具有极高热稳定性的β-(2,6)果聚糖蔗糖酶及其应用

张晓琦[1]，徐 炜[*1]，倪大伟[1]，张文立[1]，光翠娥[1]，沐万孟[1,2]
(1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品安全国际合作联合实验室，江苏 无锡 214122)

摘要：挖掘具有高热稳定性的β-(2,6)果聚糖蔗糖酶(levansucrase，LS)，并应用果聚糖蔗糖酶进行β-(2,6) 果聚糖的高效合成。以分子动力学模拟的方式筛选出具有潜在高热稳定性的β-(2,6)果聚糖蔗糖酶。将目的酶在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行重组及诱导表达，并通过镍柱亲和层析进行纯化。在不同温度下进行保温实验以验证 LS 的热稳定性，并通过条件优化获得产物的高转化率。Cedi-LS 在 65 ℃时显示出最高活性，远高于已鉴定的其他 LS。同时，在 45 ℃下保温 72 h，重组酶 Cedi-LS 能够保留 90%以上的相对活性；在 55 ℃下保温 60 h，其保留活性仍可达到初始活性的 60%以上，表现出优异的热稳定性。在反应过程中，Cedi-LS 可同时生成低聚糖、低相对分子质量的β-(2,6)果聚糖和高相对分子质量的β-(2,6)果聚糖。当温度从 65 ℃降至 35 ℃时，Cedi-LS 倾向于产生 HMW-levan，其相对分子质量可达 8.4×10^6。在 pH 5.5 和 35 ℃的条件下，以质量分数 30%的蔗糖为底物，加酶量定 20 μg/mL，蔗糖转化为β-(2,6)果聚糖的平衡转化率为 41.4%。作者鉴定了一种具有高热稳定性的 LS，并且这种 LS 能够高效生产一系列具有不同相对分子质量的果聚糖。

关键词：β-(2,6)果聚糖蔗糖酶；热稳定性；β-(2,6)果聚糖；产物特异性
中图分类号：Q 814　**文章编号**：1673-1689(2023)04-0057-12　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.04.007

An Extreme Thermostable Levansucrase and Its Application

ZHANG Xiaoqi[1]，*XU Wei*[*1]，*NI dawei*[1]，*ZHANG Wenli*[1]，*GUANG Cuie*[1]，*MU Wanmeng*[1,2]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: β- (2,6) levansucrase (LS) with high thermostability was identified and the efficient synthesis of levan by levansucrase was studied. High-temperature molecular dynamics simulation was used to screen the LS with potential high thermostability. The target enzyme was heterogeneously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified through one-step Ni^{2+}-affinity purification. The thermostability of LS was determined by incubating the enzyme at different temperatures, and the highest conversion was obtained through the optimization of conditions. The

收稿日期：2022-09-14
基金项目：国家自然科学基金项目(31922073)；江苏省自然科学基金项目(BK20210463)。
* **通信作者**：徐 炜(1991—)男，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事食品生物技术研究。E-mail：weixu@jiangnan. edu.cn

Cedi-LS showed the highest activity at 65 ℃, which was much higher than the other identified LSs. Meanwhile, Cedi-LS remained more than 90% active when incubated at 45 ℃ for 72 h, and it also remained more than 60% of its initial activity at 55 ℃ for 60 h, exhibiting excellent thermostability. The Cedi-LS produced oligosaccharides, low molecular weight (LMW) β-(2,6) levan, and high molecular weight (HMW) β-(2,6) levan simultaneously during reaction. When the temperature decreased from 65 to 35 ℃, Cedi-LS tended to produce HMW-levan with a M_w of 8.4×10^6 Da. At pH 5.5 and 35 ℃, the equilibrium conversion ratio from sucrose to levan was 41.4% with 30% sucrose and 20 μg/mL enzyme. In summary, an extreme thermostable LS was screened which could efficiently produce levan with different molecular weights.

Keywords: levansucrase, thermostability, levan, product specificity

β-(2,6) 果聚糖蔗糖酶(levansucrase,LS,EC 2.4.1.10)和菊糖蔗糖酶(Inulosucrase,IS,EC 2.4.1.9)是两种典型的果聚糖蔗糖酶(fructansucrases,FS),可以催化蔗糖生成低聚果糖(Fructooligosaccharide,FOS)和果聚糖[1]。这类酶可以在水解蔗糖的同时合成果聚糖,分别被称为水解反应和转果苷反应[2]。这两种反应都始于蔗糖被分解成葡萄糖和果糖基,当果糖基部分的受体是水分子时,就发生水解反应,生成葡萄糖和果糖。然而,当果糖基被转移到其他受体,如蔗糖或正在延长的果聚糖链上时,则发生转果苷反应[3]。

LS 和 IS 均具有催化合成低聚果糖和果聚糖能力,但两者的产物具有不同的糖苷键类型。由 IS 催化生成的菊糖主要由主链上的β-(2,1)糖苷键连接组成,而由 LS 生产的 levan 型果聚糖主要由β-(2,6)糖苷键连接[4]。目前,已经有来自 40 多种微生物的 LS 被鉴定。这些 LS 的催化反应产物中含有不同聚合度的 levan 型 FOS(相对分子质量<3×10^3)、低相对分子质量(low molecular weight,LMW,FOS<分子量<5×10^4)和高相对分子质量(high molecular weight,HMW,相对分子质量>5×10^4)。例如,来自 *Erwinia amylovora*[5]和 *Zymomonas species*[6]的 LS 以聚合度低于 10 的 FOS 作为主要产物,只生成少量的 HMW 或 LMW-levan。来自 *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002[7]的 LS 能够专一合成相对分子质量为 4 000~5 000 的 LMW-levan。对于 *Acetobacter nitrogenifigens* RG1[8]和 *Lactobacillus reuteri* LTH5448[9]的 LS 来说,HMW-levan 是它们催化蔗糖的主要产物,相对分子质量分别为 7.1×10^6 和 3.9×10^7。特别地,来自 *Clostridium acetobutylicum* 的 LS 可以在反应中单一合成 levan 而不产生 FOS[10]。

Levan 和 FOS 的性质因其链长的不同而有所区别,但它们都在食品和制药中具有广泛的应用。据报道,LMW-levan 在治疗消化性溃疡[11]中具有潜在作用。同时,HMW-levan 可以作为抗病毒剂和胰腺抗癌剂[12-14]。此外,低聚果糖由于其在肠道中难以消化的特性,可作为具有潜在健康益处的优良益生元,对肠道健康起到保护作用[15]。目前,由 LS 催化蔗糖得到β-(2,6)果聚糖是合成 levan 和 levan 型 FOS 的主要手段,同时发现温度能够显著影响产物的相对分子质量。虽然较高的温度能够加快酶反应的速度,但大多数已鉴定的 LS 的热稳定性普遍较低[16-17]。例如,*B. licheniformis* RN-01 来源的 LS 在 50 ℃下保温 1 h 后,其残余活力低于初始活性的 50%[18]。*Bacillus* sp. TH4-2 来源的 LS 在 60 ℃下保温 30 min 后仅仅保留了 50%的相对活性[19]。在本研究之前,来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的 LS 被认为是耐热性最好的 LS,它可以在 4~47 ℃下保温 6 h 依然保持超过 95%的初始活性[20]。然而,*G. stearothermophilus* LS 在较高温度(57 ℃)下会迅速失去活性。一些研究通过突变或化学修饰的方法改善了 LS 的热稳定性,例如 *B. licheniformis* RN-01[18]、*Z. mobilis* NCR[21]和 *B. circulans*[22]的 LS。然而,这些改善热稳定性的方式往往伴随着酶活性或底物亲和力的降低。*B. licheniformis* RN-01 LS 的 K82H/N83R 双点突变体在 50 ℃的半衰期由 65 min 提高 112 min,但它转果苷反应的 K_m 值提高了 58%。同样,经右旋糖酐修饰的 *B. circulans* LS 在 50~60 ℃下的半衰期显著提高,但最大酶活降低了20%。

作者通过分子动力学模拟筛选和鉴定了一种

来自 *Celerinatantimonas diazotrophica* 的耐热 LS(Cedi-LS)。此酶在 65 ℃时显示出最大活性,远远高于其他 LS。同时,当在 45 ℃下保温 72 h 后,Cedi-LS 仍保持了 90%以上的活性;在 55 ℃下保持 60%以上的初始活性,表现出优异的热稳定性。Cedi-LS 在反应中可同时产生 FOS、LMW-levan(相对分子质量为 4.1×10^4)和 HMW-levan(相对分子质量为 1.8×10^6)。当温度从 65 ℃变为 35 ℃时,Cedi-LS 倾向于生产更高相对分子质量的 levan,产物相对分子质量可达 8.4×10^6。这些结果表明,基于分子动力学模拟的方法可以快速筛选出耐热 LS;同时筛选得到的 Cedi-LS 可用于 HMW-levan 的生产,尤其是在高温下长时间反应的情况下,具有相对于其他 LS 的明显优势。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)菌体、异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素钠(Amp)、酵母提取物、蛋白胨和其他分析级化学品:购自 Sangon 生物科技有限公司(中国上海);蔗糖、葡萄糖和果糖:购自 Sigma 公司。

1.2 酶的表达与纯化

在 NCBI 数据库中记录了 *C. diazotrophica* 的基因组,其 GenBank 登录号为 ASM433954v1,该数据库记录了一个推测的编码 LS 的基因(蛋白质 ID:WP_131914435.1)。该基因使用两个限制性位点与 pET-22(+)载体融合,5′和 3′-端的限制位点 *Nde* I 和 *Xho* I 由金唯智生物技术有限公司(中国上海)商业合成。在该基因添加了 6 个组氨酸标签,用于完成之后的 Ni^{2+}亲和层析纯化。

将重组质粒转化到有活性的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中,然后将其接种到 200 mL 含氨苄青霉素钠的 LB 培养基中以筛选成功转化的菌体。在 37 ℃下培养细胞,并以 200 r/min 振荡,直到 600 nm 处的光密度($OD_{600\ nm}$)达到 0.6~0.8。加入 1 mmol/L IPTG 以诱导目标酶的表达,继续在 28 ℃和 200 r/min 的条件下培养 6~7 小时。通过高速离心的方式收集菌体,然后在 15 mL 裂解缓冲液(含 100 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH 7.0)中裂解菌体。在超声波破碎后,上清液在 8 000 *g* 和 4 ℃下离心 10 min,并通过 0.45 μm 微孔过滤器过滤。目标酶通过 Ni^{2+}亲和层析的方式进行纯化。上样缓冲液(50 mmol/L 磷酸钠缓冲液,含 100 mmol/L NaCl,pH 7.0)、洗涤缓冲液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含 100 mmol/L 氯化钠和 50 mmol/L 咪唑,pH 7.0)和洗脱缓冲液(50 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液,含有 100 mmol/L NaCl 和 500 mmol/L 咪唑,pH 7.0)分别用于平衡色谱柱、洗脱非特异性蛋白质和目标蛋白质。然后将收集的酶溶液在 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)中透析 18 h 以除去咪唑。使用 12.5 g/dL 下层凝胶和 5.5 g/dL 上层凝胶来测定 Cedi-LS 的相对分子质量,蛋白质带用考马斯亮蓝 R250 进行染色。蛋白质浓度用 Bradford 测定法[23]测定,即使用不同浓度的牛血清白蛋白做标准曲线来测定酶浓度。

1.3 酶活和转果苷活性与水解活性之比测定

Cedi-LS 的反应体系设置为 1 mL,含质量分数 30%的蔗糖和 10 μg 酶。在 65 ℃、pH 5.5 的条件下测定 Cedi-LS 的活性,反应时间为 15 min,沸水浴 10 min 终止反应。反应体系中以葡萄糖的生成量计算 LS 的总酶活,通过果糖的生成量来计算出 LS 的水解酶活。通过葡萄糖的生成量减去果糖的生成量,进一步计算 LS 的转果苷酶活。其中,总酶活的定义为每分钟生成 1 μmol 的葡萄糖所需要的酶量,水解酶活的定义为每分钟生成 1 μmol 的果糖所需要的酶量。

在不同底物质量分数(10%~60%)、不同 pH 值(4.0~9.0)和不同温度(30~80 ℃)下分别测定 Cedi-LS 的转果苷活性与水解活性之比。通过 HPLC 分析反应产物中葡萄糖和果糖的含量。Waters e2695 系统(Waters Corporation)配有 Waters 2414 RI 检测器和 Sugar Pak I 柱(6.5 mm×300 mm,Waters),柱温和流动相流量分别为 85 ℃和 0.4 mL/min。

1.4 生化特性

为了确定 pH 对 Cedi-LS 活性的影响,使用了3种不同 pH 范围的缓冲液:乙酸缓冲液(pH 4.0~6.0,50 mmol/L)、磷酸钠缓冲液(pH 6.0~7.5、50 mmol/L)和 Tris-HCl(pH 7.5~9.0、50 mmol/L)。每个 pH 的间隔设定为 0.5,反应条件与酶活测定时相同。

反应在 30~80 ℃的不同温度下进行,以 5 ℃为间隔,以测量 Cedi-LS 的最佳温度。除温度外,其他反应条件与酶活测定时相同。在 45、55、65 ℃下进行不同时间间隔的温育,以测定 Cedi-LS 的热稳定性。未经预保温处理的初始活性设定为 100%。使用

该公式计算半衰期($t_{1/2}$)值:

$$t_{1/2}=\frac{\ln 2}{k_d}$$

失活速率常数(k_d)通过线性回归方程确定:

$$\ln(\frac{A_t}{A_0})=k_d\times t$$

式中:A_t为剩余活性;A_0为初始活性;t为孵育时间,s。

在65 ℃下测定了Cedi-LS对蔗糖的动力学参数。反应在含有10~882 mmol/L蔗糖的50 mmol/L醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中进行,通过非线性回归法获得米氏常数(K_m)和催化常数(k_{cat})。

1.5 酶法合成levan的条件优化

分别以质量分数10%~60%蔗糖为底物以测定酶反应的最佳蔗糖质量分数。在优化的条件下,向反应混合物中加入5~100 μg/mL的酶,以探究最佳加酶量。最适蔗糖质量分数通过最佳酶活定义。最适加酶量通过效益比定义,即15 min内形成的产品(包括FOS和levan)与加酶量的比值。通过在特定时间间隔(0.5、1、2、3、6 h)测量不同产物的浓度来探究Cedi-LS对levan的生物合成。

1.6 产物的分离纯化

使用Sevag试剂从反应产物中除去蛋白质。利用乙醇(体积分数60%)沉淀法分离体系中的多糖。多次沉淀以提高多糖的纯度,直到通过HPLC检测不到单糖和残留蔗糖。使用真空冷冻干燥机获得多糖的冻干样品。

通过旋蒸法除去上清液中存在的乙醇。然后通过活性炭吸附色谱纯化含有FOS的混合物,以除去体系中存在的葡萄糖、果糖和少量残留蔗糖。冷冻干燥48 h以获得纯化FOS。

1.7 核磁共振(NMR)分析

连接果聚糖果糖基部分的糖苷键由核磁共振(NMR)进行检测。在60 ℃下水浴,将约35 mg纯化样品溶解在500 μL氧化氘(D_2O)中。使用AVANCE III 400 MHz NMR光谱仪(Brueker公司产品)在60 ℃下记录碳谱和氢谱。

1.8 产物相对分子质量及聚合度检测

采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)对所生成levan的相对分子质量分布进行测定。该系统使用了折射率检测器和超水凝胶线性柱(7.8 mm×300 mm)。流动相为0.1 mol/L $NaNO_3$,流量为0.5 mL/min。相对分子质量的标准参考物为右旋糖酐T-2000(相对分子质量2×10^6)、右旋糖酰胺T-300(相对分子质量3.0×10^5)、葡聚糖T-150(相对分子质量1.4×10^5)、右旋糖T-10(相对分子质量9.7×10^3)和右旋糖铵T-5(相对分子质量2.7×10^3)。测定温度为40 ℃。

采用配有脉冲电流检测器的高效阴离子交换色谱(HPAEC-PAD)对所得FOS的聚合度进行测定。该系统中使用的色谱柱为CarboPac PA200柱和CarbopacPA200柱。洗脱液在前40.0 min为100 mmol/L NaOH和40 mmol/L NaAc溶液,在40.0~40.1 min为100 pmol/L NaOH和400 mmol/L NaAc溶液,以及在40.1~60.0 min为40 mmol/L NaAc。体系温度为30 ℃,流动相流量为0.5 mL/min,以Ag/AgCl作为参比电极。

所有实验均重复3次,数据取平均值。数据管理和分析使用GraphPad Prism 5.0进行。

1.9 分子动力学模拟

使用GROMACS(2020.6版)和AMBER ff14SB力场进行高温分子动力学模拟[24-25]。水模型选用TIP3P,对酶进行溶剂化,加入离子平衡体系电荷并通过能量最小化消除错误放置的水分子。在位置约束的条件下,NVT和NPT系统平衡将系统加热至500 K。使用LINCS算法约束系统中的氢键。对达到平衡后的体系进行无限制的分子动力学模拟。使用GROMACS自带的工具对模拟轨迹进行分析。每5 ps保存一帧,统计并计算骨架原子的均方根偏差(RMSD)。

2 结果与分析

2.1 计算机辅助的耐热LS定向筛选

与传统的酶筛选方式不同,作者通过计算机辅助及Enzyme Miner在线服务器(https://loschmidt.chemi.muni.cz/enzymeminer/custom-sequences)[26]的联合筛选方式筛选潜在的耐热LS。来自*Z. mobilis*的LS序列(Genbank登录号:AEH62749.1)被设置为模板序列。在限制性条件下选定了11个潜在基因,这些限制条件包括LS的保守催化残基(*Z. mobilis* LS的D48、D194、E278)和蛋白质溶解度(在大肠杆菌中>80%)等。表1中列出了这些未被鉴定的FS序列及其Genbank登录号。这些酶的3D结构在SWISSMODEL在线服务器中进行了同源建模(https://swissmodel.expasy.org/)[27]。

表 1　由 Enzyme Miner 挑选得到的 11 种不同菌种来源的 FS 序列

Table 1　Sequences of FS from 11 various microorganisms selected by Enzyme Miner

微生物来源	登录号	氨基酸个数
Acinetobacter boissieri	WP_092750189.1	427
Arsenophonus nasoniae	WP_034249982.1	415
Brenneria rubrifaciens	WP_137712490.1	436
Celerinatantimonas diazotrophica	WP_131914435.1	419
Gibbsiella quercinecans	WP_095849051.1	426
Pseudomonas azotoformans	WP_141606063.1	416
Pseudomonas coronafaciens	WP_147476483.1	402
Rahnella aquatilis	WP_047611456.1	415
Serratia plymuthica	WP_122289004.1	416
Tatumella citrea	WP_087487124.1	419
Tatumella ptyseos	WP_029990647.1	419

高温分子动力学模拟预测了酶蛋白的柔性和热稳定性。所选蛋白质的 RMSD 值如图 1 所示,代表可量化的蛋白质骨架原子运动。选择已经得到平衡的模拟结构作为参考,而非未进行处理的同源建模结构。如图 1 所示,来自的 *C. diazotrophica* 的 FS 表现出最低的 RMSD 值,这意味着它具有最刚性的结构,可能具有相对于其他 FS 更高的热稳定性。因此,作者选择了来自 *C. diazotrophica* 的 FS 作为研究对象。

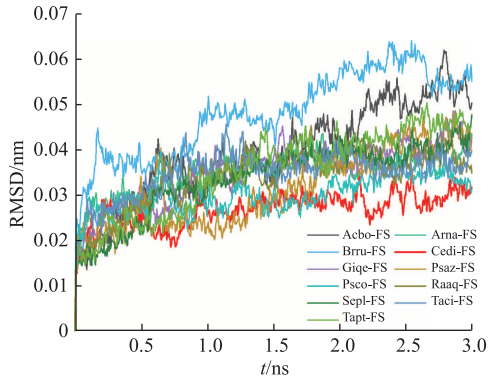


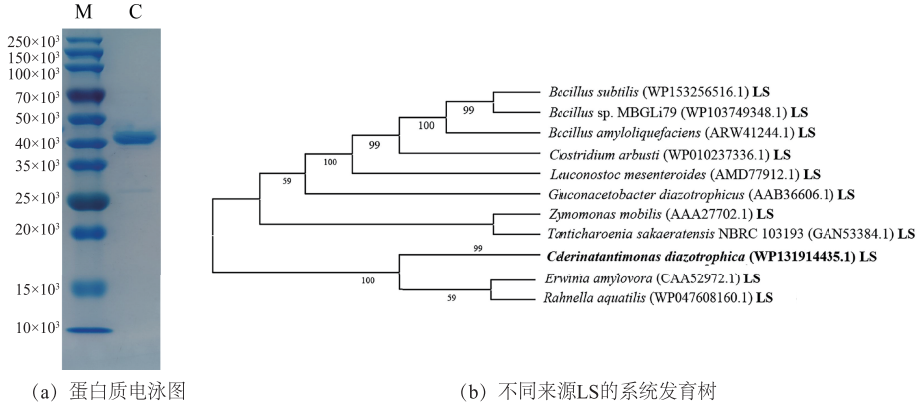
图 1　通过动力学模拟计算得到的不同来源 FS 的 RMSD 值

Fig. 1　RMSD values of different FSs calculated from MD simulations

2.2　重组酶的构建、表达及纯化

编码 *C. diazotrophica* FS 的基因序列以登录号 WP_131914435.1 保存在 GenBank 数据库中。*C. diazotrophica* 重组蛋白的 SDS-PAGE 蛋白质电泳分析表明其相对分子质量约为 44 000,见图 2(a),与计算得到的 FS 相对分子质量一致(ExPASy Computer Mw tool,https://loschmidt.chemi.muni.cz/enzymeminer/),表明目标酶在大肠杆菌中成功表达。

通过 EMBL-EBI 进行了氨基酸序列同一性分析(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/)。*C. diazotrophica* 来源的 FS 与 *Leuconostoc citreum* IS 具有 33%的最高同源性。然而,*C. diazotrophica* FS 与 *Rahnella aquatilis* LS 具有高达 72%的同源性,并且与



(a) 蛋白质电泳图　　(b) 不同来源LS的系统发育树

图注:(a)泳道 C:代表来自 *C. diazotrophica* 的纯化 LS;泳道 M:代表具有以下相对分子质量的标准酶的蛋白质标记。系统发育树由 MEGA 5.1 构建。括号中的内容是 GenBank 数据库中的登录号。

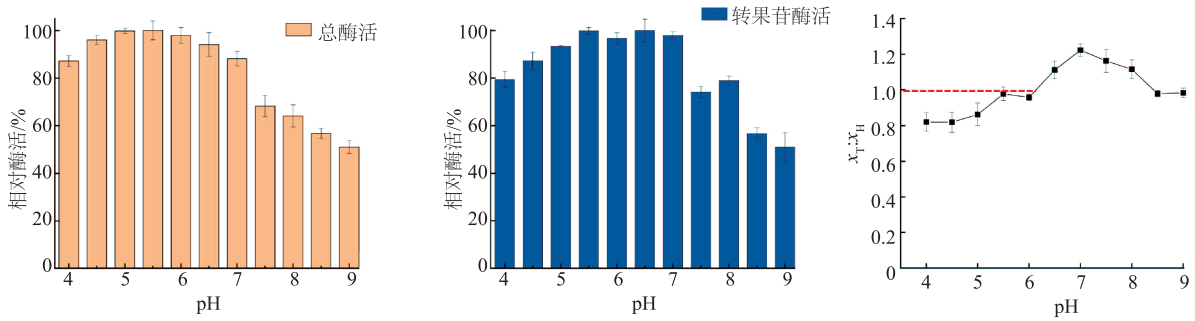
图 2　SDS-PAGE 电泳图和进化树

Fig. 2　SDS-PAGE and phylogenetic tree

E. amylovora LS 具有最高同源性(73%)。此外,还通过 MEGA 比较了 *C. diazotrophica* FS 和 LS 之间的进化关系,见图 2(b)。结果表明,*C. diazotrophica* 的 FS 与 LS 具有更密切的进化关系。为方便起见,作者后期将此酶缩写为 Cedi-LS。

2.3 pH 对酶活及 T/H 的影响

如图 3(a)所示,Cedi-LS 在 pH 5.5 时得到最大酶活。同时,Cedi-LS 在 pH 4.0~7.0 也显示出相对较高的活性,可保持 80%以上的活性。Cedi-LS 的酶活在 pH 7.5~9.0 时观察到轻微的下降,但在 pH 9.0 时 Cedi-LS 仍能保持 50%的相对活性。pH 对 Cedi-LS 转果苷酶活的影响被展示在图 3(b)中。当反应液 pH 为 5.0~7.0 时,Cedi-LS 能够保持 90%以上的转果苷酶活,表明 Cedi-LS 具有较广泛的转果苷酶活 pH 谱。为了进一步确定 pH 对转果苷和水解反应的影响,研究了转果苷酶活与水解酶活的比例。当 x_T:x_H 小于 1.0 时,水解反应为主导反应;而当 x_T:x_H 高于 1.0 时,转果苷反应则占据主导地位[28]。如图 3(c)所示,Cedi-LS 在 pH 7.0 时表现出最高的 x_T:x_H(1.22)。此外,在 pH 值为 6.5~8.0 时,Cedi-LS 的 x_T:x_H 始终高于 1,这表明在此条件下 Cedi-LS 更倾向于转果苷反应而非水解反应。大多数 LS 都在微酸(5.5)或中性 pH(7.0)下表现出最高活性[29]。例如,来自布伦勒氏菌属 *Brenneria goodwiniwas* 的 LS 在 pH 5.5 和 6.0 时表现出最高活性[30]。*L. mesenteroides* MTCC10508 LS 在 pH 5.5 时具有最高活性[31]。



(a) pH对Cedi-LS总酶活的影响　(b) pH对Cedi-LS转果苷酶活的影响　(c) pH对Cedi-LS的T/H的影响

图 3　pH 对重组 LS 的活性和 T/H 的影响

Fig. 3　Effect of pH on the activity and T/H of the recombinant LS

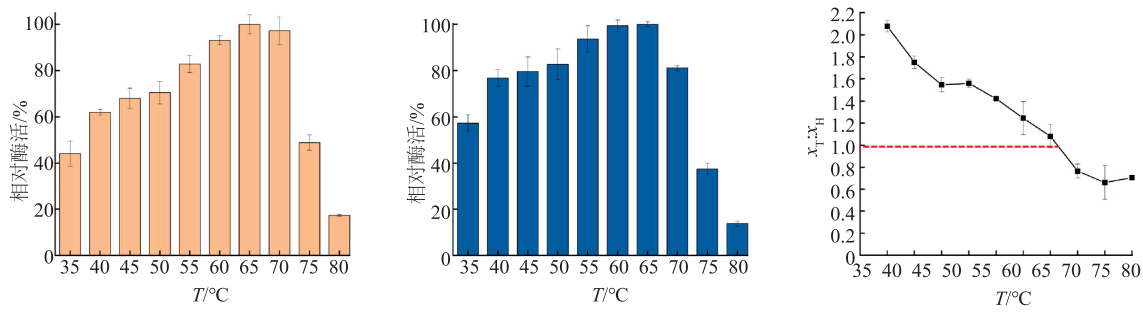
2.4 温度对酶活及 T/H 的影响

温度对 Cedi-LS 活性的影响在其最适 pH(5.5)下进行测量。如图 4(a)所示,Cedi-LS 的最适温度为 65 ℃。Cedi-LS 在 55~70 ℃的温度范围内也显示出相对较高的活性,在 70 ℃下依然可保持 80%以上的活性。然而,Cedi-LS 在 75 ℃时失去约 50%的活性,在 80 ℃时几乎完全失活。图 4(b)显示了温度对转果苷酶活的影响。Cedi-LS 在 45~70 ℃范围内均可保持超过 80%的转果苷酶活,这表明 Cedi-LS 具有转果苷反应的宽温度谱。在 35~65 ℃的温度范围内,Cedi-LS 的 x_T:x_H 始终超过 1.0,表明其在高温下仍保持优异的转果苷能力,见图 4(c)。

LS 在较低温度下表现出较高的转果苷活性,而水解活性则相反。例如,来自 *Z. mobilis* 的 LS 在 30 ℃时表现出最高的转果苷活性,而其水解酶活的最适温度为 50 ℃[32]。解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)LS 的水解和转果苷酶活最适温度分别为 45 和 40 ℃[33]。该特性还与 LS 的 x_T:x_H 有关。在较高温度(>45 ℃)下,水解是 *B. goodwinii* LS 的主要反应[30]。相比之下,Cedi-LS 在高温(>55 ℃)下依然能够保持较高的转果苷活力,这优于大多数 LS。

2.5 热稳定性测定

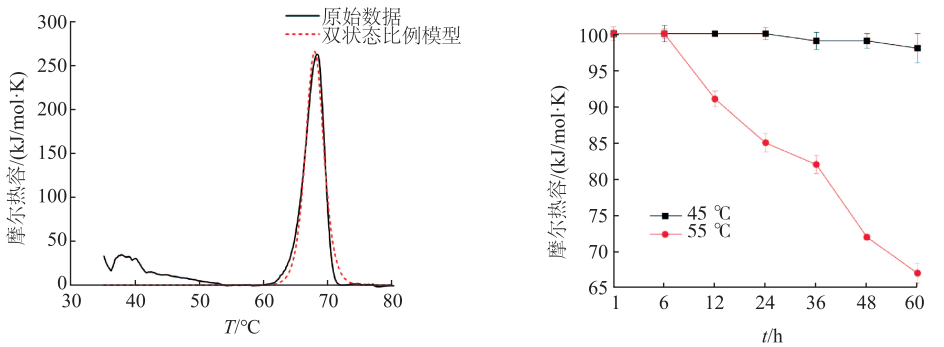
熔融温度(T_m)与酶的结构稳定性高度相关。一般来说,高 T_m 往往代表着高结构稳定性和热稳定性。经测定,Cedi-LS 的 T_m 值为 67.7 ℃(图 5(a)),显著高于来自 *L. reuteri* 121(50 ℃)和 *L. gasseri*(55 ℃)的 FS[34-35]。为了进一步测试 LS 在不同温度下的稳定性,分别在 45、55、65 ℃下对酶进行保温预处理。从结果来看,Cedi-LS 在 65 ℃下显示出低稳定性(数据未显示),但在 55 ℃和 45 ℃下表现出优异的热稳定性(图 5(b))。Cedi-LS 在 55 ℃下保温60 h 后,依然保持 60%以上的初始活性;在 45 ℃下保温 72 h 仍可保持 90%以上的初始活性。经计算,Cedi-



(a)温度对Cedi-LS总酶活的影响　(b)温度对Cedi-LS转果苷酶活的影响　(c)温度对Cedi-LS T/H的影响

图 4　温度对重组 LS 的活性和 x_T:x_H 的影响

Fig. 4　Effect of temperature on the activity and x_T:x_H of the recombinant LS



(a)Cedi-LS的T_m值　(b)Cedi-LS在45 ℃和55 ℃下的热稳定性

图 5 重组 LS 的T_m和热稳定性

Fig. 5　T_m and thermostability of recombinant LS

LS 在 55 ℃下的半衰期($t_{1/2}$)为 97 h。

除 *L. reuteri* LTH5448 LS 外，大多数 LS 在 50 ℃以上时表现出较低的热稳定性,见表 2。*B. subtilis* NRC 来源的 LS 在 50 ℃下保温 2 h 后只保留 60%的残余活力[22]。*B. goodwinii* 在 50 ℃下保温0.5 小时后几乎完全失活[30]。同样,*Bacillus* sp. TH4-2 来源的 LS 在 60 ℃下保温 30 min 即丧失 50%的初始活力[19]。来自 *G. stearothermophilus* 的 LS 被认为是最耐热的 LS，因为它可以在 4~47 ℃下 6 h 仍保持 95%以上的初始活性[20]。然而,此酶在较高温度(57 ℃)下迅速失活。

2.6　动力学参数测定及蔗糖浓度对酶活和 x_T:x_H 的影响

表 3 为 Cedi-LS 的米氏常数(Michaelis constant,K_m)和催化常数(Catalytic constant,k_{cat})。LS 作用的唯一底物就是蔗糖,但是仅仅通过测量催化该酶作用于蔗糖的 K_m 值不能够表明 LS 进行转糖苷或水解反应的速率差异。因此在计算时,作者分别使用

表 2　不同来源 LS 的热稳定性比较

Table 2　Comparison of the LS thermostability from different microorganisms

菌种来源	最适温度/℃	热稳定性	参考文献
C. diazotrophica	65	在 55 ℃保温 60 h,保留超过 60%的残余活力	本研究
B. licheniformis RN-01	50	在 50 ℃保温 1 h,丧失一半以上的初始活力	[18]
Bacillus sp. TH4-2	60	在 60 ℃保温 30 min,丧失一半的初始活力	[19]
G. stearothermophilus	57	在 4~47 ℃保温 6 h,保持 95%的初始活力	[20]
Z. mobilis	30	在 50 ℃保温 15 min,丧失活性	[36]
Brenneria sp. EniD312	45	在 45 ℃和 55 ℃的半衰期分别为 2.0 h 和 1.2 h	[37]
B. goodwinii	40	在 50 ℃保温 0.5 h,失去活性	[30]
L. reuteri LTH5448	35	在 55 ℃保温 12 h,保留 63.8%的残留活力	[9]

了葡萄糖和果糖的释放速度来表示不同形式的动力学参数。具体地,当以果糖的释放速度来表示反应速度时,得到的是关于水解酶活的动力学参数 K_m 和 k_{cat}。在这种前提下,葡萄糖的释放速度为水解速度加上转果苷反应速度。

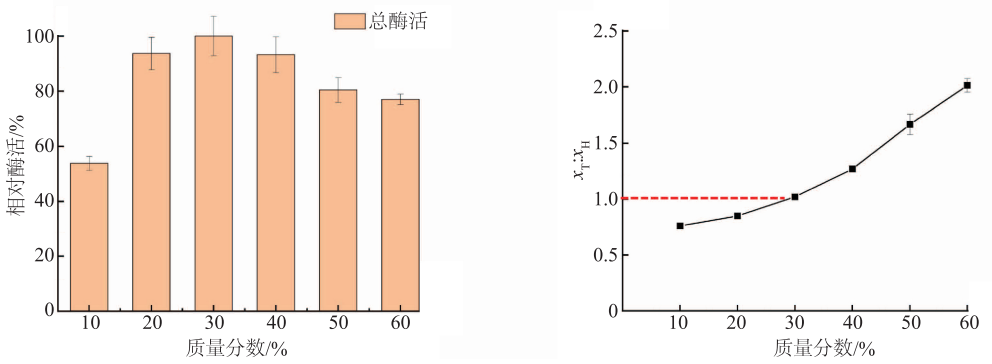
表 3　Cedi-LS 的动力学参数

Table 3　Apparent kinetic parameters of Cedi-LS

酶活	K_m/(mmol/L)	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m
水解酶活	57±2	332±22	5.8
转果苷酶活	202±7	449±13	2.2

如 6 图所示,所测得 Cedi-LS 的 K_m^F 为(57±2) mmol/L,明显低于转果苷酶 K_m(202±7) mmol/L。然而,该酶转果苷活力的 k_{cat} 值明显高于水解活力,其 k_{cat}/k_{cat} 为 1.35,显著高于 *B. subtilis* 来源的 LS(0.37)[38]。

蔗糖质量分数是影响 LS 活性的重要因素。Cedi-LS 在质量分数 30%蔗糖溶液中表现出最大活性,并且在质量分数 20%~50%条件下保持 80%以上的活性(图 6(a))。虽然 Cedi-LS 的总酶活在较高蔗糖质量分数(高于 50%)下出现轻微的降低,但在 60%蔗糖质量分数下仍可保留 70%以上的相对活性。在本研究中,Cedi-LS 的总酶活在 30%的蔗糖质量分数下出现饱和。在来自 *B. methylotrophicus* SK 21.002[7]和 *Z. mobilis*[39]的 LS 中也报告了类似结果。



(a) 蔗糖质量分数对Cedi-LS总酶活的影响　(b) 蔗糖质量分数对Cedi-LS的T/H的影响

图 6　蔗糖质量分数对重组 LS 的活性和 x_T:x_H 的影响

Fig. 6　Effect of sucrose concentration on the activity and x_T:x_H of the recombinant LS

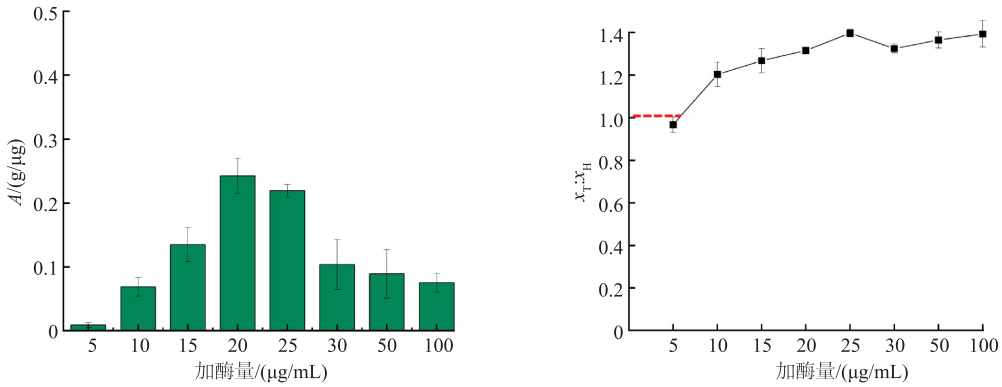
尽管酶活降低,但随着蔗糖质量分数的增加,Cedi-LS 的 x_T:x_H 始终保持上升趋势(图 6(b))。当蔗糖质量分数高于 30%时,Cedi-LS 的 x_T:x_H 高于 1.0,并且在质量分数 60%时可达到 2.0。相比之下,*E. amylovora* LS 在 100 mmol/L 蔗糖下的 x_T:x_H 约为 4,其转果苷反应在 1.5 mol/L 蔗糖下可达到 97%的最大占比[5]。

2.7　加酶量对酶活的影响

在 30%蔗糖质量分数条件下,采用 10~100 μg/mL 范围内的不同加酶量来优化 levan 的生产。由于加酶量与 levan 的产量呈现正相关,因此在本研究中,使用 levan 的产量与加酶量之比(A),即"投入产出"来作为参比。当 1 mL 反应体系中加酶量为 20 μg 或 25 μg 时,Cedi-LS 显示出较高的 A 值,其最高值出现在 20 μg/mL 的加酶量处(图 7(a))。当加酶量低于 20 μg 或高于 25 μg 时,加酶量对 Cedi-LS x_T:x_H 的影响如图 7(b)所示。蔗糖质量分数对其的影响相似,高加酶量也对 Cedi-LS 的 x_T:x_H 产生了积极影响。值得注意的是,在加酶量为 5 μg/mL 时,Cedi-LS 的 x_T:x_H 值也高于 1.0,并表现出优异的转果苷酶活。类似的结果在 *L. jensenii* LS 中也有报道[40]。相反,*B. subtilis* 来源的 LS 在 0.1 U/mL酶浓度下表现出高x_T:x_H(2.7),但当加酶量增加到 10 U/mL 时表现出低x_T:x_H[41]。

2.8　Cedi-LS 的生物转化过程

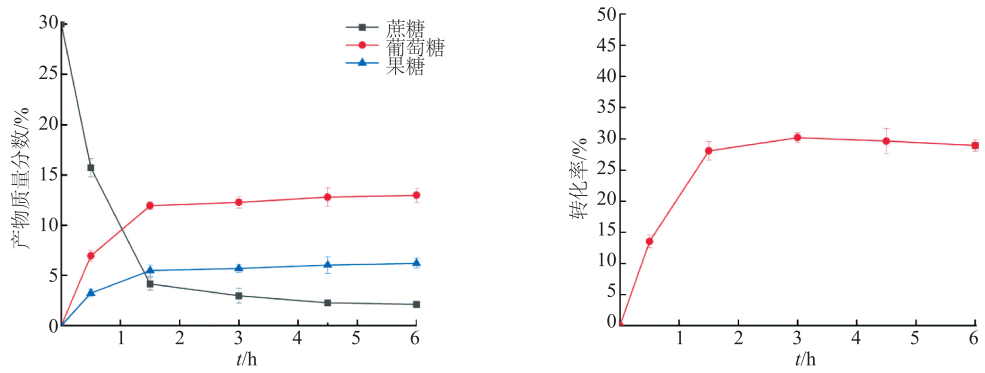
Cedi-LS 的反应在优化条件(pH 5.5、65 ℃、20 μg/mL 酶和质量分数 30%蔗糖)下进行 6 h。Cedi-LS 的生物转化过程如图 8(a)所示。蔗糖在前 1.5 h 内的反应中迅速消耗,1.5 h 后略有下降。反应体系中葡萄糖和果糖的质量随着蔗糖的消耗而逐步增加,4.5 h 后反应到达较为稳定的状态。图 8(b)显示了蔗糖和 Cedi-LS 产物之间的转化率的关系。Cedi-



(a) 加酶量对Cedi-LS的影响　(b) 加酶量对Cedi-LS的x_T:x_H的影响

图 7　加酶量对重组 LS 的酶活比的影响

Fig. 7　Effect of enzyme concentration on the x_T:x_H of the recombinant LS



(a) Cedi-LS生物转化过程中蔗糖、葡萄糖和果糖质量分数的变化　(b) Cedi-LS生物转化过程中转化率的变化

图 8　重组 LS 的生物转化过程和转化率

Fig. 8　Biotransformation process and conversion rate of recombinant LS

LS 的转化率在前 1.5 h 内出现快速增加,随后在 3 h 达到最大值 30.2%。相比之下,来自 *B. methylotrophicus* SK 21.002 和 *B. licheniformis* NS032 的 LS 也能有效地生产 levan,其转化率分别为 33%和 25%[7,42]。从目前来看,*E. amylovora* 来源的LS 产物转化率最高,可达到 59%[43]。

2.9　温度对 Cedi-LS 产物分布的影响

许多因素都被认为是影响 LS 产物特异性的潜在原因,如蔗糖质量分数[5]和酶质量浓度[44]。温度也会影响 LS 的产物特异性,然而温度如何影响 LS 的产物特异性仍不清楚。为了研究温度对 Cedi-LS 产物分布的影响,将反应温度从 65 ℃降至 35 ℃。在 35 ℃下,Cedi-LS 的产物转化率增长到 41.4%,x_T 增长为 2.3。此外,当温度降至 45 ℃和 35 ℃时,Cedi-LS 的反应液黏度明显增加。在反应 2 h 后,反应溶液呈现出凝胶状外观。

为了进一步确定在不同温度下产物分布的变化情况,通过 HPGFC 对反应产物的组分进行了详细分析(图 9)。在 65 ℃的最适温度下,Cedi-LS 可以在反应中同时产生 FOS、LMW-levan (4.1×10^4)和 HMW-levan(1.8×10^6)。当反应温度降低时,Cedi-LS 生产的 levan 显示出更高的相对分子质量,在 35 ℃时其相对分子质量可达 8.4×10^6。与此同时,低温也导致 HMW-levan 的产量进一步增加。相对分子质量及HMW-levan 产量的增加可能是导致反应液黏度升高的原因。许多 LS 在低温下都出现 HMW-levan 产量增加的现象。例如,来自 *R. aquatilis* ATCC 33071 的 LS 主要在 55~60 ℃下产生 FOS,而在低温(37 ℃)下合成 HMW-levan(1.0×10^6)[45]。在 *Z. mobilis* LS 的反应中,HMW-levan 的产量在低温(4 ℃)下明显增加[46]。

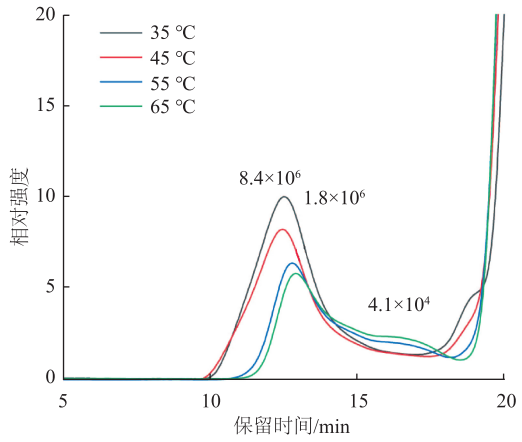


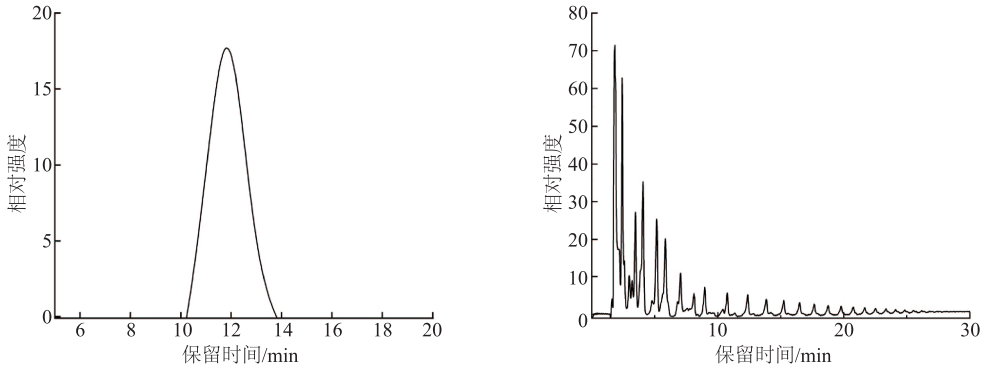
图 9　温度对重组 LS 产物分布的影响

Fig. 9　Effect of temperature on the product distribution of the recombinant LS

2.10　产物纯化和分析

用 Sevag 试剂去除反应混合物中残留的酶，并使用乙醇沉淀法分离多糖。当乙醇终体积分数为 60%时，反应液中出现明显的多糖沉淀。多次沉淀以提高所得多糖的纯度。将获得的沉淀真空冷冻干燥 48 h 以完全除去水分(图 10(a))。通过 NMR 分析 Cedi-LS 生产的多糖的糖苷键类型(图 S1,S2)。将获得的 ^{1}H 光谱图与 *L. reuteri* LTH5448 LS 和 *L. jensenii* IS 的光谱图进行比较[9,40]。同时，将 ^{13}C 化学位移与 *B. licheniformis* ANT 179[45]和 *B. methylotrophicus* SK 21.002 生物合成的 levan 进行比较(表 S2)[7]。

结果表明，Cedi-LS 合成的多糖为 β-(2,6)型果聚糖，即 levan。Cedi-LS 合成的 HMW-levan 的相对分子质量为 8.4×10⁶ (35 ℃)，分散指数(Polydispersity,PD)为 1.82。FOS 通过活性炭层析法进一步纯化，并在冷冻干燥机中干燥 48 h。经纯化后的 FOS(DP<20)纯度可达到 90%以上(图 10(b))。



(a) 纯化后HMW-levan的HPGFC谱图　(b) 纯化后FOS的HPAEC-PAD谱图

图 10　来自重组 LS 的产

Fig. 10　Products from the recombinant LSs

3　结　语

作者通过动力学模拟成功地获得了具有高热稳定性的新型 LS，并对 *C. diazotrophica* 来源 LS (Cedi-LS) 的理化性质和动力学性质进行了表征。与之前报道的 LS 相比，该重组酶表现出优异的热稳定性。在 45 ℃下保温 72 h 后，Cedi-LS 仍保持了超过 90%的初始活性；在 55 ℃下保温 60 h 后依然能够维持超过 60%的残余活性。Cedi-LS 能够同时生成 FOS、LMW 和 HMW-levan。当温度降低时，Cedi-LS 合成的 levan 的相对分子质量明显增加，从 1.8×10⁶ 增加到 8.4×10⁶。同时，HMW-levan 的产量也有所增长。在 pH 5.5 和 35 ℃，酶用量为 20 μg/mL，底物为质量分数 30%蔗糖溶液的条件下反应 6 h，levan 的转化率可达到 41.1%。此外，Cedi-LS 生产的 FOS 和 HMW-levan 均被成功纯化。纯化得到的 HMW-levan 相对分子质量为 8.4×10⁶(35 ℃)，PD 值为 1.82。同时，纯化得到的 FOS(DP<20)的纯度可达到 90%以上。

参考文献：

[1] LAMMENS W,LE Roy K,SCHROEVEN L,et al. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications[J]. **Journal of Experimental Botany**,2009,60:727-740.

[2] BELGHITH K S,DAHECH I,Belghith H,et al. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2012,50:451-458.
[3] OZIMEK L K,KRALJ S,VAN DER Maarel M,et al. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions[J]. **Microbiology**,2006,152:1187-1196.
[4] WANG X,YU S H,ZHANG T,et al. From fructans to difructose dianhydrides[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99:175-188.
[5] CAPUTI L,NEPOGODIEV S A,MALNOY M,et al. Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*,a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2013,61:12265-12273.
[6] VIGANTS A,KRUCE R,BEKERS M,et al. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride[J]. **Biotechnology Letters**,1998,20:1017-1019.
[7] ZHANG T,LI R,QIAN H,et al. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002[J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,101:975-981.
[8] PAUL A,SAMADDAR N,DUTTA D,et al. Mercuric ion stabilizes levansucrase secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1[J]. **Protein Journal**,2011,30:262-272.
[9] NI D,XU W,BAI Y,et al. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,113:29-37.
[10] GAO S,QI X,HART D J,et al. Expression and Characterization of levansucrase from *Clostridium acetobutylicum*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65:867-871.
[11] RAGAB T I M,SHALABY A S G,AWDAN S A E,et al. Role of levan extracted from bacterial honey isolates in curing peptic ulcer:In vivo[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,142:564-573.
[12] ESAWY M A,AMER H,GAMAL-ELDEEN A M,et al. Scaling up,characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage'[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,95:578-587.
[13] ESAWY M A,AHMED E F,HELMY W A,et al. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans[J]. **Carbohydrate Polymers**,2011,86:823-830.
[14] DAL Bello F,WALTER J,HERTEL C,et al. In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. **Systematic and Applied Microbiology**,2001,24:232-237.
[15] MANO M C R,NERI-NUMA I A,DA SILVA J B,et al. Oligosaccharide biotechnology:an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2018,102:17-37.
[16] RAVEENDRAN S,PARAMESWARAN B,UMMALYMA S B,et al. Applications of microbial enzymes in food industry[J]. **Food Technology and Biotechnology**,2018,56:16-30.
[17] DANIEL R M,DANSON M J. Temperature and the catalytic activity of enzymes:a fresh understanding[J]. **FEBS Letters**,2013,587:2738-2743.
[18] KLAEWKLA M,PICHYANGKURA R,CHAROENWONGPAIBOON T,et al. Computational design of oligosaccharide producing levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 to improve its thermostability for production of levan-type fructooligosaccharides from sucrose[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,160:252-263.
[19] BEN AMMAR Y,MATSUBARA T,ITO K,et al. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature[J]. **Journal of Biotechnology**,2002,99:111-119.
[20] INTHANAVONG L,TIAN F,KHODADADI M,et al. Properties of *Geobacillus Stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides[J]. **Biotechnology Progress**,2013,29:1405-1415.
[21] REICH S,KRESS N,NESTL B M,et al. Variations in the stability of NCR ene reductase by rational enzyme loop modulation[J]. **Journal of Structural Biology**,2014,185:228-233.
[22] EL-REFAI H A,ABDEL-FATTAH A F,MOSTAFA F A. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2009,25:821-827.

[23] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248-254.
[24] MAIER J A,MARTINEZ C,KASAVAJHALA K,et al. ff14SB:improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB[J]. **Journal of Chemical Theory and Computation**,2015,11:3696-3713.
[25] ABRAHAM M J,MURTOLA T,SCHULZ R,et al. GROMACS:High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. **SoftwareX**,2015,19(25):70-75.
[26] HON J,BORKO S,STOURAC J,et al. EnzymeMiner:automated mining of soluble enzymes with diverse structures,catalytic properties and stabilities[J]. **Nucleic Acids Research**,2020,48:W104-W109.
[27] WATERHOUSE A,BERTONI M,BIENERT S,et al. SWISS-MODEL:homology modelling of protein structures and complexes [J]. **Nucleic Acids Research**,2018,46:W296-W303.
[28] HILL A,CHEN L,MARIAGE A,et al. Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides[J]. **Catalysis Science & Technology**,2019,9:2931-2944.
[29] XU W,NI D,ZHANG W,et al. Recent advances in levansucrase and inulosucrase:evolution,characteristics,and application[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2019,59:3630-3647.
[30] LIU Q,YU S,ZHANG T,et al. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*[J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,157:1732-1740.
[31] JADAUN J S,NARNOLIYA L K,AGARWAL N,et al. Catalytic biosynthesis of levan and short-chain fructooligosaccharides from sucrose-containing feedstocks by employing the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2019,127:486-495.
[32] SANGILIYANDI G,CHANDRA Raj K,GUNASEKARAN P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*[J]. **Biotechnology Letters**,2004,21:179-182.
[33] 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.
[34] NI D,KIRTEL O,YIN D,et al. Improving the catalytic behaviors of *Lactobacillus*-derived fructansucrases by truncation strategies [J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2021,149:109857.
[35] NI D,ZHANG S,KIRTEL O,et al. Improving the thermostability and catalytic activity of an inulosucrase by rational engineering for the biosynthesis of microbial inulin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69:13125-13134.
[36] LI S,YAN Y,ZHOU Z,et al. Single amino acid residue changes in subsite -1 of levansucrase from *Zymomonas mobilis* 10232 strongly influence the enzyme activities and products[J]. **Molecular Biology Reports**,2011,38:2437-2443.
[37] XU W,NI D,YU S,et al. Insights into hydrolysis versus transfructosylation:mutagenesis studies of a novel levansucrase from *Brenneria* sp. EniD312[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,116:335-345.
[38] ORTIZ-SOTO M E,PORRAS-DOMINGUEZ J R,RODRIGUEZ-ALEGRIA M E,et al. Implications of the mutation S164A on *Bacillus subtilis* levansucrase product specificity and insights into protein interactions acting upon levan synthesis[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,161:898-908.
[39] OKUYAMA M,SERIZAWA R,TANUMA M,et al. Molecular insight into regioselectivity of transfructosylation catalyzed by GH68 levansucrase and beta-fructofuranosidase[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2021,296:100398.
[40] NI D,CHEN Z,XU W,et al. Efficient production of inulin and oligosaccharides using thermostable inulosucrase from *Lactobacillus jensenii*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,165:1250-1257.
[41] RAGA-CARBAJAL E,CARRILLO-NAVA E,COSTAS M,et al. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase[J]. **Glycobiology**,2016,26:377-385.
[42] KEKEZ B D,GOJGIC-CVIJOVIC G D,JAKOVLJEVIC D M,et al. High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2015,175:3068-3083.
[43] PENG J,XU W,NI D,et al. Preparation of a novel water-soluble gel from *Erwinia amylovora* levan[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2019,122:469-478.
[44] RAGA-CARBAJAL E,CARRILLO-NAVA E,COSTAS M,et al. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase[J]. **Glycobiology**,2016,26:377-385.
[45] ONER E T,HERNANDEZ L,COMBIE J. Review of Levan polysaccharide:From a century of past experiences to future prospects[J]. **Biotechnology Advances**,2016,34:827-844.