

# 毕赤酵母全细胞催化合成新型高倍甜味剂莱鲍迪苷 A

唐小雁, 陈美琪, 林影, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:**本研究构建经密码子优化后的 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 AtSUS 基因的重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS, 实现双酶在毕赤酵母中的胞内共表达。利用共表达菌株作为全细胞催化剂在体外进行催化反应, 可成功将 ST 转化为 RA, 并在此基础上对其最适反应温度、反应 pH、底物 UDP 浓度与底物蔗糖浓度条件进行优化。重组菌株经甲醇诱导, 对不同发酵时间菌体的催化能力进行探究, 确定发酵 120 h 菌体催化能力最佳, RA 产量为 0.58 mg/mL。对共表达菌株催化体系中全细胞催化条件进行优化, 优化后的催化体系为:反应 pH 7.0, UDP 浓度 1 mM, 蔗糖浓度 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 浓度 3 mM, ST 浓度 10 mg/mL, 将 OD<sub>600</sub> 为 30 的细胞与上述体系混合后在最适温度 45 °C 下, 200 r/min 反应 15 h, 重组菌可将 10 mg/mL ST 转化为 7.46 mg/mL RA, 为 RA 酶法生物合成及其产业化应用提供技术支持。

**关键词:** UDP-葡糖基转移酶; 蔗糖合成酶; 毕赤酵母; 莱鲍迪苷 A

文章编号: 1673-9078(2020)01-150-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.021

## *Pichia pastoris* Whole Cell-Catalyzed Synthesis of a Novel High-intensity Sweetener Rebaudioside A

TANG Xiao-yan, CHEN Mei-qi, LIN Ying, LIANG Shu-li

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In this study, we constructed a codon-optimized UDP-glycosyltransferase UGT76G1 and a sucrose synthase AtSUS gene recombinant *Pichia pastoris* strain, GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS, to achieve intracellular co-expression of the two enzymes in *Pichia pastoris*. The co-expressed strain was used as a whole-cell catalyst for the *in vitro* catalytic reaction, to successfully convert ST into RA. On this basis, optimization was performed on reaction temperature, reaction pH, substrate UDP concentration and substrate sucrose concentration. After the recombinant strain was induced with methanol, the catalytic capacity of the cells at different fermentation times was investigated. The catalytic capacity of the cells was the greatest after fermentation for 120 h, with the RA yield as 0.58 mg/mL. After the optimization of the catalytic conditions for the whole cells in the catalytic system of co-expressed, the optimized catalytic conditions were: reaction pH 7.0, UDP concentration 1 mM, sucrose concentration 70 mM, MgCl<sub>2</sub> concentration 3 mM, ST concentration 10 mg/mL, with the recombinant bacteria capable of converting 10 mg/mL ST to 7.46 mg/mL RA (if the cells with an OD<sub>600</sub> value of 30 were mixed with the above systems and allowed a reaction for 15 h at 200 rpm and an optimum temperature of 45 °C). This research provides technical support for the RA enzymatic biosynthesis and its industrialization.

**Key words:** UDP-glycosyltransferase; sucrose synthase; *Pichia pastoris*; rebaudioside A

甜菊糖是从甜叶菊叶子中提取和纯化的二萜糖苷, 具有高甜度、低热量、对人体无副作用等优点<sup>[1]</sup>, 美国食品和药品管理局在 2008 年将其列入为一般认为安全 (Generally Recognized As Safe, GRAS) 的甜味剂<sup>[2]</sup>。甜菊苷 (stevioside, ST) 在甜菊糖中含量最高且甜度是蔗糖的 250~300 倍<sup>[3]</sup>, 但其具有较严重的苦涩余味, 从而限制了其在食品和药品中的消费和应

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31400062)

作者简介: 唐小雁 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶学与酶工程

用<sup>[4,5]</sup>。莱鲍迪苷 A (rebaudioside A, RA) 是甜菊糖中甜度最高的组分, RA 作为天然甜味剂在食品和饮料行业广泛应用<sup>[6]</sup>。目前生产 RA 主要通过培育高产 RA 的甜叶菊品种<sup>[7,8]</sup>, 大孔树脂吸附法、重结晶法及液滴逆流分配层析提纯 RA<sup>[9-11]</sup>等方法, 但这些方法步骤繁琐且存在生产成本低、产量低、产品效果不佳等缺点。目前已有研究者在酿酒酵母中利用 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 将 ST 转化为 RA, 其中刘欢等以 1 g/L 的 ST 为底物合成 267.89 mg/L 的 RA, 为酶法合成 RA 提供思路<sup>[12,13]</sup>。然而, 糖基转移反应中的糖基供体 UDPG 价格昂贵, 这直接影响了 RA 酶促合成应

用的经济性。解决 UDPG 的回收利用问题是实现 RA 高效生物合成的关键<sup>[14,15]</sup>。

蔗糖合成酶普遍存在于高等植物的非光合作用器官中<sup>[16]</sup>，研究表明，在合适的 pH 下，拟南芥来源的蔗糖合成酶 SUS1 能可逆地催化 UDPG 葡萄糖基部分从蔗糖转移到 UDP 上，反应生成 UDPG 和果糖<sup>[17]</sup>。将 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶两步催化反应结合起来应用于 RA 生产，可实现 UDPG 的再生和循环利用，从而解决 UDPG 原料成本的问题，使得新型甜味剂工业化生产成为可能<sup>[18,19]</sup>。

本研究在构建表达高活性 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 和蔗糖合成酶 SUS1 的基础上，建立了 RA 的两步法合成途径，如图 1 所示，通过胞内共表达 UDP-糖基转移酶 UGT76G1 和拟南芥来源的蔗糖合成酶 AtSUS，实现 UDP 在全细胞催化反应中的胞内循环，并对催化反应条件进行优化，大幅提高了重组毕赤酵母催化合成 RA 的产量，从而为 RA 酶法生物合成及其产业化应用提供技术支持。

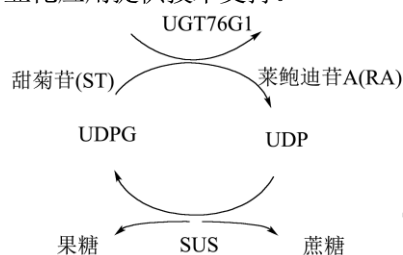


图 1 催化合成 RA 过程

Fig.1 Process of catalytic synthesis of RA

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

菌株毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、胞内表达可催化 ST 转化为 RA 的 UDP-糖基转移酶菌株 GS115/pPIC9K-UGT76G1 及质粒 pPICZA 由华南理工大学微生物与酶学实验室保藏。质粒 pUC57-AtSUS 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

#### 1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶 *EcoRI*、*NotI* 和 *MssI* 购自宝生物工程(大连)有限公司; KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶、质粒小量制备试剂盒、PCR 纯化试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 酵母提取物 YE (Yeast Extract)、胰蛋白胨 (Tryptone) 从英国 Oxoid 公司购买; 蛋白胨 (Peptone)、无氨基酸酵母氮源 YNB (Yeast Nitrogen Base) 来自美国

BD-Difco 公司; 甜菊苷 (Stevioside)、莱鲍迪苷 A (Rebaudioside A) 由曲阜海根甜菊制品有限公司提供; UDP 为上海士锋生物科技有限公司产品。

#### 1.1.3 培养基

LB、YPD、MD、BMGY、BMMY 等培养基及其配制方法参考美国 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。

## 1.2 方法

### 1.2.1 目的基因的优化及合成

在 NCBI 数据库中获得拟南芥来源的蔗糖合成酶 (GeneID: 832206)。将该基因氨基酸序列送往南京金斯瑞生物科技有限公司，经毕赤酵母密码子优化而获得的碱基序列，全基因合成后克隆至质粒 pUC57，得到含有蔗糖合成酶编码基因的重组质粒 pUC57-AtSUS。

### 1.2.2 蔗糖合成酶表达载体的构建

在 AtSUS 基因的两端引入 *EcoRI* 和 *NotI* 限制性酶切位点，如下所示：

AtSUS-F:5'-GTACGAATTCATGGCTAACGCCGAG-3'(EcoRI);

AtSUS-R:5'-GATAGCGGCCGCTTAGTCATCCTGAG-3'(NotI)，以含有编码蔗糖合成酶并经毕赤酵母密码子优化的基因 AtSUS 的载体 pUC57-AtSUS 为模板，进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用试剂盒纯化，用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 对 PCR 回收产物及质粒 pPICZA 分别进行双酶切，纯化回收后用 T4 连接酶进行连接反应，连接产物转化大肠杆菌 *E.coli* 感受态细胞，得到表达载体 pPICZA-AtSUS。

### 1.2.3 双酶体系的构建及酶的诱导表达

重组质粒 pPICZA-AtSUS 用限制性内切酶 *MssI* 线性化，电击转化毕赤酵母 GS115/pPIC9K-UGT76G1 感受态中，涂布于 YPDZ 平板，于 30 °C 恒温培养 2~4 d，挑取博来霉素抗性重组转化子，微波裂解菌体获得基因组。以基因组为模板，进行 PCR 鉴定筛选得到重组工程菌 GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS。取毕赤酵母重组工程菌接种到 10 mL BMGY 液体培养基 (50 mL 的锥形瓶) 中，30 °C 恒温摇床 250 r/min 振荡培养 16~18 h，至 OD<sub>600</sub> 达到 4~6。离心后转至 25 mL BMMY 培养基 (250 mL 的锥形瓶，控制起始 OD 值约为 1.0)，30 °C 恒温摇床 250 r/min 振荡培养。每隔 24 h 取 250 μL 诱导培养液，用于分析重组菌的生长情况及重组酶的表达水平。每次取样完毕后，补加 1% 甲醇，连续诱导发酵 144 h。

### 1.2.4 双酶法合成 RA

用 ST (甜菊苷) 作为底物分析重组酵母菌的 RA 合成能力。摇瓶发酵后离心收集菌体, 用 100 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 洗涤两次。将菌体与反应底物混合, 控制细胞的  $OD_{600}$  为 30, 200  $\mu$ L 反应体系中终浓度分别为 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 0.6 mM UDP, 50 mM 蔗糖。将混合物在 35  $^{\circ}C$  下反应 15 h, 然后将反应物煮沸 5 min。反应体系用蒸馏水进行 5 倍稀释后经 0.22  $\mu$ m 膜过滤后用于 HPLC 分析。

### 1.2.5 双酶共表达体系催化条件的优化

重组酵母工程菌 GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS 合成 RA 的反应在含有 200  $\mu$ L 反应物的 2 mL 离心管中进行, 将离心管置于振荡培养箱中, 通过单变量优化实验对反应的温度、pH、UDP 浓度和蔗糖浓度进行优化。

使用含有 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 0.6 mM UDP, 50 mM 蔗糖与  $OD_{600}$  为 30 的细胞混合, 混合物在不同温度条件下, 200 r/min 下反应 15 h 来检测温度对 RA 合成的影响。温度分别设定在 30  $^{\circ}C$ 、35  $^{\circ}C$ 、40  $^{\circ}C$ 、45  $^{\circ}C$ 、50  $^{\circ}C$ 、55  $^{\circ}C$ 。

使用含有 50 mM 磷酸钾缓冲液, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 0.6 mM UDP, 50 mM 蔗糖与  $OD_{600}$  为 30 的细胞混合, 混合物在 200 r/min, 35  $^{\circ}C$  下孵育 15 h 来研究 pH 对 RA 合成的影响, 磷酸钾缓冲液 pH 分别设定为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。

使用含有 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 50 mM 蔗糖以及不同浓度的 UDP 与  $OD_{600}$  为 30 的细胞混合, 混合物在 200 r/min, 35  $^{\circ}C$  下孵育 15 h 来研究 UDP 浓度对 RA 合成的影响, 反应物中的 UDP 浓度分别为 0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM、1 mM、1.2 mM、1.5 mM。

使用含有 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 0.6 mM UDP, 及不同浓度的蔗糖与  $OD_{600}$  为 30 的细胞混合, 混合物在 200 r/min, 35  $^{\circ}C$  下孵育 15 h 来研究蔗糖浓度对 RA 合成的影响, 反应物中的蔗糖浓度分别为 10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM。

使用含有 50 mM 磷酸钾缓冲液, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mg/mL ST, 最优浓度 UDP, 最优浓度蔗糖与  $OD_{600}$  为 30 的细胞混合, 混合物在 200 r/min 及最优反应温度条件下探究重组酵母菌株的生成 RA 的最高产量。

### 1.2.6 HPLC 分析

样品的高效液相色谱分析在 Waters 2690-2489 HPLC 系统上进行, 使用 Phenomenex Gemini 5u C18

柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm), 柱温为 40  $^{\circ}C$ , UV 检测波长为 210 nm。流动相 A (1.38 g/L 磷酸钠缓冲液, pH 2.6): 流动相 B (乙腈)=68:32, 1 mL/min。进样量为 10  $\mu$ L。使用莱鲍迪苷 A 标准品 (99%) 和甜菊苷 (95%) 通过外标法进行定量。RA 和 ST 浓度的线性范围为 0.1~2 g/L。

### 1.2.7 数据统计分析

每个重组酵母菌株重复发酵三次, 每次反应合成 RA 设置三个平行, 数据值为平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS 的构建

以质粒 pUC57-AtSUS 为模板, PCR 扩增得到约 2400 bp 的 AtSUS 基因片段, 经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切后, 连接载体片段构建 pPICZA-AtSUS 重组质粒。重组质粒经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切并用凝胶电泳鉴定。如图 2a 所示, 双酶切得到两条带分别为 3300 bp 和 2400 bp, 与预期的目的片段大小一致, 经 DNA 测序后无碱基突变, 结果正确, 重组质粒成功构建。

重组质粒 pPICZA-AtSUS 经限制性内切酶 *MssI* 线性化后电转化毕赤酵母 GS115/pPIC9K-UGT76G1 感受态中。YPDZ 平板初筛得到的重组转化子, 微波裂解粗提基因组经 PCR 凝胶电泳鉴定。如图 2b 所示, 在 2700 bp 左右扩增出一条特异性条带, 与预期的目的片段大小一致, 表明 pPICZA-AtSUS 已成功整合到 GS115/pPIC9K-UGT76G1 基因组上。

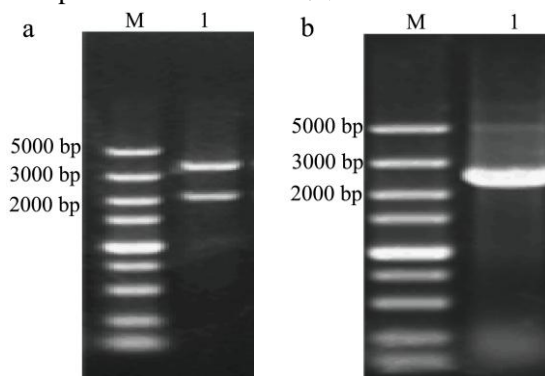


图2 重组质粒的双酶切鉴定及转化子 PCR 鉴定

Fig.2 Double enzyme digestion of recombinant plasmid and identification of transformants by PCR

### 2.2 双酶共表达催化合成 RA

重组菌经甲醇诱导 144 h 后, 生长情况正常, 如图 3 所示。利用不同发酵时间的菌体进行 RA 合成反应并检测产物, RA 产量如图 4 所示。从图中可知, 以蔗糖和 UDP 为底物时, SUS 可与 UGT 形成级联反应, 实现 UDP 循环, 进而催化合成 RA。以发酵 120 h 的菌体作为全细胞催化剂时, RA 产量最高, 达到 0.58 mg/mL。双酶体系生产 RA 解决了 UDPG 的经济性问题, 为工业化生产 RA 提供了思路。

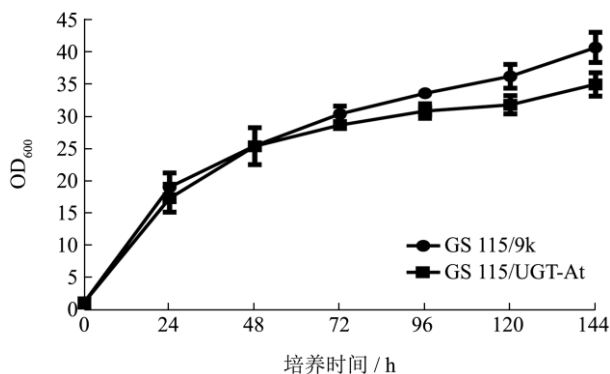


图 3 重组毕赤酵母菌株生长曲线

Fig.3 Recombinant *Pichia pastoris* Growth Curve

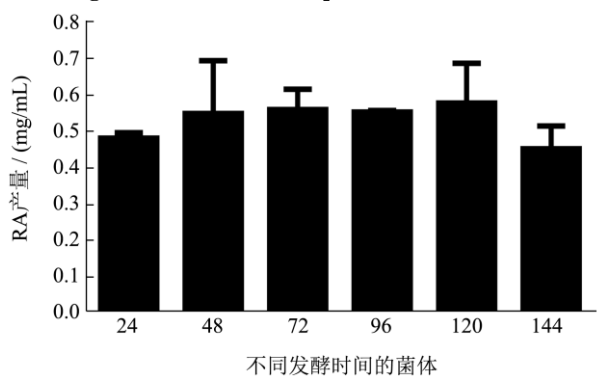


图 4 不同发酵时间菌体催化合成 RA

Fig.4 Catalytic synthesis of RA by different fermentation time

## 2.3 全细胞催化体系的条件优化

### 2.3.1 温度对 RA 合成的影响

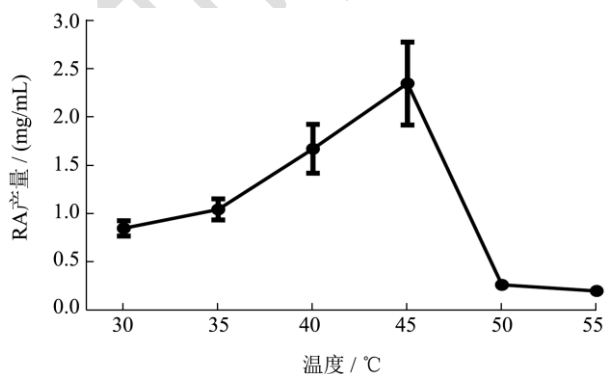


图 5 最适温度测定曲线

Fig.5 Optimum Temperature Curve

催化反应的温度对 RA 合成有很大的影响。如图 5

所示, 在 30 °C 时, 重组菌的酶活性受到一定的限制, RA 产量较低, 合成量仅为 0.82 mg/mL。随着温度增加至 45 °C, RA 产量随温度升高而增加。但当温度继续升高时, RA 产量降低, 原因可能是过高的温度导致合成 RA 的酶失活。双酶体系催化合成 RA 的最适温度为 45 °C。

### 2.3.2 pH 对 RA 合成的影响

在催化反应中, pH 的微小变化就会引起酶活性的变化。实验研究了不同 pH 的缓冲液对全细胞催化合成 RA 的影响。如图 6 所示, 虽然蔗糖合成酶的最适 pH 值为 5.0, 但过酸性条件并不适合 RA 生产。重组菌 GS115/pPIC9K-UGT/pPICZA-AtSUS 在中性 pH 环境中能够更好地催化 RA, 优化得到的最佳 pH 值为 7.0, 在该 pH 条件下, RA 产量达到最高。

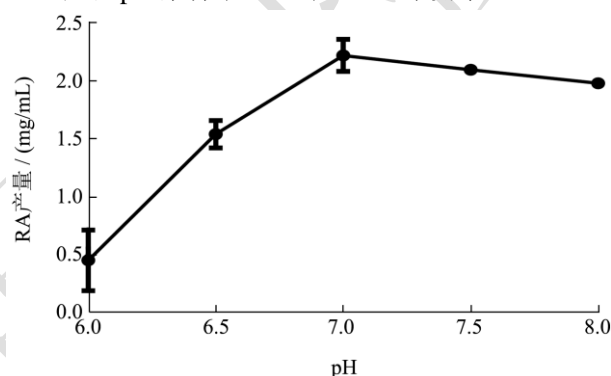


图 6 最适 pH 测定曲线

Fig.6 Optimum pH curve

### 2.3.3 UDP 浓度对 RA 合成的影响

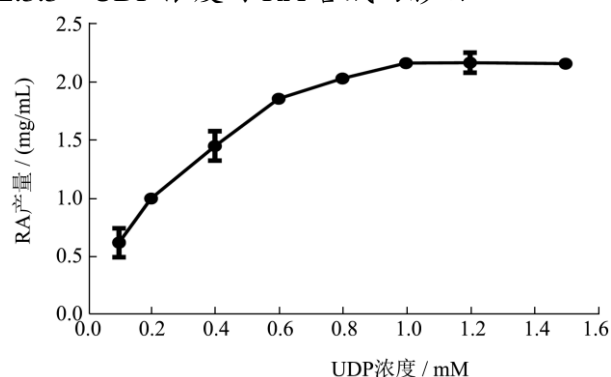


图 7 最适 UDP 浓度测定曲线

Fig.7 Optimum UDP concentration curve

双酶体系催化合成 RA 中, 蔗糖合成酶能够催化 UDP 生成 UDPG, 实现 UDPG 的再循环利用。同时, UDP 是 UGT76G1 催化 ST 形成 RA 的产物。通过设定从 0.1 mM 至 1.5 mM 的 8 个浓度来研究该催化体系的最适 UDP 浓度。如图 7 所示, 当增加反应物中的 UDP 浓度时, RA 合成并不能随之持续增加。当 UDP 浓度为 1.0 mM 时, RA 产量达到最高水平。在此基础上继续增加 UDP 浓度, RA 的产量则下降。

### 2.3.4 蔗糖浓度对 RA 合成的影响

蔗糖作为蔗糖合成酶的底物,其浓度会对 SUS 产生 UDP-葡萄糖有影响。缺乏底物蔗糖将会对 UDP-葡萄糖的再循环产生限制。同时, SUS 催化的蔗糖和果糖之间的反应是可逆的,这就需要过量的蔗糖来避免产物抑制并确保反应向正反应方向进行。通过研究从 10 mM 至 80 mM 的不同蔗糖浓度确定了蔗糖的最适浓度。如图 8 所示,当增加蔗糖浓度时, RA 的浓度持续增加,当蔗糖浓度达到 70 mM 时, RA 产量达到最高,证明该浓度是反应的最佳蔗糖浓度。

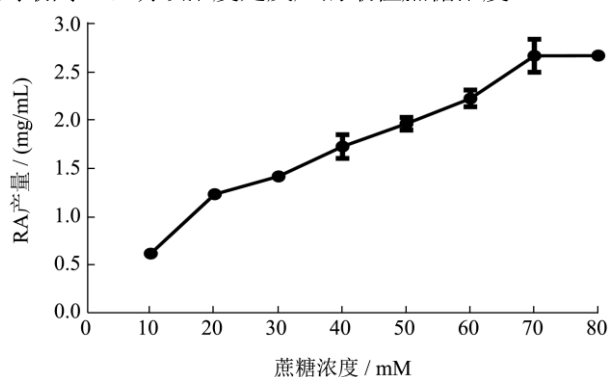


图 8 最适蔗糖浓度测定曲线

Fig.8 Optimum sucrose concentration curve

### 2.3.5 最优条件下 RA 的合成产量

在对上述反应条件进行优化后,得到重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K-UGT76G1/pPICZA-AtSUS 反应生成 RA 的最适温度是 45 °C, pH 7.0, UDP 浓度 1 mM, 蔗糖浓度 70 mM。在上述最适反应条件下,将 OD<sub>600</sub> 为 30 的细胞与 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mg/mL ST 混合后反应 15 h,合成的 RA 产量为 7.46±0.19 mg/mL,较条件优化前提高了 12.87 倍。

## 3 结论

3.1 莱鲍迪昔 A 作为甜菊糖苷中甜味最高、口感最好的成分,获取高纯度莱鲍迪昔 A 的产品是甜菊糖产品的一个重要发展方向。本研究建立了双酶级联催化反应,实现了全细胞催化及胞内 UDP 循环利用。生产 RA 的最优条件为反应温度 45 °C, pH 7.0, UDP 浓度 1 mM, 蔗糖浓度 70 mM,在该条件下,菌株 GS115/pPIC9K-UGT76G1/pPICZA-AtSUS 可催化 10 mg/mL ST 合成 7.46 mg/mL RA,与此前报道的酿酒酵母<sup>[12]</sup>相比有较大提高。

3.2 利用毕赤酵母胞内共表达 SUS 与 UGT76G1,可以在催化过程中实现级联反应,实现全细胞催化反应中胞内 UDP 的循环,提高菌株催化 ST 合成 RA 的能力,为利用 ST 催化合成 RA 的规模化生产提供了可能。为进一步提升 RA 合成产率,后续研究需对共表

达体系中双酶配比等进行进一步优化。

## 参考文献

- [1] Carakostas M C, Curry L L, Boileau A C, et al. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 1-10
- [2] Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2009, 121(1): 41-54
- [3] Geuns J M C. Stevioside [J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 913-921
- [4] Brandle J E, Telmer P G. Steviol glycoside biosynthesis [J]. Phytochemistry, 2007, 68(14): 1855-1863
- [5] J E Brandle, A N Starratt, M Gijzen. Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1998, 78(4): 527-536
- [6] Wu X L, Wang B G, Chen T, et al. The non-cytotoxicity characterization of rebaudioside A as a food additive [J]. Food and Chemical Toxicology. 2014, 66, 334-340
- [7] 杨文婷,蔡乾蓉,徐应文,等.四川引种甜叶菊的糖苷含量变异及优良单株筛选[J].中国糖料,2010:27-30  
YANG Wen-ting, CAI Qian-rong, XU Ying-wen, et al. Variation of glycosidic content of stevia introduced in Sichuan and screening of excellent individual plants [J]. Chinese Sugar Materials, 2010: 27-30
- [8] 赵宁娟,宋小兰,宋月红,等.不同品种甜叶菊糖苷含量分析研究[J].现代农业科技,2013:81-82  
ZHAO Ning-juan, SONG Xiao-lan, SONG Yue-hong, et al. Analysis of different varieties of stevia glycosides [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013: 81-82
- [9] 叶发银,杨瑞金,华霄,等.大孔树脂 D392对莱鲍迪昔A和甜菊苷吸附作用的研究[J].食品工业科技,2012,33:206-210  
YE Fa-yin, YANG Rui-jin, HUA Xiao, et al. Study on the adsorption of rebaudioside A and stevioside by macroporous resin D392 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33: 206-210
- [10] 李培,杨瑞金.重结晶法分离莱鲍迪昔A的工艺研究[J].食品与机械,2010,17:160-163  
LI Pei, YANG Rui-jin. Study on the separation of rebaudioside A by recrystallization [J]. Food and Machinery, 2010, 17: 160-163
- [11] Li Y, Li Y, Wang Y, et al. Production of rebaudioside A from stevioside catalyzed by the engineered *Saccharomyces*

- cerevisiae* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(8): 1586-1598
- [12] 刘欢,李艳,严明,等.重组酿酒酵母全细胞催化合成莱鲍迪昔 A[J].食品与发酵工业,2012,38(7):6-10  
LIU Huan, LI Yan, YAN Ming, et al. Whole cell catalyzed synthesis of rebaudioside A by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 6-10
- [13] Călin-Aurel Drăgan, Buchheit D, Bischoff D, et al. Glucuronide production by whole-cell biotransformation using genetically engineered fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Drug Metabolism & Disposition, 2010, 38(3): 509-515
- [14] Carvalho C C R D. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 75-83
- [15] Tsai T I, Lee H Y, Chang S H, et al. Effective sugar nucleotide regeneration for the large-scale enzymatic synthesis of Globo H and SSEA4 [J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(39): 14831-14839
- [16] Zheng Y, Anderson S, Zhang Y, et al. The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(41): 36108-36118
- [17] Schmolzer K, Gutmann A, Diricks M, et al. Sucrose synthase: A unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(2), 88-111
- [18] Chen L, Sun P, Li Y, et al. A fusion protein strategy for soluble expression of Stevia glycosyltransferase UGT76G1 in *Escherichia coli* [J]. Biotech, 2017, 7(6): 356
- [19] Wang Y, Chen L, Li Y, et al. Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2015, 80 (1): 67-73

## (上接第 68 页)

- [23] Mahboubeh Fazaeli, Shima Yousefi, Zahra Emam-Djomeh. Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of pomegranate (*Punica granatum* L.) and black mulberry juices [J]. Food Research International, 2013, 50(2): 568-573
- [24] 孙晓健,于鹏飞,李晨晨,等.真空冷冻干燥香椿中挥发性有机硫成分的 GC-MS 分析[J/OL].食品工业科技,1-9 [2019-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20190430.1423.027.html>  
SUN Xiao-jian, YU Peng-fei, LI Chen-chen, et al. Comparative analysis of vacuum freeze-drying treatment on volatile sulfur components of *Toona sinensis* by GC-MS [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1-9 [2019-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20190430.1423.027.html>
- [25] 刘常金,张杰,周争艳,等.GC-MS 分析比较 3 个特产香椿品种的挥发性成分[J].食品科学,2013,34(20):261-267  
LIU Chang-jin, ZHANG Jie, ZHOU Zheng-yan, et al. Comparative analysis of volatile components in three cultivars of Chinese toon (*Toona sinensis*) by GC-MS [J]. Food Science, 2013, 34(20):261-267
- [26] 王海翔,潘见,谢慧明,等.超高压处理对脐橙汁中香气成分柠檬烯的影响[J].食品科学,2010,31(1):66-70  
WANG Hai-xiang, PAN Jian, XIE Hui-ming, et al. Effect of ultra-high hydrostatic pressure treatment on limonene in navel orange juice [J]. Food Science, 2013, 31(1): 66-70
- [27] 潘见,王海翔,谢慧明,等.超高压处理对鲜榨橙汁中主要香气成分的影响[J].农业工程学报,2009,25(5):239-243  
PAN Jian, WANG Hai-xiang, XIE Hui-ming, et al. Effects of ultra high pressure treatment on main flavor compounds in orange juice [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(5): 239-243

## (上接第 142 页)

- [25] 张微微,孙艳辉,韦海阳,等.紫外线照射对炼乳空桶杀菌效果及其动力学研究[J].食品与机械,2019,35(4):108-112  
ZHANG Wei-wei, SUN Yan-hui, WEI Hai-yang, et al. Germicidal effects of ultraviolet on condensed milk barrel and its dynamic [J]. Food & Machinery, 2019, 35(4): 108-112
- [26] 国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准糕点、面包:GB 7099-2015[S].北京:中国标准出版社,2015  
National Health and Family Planning Commission of PRC: National Food Safety Standards Cake, Bread: GB 7099-2015 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015
- [27] 张根生,池天奇,王芮,等.鸡肉饼低温贮藏中品质变化研究[J].中国调味品,2018,43(3):18-22  
ZHANG Gen-sheng, CHI Tian-qi, WANG Rui, et al. Study on physicochemical quality of chicken patty in low temperature storage [J]. China Condiment, 2018, 43(3): 18-22

---

现代食品科技