

体外多酶级联反应体系高效合成莱鲍迪苷 M

刘思颖, 王斌, 潘力*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 为建立体外多酶级联反应体系高效合成莱鲍迪苷 M (Rebaudioside M, RM), 该文分别构建了含有甜叶菊来源的糖基转移酶 UGT76G1 和水稻来源的糖基转移酶 EUGT11 以及拟南芥来源的蔗糖合成酶 SUS1 的重组大肠杆菌, 将甜叶菊经一锅法催化合成 RM。为提升该体系中限速酶 EUGT11 的酶活, 从而提升整个体外多酶级联反应体系的 RM 产量, 本文将该酶表达质粒的 T7 启动子核心区域串联, 并比较一重、二重、三重和四重启动子启动转录时该酶活性, 当三重启动子启动转录时, 重组酶 EUGT11 的酶活力最高, 是一重启动子启动转录时的 2.13 倍, 在酶活力配比为 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3 copies of T7=1:2:6.39 的体外多酶级联反应体系中, RM 产量为 3.79 mmol/L, 较酶活力配比为 SUS1:UGT76G1:EUGT11=1:2:3 的体外多酶级联反应体系中, RM 的产量提升了 2.35 倍。该文成功建立了高效合成 RM 的体外多酶级联反应体系, 为此后工业化酶法合成 RM 提供理论和数据支持。

关键词: 甜菊糖苷; 莱鲍迪苷 M; 糖基转移酶 EUGT11; 多重启动子; 体外多酶级联反应体系

文章编号: 1673-9078(2021)11-175-184

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0241

A Multiple-enzyme Cascade Reaction Strategy *in Vitro* for Efficient Synthesis of Rebaudioside M

LIU Siying, WANG Bin, PAN Li*

(School of Biology and Biological Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To efficiently synthesize rebaudioside M (RM) by multiple-enzyme cascade reaction method, a recombinant *E. coli* containing UDP-glucosyltransferase UGT76G1 from *Stevia rebaudiana*, UDP-glucosyltransferase EUGT11 from *Oryza sativa*, and the sucrose synthase SUS1 from *Arabidopsis thaliana* was constructed respectively. To improve the catalytic efficiency of the rate-limiting enzyme, here, the EUGT11 single-promoter expression plasmid was modified by using multiple-promoter. When the triple-promoter initiated transcription, the enzyme activity of the recombinase EUGT11 was the highest, which was 2.13 times than that of single-promoter. When it participated in the *in vitro* multiple-enzyme cascade reaction system, under the condition that the enzyme ratio was SUS1: UGT76G1: EUGT11/3 copies of T7=1: 2: 6.39, the yield of RM was 3.79 mmol/L, which was 2.35 times higher than before. The *in vitro* multiple-enzyme cascade reaction system for the efficient synthesis of RM was successfully established. In summary, this study improved the strategy of enzymatic synthesis of RM and provided theoretical data support for industrial production.

Key words: stevioside; rebaudioside M; UDP-glucosyltransferase EUGT11; mutiple-promoter; multiple-enzyme cascade reactionsystem

引文格式:

刘思颖,王斌,潘力.体外多酶级联反应体系高效合成莱鲍迪苷 M [J].现代食品科技,2021,37(11):175-184

LIU Siying, WANG Bin, PAN Li. A multiple-enzyme cascade reaction strategy *in vitro* for efficient synthesis of rebaudioside M [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 175-184

甜叶菊原产于巴拉圭和巴西, 其叶片中可提取出

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2018B020205002; 2020B020226007); 佛山市核心技术攻关项目 (1920001000824)

作者简介: 刘思颖 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: 137767280@qq.com

通讯作者: 潘力 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物遗传育种,

E-mail: btlipan@scut.edu.cn

一类甜度高且热量低的糖苷类化合物, 几个世纪以来, 一直被南美洲人作为天然甜味剂食用, 包括甜菊苷 (Stevioside, ST)、莱鲍迪苷 A (Rebaudioside A, RA)、莱鲍迪苷 D (Rebaudioside D, RD) 和莱鲍迪苷 (Rebaudioside M, RM)。其中 ST 和 RA 含量较为丰富 (约占叶片干重的 7% 和 3%), 但与 RD 和 RM 相比, 它们的甜度较低, 且随添加量不断增加, 苦涩味逐渐显现, 故应用于食品生产时会影响产品风味^[1]。

RD 和 RM 作为高品质甜味剂, 甜度为蔗糖的 400 倍, 口感更加纯净, 但是含量十分稀少, 仅占叶片干重的 0.3%^[2]。利用传统物理方法从叶片中提纯 RD 和 RM 的产量远远不能满足市场需求, 且生产量少, 工艺繁琐, 成本较高^[3,4]。

甜叶菊来源的糖基转移酶 UGT76G1 可以在糖基供体 UDPG 存在的条件下, 催化两种糖基转移反应: 由 ST 生成 RA^[5], 或由 RD 产生 RM^[6], 而水稻来源的糖基转移酶 EUGT11 则可以利用糖基供体 UDPG, 以 RA 为底物催化生成 RD^[7], 糖基转移酶 UGT76G1 和糖基转移酶 EUGT11 都属于 UDP 糖基转移酶。在以上三个糖基转移反应中, 均需要 UDPG 作为糖基供体, 但 UDPG 价格昂贵, 使甜味剂的生产成本大幅增加。而蔗糖合成酶可利用廉价原料 UDP, 在蔗糖存在的情况下, 将葡萄糖基转移至 UDP, 生成 UDPG 和

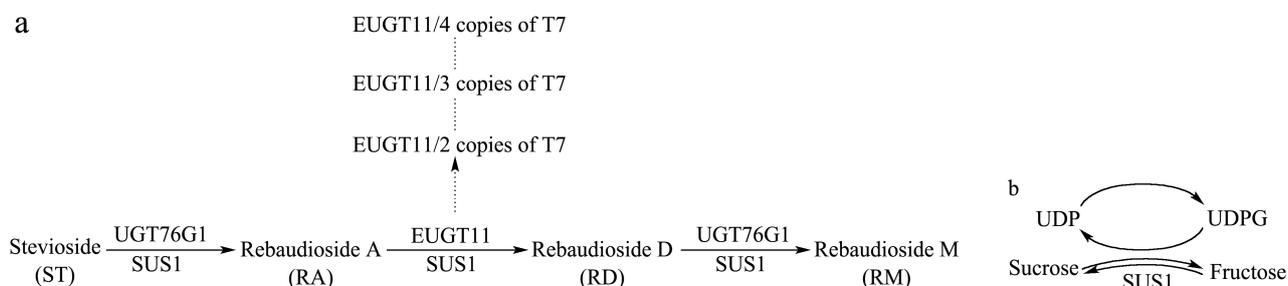


图 1 体外多酶级联反应体系示意图

Fig.1 Process of multiple-enzyme cascade reactionsystem *in vitro*

注: a 为体外多酶级联反应体系总流程图, 其中, EUGT11/2 copies of T7 指二重启动子控制转录时的 EUGT11, EUGT11/3 copies of T7 指三重启动子控制转录时的 EUGT11, EUGT11/4 copies of T7 指四重启动子控制转录时的 EUGT11; b 为 SUS1 介导的 UDP-UDPG 循环反应, 其中 UDPG 指糖基供体尿苷二磷酸葡萄糖, UDP 指尿苷二磷酸。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因、菌株及质粒

E.coli Match1T1 购自 Invirtogen 公司; *E.coli* Rosetta (DE3) 购自 Invirtogen 公司; 通用载体质粒 pET22b 购自 Takara 公司; 大肠杆菌表达质粒 pET22b-UGT76G1、pET22b-EUGT11、pET22b-SUS1、pET22b-EUGT11/2 copies of T7、pET22b-EUGT11/3 copies of T7、pET22b-EUGT11/4 copies of T7 均由本实验室构建。

1.1.2 酶及试剂

Restriction Enzymes FastDigest[®] 购于赛默飞世尔科技公司; PCR 高保真酶 Prime STAR HS (premix) 购自 Takara 公司; 质粒小量提取试剂盒购自广州捷倍斯生物科技有限公司; 酶反应产物纯化试剂盒购自广州捷倍斯生物科技有限公司; UDP (尿苷二磷酸) 及

果糖 (图 1b), 且该过程可逆, 可以实现 UDP-UDPG 的循环反应^[8-11]。当糖基转移反应与 SUS1 介导的 UDP-UDPG 循环反应偶联时, 不需要添加昂贵底物 UDPG, 各糖基转移反应也能正常进行。

由于新型甜味剂 RM 更加符合人们对食物品质的追求, 但目前关于体外一锅法高效合成 RM 的论文报道较少。本文将 UGT76G1, EUGT11 和 SUS1 分别于大肠杆菌中重组表达, 利用其破碎得到的粗酶液建立多酶级联反应体系, 即将三个单级联反应串联, 在体外形成通路, 由廉价原料 ST 经一锅法合成 RM (图 1a, 1b)。并通过提高该通路中限速酶 EUGT11 酶活, 将终产物 RM 产量提升, 该方法避免直接用昂贵的 RD 作为合成 RM 的底物, 为低成本高效酶法合成 RM 提供技术支持。

UDPG (尿苷二磷酸葡萄糖) 均购自上海源叶公司; 氨苄青霉素 Amp 及异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 均购自北京普博欣生物科技有限公司; ST、RA、RD 及 RM 底物及标准品均由曲阜海根甜菊制品有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因序列合成及扩增

甜叶菊来源的糖基转移酶 UGT76G1, 水稻来源的糖基转移酶 EUGT11 及拟南芥来源的蔗糖合成酶 SUS1 的基因序列均由南京金斯瑞公司优化合成, 并分别克隆至载体 pUC57, 得到 pUC57-UGT76G1、pUC57-EUGT11 和 pUC57-SUS1 三个质粒。

1.2.2 表达载体构建

1.2.2.1 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 的单启动子表达载体构建

以质粒 pUC57-UGT76G1、pUC57-EUGT11 和 pUC57-SUS1 为模板, 分别用引物 UGT76G1-F 和

UGT76G1-R、EUGT11-F 和 EUGT11-R、SUS1-F 和 SUS1-R (表 1), 将目的片段扩增, 将大小正确的 PCR 产物并回收备用。用 *Xho* I 和 *Nde* I 酶切载体 pET22b 并纯化, 将纯化后的载体分别和目的基因片段连接。将 10 μL 连接产物分别转化至 *E. coli* Match1T1, 涂布

于含有氨苄霉素的 LB 平板。挑取阳性转化子扩大培养后提质粒, 经酶切验证正确后, 送至广州天一辉远基因科技有限公司测序, 得到测序正确的质粒 pET22b-UGT76G1、pET22b-EUGT11 及 pET22b-SUS1, 并将对应菌株于甘油中低温保藏。

表 1 用于载体构建的寡核苷酸序列

Table 1 Sequences of oligonucleotides for plasmids construction

引物名称	序列 (5'→3')
pET22b-F	<u>Tgtgagcggataacaattccataat</u> ttgttaacttaagaaggag
pET22b-R	<u>Agtagctgtattaatttcgttcg</u> cgctgggatggtggc
UGT76G1-F	<u>Ttaagaaggagatatacatatg</u> gagaataagacagaaacaccgt
UGT76G1-R	<u>Gctttgttagcagccgatctca</u> gagcactaatgtaagaacca
SUS1-F	<u>Ttaagaaggagatatacatatg</u> ccaacgctgagcgcgatgac
SUS1-R	<u>Gctttgttagcagccgatctca</u> atcgtcttggcgagagga
EUGT11-F	<u>Ttaagaaggagatatacatatg</u> gactccggttacagctc
EUGT11-R	<u>Gctttgttagcagccgatctca</u> gtcttttagctccgcagttg
2 copies of T7-F	Taatacagctactatagtaatacagctactataggggaatt <u>gtgagcggataacaattc</u>
2 copies of T7-R	Cctatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattaatttcg
3 copies of T7-F	taatacagctactatagtaatacagctactataggaatacagctactataggggaatt <u>gtgagcggataacaattc</u>
3copies of T7-R	cctatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattaatttcg
4 copies of T7-F	taatacagctactatagtaatacagctactataggaatacagctactataggaatacagctactataggggaatt <u>gtgagcggataacaattc</u>
4 copies of T7-R	cctatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattacatagtgagtcgtattaatttcg

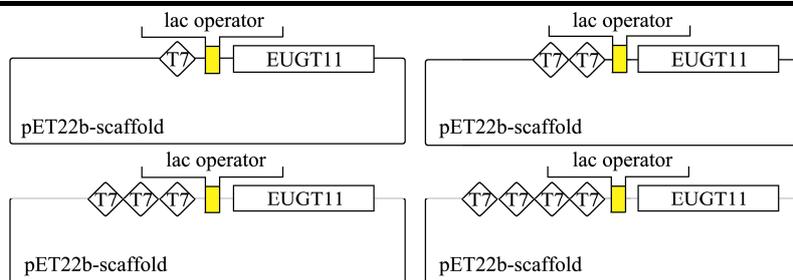


图 2 糖基转移酶 EUGT11 表达载体

Fig.2 Plasmids used for expression of UDP-glucosyltransferase EUGT11

1.2.2.2 EUGT11 多重启动子表达载体构建

以质粒 pET22b-EUGT11 为模板, 用 pET22b-F 和 pET22b-R 扩增得到含有和目的基因 EUGT11 的 pET22b 载体骨架的大片段, 命名为 pET22b-scaffold-EUGT11, 胶回收备用。将 2 copies of T7-F 和 2 copies of T7-R(表 1)两条寡核苷酸链在 98 °C 条件下变性 5 min, 自然降至室温完成退火, 形成双启动子双链片段, 命名为 2 copies of T7, 回收该片段备用。将另外两对寡核苷酸链 3 copies of T7-F 和 3 copies of T7-R、4 copies of T7-F 和 4copies of T7-R (表 1) 也进行如上操作, 分别退火形成三重启动子和四重启动子双链片段, 分别命名为 3 copies of T7 和 4 copies of T7。将双链片段 2 copies of T7、3 copies of T7 和 4 copies of T7 分别与 pET22b-scaffold-EUGT11 连接, 转

化至大肠杆菌 *E. coli* Match1T1。经带有氨苄霉素的抗性平板初步筛选阳性转化子, 将鉴定正确的转化子送至广州天一辉远基因科技有限公司测序。得到含有双重、三重、四重启动子的 EUGT11 表达质粒, 分别命名为 pET22b-EUGT11/2 copies of T7、pET22b-EUGT11/3 copies of T7 和 pET22b-EUGT11/4 copies of T7 (图 2)。

1.2.3 大肠杆菌诱导表达

将质粒 pET22b-UGT76G1、pET22b-EUGT11、pET22b-SUS1、pET22b-EUGT11/2 copies of T7、pET22b-EUGT11/3 copies of T7 和 pET22b-EUGT11/4 copies of T7 分别转化至 Rosetta (DE3), 经氨苄霉素抗性 LB 平板筛选阳性转化子, 分别命名为 Rosetta-UGT76G1、Rosetta-EUGT11、Rosetta-SUS1、

Rosetta-EUGT11/2 copies of T7、Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 和 Rosetta-EUGT11/4 copies of T7。将以上重组大肠杆菌分别于液体 LB 中培养 8 h，以 1%接种量转接于 100 mL 新鲜 LB 液体培养基，待菌体生长至 $OD_{600}=0.7$ 左右，向其中添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至工作浓度为 0.5 mmol/L，并在 20 °C，200 r/min 条件下低温诱导培养。诱导 20 h 后，以 4 °C，8000 r/min 离心收集菌体，30 mL 超纯水洗涤两次，最后用 10 mL 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液重悬菌体，冰浴超声破碎 30 min，离心取上清液得到粗酶液，用于后续 BCA 法蛋白浓度测定及酶活测定。

1.2.4 酶活测定

1.2.4.1 酶活测定体系

糖基转移酶 UGT76G1 酶活测定体系：将 Rosetta-UGT76G1 破碎后得到的粗酶液与反应体系混合，总体积为 200 μ L。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、1 mmol/L ST 或 1 mmol/L RD、2 mmol/L UDPG、3 mmol/L $MgCl_2$ ，粗酶液中的总蛋白量为 2 mg。反应 30 min 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 UDP、UDPG 进行定性定量分析。

糖基转移酶 EUGT11 酶活测定体系：将 Rosetta-EUGT11 破碎后得到的粗酶液与反应体系混合，总体积为 200 μ L。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、1 mmol/L RA、2 mmol/L UDPG、3 mmol/L $MgCl_2$ ，粗酶液中的总蛋白量为 2 mg。反应 30 min 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 UDP、UDPG 进行定性定量分析。

蔗糖合成酶 SUS1 酶活测定体系：将 Rosetta-SUS1 破碎后得到的粗酶液与反应体系混合，总体积为 200 μ L。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、700 mmol/L 蔗糖、2 mmol/L UDP、3 mmol/L $MgCl_2$ ，粗酶液中的总蛋白量为 2 mg。反应 30 min 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 UDP、UDPG 进行定性定量分析。

1.2.4.2 酶活计算公式

酶活力单位定义为：各酶在相应反应条件下，每 1 min 生成 1 mmol/L UDPG 或 UDP 所需酶量。

$$\text{酶活} / (U/g) = \frac{C \times N \times V}{T \times m}$$

式中：

C ——通过标准曲线计算出的 UDP、UDPG 浓度，mmol/L；

N ——稀释倍数；

V ——反应体系体积，L；

T ——反应时间，min；

m ——反应体系中的蛋白含量，g。

1.2.5 重组酶 UGT76G1 和 EUGT11 对糖苷类底物转化率测定

重组酶 UGT76G1 对底物转化率测定体系：将 Rosetta-UGT76G1 破碎后得到的粗酶液与反应体系混合，总体积为 200 μ L。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、1 mmol/L ST 或 1 mmol/L RD、2 mmol/L UDPG、3 mmol/L $MgCl_2$ ，加入粗酶液的量为 10 mU。反应 24 h 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 ST、RA 或 RD、RM 进行定性定量分析，并计算 ST 或 RD 的转化率。

重组酶 EUGT11 对底物转化率测定体系：将 Rosetta-EUGT11 破碎后得到的粗酶液与反应体系混合，总体积为 200 μ L。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、1 mmol/L RA、2 mmol/L UDPG、3 mmol/L $MgCl_2$ ，加入粗酶液的量为 10 mU。反应 24 h 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 RA、RD 进行定性定量分析，并计算 RA 的转化率。

1.2.6 体外单级联体系和体外多级联体系产物测定

1.2.6.1 重组酶 UGT76G1 和 SUS1 参与的体外单级联体系中 ST 转化率测定

按照 1.2.3 的方法破碎获得 Rosetta-UGT76G1 和 Rosetta-SUS1 的粗酶液，控制体系中 SUS1 酶量为 10 mU，UGT76G1 酶量分别为 10 mU、20 mU、30 mU，使得反应体系中双酶酶量比例为 1:1、1:2、1:3。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、700 mmol/L 蔗糖、1 mmol/L ST、2 mmol/L UDP、3 mmol/L $MgCl_2$ ，补加蒸馏水至 200 μ L。反应 24 h 后，95 °C 加热 5 min 使酶失活，超纯水稀释 10 倍，0.22 μ m 滤膜过滤后，经 HPLC 对 ST、RA 进行定性定量分析，并计算 ST 转化率。

1.2.6.2 重组酶 EUGT11 和 SUS1 参与的体外单级联体系中 RA 转化率测定

按照 1.2.3 的方法破碎获得 Rosetta-EUGT11 和 Rosetta-SUS1 的粗酶液，控制粗酶液的用量，使反应体系中 SUS1 酶活力为 10 mU（换算成总蛋白质量为 0.16 mg），EUGT11 酶活力分别为 10 mU、20 mU、30 mU（换算成蛋白质量分别为 1.96 mg、3.93 mg、5.9 mg），使得反应体系中双酶酶活力比例为 1:1、1:2、1:3（换算成蛋白质量比为 1:12.3、1:24.6、

1:36.9)。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、700 mmol/L 蔗糖、1 mmol/L RA、2 mmol/L UDP、3 mmol/L MgCl₂, 补加蒸馏水至 200 μL。反应 24 h 后, 95 °C 加热 5 min 使酶失活, 超纯水稀释 10 倍, 0.22 μm 滤膜过滤后, 经 HPLC 对 RA、RD 进行定性定量分析, 并计算各酶量配比下的 RA 转化率。

破碎 Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 得到的粗酶液也加入到同样体系反应, Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 的粗酶液的用量为: 保证反应体系中所含该粗酶液的蛋白质量与 Rosetta-EUGT11 粗酶液酶活力为 10 mU、20 mU、30 mU 时对应的蛋白质量一致, 即分别为 1.96 mg、3.93 mg、5.9 mg, 具体为: 使反应体系中 SUS1 酶活力为 10 mU (换算成总蛋白质量为 0.16 mg), Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 酶活力分别为 21.3 mU、42.6 mU、63.9 mU, 使得反应体系中双酶酶活力比例为 1:2.13、1:4.26、1:6.39。反应 24 h 后, 95 °C 加热 5 min 使酶失活, 超纯水稀释 10 倍, 0.22 μm 滤膜过滤后, 经 HPLC 对 RA、RD 进行定性定量分析, 并计算各酶量配比下的 RA 转化率。

1.2.6.3 重组酶 UGT76G1 和 SUS1 参与的体外单级联体系中 RD 转化率测定

按照 1.2.3 的方法破碎获得 Rosetta-EUGT11 和 Rosetta-SUS1 的粗酶液, 控制体系中 SUS1 酶量为 10 mU, UGT76G1 酶量分别为 10 mU、20 mU、30 mU, 使得反应体系中双酶酶量比例为 1:1、1:2、1:3。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液、700 mmol/L 蔗糖、1 mmol/L RD、2 mmol/L UDP、3 mmol/L MgCl₂, 补加蒸馏水至 200 μL。反应 24 h 后, 95 °C 加热 5 min 使酶失活, 超纯水稀释 10 倍, 0.22 μm 滤膜过滤后, 经 HPLC 对 RD、RM 进行定性定量分析, 并计算 RD 转化率。

1.2.6.4 重组酶 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 参与的体外多酶级联体系产物测定

按照 1.2.3 的方法破碎获得 Rosetta-SUS1, Rosetta-UGT76G1 和 Rosetta-EUGT11 的粗酶液, 以酶活力比例为 1:2:3 加入反应体系中, 即各酶酶活力分别为 10 mU、20 mU、30 mU。其中各组份及终浓度为 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)、700 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L ST、20 mmol/L UDP、3 mmol/L MgCl₂, 补加蒸馏水至 200 μL。反应 48 h 后, 95 °C 加热 5 min 使酶失活, 超纯水稀释 10 倍, 0.22 μm 滤膜过滤后, 经 HPLC 分析对 ST、RA、RD、RM 进行定性定量分析。破碎 Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 得到的粗酶液也按照同样体系反应, Rosetta-EUGT11/3 copies of T7

的粗酶液的用量为: 保证反应体系中所含该粗酶液的蛋白质量与 Rosetta-EUGT11 粗酶液酶活力为 30 mU 对应的蛋白质量一致, 即为 5.9 mg。

1.2.6.5 底物转化率计算公式

$$\text{转化率} / \% = \frac{S_{t1} - S_{t0}}{S_{t1}} \times 100\%$$

式中:

S_{t0} —反应结束时底物浓度, mmol/L;

S_{t1} —反应开始时底物浓度, mmol/L。

1.2.7 HPLC 分析条件

HPLC 分析 RA、ST、RM、RD 条件: Agilent 1220 Infinity 梯度液相色谱系统, Phenomenex Luna 5μ C18 柱, 流动相为 A (1.5 g/L 磷酸二氢钠缓冲液):B (乙腈)=68:32, 采用等度洗脱, 进样量 10 μL, 检测波长 210 nm。ST、RA、RD、RM 标准品经以上条件分析后, 得到外标法分析所用的标准曲线。

HPLC 分析 UDP、UDPG 条件: Agilent 1220 Infinity 梯度液相色谱系统, Phenomenex Luna 5μ C18 柱, 流动相为 A (200 mmol/L 磷酸盐缓冲液): B (1.62 g/L 四丁基溴化铵水溶液)=1:1, 采用等度洗脱, 进样量 10 μL, 检测波长 262 nm。UDPG、UDP 标准品经以上条件分析后, 得到外标法分析所用的标准曲线。

1.2.8 数据处理

每个重组大肠杆菌重复发酵三次, 每个蛋白浓度测定体系、酶活测定体系以及级联反应体系均设置三个平行, 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 重组酶 UGT76G1、EUGT11、SUS1 的表

达研究

2.1.1 重组酶 UGT76G1、EUGT11、SUS1 表达载体构建

为了构建重组酶 UGT76G1、EUGT11、SUS1 表达载体, 将目的基因 *UGT76G1*、*EUGT11*、*SUS1* 分别与线性化的 pET22b 载体连接, 并对表达载体 pET22b-*UGT76G1*、pET22b-*EUGT11* 及 pET22b-*SUS1* 进行琼脂糖凝胶电泳及酶切鉴定。质粒的琼脂糖凝胶电泳出现大小为 6717 bp、6747 bp、7767 bp 的条带(图 3), 与各质粒大小一致。用 *Xba* I 和 *Nde* I 对质粒 pET22b-*UGT76G1* 双酶切鉴定, 用 *Xba* I 和 *Cla* I 对质粒 pET22b-*EUGT11* 双酶切鉴定, 释放出的片段大小分别为 5303 bp 和 1414 bp、5357 bp 和 1390 bp, 条

带大小正确;用 *Xba* I 对质粒 pET22b-*SUS1* 单酶切鉴定,得到大小为 7767 bp 的单一一条带,大小正确(图 3)。由于质粒 pET22b-*EUGT11/2* copies of T7、pET22b-*EUGT11/3* copies of T7 和 pET22b-*EUGT11/4* copies of T7 大小差距不大,只能依靠测序手段鉴定是否有相应个数的启动子与载体连接,正确连接的载体如图 2。

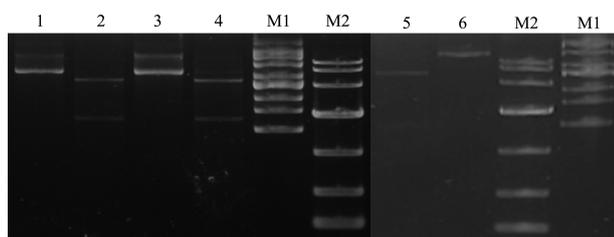


图 3 质粒 pET22b-*UGT76G1*、pET22b-*EUGT11*、pET22b-*SUS1* 及酶切鉴定电泳图

Fig.3 Electropherogram of pET22b-*UGT76G1*, pET22b-*EUGT11*, pET22b-*SUS1* and their restriction enzymedigestion

注: 1、3、6 泳道分别为质粒 pET22b-*UGT76G1*、pET22b-*EUGT11*、pET22b-*SUS1* 的电泳条带; 2、4、5 泳道分别为以上质粒对应酶切鉴定结果; M1 为 Takara DNA Marker Supercoiled Ladder; M2 为 Takara DNA Marker DL10000。

2.1.2 重组酶 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 表达活性研究

分别对重组菌 Rosetta-UGT76G1、Rosetta-EUGT11、Rosetta-SUS1 破碎后得到的粗酶液进行酶活测定,以探究重组酶 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 在大肠杆菌胞内表达情况。糖基转移酶 UGT76G1、EUGT11 催化 UDPG 转化为 UDP,故按照反应生成 UDP 的量计算酶活;SUS1 催化 UDP 转化为 UDPG,按照反应生成 UDPG 的量计算酶活。结果如表 2,UGT76G1(ST)、UGT76G1(RD)、EUGT11、SUS1 酶活分别为 31.35、19.27、5.09、65.34 U/g,宿主 Rosetta (DE3) 粗酶液基本无活性,表明重组酶 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 均已在大肠杆菌胞内成功表达。

其中,重组酶 UGT76G1 催化不同糖基转移反应时,UDPG 转化率差异较大(表 2,图 4c、4d),催化 ST 转化为 RA 的酶活为催化 RD 转化为 RM 酶活的 1.63 倍,可能是 ST 的分子构型相较于 RD 更易进入该酶的催化口袋而更快的触发糖基转移反应^[12],此时该酶对于糖基供体 UDPG 的葡萄糖基移除速率也更快,表现为该酶催化 ST 转化为 RA 时也有更高的 UDPG 转化率。重组酶 EUGT11 的酶活最低,反应结束只有少量 UDP 产生(图 4e),可初步认为在体外多酶级联催化体系中,EUGT11 是该体系的限速酶。重

组酶 SUS1 的 UDP 转化率最高,反应结束后 UDP 几乎完全转化为 UDPG(图 4b),较高的酶活使得该酶能在体外多酶级联反应体系中为糖基转移反应提供足量糖基供体 UDPG。

表 2 重组大肠杆菌粗酶液酶活测定

Table 2 Enzyme activity of crude lysates	
Enzyme	Specific activity/(U/g)
UGT76G1 (RD)	19.27±0.57
UGT76G1 (ST)	31.35±0.54
EUGT11	5.09±0.14
SUS1	65.34±1.67
Rosetta-control	0.09±0.01

注: UGT76G1 (RD) 和 UGT76G1 (ST) 表示 UGT76G1 分别以 RD 和以 ST 为底物进行催化。Rosetta-control 为 Rosetta (DE3) 宿主破碎得到的粗酶液在同样条件下进行催化。

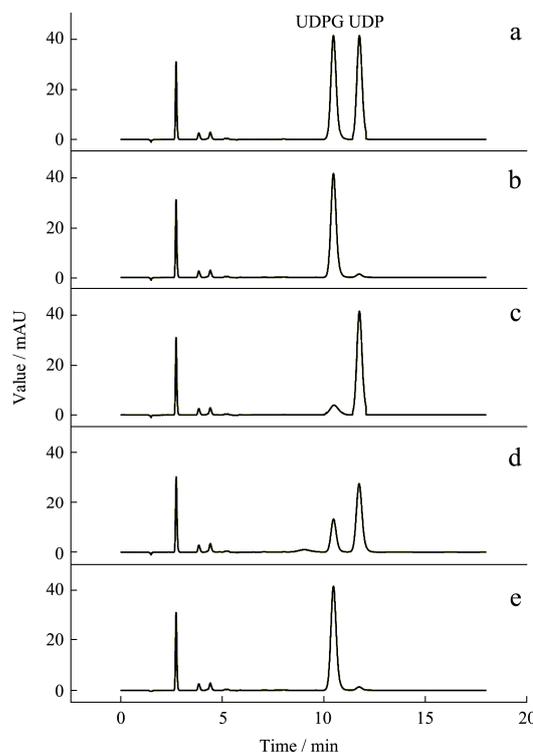


图 4 UDP、UDPG 的 HPLC 分析

Fig.4 HPLC analysis of UDP, UDPG

注: 图中 a 为 UDP、UDPG 标品 HPLC 曲线,UDPG 出峰时间为 10.46 min,UDP 出峰时间为 11.75 min; b 为 Rosetta-SUS1 粗酶液酶活测定的 HPLC 曲线; c 为 Rosetta-UGT76G1 (ST) 粗酶液酶活测定的 HPLC 曲线; d 为 Rosetta-UGT76G1 (RD) 粗酶液酶活测定的 HPLC 曲线; e 为 Rosetta-EUGT11 粗酶液酶活测定的 HPLC 曲线。

2.2 重组酶 UGT76G1 和 EUGT11 对糖苷类底物转化率研究

表3 重组酶 UGT76G1 和 EUGT11 粗酶液对底物的转化率测定

Table 3 Conversion rate of different substrates of UGT76G1 and

EUGT11 crude lysates	
Enzyme	Conversion rate of substrate/%
UGT76G1 (ST)	98.92±0.79
UGT76G1 (RD)	57.49±1.01
EUGT11	13.25±0.96

注: UGT76G1 (RD) 和 UGT76G1 (ST) 表示 UGT76G1 分别以 RD 和以 ST 为底物进行催化。

为了确定体外多酶级联反应体系中的限速酶, 比较了在相同酶量下糖基转移酶 UGT76G1 对 ST 和 RD 转化率以及 EUGT11 对 RA 的转化率。结果如表 3, Rosetta-UGT76G1 粗酶液对 ST 的转化率为 98.92%, 对 RD 的转化率为 57.49%, Rosetta-EUGT11 粗酶液对 RA 的转化率仅为 13.25%。由此可知, 重组酶 UGT76G1 几乎可以将 ST 完全转化为 RA, 保证多酶级联反应体系第一步反应的催化效率。重组酶 EUGT11 对 RA 的转化率较低, 导致 RD 产量低, 不能为 RM 的合成提供足量的前体, 故该步骤应为体外多酶级联反应体系中的限速步骤。

2.3 在不同串联个数启动子操控下表达的重组酶 EUGT11 酶活比较

启动子是转录调控的起始位点, 启动子与 RNA 聚合酶结合并起始转录, 该过程直接影响到下游基因的转录水平。理论上多拷贝的启动子可以增加 DNA 分子与聚合酶的作用的机率, 即可以通过增加启动子拷贝数, 提高下游基因的转录效率, 从而增加目的基因表达量而提高酶活力^[13]。王俊妹^[14]在大肠杆菌中, 通过将化学合成五个重复 *trc* 启动子核心区与载体连接, 并以绿色荧光蛋白和半乳糖苷酶作为信号分子监测启动子的启动强度, 证明其启动强度是单拷贝启动子强度的 3.47 倍, 该结果为本实验在提高限速酶酶活方面提供了基本思路。为提升限速酶 EUGT11 活性, 从而提升体外多酶级联反应体系的整体催化效率, 本文将该酶表达质粒的 T7 启动子核心区域串联, 分别构建含有一重、二重、三重和四重启动子的 EUGT11 表达质粒的重组大肠杆菌, 并测定酶活, 结果如表 4, 在相同反应条件下, 重组酶 EUGT11、EUGT11/2 copies of T7、EUGT11/3 copies of T7、EUGT11/4 copies of T7 酶活分别为 5.09、0.29、10.84、9.21 U/g。相比单启动子控制下表达的重组酶 EUGT11, 三重启动子将酶活提升 2.13 倍。四重启动子也使得酶活提升 1.81 倍, 而二重启动

子使得该酶的表达量大幅下降, 酶活仅为 0.29 U/g。

表4 不同串联个数启动子操控下表达的 EUGT11 酶活

Table 4 Comparison of enzyme activity of EUGT11 with different number of promoters

Enzyme	Specific activity/(U/g)
EUGT11	5.09±0.14
EUGT11/2 copies of T7	0.29±0.02
EUGT11/3 copies of T7	10.84±0.05
EUGT11/4 copies of T7	9.21±0.62
Rosetta-control	0.09±0.01

注: Rosetta-control 为 Rosetta (DE3) 宿主破碎得到的粗酶液在同样条件下进行催化。

2.4 体外各单级联反应最佳酶量配比探究

为便于确定体外多酶级联反应体系的酶量配比, 先对各单级联反应的最佳酶量配比进行探究。本文控制重组酶 SUS1 与重组酶 UGT76G1 的单酶级联反应中的酶活力配比为 1:1、1:2、1:3。由于多重启动子中, 三重启动子对重组酶 EUGT11 酶活提升效果最佳, 故选择重组菌 Rosetta-EUGT11/3 copies of T7 破碎液进行以 RA 为底物的单酶级联反应最佳酶量配比探究, 并以重组菌 Rosetta-EUGT11 破碎液做为对照, 本文控制重组酶 SUS1 与重组酶 EUGT11 或重组酶 EUGT11/3 copies of T7 的单酶级联反应中蛋白质质量配比为 1:2.3、1:24.6、1:36.9。比较三种酶活力或蛋白质质量配比下各糖基转移酶对底物的转化率, 转化率最高时的酶活力或蛋白质质量配比为该单级联反应的最佳酶活力或蛋白质质量配比, 结果如图 5。

重组酶 EUGT11 和 EUGT11/3 copies of T7 催化 RA 转化为 RD 的单级联反应情况如图 5a 和 5b, SUS1 与 EUGT11 的酶活力配比为 1:1、1:2、1:3 时, RA 的转化率分别为 19.07%、29.10%、36.56%; SUS1 与 EUGT11/3 copies of T7 的酶活力配比为 1:2.13、1:4.26、1:6.39 时, RA 的转化率分别为 25.68%、63.60%、79.75%。由此可知, 单启动子控制下的 EUGT11 和三重启动子控制下的 EUGT11 在酶量配比为 1:3 和 1:6.39 时 (即蛋白质质量配比均为 1:36.9 时) 出现 RA 最高转化率, 且后者最高转化率为前者的 2.18 倍。

重组酶 UGT76G1 催化 ST 转化为 RA 的单级联反应结果如图 5c, SUS1 与 UGT76G1 的酶量配比为 1:1、1:2、1:3 时, ST 转化率分别为 89.17%、95.28%、87.89%。当酶量配比为 1:2 时, ST 转化率最高, 再增加糖基转移酶的量至酶量配比为 1:3 时, 产物 RA 转化率略有降低。

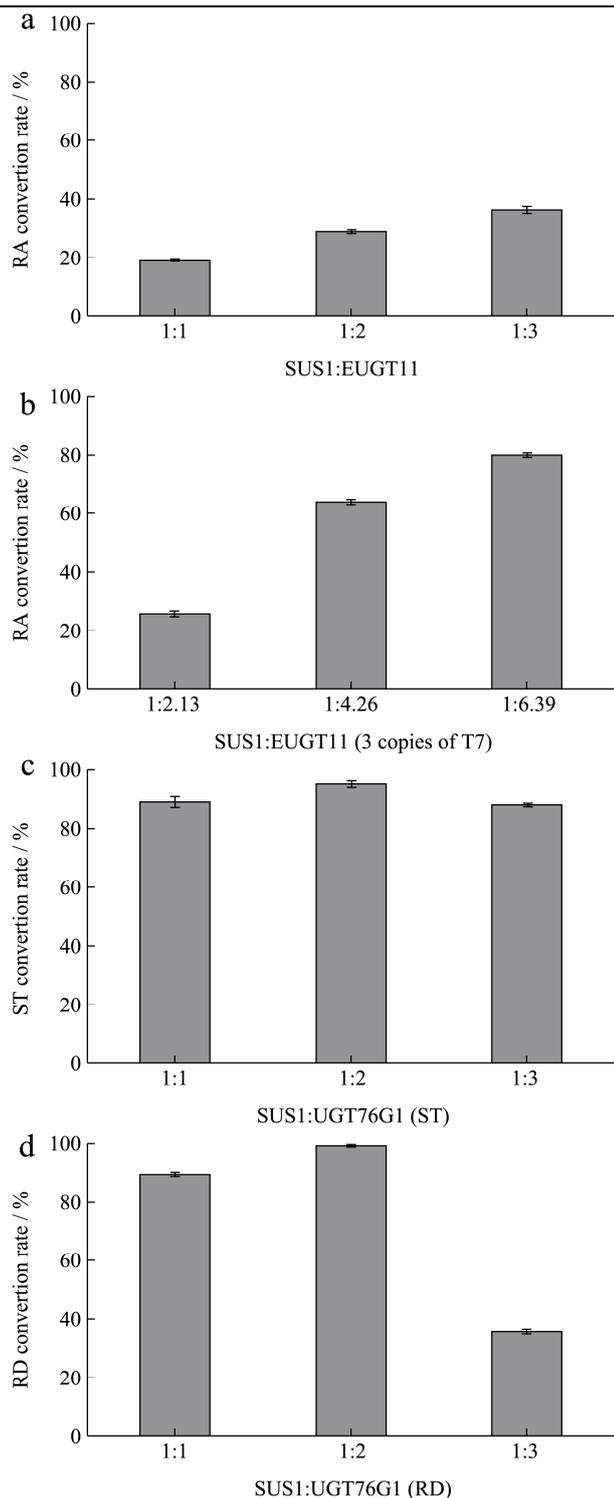


图5 单级联反应中 SUS1 和 UDP 糖基转移酶不同酶量配对应的底物转化率

Fig.5 Substrate conversion rate with different ratios of SUS1 and UDP-glucosyltransferase in cascade reaction

注: UGT76G1 (RD) 和 UGT76G1 (ST) 表示 UGT76G1 分别以 RD 和以 ST 为底物进行催化, EUGT11 表示单启动子启动转录的 EUGT11, EUGT11/3copies of T7 表示三重启动子启动转录的 EUGT11。

重组酶 UGT76G1 催化 RD 转化为 RM 的单级联

反应结果如图 5d, SUS1 与 UGT76G1 的酶量配比为 1:1、1:2、1:3 时, RD 转化率分别为 89.57%、99.26%、35.92%。当酶量配比为 1:2 时 RD 转化率最高, 再增加 UGT76G1 至酶量配比为 1:3 时 RD 转化率大幅降低。可能由于酶量配比为 1:2 时, 该级联反应中 SUS1 的糖基供体 UDPG 供应速度与 UGT76G1 转糖基速度达到最优平衡, 若再增加糖基转移酶的量, 使 UDPG 消耗量加大, 在 SUS1 酶量不变的情况下, UDPG 的产生速度跟不上消耗速度, 可能会在一定程度上破坏偶联反应的平衡, 使 RD 的转化率降低。

将每个单酶级联反应体系的最佳酶活力配比综合, 则体外多酶级联反应体系最佳酶活力配比应为 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3 copies of T7=1:2:6.39, 换算成蛋白质量比例为 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3 copies of T7=1:4:36.9。

2.5 三重启动子操控下表达的 EUGT11 对体

外多酶级联反应体系中 RM 产量探究

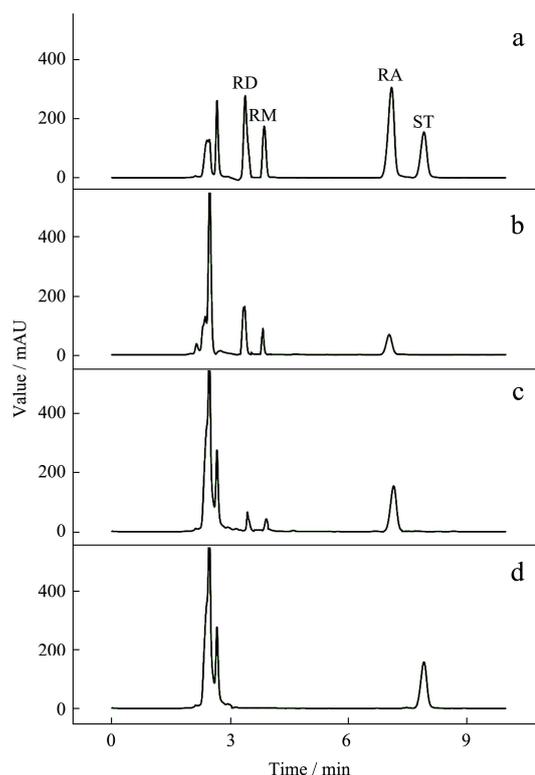


图6 体外多酶级联反应体系 HPLC 产物分析

Fig.6 HPLC analysis of production in different multiple-enzyme cascade reaction *in vitro*

注: 图中 a 为各甜菊醇糖苷样品出峰时间, RD 出峰时间为 3.34 min, RM 出峰时间为 3.93 min, RA 出峰时间为 6.88 min, ST 出峰时间为 7.86 min; b 为酶活力配比为 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3copies of T7=1:2:6.39 下的体外多酶

级联体系反应 48 h 后 HPLC 结果; c 为酶活力配比为 SUS1:UGT76G1:EUGT11=1:2:3 下的体外多酶级联体系反应 48 h 后 HPLC 结果; d 为用大肠杆菌 Rosetta (DE3) 宿主破碎后的粗酶液代替酶反应中的 Rosetta-UGT76G1、Rosetta-EUGT11、Rosetta-SUS1 破碎后的粗酶液进行体外多酶级联体系反应 48 h 后 HPLC 结果。

表 5 不同体外多酶级联反应体系 RA、RD、RM 浓度比较

Table 5 Comparison of concentration of RA, RD and RM in different multiple-enzyme cascade reaction *in vitro*

Enzyme	Steviol glycosides concentration/(mmol/L)		
	RA	RD	RM
EUGT11	7.85±0.14	2.29±0.64	1.61±0.22
EUGT11/3 copies of T7	3.14±0.89	5.76±0.74	3.79±0.31
Control group	0.007±0.001	0.005±0.001	0.006±0.001

注: EUGT11 指 SUS1:UGT76G1:EUGT11=1:2:3 反应体系; EUGT11/3 copies of T7 指 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3copies of T7=1:2:6.39 反应体系; Control group 表示空白体系, 用 Rosetta (DE3) 宿主发酵得到的粗酶液代替各重组菌粗酶液。

为了研究 EUGT11 的表达效率对体外多酶级联反应体系终产物 RM 产量的影响, 将单启动子操控下表达的 EUGT11 参与的反应体系 SUS1:UGT76G1:EUGT11=1:2:3 (对照组) 与三重启动子操控下表达的 EUGT11 参与的反应体系 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3 copies of T7=1:2:6.39 (实验组) 在相同条件下反应 48 h 后, 用 HPLC 对反应后各体系中的 ST、RA、RD、RM 进行定量分析, 结果如图 6 和表 5 所示。反应进行 48 h 后, 在体系 SUS1:UGT76G1:EUGT11=1:2:3 中, 10 mmol/L ST 转化为 7.85 mmol/L RA, 2.29 mmol/L RD 和 1.61 mmol/L RM; 在体系 SUS1:UGT76G1:EUGT11/3 copies of T7=1:2:6.39 中, 10 mmol/L ST 转化为 3.14 mmol/L RA, 5.76 mmol/L RD 和 3.79 mmol/L RM (表 5)。在两个体系中, ST 均完全转化为 RA, 而在三重启动子控制下的 EUGT11 参与的体系中, 由于 RA 转化率提升, 使得 RD 和 RM 产量均高于单启动子控制下的 EUGT11 参与的反应体系 (图 6)。相比单启动子控制下的 EUGT11 参与的反应体系, 三重启动子控制下的 EUGT11 使得反应结束时 RD 产量提升 2.52 倍, RM 产量也随之提升 2.35 倍。

3 讨论

UGT76G1 和 EUGT11 是目前甜菊醇糖苷类物质酶法生产中较常使用的糖基转移酶, 但多数生产方法仅利用单个酶与蔗糖合成酶偶联产生单一种类的糖苷, 且产物大多为 RA 或 RD。朱清娟^[15]利用重组毕

赤酵母制备的粗酶液, 在体外偶联 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶, 将 10 mmol/L ST 转化合成 8.20 mmol/L RA。杨玉凤^[16]利用重组大肠杆菌全细胞催化 1 mmol/L RA 转化为 0.1 mmol/L RD。而本文利用大肠杆菌表达的重组酶 UGT76G1、EUGT11 和 SUS1 搭建体外反应通路, 使廉价底物 ST 先经 UGT76G1 催化为 RA, 再经 EUGT11 催化产生 RD, 最后经 UGT76G1 转化为 RM, 该体外反应通路旨在利用较简单的生产方法得到更高品质的甜味剂 RM。

4 结论

3.1 本文通过比较重组酶 UGT76G1 对 ST 和 RD 的转化率以及 EUGT11 对 RA 的转化率, 得知 EUGT11 对底物 RA 的转化率最低, 仅 13.25%, 而该酶参与的糖基转移反应正是产生 RM 的前体 RD 的关键一步, 因此, 提升该酶酶活是提升终产物 RM 产量的关键。为提升该限速酶酶活, 构建了三重启动子操控下表达的重组酶 EUGT11, 相比单启动子操控下表达的重组酶 EUGT11, 三重启动子使其酶活提升 2.13 倍。当三重启动子操控下表达的重组酶 EUGT11 参与整个体外多酶级联反应体系时, RD 产量提升 2.52 倍, RM 产量也随之提升 2.35 倍, 该反应体系将 10 mmol/L ST 转化为 3.79 mmol/L RM。

3.2 本文提供的 RM 合成方法与直接催化 RD 生产 RM 的方法相比, 底物廉价, 催化效率较高, 为此后 RM 生物合成的工业应用提供新思路。但该一锅法催化所得产物成分较复杂, 含有多种糖苷类物质, RM 不易从众多性质相似的成分中分离。为得到纯度更高的 RM, 可以继续挖掘更优质的糖基转移酶基因, 或用异源表达量大且本底表达量低的宿主进行糖基转移酶和蔗糖合成酶的异源表达, 旨在获得纯度更高的 RM。

参考文献

- [1] Prakash I, Markosyan A, Bunders C. Development of next generation stevia sweetener: rebaudioside M [J]. *Foods*, 2014, 3(1): 162-175
- [2] Chen L, Cai R, Weng J, et al. Production of rebaudioside D from stevioside using a UGTSL2 Asn358Phe mutant in a multi-enzyme system [J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 974-983
- [3] Olsson K, Carlsen S, Semmler A, et al. Microbial production of next-generation stevia sweeteners [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 1-14
- [4] Prakash I, Bunders C, Devkota K P, et al. Isolation and

- characterization of a novel rebaudioside M isomer from a bioconversion reaction of rebaudioside A and NMR comparison studies of rebaudioside M isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Stevia rebaudiana* Morita [J]. *Biomolecules*, 2014, 4(2): 374-389
- [5] Chen L, Sun P, Li Y, et al. A fusion protein strategy for soluble expression of *Stevia* glycosyltransferase UGT76G1 in *Escherichia coli* [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(6): 1-8
- [6] TAO Jun-hua, LI Guo-qing, LIANG Xiao-liang, et al. Enzymatic method for preparing rebaudioside: United States. US 10,30,662 B2 [P]. May 28, 2019[2021.03.01]. <https://patentscope2.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015113231>
- [7] Wang Z, Hong J, Ma S, et al. Heterologous expression of EUGT11 from *Oryza sativa* in *Pichia pastoris* for highly efficient one-pot production of rebaudioside D from rebaudioside A [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1669-1676
- [8] Chen L, Pan H, Cai R, et al. Bioconversion of stevioside to rebaudioside E using glycosyltransferase UGTSL2 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193: 637-649
- [9] Schmölder K, Lemmerer M, Gutmann A, et al. Integrated process design for biocatalytic synthesis by a leloir glycosyltransferase: UDP-glucose production with sucrose synthase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 924-928
- [10] Wang Y, Chen L, Li Y, et al. Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2016, 80(1): 67-73
- [11] Huang F C, Hinkelmann J, Hermenau A, et al. Enhanced production of β -glucosides by in-situ UDP-glucose regeneration [J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 35-44
- [12] Zhang S shan, Chen H, Xiao J yu, et al. Mutations in the uridine diphosphate glucosyltransferase 76G1 gene result in different contents of the major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162(December 2018): 141-147
- [13] Brosius J, Erfle M, Storella J. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its *in vivo* activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(6): 3539-3541
- [14] 王俊姝. 大肠杆菌操纵子改造及其应用初步研究[D]. 青岛: 山东大学, 2010
- WANG Junshu. Engineering of *Escherichia coli* operon and its potential application [D]. Qingdao: Shandong University, 2010
- [15] 杨玉凤, 费理文, 李建华, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成莱鲍迪昔 D [J]. *工业微生物*, 2017, 47(5): 1-7
- YANG Yufeng, FEI Liwen, LI Jianhua, et al. Production of rebaudioside D by recombinant *Escherichia coli* whole cell catalyst [J]. *Industrial Microbiology*, 2017, 47(5): 1-7
- [16] 朱清娟, 陈美琪, 梁书利, 等. 体外偶联 UDP-糖基转移酶与蔗糖合成酶高效催化合成莱鲍迪昔 A [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(1): 47-53
- ZHU Qingjuan, CHEN Meiqi, LIANG Shuli, et al. Efficient synthesis of rebaudioside A catalyzed by in vitro coupling UDP-glycosyltransferase and sucrose synthase [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(1): 47-53

(上接第 24 页)

- [21] Yao K, Liu D M, Liang M H, et al. Detection of nitrite degradation by *Lactobacillus plantarum* DMDL9010 through the anaerobic respiration electron transport chain using proteomic analysis [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 56: 1608-1622
- [22] 杜磊, 袁超, 董亚敏. 乳酸菌培养基的优化设计研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 7: 165-168
- DU Lei, YUAN Chao, DONG Yamin. Study on the optimal design of lactic acid bacteria culture medium [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 7: 165-168
- [23] 沙吉坦穆·克依斯尔, 古丽皮艳·托乎提, 努丽艳·阿不都米力克, 等. 新疆传统发酵酸乳优势菌种短乳杆菌高密度培养技术[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 178-183
- Kayser Sajidam, Tohti Gulpiya, Abdumilik Nurya, et al. High-density cultivation of *Lactobacillus brevis* as a dominant strain isolated from Xinjiang traditional fermented camel milk [J]. *Food Science*, 2016, 37(23): 178-183