

# 果聚糖蔗糖酶基因的克隆表达及酶学性质分析

徐君<sup>1</sup>, 张言周<sup>1</sup>, 黎循航<sup>1,2</sup>, 管政兵<sup>1</sup>, 蔡宇杰<sup>1</sup>, 廖祥儒<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西南昌 330045)

**摘要:** 将来源于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的果聚糖蔗糖酶(levansucrase)基因进行克隆, 并将其在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中表达。对发酵产酶后的菌体进行破壁和离心, 粗酶液经镍柱纯化后, 进行酶学性质研究。结果表明, 重组酶的水解酶活和转移酶活最适温度分别为 45 °C 和 40 °C, 最适 pH 分别为 6.5 和 6.0。此外, 果聚糖蔗糖酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 150.74 mmol/L 和 21.23  $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。最后, 在 pH 6.0、40 °C 条件下, 果聚糖蔗糖酶催化反应 12 h 后, 体系中果聚糖质量分数可达 34.05%。

**关键词:** 果聚糖蔗糖酶; 解淀粉芽孢杆菌; 重组表达; 性质

中图分类号: Q 81 文章编号: 1673-1689(2019)03-0124-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.018

## Gene Cloning, Heterologous Expression and Characterization of Levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*

XU Jun<sup>1</sup>, ZHANG Yanzhou<sup>1</sup>, LI Xunhang<sup>1,2</sup>, GUAN Zhengbing<sup>1</sup>, CAI Yujie<sup>1</sup>, LIAO Xiangru<sup>\*1</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* was cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). After purification, the enzymatic characterization of levansucrase was determined and analyzed. The optimum temperature of hydrolytic activity was 45 °C and the maximal transfructosylation activity was measured at 40 °C. The optimum pH for hydrolytic and transfructosylation activities were 6.5 and 6.0, respectively. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for levansucrase were calculated to be 150.74 mmol/L sucrose and 21.23  $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ , respectively. Levansucrase-catalyzed reaction was investigated at pH 6.0 and 40 °C. The result indicated that the content of levan was up to 34.05% in total products after 12 h.

**Keywords:** levansucrase, *Bacillus amyloliquefaciens*, recombinant expression, characterization

果聚糖(levan)普遍存在于天然植物中, 在植物生长过程中可以储藏能量, 参与调节细胞渗透压,

提高植物的耐旱能力<sup>[1]</sup>。许多微生物也可以合成果聚糖, 据报道, 能合成 levan 的菌株有很多, 如果聚

收稿日期: 2016-01-16

基金项目: 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28); 无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310)。

\* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化学和生物工程方面的研究。E-mail: liaoxiangru@163.com

引用本文: 徐君, 张言周, 黎循航, 等. 果聚糖蔗糖酶基因的克隆表达及酶学性质分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 124-129.

糖微杆菌(*Microbacterium laevaniformans*)<sup>[2]</sup>、水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*)<sup>[3]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[4]</sup>、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[5]</sup>、甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus Methylophilus*)<sup>[6]</sup>。它们合成果聚糖能力不尽相同,且果聚糖相对分子质量也存在差异。据报道,有些细菌来源的 levan 具有抗病毒、增强免疫力等生理功能<sup>[7]</sup>。此外,果聚糖还具有热量低、保湿效果好等特点,在食品、化妆品和医药方面都有着广泛的应用<sup>[8-10]</sup>。

目前合成 levan 果聚糖的方法有化学合成法<sup>[11]</sup>、微生物发酵法以及酶催化合成法<sup>[7-8]</sup>。化学合成法过程较为繁琐,且生成的副产物在后期较难除去。发酵法一般是指微生物利用蔗糖发酵产生 levan,但大部分菌株合成 levan 的能力不高,且底物利用率也比较有限。一般来说,利用果聚糖蔗糖酶(levansucrase, LSase)合成果聚糖的方法较为简单,且能获得较高的底物转化率和 levan 果聚糖产量。作者通过克隆来源 *Bacillus amyloliquefaciens* H47 中的 levansucrase 基因,在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中表达成功,并对重组 LSase 进行纯化及酶学性质分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** *Bacillus amyloliquefaciens* H47、*Escherichia coli* (*E. coli*) JM109、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、质粒 pET-28a (+): 为作者所在实验室储存。

**1.1.2 培养基** LB 培养基: tryptone 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 固体培养基 20 g/L, 湿热灭菌(121  $^{\circ}$ C, 20 min)。

LB-卡那霉素(Kana)培养基: LB 培养基灭菌后冷却至 40~50  $^{\circ}$ C, 加入 Kana 至终质量浓度为 50  $\mu$ g/mL。

**1.1.3 主要试剂** 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、dNTP Mixture、标准蛋白质 Marker 和核酸 Marker: 大连宝生; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA 提取试剂盒: Takara 公司; 卡那霉素(Kana)和引物: 上海生工。

**1.1.4 主要仪器** 高效液相色谱仪: HITACHI 公司; 蛋白质电泳仪、凝胶成像仪: 上海生工; AKTA

avant 蛋白质纯化系统: 美国通用公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 Levansucrase 基因克隆及重组载体构建** 依据 *Bacillus amyloliquefaciens* H47 全基因组测序结果分析, 设计引物序列, levF :5' -GCCGGGATCC ATGAACATCAAAAAATTTGC -3'; levR :5' -GCCGCTCGAGTTAGTTGTTAACCGT AAGC-3' (下划线部分为 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点)。以 *B. amyloliquefaciens* H47 基因组 DNA 为模板进行 PCR, 产物回收后, 将其与 pET-28a (+) 质粒分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 将酶切后的 DNA 和载体连接, 12 h 后将连接产物导入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 经含有 Kana 的 LB 平板筛选阳性转化子, 挑取 10 个转化子转入 LB-Kana 培养基中过夜培养, 提取质粒双酶切验证, 并送往公司对目的基因进行测序。

**1.2.2 Levansucrase 的表达** 将测序结果正确的重组质粒 pET-28a(+)-LSase 导入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 通过 LB-Kana 平板筛选, 挑取 3-5 个转化子, 进行菌落 PCR 验证, 将正确的转化子挑到 LB-Kana 液体培养基中过夜培养, -80  $^{\circ}$ C 甘油管保存。

从甘油管中接 3  $\mu$ L 菌液至 3 mL 的 LB-Kana 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h 后, 以 1 mL 的接种量复接到含 50 mL LB-Kana 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 2 h (OD<sub>600</sub> 约为 0.6), 加入 0.4 mmol/L 的 IPTG, 同时降温至 30  $^{\circ}$ C 培养, 12 h 后低温离心收集菌体, 并用 20 mmol/L、pH 6.5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液将细胞悬浮, 对悬浮后的菌液进行破壁, 至菌液呈透明状, 离心收集上清液和沉淀, 经 SDS-PAGE 检测和酶活测定。

**1.2.3 Levansucrase 的纯化** 将粗酶液过 0.22  $\mu$ m 滤膜, 选用 1 mL HisTrap HP 组氨酸标记亲和层析柱(镍柱)进行分离纯化。缓冲液 A 为含有 20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L 氯化钠的磷酸钠缓冲液(20 mmol/L、pH 7.4)。缓冲液 B 为含有 500 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L 氯化钠的磷酸钠缓冲液(20 mmol/L、pH 7.4)。线性洗脱, 先用低浓度咪唑的 B 将结合在镍柱上的杂蛋白质冲洗下来, 再用较高浓度的咪唑洗涤目的蛋白质, 收集样品并做 SDS-PAGE 检测和酶活测定。

**1.2.4 Levansucrase 酶活测定** 用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(20 mmol/L, pH 6.5) 配置 1.2 mol/L 的蔗糖溶液作为底物, 取 0.5 mL 蔗糖与 0.5 mL 酶

液,混合均匀后在 40 °C 下反应 20 min,以不加酶液的为空白对照,并通过 HPLC 法检测葡萄糖和果糖的生成量。

果聚糖蔗糖酶酶活定义为:每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。水解酶活定义为:每分钟水解 1  $\mu\text{mol}$  果糖所需的酶量。转糖基酶活定义为:每分钟转移 1  $\mu\text{mol}$  果糖所需的酶量。

**1.2.5 高效液相色谱** 反应前后各物质的量通过高效液相色谱 (HPLC) 法检测。色谱条件为: HITACHI 系列色谱仪,示差检测器, HITACHI LaChrom NH<sub>2</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm) 色谱柱, 粒径 5  $\mu\text{m}$ , 柱温 30 °C, 流动相为乙腈:水 (70:30), 流速 1 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$  [12]。

**1.2.6 温度和 pH 对重组 LSase 酶活的影响** LSase 最适温度测定条件为:蔗糖浓度 0.6 mol/L、20 mmol/L、pH 6.5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液。在 25~60 °C 范围内 (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C) 测定 LSase 的酶活力, 以确定 LSase 的最适催化温度。研究过程中, 分析了酶在 30、40、50 °C 下的温度稳定性, 以处理前的初始酶活力为 100%。

LSase 最适 pH 测定条件为: 在蔗糖浓度 0.6 mol/L、40 °C 条件下, 测定 LSase 在不同的 pH (4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0) 下酶活力的大小 (其中 3.0~8.0 为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液, pH 8.0~9.0 为 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液)。酶 pH 稳定性测定的前处理条件为: 将 LSase 在上述 pH 条件下放置 12 h 后, 测定其残余活力。

**1.2.7 酶动力学参数测定** 酶动力学参数测定条件为: 20 mmol/L、pH 6.5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液, 底物为蔗糖。底物浓度范围 0.025~0.9 mol/L。动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$  均采用 Lineweaver-Burk 方程进行计算。

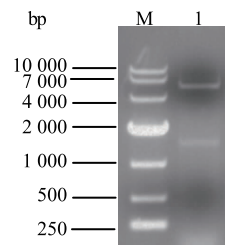
**1.2.8 LSase 催化底物反应** 将果聚糖蔗糖酶加到 200 g/L 的蔗糖溶液中, 在 pH 6.0、40 °C 条件下进行催化反应 12 h 后终止反应, 并用 1.2.5 方法分析体系中各物质的量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Levansucrase 基因的克隆及重组载体的构建

PCR 产物经 1% 的核酸胶电泳, 条带显示目的基因大小约为 1.5 kb。将重组质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I

进行双酶切验证, 结果见图 1。两个 DNA 片段大小约为 5.4 kb 和 1.5 kb, 表明目的基因成功插入载体 pET-28a (+) 上, 测序结果也表明重组载体 pET-28a-LSase 在 *Escherichia coli* 中构建成功。



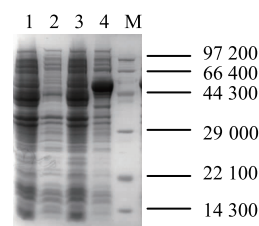
泳道 1: pET-28a (+)-LSase (*Bam*HI *Xho*I); 泳道 M: 10 000 DNA marker

图 1 重组质粒 pET-28a-LSase 的酶切验证

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid of pET-28a-LSase

### 2.2 重组质粒的诱导表达

重组菌 *E.coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+)-LSase 经 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导 12 h 后, 离心收集菌体。以携带空载体 pET-28a (+) 的 *E.coli* BL21 (DE3) 为对照组, 结果见图 2。SDS-PAGE 结果显示, 经 IPTG 诱导后的重组菌 *E.coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+)-LSase, 目的蛋白质条带出现在约 52 000 (泳道 4) 处, 这与预估的目的蛋白质大小一致, 并且在重组菌破碎后的上清液中检测到酶活, 而对照组均没有检测到酶活, 表明 LSase 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中成功表达。



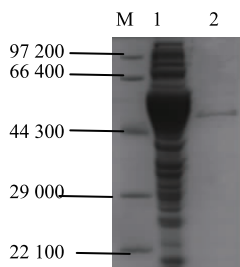
泳道 1: 大肠杆菌 BL21 未诱导; 泳道 2: 大肠杆菌 BL21 加 IPTG 诱导; 泳道 3: 重组菌未诱导; 泳道 4: 重组菌加 IPTG 诱导; 泳道 M: 蛋白质相对分子质量 (Low)。

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed products

### 2.3 重组蛋白质的分离纯化

粗酶液经 His Trap HP 亲和柱纯化后, 具有组氨酸标签的 LSase 能够与镍结合, 而其他杂蛋白质被去除, 得到的蛋白质相对较纯, 结果见图 3。



泳道 M:Marker;泳道 1:*E.coli* BL21(DE3)/pET-28(a)-LSase 诱导后破碎上清液;泳道 2:经 Ni 柱纯化的蛋白质。

图 3 纯化后 LSase 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of samples from purification

### 2.4 温度对重组酶活性的影响

**2.4.1 最适反应温度** 由图 4 可知,重组酶 LSase 的水解酶活和转移酶活的最适温度分别在 45 °C 和 40 °C。不同来源的酶最适温度差别很大,*Bacillus sp.* TH4-2 来源的果聚糖蔗糖酶在 60 °C 时转移酶活性最大<sup>[13]</sup>,而运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的重组酶合成果聚糖的最适合温度为 0 °C<sup>[14]</sup>,*Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953 所产的酶在 30 °C 时表现出了最大的转移酶活性,而分解酶活性的最适温度在 45~50 °C<sup>[15]</sup>。

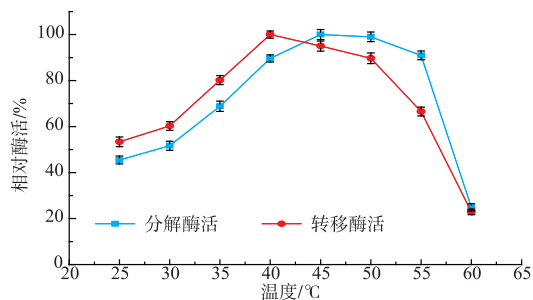


图 4 温度对 LSase 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of LSase

**2.4.2 温度稳定性** 将 LSase 置于不同温度(30、40、50 °C)下处理,测定其残余酶活,结果见图 5-6。表明在 30 °C 下放置 12 h 后,分解残余酶活为 83.07%,转移残余酶活为 76.06%,40 °C 放置 12 h 后,分解和转移残余酶活分别为 74.97%和 76.05%,在 50 °C 放置 2 h 后,分解酶活降低为原来的 21.23%,转移酶活为 12.46%,而在 4 h 后,酶几近失活。

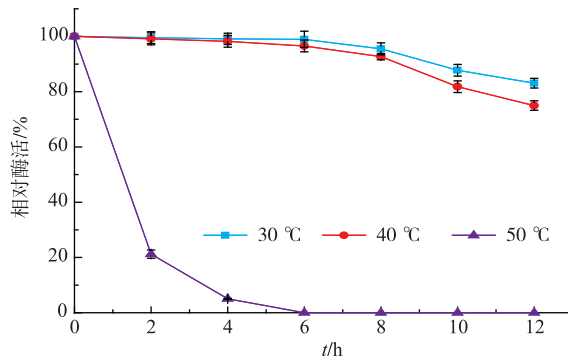


图 5 温度对 LSase 水解酶活稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the hydrolytic stability of LSase

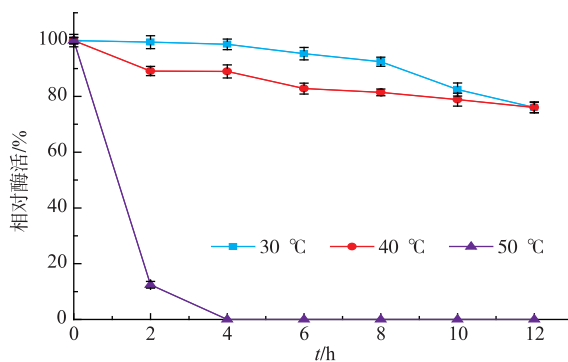


图 6 温度对 LSase 转移酶活稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the transfructosylation stability of LSase

### 2.5 pH 对重组酶活性的影响

**2.5.1 最适反应 pH** 由图 7 可知,在 pH 6.5 时,重组 LSase 的水解活力最大,而在 pH 6.0 时转移活力最大。这与已报道的 *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953 所产酶的最适 pH 接近<sup>[15]</sup>。*Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 的果聚糖蔗糖酶最适 pH 为 5.4,当 pH 在 4.4~6.2 范围内,酶活在 50%以上,但当 pH 大于 7.0 时,该酶的活性则完全被抑制<sup>[16]</sup>。目前报道的大部分细菌来源的 levansucrase 最适 pH 都在 5.0~7.0 之间<sup>[13-16]</sup>。

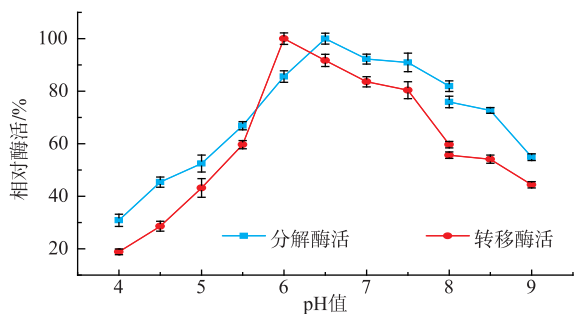
**2.5.2 pH 稳定性** 将重组酶 LSase 置于不同的 pH (4~9)下放置,12 h 后测定其残余酶活,结果见图 8。LSase 在 pH 6.0~7.5 时稳定,12 h 后其残余酶活仍然高达 75%以上。

### 2.6 果聚糖蔗糖酶动力学参数的测定

实验用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 6.5、20 mmol/L) 配置不同浓度的蔗糖溶液,采用 1.2.7 方



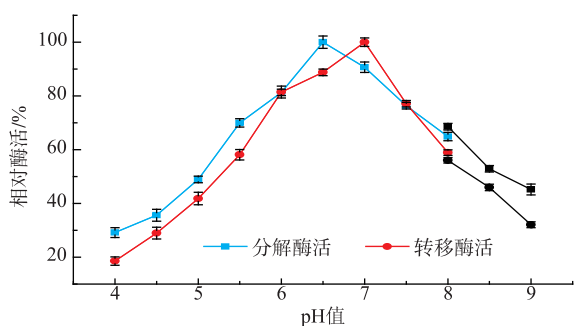
法, 计算出  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 150.74 mmol/L 和 21.23  $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。



pH 3.0~8.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液, pH 8.0~9.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液

图 7 pH 对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on the activity of LSase



pH 3.0~8.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液, pH 8.0~9.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液

图 8 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on stability of LSase

## 参考文献:

- [1] HENDRY G A F. Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal [J]. *New Phytologist*, 1993(123): 3-14.
- [2] BAE I Y, OH I K, LEE S, et al. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 42(1): 10-13.
- [3] YOO S H, YOON E J, CHA J, et al. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, 34(1-2): 37-41.
- [4] SHIH I L, CHEN L D, WU J Y. Levan production using *Bacillus subtilis* cells immobilized on alginate [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010(82): 111-117.
- [5] LU Juan, XIAO Min, LU Lili. Optimization of fermentation conditions for production of levan by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2011(32): 183-187. (in Chinese)
- [6] ZHANG T, LI R, QIAN H, et al. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002 [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014(101): 975-981.
- [7] ESAWYA M A, AHMEDA E F, HELMYA W A, et al. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates

不同微生物来源的 levansucrase 对蔗糖的亲合力差别很大。*Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC<sup>[17]</sup>、*Rahnella aquatilis*<sup>[18]</sup>、*P. syringae*<sup>[19]</sup> 和 *Zymomonas mobilis*<sup>[20]</sup> 的果聚糖蔗糖酶的  $K_m$  分别为 26.6、50、122、160 mmol/L。

## 2.7 LSase 催化反应

以 200 g/L 蔗糖为底物, 在 pH 6.0、40 °C 条件下进行果聚糖蔗糖酶催化反应, 12 h 后终止反应并对产物进行分析。结果表明, 产物中含有葡萄糖、果糖和果聚糖等一系列产物, 且体系中的果聚糖质量分数为 34.05%, 而蔗糖只剩 4.31%。

## 3 结语

将来源于 *Bacillus amyloliquefaciens* H47 中的 levansucrase 基因进行克隆, 并实现了在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中的异源表达, 经镍柱纯化后, 对 LSase 的酶学性质进行了初步探索。研究发现, 重组酶 LSase 的水解酶活和转移酶活最适温度分别为 45 °C 和 40 °C, 在温度低于 40 °C 时, 酶活较稳定。最适 pH 分别为 6.5 和 6.0。在 pH 6.0~7.5 之间, 酶可以较长时间保存。而果聚糖蔗糖酶  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 150.74 mmol/L 和 21.23  $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。此外, 在 pH 6.0、40 °C 条件下进行酶催化反应, 12 h 后体系中果聚糖的质量分数达到 34.05%。

- capable of producing antiviral levans[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 86(2):823-830.
- [8] KIM K H, CHUNG C B, KIM Y H, et al. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis* [J]. **Cosmetic Science**, 2005, 56(6):395-406.
- [9] BEKERS M, LAUKEVICS J, UPITE D, et al. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase[J]. **Process Biochemistry**, 2002, 38(5):701-706.
- [10] ABDEL-FATTAH A M, GAMAL-ELDEEN A M, HELMY W A, et al. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2012, 89(2):314-322.
- [11] OSCARSON S, SEHGELMEBLE F W. Chemical syntheses of inulin and levan structures [J]. **Journal of Organic Chemistry**, 2002, 67(24):8457-8462.
- [12] WANG Limei, ZHOU Huiming. Study on fermentation conditions for the production of fructosyltransferase and transfructosylation from *Aspergillus niger*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(2):53-54. (in Chinese)
- [13] AMMAR Y B, MATSUBARA T, ITO K, et al. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature[J]. **Journal of Biotechnology**, 2002, 99(2):111-119.
- [14] BELGHITH H, SONG K B, KIM C H, et al. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase[J]. **Biotechnology Letters**, 1996, 18(4):467-472.
- [15] PARK H E, PARK N H, KIM M J, et al. Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 32(7):820-827.
- [16] TIEKING M, EHRMANN M A, VOGEL R F, et al. Molecular and functional characterization of a levansucrase from sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 66(6):655-663.
- [17] KANG H K, SEO Y M, SEO E S, et al. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2005, 1727(1):5-15.
- [18] OHTSUKU K, HINO S, FUKUSHIMA T, et al. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JMC-1683 [J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1992, 56(9):1373-1377.
- [19] R.E.布坎南, N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社, 1984.
- [20] YANASE H, IWATA M, NAKAHIGASHI R, et al. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1992, 56(8):1335-1336.

## 科 技 信 息

欧盟评估大肠杆菌发酵产生的 L-色胺酸作为添加剂的安全性和有效性

2019年2月28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)研究小组被要求就大肠杆菌 CGMCC 7.248(*Escherichia coli* CGMCC 7.248)发酵产生的 L-色胺酸(L-tryptophan)作为饲料和饮用水营养添加剂用于所有动物物种的安全性和有效性发布科学意见。

经过评估,FEEDAP研究小组认为,大肠杆菌 CGMCC 7.248产生的 L-色胺酸作为添加剂对非反刍动物目标物种和消费者是安全的。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估大肠杆菌发酵产生的 L-色胺酸作为添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2019-3-6). <http://news.foodmate.net/2019/03/508917.html>