

# D-阿洛酮糖 3-差向异构酶基因 在枯草芽孢杆菌中的表达

贾敏<sup>1,2</sup>, 沐万孟<sup>1</sup>, 张涛<sup>1</sup>, 江波<sup>\*1</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 将 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (DPE) 基因利用 PCR 进行扩增, 与枯草芽孢杆菌载体 pMA5 连接, 构建重组质粒 pMA5-cbdpe。重组质粒转入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800 感受态细胞, 利用卡那霉素筛选和 PCR 鉴定, 获得一株 DPE 重组枯草芽孢杆菌菌株。该重组菌株无需诱导即可产生 DPE 酶, 18 h 时酶活可达 6.8 U/mL。该酶最适 pH 为 7.0, 最适温度为 55 °C, 与大肠杆菌表达的 DPE 酶酶学性质相似。结果表明, DPE 酶可在枯草芽孢杆菌中表达。

**关键词:** D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; D-阿洛酮糖; 枯草芽孢杆菌; 酶学性质

**中图分类号:** TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2014)11-1129-07

## Expression of D-Psicose 3-Epimerase in *Bacillus subtilis*

JIA Min<sup>1,2</sup>, MU Wanmeng<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>, JIANG Bo<sup>\*1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The D-psicose 3-epimerase gene was amplified through PCR and ligated with the expression vector pMA5 of *Bacillus subtilis*, forming the recombinant plasmid pMA5-cbdpe. The recombinant plasmid was then transformed into *B. subtilis* WB800, and a recombinant strain was acquired through resistance screening of Kanamycin and PCR identification method. The enzyme activity of recombinant D-psicose 3-epimerase could reach 6.8 U/mL after 18 h fermentation. The recombinant D-psicose 3-epimerase expressed in *B. subtilis* exhibited optimal activity at pH 7.0. And the optimal temperature was 55 °C. It showed the same enzyme characterization as the D-psicose 3-epimerase expressed in *Escherichia coli*. This result indicated that the D-psicose 3-epimerase gene was successfully expressed in *B. subtilis*.

**Keywords:** D-psicose 3-epimerase, D-psicose, *B. subtilis*, enzyme characterization

D-阿洛酮糖是稀有糖的一种, 是 D-果糖 C-3 位的差向异构体。D-阿洛酮糖不仅是一种无热量的

甜味剂<sup>[1]</sup>, 而且可作为其他稀有糖生产的重要原料<sup>[2]</sup>。D-阿洛酮糖具有多种独特的营养学和生理学功能,

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102); 国家自然科学基金项目(31230084)。

\* 通信作者: 江波(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品化学及应用酶技术方面的研究。

E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

受到越来越多研究者的注意。D-阿洛酮糖零能量,可预防肥胖<sup>[3]</sup>;能降低血糖<sup>[4]</sup>,可作为 II 型糖尿病人的辅助治疗剂、膳食补充剂和甜味剂;可降低血脂,减少脂肪合成酶活性,抑制腹腔内脂肪堆积<sup>[5]</sup>;有抗氧化活性,具有较强的活性氧(ROS)清除功能<sup>[6]</sup>;具有神经保护作用<sup>[7]</sup>。鉴于 D-阿洛酮糖良好的理化性质,美国食品及药品管理局于 2011 年对 D-阿洛酮糖的安全性进行确认,并正式批准其为 GRAS(一般认为安全,Generally Recognized as Safe)食品,允许应用于食品、膳食补充剂和医药制剂中,具有巨大的市场前景<sup>[8]</sup>。

D-阿洛酮糖在自然界中存在极少,利用化学方法合成 D-阿洛酮糖杂质多且不易分离。利用 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-*psicose* 3-epimerase, DPE, EC 5.3.1.-),通过催化 D-果糖 C3 位的差向异构化获得 D-阿洛酮糖。作者所在实验室已成功构建大肠杆菌工程菌株 BL21(DE3) /pET22b-cbdte 表达 DPE 酶<sup>[9]</sup>。但由于大肠杆菌宿主安全性的问题,使其所表达的 DPE 重组蛋白不适宜应用于 D-阿洛酮糖的工业化生产中。而枯草芽孢杆菌是食品级微生物,属于 GRAS 级微生物,不存在内毒素等食品安全问题,被广泛应用于各种工业酶制剂中<sup>[10-11]</sup>。

本研究旨在利用食品级微生物枯草芽孢杆菌作为宿主菌,构建 DPE 酶枯草芽孢杆菌基因工程菌,实现 DPE 酶在枯草芽孢杆菌中的表达,为 D-阿洛酮糖的工业化生物酶法生产奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器与试剂

Authorized Thermal Cycler PCR 仪:购自德国 Eppendorf;垂直板蛋白电泳系统:购自 PowerPac Universal;凝胶成像系统 Gel DocXR:购自美国 Bio-Rad 公司;高效液相色谱仪 Agilent 1260:购自美国 Agilent 公司;紫外可见分光光度计 UV2102PC:购自上海尤尼柯仪器有限公司;全自动高压灭菌锅 CL-40M:购自日本 ALP 公司;超净工作台 SW-CJIFD:购自苏净安泰空气技术有限公司;高速冷冻离心机 Centrifuge 5804R:购自德国 Eppendorf 公司。

Premix TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶:购自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 提取试剂盒及 DNA 胶回收试剂盒:购自上海生工生物工程有限公司;D-阿洛酮糖标准品:购自 Sigma 公司;

其他常规试剂;进口分装或国产分析纯;引物合成及 DNA 测序:由上海生工生物工程有限公司完成。质粒 pET22b-cbdpe, 质粒 pMA5, 宿主菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和宿主菌 *Bacillus subtilis* WB800:由作者所在实验室保藏。

### 1.2 培养基制备

种子(LB)培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 10.0;pH 7.0。

发酵培养基(组分 g/L):酵母抽提物 15.0,葡萄糖 5.0,NaCl 8.0,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.0;自然 pH。灭菌后加入抗生素。

### 1.3 DPE 基因的克隆

以大肠杆菌质粒 pET22b-cbdpe 为模板,通过 PCR 的方法进行 DPE 基因扩增。为便于分离纯化,设计引物时将 pET22b 质粒上带有的 His-tag 标签引入目的基因中,并在该基因的两端分别引入两个酶切位点,*Nde* I 和 *Bam*H I,设计一对引物如下:

PMA1:5'-CGCCATATGAAATATGGTATTTATT TTGCT-3'

PMA2:5'-CGCGGATCCTTGTAGCCGGATCTC -3'

PCR 反应程序如下:94 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶回收预期大小的片段。与 pMD-T-19 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布在含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板上,挑取阳性克隆,提取质粒进行测序,得到 pMD19-T-cbdpe。

### 1.4 枯草芽孢杆菌重组表达质粒的构建

将获得的 pMD19-T-cbdpe 和 pMA5 质粒,用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切,回收基因片段,经 T4 连接酶连接过夜后转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板,37 °C 过夜培养。挑取阳性克隆,提取质粒,进行测序验证。并利用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切验证。

### 1.5 枯草芽孢杆菌重组菌的构建及筛选

制作 *Bacillus subtilis* WB800 感受态细胞<sup>[12]</sup>转化重组质粒 pMA5-cbdpe,将转化子涂布卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 平板,37 °C 培养 24 h,挑取单菌落至液体培养基,进行发酵培养,测定菌体酶活,并进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 DPE 酶活力测定

将获得的枯草芽孢杆菌重组菌接入发酵培养基进行摇瓶发酵培养,测定生长曲线和酶活曲线。酶活力测定方法参照文献[13]。酶活力单位定义为:1 mL 发酵液在 55 °C 和 pH 7.0 条件下,单位时间(1 min)内产生 1 μmol 的 D-阿洛酮糖为一个酶活力单位,以 U/mL 表示。D-阿洛酮糖采用 HPLC 检测,液相柱: Sugar-Pak I 钙型离子交换柱;柱温: 85 °C;流动相: 0.1 mmol/L EDTA-Ca 水溶液 (0.22 μm 膜过滤);洗脱流速: 0.4 mL/min;进样量: 10 μL;检测器: Shodex 示差折光检测器。

### 1.7 DPE 酶的分离纯化

收集对数中后期的发酵液,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,取菌体用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 溶解,重悬菌体,进行超声破碎。工作条件为:工作时间 1 s,停止时间 2 s,共计 12 min。将破碎菌体进行低温高速离心 (4 °C、12 000 r/min 离心 15 min)。收集上清液即为粗酶液。用微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤,备用。

先用上样缓冲液 (50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 平衡 Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和层析柱。将 5 mL 的粗酶液加到层析柱上,用低咪唑洗脱液 (50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 洗脱杂蛋白质,后利用高咪唑洗脱液 (50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 洗脱目的蛋白质。收集目的蛋白质放入透析袋中,利用平衡液透析过夜。

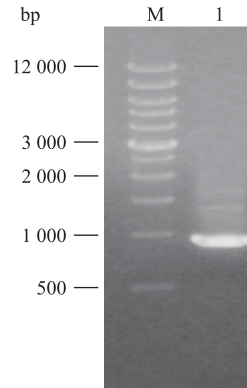
### 1.8 DPE 酶蛋白浓度测定

采用 Lowry 法<sup>[14]</sup>测定蛋白质含量,以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白质,做标准曲线。将样品稀释至一定浓度,根据标准曲线算出蛋白质浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 DPE 基因克隆

以大肠杆菌重组质粒 pET22b-cbdpe 为模板,PCR 扩增得到约 900 bp 的 DPE 基因,见图 1。获得的 pMD19-T-cbdpe 经测序验证, *Clostridium botetiae* ATCC BAA -613 DPE 基因进行比对发现,目的基因得到正确扩增。



M: DNA marker; 1: 目的基因 DPE 片段

图 1 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

### 2.2 重组表达载体的构建与鉴定

将 pMD19-T-cbdpe 和 pMA5 质粒,用 *Nde* I 和 *Bam* H I 进行双酶切,用 T4 连接酶进行连接,构建重组质粒 pMA5-cbdpe,其构建过程见图 2。

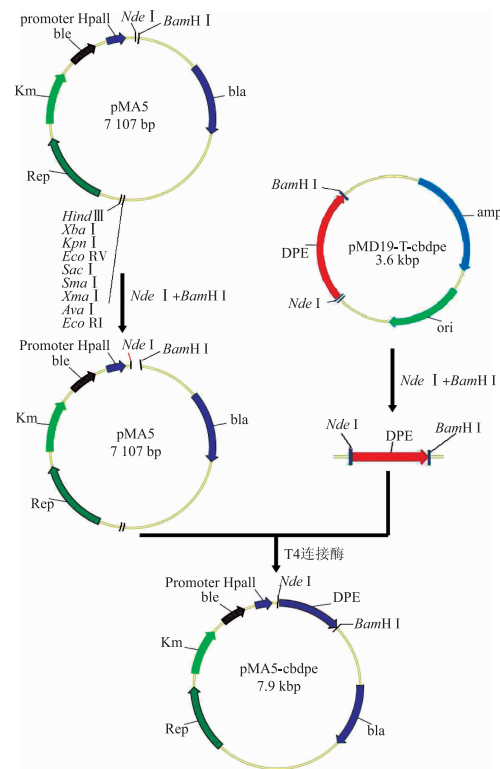
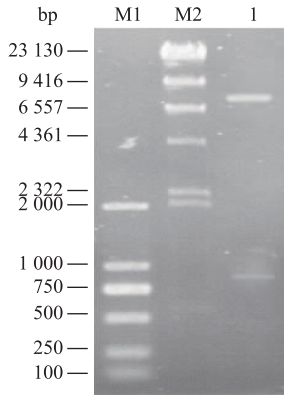


图 2 pMA5-cbdpe 重组质粒构建过程

Fig. 2 Restructuring process of pMA5-cbdpe plasmid

对重组质粒进行 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切验证,琼脂糖凝胶电泳在约 900 bp 及 7 000 bp 处出现条带,与目的基因及 pMA5 的片段大小一致,初步确定获得 pMA5-cbdpe 的阳性克隆,见图 3。

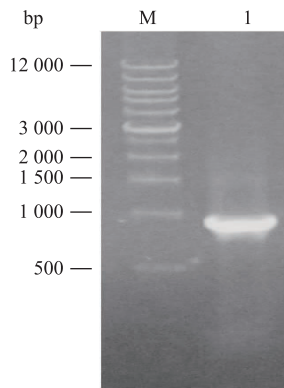


M1:DL2000 DNA maker;M2: $\lambda$ -HindIII digest DNA maker;1: pMA5-cbdpe 双酶切产物

图3 重组质粒 pMA5-cbdpe 的双酶切验证

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pMA5-cbdpe

经基因组测序,并与 NCBI 中 *Clostridium bolteae* ATCC BAA -613 DPE 基因序列进行比对,结果表明成功构建了重组载体 pMA5-cbdpe。将重组载体转化入 *B. subtilis* WB800,经卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)LB 平板筛选后,挑取阳性克隆子,发酵培养,进行菌液 PCR 鉴定,获得一株包含 DPE 基因的枯草芽孢杆菌重组菌,见图 4。



M;DNA marker;1:阳性克隆的 PCR 鉴定

图4 重组枯草芽孢杆菌 PCR 鉴定

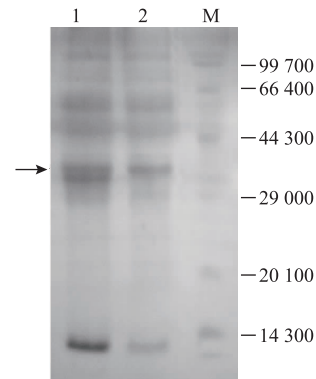
Fig. 4 PCR identification of recombinant *B. subtilis*

### 2.3 枯草芽孢杆菌重组菌的表达及活性鉴定

枯草芽孢杆菌重组菌经发酵培养,取菌体进行 SDS-PAGE 电泳验证显示,在 34 000 左右出现明显表达蛋白质,见图 5。这与大肠杆菌表达 DPE 相对分子质量一致,表明该枯草芽孢杆菌可实现 DPE 的表达,经离心沉淀后即可获得菌体。干燥后即可制得粗酶粉,用于 D-阿洛酮糖的生产,避免理化操作

可能对酶性质产生的影响。

利用枯草芽孢杆菌模式菌株 *B. subtilis* 168,进行 DPE 酶表达时,PCR 鉴定重组菌中包含 DPE 基因后,发酵培养发现重组菌没有酶活(结果未显示);而利用敲除八种蛋白酶的宿主菌 *B. subtilis* WB800 作为宿主菌<sup>[15]</sup>,则可在菌体中检测到酶活。可能是由于宿主菌的蛋白酶可降解所表达的 DPE 重组蛋白,导致利用 *B. subtilis* 168 表达 DPE 酶不能检测到酶活。



M;蛋白质 marker;1:发酵 18 h 菌体;2:发酵 12 h 菌体

图5 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE profiles

为检测重组菌产 DPE 酶的酶活情况,将不同发酵时间的发酵液与 D-果糖溶液在合适条件下进行反应,测定不同时间发酵液 DPE 酶活及菌体生长状况,见图 6。在对数中后期,发酵 16~24 h 时,酶活达到最高,为 6.8 U /mL,高于大肠杆菌 IPTG 诱导表达的酶活(约 3.5 U/mL)<sup>[16]</sup>。表明该菌株可表达相对较高活性的 DPE 酶。

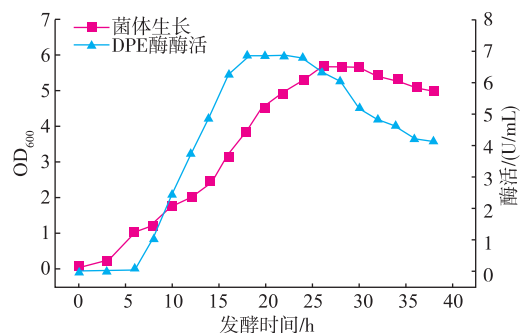


图6 重组枯草芽孢杆菌发酵曲线

Fig. 6 Curve of enzyme activity of recombinant *B. subtilis*

对于 DPE 酶的工业化生产,大肠杆菌表达的 DPE 酶在工业化发酵中,需要额外添加诱导剂,并



且需保持较低的诱导温度以减少包涵体的大量产生;而枯草芽孢杆菌表达 DPE 酶发酵过程简单,无需降温,减少能耗,并且无包涵体产生,单位发酵液酶活较高。真核表达系统如毕赤酵母等,一般需要较长发酵时间才能达到较高酶活;而枯草芽孢杆菌 16~24 h 即可达到较高酶活水平,发酵时间短,节约能耗。

### 2.4 重组 DPE 酶的分离纯化

*Clostridium bolteae* DPE 酶菌体经超声破碎,离心后得到粗酶液,由于引入 6 个组氨酸标签,通过 Ni<sup>2+</sup>柱亲和层析,将目的蛋白质与杂蛋白质分离,经 SDS-PAGE 电泳检测,见图 7。在 34 000 处得到目的蛋白,其相对分子质量大小与预测符合,进一步证明 DPE 基因在枯草芽孢杆菌宿主中得到正确表达。

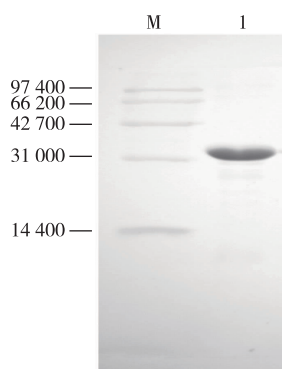


图 7 分离纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE profile of the purified recombinant protein

### 2.5 重组 DPE 酶的酶学性质

**2.5.1 pH 对 DPE 酶活力的影响** 在 55 °C、pH 5.0~9.0 的缓冲溶液中分别测定 DPE 酶活力,重复 3 次,取平均酶活力,见图 8。该 DPE 酶的最适 pH 为 7.0,与大肠杆菌表达的 DPE 酶一致<sup>[17]</sup>。其酶活力 > 90% 的 pH 范围有所扩大,为 6.0~7.5。

**2.5.2 pH 对 DPE 酶稳定性的影响** 将纯化后的 DPE 酶在 pH 5.0~9.0 的缓冲液反应体系中,4 °C 保存 2 h,然后测定残余酶活,以原始酶活为最高酶活 100%,见图 9。在 pH 5.0~8.5 的范围内,DPE 酶相对稳定,残余酶活均在 80% 以上。

**2.5.3 温度对 DPE 酶活力的影响** 在 pH 7.0 条件下,测定 40~80 °C 下的酶活力,结果见图 10。重组 DPE 酶在 55 °C 下酶活力达到最高。在 45~65 °C 其

相对酶活仍可维持在 80% 以上。

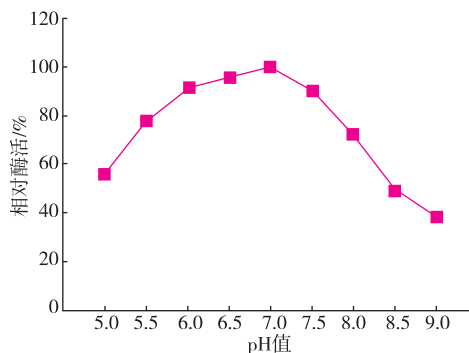


图 8 pH 值对酶活力的影响

Fig. 8 Effects of pH on DPE enzyme activity

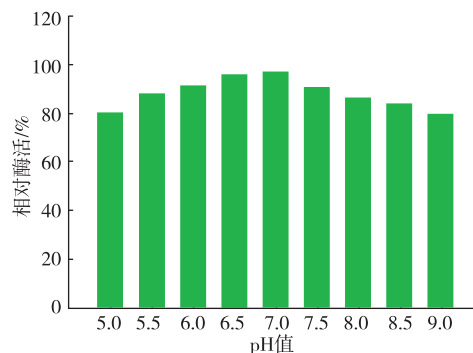


图 9 pH 值对酶稳定性的影响

Fig. 9 Effects of pH on DPE stability

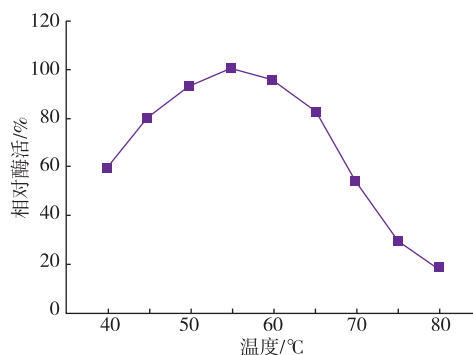


图 10 温度对酶活力的影响

Fig. 10 Effects of temperature on DPE enzyme activity

**2.5.4 温度对 DPE 酶稳定性的影响** 将酶液在不同温度下保温不同的时间,测定 DPE 酶的残余酶活,结果见图 11。枯草芽孢杆菌表达的 DPE 酶的热稳定性比大肠杆菌表达的 DPE 酶的热稳定性略有提高。其 55 °C 的半衰期由 42 min 增加到 45 min<sup>[17]</sup>。

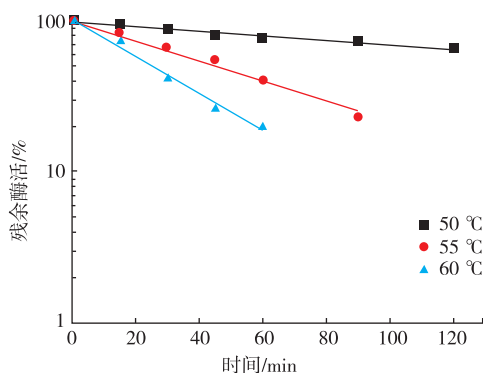


图 11 温度对 DPE 酶稳定性的影响

Fig. 11 Effects of temperature on DPE stability

**2.5.5 金属离子对 DPE 酶活力的影响** 不同金属离子对酶的催化效果有不同的影响,见图 12。在酶反应体系中加入不同的金属离子,DPE 酶的稳定性及催化活力会有所不同。DPE 酶是一种金属蛋白酶,在金属螯合剂 EDTA 的存在下,DPE 酶彻底失活。 $\text{Co}^{2+}$ 和  $\text{Mn}^{2+}$ 离子可提高 DPE 酶的活性,尤其是  $\text{Co}^{2+}$ 离子。 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对其酶活有明显抑制作用,这与大肠杆菌表达的重组 DPE 酶酶学性质一致<sup>[7]</sup>。

### 3 结语

D-阿洛酮糖 3-差向异构酶可在食品级微生物枯草芽孢杆菌中的表达,利用 PCR 扩增 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶基因与枯草芽孢杆菌载体 pMA5

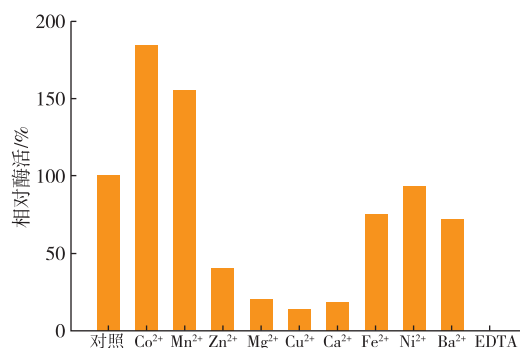


图 12 不同金属离子对重组 DPE 酶活影响

Fig. 12 Effect of different metallic ions on the DPE activity

连接,构建重组质粒 pMA5-cbdpe。重组质粒转入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800 感受态细胞,利用卡那霉素筛选和 PCR 鉴定,获得一株 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶重组枯草芽孢杆菌菌株。该重组菌株无需诱导即可产生 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶,18 h 时酶活即可达到 6.8 U/mL。同时,对枯草芽孢杆菌表达的重组 DPE 酶的酶学性质进行测定,发现其酶学性质与大肠杆菌来源的 DPE 酶相似。

利用枯草芽孢杆菌作为宿主菌进行 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶生产,无内毒素产生,无需添加诱导剂,发酵简单,发酵时间短,能耗低,适用于 D-阿洛酮糖的工业化生产。此外,本研究也可为提高我国酶制剂行业在食品及其他相关领域发展的研究提供参考,具有重要的现实意义。

### 参考文献:

- [1] Matsuo T, Suzuki H, Hashiguchi M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats [J]. *Journal of Nutrition Science Vitaminol*, 2002, 48: 77-80.
- [2] Izumori K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124(4): 717-722.
- [3] Iida T, Hayashi N, Yamada T, et al. Failure of d-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans[J]. *Metabolism*, 2010, 59(2): 206-214.
- [4] N Hayashi, T Iida, T Yamada, et al. Study on the postprandial blood glucose suppression effect of D-psicose in borderline diabetes and the safety of long-term ingestion by normal human subjects[J]. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 2010, 74: 510-519.
- [5] Matsuo T, Izumori K. D-Psicose inhibits intestinal  $\alpha$ -glucosidase and suppresses the glycemic response after ingestion of carbohydrates in rats[J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2009, 45(2): 202-206.
- [6] Murata A, Sekiya K, Watanabe Y, et al. A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils[J]. *J Bioscience Bioengineering*, 2003, 96: 89-91.
- [7] Takata M, Yamaguchi F, Nakanose K, et al. Neuroprotective effect of D-psicose on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma(PC12) cells[J]. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2005, 100: 511-516.
- [8] Mu W, Zhang W, Feng Y, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1461-1467.

- [9] 储菲菲,沐万孟,邢庆超,等. *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 D-塔格糖 3-差向异构酶的诱导表达、纯化及活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(7):198-201.  
CHU Feifei,MU Wanmeng,XING qingchao,et al. Study on expression,purification and enzyme activity of *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 D-tagatose 3-epimerase[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,33(7):198-201.(in Chinese)
- [10] Yang H,Liu L,Li J,et al. Heterologous expression,biochemical characterization,and overproduction of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*[J]. **Microb Cell Fact**,2011,10:77.
- [11] 李静静,徐美娟,张显,等. 一种耐低温  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(5):516-523.  
LI Jingjing,XU Meijuan,Zhang Xian,et al. High-level expression of cold-adapted  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase in *Bacillus subtilis*[J]. **Food Science and Biotechnology**,2013,32(5):516-523.(in Chinese)
- [12] Kunst F,Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**,1995,177(9):2403-2407.
- [13] Wanmeng Mu,Feifei Chu,Qiangchao Xing,et al. Cloning,expression,and characterization of a D- $\psi$ -sucose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**,2011,59:7785-7792.
- [14] Lowry O H,Rosenbrough N J,Farr A L,et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. **Journal of Biological Chemistry**,1951,193:265-275.
- [15] Wu S C,Yeung J C,Duan Y,et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*:effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2002,68(7):3261-3269.
- [16] 贾敏,江波,张晓鸣,等. 乳糖诱导 D 塔格糖 3 差向异构酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 食品工业科技,2013,34(13):143-146.  
JIA Min,JIANG Bo,ZHANG Xiaoming,et al. Expression of recombinant D-tagatose 3-epimerase in *E. coli* BL21/(DE3) induced by lactose[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2013,34(13):143-146.(in Chinese)
- [17] Jia M,Mu W,Chu F,et al. A d- $\psi$ -sucose 3-epimerase with neutral pH optimum from *clostridium bolteae* for d- $\psi$ -sucose production:cloning,expression,purification,and characterization [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2014,98(2):717-725.

## 会议信息

会议名称(中文):第二届中国放线菌生物学与产业化研讨会

开始日期:2014-12-05

结束日期:2014-12-08

所在城市:广东省 广州市

具体地点:广州凯旋华美达大酒店

主办单位:中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会、上海市微生物学会

承办单位:中科院热带海洋生物资源与生态重点实验室(中科院南海海洋研究所) 中科院合成生物学重点实验室(上海生命科学研究院植物生理生态研究所) 微生物代谢国家重点实验(上海交通大学)

全文截稿日期:2014-10-31

联系人:张长生(13580391736);朱义广(15360660814);诸晗宁(15918851831)

通讯地址:中科院南海海洋研究所

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=3030>