

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.04.015

异源果聚糖蔗糖酶在乳酸乳球菌中的分泌表达

包书健, 李兴江, 吴学风, 穆冬冬

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为了实现果聚糖蔗糖酶简便有效的纯化,文章将来源于解淀粉芽孢杆菌的基因 *sacB* 添加组氨酸标签后与信号肽基因 *usp45* 融合形成基因片段 *usp45-sacB*, 然后插入质粒 *pNZ8048* 中, 导入乳酸乳球菌 (*L. lactis*) NZ9000 构建重组菌株 *L. lactis* (*pNZ8048-usp45-sacB*)。通过电泳验证纯化蛋白的分子量为 51 kDa, 符合预期大小, 确定果聚糖蔗糖酶成功表达。为了进一步提高果聚糖蔗糖酶的产量, 该研究对诱导时间和诱导剂的质量浓度进行优化, 得出最优的表达条件为: 诱导时间 48 h, 诱导剂 nisin 质量浓度 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

关键词: *sacB* 基因; 果聚糖蔗糖酶; 质粒; 分泌表达; 乳酸乳球菌

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2024)04-0527-06

Secretory expression of heterologous levansucrase in *L. lactis* NZ9000

BAO Shujian, LI Xingjiang, WU Xuefeng, MU Dongdong

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In this study, in order to realize the simple and effective purification of levansucrase, the gene *sacB* from *Bacillus amyloliquefaciens* was added with histidine label and fused with the signal peptide gene *usp45* to form the gene fragment *usp45-sacB*, then it was inserted into the plasmid *pNZ8048* and introduced into *L. lactis* NZ9000 to construct the recombinant strain *L. lactis* (*pNZ8048-usp45-sacB*). It is verified by electrophoresis that the size of the purified protein is 51 kDa, which is in line with the expected size, and it is confirmed that the levansucrase is successfully expressed. In order to further improve the yield of levansucrase, the induction time and the concentration of inducer were optimized. The best expression conditions are as follows: the induction time is 48 h and the concentration of inducer nisin is 2 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Key words: *sacB* gene; levansucrase; plasmid; secretory expression; *L. lactis* NZ9000

糖苷水解酶是广泛存在于各类生物体内的一种糖基酶, 对体内糖和糖缀合物的水解与合成过程有着重要影响, 果聚糖蔗糖酶(levansucrase)属于糖苷水解酶家族 GH68 (EC 2. 4. 1. 10)^[1]。果聚糖蔗糖酶同时具有水解活性和转糖基活性, 当以蔗糖为底物时, 可以水解为葡萄糖和果糖, 同时也可以将果糖基转移到葡萄糖残基上生成 levan 型果聚糖^[2]。Levan 是一种胞外多糖, 其主链由 β (2, 6) 键连接, 而支链主要由 β (2, 1) 键连接^[3]。

研究表明, levan 具有多种生物学功能, 如抗炎症、抗氧化、抗肿瘤、益生元、物质输送等, 因此在食品、医药和化妆品多个行业都具有潜在的应用价值^[4]。Levan 的合成方式主要有化学合成法、生物发酵法和酶合成法 3 种。前 2 种合成方法都存在操作复杂、生产周期长、产物难以纯化等缺点, 生产成本过高。而酶合成法操作简便、产物也易于纯化, 因此受到了更多的关注和研究^[5]。

果聚糖蔗糖酶的分子量大多在 45~90 kDa

收稿日期: 2021-12-08; 修回日期: 2021-12-22

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (2108085MC123); “十四五” 科技创新培育重点专项资助项目 (PA2021KCPY0048)

作者简介: 包书健 (1997—), 男, 陕西商南人, 合肥工业大学硕士生;

李兴江 (1978—), 男, 安徽五河人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师;

穆冬冬 (1985—), 男, 安徽颍上人, 博士, 合肥工业大学讲师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: d.mu@hfut.edu.cn.

之间,少数在 100 kDa 以上^[6]。目前报道的果聚糖蔗糖酶主要产自微生物,且多为细菌,如解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)^[7-8]。细菌在特定条件下可以通过发酵生产此酶,但发酵液成分复杂,发酵过程中也会生成多种副产物,很难获得纯化的酶,不利于后期果聚糖的合成。

乳酸乳球菌(*L. lactis*)是一种常见的食品级细菌,通常被认为是安全的。乳酸乳球菌生长迅速,全序列基因组仅 2.3 Mbp,被认为是蛋白质表达的最佳候选者之一^[9-12]。本研究将来源于解淀粉芽孢杆菌 BH072 的 *sacB* 基因加上组氨酸标签,插入到质粒 *pNZ8048* 中,成功构建果聚糖蔗糖酶的重组表达载体。通过固相金属亲和层析对表达出的重组酶进行纯化,同时对表达条件进行优化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、载体和培养基

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) BH072、乳酸乳球菌(*L. lactis*) NZ9000 均购于中国微生物菌种保藏中心,再由本实验室培养并于一80℃条件下保存。构建重组表达载体所用的质粒为 *pNZ8048*,保存于 *L. lactis* NZ9000(实验室保藏)。解淀粉芽孢杆菌在 LB 培养基中培养,乳酸乳球菌在 M17 培养基中培养。M17 培养基在使用时添加 0.5% 的葡萄糖^[13]。

1.1.2 主要试剂

实验所用试剂盒 EasyPure Plasmid Mini-Prep Kit、EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit、EasyPure Quick Gel Extraction Kit、EasyPure PCR Purification Kit 均购于北京全式金生物技术有限公司;相关酶 Taq DNA Polymerase、Fastpfu DNA Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nco* I、T4-DNA Ligase、DNA Marker 均购于生

工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为化学纯,均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *usp45* 基因和 *sacB* 基因的扩增

使用试剂盒提取出 *L. lactis* NZ9000 和 *B. amyloliquefaciens* BH072 的全基因组。利用 Clonemanager 软件设计引物,所用引物见表 1 所列。在 p1 的 5'端引入 *Nco* I 位点,在 p2 的 5'端引入一段 *sacB* 的基因序列,便于后期基因的融合与酶切。在 p3 的 5'端引入一段 *usp45* 的基因,便于基因的融合,将 *Xba* I 位点添加到引物 p4 的 5'末端,并引入了 6 个组氨酸的标签,用于重组蛋白的纯化(下划线部分为限制性核酸内切酶序列,波浪线部分为 6his 序列)。

以 *L. lactis* NZ9000 全基因组 DNA 作为模板,用引物 p1 和 p2 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增片段 *usp45*, PCR 扩增体系(50 μ L)为:基因组模板 1 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, 引物 p1、p2 各 1 μ L, Fastpfu 酶 1 μ L, ddH₂O 32 μ L; 95℃变性 30 s, 57℃退火 60 s, 72℃延伸 5 s, 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。以 *B. amyloliquefaciens* BH072 全基因组 DNA 作为模板,用引物 p3 和 p4 通过 PCR 扩增片段 *sacB*, PCR 扩增体系(50 μ L)为:基因组模板 1 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, 引物 p3、p4 各 1 μ L, Fastpfu 酶 1 μ L, ddH₂O 32 μ L; 95℃变性 30 s, 59℃退火 60 s, 72℃延伸 45 s, 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。融合 PCR 扩增体系(50 μ L)为:纯化后的 *usp45* 与 *sacB* 各 1 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, Fastpfu 酶 1 μ L, ddH₂O 31 μ L; 第 1 轮 PCR 条件为 95℃变性 30 s, 64℃退火温度 60 s, 72℃延伸时间 1 min, 1 个循环,最后 72℃延伸 7 min; 第 2 轮 PCR 条件为反应结束后,每管中加入 p1、p4 各 1 μ L, 95℃变性 30 s, 58℃退火温度 60 s, 72℃延伸时间 1 min, 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,并用试剂盒纯化和回收目的片段,4℃保存备用。

表 1 所用到的引物

引物名称	序列(5'—3')	作用
p1	CATGCCATGGCAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAA	<i>Nco</i> I 酶切位点/扩增 <i>usp45</i>
p2	GGGTATTTTCTTTAGCGTAAACACCTGAC	扩增 <i>usp45</i> /与 p3 重合
p3	GTCAGGTGTTTACGCTAAAGAAAATACCC	扩增 <i>sacB</i> /与 p2 重合
p4	CCGGAATTCTTAGTGATGGTGATGGTTGTTAACCG	<i>EcoR</i> I 酶切位点/扩增 <i>sacB</i>

1.2.2 *pNZ8048-usp45-sacB* 的构建

本实验按照试剂盒说明书提取质粒 *pNZ8048*,通过质粒图谱分析可知,质粒均含有 *Nco* I和 *Eco*R I酶切位点。通过 *Nco*I和 *Eco*R I分别对 *usp45-sacB* 及质粒 *pNZ8048* 进行双酶切,酶切产物切胶回收,再用 T4-DNA 连接酶将酶切后的 *usp45-sacB* 和 *pNZ8048* 连接,获得连接产物。将连接产物电转化导入 *L. lactis* NZ9000,菌落 PCR 筛选出阳性克隆子,再重新提取出理论正确的重组质粒,通过测序验证重组质粒的准确性。

1.2.3 菌株感受态的制备

L. lactis NZ9000 感受态的制备参照文献[14]方法。将实验室保存的 *L. lactis* NZ9000 在 GM17-ager 上划线,3 °C 过夜培养。挑取单菌落接种于 5 mL 的 SMGG 培养基中,3 °C 过夜培养。将 5 mL 的 SMGG 菌液接种至 100 mL 的 SMGG 培养基中,培养至 A_{600} 为 0.6,将离心后获得的菌体用提前预冷的 Wash Buffer 洗涤 3 次,最后用 1 mL 的 Wash Buffer 重悬洗涤后的菌体,每管 50 μ L 分装于灭菌的 1.5 mL EP 管,-80 °C 条件下保存。

1.2.4 乳酸乳球菌的电转化

将乳酸乳球菌感受态置于冰上,加入 2 μ L 质粒,缓慢吸打混匀,静置 1 min;然后迅速将混合物转移至 0.2 cm 预冷的电转杯中,将电转杯表面擦干后,迅速放入电转仪中,进行电转化。电转仪的参数设定^[15]为直径 0.2 cm、电容 25 μ F、电压 2 500 V。电转化完成后迅速将混合物转移至 1 mL 无菌且未加抗生素的 M17 培养基中,3 °C 复苏 1.5 h。复苏完成后将菌液均匀涂于含氯霉素抗性的 M17 平板上,平板倒置在 3 °C 保温箱中过夜培养。

从过夜培养后的平板上挑取单菌落,进行菌落 PCR 验证,将验证正确的阳性克隆菌落接种于 M17+氯霉素的液体培养基中,过夜培养后提取质粒,送去生物公司测序。

1.2.5 生长曲线的绘制

将 *L. lactis* NZ9000、*L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*)、*L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*) 分别接入新鲜的 M17 液体培养基,对于 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*) 和 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*),在 A_{600} 达到 0.5 时接入诱导剂。通过分光光度计测定 0~24 h 内这 3 种菌的 A_{600} ,每隔 1 h 测定 1 次^[16]。根据 A_{600} 绘制

菌株的生长曲线,以未接菌的 M17 液体培养基作为空白对照。

1.2.6 重组酶的表达及纯化

将含有 *pNZ8048-usp45-sacB* 的 *L. lactis* NZ9000 进行一次活化,以 1:100 的比例接种至无菌且加过氯霉素的 M17 培养基中,3 °C 培养至菌液 A_{600} 为 0.5 时,加入诱导剂 nisin 诱导重组酶的表达。为了获得较高含量的重组酶,本实验探究了诱导时间和诱导剂质量浓度对重组酶表达量的影响。

重组酶的纯化方法为固定相金属亲和层析法,利用重组酶末端引入的组氨酸标签特异性与 Ni^{2+} 螯合这一特性分离纯化重组蛋白。首先将发酵液离心获得上清液,通过旋转混匀使重组酶与预处理过的镍柱充分结合,再用 Wash buffer 洗除未与镍柱结合的细胞体及杂蛋白质,最后用与镍柱体积相同的 Elution buffer 进行洗脱,得到纯化的重组酶^[17]。利用 SDS-PAGE 分析重组酶的表达及纯化情况。

2 结果和分析

2.1 基因的扩增分析

根据美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库公布的 *usp45* 基因序列(GenBank: ABY84357)设计特异性的引物,以 *L. lactis* NZ9000 的全基因组 DNA 为模板,扩增出的基因片段大小为 100 bp 左右,电泳结果如图 1a 所示。根据 Clonemanager 软件分析可知 *L. lactis* NZ9000 来源的 *usp45* 基因片段大小为 81 bp,加上保护碱基与酶切位点序列,基因大小约为 100 bp,表明本实验扩增出的 *usp45* 基因是正确的。试剂盒纯化和回收后的基因质量浓度约为 200 ng/ μ L。

根据 NCBI 数据库公布的 *sacB* 基因序列(GenBank nucleotide ID: 749171203),设计特异性的引物,以 *B. amyloliquefaciens* BH072 的全基因组 DNA 为模板,扩增出的基因片段大小为 1 300 bp 左右,电泳结果如图 1b 所示。根据 Clonemanager 软件分析可知,*B. amyloliquefaciens* BH072 来源的 *sacB* 基因片段大小为 1 335 bp,表明本实验扩增出的 *sacB* 基因是正确的。试剂盒纯化和回收后的基因质量浓度约为 200 ng/ μ L。

将融合后的片段进行电泳实验,发现其大小约为 1 400 bp,电泳结果如图 1c 所示。根据

Clonemanager 软件分析可知,融合后 *usp45-sacB* 基因片段大小为 1 416 bp,表明本实验融合出的

usp45-sacB 基因是正确的。试剂盒纯化和回收后的基因质量浓度约为 200 ng/ μ L。

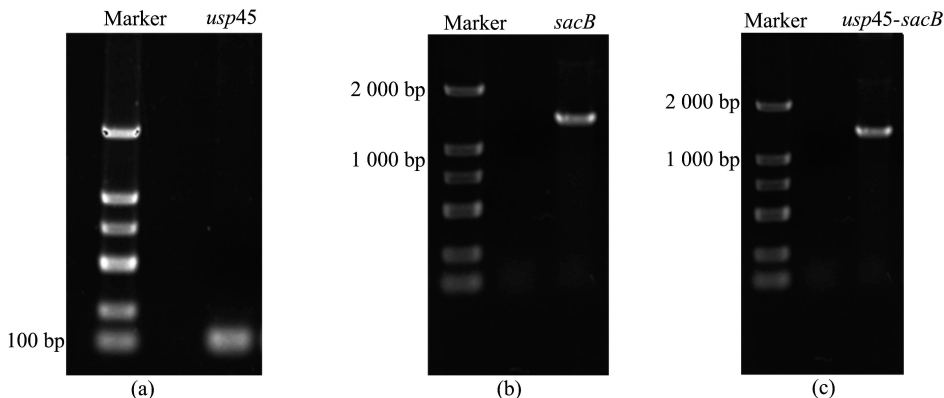


图 1 扩增基因的电泳图

2.2 *pNZ8048-usp45-sacB* 的构建分析

目的基因 *usp45-sacB* 和质粒 *pNZ8048* 分别进行 *Nco* I 和 *EcoR* I 双酶切反应后的结果如图 2 所示。

图 2 中:泳道 1 为酶切后的 *usp45-sacB*,片段大小保持在 1 400 bp 左右,并且泳道中只有单个条带,表明目的基因未被切碎;泳道 2 为酶切后的质粒 *pNZ8048*,观察到 1 个大片段和 2 个小片段,表明质粒被成功切开,软件分析出本实验所使用的 *pNZ8048* 经 *Nco* I 和 *EcoR* I 双酶切后的大片段大小为 4 198 bp,所有条带位置均与理论值一致。

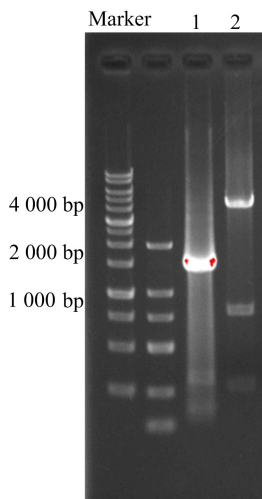


图 2 *usp45-sacB* 与 *pNZ8048* 酶切反应后电泳图

2.3 乳酸乳球菌转化后阳性克隆的鉴定结果

将重组质粒 *pNZ8048-usp45-sacB* 经电转化导入到 *L. lactis* NZ9000 中,通过菌落 PCR 筛

选出阳性克隆,结果如图 3 所示。

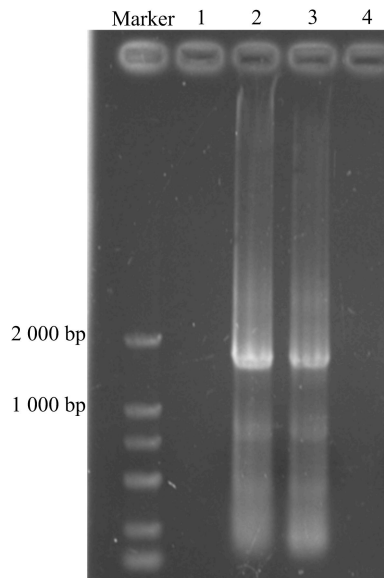


图 3 菌落 PCR 产物的电泳图

图 3 中:泳道 1 为未添加模板获得的扩增产物;泳道 2 为以连接产物为模板获得的扩增产物,泳道 1、2 作为对照;泳道 3、4 为菌落 PCR 的产物,泳道 3 在约 1 500 bp 处有清晰条带与预期大小一致,初步判定泳道 3 所代表菌株为阳性克隆。

将阳性克隆接种于含氯霉素的 M17 液体培养基中过夜培养,通过试剂盒提取出重组质粒 *pNZ8048-usp45-sacB*,将质粒送往公司测序,通过测序结果可判定重组表达载体构建成功。

2.4 果聚糖蔗糖酶的表达对菌株生长的影响

为了探究果聚糖蔗糖酶的表达对 *L. lactis* NZ9000 生长过程的影响,本文测定了 *L. lactis*

NZ9000、*L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*)、*L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*) 的生长曲线,如图4所示。从图4可以看出,*L. lactis* NZ9000 生长速度最快,在1~16 h的生长速度明显高于 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*) 和 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*),这可能是由于质粒的复制及表达需要分走能量,而 *L. lactis* NZ9000 产生的能量都用来生长,导致 *L. lactis* NZ9000 生长速度快于 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*) 和 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*)。在后期观察到 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048-usp45-sacB*) 略低于 *L. lactis* NZ9000 和 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*),说明果聚糖蔗糖酶的表达需要消耗能量,会轻微抑制 *L. lactis* NZ9000 的生长水平。所有菌株的生长曲线都有着类似的生长趋势,说明果聚糖蔗糖酶的合成并不影响菌株的正常生长,即蛋白的表达对菌株的生长没有影响。

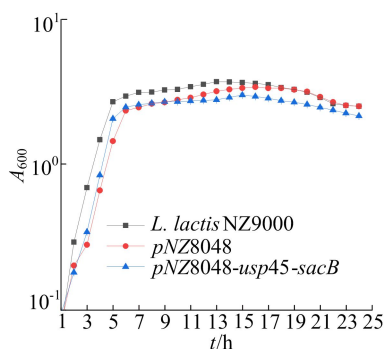


图4 生长曲线

2.5 重组酶的表达及纯化分析

在离心后的上清液中加入终质量浓度为 0.2 mg/mL 的胰蛋白酶反应 3 min 去除 *usp45* 信号肽,纯化后的蛋白通过电泳分析。重组表达的果聚糖蔗糖酶的 SDS-PAGE 结果如图5所示,通过 Image Lab 软件分析出的蛋白相对表达量如图6所示。图5中:M 代表蛋白 Marker;对照组 C 代表 *L. lactis* NZ9000 (*pNZ8048*) 发酵液纯化的样品;12、24、36、48、60 为诱导时间,单位 h;2、4、6、8、10 为诱导剂质量浓度,单位 $\mu\text{g/L}$ 。

根据已知 *sacB* 基因序列翻译出的蛋白序列可知,不含有信号肽的果聚糖蔗糖酶的分子量为 51 kDa,图5a和图5b出现的蛋白条带位置均为 51 kDa 左右,表明构建出的重组质粒 *pNZ8048-usp45-sacB* 已成功表达所需的果聚糖蔗糖酶。从图6可以看出,最优的诱导时间为 48 h,继续延长发酵时间,蛋白的表达量会有所下降。从图5b

和图6b可以看出最优的诱导剂 nisin 质量浓度为 $2 \mu\text{g/L}$ 。

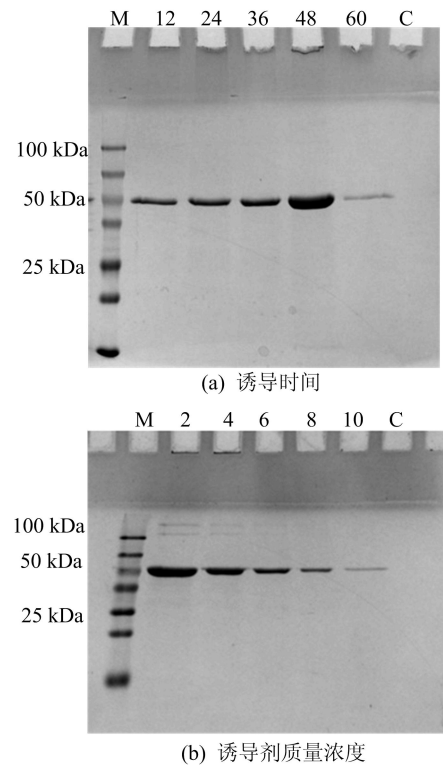


图5 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析结果

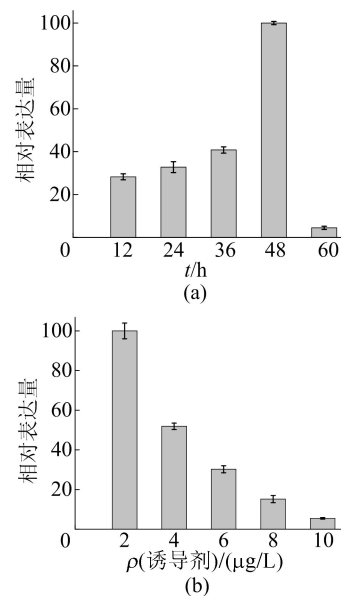


图6 重组蛋白的表达量分析

3 结 论

目前果聚糖蔗糖酶主要由多种微生物发酵生成,较难从成分复杂的发酵液中纯化出来。因此,本文通过引入信号肽 *usp45*,实现解淀粉芽孢杆

菌来源的果聚糖蔗糖酶在乳酸乳球菌中的分泌表达,同时通过在目的基因 *sacB* 中加入组氨酸标签简化其纯化过程。根据电泳结果可知,本实验纯化出的重组酶分子量大小约为 51 kDa,表明果聚糖蔗糖酶成功表达。本实验为果聚糖蔗糖酶在革兰氏阳性菌中的表达研究提供了依据,同时也证明了乳酸乳球菌是潜力较大的异源蛋白工业化生产的宿主。

[参 考 文 献]

- [1] XU W, LIU Q, YU S, et al. Synthesis of lactosucrose using a recombinant levansucrase from *Bremneria goodwinii* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 186 (2): 292-305.
- [2] 李润静. 产果聚糖蔗糖酶菌株筛选及酶的分离纯化酶学性质研究和 levan 果聚糖的酶法合成 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [3] 陆娟, 卢丽丽, 肖敏. Levan 蔗糖酶及其在 Levan 果聚糖合成中的应用 [J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 601-607.
- [4] RAIRAKHWADA D, SEO J W, SEO M Y, et al. Gene cloning, characterization, and heterologous expression of levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37 (2): 195-204.
- [5] 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 (3): 124-129.
- [6] MORALES-ARRIETA S, RODRÍGUEZ M, SEGOVIA L, et al. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostocmesenteroides* NRRL B-512 F [J]. Gene, 2006, 376(1): 59-67.
- [7] PAUL A, SAMADDAR N, DUTTA D, et al. Mercuric ion stabilizes levansucrase secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1 (T) [J]. Protein Journal, 2011, 30 (4): 262-272.
- [8] LI W, YU S, ZHANG T, et al. Recent novel applications of levansucrases [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(17): 6959-6969.
- [9] BALCÁZAR J L, DE BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, et al. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*) [J]. British Journal of Nutrition, 2007, 97(3): 522-527.
- [10] SONG A L, IN L, LIM S, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 55.
- [11] TURNER M S, WALDHERR F, LOESSNER M J, et al. Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria [J]. Systematic & Applied Microbiology, 2007, 30(1): 58-67.
- [12] TAKALA T, SARIS P. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 467-471.
- [13] MA T, LI X, WU X, et al. Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* γ -Glutamyltransferase in *Lactococcus lactis* and immobilization on magnetic nanoparticles [J]. ACS Food Science & Technology, 2021, 1(5): 778-787.
- [14] HOLO H. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with Glycine in osmotically stabilized media [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3119-3123.
- [15] MA T, LU J, ZHU J, et al. The secretion of *Streptomyces monbaraensis* transglutaminase from *Lactococcus lactis* and immobilization on porous magnetic nanoparticles [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1675.
- [16] MU D, LI H, CHEN Q, et al. Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* and its application in enzymatic synthesis of l-Theanine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14129-14136.
- [17] MU D, ZHOU Y, WU X, et al. Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase from *Bacillus subtilis* and its application in the enzymatic synthesis of levan [J]. ACS Food Science & Technology, 2021, 1(2): 249-259.

(责任编辑 闫杏丽)