doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.001

·基础研究·

蔗糖磷酸化酶全细胞催化 AA-2G 的条件优化 *

余 磊[1] 李骥璇[1] 王忆茗[2] 郑桂兰[1] 王洪钟[1△]

（1 清华大学生命科学学院 北京 100084；2 复旦大学附属中山医院骨科 上海 200032）

摘要 目的：使用表达蔗糖磷酸化酶（EC 2.4.1.7, Sucrose phosphorylase, SPase）的大肠杆菌重组工程菌 *E.coli* BL21/pET-spase，作为全细胞催化剂，合成 2-O-D- 吡喃葡糖基 -L- 抗坏血酸（Ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G）。通过反应条件的优化研究，提高 AA-2G 的收率。 **方法：**分别考察菌体量、缓冲液 pH、蔗糖浓度、维生素 C 浓度、反应时间和温度对 AA-2G 合成反应的影响，再组合上述最佳条件进行反应。AA-2G 的产量使用高效液相色谱法进行定量。 **结果：**最佳反应条件为：菌体量 15 mg/mL，缓冲液 pH 4.5，蔗糖浓度 100 g/L，维生素 C 浓度 175 g/L，反应时间 20 h，温度 37 ℃。在此条件下，AA-2G 产量达到了 35.7 g/L。 **结论：**以蔗糖为底物，使用 SPase 合成 AA-2G 的研究报道较少。本研究通过优化此方法的反应条件，让 AA-2G 的产量得到了大幅提高。同时本研究中成功地采用了大肠杆菌工程菌作为全细胞催化剂，这比传统的使用粗酶液的方法更省时省力，有良好的应用潜力。

关键词：蔗糖磷酸化酶；AA-2G；全细胞催化

中图分类号：O629.13; R-33 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2017）14-2601-05

Optimization of Whole-cell Synthesis of AA-2G by Sucrose Phosphorylase*

YU Lei[1], LI Ji-xuan[1], WANG Yi-ming[2], ZHENG Gui-lan[1], WANG Hong-zhong[1△]

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Department of Orthopedics, Zhongshan hospital, Fudan university, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: Sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7, Sucrose phosphorylase, SPase) was produced by recombinant strain *E. coli* BL21/pET-spase. This recombinant strain was used as Whole-cell catalysis to synthesize 2-O-a-D-Glucopyranosyl-L-ascorbicacid (Ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G). Reaction conditions were optimized to get higher production of AA-2G. **Methods:** The effects of wet cell weight, pH value of buffer solution, sucrose concentration, Vitamin C concentration, reaction time and temperature on production of AA-2G were investigated. High-performance liquid chromatography was used to determine the production of AA-2G. **Results:** The optimal conditions for synthesis of AA-2G were wet cell weight of 15 mg/ml, buffer solution pH value of 4.5, sucrose concentration of 100 g/L, Vitamin C concentration of 175 g/L, reaction time of 20 h, and temperature of 37 ℃. Under these conditions, the production of AA-2G was 35.7 g/L. **Conclusion:** Synthesis of AA-2G from sucrose by SPase is still under basic research. No industrial application is reported yet. In this paper, reaction conditions of AA-2G synthesis were optimized, which led to higher production of AA-2G. Whole cells of recombinant *E.coli* were successfully used as catalysis. Since whole-cell catalysis is easier to prepare than crude enzyme, its potential of application is promising.

Key words: Sucrose phosphorylase; AA-2G; Whole-cell catalysis

Chinese Library Classification(CLC): O629.13; R-33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2601-05

前言

维生素 C（Vitamin C, VC）是一种参与人体多种生理活动的维生素，它对维持人体健康的作用被广泛认可[1]。然而由于 C2 上的羟基易受 pH、金属离子、热、光影响，VC 很不稳定。因此其各种相对稳定的衍生物，如盐类、酯类和糖基类衍生物相继被开发出来。其中糖基类衍生物，2-O-D- 吡喃葡糖基 -L- 抗坏血酸(Ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G)以其突出的稳定性和能在人体中缓释为 VC 的特点脱颖而出[2]。

AA-2G 主要以酶法合成，供体上的葡萄糖苷被糖基转移酶转移到 VC 的 C2 上。当前已报道的用于 AA-2G 合成的酶包括 α- 葡萄糖苷酶、α- 淀粉酶、蔗糖磷酸酶（Sucrose phosphorylase, SPase）、环糊精葡萄糖基转移酶（CGTase）、α- 异麦芽糖基葡糖基糖合成酶[2]和葡聚糖蔗糖酶[3]。目前广泛使用的酶是环糊精葡萄糖基转移酶（CGTase）。

全细胞催化是利用完整细胞进行生物转化的技术。与游离酶催化相比，它有如下优点：无需对酶分离纯化，减少了酶活损失，降低了成本[17]。同时因有细胞保护，酶稳定性更好，半衰期

* 基金项目：国家自然科学基金项目（21476124）

作者简介：余磊（1990-），硕士研究生，研究方向：生物转化及生物催化，E-mail: 821852214@qq.com

△ 通讯作者：王洪钟（1965-），博士，副教授，研究方向：生物转化及生物催化，电话：010-62795632，E-mail: hzwang@mail.tsinghua.edu.cn

（收稿日期：2016-10-20 接受日期：2016-11-15）

更长，细胞易于与产物分离并回收，可以实现催化剂的重复使用。本实验室前期构建了含 SPase 基因的质粒，并用其转化大肠杆菌。本研究用此工程菌作为全细胞催化剂，以相对便宜的蔗糖为糖基供体合成 AA-2G，同时优化反应条件，旨在减少 AA-2G 的生产成本并提高收率。

1 材料与方法

1.1 材料

重组质粒 pET-28a(+)-spase 以及携带该质粒的 *Escherichia coli* BL21(DE3)均由本实验室构建及保藏；蔗糖和抗坏血酸为市售分析纯试剂；AA-2G 标准品够自 TCI 公司；LC98Ⅰ型高效液相色谱仪（北京温分分析仪器技术开发有限公司）；LB 液体培养基：酵母提取物 0.5 %，蛋白胨 1 %，氯化钠 1 %，121 ℃灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 工程菌培养 将工程菌 *E.coli* BL21/pET-spase 接种于含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中，于 37 ℃，200 rpm 摇床上培养 8 h 后，以按 4 %的接种量接种至 LB 液体培养基中，37 ℃，200 rpm 摇床上培养至 OD_{600} 约为 0.6 后，加 IPTG 至终浓度为 1 mM，在 25 ℃、180 rpm 的恒温摇床中诱导 15 h。之后，8000 rpm 离心 10 min 收菌，用 pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤二次，菌体保存于 -20 ℃待用。

1.2.2 全细胞合成 AA-2G 与优化 1）工程菌的 AA-2G 合成活性检测：80 g/L 蔗糖和 50 g/L 抗坏血酸溶于 50 mmol/L 的醋酸盐缓冲液（pH 6.0）中，加入 5 mg/mL 的工程菌 *E.coli* BL21/pET-spase，37 ℃恒温摇床中反应 24 h。同时设置空白对照组，其他反应条件与上述相同，而菌体则使用含有空质粒的菌株 *E. coli* BL21/pET-28a。反应结束后将反应液用超纯水稀释 150 倍，并用 0.45 μm 的针头过滤器过滤，用于 HPLC 检测分析。

2）菌体量对反应的影响 菌体量分别为 5 mg/mL、15 mg/mL、25 mg/mL，其他条件同 1）。

3）缓冲液 pH 对反应的影响 pH 分别为 4、4.5、5、5.5、6.5、6.5、7，其中设 pH 为 4.5 的组为对照组，其它组与其进行 AA-2G 产量的比较。菌体量为 15 mg/mL，其他条件同 2）。

4）蔗糖浓度对反应的影响 蔗糖浓度分别为 50 g/L、75 g/L、100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L、500 g/L。pH 为 4.5，其他条件同 3）。

5）反应时间对反应的影响 反应时间分别为 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h。蔗糖浓度为 200 g/L，其他条件同 4）。

6）温度对反应的影响 温度分别为 30 ℃、37 ℃、45 ℃，其中设 30 ℃组作为对照组，其他组与其进行 AA-2G 产量比较。反应时间为 20 h，其他条件同 5）。

7）VC 浓度对反应的影响 VC 浓度分别为 17.5 g/L、35 g/L、75 g/L、105 g/L、140 g/L、175 g/L、210 g/L。温度为 37℃，其他条件同 6）。

1.2.3 HPLC 检测条件 色谱柱：Diamonsil C18 柱，5 μm（φ 250× 4.6 mm）。紫外检测波长为 238 nm。流动相为 1 %的甲醇，用磷酸调 pH 至 2.0，流速 0.8 mL/min，进样量 10 μL，柱温为 25 ℃。HPLC 图谱中 AA-2G 的峰面积和浓度成正比，以此绘制 AA-2G 标准曲线。利用标准曲线及样品中的 AA-2G 的峰面积，得出样品中 AA-2G 的浓度。

1.3 统计学分析

每个实验至少重复三次，数据以平均数± 标准差表示。每组变量与对照组进行 AA-2G 产量的比较，用 SPSS10.0 进行 t 检验，* 表示 $P<0.05$，即有显著差异。

2 结果

2.1 工程菌的 AA-2G 合成活性检测

如图 1，含有空质粒的菌株的 HPLC 图谱中只有 VC 的色谱峰，没有 AA-2G 的色谱峰，表明其不能催化合成 AA-2G。如图 2，工程菌的 HPLC 图谱中有 AA-2G 的色谱峰，表明其有合成 AA-2G 的能力。

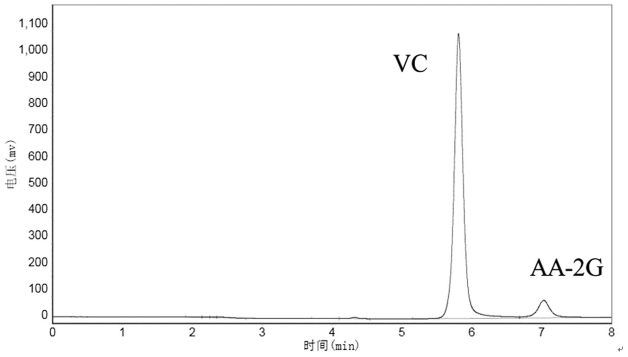

图 1 空白对照反应液的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC analysis of the reaction product of control with empty plasmid

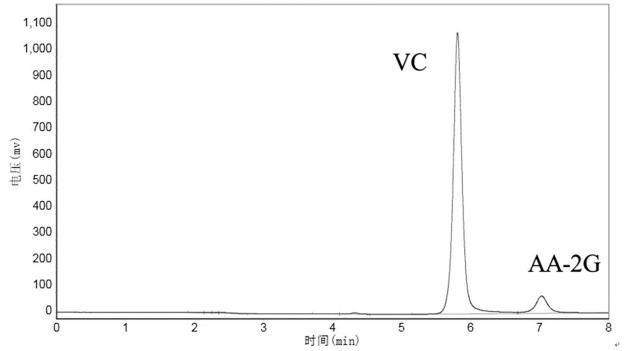

图 2 含 SPase 的工程菌反应液的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC analysis of the reaction product of whole cells with SPase

2.2 菌体量对反应的影响

其他反应条件相同，考察菌体量对反应的影响，结果如图 3。可见 AA-2G 产量随着菌体量增加，在菌体量为 15 mg/L 产量达到最大，之后随菌体量增加而降低。菌体量低时，酶活力不够，而菌体量过高时，菌体中其他的酶带来的副反应又对 AA-2G 合成造成了影响。因此选择菌体量为 15 mg/L 进行反应。

2.3 缓冲液 pH 对反应的影响

其他反应条件相同，考察缓冲液 pH 对反应的影响，结果如图 4。可见在 pH 高于 4.5 时，AA-2G 产量随着 pH 的增加而快速下降。而 pH 在低于 4.5 时，AA-2G 产量也略有下降。VC

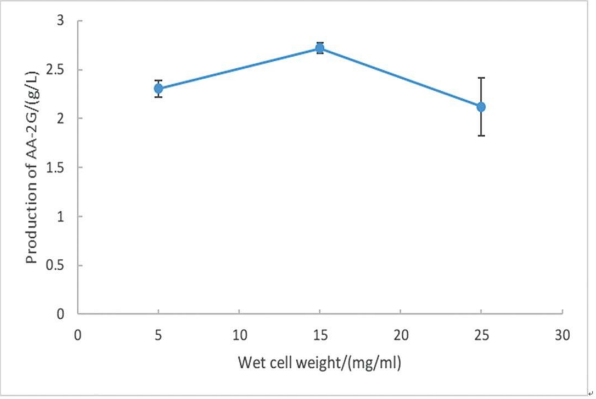

图 3 菌体量对反应的影响

Fig. 3 Effect of wet cell weight on production of AA-2G

在 pH 低时更稳定，但 pH 过低又会影响 SPase 的酶活与稳定性，因此选择 pH 为 4.5 进行反应。将 pH 4.5 组作为对照组，把其他组与其进行 AA-2G 产量比较，pH 高于 4.5 的组均有显著性差异（P<0.05）。

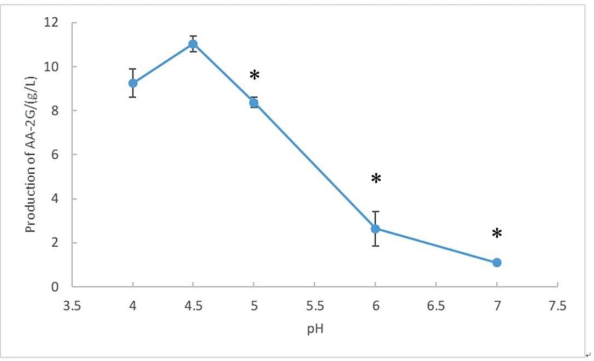

图 4 缓冲液 pH 对反应的影响

Fig. 4 Effect of pH value of buffer solution on production of AA-2G

*: P<0.05 compared with the control

2.4 蔗糖浓度对反应的影响

固定其他反应条件，考察蔗糖的浓度对反应的影响，结果如图 5。可见在蔗糖浓度低于 100 g/L 时，AA-2G 产量随蔗糖浓度增加而迅速增加。而蔗糖浓度在高于 100 g/L 时，AA-2G 产量只有微弱的增加。蔗糖浓度过高时，反应结束后会剩余高浓度的蔗糖，一方面造成底物的浪费，另一方面也给之后 AA-2G 的分离造成困难，因此蔗糖浓度选择 100 g/L。

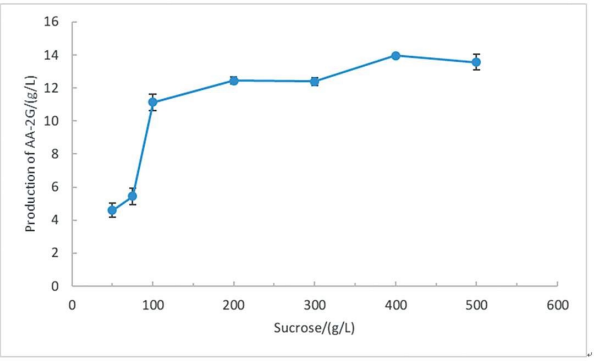

图 5 蔗糖浓度对反应的影响

Fig. 5 Effect of sucrose concentration on production of AA-2G

2.5 反应时间对反应的影响

固定其他反应条件，考察反应时间对反应的影响，结果如图 6。可以看出，AA-2G 产量在反应时间在 12 h 之前，随着时间迅速增加，在 12 h 之后 AA-2G 产量继续缓慢增加，并在 20 h 时达到最大，而之后随着时间缓慢减少。因此反应时间选择 20 h。

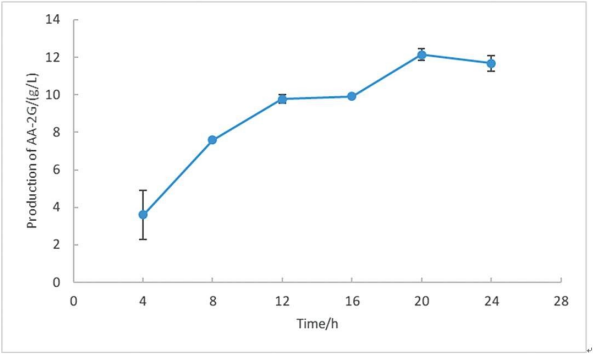

图 6 反应时间对反应的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on production of AA-2G

2.6 温度对反应的影响

固定其他反应条件，考察温度对反应的影响，结果如图 7。可以看出 AA-2G 产量先是随温度增高而增加，在 37 ℃时达到最大，之后 AA-2G 产量开始减少。温度过低会降低 SPase 的酶活，而温度过高会增加 VC 的分解速度，都会影响 AA-2G 产量，因此选择反应温度为 37 ℃。将 30 ℃组作为对照组，把其他组与其进行 AA-2G 产量比较，37 ℃组有显著性差异（P<0.05）。

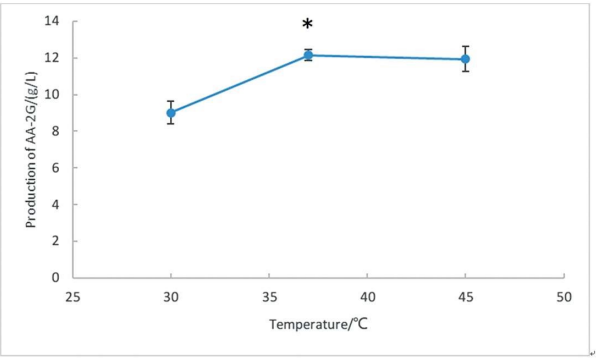

图 7 温度对反应的影响

Fig. 7 Effect of temperature on production of AA-2G

*: P<0.05 compared with the control

2.7 VC 浓度对反应的影响

使用以上优化后的反应条件，菌体量 15 mg/L，pH 4.5，温度 37 ℃，反应时间 20 h，蔗糖浓度 100 g/L，考察 VC 浓度对反应的影响，结果如图 8。可以看出，AA-2G 产量随着抗坏血酸浓度的增加而增加，并在抗坏血酸浓度为 175 g/L 时，AA-2G 的产量达到最大，为 35.7 g/L，之后 AA-2G 产量略有降低。因此 VC 浓度选择 175 g/L。

3 讨论

目前 AA-2G 生产的成本较高，一个原因是酶的制备和使

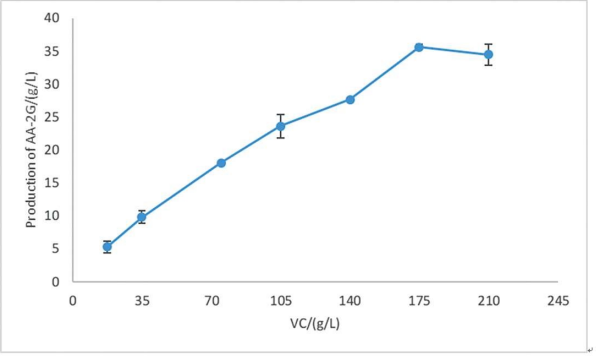

图 8 VC 浓度对反应的影响

Fig. 8 Effect of Vitamin C concentration on production of AA-2G

用较困难。大部分用于合成 AA-2G 的酶是游离酶,反应后难以回收利用或从产物中去除。同时制备时需要菌体破碎或粗酶液的浓缩、纯化等繁琐的操作[4]。针对游离酶的这些问题,对酶进行固定化或使用完整细胞是重要的解决方法[5,6]。熊艳军等通过表面展示含有 CGTase 的完整酵母细胞制备了 AA-2G [6]。而本文中则成功地利用了本实验室前期构建的工程菌 *E.coli* BL21/pET-spase 的完整菌体,催化合成了 AA-2G。另外以往酶的制备需要经过较长的周期。熊艳军[6]的酵母全细胞需要诱导 48 h 才能达到最大活力。许乔艳[4]的基因工程菌需要诱导 90 h,得到的发酵液需要纯化后再用于 AA-2G 合成。Kwon[16]的重组菌虽然只需要诱导 12 h,但仍需要进行超声破碎,之后获得粗酶液后需要纯化才能使用。而本文中大肠杆菌全细胞催化剂的制备只需要诱导 15 h 并洗涤收集菌体即可。

AA-2G 生产的成本高的另一个原因是目前广泛使用的 CGTase 造成的,适合它的糖基供体价格较高。当以较昂贵的 α- 环糊精作为底物时,AA-2G 产量最高能达到 143 g/L [7]。而 CGTase 利用便宜的底物得到的 AA-2G 产量则非常低,即使经过了分子改造[13],产量依然不理想。以麦芽糊精为底物,AA-2G 产量普遍在 2 g/L[8-11]左右;以麦芽糖为底物,AA-2G 产量为 5.5 g/L[14]和可溶性淀粉 AA-2G 产量为 2 到 3 g/L[12,13]。Kwon[15,16]首次证明了 SPase 可以合成 AA-2G,却未进行反应条件优化方面的研究。而本文中以 SPase 为催化剂,使用较便宜的蔗糖为底物,优化了反应条件后 AA-2G 产量为 35.7 g/L,在底物价格和 AA-2G 产量之间取得了一个较好的平衡点。

在 AA-2G 的合成反应中,pH 有重大影响,一个原因是因为底物 VC 在中性和碱性条件下很容易氧化分解。本文中使用 SPase,合成 AA-2G 的最佳 pH 为 4.5。Gudiminchi[7]和熊艳军[6]各自使用不同的 CGTase,也得出反应最佳 pH 为 4.5 的结论。Ruizhi Han[10]对 CGTase 进行了一系列突变,发现此酶的最适 pH 发生了改变,而在 AA-2G 产量较高的几个突变体中的大多数最适 pH 都小于 6.5。可见,在酶的活性允许下,缓冲液以偏酸性为宜[7]。

温度也是一个重要的反应参数,合适的温度应该同时考虑酶活和 VC 稳定性。来自 *Thermoanaerobacter sp.*的 CGTase 最适温度是 90 ℃,而 VC 在温度高于 60 ℃分解较快,即使加硫脲保护,效果也不是很好。最后研究者发现 50 ℃为最佳反应温度[7]。Long Liu[11]等发现,来自 *Paenibacillus macerans* 的野生型 CGTase 和它的突变体合成 AA-2G 的最佳温度都是 36 ℃,AA-2G 产量在 28 ℃到 52 ℃之间能达到最高产量的 60 %以上,而温度低于 20 ℃时产量则大幅度减少。熊艳军[6]得出最佳温度为 30 ℃。Ahmed Eibaid [14] 发现来源于 *Bacillus sp.* SK 13.002 的 CGTase 合成 AA-2G 的温度为 37 ℃。Ruizhi Han[9]总结了一些研究者的工作,发现合成 AA-2G 的最佳温度有 37 ℃、40 ℃、45 ℃等。本文中 SPase 的反应最佳温度为 37 ℃,与以上研究者的结论一致或较为接近。

SPase 能以蔗糖为糖基供体,将蔗糖的葡萄糖基转移到种类众多的含羟基的受体上[18,19],而应用其以 VC 作为受体合成 AA-2G 的研究才刚刚展开。本文使用表达了 SPase 的大肠杆菌全细胞合成了 AA-2G,并对此反应的一些影响因素进行了初步的探索,为 SPase 用于 AA-2G 工业化生产提供了可能。不过,本实验还未完全发挥出 SPase 的潜力,后续可以用正交实验对反应条件进一步优化。另外分子改造也可以提高酶能力,Michael Kraus 将 SPase 进行了改造,白藜芦醇、儿茶酸和表儿茶酸的产量都得到了提高[20]。因此后续研究也可以对 SPase 进行分子改造,提高其对 VC 的特异性,以期进一步提高 AA-2G 产量。

参 考 文 献(References)

[1] Kimura M, Moteki H, Uchida M, et al. L-ascorbic acid- and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate in vivo liver regeneration and lower serum alanine aminotransaminase activity in 70% partially hepatectomized rats[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(4): 597-603

[2] Han R, Liu L, Li J, et al. Functions, applications and production of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(2): 313-320

[3] Kim Y, Yeon M J, Choi N, et al. Purification and characterization of a novel glucansucrase from Leuconostoc lactis EG001 [J]. Microbiological Research, 2010, 165(5): 384-391

[4] 许乔艳, 韩瑞枝, 李江华, 等. 亚位点 +1 处突变提高软化类芽胞杆菌环糊精糖基转移酶底物麦芽糊精特异性 [J]. 生物工程学报, 2014, 30(1): 98-108
Xu Qiao-yan, Han Rui-zhi, Li Jiang-hua, et al. Improving maltodextrin specificity by site-saturation engineering of subsite +1 in cyclodextrin glycosyltransferase from Paenibacillus macerans [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(1): 98-108

[5] 王洁, 余磊, 杨东, 等. 基于酵母表面展示技术的胸苷磷酸化酶全细胞催化剂的构建[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 201-206
Wang Jie, Yu Lei, Yang Dong, et al. Construction of Pichia pastoris Surface Display Technology as Whole-cell Biocatalyst for Thymidine Phosphorylase[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(1): 201-206

[6] 熊艳军, 宿玲恰, 王蕾, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶的酿酒酵母表面展示及其生产 2-O-α-D- 吡喃葡萄糖基抗坏血酸 [J]. 微生物学报, 2015, 55(10): 1305-1313
Xiong Yan-jun, Su Ling-qia, Wang Lei, et al. Anchorage of cyclodextrin glycosyltransferase on outer membrane of Saccharomyces cerevisiae to produce 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55 (10): 1305-1313

[7] Gudiminchi R K, Towns A, Varalwar S, et al. Enhanced Synthesis of 2-O-α-d-Glucopyranosyl-l-ascorbic Acid from α-Cyclodextrin by a

Highly Disproportionating CGTase [J]. ACS Catalysis, 2016, 6(3): 1606-1615

[8] Han R, Liu L, Shin H D, et al. Iterative Saturation Mutagenesis of -6 Subsite Residues in Cyclodextrin Glycosyltransferase from Paenibacillus macerans To Improve Maltodextrin Specificity for 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Synthesis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(24): 7562-7568

[9] Han R, Liu L, Shin H, et al. Site-saturation engineering of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from Paenibacillus macerans to enhance substrate specificity towards maltodextrin for enzymatic synthesis of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid (AA-2G) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(13): 5851-5860

[10] Han R, Liu L, Shin H D, et al. Systems Engineering of Tyrosine 195, Tyrosine 260, and Glutamine 265 in Cyclodextrin Glycosyltransferase from Paenibacillus macerans To Enhance Maltodextrin Specificity for 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Synthesis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 79(2): 672-677

[11] Liu L, Xu Q, Han R, et al. Improving maltodextrin specificity for enzymatic synthesis of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid by site-saturation engineering of subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from Paenibacillus macerans [J]. J Biotechnol, 2013, 166(4): 198-205

[12] Han R, Li J, Shin H D, et al. Carbohydrate-Binding Module-Cyclodextrin Glycosyltransferase Fusion Enables Efficient Synthesis of 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid with Soluble Starch as the Glycosyl Donor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(10): 3234-3240

[13] Han R, Li J, Shin H D, et al. Fusion of Self-Assembling Amphipathic Oligopeptides with Cyclodextrin Glycosyltransferase Improves 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Synthesis with Soluble Starch as the Glycosyl Donor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4717-4724

[14] Eibaid A, Bashari M, Miao M, et al. Biosynthesis of 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid from Maltose by Cyclodextrin Glucanotransferase from Bacillus sp. SK 13.002 [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2014, 2(4): 193-197

[15] Kim M, Kwon T, Lee H J, et al. Cloning and expression of sucrose phosphorylase gene from Bifidobacterium longum in E.coli and characterization of the recombinant enzyme[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(15): 1211-1217

[16] Kwon T, Kim C T, Lee J. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from Bifidobacterium longum[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 611-615

[17] 王玺, 段胜林, 熊舒莉, 等. 自诱导系统在酶促合成 2'- 脱氧胞苷中的应用[J]. 生物技术通报, 2014, (11): 225-232
Wang Xi, Duan Sheng-lin, Xiong Shu-li, et al. Application of Auto-induction System in the Synthesis of 2'-deoxycytidine [J]. Biotechnology Bulletin, 2014, (11): 225-232

[18] 李群良, 张欣英, 杨克迪, 等. 巨大芽孢杆菌 Bacillus megaterium NCIB 8508 蔗糖磷酸化酶生物催化合成 α- 熊果苷的研究[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(04): 46-48, 69
Li Qun-liang, Zhang Xin-ying, Yang Ke-di, et al. Biocatalytic Synthesis of α-Arbutin by Bacillus Megaterium NCIB 8508 Sucrose Phosphorylase[J]. Chemistry & Bioengineering, 2011, 28(04): 46-48, 69

[19] 万月佳, 马江锋, 徐蓉, 等. 重组大肠杆菌产蔗糖磷酸化酶的酶学性质及其催化合成 α- 熊果苷 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(12): 1450-1459
Wan Yue-jia, Ma Jiang-feng, Xu Rong, et al. Properties of sucrose phosphorylase from recombinant Escherichia coli and enzymatic synthesis of α-arbutin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28 (12): 1450-1459

[20] Kraus M, Grimm C, Seibel J. Redesign of the Active Site of Sucrose Phosphorylase through a Clash-Induced Cascade of Loop Shifts [J]. ChemBioChem, 2016, 17(1): 33-36