

生物转化生产 D-塔格糖的食品级菌种选育及 L-阿拉伯糖异构酶的克隆表达

门燕^{1,2}, 朱玥明², 管于平², 张同存¹, 何森健², 孙媛霞²

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

门燕, 朱玥明, 管于平, 等. 生物转化生产 D-塔格糖的食品级菌种选育及 L-阿拉伯糖异构酶的克隆表达. 生物工程学报, 2012, 28(5): 592-601.

Men Y, Zhu YM, Guan YP, et al. Screening of food-grade microorganisms for biotransformation of D-tagatose and cloning and expression of L-arabinose isomerase. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 592-601.

摘 要: L-阿拉伯糖异构酶 (L-arabinose isomerase, L-AI) 是一种可以催化 D-半乳糖为 D-塔格糖的胞内异构化酶。随着塔格糖在食品工业中越来越广泛的应用, 能够将半乳糖转化为塔格糖的食品级微生物以及食品级来源的 L-AI 受到更大的关注。文中从各种酸奶制品、泡菜及其他一些食品中采集不同的样品, 筛选出 1 株具有 L-AI 酶活性的食品级菌株, 经过生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列测定, 确定该菌株为戊糖片球菌, 命名为 *Pediococcus pentosaceus* PC-5。以该菌基因组为模板, 克隆 L-AI 基因, 并在大肠杆菌 BL21 成功地异源表达。表达产物经粗提取后, 在 40 °C 下加入 Mn^{2+} , 使 D-半乳糖转化为 D-塔格糖的转化率为 33%。

关键词: L-阿拉伯糖异构酶, D-塔格糖, 食品级微生物

Received: August 24, 2011; **Accepted:** October 31, 2011

Supported by: Science and Technology Projects of Tianjin (No. 10YFYBJC00100), National Natural Science Foundation of China (No. 31101303), Innovation Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2EWG5).

Corresponding author: Yuanxia Sun. Tel/Fax: +86-22-84861961; E-mail: syx0430@hotmail.com

天津市科技支撑计划重大项目 (No. 10YFYBJC00100), 国家自然科学基金 (No. 31101303), 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2EWG5) 资助。

Screening of food-grade microorganisms for biotransformation of D-tagatose and cloning and expression of L-arabinose isomerase

Yan Men^{1,2}, Yueming Zhu², Yuping Guan², Tongcun Zhang¹, Ken Izumori², and Yuanxia Sun²

¹ College of Biology Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: L-Arabinose isomerase (L-AI) is an intracellular enzyme that catalyzes the reversible isomerization of D-galactose and D-tagatose. Given the widespread use of D-tagatose in the food industry, food-grade microorganisms and the derivation of L-AI for the production of D-tagatose is gaining increased attention. In the current study, food-grade strains from different foods that can convert D-galactose to D-tagatose were screened. According to physiological, biochemical, and 16S rDNA gene analyses, the selected strain was found to share 99% identity with *Pediococcus pentosaceus*, and was named as *Pediococcus pentosaceus* PC-5. The *araA* gene encoding L-AI from *Pediococcus pentosaceus* PC-5 was cloned and overexpressed in *E. coli* BL21. The yield of D-tagatose using D-galactose as the substrate catalyzed by the crude enzyme in the presence of Mn²⁺ was found to be 33% at 40 °C.

Keywords: L-arabinose isomerase, D-tagatose, food-grade microorganisms

远在公元前 16 世纪, 中国就会利用微生物酿酒, 微生物发酵方法至今仍应用于食品加工中, 如醋、酱油、酸奶等制造业。该类微生物被称为食品级微生物 (Food-grade microorganisms), 属于一般公认安全 (Generally recognized as safe, GRAS) 微生物范畴。这类食品级微生物主要有: 真菌中的曲霉菌和酵母菌, 细菌中的乳酸菌和枯草芽胞杆菌等^[1], 这些微生物在食品工业中得到了越来越广泛的应用。

D-塔格糖 (D-果糖同分异构体) 是目前被发现的一种新型的低热量的功能性甜味剂^[2]。D-塔格糖的味道和口感与蔗糖相似, 但是 D-塔格糖的热量值仅有 7.3 kJ/g, 只占蔗糖能量的 30%^[3]。对于血糖医学指数的研究表明, D-塔格糖不会引起血液中葡萄糖水平的增加, 因此 D-塔格糖的使用对于糖尿病患者是安全的^[4-5]; 不同于蔗糖, 它不会促进蛀牙生长, 并具有抑制

龋齿、牙龈炎、消除口臭及洁齿等作用^[6-7]。2001 年美国食品与药物管理局 (FDA) 确定 D-塔格糖为普遍公认安全食品 (GRAS)^[8]。

L-阿拉伯糖异构酶 (L-arabinose isomerase, L-AI) 是一种能够催化 L-阿拉伯糖转化为 L-核酮糖的异构化酶, 由于 D-半乳糖和 L-阿拉伯糖在结构上具有一定的相似性, 其在 C3、C4 的位置上均有一个 L-型顺式羟基结构, 因此在体外 L-AI 能使 D-半乳糖转化为 D-塔格糖^[3,9-11]。由此可见 L-AI 是实现生物法生产 D-塔格糖的重要生物催化剂^[12]。

研究发现, L-AI 对 D-塔格糖的转化率随反应温度的升高而增加, 因此以往筛选得到的多来源于嗜热菌, 例如嗜热杆菌 *Thermoanaerobacter mathranii*^[13], 嗜热脂肪芽胞杆菌 *Bacillus stearothermophilus* US100^[14]等。但这些嗜热菌及其来源基因的食品安全性受到质疑, 研究学者开

始筛选食品级微生物开展转化生产D-塔格糖的研究, Cheetham 等^[15]利用盖氏乳杆菌 *Lactobacillus geyonii* 代谢产生 L-阿拉伯糖异构酶成功转化半乳糖生成塔格糖, 第一次提出利用乳酸菌生产塔格糖的设想。Chouayekh, Zhang H 等^[16-17]利用来自于植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 的 L-AI 的基因克隆表达进行半乳糖的转化成为塔格糖。Rhim 等^[18]在食品级基础上克隆表达了来自于米酒乳杆菌 *Lactobacillus sakei* 23K 的耐酸 L-AI 基因, 利用酶法转化生成了塔格糖。还有 2011 年来源于发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*^[19]等食品级菌株 L-AI 的应用的报道。

本研究通过食品级菌种的筛选, 从各种酸奶泡菜制品中筛选出一株产 L-AI 的菌株, 将其 L-AI 基因克隆, 构建质粒, 并成功表达了具有生物活性的重组 L-AI, 利用微生物酶法转化生成塔格糖, 为进一步通过定点突变和基因重组的手段研究生物转化法制备 D-塔格糖提供新材料, 开拓新途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集与培养基

从各种酸奶制品、泡菜以及其他一些食品中

采集不同的样品, 将上述样品培养在 MRS 固体培养基平板上, 涂布、划线分离。

1) 改良肉汤培养基 (MRS)^[20]: 蛋白胨 10.0 g; 牛肉膏 10.0 g; 酵母粉 5.0 g; 乙酸钠 5.0 g; 柠檬酸三铵 2.0 g; 磷酸氢二铵 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.58 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$: 0.25 g; 吐温-80 1 mL; 蒸馏水 1000 mL; 葡萄糖 2%, 为避免葡萄糖高温灭菌时发生一定程度的焦化, 配制培养基时, 单独将其配置成 20% 的糖溶液。待培养基完全溶解, 调 pH 至 6.2~6.6。

2) 平板及斜面培养基: MRS 培养基中添加 20 g/L 琼脂。

1.1.2 菌种与质粒

作为质粒克隆的宿主菌大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、目的基因表达的宿主菌 *E. coli* BL21 为本实验室保存; 克隆以及表达载体 pET-21a (+) 购自 Novagen 公司。

1.1.3 生化试剂

PCR 引物由华大基因合成 (表 1); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司; T4 DNA 连接酶、*Bam*H I、*Hind* III 限制性内切酶购自于宝生物工程有限公司。

表 1 16S rDNA 通用引物序列和 PCR 扩增 L-AI 的引物序列

Table 1 The general primers of 16S rDNA and PCR amplification primers of L-AI gene

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
Lac-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	-
Lac-R	TTGCGCCGCTCAAACCTCT	-
PPAI-F	<u>CGGGATCC</u> AAAAAAGTACAAGATTATG	<i>Bam</i> H I
PPAI-R	CCCA <u>AAGCTT</u> TCATTTGATGTTAACGTATGTC	<i>Hind</i> III

Note: *Bam*H I and *Hind* III site are under lined.

1.2 方法

1.2.1 菌种初筛

将筛得的菌株, 分别接种到装有 100 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 12 h, 将发酵液等量分装于 2 个离心管中, 其中一管离心 20 min (4 °C, 12 000 r/min) 获得菌体, 悬浮于 2 mL ddH₂O 中, 超声破碎 5 min 后, 离心去除细胞碎片, 取上清液 (即为粗酶液) 进行酶反应。酶促反应条件为: 取 500 μL 粗酶液与 500 μL 1%D-半乳糖, 35 °C 反应过夜。

另一管未做细胞破碎的菌体离心弃上清后直接进行酶反应。酶反应条件为: 加入 500 μL 1%D-半乳糖液以及 500 μL ddH₂O, 35 °C 反应过夜。同时进行对照实验。

酶反应结束后, 加热至 95 °C、5 min 终止反应, 采用半胱氨酸-咪唑法^[21]进行显色反应。

1.2.2 乳酸菌的生理生化鉴定

将筛得的菌株根据参考文献[22]所列乳酸菌种鉴定方法进行鉴定。

1.2.3 16S rDNA 克隆及系统进化树的建立

以基因组 DNA 为模板, 利用 16S rDNA 基因的通用引物 (Lac-F、Lac-R), 进行 PCR 扩增。将扩增获得的 PCR 产物进行序。

PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.2.4 *Pediococcus pentosaceus* PC-5 L-AI 基因序列扩增

根据 NCBI 基因库中 *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 (GenBank Accession

No. CP000422.1) 菌中的 L-AI 基因序列设计引物 (PPAI-F、PPAI-R), 上下游引物 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。

PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.2.5 *Pediococcus pentosaceus* PC-5 L-AI 基因表达质粒的构建

纯化后的 L-AI 的 PCR 基因片段和表达载体 pET-21a (+) 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别进行双酶切反应。回收后的目的片段与载体用 T4 DNA 连接酶在 4 °C 连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态中进行克隆, PCR 筛选阳性克隆, 双酶切鉴定, 挑取阳性转化子转入 *E. coli* BL21 进行诱导表达, 并将重组质粒送华大基因测序。

1.2.6 重组 L-AI 的诱导表达

挑取阳性菌落 *E. coli* BL21 (pET-PPLAI) 接入 3 mL LB-Amp 培养基 (Amp 终浓度为 100 mg/L) 中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 将上一步活化的菌接种至 100 mL LB-Amp 培养基 (Amp 终浓度为 100 mg/L) 中, 37 °C 培养 3~4 h 至 *OD*₆₀₀ 约 0.6~0.8, 即细菌生长对数期, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导表达, 分别以 37 °C、200 r/min 培养 3 h, 30 °C、150 r/min 培养 6 h, 20 °C、100 r/min 培养过夜。

收集诱导后的菌体, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 并用 ddH₂O 洗涤菌体 2 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 用 2 mL ddH₂O 悬浮, 并在冰上超声破碎细胞, 离

心 20 min, 取上清液 50 μ L, 加入 50 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液, 用于 SDS-PAGE 检测。同时将只含有 pET-21a (+) 的 *E. coli* BL21 进行以上实验操作作为对照。

1.2.7 重组 L-AI 粗酶的酶活检测

L-AI 的活性通过 D-塔格糖生成的含量来测定。在标准条件下, 反应体系包括: 1% D-半乳糖, 0.5 mmol/L CoCl_2 , 1 mmol/L MnCl_2 , 300 μ L 粗酶, 用 ddH₂O 补足至 1 mL (对照反应不加 MnCl_2 测酶活力)。酶促反应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下过夜, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中处理 5 min 灭活酶的活性停止反应。生成的 D-塔格糖的含量采用 HPLC 高效液相色谱法。安捷伦高效液相色谱仪 1200, 分析柱: Waters Sugar Pak1, 流动相: 去离子水, 柱温 80 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 mL/min, 进样量 20 μ L, 检测器: 示差检测器。

2 结果与分析

2.1 菌种初筛结果

采用半胱氨酸-吡唑法, 对筛出的 20 株菌株进行显色反应。对于菌体超声破碎获得的上清液进行的酶反应, 通过颜色比较, 显色结果并不理想, 但在分光光度计测出在 560 nm 下有一株菌显示较小的吸光值, 显示出弱的 L-AI 活性, 将其初步确定为具有产塔格糖能力的菌株, 命名为 PC-5 菌株; 对于所有用全细胞进行的酶促反应来说, 均没有检测到酶活。

2.2 菌株的细胞形态及生理生化鉴定

菌株在液体 MRS 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 12 h, 细菌生长状况良好, 菌体呈白色, 并沉降

在培养基的底部。菌体在固体 MRS 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 48 h, 菌落圆形, 白色扁平, 边缘圆整。由革兰氏染色结果可知, 该 PC-5 菌株为革兰氏阳性菌, 细胞形状呈球形, 呈片状排列, 直径 0.8~1.0 μm 。同时, 在表 2 中也比较了 PC-5 菌株与相关菌株的生理生化特性, 其结果显示 PC-5 菌株与 *P. pentosaceus* [22] 的相关生理生化特征较为相似, 接触酶均为阴性; 不能水解淀粉; 明胶液化实验结果均为阴性; 均可利用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖、柳醇作为碳源。据此鉴定 PC-5 菌株属于片球菌属。

2.3 菌株 16S rDNA 基因测序及系统进化树

通过分析测定获得该片段序列, 利用 BLAST 软件将该序列与美国国家生物信息中心 (NCBI) 收录的 DNA 序列进行比对, 基于相关菌株 16S rDNA 序列构建系统发育树 (图 1)。结果表明, PC-5 菌株 16S rDNA 序列与 *Pediococcus pentosaceus* 属的相似性最高。根据 16S rDNA 序列分析结果, 结合其形态和生理生化特性, 该菌被鉴定为 *Pediococcus pentosaceus*, 并将该菌株命名为 *Pediococcus pentosaceus* PC-5。

2.4 PC-5 菌 L-AI 基因的扩增

从 NCBI 上查得 *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 (GenBank Accession No. CP000422.1) 此菌株含有表达 L-AI 的基因序列, 根据该序列设计引物, 则以 PC-5 菌基因组为模板, PCR 扩增 L-AI 基因。从 PC-5 菌中扩增出大小约为 1 400 bp 的 DNA 片段, 与 L-AI 基因的已知大小相符。

表 2 PC-5 菌株及相关菌株的特征比较

Table 2 Comparison of the phenotypic characteristics of strain PC-5 and the related strains

Characteristic	Strainns designations			
	PC-5	<i>P. pensaceus</i> ^[22]	<i>P. acidilactici</i> ^[22]	<i>L. plantarum</i> ^[22]
Catalase test	—	—	—	—
Methyl red (MR) test	+	+	+	+
Acetyl methyl methanol VP test	+	+	+	+
Gelatin liquefaction test	—	—	—	—
Starch hydrolysis test	—	—	—	—
Glucose	+	+	+	+
Maltose	+	+	—	+
Lactose	+	+	d	+
Sucrose	+	d	d	+
Fructose	+	+	+	+
Xylose	d	+	+	d
Dextrin	—	—	—	+
D-Galatose	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	d
Mannitol	—	—	—	+
Fucose	—	—	+	+
Salicin	+	+	+	+
Rhamnose	—	—	—	—
Raffinose	—	—	—	+

Note: +, positive; —, negative, d, weak positive.

2.5 L-AI 基因表达质粒的构建与验证

重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证与菌落 PCR 验证, 结果均获得目的基因片段 1 400 bp 左右 (图 2、3), 表明含 L-AI 基因的原核表达质粒构建成功。测序结果显示, *Pediococcus pentosaceus* PC-5 菌株的 L-AI 序列结果显示目的基因片段的大小为 1 426 bp, 与预期结果一致。将该基因序列提交至 GenBank, 获取登录号为: JN377428。

2.6 重组 L-AI 基因的诱导表达结果

将重组质粒 pET-PPLAI 转入表达载体 *E. coli* BL21, 选取阳性菌落加入 IPTG 进行诱导表达, 同时, 利用相同条件培养含有 pET-21a (+) 的 *E. coli* BL21 作为对照。

实验结果表明, *E. coli* BL21 (pET-PPLAI) 培养液在加入 IPTG 后, 20 °C、100 r/min 过夜培养为最佳诱导表达条件, 由 SDS-PAGE 可知 (图 4), 重组蛋白粗提物在 58 kDa 附近有一明显

的特异性条带,对照菌的蛋白粗提物在该位置无明显条带。在此条件下重组蛋白以可溶性形式存在,几乎没有包涵体的生成。利用 DNAMAN 软件计算出实际 PPLAI 理论值为 54 kDa,与预期结果几乎为一致。

2.7 重组 L-AI 粗酶的酶活

将重组 L-AI 进行酶促反应后,由 HPLC 检测反应结果,在 1% D-半乳糖,300 μ L 粗酶提取物的反应体系下,未加 Mn^{2+} 的反应体系结果在 16.49 min 没有峰出现 (D-塔格糖的保留时间),该结果与以往多数文献报道中指出“在没有金属离子存在的情况下,L-AI 一般是没有或者极低地显示出异构化 D-半乳糖的活性^[23]”,“L-AI 多数依赖 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 作为辅因子增强其酶活力及热稳定性^[14]”的结果一致,金属离子 Mn^{2+} 的摄入对于重组 L-AI 的酶促反应的进行是必需的。由色谱图分析可见 (图 5),从 *Pediococcus pentosaceus* PC-5 获得的 L-AI 具有

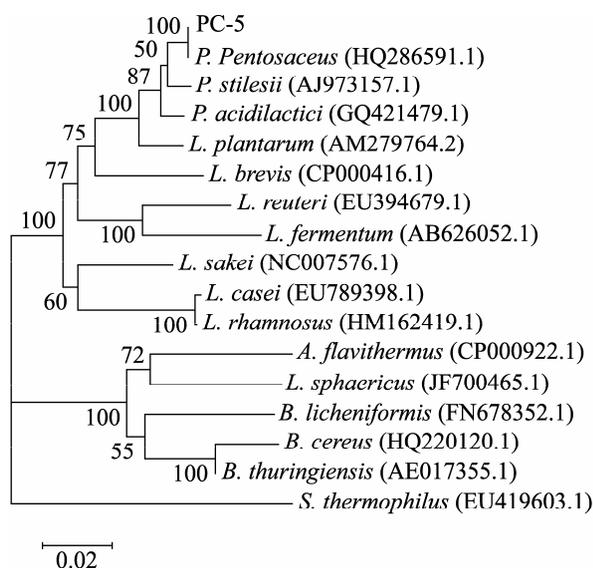


图 1 PC-5 菌株与其他细菌的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic relationships of 16S rDNA gene of PC-5 and related species.

催化 D-半乳糖转化为 D-塔格糖的能力,且转化率随反应温度的增加而提高,30 $^{\circ}C$ 、40 $^{\circ}C$ 反应过夜 12 h,底物 1% D-半乳糖转化率分别约为 30% 和 33%。

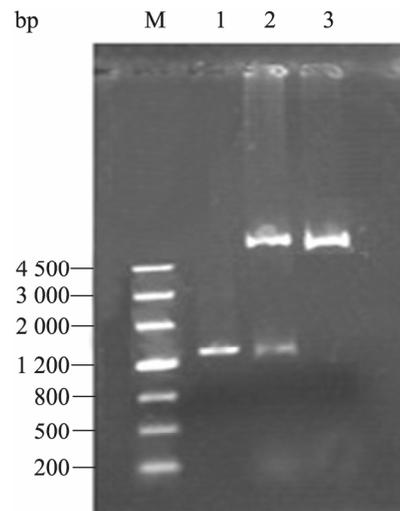


图 2 重组 pET-PPLAI 的酶切验证

Fig. 2 Identification of positive plasmid of pET-PPLAI by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: L-AI; 2: pET-PPLAI; 3: pET-21a (+).

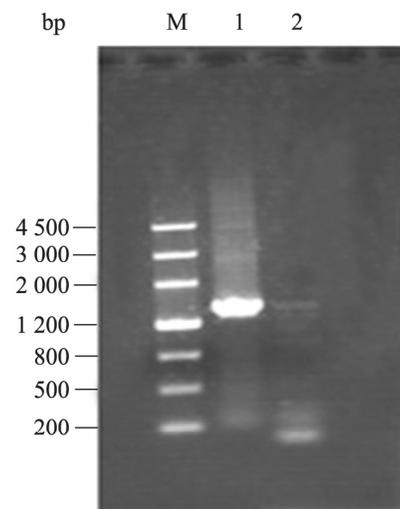


图 3 重组 pET-PPLAI 的 PCR 验证

Fig. 3 Identification of positive plasmid of pET-PPLAI by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of pET-PPLAI; 2: PCR product of pET-21a (+).

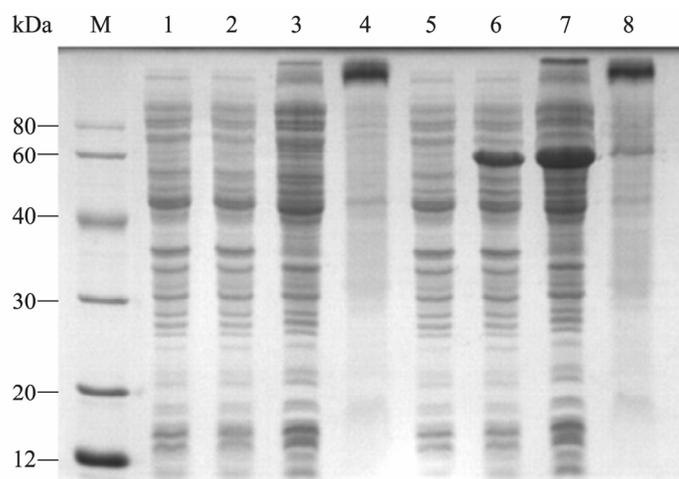


图 4 重组质粒 pET-PPLAI 在 *E. coli* BL21 中的表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins expressed in *E. coli* BL21. M: protein markers; 1: total cell (pET-21a (+) without IPTG); 2: total cell (pET-21a (+) with IPTG); 3: supernatant (pET-21a (+)); 4: precipitation (pET-21a (+)); 5: total cell (pET-PPLAI without IPTG); 6: total cell (pET-PPLAI with IPTG); 7: supernatant (pET-PPLAI); 8: precipitation (pET-PPLAI).

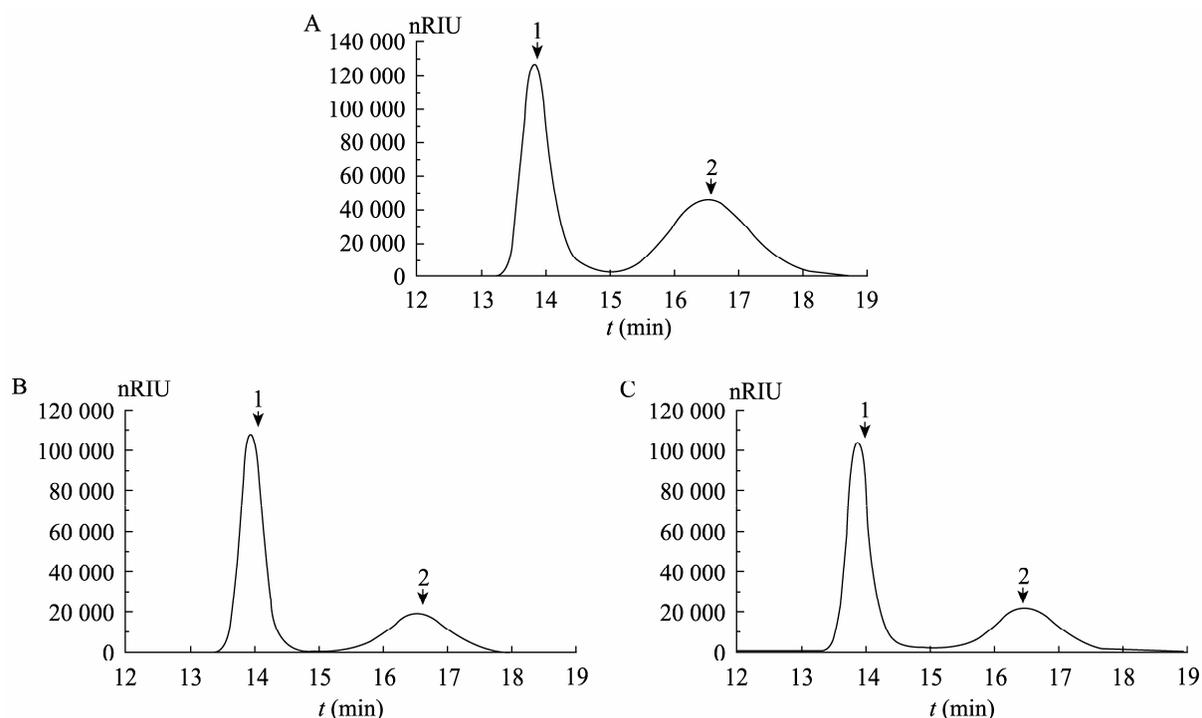


图 5 HPLC 分析 D-塔格糖的产量

Fig. 5 HPLC analysis of the D-tagatose production. (A) Standard solution of D-galactose and D-tagatose at 10 g/L. (B) Isomerization products after 12 h of reaction at 30 °C. (C) Isomerization products after 12 h of reaction at 40 °C. 1: D-Galactose with a retention time of 13.81 min; 2: D-tagatose with a retention time of 16.49 min.

3 结论

本研究采用了半胱氨酸唑法初步筛选出具有转化生产塔格糖能力的食品级菌株,确定为戊糖片球菌,并将其 L-AI 基因在 *E. coli* BL21 异源表达。经 IPTG 诱导表达后,约在 58 kDa 处明显出现目的蛋白条带,与预期结果几乎相符,由 SDS-PAGE 电泳结果可知,在此条件下重组蛋白以可溶性形式存在,几乎没有包涵体的生成。在温度 40 °C, 1%底物、300 μL 粗酶的条件下反应过夜,以半乳糖为底物转化为塔格糖,转化率可以达到 33%。目前,利用食品级菌株微生物酶法将半乳糖转化为塔格糖,在食品工业上广泛应用。对此,我们将由戊糖片球菌获得的重组酶的纯化以及提高塔格糖的产率作为下一步工作的重点方向。

REFERENCES

- [1] Wu K. Food-grade Microorganism. Beijing: Chemical Industry Press (CIP), 2008.
吴坤. 食品微生物. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [2] Levin GV. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J Med Food*, 2002, 5(1): 23–36.
- [3] Levin GV, Zehner LR, Saunders JP, et al. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(Suppl 5): 1161S–1168S.
- [4] Donner TW, Wilber JF, Ostrowski D. D-tagatose, a novel hexose: acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 1999, 1: 285–291.
- [5] Seri K, Sanai K, Negishi S, et al. Prophylactic and remedial preparation for diseases attendant on hyperglycemia, and wholesome food: EP, 0560284, 1997-09-07.
- [6] Iida T, Ichihara T, Izumori K, et al. Noncarious material and anticariogenic containing rare sugar: EP, 2098227, 2009-09-09.
- [7] Lu Y, Levin GV, Donner TW. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(2): 109–134.
- [8] FDA. Food labeling: health claims; D-tagatose and dental caries. Final rule. *Fed Regist*, 2003, 68(128): 39831–39833.
- [9] Yoon SH, Kim P, Oh DK. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, 19(1): 47–51.
- [10] Kim BC, Lee YH, Lee HS, et al. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 212(1): 121–126.
- [11] Kim HJ, Ryu SA, Kim P, et al. A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(2): 400–404.
- [12] Roh HJ, Yoon SH, Kim P. Preparation of L-arabinose isomerase originated from *Escherichia coli* as a biocatalyst for D-tagatose production. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(3): 197–199.
- [13] Jørgensen F, Hansen OC, Stougaard P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(6): 816–822.
- [14] Rhimi M, Bejar S. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(2): 191–199.
- [15] Cheetham PSJ, Wootton AN. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15(2): 105–108.
- [16] Chouayekh H, Bejar W, Rhimi M, et al.

- Characterization of an L-arabinose isomerase from the *Lactobacillus plantarum* NC8 strain showing pronounced stability at acidic pH. FEMS Microbiol Lett, 2007, 277(2): 260–267.
- [17] Zhang H, Jiang B, Pan BB. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 641–646.
- [18] Rhimi M, Ilhammami R, Bajic G, et al. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23K is an attractive D-tagatose producer. Bioresour Technol, 2010, 101(23): 9171–9177.
- [19] Xu Z, Qing YJ, Li S, et al. A novel L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterization. J Mol Catal B: Enzym, 2011, 70(1/2): 1–7.
- [20] Wang FR, Xu H, Li S, et al. Screening and identification of two D-tagatose-producing strains. Food Ferment Ind, 2009, 35(8): 15–19.
汪芙蓉, 徐虹, 李莎, 等. 产 D-塔格糖菌株的筛选与鉴定. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 15–19.
- [21] Dische Z, Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. J Biol Chem, 1951, 192(2): 583–587.
- [22] Buchana RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984.
RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [23] Oh DK. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(1): 1–8.



关于启用新账号的通知

我编辑部自 2012 年 2 月 20 日起, 将正式启用新的银行账号, 新的账户信息如下:

账户名称: 中国科学院微生物研究所

开户行: 中国农业银行股份有限公司北京科学园分理处

账号: 11251101040000848

凡向本刊编辑部转账的单位及个人, 请自 2 月 20 日起按新账号转款。为了快速到账, 稿件审理费和发表费建议使用银行转账方式汇款, 汇款时请务必注明稿件编号, 感谢您的合作!

《生物工程学报》编辑部

2012-2-17