

重组 β -葡萄糖苷酶生产龙胆低聚糖的工艺条件优化

刘玲玲^{1,2}, 朱松¹, 朱婷², 张敏², 吴敬^{1,2*}, 陈坚^{1,2}

(¹江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

(²江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要 【目的】 β -葡萄糖苷酶可用于酶法生产龙胆低聚糖。为了给龙胆低聚糖的生产提供大量的酶来源, 构建基因工程菌表达黑曲霉(CMI CC 324626) β -葡萄糖苷酶基因(*bgl*)并研究重组酶生产龙胆低聚糖的工艺条件。【方法】将*bgl*克隆到表达载体 pPIC9K, 转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71。表达产物通过 HPLC 和 LC-MS 鉴定了其可用于生产龙胆低聚糖的转糖活性, 并对酶转化葡萄糖生产龙胆低聚糖的反应条件进行了优化。【结果】实现了 β -葡萄糖苷酶的过量表达。当底物葡萄糖浓度为 80%, 反应 pH 4.5, 温度为 60°C, 加酶量为每克葡萄糖 60 U, 添加 1 mmol/L 的 K^+ , 转化周期为 48 h, 龙胆低聚糖累计达到最大为 50 g/L。【结论】本研究是国内首次利用重组酶法生产龙胆低聚糖的报道。

关键词: 龙胆低聚糖, 酶转化, β -葡萄糖苷酶, 表达, 毕赤酵母

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0597-06

龙胆低聚糖是一类由葡萄糖以 β -1,6 糖苷键结合的新型功能性低聚糖, 包括龙胆二糖, 少量的三糖和四糖^[1]。作为功能性食品配料, 龙胆低聚糖除了具有低热量、低龋齿、整肠等生理功能外, 与其他功能性低聚糖相比, 它还能更好地促进人体小肠中双歧菌和乳酸菌的繁殖^[2]; 并且耐热、耐酸, 可应用于其他一些低聚糖不适宜使用的保健食品中。虽然龙胆低聚糖具有广阔的应用前景, 但目前只有日本的 Nihon Shokuhin Kako 公司进行工业化生产^[3], 主要在日本销售。我国还在试产阶段, 产量较小, 不超过百吨。龙胆低聚糖的制取方法很多。早期采取从植物中提取, 因为受到原料的限制, 产量不高。目前酶法制取成为最有效地降低成本, 大规模生产的途径。工业上采用高浓度的葡萄糖为原料, 经 β -葡萄糖苷酶转糖苷和缩合, 再经分离精制得到不同规格的龙胆低聚糖成品^[4-5]。

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BGL, EC 3.2.1.21)属于水解酶类^[6], 但也具有转糖苷活性, 可使低聚糖的非还原末端糖苷键断裂, 释放出葡萄糖, 并将游离的葡萄糖基以 β -1,6 糖苷键形式转移到其他糖底物上获得龙胆低聚糖^[7]。BGL 广泛存在于自然界许多植物和微生物中, 但酶活普遍较低, 且不易纯化, 所以运用基因工程手段构建高效表达 BGL 的工程菌成为当今研究 β -葡萄糖苷酶的重点。

到目前为止, 已有上百个微生物 β -葡萄糖苷酶基因得到克隆, 其中一些获得异源表达^[8]。早期主要选用大肠杆菌为宿主, 近年来随着真核表达体系的建立与完善, 研究表明 β -葡萄糖苷酶基因在酵母中表达比在大肠杆菌中表达的表达式和酶活性普遍要高些, 所以酵母表达系统被广泛应用。由于 β -葡萄糖苷酶的水解活性在纤维素的完全降解中起到至关重要的作用^[8-9], 目前对于 β -葡萄糖苷酶的研究

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619); 食品科学与技术国家重点实验室科研基金(SKLF-MB-200802)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 刘玲玲(1984-), 女, 安徽淮南人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。Email: linglinghuwuxi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-05; 修回日期: 2009-01-31

大多集中于其水解活性,转苷活性的报道很少。Heather 等人曾研究过黑曲霉来源的 β -葡萄糖苷酶转苷活性与 pH 的关系^[7],发现 pH 对黑曲霉来源的 β -葡萄糖苷酶转苷速率并无明显影响,当以纤维二糖为底物,pH4.5,纤维二糖浓度为 50 mmol/L 反应 2 h 时,产物龙胆二糖的浓度大概仅有 18 mmol/L,即 6.5 g/L。国内学者主要致力于克隆表达 β -葡萄糖苷酶基因以及研究其水解酶学性质,未有涉及转苷活性。

本研究将 *Aspergillus niger bgl* 连接到载体 pPIC9K 上,在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 中表达,SDS-PAGE 电泳显示发酵液中有目标蛋白表达。表达产物经 HPLC、LC-MS 鉴定具有转苷活性,可作为龙胆低聚糖的生产用酶。此外,对酶法生产龙胆低聚糖的转化条件进行了优化。本研究为龙胆低聚糖大规模生产奠定了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, *P. pastoris* KM71, 重组质粒 pUC19-*bgl* (已去除内含子且含 *bgl* 基因的质粒, Oded Shoseyov 教授惠赠) 表达质粒 pPIC9K, 为本实验室保藏。

1.1.2 培养基:LB、SOB、SOC 培养基, 细菌常用培养基^[10]。MD、YPD、BMGY、BMMY 培养基, 重组酵母常用培养基^[11]。

1.1.3 试剂和酶:质粒小量提取试剂盒购自上海生物工程公司, 胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, *EcoR* I、*Not* I、*Bgl* II、T4 连接酶、Ex HS *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司。酵母无氮基本氮源培养基 (YNB)、遗传霉素 G418 购自上海生物工程公司。龙胆二糖标样购自 Sigma 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器:PCR 仪, 凝胶成像仪, 蛋白电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司, DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂, 高效液相色谱仪, 液质联用仪购自美国沃特斯公司。

1.2 表达载体的构建

按照已发表的 *bgl* 的 cDNA 序列, 设计正反引物: 正向引物 P1 (5'-ACGAGGAATTCATGAATTGGCCTACTCC-3'); 反向引物 P2 (5'-ATATGCGGCCGCCTGAACAGTAGGCAGAG-3')。

正向引物带有 *EcoR* I 酶切位点, 反向引物带有 *Not* I 酶切位点, 以引物 P1、P2 对重组质粒 pUC19-*bgl* PCR 扩增获得 *bgl* 基因片段。将其克隆到

pMD18-T simple vector (pMD18-T-*bgl*) 送至上海生物工程股份有限公司测序。pMD18-T-*bgl* 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后, 将片段纯化、回收, 质粒 pPIC9K 也以同样的方法酶切并胶回收。T4 ligase 连接目的基因和载体, 转入 *E. coli* JM109 的感受态细胞中, 转化子测序, 得到表达质粒 pPIC9K-*bgl*。

1.3 工程菌的构建以及高拷贝重组子的筛选

将表达载体 pPIC9K-*bgl*, 经 *Bgl* II 酶切线性化后回收含有目的基因的条带, 电击转入 *P. pastoris* KM71 感受态细胞中^[12], 在 MD 平板长出单克隆, 再经 YPD/G418 平板筛选多拷贝转化子, G418 浓度筛选梯度依次为 0.5、1、2 mg/mL, 高拷贝转化子经 PCR 鉴定。pPIC9K 空质粒处理同上, 转化菌作为阴性对照。

1.4 摇瓶发酵产 BGL

将鉴定正确的单菌落接种至 5 mL YPD 培养基, 200 r/min, 30°C 培养 16 h, 以 10% 的接种量接入 BMGY 培养基 (50 mL 培养基/250 mL 三角瓶), 30°C 培养 24 h, 离心收集全部菌体, 转入 BMMY 培养基 (50 mL 培养基/250 mL 三角瓶), 30°C 培养 120 h, 每 24 h 补加 0.5% 的甲醇, 并取样 200 μ L, 离心收集上清进行 12% SDS-PAGE 确定目的蛋白的表达与存在形式。阴性对照重组毕赤酵母 KM71/pPIC9K 培养方法同上。

1.5 BGL 的水解酶活测定

比色测定法^[13]。

1.6 BGL 的转苷活性检测

收集重组毕赤酵母发酵培养的上清液经 PEG 浓缩, 硫酸铵沉淀, 透析, 制成粗酶液, 检验转苷活性如下^[4, 13-14]: 用 pH4.5 的醋酸缓冲液配制 50% 的葡萄糖溶液 10 mL, 400 μ L 粗酶液, 50°C 反应 24 h, 然后煮沸 10 min, 微孔过滤, HPLC 以及 LC-MS 检测产物。

HPLC 条件: 示差折光检测器, 色谱柱: Hypersil NH₂ 250 mm \times 4.6 mm, 柱温 30°C, 池温 (检测器) 30°C; 流动相: 70% 乙腈, 流速: 1 mL/min, 进样量 5 μ L。

质谱条件: 离子方式: ESI⁻、ESI⁺, 离子源温度: 100°C, 脱溶剂气温度: 250°C, 质量范围: 100 ~ 800 m/z, 选择离子: ESI⁺: 365.5 Da; ESI⁻: 341.4 Da, 光电倍增器电压: 650 Volts, Analyser Vacuum 2.6e-5 mBar, Gas Flow 4.2 lit/hr。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pPIC9K-*bgl* 的构建

PCR 扩增获得基因 *bgl*, 大小为 2580 bp, 与预计相符, 将其克隆到 pMD18-T simple vector, pMD18-T-

bgl 和质粒 pPIC9K 分别酶切、胶回收,然后相连接、转化 *E. coli* JM109,抽提质粒。重组质粒 pPIC9K-*bgl* 全长 11880 bp,质粒经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切鉴定,获得结果与预期一致(图略)。测序结果表明 *bgl* 基因全长为 2580 bp,编码 860 个氨基酸,与 NCBI 中报道的登录号为 CAB75696 的 *A. niger* BGL 蛋白质序列相比,只有在第 701、858 位氨基酸有差异,NCBI 报道的分别是谷氨酰胺、苏氨酸,而测序结果中分别是亮氨酸、异亮氨酸。将重组质粒命名为 pPIC9K-*bgl*。

2.2 重组 *P. pastoris* KM 71/pPIC9K-*bgl* 的构建与培养

重组表达载体 pPIC9K-*bgl* 经 *Bgl* II 线性化、纯化回收后,电转 *P. pastoris* KM 71 感受态细胞,涂布 MD 平板,转化子转接到不同浓度的 G418 的 YPD/G418 平板上,筛选具有高拷贝的 *bgl* 基因的菌株,从 G418 浓度为 1 mg/mL 的 YPD/G418 平板上挑取单菌落,PCR 鉴定正确。重组 *P. pastoris* KM 71/pPIC9K-*bgl* 经甲醇诱导表达,发酵 120 h 后上清液经 SDS-PAGE 鉴定。如图 1 所示,在大约 120 kDa 处出现一条蛋白条带,与理论 BGL 的分子量相符,而阴性对照中没有相应条带,证明 *bgl* 在 *P. pastoris* 中成功表达。

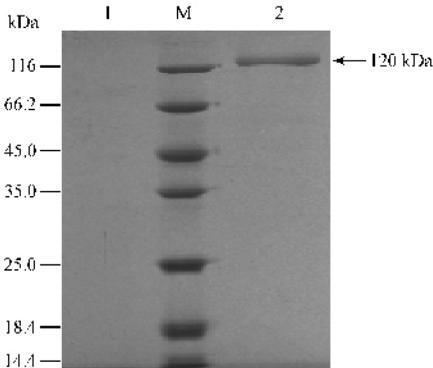


图 1 BGL 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the BGL expression. 1. Supernatant of *P. pastoris* KM 71/pPIC9K; 2. Supernatant of *P. pastoris* KM 71/pPIC9K-*bgl*; M. Marker.

2.3 重组菌表达产物 β -葡萄糖苷酶的活性检测

2.3.1 水解活性 利用比色测定法测定重组菌发酵后的发酵上清的水解酶活,最高是发酵 96 h,酶活为 80 U/mL。

2.3.2 转苷活性 以 50% 的葡萄糖溶液为底物,50°C 反应 24 h, HPLC 检测反应产物,结果见图 2。HPLC 图谱显示,龙胆二糖标样在 7.7 min 出峰,酶反应产物与其一致。为了进一步鉴定重组表达产物

的转苷活性,采用 LC-MS 对反应产物进行定性,图 4 为 HPLC 中对应龙胆二糖样品的流出峰的质谱图,由图中可见,在 ESI 正离子化(B、D)负离子化(A、C)方式下,质谱峰特征均与标准品相符。这些检测结果表明重组 BGL 确有转苷活性,能够将葡萄糖转糖苷并缩合成龙胆低聚糖。

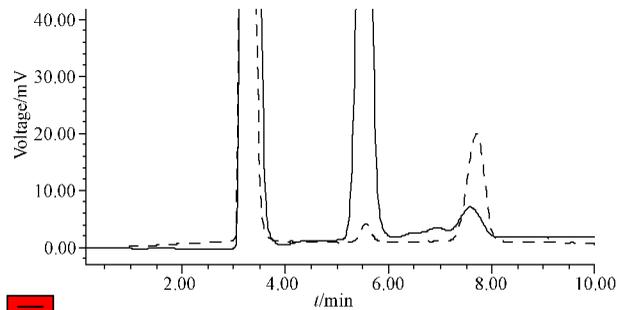


图 2 反应液总组份 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC spectrometry analysis.

2.4 重组 β -葡萄糖苷酶制备龙胆低聚糖转化条件优化

2.4.1 反应时间对酶转化的影响 为了确定合适的转化时间,对转化周期进行了考察。以 50% 的葡萄糖溶液为原料,加酶量为 40 U/g 葡萄糖, pH 4.5, 50°C 反应,隔 12 h 取样,用 HPLC 法测龙胆低聚糖的含量。结果如图 4。在反应过程中,前 24 h 龙胆低聚糖的含量急剧上升,随后上升幅度很小,反应到 48 h 低聚龙胆糖含量达到峰值(23 mg/mL),到 60 h 产物浓度下降,只有 48 h 时的 73%,分析原因可能是转化反应进行到平衡,龙胆低聚糖又被作为底物被酶水解。所以以下实验将转化时间确定在 48 h。

2.4.2 底物浓度对酶转化的影响 配制不同浓度的葡萄糖溶液,反应 48 h,检测产物含量,结果见表 1。

如表 1 所示,随底物浓度的升高,龙胆低聚糖的含量也在逐渐升高,当达到 80% 时,产物的含量虽然不是峰值,但是继续升高底物浓度,产物上升幅度很小,可能过高的葡萄糖浓度导致粘稠度过大,不利于反应的进行。并且从节约成本考虑,最适的底物浓度为 80%。

2.4.3 反应初始 pH 对酶转化的影响 分别用 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 的缓冲液配制 80% 的葡萄糖溶液作为底物反应,考察在不同 pH 的反应体系中龙胆低聚糖的含量,结果如表 2。

如表 2 所示, BGL 的转苷活性的最适 pH 偏酸性,当反应体系的 pH 为 4.5 时,龙胆低聚糖含量最高。升高 pH 到 7.5 时,产物很少,几乎很难检出。降低 pH 到 3.5 时,产物含量也有所降低,即过低的

pH 也会抑制转化的进行。

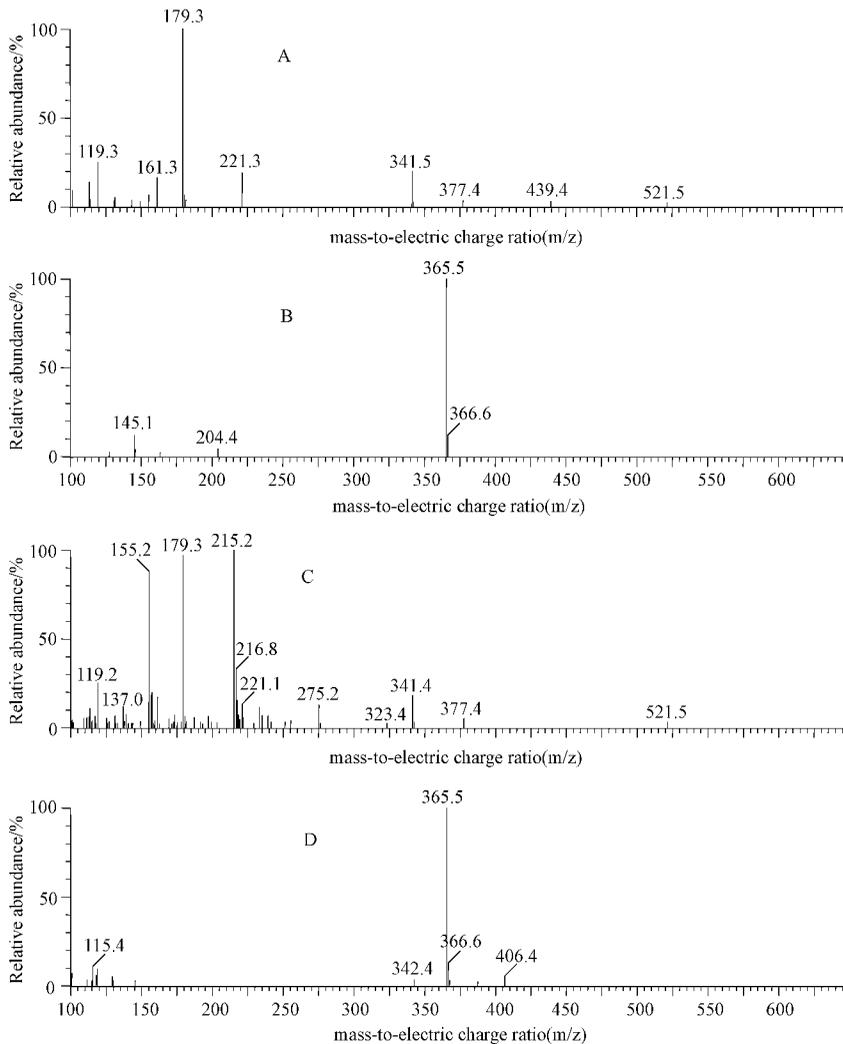
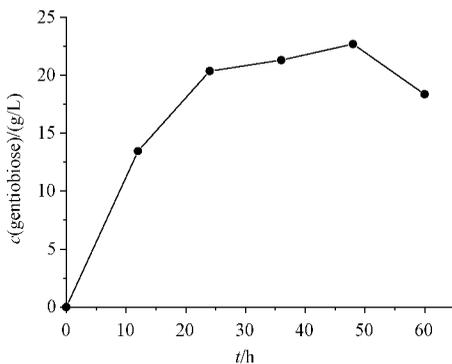


图 3 反应液总组份 LC-MS 图谱

Fig.3 LC-MS spectrometry analysis. A,B:Gentiobiose sample ; C,D: Reaction mixture.



4 转化时间对龙胆低聚糖的含量的影响
Fig. 4 Effect of transform time on the production of gentiooligosaccharide.

表 1 底物葡萄糖浓度对龙胆低聚糖产量的影响

Table 1 Effect of glucose concentration on the production

		of gentiooligosaccharide					
$c(\text{Glucose})(\text{g}/100\text{mL})$	$c(\text{Gentiooligosaccharide})(\text{g}/\text{L})$	40	50	60	70	80	90
		14	22.7	29.5	35.2	42.5	42.9

表 2 初始 pH 对龙胆低聚糖产量的影响

Table 2 Effect of initial pH on production of gentiooligosaccharide

pH	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5
$c(\text{Gentiooligosaccharide})(\text{g}/\text{L})$	38.8	42.4	26.1	15.8	1.0

2.4.4 反应温度对酶转化的影响 :以 80% 葡萄糖溶液为底物 ,pH4.5 ,在不同的温度下进行反应 ,检测龙胆低聚糖含量变化。结果如表 3。

表3 反应温度对龙胆低聚糖产量的影响

Table 3 Effect of temperature on production of gentiooligosaccharide

Temperature(°C)	30	40	50	60	70
α (Gentiooligosaccharide) (g/L)	21.5	36.4	42.2	44.5	9.8

如表3所示,当转化温度为60℃时,龙胆低聚糖含量累积到达峰值,低于或高于60℃,转化都会受到抑制,尤其是高温,到反应温度上升到70℃时,龙胆低聚糖含量仅为60℃的22%,说明高温已经使酶的活力大幅度降低。

2.4.5 加酶量对酶转化的影响 选择pH4.5,60℃反应条件,在80%的葡萄糖溶液中,加入不同量的 β -葡萄糖苷酶,分别为每克葡萄糖10 U、20 U、40 U、60 U、100 U,检测龙胆低聚糖产物含量。结果如表4。

表4 加酶量对龙胆低聚糖产量的影响

Table 4 Effect of enzyme dosage on production of gentiooligosaccharide

Enzyme dosage(U/g)	10	20	40	60	100
α (Gentiooligosaccharide) (g/L)	42.0	43.1	44.2	47.2	46.4

由表4可知,增加酶量可改善转化效果,并且在一定的范围内加酶量与龙胆低聚糖累积含量成线性关系,当加酶量大于60 U/g时,低聚龙胆糖累积含量不再增加,最适加酶量确定为每克葡萄糖60 U。

2.4.6 金属离子对酶转化的影响 据报道, β -葡萄糖苷酶活性受到不同的金属离子的影响,所以在反应体系中添加了1 mmol/L的 K^+ 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} ,检测低聚龙胆糖的产量变化。结果如表5。

表5 金属离子对龙胆低聚糖产量的影响

Table 5 Effect of metal ions on production of gentiooligosaccharide

Metal ions(1 mmol/L)	blank	K^+	Co^{2+}	Mn^{2+}
α (Gentiooligosaccharide) (g/L)	46.8	50.1	51.5	35.6

从表5中可以看出, K^+ 、 Co^{2+} 对 β -葡萄糖苷酶的转苷活性具有激活作用, Mn^{2+} 抑制反应的进行。但是考虑到产物龙胆低聚糖是用作食品添加剂,实际生产中不能引入重金属离子,所以可以考虑在反应体系中添加1 mmol/L的 K^+ 。但是试验结果的重金属离子对 β -葡萄糖苷酶的转苷活性的作用可以为机理的研究提供借鉴作用。

3 讨论

本研究成功地获得了能够高效分泌表达黑曲酶 β -葡萄糖苷酶基因的重组*P. pastoris*菌株。初步试

验表明表达的 β -葡萄糖苷酶活性可达80 U/mL,而目前国内报道的最高水平仅为7.75 U/mL^[15],故本研究代表着目前国内报道的表达黑曲酶来源 β -葡萄糖苷酶的最高水平。

本研究还优化了利用重组 β -葡萄糖苷酶的转苷活性酶法生产龙胆低聚糖的工艺条件。当底物葡萄糖浓度为80%,反应pH、温度分别为4.5、60℃,加酶量为每克葡萄糖60 U,反应体系中添加1 mmol/L的 K^+ ,反应48 h后,龙胆低聚糖的含量达到最高为50 g/L。

本研究是国内外首次利用重组 β -葡萄糖苷酶酶法生产龙胆低聚糖的报道,为下一步的重组*P. pastoris*产 β -葡萄糖苷酶发酵条件优化、酶转化后龙胆低聚糖成品的分离精制以及工业化生产提供了坚实的基础。

参考文献

- [1] 谷利伟,赵金兰.日本低聚糖开发新动态.功能食品基料(*Food & Machinery*),1999,1:27-28.
- [2] 尤新.功能食品配料-新型低聚糖.食品科学(*Food Science*),1995,16(11):41-44.
- [3] 包怡红,生庆海.低聚糖的种类及其应用.粮油食品科技(*Grain and Oil Food Science*)2002(10):14-17.
- [4] 邹辉,黎锡流,罗明姬.低聚龙胆糖的酶法生产技术.中国食品添加剂(*China Food Additives*),2004,13:97-101.
- [5] 唐传核,朱高翔.功能性食品添加剂-龙胆低聚糖.江苏食品与发酵(*Jiangsu Shipin Yu Fajiao*),2003,1:29-31.
- [6] Heather F Seidle, Ira Marton, Oded Shoseyov, et al. Physical and kinetic properties of the family 3 β -glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose Breakdown. *The Protein Journal* 2004 23(1):11-23
- [7] Heather F. Seidle, Reuben E. Huber. Transglucosidic reactions of the *Aspergillus niger* family 3 β -glucosidase qualitative and quantitative analyses and evidence that the transglucosidic rate is independent of pH. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005 436:254-264.
- [8] 闫会平,陈士华,吴兴泉.黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的进展.纤维素科学与技术(*Journal of Cellulose Science and Technology*)2007,15(1):59-63.
- [9] Siegel Dan, Ira Marton, et al. Cloning expression characterization and nucleophile identification of family3 *Aspergillus niger* β -glucosidase. *The Journal of Biological Chemistry* 2000 275(7):4973-4980.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫,等译.第二版.北京:科学出版社,1992.

- [11] 王芸, 华兆哲, 刘立明. 重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*) 2008 24(4) 635 - 639.
- [12] Shixuan Wu, Geoffrey J. Letchworth. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Bio techniques* 2004, 36 :152 - 154
- [13] Shoseyov O, Bravdo B, Ikan R, et al. Endo- β -glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycoside-containing medium. *Phytochemistry* 1988 27 :1973 - 1976.
- [14] 钟振声, 王文铂. 用离子交换树脂祛除低聚糖中的葡萄糖. 化学与生物工程 2004 4 :36 - 37.
- [15] 赵林果. β -葡萄糖苷酶的制备与回收利用及其基因的克隆表达. 南京林业大学博士毕业论文 2007.

Production of gentiooligosaccharide by recombinant β -glucosidase

Lingling Liu^{1,2}, Song Zhu¹, Ting Zhu², Min Zhang², Jing Wu^{1,2*}, Jian Chen^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(² School of Biotechnology, Jiangnan University and The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract [Objective] β -glucosidase can be used to prepare gentiooligosaccharide from glucose. The purpose of this study is to obtain β -glucosidase through DNA recombinant technology as well as to optimize the production of gentiooligosaccharide by the recombinant β -glucosidase. **[Methods]** We cloned *bgl*, the gene encoding β -glucosidase from *Aspergillus niger* (CMI CC 324626) into the expression vector pPIC9K to construct the recombinant plasmid pPIC9K-*bgl*. The vector was then transformed into *Pichia pastoris* KM71 for extracellular overproduction of β -glucosidase. The activity of the expressed enzyme was measured by the assay of transglucosidation reaction and the transglucosidation product was identified by HPLC and LC-MS. Furthermore, the condition for prepare gentiooligosaccharide by this recombinant β -glucosidase is optimized. **[Results]** *A. niger* β -glucosidase was successfully expressed in *P. pastoris* and the recombinant produced gentiooligosaccharide from glucose. In addition, the main operation parameters of this enzymatic conversion were optimized. At 80% glucose, 60°C, pH 4.5, 1 mmol/L K⁺, 60 U β -glucosidase per gram substrate, and 48 h reaction time, the gentiooligosaccharide produced reached 50 g/L. **[Conclusion]** This is the first report of producing gentiooligosaccharide by recombinant β -glucosidase.

Keywords : gentiooligosaccharide ; enzymatic conversion ; β -glucosidase ; expression ; *Pichia pastoris* , *Aspergillus niger*

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)

Supported by the Grant from National Science Fund for Distinguished Young Scholars (20625619), Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (SKLF-MB-200802) and Program for Innovative Research Team of Jiangnan University.

* Corresponding authors. Tel/Fax : + 86-510-85327802 ; E-mail : jingwu@jiangnan.edu.cn

Received 5 December 2008/Revised 31 January 2009

《微生物学报》答作者问——关于署名

问 我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表, 如果想在作者和单位方面增、减新的内容, 并且修改作者及单位署名顺序是否可以? 是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答 可以变更, 但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信, 证明内容: 原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来), 新的变更即可生效。