

研究报告

重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的表达条件优化

张洪斌, 胡雪芹, 冒小青, 王雅洁

合肥工业大学化工学院制药工程系, 合肥 230009

摘要: 通过设计正交实验, 考察了培养基中各组分及其浓度对右旋糖酐蔗糖酶工程菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET28-dexYG 诱导产酶结果的影响。在获得最佳培养条件的基础上, 考察温度、蔗糖浓度和 pH 值对右旋糖酐产量的影响。结果表明: 菌浓 OD_{600} 达到 2.0 时, 加入异丙基硫代- β -D-呋喃半乳糖苷(IPTG)至 0.25 mmol/L, 25°C 诱导培养 4 h, 产酶活力最高, 达到 110.16 U/mL, 蔗糖浓度对产量的影响比较显著。研究结果得到高效表达的培养条件, 为实现该酶的工业化应用打下了基础。

关键词: 右旋糖酐蔗糖酶, 表达, 优化, 右旋糖酐

Optimization of culture conditions for recombinant dextransucrase expression

Hongbin Zhang, Xueqin Hu, Xiaoqing Mao, and Yajie Wang

Department of Pharmaceutical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

Abstract: We optimized the medium for recombinant dextransucrase expression in engineering strain *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET28-dexYG by an Orthogonal experiment. After the medium had been decided, we studied the effect of temperature, sucrose concentration and pH value on the yield. The results indicated that optimal conditions were adding IPTG of 0.25 mmol/L when OD_{600} reached 2.0 and cultivation lasted for 4 h at 25°C. Under the selected medium and these conditions, the dextransucrase activity expressed by the engineering strain was high activity. Maximal activity reached 110.16 U/mL sucrose concentration effects the dextran yield gratefully. The results for dextransucrase expression would provide foundation for industrial application of dextransucrase.

Keywords: dextransucrase, expression, optimization, dextran

右旋糖酐蔗糖酶(Dextransucrase, EC 2.4.1.5)是一种分泌型葡萄糖基转移酶^[1], 该酶以蔗糖为底物, 将蔗糖分子中 D-吡喃葡萄糖基催化转移到葡聚糖分子中, 其结果可以生成不同分子量的右旋糖酐, 同

时伴有果糖产生^[2-3]。很多菌株, 比如肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc*)、链球菌(*Streptococcus*)和乳酸菌(*Lactobacillus*)都能在一定的培养条件下生产该酶。右旋糖酐蔗糖酶的主要产物右旋糖酐因其具有安

Received: September 23, 2009; **Accepted:** November 4, 2009

Supported by: Key Program of Anhui Province College Science Research (No. KJ2008A067), Ph.D Foundation of Hefei University of Technology (No. GDBJ2008-021).

Corresponding author: Hongbin Zhang. Tel: +86-551-2901968; Fax: +86-551-2901968; E-mail: zhb5678@163.com
安徽高校省级自然科学研究重点项目(No. KJ2008A067), 合肥工业大学博士基金(No. GDBJ2008-021)资助。

全、无毒、生物相容性好等多种优点, 已被广泛应用于医药、食品、色谱分析等多个领域^[4], 右旋糖酐是目前公认的优良血浆代用品之一, 有增加血容量作用, 临床主要用于治疗失血性休克^[5]; 若在酶反应中加入受体如麦芽糖、异麦芽糖等可合成功能低聚糖^[6-7]。果糖是该酶催化的副产物, 其在医药领域中具有重要用途。

获取高活性的右旋糖酐蔗糖酶, 对于实现该酶的诸多应用、提高产品品质具有重要意义。但肠膜状串珠菌在产右旋糖酐蔗糖酶的过程中, 由于其碳源与酶底物均为蔗糖, 产生了高黏度的右旋糖酐, 对酶的提取纯化和催化产物的质量控制都造成很大的困难^[3, 8]。因此, 利用分子生物学技术获得新的酶源是目前研究热点之一, 根据文献报道对该酶的克隆表达始于 90 年代^[9-10]。Wilke-Douglass 等^[11]首次从 *Lm* NRRL B2512F 克隆得到右旋糖酐蔗糖酶基因 *dsrS*, 并在 1997 年对重组酶的性质及影响其酶活的关键氨基酸序列进行了鉴定^[12]; 瑞士的 Neubauer 等^[13]克隆出右旋糖酐蔗糖酶基因 *dsrD* 并在酵母菌转化获得基因工程菌, 所得重组酶催化转化率达到 60%, 但对该酶的原核表达未见明显的提高。本实验室 2005 年从一株 *L. mesenteriodes* 中扩增出右旋糖酐蔗糖酶基因 DexYG(GenBank Accession No. DQ34576), 并成功构建了表达型的重组右旋糖酐蔗糖酶工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET28-dexYG, 然后在此基础上对其诱导培养条件进行了初步优化, 使其酶活由最初的 5.39 U/mL 提高到 35.62 U/mL^[14-15], 并对重组酶进行了分离纯化和酶学性质研究^[16]; 同时尝试利用乳糖对其诱导表达取得了一些成效, 最高活力达到 45.18 U/mL^[17]。本研究通过对培养基成分和表达条件的进一步优化, 实现在该工程菌中高效表达高活力的右旋糖酐蔗糖酶, 为该酶的工业化生产与应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28-dexYG 由本实验室构建、保存。

1.2 主要试剂和仪器

异丙基硫代- β -D 半乳糖苷(IPTG)购自默克公司; 卡那霉素购自上海捷瑞; 其他常用试剂均为市售国产试剂。1515 型高效液相色谱仪(Waters 公司); VIS-723 紫外分光光度计(上海精密科学仪器公司); GL-20G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); MDFU332 型低温冰箱 (-50°C)(日本 SanYo); PHS-4CT 型 pH 计(上海康仪仪器); HQL-300B 恒温冷冻摇床(武汉中科仪器厂)。

1.3 右旋糖酐蔗糖酶的表达

将基因工程菌 BL21(DE3)/pET28-dexYG 于 37°C、含卡那霉素(50 g/mL)的 LB 培养基中进行过夜密集培养^[15]。将过夜培养的细菌按照 1% 的接种量接种到含卡那霉素(50 g/mL)的新鲜培养基中, 37°C、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 25°C、250 r/min 诱导 4 h 右旋糖酐蔗糖酶的表达。收集细菌沉淀, 超声破碎细菌后, 离心收集上清。

1.4 右旋糖酐蔗糖酶活力测定

方法参照文献^[14]。

1.5 酶表达培养基的组成研究

培养基各组成及浓度研究, 通过 $L_{18} 7^3$ 七因素三水平正交实验, 各因素与水平见表 1。按照表 1 分别配制培养基, 并照 1.3 中分别在不同培养基中表达右旋糖酐蔗糖酶, 检测酶活。

表 1 培养基优化正交实验因素水平表

Table 1 Selected factors and assigned levels for optimizing medium components and concentration

Serial No.	Factor	Level 1	Level 2	Level 3
1	Glycerol (g/L)	0	5	10
2	Glucose (g/L)	0	5	10
3	Tryptone (g/L)	5	10	15
4	Yeast extract (g/L)	2.5	5	10
5	M9 salt solution(multiple)	0	0.5×	1×
6	Calcium chloride(mmol/L)	0	0.05	0.1
7	Magnesium sulfate (mmol/L)	0	0.1	0.2

10× M9 salt solution^[18](1 L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g; KH_2PO_4 3 g; NaCl 0.5g; NH_4Cl 1 g.

1.6 菌体生长曲线研究

将基因工程菌 BL21 (DE3)/pET28-dexYG 于 37°C、含卡那霉素(50 g/mL)的 LB 培养基中进行过

夜密集培养。将过夜培养的细菌按照 1% 的接种量分别接种到含卡那霉素(50 g/mL)的 LB 培养基和经过正交优化后的表达培养基中, 37°C、250 r/min 培养, 4 h 后加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 25°C、250 r/min 诱导培养 8 h, 每小时取样测 OD_{600} 和 pH 值。

1.7 酶表达条件的研究

在正交实验确定培养基组分的情况下, 选择最优培养基, 研究诱导菌浓、IPTG 诱导浓度对酶活的影响。

1.8 重组右旋糖酐蔗糖酶合成右旋糖酐的研究

通过改变反应体系中反应温度、蔗糖浓度和 pH 值, 研究不同反应条件对产量与特性黏度的影响。酶催化反应参见文献[14], 反应 5 h 后, 向反应液中加入两倍体积 95% 的乙醇, 离心后弃上清液。沉淀在 75% 乙醇中反复捏洗后, 置于 60°C 干燥, 称重计算产量。另取 0.1 g 样品溶解于 50 mL 去离子水, 过滤后用乌式黏度计在 25°C 测量特性黏度。

1.9 HPLC 检测右旋糖酐分子量及分布

采用 HPLC 法分析特性黏度不同的两种右旋糖酐产物, 色谱条件如下: GPC 分离柱(7.8 mm×300 mm),

2414 型示差折光检测器; 流动相为纯水, 流速 0.6 mL/min, 样品质量浓度 1 g/L; 检测器温度 40°C, 柱温度 60°C。

2 结果

2.1 酶表达培养基的组成研究

通过表 1 正交实验, 对培养基各组成及浓度进行了研究, 结果见表 2。最佳诱导产酶培养基为: 甘油(Glycerol) 5 g/L, 葡萄糖(Glucose) 5 g/L, 胰蛋白胍(Tryptone) 5 g/L, 酵母浸膏(Yeast extract) 5 g/L, 1×M9 盐(M9 salt solution), 镁离子(Magnesium sulfate) 0.1 mmol/L。根据极差, 各成分对酶表达的影响大小: M9 盐 > 镁离子 > 胰蛋白胍 > 酵母浸膏 > 葡萄糖 > 甘油。

2.2 菌体生长曲线研究

分别对 LB 培养基和经过正交优化后的表达培养基中的菌体生长曲线进行了研究, 结果见图 1。在上述两种培养基中, pH 的变化趋势截然不同, 在 LB 培养基中随着菌的生长和 IPTG 的加入, pH 渐渐上升, 而在优化后的表达培养基中 pH 值是下降的。

表 2 $L_{18}(3^7)$ 正交实验结果

Table 2 $L_{18}(3^7)$ orthogonal array of design experiments

Experiment No.	Glycerol	Glucose	Tryptone	Yeast extract	M9 salt solution	Calcium chloride	Magnesium sulfate	Dextranucrase activity (U/mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	0.806
2	1	2	2	2	2	2	2	2.575
3	1	3	3	3	3	3	3	5.233
4	2	1	1	2	2	3	3	3.984
5	2	2	2	3	3	1	1	9.014
6	2	3	3	1	1	2	2	1.047
7	3	1	2	1	3	2	3	1.687
8	3	2	3	2	1	3	1	1.047
9	3	3	1	3	2	1	2	1.567
10	1	1	3	3	2	2	1	4.345
11	1	2	1	1	3	3	2	11.748
12	1	3	2	2	1	1	3	0.685
13	2	1	2	3	1	3	2	0.768
14	2	2	3	1	2	1	3	2.011
15	2	3	1	2	3	2	1	8.894
16	3	1	3	2	3	1	2	13.321
17	3	2	1	3	1	2	3	0.942
18	3	3	2	1	2	3	1	2.455
K_1	4.232	4.152	4.657	3.292	0.882	4.567	4.427	
K_2	4.286	4.556	2.864	5.084	2.823	3.248	5.171	
K_3	3.503	3.314	4.501	3.645	8.316	4.206	2.424	
R	0.783	1.242	1.793	1.792	7.434	1.319	2.747	

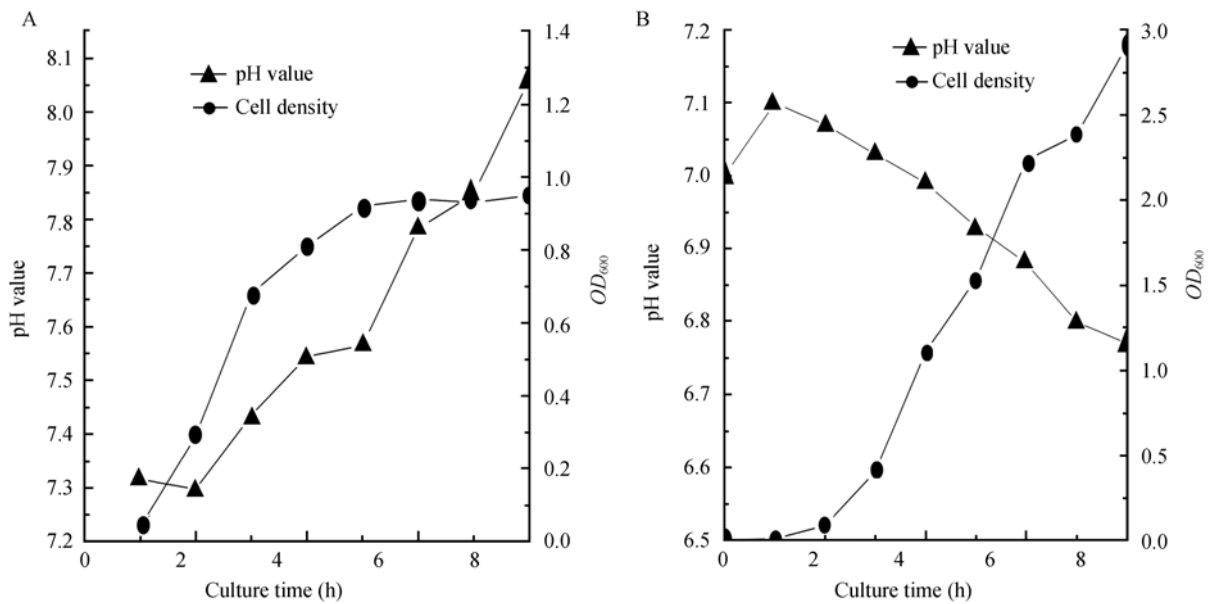


图 1 工程菌在 LB、表达培养基中的生长曲线

Fig. 1 Cell density and pH value of medium during cultivation in different medium. (A) LB medium. (B) Optimized medium.

在以前的研究中^[15], 在 LB 培养基中表达该酶活力比较低, 后经研究发现, 偏酸的环境(pH 6.0 左右)有利于该酶的表达。在优化后的表达培养基中, M9 盐离子中的磷酸盐、甘油的代谢物对于保持溶液的 pH 值在培养过程中下降有一定关系。从菌浓变化可以看到, 在 LB 培养基中, 加入 IPTG 后, 菌体几乎停止生长。而在优化后的表达培养基中, 外源蛋白高效表达并不影响菌体正常生长。

2.3 酶表达条件的研究

2.3.1 IPTG 浓度的影响

将过夜培养的细菌分别按照 1%的接种量接种到含卡那霉素(50 g/mL)的优化表达培养基中, 37°C、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25、0.5、1 mmol/L, 25°C、250 r/min 培养 4 h。将发酵液离心、破碎后, 检测三者酶活分别为 7.47、7.34、7.65 U/mL, 三者相差不大, 得出 0.25 mmol/L IPTG 为最佳条件。

2.3.2 诱导菌浓的影响

在不同菌浓(OD₆₀₀ 值)下对菌体进行诱导研究, 结果见图 2。根据实验结果, 当菌浓 OD₆₀₀=2.0 时加入 IPTG, 诱导 4 h 后酶活达到 110.16 U/mL, 远高于其他菌浓下诱导的最大酶活。综合之前的实验结果, 该酶表达的最佳条件是在菌浓达到 2.0 时, 加入 0.25 mmol/L IPTG, 然后在 25°C、250 r/min 诱导 4 h。

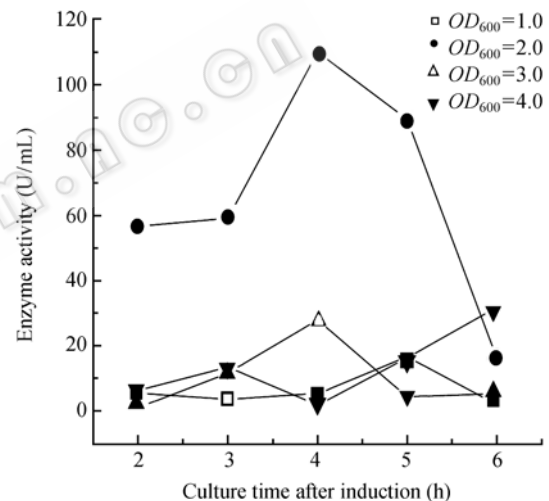


图 2 诱导菌浓对酶活的影响

Fig. 2 Effect of inducing cell density on dextransucrase expression.

2.4 重组右旋糖酐蔗糖酶合成右旋糖酐的研究

在不同反应温度、蔗糖浓度和 pH 值条件下对产物的产量和特性黏度的影响进行了研究, 结果见图 3。从图 3A 可以看到, 随着温度的升高, 产量和特性黏度都是先升后降, 都在 25°C 时取最大值。当温度继续升高到 35°C 时, 由于酶热稳定性较差, 所以在此温度下很快失活, 并未有右旋糖酐生成。从图 3B 得出结论, 随着蔗糖浓度的增加, 产量下降, 在蔗糖浓度为 5% 时产量最高, 达到 83.3%, 当蔗糖浓度提高到 30%, 产量下降到 17.8%。根据图 3C, 右旋糖酐产量随着 pH 值的增加而提高, 产物的特性

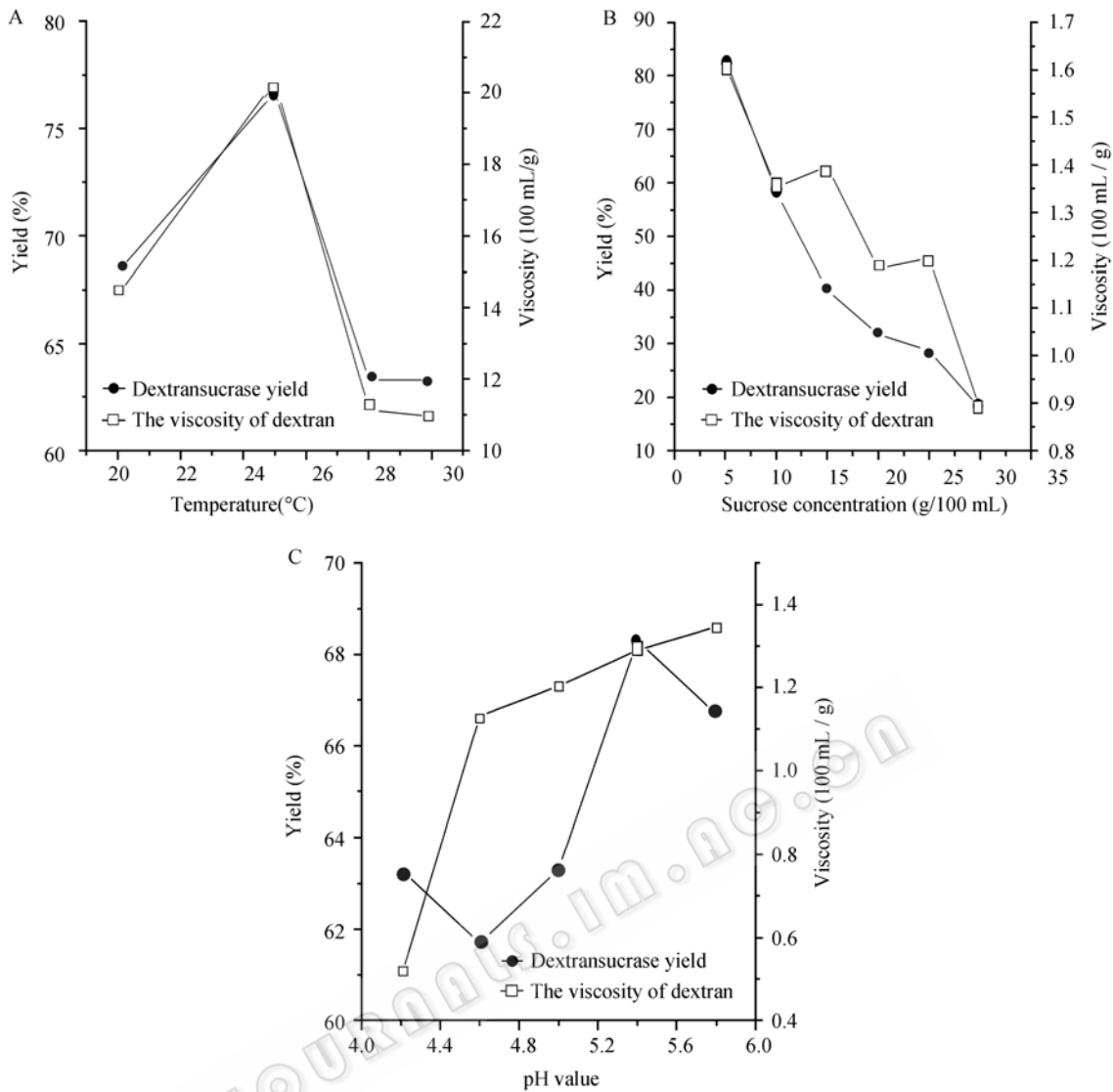


图 3 反应温度、蔗糖浓度和 pH 值对合成产物的影响

Fig. 3 Effects of temperature, sucrose concentration and pH value on dextran synthesis. (A) Effect of temperature. (B) Effect of sucrose concentration. (C) Effect of pH value.

黏度在 pH 4.2 时最小。蔗糖浓度对右旋糖酐产量的影响最大，其次是温度，影响最小的是 pH 值。

2.5 HPLC 检测右旋糖酐分子量及分布

分别取特性黏度 $[\eta]=0.4225$ 、 1.0755 g/100 mL 的右旋糖酐，进行 HPLC 分析，结果见表 3。

从表 3 的结果看，特性黏度相差比较大的两种右旋糖酐样品中所含有的糖酐成分相同。由重组右旋糖酐以蔗糖为底物，经过不同的反应条件合成的糖酐样品都含有分子量为大于 100 万、约 70 万和 40 万的 3 种糖酐。

虽然 LB 培养基是常见的被用于外源蛋白表达的培养基，但是该重组右旋糖酐蔗糖酶在 LB 培养

表 3 右旋糖酐分子量分布

Table 3 Molecular weight distribution of dextran

Sample	Retention time (min)	Molecular weight	Content (%)
1 [η]=0.4225g/100mL	17.550	> 1 000 000	58.94
	19.433	663 869	24.23
	20.567	315 709	16.83
2 [η]=1.0755g/100mL	17.269	> 1 000 000	67.19
	19.350	703 456	22.09
	20.414	347 398	10.73

基中的表达量很少。在本实验中，通过设计正交实验考察培养基成分，选择了一种营养成分更加合理、更适合该酶表达的培养基。在优化后的表达培养基中，菌体生长快速，实现了重组右旋糖酐蔗糖酶的高效表

达, 并且利用该酶可以合成高分子量的右旋糖酐。

3 讨论

迄今为止, 有关右旋糖酐蔗糖酶基因的克隆与表达在我国文献报道较少, 邵彦春等^[19]克隆出该基因(GenBank Accession No. Y743959)在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 系统中表达, 将发酵液浓缩 1000 倍才见微弱酶活力; 国外研究者^[13]构建的以酵母为宿主菌的工程菌产酶活力也较低。本实验室在以前的研究中, 利用原核细胞来表达右旋糖酐蔗糖酶基因, 经过初步实验使其表达的酶活由最初的 5.39 U/mL 提高到 35.62 U/mL^[15], 说明培养基条件组分和诱导条件对原核生物的表达影响很大。论文以含右旋糖酐蔗糖酶基因的重组大肠杆菌为出发菌株, 从 LB 的基础成分酵母浸膏和蛋白胨入手, 进一步研究其配比, 并加入了 M9 盐离子和其他微量元素, 同时考察了两种碳源葡萄糖和甘油对表达的影响, 使重组右旋糖酐蔗糖酶在大肠杆菌中的表达得到了较大的提高。在研究的培养基组分中除了钙离子之外, 其他成分都对表达有不同程度的促进作用, 此结果与该酶在原始菌中的分泌截然不同, 本研究组在对肠膜状明串珠菌产右旋糖酐蔗糖酶的研究中发现钙离子是重要的促进剂^[20], Yang 等^[21]在大肠杆菌中表达右旋糖酐蔗糖酶基因 *dsrX* 中发现 1 mmol/L Mn^{2+} 对该酶的表达有促进作用, 而 1 mmol/L Cu^{2+} 或 Al^{3+} 对酶表达有较强的抑制作用, 从实验结果与文献分析可知, 诱导效果在一定程度上依赖于培养基成分, 而且一定浓度的无机离子对于基因的表达有很大影响。另外镁离子对于保持基因稳定性是很必须的, 它能保持 DNA 和染色体的结构稳定性, 是酶反应中的重要辅助因子^[22]。研究中还发现蔗糖浓度 5% 时右旋糖酐产量最高, 当蔗糖浓度提高到 30%, 产量下降到 17.8%, Santos 等^[3]在研究原始菌株肠膜状明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 发酵时, 发现高浓度蔗糖对酶合成没有抑制作用, 但蔗糖浓度超过 40% 时菌体不能分离, 说明底物浓度对该重组酶合成能力有较大影响。

通过正交实验获得优化后的表达培养基为: 甘油 5 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 胰蛋白胨 5 g/L, 酵母浸膏

5 g/L, $1\times M9$ 盐, 镁离子 0.1 mmol/L; 当菌浓 $OD_{600}=2.0$ 时, 加入 IPTG 至 0.25 mmol/L 诱导培养 4 h, 产酶活力最高, 达到 110.16 U/mL, 研究结果得到高效表达的培养条件, 为实现该酶的工业化应用打下了基础。

REFERENCES

- [1] Davies G, enrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995, **3**: 853–859.
- [2] Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **23**: 131–151.
- [3] Santos M, Teixeira J, Rodrigues A. Production of dextranucrase, dextran and fructose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512. *Biochem Eng J*, 2000, **4**: 177–188.
- [4] Shamala TR, Prasad MS. Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp.. *Process Biochem*, 1995, **30**(3): 237–241.
- [5] The People's Republic of China Pharmacopoeia Committees. The People's Republic of China Pharmacopoeia (2). 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
中华人民共和国药典委员会编.《中华人民共和国药典》(二部). 2005 版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] Moulis C, Medina GV, Suwannarangsee S, et al. One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextranucrase. *Biocatal Biotransform*, 2008, **26**: 141–151.
- [7] Heincke K, Demuth B, Jordening HJ, et al. Kinetics of the dextranucrase acceptor reaction with maltose-experimental results and modeling. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24**: 523–534.
- [8] Kima YM, Seoc M, Kanga HK, et al. Construction of a fusion enzyme of dextranucrase and dextranase: application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol*, 2009, **44**: 159–164.
- [9] Robyt JF, Yoon SH, Mukerjea R. Dextranucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydr Res*, 2008, **343**: 3039–3048.
- [10] Moulis C, Joucla G, Harrison D, et al. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J Biol Chem*, 2006, **281**(42): 31254–31267.
- [11] Wilke-Douglas M, Perchorowicz JT, Houch CM, et al. Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products: US patent, WO89/12386. 1989-12-28.
- [12] Monchois V. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 465–472.

- [13] Neubauer H, Bauche A, Mollet B. Molecular characterization and expression analysis of the dextranucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiol*, 2003, **149**: 973–982.
- [14] Zhang HB, Zhu CB, Hu YJ, *et al.* Cloning, sequencing and expression of a dextranucrase gene (*dexYG*) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**: 1441–1446.
- [15] Zhang HB, Zhu CB, Hu YJ, *et al.* Construction and culture conditions of engineered dextranucrase-producing strain. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(4): 1–6.
张洪斌, 朱春宝, 胡又佳, 等. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究. *微生物学报*, 2008, **48**(4): 1–6.
- [16] Wang YJ, Zhang HB, Hu XQ, *et al.* Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli* dextranucrase. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(9): 1266–1269.
王雅洁, 张洪斌, 胡雪芹, 等. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的纯化及其性质研究. *微生物学报*, 2008, **48**(9): 1266–1269.
- [17] Zhang HB, Wang YJ, Hu XQ, *et al.* Effect of different culture conditions for dextranucrase production in *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Afr J Biotechnol*, 2009, **8**(8): 1577–1582.
- [18] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ed. Beijing: Science Press, 2002: 1596.
- [19] Shao YC, Wang JH, Teng D, *et al.* Cloning and sequence analysis of gene coding for dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Microbiology*, 2005, **32**(3): 20–23.
邵彦春, 王建华, 腾达, 等. 右旋糖酐蔗糖酶基因的克隆及其序列分析. *微生物学通报*, 2005, **32**(3): 20–23.
- [20] Zhang HB, Yao RS, Zhu HX, *et al.* Study on the production of dextran by fermentation. *J Hefei Univ Technol (Natural Science)*, 2004, **27**(9): 783–787.
张洪斌, 姚日生, 朱慧霞, 等. 发酵法生产右旋糖酐的工艺研究. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2004, **27**(9): 783–787.
- [21] Yang YI, Luo J, Wang JH, *et al.* Expression and characterization of dextranucrase gene *dsrX* from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2008, **133**: 505–512.
- [22] Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res*, 2001, **45**: 113–121.

JOURNALS.IM.AC.CN