豆蛋白胨、胰蛋白胨、鱼粉蛋白胨。从结果中还可以发现,WB-PH对无机氮源利用率很低,菌体量及发酵酶活均没有提高。

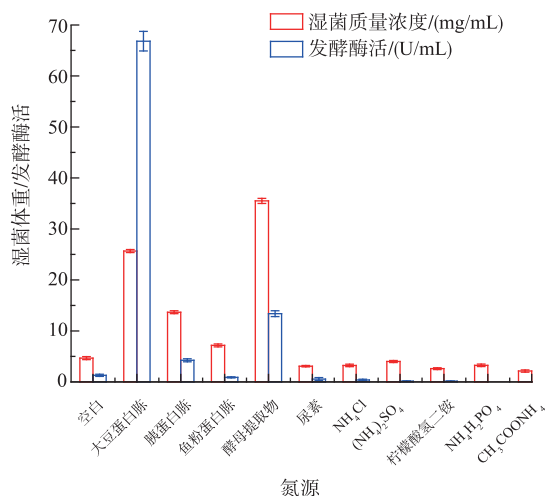


图4 不同氮源对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen source on levansucrase production and biomass

以大豆蛋白胨作为氮源,考察不同添加量对发酵酶活的影响,结果如图5所示,大豆蛋白胨质量分数为2%时,发酵酶活最高。大豆蛋白胨含量在1%~8%范围内时,菌体质量浓度与氮源质量分数呈

正相关趋势,发酵酶活先升高后降低,可能是由于大豆蛋白胨添加量较高的几组中的菌体还处于生长阶段,尚未进入表达蛋白的时期。而大豆蛋白胨质量分数为10%时菌体量减少,主要是由于浓度增加导致培养基粘度变大,在摇床培养时溶氧减少,枯草芽孢杆菌为好氧菌,生长受到了抑制。

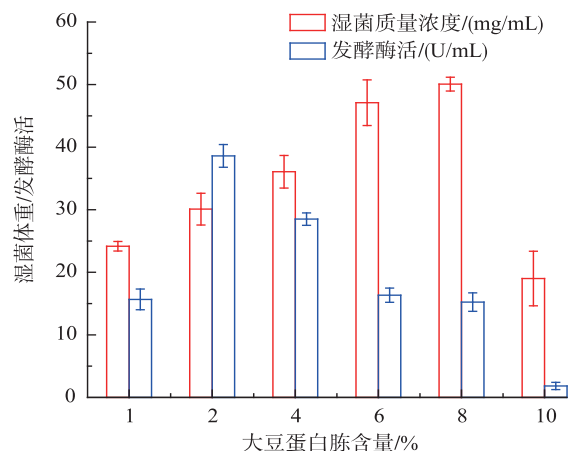


图5 大豆蛋白胨浓度对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 5 Effects of soy peptone concentration on levansucrase production and biomass

2.3.2 碳源种类及用量 保持总碳含量不变,分别使用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、糊精、可溶性淀粉、甘油作为唯一碳源进行发酵,考察不同种类碳源的影响,结果如图6所示,以果糖作为唯一碳源时,发酵酶活最高(64.58 U/mL),其次是葡萄糖(61.79 U/mL)和蔗糖(54.01 U/mL),3者的菌体质量浓度基本相同。考虑到三种碳源中,果糖成本较高,葡萄糖成本最低,故采用葡萄糖作为最佳碳源。

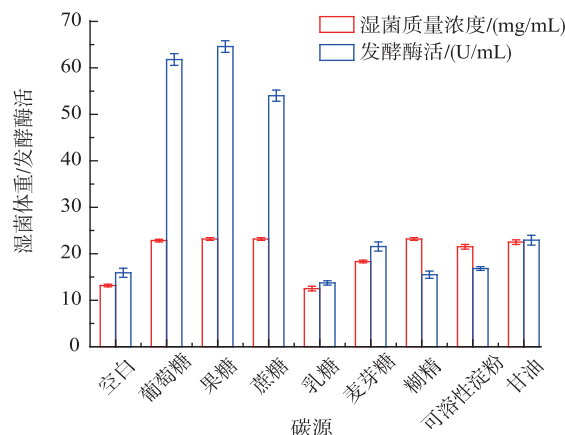


图6 不同碳源对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 6 Effects of carbon source on levansucrase production and biomass

以葡萄糖作为碳源,考察不同添加量对发酵的影响,结果如图 7 所示,不同的葡萄糖添加量对菌体量的影响变化不大,考察范围内所有组别湿菌体重都在 20~30 mg/mL 范围之间,葡萄糖添加量为 2%时,发酵酶活和菌体量均达最大值。

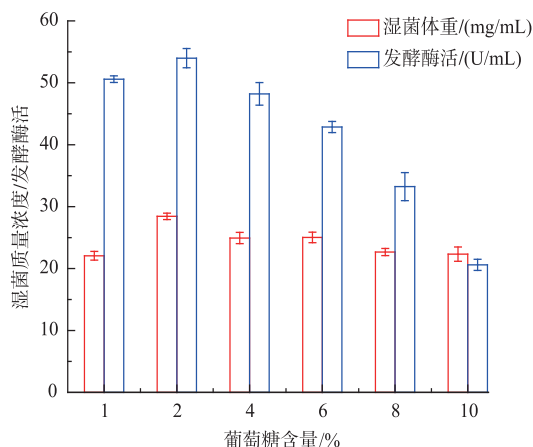


图 7 葡萄糖添加量对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 7 Effects of glucose concentration on levansucrase production and biomass

2.3.3 接种量 接种量会影响菌体的生长和蛋白的表达。接种量过低,菌体生长的延滞期时间会增长,从而延长了发酵周期;接种量过高,会使得菌体生长利用的营养物质过多,对后期产酶不利。以最佳碳源、氮源配制发酵培养基,分别将种子液按 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%的接种量,接种至发酵培养基进行发酵培养,考察不同接种量的影响,结果如图 8 所示,接种量为 1%时,发酵酶活达最大值。

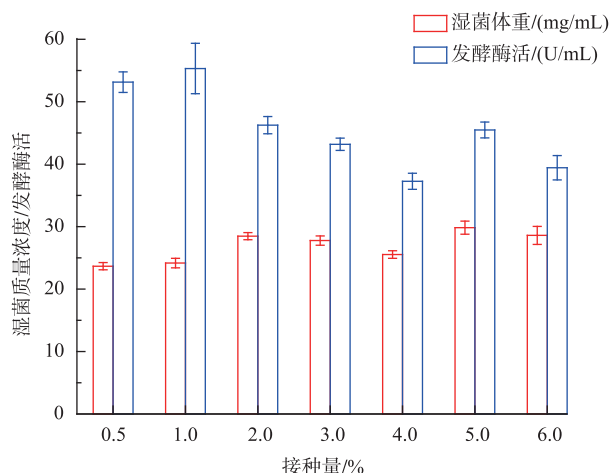


图 8 接种量对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 8 Effects of inoculum size on levansucrase production and biomass

2.3.4 装液量 摇瓶装液量的变化反映了溶氧水平的高低,枯草芽孢杆菌是好氧菌,因此发酵过程中充足的氧气供给十分重要。在固定摇床转速 200 r/min 下,考察了 250 mL 三角瓶和 500 mL 三角瓶不同装液量情况下对枯草芽孢杆菌生长的影响,结果如图 9、图 10 所示,发酵酶活和菌体量均随着装液量的增加而降低。相同装液量条件下,使用的三角瓶体积越大,发酵酶活越高。可以发现充足的供氧对菌体生长和产酶都有提高作用。

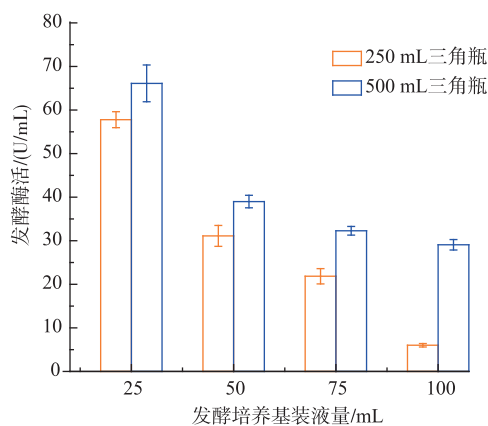


图 9 装液量对发酵酶活的影响

Fig. 9 Effects of culture volume on levansucrase production

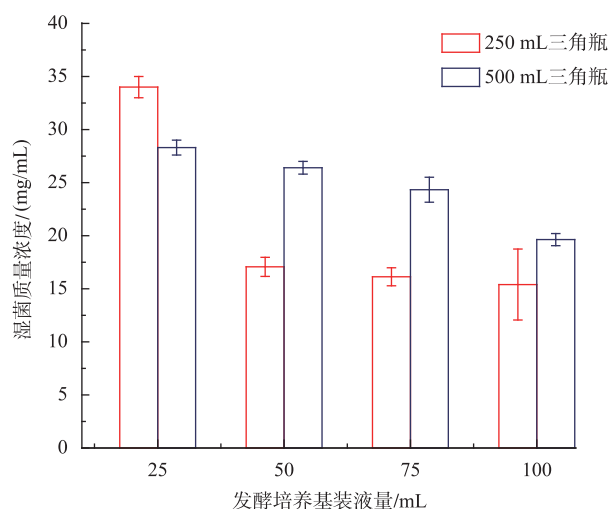


图 10 装液量对菌体量的影响

Fig. 10 Effects of culture volume on biomass

2.3.5 发酵时间 采用以上所有优化过的条件,进行摇瓶连续发酵培养,每隔一段时间取样测定湿菌体重、发酵酶活,结果如图 11 所示。从图中可以看出,在 3 h 后菌体生长进入对数期,15 h 后达到平台

期,21 h 湿菌质量浓度达到最大值 29.6 mg/mL,之后逐渐降低。发酵酶活在发酵 4 h 以后开始逐渐升高,在 9~18h 期间升高速率最快,18 h 发酵酶活达最大值 108.34 U/mL。18 h 以后酶活开始降低,分析原因主要是由于菌体开始凋亡,胞内的蛋白酶被释放出来,降解自身原有蛋白的同时也将果聚糖蔗糖酶蛋白分解了。

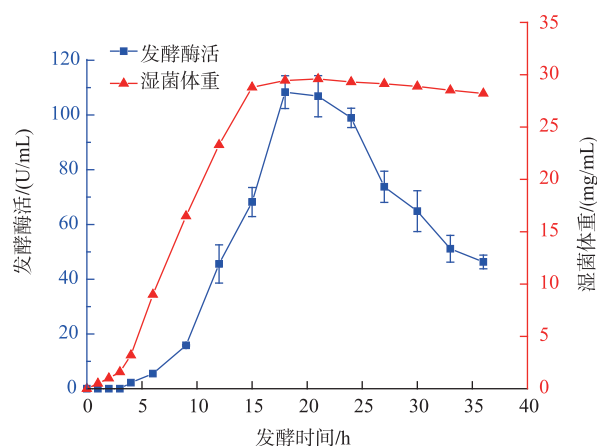


图 11 发酵时间对发酵酶活和菌体量的影响

Fig. 11 Effects of fermentation time on levansucrase production and biomass

3 结 语

将来源于肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC 的果聚糖蔗糖酶基因克隆并构建了 3 种不同启动子组合的质粒,分别导入枯草芽孢杆菌 WB600 和 1A751 后,经过发酵比较酶活,确定了 WB-PH 的发酵酶活最高。将 WB-PH 的发酵条件进行单因素实验优化,确定了发酵培养基配方为:20 g/L 葡萄糖,20 g/L 大豆蛋白胨;培养条件为:接种量 1%,装液量 5%(V:V),发酵周期 18 h,培养温度 37℃,摇床转速 200 r/min。在该培养条件下产果聚糖蔗糖酶的发酵酶活最高可达 108.34 U/mL,约为优化前的 25.92 倍,为下一步利用果聚糖蔗糖酶以蔗糖和乳糖为底物高效合成低聚乳糖提供了基础。

参考文献:

- [1] FUJITA K, OSAWA T, MIKUNI K, et al. Production of lactosucrose by β -fructofuranosidase and some of its physical properties [J]. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 1991, 38(1): 1-7.
- [2] FUJITA K, ITO T, KISHINO E. Characteristics and applications of lactosucrose [J]. *Journal of Engineering Thermophysics*, 2009, 13-21.
- [3] OKU T, TANABE K, OGAWA S, et al. Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases [J]. *Clinical & Experimental Gastroenterology*, 2011, 4: 155-161.
- [4] OHKUSA T, OZAKI Y, SATO C, et al. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp in human fecal flora [J]. *Digestion*, 1995, 56(5): 415-420.
- [5] TAKEI K, AKAKURA K, UEDA T, et al. Effect of oral lactosucrose supplementation on human enteric oxalate-degrading bacteria [J]. *Hinyokika Kiyo Acta Urologica Japonica*, 2006, 52(9): 687-691.
- [6] FUJITA K, HARA K, NAKAYAMA S, et al. Effects of 4'-G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) on bone in weanling rats [J]. *Nipponyo Shokuryo Gakkaishi*, 1999, 52(6): 343-348.
- [7] KIMURA Y, NAGATA Y, BRYANT C W, et al. Nondigestible oligosaccharides do not increase accumulation of lipid soluble environmental contaminants by mice [J]. *J Nutr*, 2002, 132(1): 80-87.
- [8] TANIGUCHI Y, MIZOTE A, KOHNO K, et al. Effects of dietary lactosucrose (4'-G- β -D-galactosylsucrose) on the IgE response in mice [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2007, 71(11): 2766-2773.
- [9] HINO K, KUROSE M, SAKURAI T, et al. Effect of dietary lactosucrose (4'-G- β -D-galactosylsucrose) on the intestinal immune functions in mice [J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2007, 54(3): 169-172.
- [10] LI W, XIANG X L, TANG S F, et al. Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β -D-galactosidase from *Bacillus circulans* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3927-3933.

- [11] GAD A. Enzymatic synthesis and characterizaion of a new trisaccharide, α -lactosyl- β -fructofuranoside [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1957, 229: 121-129.
- [12] TAKAHAMA A, KUZE J, OKANO S, et al. Production of lactosucrose by *Bacillus-Natto* levansucrase and some properties of the enzyme[J]. **J Jpn Soc Food Sci**, 1991, 38(9): 789-796.
- [13] PARK N H, CHOI H J, OH D K. Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity [J]. **Biotechnol Lett**, 2005, 27(7): 495-497.
- [14] CHOI H J, KIM C S, KIM P, et al. Lactosucrose bioconversion from lactose and sucrose by whole cells of *Paenibacillus polymyxa* harboring levansucrase activity[J]. **Biotechnol Progr**, 2004, 20(6): 1876-1879.
- [15] LEE HO J, LIM J S, et al. Continuous production of lactosucrose by immobilized *Sterigmatomyces elviae* mutant [J]. **J Microbiol Biotechn**, 2007, 17(9): 1533-1537.
- [16] FUJITA K, HARA K, HASHIMOTO H, et al. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1990, 54(4): 913-919.
- [17] MIN G K, KIM C H, LEE J S, et al. Synthesis of methyl β -D-fructoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis* [J]. **Enzyme & Microbial Technology**, 2000, 27(9): 646-651.
- [18] ESAWY, MAHMOUD M A, FATTAH D A R, et al. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties[J]. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2008, 25(2): 237-246.
- [19] SEIBEL J, MORARU R, G TZE S, et al. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase)[J]. **Carbohydrate Research**, 2006, 341(14): 2335-2349.
- [20] HAN W C, BYUN S H, KIM M H, et al. Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*[J]. **J Microbiol Biotechn**, 2009, 19(10): 1153-1160.
- [21] PENG Duan, LAN Dongming, WANG Yonghua. Cloning and expression of β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* 10137 in *E.coli*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010(1): 29-33. (in Chinese)
- [22] SEO J W, SONG K B, JANG K H, et al. Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*[J]. **J Biotechnol**, 2000, 81(1): 63-72.
- [23] WANG Jinbin, CHEN Dachao, LI Wen, et al. The latest research progress of the expression system of edible *Bacillus subtilis*[J]. **Acta Agriculturae Shanghai**, 2014, 30(1): 115-120. (in Chinese)
- [24] WANG Jingli, LIU Song, DU Guocheng, et al. Construction and fermentation optimization of a recombinant *Bacillus subtilis* producing alkaline amylase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(3): 296-302. (in Chinese)
- [25] YU Xiaoxia, TIAN Jian, LIU Xiaoqing, et al. Research progress of *Bacillus subtilis* expression system and its promoter regulatory elements[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2015, 31(2): 35-44. (in Chinese)
- [26] LI W J, YU S H, ZHANG T, et al. Efficient biosynthesis of lactosucrose from sucrose and lactose by the purified recombinant levansucrase from *leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63(44): 9755-9763.
- [27] HE W, MU W, JIANG B, et al. Construction of a food grade recombinant *Bacillus subtilis* based on replicative plasmids with an auxotrophic marker for biotransformation of D-fructose to D-allulose [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016, 64(16): 3243-3250.
- [28] JULKOWSKA D, OBUCHOWSKI M, HOLLAND I B, et al. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium [J]. **Journal of Bacteriology**, 2005, 187(1): 65-76.
- [29] GE Chunlei, LIU Zhongmei, CUI Wenjing, et al. Efficient overexpression of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by tandem promoters[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2016(11): 1-8. (in Chinese)
- [30] KONG Weiwen, WANG Dandan, LIU Aixin. Characteristics of gene expression driven by two tandem pathogen-inducible promoters[J]. **Acta Phytopathologica Sinica**, 2013, 43(4): 376-382. (in Chinese)
- [31] HUAI Lihua, KOU Guanghui, ZHOU Changping, et al. Effects of carbon and nitrogen source on enzymatic synthesis of L-cysteine[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2006, 22(4): 85-87. (in Chinese)