

编码米曲霉果糖基转移酶基因在大肠杆菌中的重组表达

王玉海, 岳娟, 王鹏, 林晓珊, 张毅

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为了大量获得果糖基转移酶, 本文通过 RT-PCR 扩增获得米曲霉果糖基转移酶基因, 连接到大肠杆菌 pEASY-E1 质粒上, 并转化到大肠杆菌 BL21-DE3 菌株中成功表达, 通过对重组菌诱导表达条件的优化, 最终确定在诱导温度为 25 °C, 诱导剂异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 浓度为 1.0 μmol/mL 的条件下, 该重组酶可以顺利表达。利用重组质粒 PEASY-S1 上的 6×组氨酸标签, 用亲和层析的方法纯化能够得到较高纯度的果糖基转移酶。以蔗糖为底物, 用该酶进行果糖基转化生产低聚果糖的实验结果表明: 重组果糖基转移酶具有一定催化能力, 其酶活力达到 59.0 U/g, 且在低温诱导时稳定表达, 具备一定的潜在开发利用价值。本实验成功在大肠杆菌中重组表达出果糖基转移酶, 并且能够短时间内、大量表达具有催化活性的果糖基转移酶, 可望为果糖基转移酶的工业化提供理论基础。

关键词: 蔗果寡糖; 果糖基转移酶; 大肠杆菌; 蛋白表达

文章编号: 1673-9078(2014)9-67-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.012

Recombinant Expression of Fructosyl Transferase Gene of *Aspergillus oryzae* in *Escherichia coli*

WANG Yu-hai, YUE Juan, WANG Peng, LIN Xiao-shan, ZHANG Yi

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

Abstract: To obtain a higher yield of fructosyl transferase during industrial production, the fructosyl transferase gene from *Aspergillus oryzae* SBB201 strain was amplified using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and cloned into plasmid pEASY-E1, which was then transformed into *E. coli* BL21-DE3 strain to achieve successful expression. Optimal conditions for inducing the expression of recombinant genes were ultimately determined for successful expression of fructosyl transferase, namely, induction temperature of 25 °C and a dose of 1.0 μmol/mL isopropylthiogalactoside (IPTG,) as an inducer. Taking advantage of the 6 × histidine-tag at the amino terminus of recombinant plasmid PEASY-S1, the expressed fructosyl transferase was purified by chelating affinity chromatography. Sucrose was used as substrate to test the catalyzing ability of fructosyl transferase. The results indicated that the recombinant fructosyl transferase had catalyzing ability and its enzyme activity reached 59.0 U/g. In addition, this recombinant fructosyl transferase could be stably expressed at low temperature. Thus, it has great potential for development and application. In this study, recombinant expression of fructosyl transferase in *E. coli* was successful, achieving rapid expression of a large amount of fructosyl transferase with catalyzing ability. This study could provide a theoretical basis for industrial production of fructosyl transferase.

Key words: fructo-oligosaccharide; fructosyl transferase; *E. coli*; protein expression

蔗果寡糖是指在蔗糖的果糖基上通过 β-(2, 1)糖苷键连接 1-3 个果糖基而形成的蔗果三糖 (GF₂)、蔗果四糖 (GF₃)、蔗果五糖 (GF₄) 等一系列果糖寡聚体^[1]。蔗果寡糖是一种超强双歧因子, 可以促进双歧杆菌增殖^[2], 而双歧杆菌是典型的有益菌, 不但能够促进消化吸收, 治疗慢性腹泻, 还可以调整内分泌和

恢复免疫功能, 以及恢复肠道蠕动功能从而缓解便秘等症^[3]。此外, 蔗果寡糖的甜度是蔗糖的30%~60%, 热量很低, 不会引起血糖值和胰岛素升高, 对受胰岛素控制的肝糖原的合成也无影响, 可以作为糖尿病和高血压患者的保健甜味剂。蔗果寡糖能够预防和调节多种疾病, 是一种营养型保健食品, 对人体没有任何毒副作用, 已被许多国家批准使用于食品、化妆品、药品、饲料等。

果糖基转移酶能催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,

收稿日期: 2014-03-11

作者简介: 王玉海 (1985-), 男, 硕士, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 张毅 (1964-), 男, 副教授

也可通过转果糖基作用在蔗糖的果糖基上连1~3个果糖基形成低聚果糖。该酶广泛存在于高等植物和微生物中,能产生该酶的植物有洋葱、芦笋、大麦、香蕉、甜菜、莴苣、菊苣等,微生物有黑曲霉、米曲霉、日本曲霉、青霉、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、产气杆菌等^[4]。1982年,Gupta等人从尖孢镰刀菌得到高纯度的果糖基转移酶,并对其催化产生低聚果糖的一系列生物合成机制进行研究。1989年,Hirayama等通过纯化黑曲霉得到果糖基转移酶,并对该酶的一系列特性进行了研究^[5]。

从目前来看,工业化生产低聚果糖所用的果糖基转移酶大多来自于微生物,作为工业生产果糖转移酶的重要来源^[6],黑曲霉、米曲霉在生产实践中,菌丝体生长的卷曲成球,给发酵生产往往带来诸多不便,所以人们为了改善这种状况做了大量工作。1995年,第一个果糖基转移酶的基因得到克隆,其后不同物种的果糖基转移酶基因得到研究,如1997年克隆表达了*Jerusalem artichoke*基因组内的果糖基转移酶;1998年,在*Onion*、*globe artichoke*等物种获得果糖基转移酶基因;果糖基转移酶还被用于转基因植物的研究,用于提高植物的抗逆性。在2007年,莴苣果糖基转移酶基因被转到烟草基因组内,提高了烟草抗低温的能力^[7]。

大肠杆菌是第一个用于重组蛋白生产的宿主菌,也是目前应用最广泛的蛋白质表达系统^[8]。它不仅具有遗传背景清楚、培养操作简单、转化和转导效率高、生长繁殖快、成本低廉,可以快速大规模地生产目的蛋白等优点,而且其表达外源基因产物的水平远高于其它基因表达系统,表达的目的蛋白量甚至能超过细菌总蛋白量的30%。本研究采用原核生物大肠杆菌表达系统高效可溶性地表达果糖基转移酶,并用亲和层析制备高纯度的果糖基转移酶,为果糖基转移酶的生产奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

果糖基转移酶生产菌株来自本实验室保藏米曲霉(*Aspergillus oryzae*)菌株SBB201,大肠杆菌克隆DH5 α 菌种及大肠杆菌表达菌株BL21-DE3菌种购自TransGen Biotech公司。

1.1.2 工具酶与试剂

各种工具酶及蛋白质分子质量标准物购自Takara公司,PCR扩增引物由Invitrogen(广州)公司合成,其

他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 米曲霉果糖基转移酶基因克隆

将米曲霉接种在DPY培养基中,35℃,150 r/min培养36 h,纱布过滤收集菌体,用液氮研磨,按Trizol试剂操作手册提取和鉴定RNA,-80℃保存备用。利用Takara公司反转录试剂盒合成第一链cDNA,根据米曲霉果糖基转移酶基因在Genbank数据库中报道的序列(EU118292)设计引物,引物:P1-5'ATGAAGCTCTCAACCGCGAGTGCCT3';P2-5'TTAGCCAATGCCTTGTTGTCGACCA3'。以cDNA为模板,利用P1和P2引物进行PCR反应:反应体系为50 μ L,反应程序:98℃变性2 min \rightarrow 98℃变性10 s \rightarrow 60℃退火15 s \rightarrow 72℃延伸2 min \rightarrow 30个循环后72℃延伸5 min。纯化回收PCR产物。

确认PCR产物后,配制连接体系:其中Solution I 5 μ L,PMD20载体数目与插入片段数目为1:10,用无菌水将总体积补充至10 μ L,4℃过夜连接。

过夜连接后,全量(10 μ L)加入到100 μ L DH5 α 感受态细胞中,冰浴30 min,42℃热激45 s,再置于冰上1 min。加入890 μ L SOC培养基中,37℃,200 r/min,培养60 min。取适量涂布于LB-Amp固体培养基中,37℃倒置培养10 h,取分散度合适的平板,挑取单菌落,以单菌落为模板,以P1/P2引物进行PCR扩增,验证阳性克隆。将阳性克隆送至测序公司测定目的片段序列。

1.2.2 大肠杆菌重组表达载体构建^[9]

以测序后的载体为模板,以P1/P2引物,扩增目的片段,琼脂糖凝胶分离目的片段,并切胶回收获得纯净条带,连接至pEASY-E1载体,连接方法为平末端连接,连接体系为5 μ L,载体数目与插入片段数目为7:1,25℃(PCR控温)连接15 min,并用热激法转化入大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞中,取适量菌液涂布于Amp-LB平板培养基中,37℃倒置培养10 h,取合适稀释度的平板,挑取单菌落,以菌落为模板,以T7 promoter primer和P2为引物,PCR扩增验证阳性克隆;克隆成功的重组质粒命名为pEASY-S1。

1.2.3 重组大肠杆菌转化与筛选

提取重组质粒pEASY-S1,琼脂糖凝胶电泳验证,将通过验证,长度准确的质粒通过热激法转化至大肠杆菌BL21-DE3感受态细胞中,然后涂布于Amp-LB平板上培养,挑取培养出的大肠杆菌菌落,以大肠杆菌菌落为模板,以P1和T7 terminator primer为引物进行PCR扩增验证重组菌构建结果。

1.2.4 重组大肠杆菌的诱导表达^[10]

挑取单个菌落接种到 Amp-LB 培养基中(含氨苄青霉素 100 μg/mL), 37 °C、250 r/min 过夜培养, 以获得有活力的菌株, 取 0.5 mL 活力菌液接种至 50 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 °C 下培养 2 h, 待其菌体浓度达到 OD₆₀₀ 介于 0.8 与 1.1 之间时, 加诱导物 IPTG 至终浓度为 1.0 μmol/mL, 分别在 30 °C、25 °C、20 °C 条件下培养 4 h, 以诱导目的基因表达。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳验证重组果糖基转移酶表达^[11]

参考文献的方法进行 SDS-PAGE 电泳试验。在电泳试验中, 采用 12.0% (质量分数) 的分离胶和 5.0% (质量分数) 的浓缩胶。取 5 mL 大肠杆菌菌液, 离心后收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入上样缓冲液混合后沸水浴 10 min, 上样, 4 °C 条件下电泳, 先用 80 V 电泳 30 min, 在用 150 V 电泳 90 min。电泳后用超纯水浸洗凝胶两次, 然后采用考马斯亮蓝 R-250 染色的方法对凝胶进行染色, 染色 70 min, 染色结束后用脱色液脱色。

取诱导表达的菌液, 离心收集菌体, 利用重组蛋白上设计的 6×组氨酸标记, 进行亲和层析。镍离子亲和层析柱, Buffer A (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0), Buffer B (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 500 mM 咪唑, pH 8.0), 使用梯度洗脱进行层析。将洗脱透过液进行蛋白质电泳, 验证层析结果。

1.2.6 重组果糖基转移酶活性测定^[12]

按照 1.2.4 的方法培养重组大肠杆菌, 待诱导表达结束后, 离心收集菌体, 称重并用 PBS 缓冲液 (pH 6.0) 洗涤 1~2 次, 最终用等重的 PBS 缓冲液悬浮, 并用超声波破碎, 超声波破碎程序为: 25 W, 5 s on, 5 s off, 持续 3~5 min。

配制酶促反应体系: 产酶菌体 1 g、蔗糖 2 g, 总体积为 20 mL。将反应体系置于摇瓶中, 在 45 °C、150 r/min 的恒温回旋式摇床中反应 60 min, 取出置于 100 °C 水浴中 5 min 将酶灭活, 冷至室温, 于 10000 r/min 台式离心机上离心 5 min, 取上层清液用 0.22 μm 的滤膜过滤, 并加入等体积的超纯水, 作为 HPLC 法测定蔗糖三糖的试液。

HPLC 检测条件: 色谱柱: 氨基键合柱 (Inertsil NH₂); 流动相: 流速: 1.0 mL/min; 乙腈(色谱纯)/水=72/28; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL; 检测器: Waters 2410 型示差折光检测器; 允许差: 同一样品两次测定结果之差, 不得超过平均值的 5%。

根据酶活力的定义, 在上述条件下, 每分钟产生

1 μmol 蔗糖三糖所需酶量为一个酶活力单位 (U), 按下式计算每克产酶菌丝体的酶活力 X, 单位为 U/g。

$$X = (10 \times 1000 \times GF2) / (0.504 \times t \times m)$$

注: 10 为 100 mL 蔗糖溶液中蔗糖含量; GF2 为蔗糖三糖的百分含量, %; t 为反应时间, 单位为分钟 (min); m 为反应菌丝体质量, 单位为 g。

2 结果与分析

2.1 果糖基转移酶基因克隆及表达质粒构建

通过提取米曲霉的总 RNA, 反转录为 cDNA, 利用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增出目的条带; 将 PCR 产物与克隆载体相连接, 转化至大肠杆菌中, 挑取阳性克隆测序。测序结果表明克隆的果糖基转移酶基因序列与 GenBank 数据库中 GX0015 菌株报道序列有 19 个碱基不同, 氨基酸序列中有四个不同。通过平行测序, 可得到稳定相同的测序结果, 故可知在 PCR 过程中未见任何突变。

扩增的 PCR 产物克隆至表达载体 pEASY-E1 上, 再分别以 P3、P4 引物进行菌落 PCR, 筛选出阳性克隆, 测序结果表明重组质粒 pEASY-S1 构建成功, 其示意图见图 1。

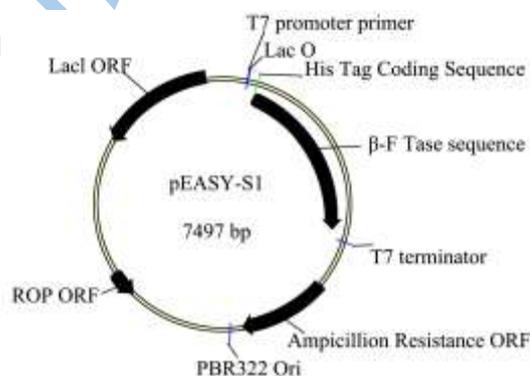


图1 重组表达质粒 pEASY-E1 构建示意图

Fig.1 Sketch of construction of recombinant expression plasmid pEASY-E1

2.2 重组大肠杆菌筛选及鉴定

培养米曲霉 SBB201 菌株, 并提取总基因组, 将 PCR 扩增并测序确认的米曲霉果糖基转移酶基因连接至 pEASY-E1 质粒, 得到 pEASY-S1, 成功构建 pEASY-E1 质粒后, 采用化学转化法转化入大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 用 LB-Amp 固体培养基筛选转化成功的菌株, 挑去能够在 Amp 抗性条件下生长的单菌落, 接入到 LB-Amp 液体培养基中培养, 由于 pEASY-S1 质粒是通过平末端连接构建的, 故需要以重组菌落为模板, 利用 pEASY-E1 质粒上自带的 T7

terminator primer 和 P1 Primer 进行 PCR 验证。可以扩增出目的基因的质粒即为正确连接的质粒。

将正确连接的 pEASY-E1 质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中, 培养转化成功的重组单菌株, 收集菌体并提取质粒, 通过琼脂糖凝胶电泳验证质粒长度, 由于空质粒长 5715 bp, 连接目的片段后长 7497 bp, 可以根据质粒长度判断重组菌构建效果。

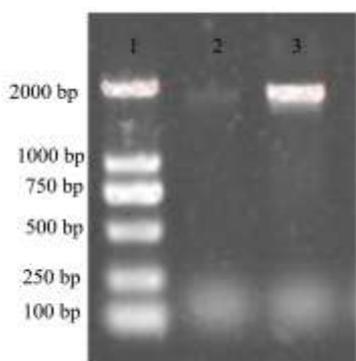


图2 重组转化子 PCR 电泳

Fig.2 PCR identification of recombinant transformants

注: 1: DL2000Marker; 2: 阴性对照; 3: 阳性克隆结果。

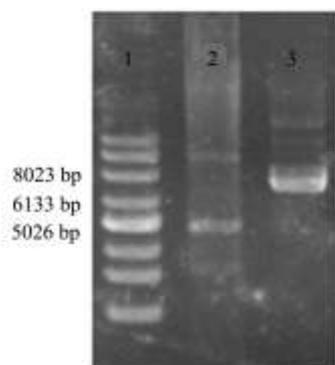


图3 pEASY-S1质粒电泳

Fig.3 Electrophoretic patterns of recombinant plasmid pEASY-E1

注: 1: Supercoiled Marker; 2: 阴性对照; 3: 重组质粒。

2.3 重组大肠杆菌在摇瓶培养中诱导结果^[13]

在 LB 培养基中培养重组大肠杆菌, 37 °C, 200 r/min 培养。待菌体浓度 (OD₆₀₀) 达到 0.8~1.0 时, 加入 IPTG 诱导剂, 终浓度为 1.2、1.0、0.8 μmol/mL, 继续培养至 OD₆₀₀ 接近 2.0 时, 终止发酵, 将菌体置于 4 °C 保存 1 h, 离心收集菌体, 按照 1.2.5 方法电泳确认果糖基转移酶表达效果, 发现重组大肠杆菌在 66.4 ku 的蛋白标记下方有重组蛋白表达, 而对照组则无重组蛋白表达。利用 BandScan 软件分析电泳图, 其中 4、5、6 三个泳道目的条带分别占泳道总蛋白含量的 14.8%、16.7%、13.6%, 对应实验设计, 可知在 IPTG 浓度为 1.0 时重组酶表达量较高 (电泳结果见图

4)。

控制 IPTG 浓度为 1.0 μmol/mL, 将重组菌放在 30 °C、25 °C、20 °C 的条件下继续培养至 OD₆₀₀ 接近 2.0 时, 终止发酵, 将菌体置于 4 °C 保存 1 h, 离心收集菌体, 按照 1.2.5 方法电泳确认果糖基转移酶表达效果。利用 BandScan 软件分析电泳图, 其中 4、5、6 三个泳道目的条带分别占泳道总蛋白含量的 7.8%、19.1%、6.3%, 对应实验设计, 可知重组大肠杆菌蛋白质中在 25 °C 时重组酶表达量较高 (电泳结果见图 5)。

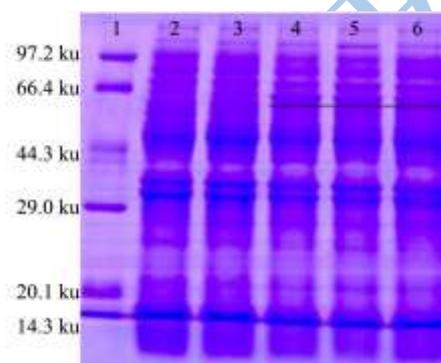


图4 IPTG 浓度梯度对重组果糖基转移酶表达的影响

Fig.4 Effect of induction on recombinant by the concentration of IPTG

注: 1, 蛋白质 Marker; 2, 未携带重组质粒的 BL21-DE3 菌株; 3, 未加入 IPTG 诱导的重组菌株; 4, IPTG 浓度为 1.2 μmol/mL; 5, IPTG 浓度为 1.0 μmol/mL; 6, IPTG 浓度为 0.8 μmol/mL。

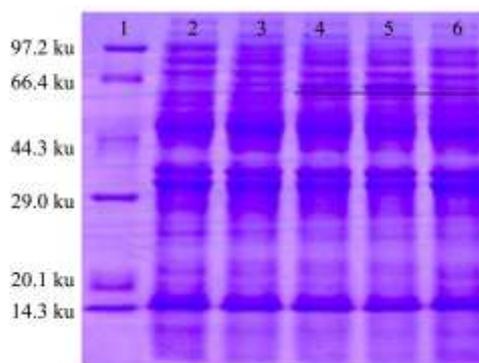


图5 温度梯度对重组果糖基转移酶表达的影响

Fig.5 Effect of induction on recombinant by temperature

注: 1, 蛋白质 Marker; 2, 未携带重组质粒的 BL21-DE3 菌株; 3, 未加入 IPTG 诱导的重组菌株; 4, 30 °C 条件诱导重组菌株表达; 5, 25 °C 条件诱导重组菌表达; 6, 20 °C 条件诱导重组菌表达。

按照优化过的诱导表达条件培养重组菌株, 电泳显示有明显果糖基转移酶蛋白出现, 未加 IPTG 诱导的重组大肠杆菌也有本底表达, 但是表达量较低。另外未携带重组质粒的 BL21-DE3 大肠杆菌蛋白中不含

有相应蛋白。该结果表明果糖基转移酶已经成功在大肠杆菌中表达（电泳结果见图6）。

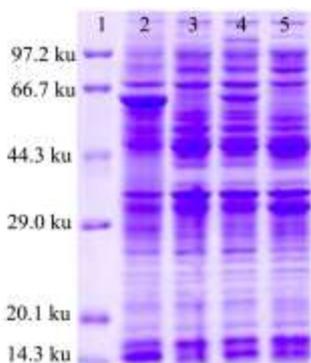


图6 重组表达果糖基转移酶 SDS-PAGE 电泳

Fig.6 Electrophoretic patterns of recombinant fructosyltransferase

注：1，蛋白质 Marker；2，重组大肠杆菌蛋白提取；3，阴性对照1；4，未加入 IPTG 的重组菌；5，阴性对照。

2.4 重组果糖基转移酶的纯化^[14]

收集重组表达的大肠杆菌菌体，破碎充分溶解，利用重组表达果糖基转移酶蛋白上的组氨酸标签，用亲和层析纯化表达蛋白，鉴定重组表达效果。将透过液进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳，从电泳图中可见，溶解后的大肠杆菌蛋白质中含有果糖基转移酶。



图7 Ni 柱亲和层析纯化重组果糖基转移酶

Fig.7 Recombinant fructosyl transferase purification in Ni-NTA affinity chromatography

注：1，蛋白质Marker；2，纯化后重组果糖基转移酶。

2.5 重组大肠杆菌中酶活力测定

将重组大肠杆菌菌株接种在 100 mL LB-Amp 培养基中，37 °C，200r/min 培养至 OD₆₀₀ 介于 0.8 至 1.2 时，通过优化诱导时间、温度、和诱导剂浓度，得到当加入 IPTG 终浓度达到 1.0 μmol/mL，诱导温度为 25 °C 培养时酶活效果最好，至 OD₆₀₀=2.0 时终止培养，离心收集菌体，称重，按照 1.2.6 的方法检测重组酶活性，由于在液相色谱检测中，葡萄糖、果糖、蔗糖、

蔗糖三糖、蔗糖四糖的保留时间分别为 7.0 min、7.5 min、9.0 min、12.5 min、16.5 min，通过对检测结果的分析，发现野生型的菌体酶液的催化体系中未发现蔗糖的降解和糖基转化；未添加诱导剂的重组菌体催化体系有较弱的蔗糖降解能力，可以检测到葡萄糖和果糖的波峰，蔗糖的含量也有相应的下降，未检测到蔗糖三糖的波峰。重组大肠杆菌酶液催化体系可检测到蔗糖较明显的降解，通过积分计算，可得蔗糖三糖含量为 1.74%，计算得重组大肠杆菌转果糖基活性为 59.0 U/g。

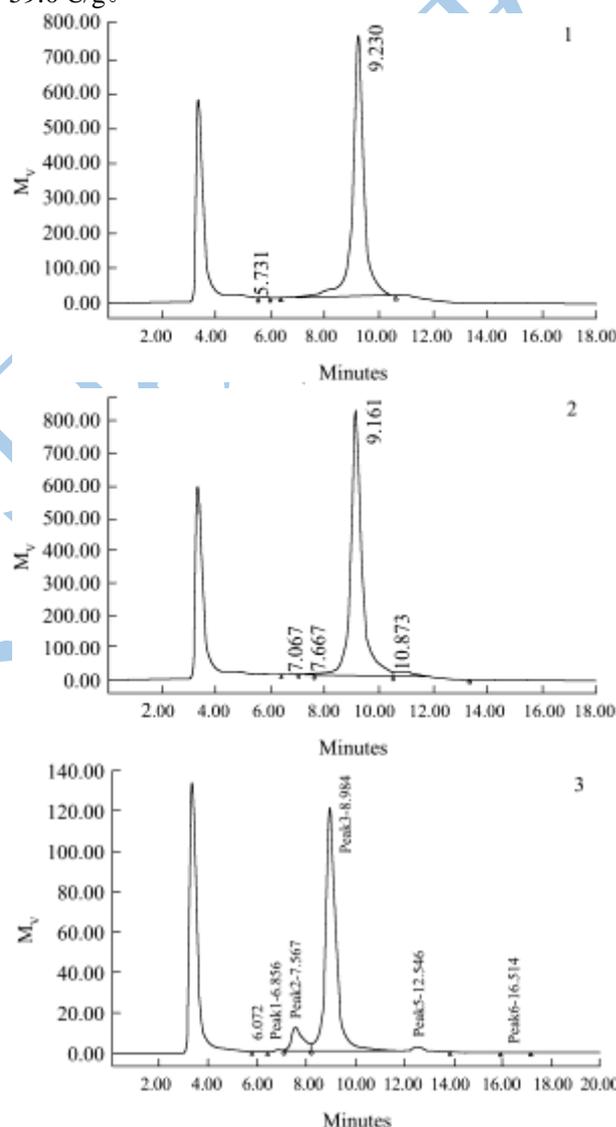


图8 HPLC 测定重组表达的果糖基转移酶活性

Fig.8 The HPLC map of recombinant fructosyl transferase activity

注：1，野生型菌株；2，未加入诱导剂的重组菌；3，正常诱导的重组菌体。

3 结论

3.1 作为目前应用最多的异源蛋白表达系统，大肠杆

菌具有多方面的优点,获得表达产物耗时较短,所投入的成本相对比较低。但也有在一些缺陷,例如异源蛋白常经以不溶的包涵体形式表达,胞内表达的产物较难纯化,且原核表达系统的后加工修饰体系不完整,翻译产物的后修饰不足,表达异源蛋白的生物活性较低等。

3.2 本实验以实验室保藏的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株 SBB201 为基础,通过提取米曲霉 Total RNA,逆转录合成得到果糖基转移酶 cDNA 片段,避免了大肠杆菌表达系统转录修饰体系不足的缺陷。将目的基因连接 pEASY-E1 质粒,并最终果糖基转移酶基因的克隆至大肠杆菌中,并成功诱导表达,测序可知米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株 SBB201 的果糖基转移酶序列。通过比对得到其与 GX0015 菌株碱基序列和氨基酸序列的不同。

3.3 通过对米曲霉果糖基转移酶基因重组质粒构建,我们得到表达出果糖基转移酶活性的大肠杆菌重组菌体,在对诱导表达条件的优化过程中,通过对诱导温度和诱导剂 IPTG 浓度的优化,可以确定在 25 °C、IPTG 浓度为 1.0 μmol/mL 时,重组果糖基转移酶的表达效果最好。为了进一步验证重组蛋白的表达,我们进行了 Ni 柱亲和层析,并获得高纯度的果糖基转移酶,这个结果进一步验证了米曲霉果糖基转移酶基因在大肠杆菌中的表达。在转糖基实验中,对重组果糖基转移酶的酶活检测检测,重组大肠杆菌果糖基转移酶活性可以达到 59.0 U/g,后期将对果糖基转移酶酶活的特性作进一步的研究。

参考文献

- [1] Tita Ritsema, Jeanine Joling Sjeff Smeekens. Patterns of fructan synthesized by onion fructan: fructan 6G-fructosyltransferase expressed in tobacco BY2 cells is fructan: fructan 1-fructosyltransferase needed in onion [J]. *New Phytologist*, 2003, 160: 61-67
- [2] 李玉,路福平,王正祥.功能性低聚糖合成中糖基转移酶研究进展[J].*食品科学*,2013,34(9):358-363
LI Yu, LU Fu-ping, WANG Zheng-xiang. Recent advance in research and application of several glycosyltransferases in the synthesis of functional oligosaccharides [J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 358-363
- [3] 陈藉南.双歧杆菌的生理功效及应用研究进展[J].*科技创新导报*,2010,11:2-3
CHEN Xiang-nan. The research progress on application and physiological functions of bifidobacterium [J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2010, 11: 2-3
- [4] M L Velazquez-Hernandez, V M Baizabal-Aguirre, A Bravo-Patino, et al. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106: 1763-1778
- [5] Masaki Fujishima, Hideki Sakai, Keiji Ueno, et al. Purification and characterization of a fructosyltransferase from onion bulbs and its key role in the synthesis of fructo-oligosaccharides *in vivo* [J]. *New Phytologist*, *New Phytologist*, 2005, 165: 513-524
- [6] 毛多斌,王雪.果糖基转移酶及低聚果糖生产研究进展[J].*广东化工*,2009,4(36):100-102
MAO Duo-bin, WANG Xue. The research progress on β-fructosyltransferase and synthesis of fructo-oligosaccharides [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2009, 4, 36: 100-102
- [7] 陈利平,韩亚伟,毛多斌,等.枯草芽胞杆菌果糖基转移酶基因的克隆及其序列分析[J].*河南农业大学学报*,2009,4(43): 432-436
CHEN Li-ping, HAN Ya-wei, MAO Duo-bin, et al. Cloning and analysis of fructosyltransferase gene from bacillus subtilis [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2009, 4(43): 432-436
- [8] 唐博,崔子寅,王艺萌,等.在大肠杆菌中高效表达具有抗病毒活性的可溶性犬α7干扰素[J].*中国预防兽医学报*,2013,4(35): 321-324
TANG Bo, CUI Zi-ying, WANG Yi-meng, et al. High level expression of recombinant canine interferon-alpha-7 with the antiviral activity in escherichia coli [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 4(35): 321-324
- [9] Vinay V Vyas, Dominic Esposito, Terry L Sumpter, et al. Clinical manufacturing of recombinant human interleukin15.iproduction cell line development and protein expression in *E.coli* with stop codon optimization [J]. *Biotechnology Progress*,2012, 28(2): 497-507
- [10] Paolo Montanari, Giuseppe Bozza, Barbara Capecchi, et al. Human heat shock protein (Hsp) 90 interferes with neisseria meningitidis adhesin A (NadA)-mediated adhesion and invasion [J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(3): 368-385
- [11] Catriona Donovan, Boris Sieger, Reinhard Krämer, et al. A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in ctnobacteria [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(1): 105-116
- [12] 何小妮,蒋波,王玉海,等.非对称灭活双亲原生质体融合法选育产果糖基转移酶的米曲霉新菌株的研究[J].*现代食品科技*,2013,29(5):993-997
HE Xiao-ni, JIANG Bo, WANG Yu-hai, et al. Breeding

- of a new *Aspergillus oryzae* strain for fructosyl-transferase production by protoplast fusion of asymmetric inactivated parents [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(5): 993-997
- [13] Matha V Radchenko, Rungaroon Waditee, Sawako Oshimi, et al. Cloning, functional expression and primary characterization of vibriolysin K^+/H^+ antiporter genes in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 651-663
- [14] 柯野,陈丹,李家洲,等.米曲霉碱性蛋白酶基因的克隆表达及水解特性[J].华南理工大学学报,2008,8(40):88-94
- KE Ye, CHEN Dan, LI Jia-zhou, et al. Expression and hydrolysis characteristics of *Aspergillus oryzae* alkaline protease [J]. *Journal of South China University of Technology*, 2008, 8(40): 88-94

现代食品科技