

枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因的分泌表达及其在粉丝制作中的应用

祝冬君¹, 张锦雯¹, 姚雁², 单逸蓝¹, 杨梦莲¹,
沈微^{*1,3}, 杨海泉¹, 夏媛媛¹, 陈磊¹, 陈献忠¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡先秦生物科技有限公司, 江苏 无锡 214073; 3. 江南大学 中国高校工业微生物资源数据平台, 江苏 无锡 214122)

摘要: 作者旨在研究枯草芽孢杆菌普鲁兰酶的分泌表达及表达产物的应用性能。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 菌株的普鲁兰酶编码基因 *BsP* 分别在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌中进行表达, 重组酶在两种宿主中均能利用自身结构分泌到细胞外。重组酶分泌到枯草芽孢杆菌细胞外的产物的酶学性质与积累在大肠杆菌胞质内的产物有明显的差异, 分泌到枯草芽孢杆菌细胞外的重组酶 *BsBsP* 的比酶活为 153.7 U/mg, 是大肠杆菌胞质内产物的 5.5 倍。重组酶 *BsBsP* 最适 pH 为 6.0, 最适温度为 45 °C。重组酶 *BsBsP* 对直链淀粉无降解作用, 为 I 型普鲁兰酶。在以土豆淀粉为原料的粉丝制作工艺中, 以重组酶 *BsBsP* 水解芡糊淀粉可以有效降低粉丝断条率。枯草芽孢杆菌普鲁兰酶可利用自身结构实现高效分泌表达, 重组酶适用于以淀粉为原料的粉丝制作。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 普鲁兰酶; 分泌表达; 双精氨酸转运途径

中图分类号: S 816.53 文章编号: 1673-1689(2022)02-0082-12 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.011

Secretory Expression of Pullulanase Gene from *Bacillus subtilis* and Its Application to Vermicelli Production

ZHU Dongjun¹, ZHANG Jinwen¹, YAO Yan², SHAN Yilan¹, YANG Menglian¹, SHEN Wei^{*1,3},
YANG Haiquan¹, XIA Yuanyuan¹, CHEN Lei¹, CHEN Xianzhong¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Xianqin Biological Technology Co., Ltd., Wuxi 214122, China; 3. Industrial Microbial Resource Data Platform for Chinese Universities, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study aimed to investigate the secretory expression of the pullulanase gene from *Bacillus subtilis* and the application of the recombinant enzyme. The *BsP* gene encoding pullulanase in *B. subtilis* strain 168 was expressed in *Escherichia coli* and *B. subtilis*, respectively. The recombinant enzymes expressed in both hosts could be secreted to the outside of cell via its own

收稿日期: 2021-01-14

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102101-5)。

* 通信作者: 沈微(1968—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事新型食品加工用酶制剂的创制与创新应用方面的研究。

E-mail: 2270723473@qq.com

structure. The enzymatic properties of the expression products secreted to the culture medium significantly differed from those accumulated in the cytoplasm of *Escherichia coli*. The specific enzyme activity of recombinant enzyme BsBsP expressed in *B. subtilis* and secreted to the culture medium was 153.7 U/mg, which was 5.5 times higher than that of the products accumulated in the cytoplasm of *E. coli*. The optimum pH and temperature of BsBsP were 6.0 and 45 °C, respectively. The recombinant enzyme BsBsP could not hydrolyze amylose, and it was considered as a type I pullulanase. Hydrolysis of starch paste with the recombinant enzyme BsBsP significantly reduced the broken rate of vermicelli in the processing of potato starch vermicelli. *B. subtilis* pullulanase could use its own structure to achieve high-efficiency secretory expression, and the recombinant enzyme BsBsP is suitable for starch-based vermicelli production.

Keywords: *Bacillus subtilis*, pullulanase, secretory expression, twin-arginine translocation system

普鲁兰酶是一类淀粉脱支酶,主要用于淀粉制糖工业中,与其他淀粉水解酶协同作用以提高淀粉水解效率,减少极限糊精残留,提高葡萄糖得率和产品质量^[1-2]。近年来,相关研究者还开发了以普鲁兰酶为催化剂的新工艺和新产品,例如以淀粉为原料的直链淀粉、抗性淀粉生产工艺^[3-4]。本课题组在前期工作中建立了一种酶法粉丝制作工艺,在粉丝制作的制芡糊阶段用普鲁兰酶处理芡糊,通过催化淀粉脱支反应,提高芡糊中直链淀粉的含量,从而使制作出的粉丝与明矾粉丝质量一致^[5]。进一步研究发现,在酶法粉丝制作中,与耐酸性普鲁兰酶相比,中性普鲁兰酶具有更高的催化效率,所制作的粉丝成品的质量也明显优于以酸性普鲁兰酶为催化剂获得的粉丝^[6-7]。由于普鲁兰酶主要是在淀粉制糖工业的糖化阶段与糖化酶联合使用,因此市售普鲁兰酶均为酸性普鲁兰酶,尚缺乏针对粉丝制作工艺开发的中性普鲁兰酶产品,且目前普鲁兰酶的市场价格较高,因此开发高活性、食品安全的中性普鲁兰酶对酶法粉丝工艺的应用具有关键性的意义。芽孢杆菌及其近缘微生物是中性普鲁兰酶的重要来源^[8-12],其中,芽孢杆菌属、厌氧芽孢杆菌属、地芽孢杆菌属的一些种的普鲁兰酶基因已经被克隆表达^[11-14]。这些普鲁兰酶在耐热性等方面差异显著,但其最适 pH 均在中性或接近中性,只有厌氧芽孢杆菌某些种的普鲁兰酶最适 pH 可以达到 5.5 左右,但在 pH 为 6.5 时仍具有较高的活性。可见,芽孢杆菌及其近缘微生物是筛选粉丝制作专用普鲁兰酶的理想宿主菌。枯草芽孢杆菌是公认食品安全的微生物,是淀粉酶、蛋白酶等多种食品级酶制剂的生

产菌。如果能够以枯草芽孢杆菌为宿主菌,高效表达其自身的普鲁兰酶,这将有利于解决中性普鲁兰酶的来源及食品安全问题。Malle 等^[12]从枯草芽孢杆菌中克隆并在大肠杆菌中异源表达了一种 I 型普鲁兰酶,当时的研究发现这是一种胞内普鲁兰酶。本研究发现,枯草芽孢杆菌普鲁兰酶在适当的条件下可以少量分泌到大肠杆菌细胞外,在枯草芽孢杆菌中可以实现高效分泌表达,实际上是一种胞外酶,而且这种酶的分泌表达产物的酶学性质与胞内产物存在显著差异。作者研究了枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因的表达、重组酶性质及其在粉丝制作中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 模式株 168、淀粉酶基因缺陷株 1A717^[6] 均为中国高校工业微生物资源信息平台提供,保藏号分别为 CICIM B0030 和 CICIM B0021; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达载体 pLac03、pUP43 均为作者所在课题组前期构建^[6,13],含有上述质粒的大肠杆菌转化子的保藏号分别为 CICIM B6937 和 CICIM B6941; 表达耐热型中性普鲁兰酶 GsP 的重组大肠杆菌 JM109/pLac03-GsP^[13]、重组枯草芽孢杆菌 1A717/pUP43-GsP^[6] 均为作者所在课题组前期构建,菌株保藏号分别为 CICIM B6922 和 CICIM B6924。

1.1.2 工具酶及主要试剂 限制性核酸内切酶 *Mlu*I、*Kpn*I、*Spe*I、*Sal*I、蛋白质电泳标准相对分子质量 (Prestained Protein Ladder): 赛默飞世尔科技有限公

司产品;连接酶、DNA聚合酶ExTaq、核酸电泳标准相对分子质量DL10000;宝生物工程(大连)有限公司产品;普鲁兰糖;MegaZyme公司产品,购自上海意果科技有限公司;其他试剂:均购自国药集团。

1.1.3 引物 在NCBI公布的枯草芽孢杆菌模式株168菌株的基因组序列(美国国家生物技术信息中心登录号:NC_000964.3)中有一段标注为amyX的基因,根据Malle等^[12]研究其产物为普鲁兰酶,作者将其命名为BsP基因,根据其序列设计引物如下:

Plb1:5' -CGACGCGTTTAAGGAGGAACCTTATGGTCAGCATCCGCCGAG-3'

Plb2:5' -GGGGTACCTCAATGTTGATGTTGATGATGAGCAAACTCTTAAGAT-3'

Pbs1:5' -AATTACCGACTAGTAAAGGAGGAATCTTATGGTCAGCATCCGCCGAG-3'

Pbs2:5' -AATTACCGTTCGACTCAATGTTGATGTTGATGATGAGCAAACTCTTAAGAT-3'

引物Plb1、Plb2、Pbs1、Pbs2中带下划线部分分别为内切酶MluI、KpnI、SpeI、SalI识别位点,带双下划线部分为核糖体结合位点。引物Plb1、Pbs1与普鲁兰酶基因编码区5'端一致,引物Plb2、Pbs2与普鲁兰酶基因编码区3'端互补。下游引物中带波浪线部分为6个组氨酸编码序列,用于重组酶的纯化。

1.1.4 培养基 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌培养种子液均采用LB培养基,摇瓶发酵培养均采用TB培养基,均按常规方法配制。

1.2 实验方法

1.2.1 普鲁兰酶重组表达载体的构建 提取*B. subtilis* 168菌株的基因组,以基因组为模板,以Plb1、Plb2为引物进行PCR扩增,用MluI和KpnI酶切目的基因片段和表达载体pLac03,连接之后转化*E. coli* JM109,涂布在含有氨苄青霉素的LB平板上,挑取转化子进行液体培养,提取转化子质粒进行酶切验证和测序。

以*B. subtilis* 168的基因组为模板,以Pbs1、Pbs2为引物进行PCR扩增,用SpeI和SalI酶切目的基因片段和表达载体pUP43,连接后转化*E. coli* JM109,涂布在含有氨苄青霉素的LB平板上,挑取转化子进行液体培养,提取转化子质粒进行酶切验证和测序。

1.2.2 普鲁兰酶重组枯草芽孢杆菌的构建 将表达载体pUP43-BsP转化到*B. subtilis* 1A717中,转

化方法见文献[15],涂布在含卡那霉素的LB平板上,挑取转化子提取质粒,酶切验证。其中枯草芽孢杆菌质粒提取方法见文献[16]。

1.2.3 重组普鲁兰酶的表达及产物的分析 重组菌株*E. coli* JM109/pLac03-BsP和对照菌株*E. coli* JM109/pLac03的种子液及摇瓶发酵的培养方法同文献[13],发酵结束后,收集发酵液提取胞外、周质和胞质粗酶液,进行酶活检测。基本操作过程如下:取适量发酵液,4000 r/min离心10 min,收集离心后的上清液作为胞外粗酶液。将离心后的菌体重悬于含有20 g/dL蔗糖的磷酸氢二钠和柠檬酸缓冲液中,冰浴2 h后离心去上清液,再将菌体重悬于与发酵液等体积的磷酸氢二钠和柠檬酸缓冲液的低渗透压的溶液中,由于渗透压的急剧变化,周质中的蛋白质被释放到环境中,4000 r/min离心10 min,上清液即为周质粗酶液。沉淀部分再次重悬于磷酸氢二钠和柠檬酸缓冲液中,超声波破碎细胞,离心取上清液为胞质粗酶液。酶活检测、SDS-PAGE凝胶电泳分析重组酶的分布情况,普鲁兰酶酶活测定方法同文献[12]。其中,酶与底物的反应温度一般为45℃。酶活定义为:在相应条件下,每分钟分解普鲁兰糖所释放的还原糖,其还原力相当于1 μmol葡萄糖所需的酶量,用1 U表示。

重组菌*B. subtilis* 1A717/pUP43-BsP及对照菌*B. subtilis* 1A717/pUP43的种子液及摇瓶发酵的培养方法同文献[6],发酵结束后,收集发酵液提取胞外和胞质粗酶液,并进行酶活检测和SDS-PAGE凝胶电泳分析。胞外和胞质粗酶液的提取方法同上。

1.2.4 重组普鲁兰酶的纯化 重组酶的C端带有His-tag标签,所以采用镍柱进行亲和层析纯化,具体纯化方法如下:取胞外粗酶液5 mL,经0.22 μm滤膜过滤,用含有0.5 mol/L NaCl和0.02 mol/L咪唑的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠缓冲液(浓度为0.02 mol/L,pH 7.4)作为上样缓冲液,用含0.5 mol/L咪唑和0.5 mol/L NaCl的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠缓冲液作为洗脱液,梯度洗脱,流量为1 mL/min。SDS-PAGE蛋白质电泳分析纯化结果,测定蛋白质含量,计算比酶活。纯化柱为His-Trap HP 1 mL亲和层析柱,GE公司产品,购自国药集团。

1.2.5 重组普鲁兰酶酶学性质的测定 重组酶最适温度的测定:分别在30、35、40、45、50、55、60、65℃下测定酶活的大小,以最高酶活为100%,计算相

对酶活。重组酶最适 pH 的测定:在 pH 为 4.0~8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,测定酶活力,以最高酶活为 100%,计算相对酶活。重组酶热稳定性的测定:将酶液置于 40、45、50、55 °C 金属浴中处理 3 h,分别测定处理 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 后的酶活,以未处理的酶活为 100%,计算相对酶活。金属离子对重组酶酶活的影响测定:以 10 mmol/L 的不同金属离子溶液替换酶活力测定反应体系中的缓冲液,用盐酸或氢氧化钠调节金属离子缓冲液 pH 为 6.0,以去离子水代替金属离子溶液作为对照,以对照酶活为 100%,计算相对酶活。每个数据均做 3 个平行样。

1.2.6 重组普鲁兰酶动力学参数的测定 配制质量浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 mg/mL 的普鲁兰多糖,取不同浓度的底物在最适温度及 pH 条件下与普鲁兰酶 BsP 反应,以蒸馏水代替酶液作为空白对照,DNS 法测定生成的还原糖含量,计算不同底物质量浓度 [S](mg/mL) 时的酶促反应初速度 V ($\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$),作 V -[S] 曲线图,用 L-B 双倒数作图法计算出酶的 K_m 值和 V_{max} 。

1.2.7 重组普鲁兰酶水解普鲁兰多糖的产物分析 麦芽三糖、麦芽糖和葡萄糖的标准品质量浓度 10 g/L,取过量重组普鲁兰酶与普鲁兰糖在最适条件下反应,对照为灭活酶液与普鲁兰糖反应,对标准样和酶反应产物样品进行 HPLC 检测。色谱条件:Bio-Rad HPLC Organic Acid Analysis Column Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column 300 mm×7.8 mm,以 5 mmol/L H_2SO_4 为流动相,流速设置为 0.5 mL/min,柱温设置为 55 °C。

1.2.8 重组酶在粉丝制作中的应用 按传统方法制作粉丝,在文献[7]的基础上根据枯草芽孢杆菌表达的重组普鲁兰酶的性质稍做改变,主要涉及第一步制芡糊,具体如下:取淀粉或红薯粉 100 g,用 100 mL 温水悬浮,一次性加入 700 mL 沸水,并剧烈搅拌成芡糊,冷却至 45 °C 时加入普鲁兰酶搅拌均匀,在 45 °C 水浴锅中保温 30 min。后续步骤包括和面、制丝、煮丝、理丝、晾干均与文献[7]相同。明矾粉丝制作方法同文献[7],以普鲁兰酶 GsP 和 PUL3665 为催化剂的粉丝制作方法分别与文献[6]和文献[7]一致。粉丝断条率、膨润度和煮沸损失率的计算方法均同文献[7],检测时均做 2 组平行实验。

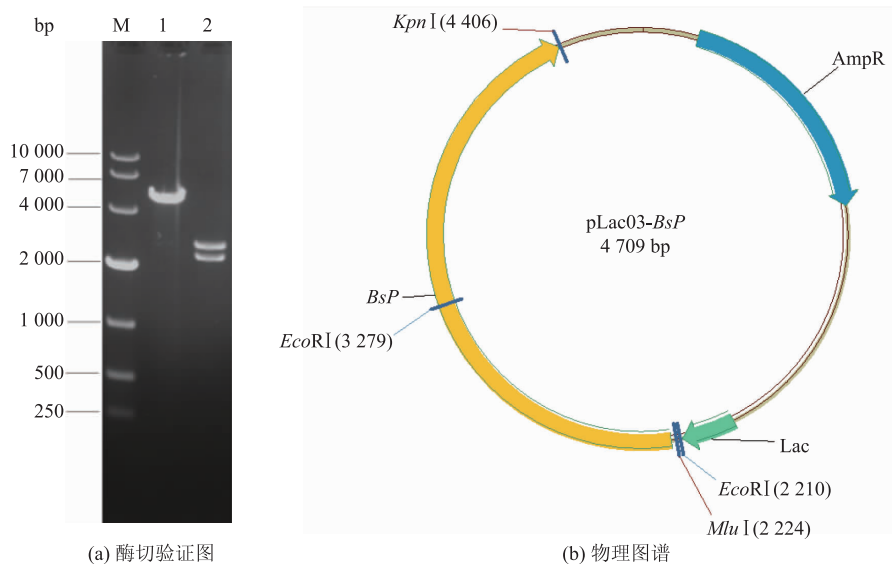
2 结果与分析

2.1 重组菌的构建

以枯草芽孢杆菌 168 的染色体 DNA 为模板,以 Plb1 和 Plb2 为引物进行 PCR 扩增,获得 2.2 kb 的扩增产物,产物大小与根据枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因 *BsP* 大小一致。用核酸内切酶 *MluI* 和 *KpnI* 酶切目的片段和表达载体 pLac03,连接后转化 *E. coli* JM109,任取 4 个转化子提取质粒,酶切验证。结果表明,这 4 个转化子所含质粒用 *MluI* 和 *KpnI* 酶切后获得 2.6 kb 和 2.2 kb 的两个片段,分别与 pLac03 空质粒和扩增片段一致。图 1(a)是其中 1# 转化子质粒酶切电泳图,酶切图谱符合重组质粒应有的特点(图 1(b))。进一步测序显示,4 个重组质粒中插入片段的序列完全相同,与枯草芽孢杆菌 *BsP* 基因编码区完全一致,编码区的 3' 端增加了由引物带入的 6 个组氨酸密码子,用于表达产物的亲和层析纯化,包括 6 个组氨酸密码子的编码区全长 2 175 bp,编码的多肽链理论相对分子质量为 81 800。重组菌诱导表达后进行细胞破碎,破碎液检测到明显的普鲁兰酶活性,而含空质粒的对照菌则细胞内外均未检测到酶活。这个结果与 Malle 等^[12]对 *amyX* 基因的研究结果一致,说明克隆的基因编码的蛋白质是一种普鲁兰酶,将上述 1# 转化子命名为 *E. coli* JM109/pLac03-*BsP*,简称为 JM109/pLac03-*BsP*,用于后续实验。

2.2 重组普鲁兰酶的分泌表达及纯化

在本课题组的前期工作中曾对嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的普鲁兰酶基因 *GsP* 和地表地芽孢杆菌 (*G. subterraneus*) 的普鲁兰酶基因 *pul3665* 进行研究,结果显示这两种基因在大肠杆菌中的表达产物均有相当大的部分可以分泌到周质空间和细胞外^[7,13]。序列比对显示,*BsP* 基因编码的蛋白质 *BsP* 与地芽孢杆菌来源的两种耐热型普鲁兰酶 *GsP* 和 PUL3665 的氨基酸序列的同源性大概为 50%。为了研究 *BsP* 在大肠杆菌中分泌表达的可能性,将重组菌分别在 LB 培养基和 TB 培养基中进行培养和诱导表达。结果显示,重组菌 JM109/pLac03-*BsP* 在 LB 中诱导表达后细胞外培养液中检测不到明显的酶活,细胞破碎液则有较高的普鲁兰酶酶活,折合到等体积发酵液其酶活大约为 46 U/mL。重组菌 JM109/pLac03-*BsP* 在 TB 培养基



M:DL10000 DNA marker; 1:pLac03-BsP/Kpn I; 2:pLac03-BsP/Kpn I +Mlu I

图1 重组质粒 pLac03-BsP 酶切验证图和物理图谱

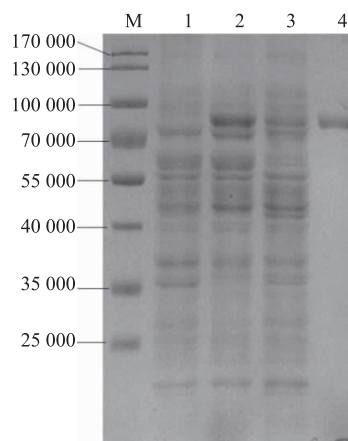
Fig. 1 Restriction analysis and map of the recombinant plasmid pLac03-BsP

中诱导表达后细胞外培养液中的普鲁兰酶酶活大约为 0.6 U/mL,虽然活力不高但很明显,而含空质粒的对照菌在同样条件下则完全检测不到酶活。肖亚朋等^[13]研究发现,表达 *GsP* 基因的重组大肠杆菌只有在 TB 培养基中诱导表达时普鲁兰酶才能分泌到细胞外,而在 LB 培养基中诱导表达时培养液中检测不到酶活。本研究结果与其一致,但 *GsP* 分泌表达量相比本研究的 *BsP* 明显更高,前者培养液酶活达到 2.3 U/mL。

为研究基因 *BsP* 表达产物在大肠杆菌中的分泌情况,将重组大肠杆菌 JM109/pLac03-BsP 和 JM109/pLac03-GsP 诱导表达后分离细胞各组分析重组酶及重组蛋白质的情况,结果见图 2~3。

图 2 的 1~3 泳道为重组菌胞质内蛋白质的电泳结果,对比这 3 个泳道可知,相对于含空质粒的对照菌,重组菌 JM109/pLac03-BsP 和 JM109/pLac03-GsP 的胞内蛋白质在相对分子质量 80 000 左右均有一个明显的表达条带,分别与 *BsP* 基因和 *GsP* 基因对应蛋白质的理论相对分子质量 81 800 和 81 300 一致。从表达条带的浓度看,*BsP* 基因的表达量明显比 *GsP* 更高,酶活检测结果显示, JM109/pLac03-BsP 胞质组分的酶活为 44.7 U/mL,而 JM109/pLac03-GsP 胞质组分的酶活为 29.6 U/mL,这个结果与蛋白质条带的差异能大致对应,从这个

结果看 *BsP*、*GsP* 两条基因的表达产物的比酶活应该比较接近。

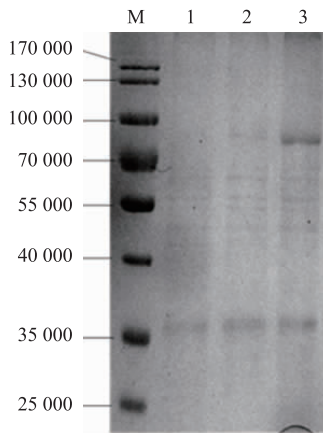


M: 蛋白质标准相对分子质量; 1: *E. coli* JM109/pLac03 胞质组分; 2: *E. coli* JM109/pLac03-BsP 胞质组分; 3: *E. coli* JM109/pLac03-GsP 胞质组分蛋白质; 4: *E. coli* JM109/pLac03-BsP 胞质组分纯化蛋白质。

图2 重组菌株胞质蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of cytoplasmic protein of the recombinants

图 3 的 1~3 泳道是重组菌周质蛋白质的电泳结果,对比 3 个电泳道可见,与对照菌相比,重组菌 JM109/pLac03-BsP 和 JM109/pLac03-GsP 的周质蛋白质在 80 000 附近也存在明显的差异表达条带,与



M:蛋白质标准相对分子质量;1:*E. coli* JM109/pLac03 周质组分;2:*E. coli* JM109 /pLac03-*BsP* 周质组分;3:*E. coli* JM109/pLac03-*GsP* 周质组分蛋白质。

图3 重组菌株周质蛋白质 SDS-PAGE 分析

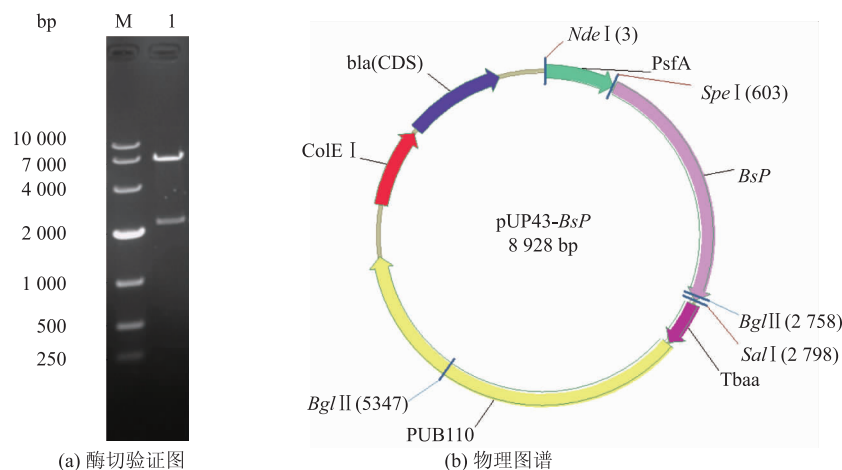
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of periplasmic protein of the recombinants

各自的重组普鲁兰酶相对分子质量一致。从差异表达条带的浓度看,*GsP* 的条带很浓,而 *BsP* 只有很微弱的差异条带,用软件 Image Lab 4.0 对两个条带进行分析显示,条带所代表的 *GsP* 的浓度是 *BsP* 的 12 倍。进一步进行酶活检测,结果显示 JM109/pLac03-*GsP* 的周质酶活为 14.6 U/mL, 而 JM109/pLac03-*BsP* 的周质酶活为 4.6 U/mL。显然,两者酶活的差异

显著小于蛋白质浓度的差异,初步推算可以发现,周质中 *BsP* 的比酶活大约是 *GsP* 的 4 倍,这和胞质内重组酶比酶活的计算结果形成明显的矛盾。由于周质中 *BsP* 的含量过低,未能获得其纯酶,同时考虑到大肠杆菌周质蛋白质的分离并不准确,容易被胞质内组分污染,因此在大肠杆菌中只采用胞质内蛋白质进行重组 *BsP* 的分离纯化。图 2 泳道 4 是纯酶的电泳结果,可见采用镍柱亲和层析得到的产物显示为单一条带,结合蛋白质质量浓度检测进行计算,大肠杆菌胞质内 *BsP* 纯酶比活力为 27.7 U/mg,这与 Malle 等^[12]获得的 *BsP* 纯酶比酶活 24.1 U/mg 比较接近。

2.3 重组枯草芽孢杆菌的构建

以 *B. subtilis* 168 的基因组为模板,以 *Pbs1* 和 *Pbs2* 为引物进行 PCR 扩增得到目的基因,将目的基因和载体 pUP43 用 *SpeI* 和 *SalI* 酶切连接,并转化大肠杆菌,挑取转化子提取质粒酶切验证。图 4 (a) 中泳道 1 是其中 1# 转化子所含质粒的酶切电泳图,用 *SpeI* 和 *SalI* 酶切后电泳显示大小为 2.2 kb 和 6.7 kb 的两条带,与 *BsP* 基因和表达载体 pUP43 的大小一致(图 4(b))。进一步测序显示,重组质粒中的插入片段与 *amyX* 基因编码区一致,编码区的 3'端增加了由引物带入的 6 个组氨酸密码子。



M:DL10000 DNA marker;1:pUP43-*BsP*/*SpeI*+*SalI*

图4 重组质粒 pUP43-*BsP* 酶切验证图和物理图谱

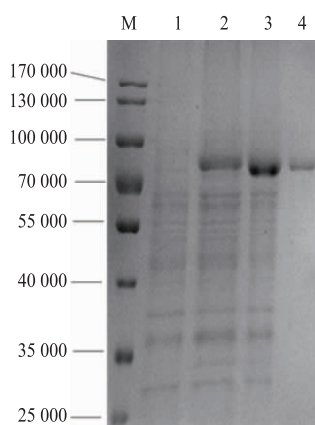
Fig. 4 Restriction analysis and map of the recombinant plasmid pUP43-*BsP*

将重组质粒 pUP43-*BsP* 转化到 *B. subtilis* 1A717 中,提取转化子质粒进行酶切验证,结果显示所提取质粒的酶切图谱与图 4(a)一致,表明该菌株

是转入了重组质粒 pUP43-*BsP* 的重组菌,将该重组菌命名为 *B. subtilis* 1A717/pUP43-*BsP*, 简称 1A717/pUP43-*BsP*,用于后续实验。

2.4 *BsP* 基因在枯草芽孢杆菌中的表达

按上述方法进行重组枯草芽孢杆菌重组酶的发酶。重组枯草芽孢杆菌 1A717/pUP43-*BsP* 和 1A717/pUP43-*GsP* 发酶至 36 h, 发酶上清液酶活分别达到 71 U/mL, 和 34 U/mL。图 5 是重组菌发酶上清液的 SDS-PAGE 电泳图。对比图 5 的 1~3 泳道可知, 相对于对照菌株, 1A717/pUP43-*BsP* 和 1A717/pUP43-*GsP* 的发酶液上清液在 81 000 附近有明显表达条带, 与目的蛋白质理论相对分子质量一致。由图 5 泳道 2、3 可见, *GsP* 基因的表达量明显高于 *BsP* 基因, 但酶活检测显示, 发酶液中 *GsP* 的酶活不到 *BsP* 的一半, 显然 *BsP* 的比酶活远高于 *GsP*, 这与大肠杆菌周质酶活检测及蛋白质电泳分析结果一致。对 1A717/pUP43-*BsP* 发酶上清液进行纯化, 图 5 泳道 4 为纯化后的酶液, 显示为单一条带。测定其蛋白质浓度, 经过计算得出该蛋白质的比酶活为 153.7 U/mg, 这个比活力是同一基因在大肠杆菌胞质内表达产物的 5.5 倍。结合大肠杆菌中 *BsP* 胞质内产物和周质产物的差异可见, *BsP* 的周质分泌表达产物的比活力远高于胞质内非分泌产物的比活力。鉴于 *BsP* 基因在枯草芽孢杆菌中分泌表达产物和在大肠杆菌胞质内产物的比活力显著差异, 在后续工作中前者命名为 *BsBsP*, 后者为 *EcBsP*。



M: 蛋白质标准相对分子质量; 1: *B. subtilis* 1A717/pUP43 胞外组分; 2: *B. subtilis* 1A717/pUP43-*BsP* 胞外组分蛋白质; 3: *B. subtilis* 1A717/pUP43-*GsP* 胞外组分蛋白质; 4: *B. subtilis* 1A717/pUP43-*BsP* 胞外组分纯化蛋白质。

图 5 重组菌株胞外蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of extracellular protein of the recombinants

BsBsP 和 *EcBsP* 是同一个基因的表达产物, 两

种蛋白质的酶学性质发生大的差异一般可能有两个原因, 一是蛋白质折叠方式不同, 二是蛋白质的后加工。对于后一种情况, 由于枯草芽孢杆菌不是真核生物, 不存在糖基化等后修饰现象, 最有可能发生的是蛋白质的部分切除。由于两种蛋白质的纯酶都是利用其羧基端的组氨酸残基通过亲和层析分离的, 因此羧基端一定是完整的。为验证两种蛋白质氨基端是否有差异, 将纯化得到的 *BsBsP* 和 *EcBsP* 送上海生工生物技术公司进行氨基端测序。测序结果表明, *BsBsP* 和 *EcBsP* 氨基端的 6 个氨基酸一样, 都是 Met-Val-Ser-Ile-Arg-Arg, 与 *BsP* 基因编码区的 5' 端翻译产物完全一致, 可见 2 种蛋白质的 N 端均未发生部分切除, 因此 2 种蛋白质的氨基酸序列应该完全相同, *EcBsP* 比酶活低的原因很可能源于形成立体结构过程中发生的错误折叠。

2.5 重组普鲁兰酶的酶学性质

2.5.1 重组普鲁兰酶的最适温度和最适 pH 在 pH 6.0 的缓冲液中, 30~65 °C 温度范围内测定 *BsBsP* 的相对酶活, 结果见图 6。 *BsBsP* 在 40~50 °C 时酶活较高, 45 °C 为最适温度, 温度超过 50 °C 时酶活迅速下降。 *EcBsP* 的最适 pH、最适温度和温度稳定性检测结果与 *BsBsP* 几乎完全相同, 以下不再赘述。

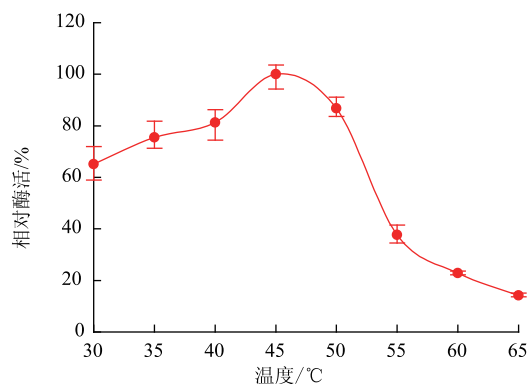


图 6 温度对重组普鲁兰酶 *BsBsP* 酶活力的影响

Fig. 6 Effects of temperature on the activity of the recombinant pullulanase *BsBsP*

在 45 °C 下, 测定不同 pH 值的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液对酶活力的影响, 结果见图 7。重组普鲁兰酶 *BsBsP* 对 pH 变化较敏感, pH 为 5.5~6.5 时, 酶活均在最高酶活的 90% 以上, 6.0 为最适 pH 值。pH 5 时相对酶活为 47%, pH 超过 6.5 时酶活力下降明显。

2.5.2 重组普鲁兰酶的热稳定性 将酶液置于 40、45、50、55 °C 金属浴中处理 3 h, 每间隔 0.5 h 测定

相对酶活,结果见图8。40℃保温处理3h,相对酶活在80%以上;45℃保温处理3h,相对酶活在60%以上;温度超过45℃,酶活下降迅速;50℃保温处理3h,相对酶活仅为19%;在55℃下BsBsP迅速失活。

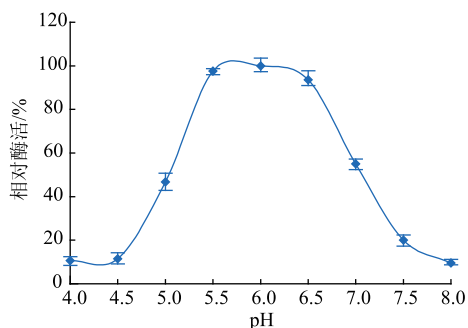


图7 pH对重组普鲁兰酶BsBsP酶活力的影响

Fig. 7 Effects of pH on the activity of the recombinant pullulanase BsBsP

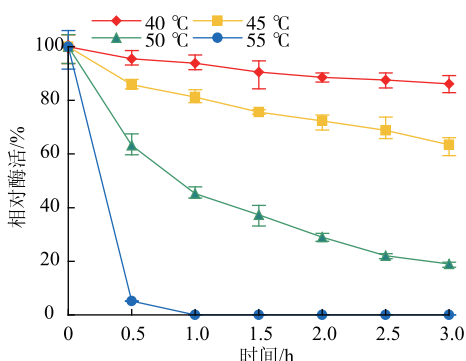


图8 重组普鲁兰酶BsBsP的热稳定性

Fig. 8 Thermo-stability of the recombinant pullulanase BsBsP

2.5.3 不同金属离子及溶液对重组普鲁兰酶酶活力的影响 在45℃、pH 6.0条件下,测定几种常见金属离子及溶液对普鲁兰酶BsBsP和EcBsP的催化活力的影响,结果见表1。Mn²⁺、Co²⁺对两种酶的活性均有激活作用;Na⁺、K⁺、Fe²⁺、Cu²⁺对两种酶的活性有一定的抑制作用;Zn²⁺对重组酶均有强烈抑制作用,在实验条件下两种重组酶的酶活几乎完全丧失。Na⁺对BsP活性的作用是一个需要重视的问题,因为粉丝制作的芡糊中需要添加1 g/dL的氯化钠。进一步实验显示,增加Na⁺对BsP的影响不明显,另外酶活检测是在磷酸氢二钠和柠檬酸缓冲液中进行,由于溶液本身含有钠离子,因此虽然钠离子对酶活有影响,但对其在粉丝中应用的影响可能并不大。从表1可知,金属离子及化合物对BsBsP和

EcBsP的影响基本一致,只有SDS的影响相差很大,SDS导致BsBsP酶活几乎减少一半,而对EcBsP几乎没有影响。

表1 不同金属离子及试剂对BsP酶活力的影响

Table 1 Effects of different metal ions and reagents on the enzyme activity of BsP

试剂	相对酶活%	
	BsBSP	EcBsP
ddH ₂ O	100.0	100.0
EDTA-Na ₂	63.0±0.6	61.0±1.3
NaCl	75.5±1.1	77.4±0.6
CaCl ₂	104.0±0.3	103.1±0.2
KCl	49.5±0.5	42.2±1.4
MgSO ₄	97.6±1.2	100.6±0.3
ZnSO ₄	2.2±0.9	微弱
FeSO ₄	68.6±2.5	72.2±1.5
CuSO ₄	50.0±2.1	43.6±2.6
MnSO ₄	125.3±3.3	131±1.4
CoSO ₄	130.3±2.4	133±2.0
SDS	54.1±0.8	96.7±3.4
尿素	73.2±1.3	78.2±1.9

2.5.4 重组普鲁兰酶的动力学参数 按照1.2.6的方法测定BsBsP的酶促反应动力学参数,做出重组酶BsBsP催化普鲁兰多糖的V-[S]曲线图,见图9。根据L-B双倒数曲线图(图10),得到线性方程y=2.863 6x+1.301,由此可得重组酶BsBsP的K_m=2.201 mg/mL,V_{max}=0.769 μmol/(mL·min)。

2.6 重组普鲁兰酶对普鲁兰多糖的降解

取过量BsBsP与普鲁兰多糖在45℃反应2h,对降解产物进行HPLC检测,结果见图11。BsBsP降解底物普鲁兰多糖生成单一产物麦芽三糖,没有检测到麦芽糖、葡萄糖以及潘糖,表明BsBsP只作用于普鲁兰多糖的α-1,6-糖苷键,对α-1,4-糖苷键不起作用。将BsBsP与质量浓度为0.5 g/dL的直链淀粉溶液在45℃反应24h,结果显示BsBsP对直链淀粉溶液蓝值没有影响,进一步表明BsBsP不降解α-1,4-糖苷键,由此可见BsBsP是一种专一性降解α-1,6-糖苷键的I型普鲁兰酶。在粉丝制作中,采用I型普鲁兰酶处理芡糊可以获得质量较高的成品粉丝,而II型普鲁兰酶由于具有水解α-1,4-糖苷键的活性,导致淀粉链变短,由此获得的粉丝断条率较高^[7]。BsBsP完全不水解α-1,4-糖苷键,比较适合在粉丝制作中使用。

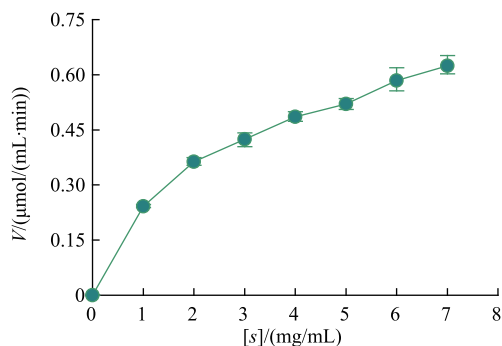


图9 BsBsP 作用于普鲁兰多糖的 V-[S]动力学曲线

Fig. 9 V-[S] kinetic curve of BsBsP acting on pullulan

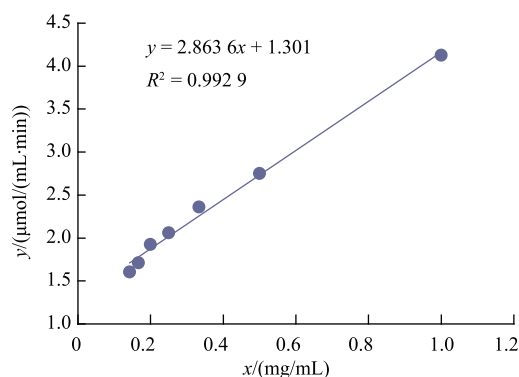


图10 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图

Fig. 10 Lineweaver-Burk double reciprocal curve

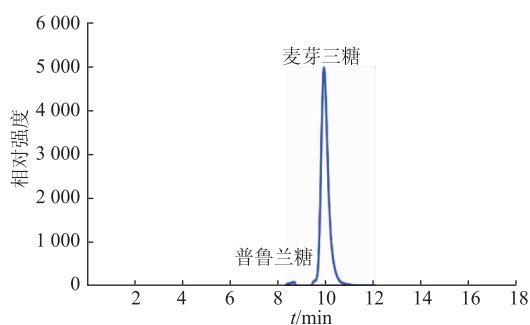


图11 BsBsP 催化普鲁兰多糖降解的产物分析

Fig. 11 Analysis of BsBsP-catalyzed degradation products of pullulan

2.7 重组普鲁兰酶 BsBsP 在粉丝制作中的应用效果

将重组枯草芽孢杆菌 1A717/pUP43-BsP 发酵获得的普鲁兰酶发酵液用超滤机进行超滤浓缩,获得最终酶活 681 U/mL 的浓缩酶液,将 BsBsP 浓缩酶液用于马铃薯淀粉粉丝的制作,结果见表 2。

表 2 结果表明,按照传统粉丝的制作工艺,如果不添加明矾,制作出的粉丝在煮丝阶段互相粘连严重,质量不合格。如果用适量 BsBsP 处理芡糊可

表 2 添加 BsBsP 对马铃薯淀粉粉丝质量的影响

Table 2 Effects of BsBsP addition on the quality of potato starch vermicelli

酶用量/ (U/g 淀粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失 率/%
0	严重并条	无法检测	无法检测	无法检测
0.5	部分并条	27±7	731±25	7.3±1.1
1.0	部分并条	9±2	719±14	8.7±1.4
1.5	少量并条	2.5±1.5	723±20	7.2±0.7
3.0	少量并条	3±1	739±26	7.5±1.3
6.0	少量并条	4±1	736±22	7.0±0.2
加明矾	少量并条	2±1	603±7	5.4±0.3

注:煮丝情况是指挤压出的粉丝在沸水中的情况。严重并条表示粉丝机压出的粉丝条进入沸水中煮丝时粉丝互相粘连并条,并条的粉丝在随后的理丝阶段难以相互分开,粉丝质量不合格;部分并条表示漏入沸水中的并条粉丝数量在 10%以内;少量并条表示漏入沸水中的并条粉丝数量在 2%以内。

以解决煮丝阶段的并条问题,也可以制作出质量合格的粉丝。按照本文方法制作粉丝,按每克芡糊淀粉 1 U 的量添加 BsBsP 处理芡糊,制作的粉丝断条率可以控制在 10%以内,基本达到优质粉丝质量的国家标准,但以这一条件制作粉丝时粉丝并条较多,这可能增加后续理丝阶段的工作量,因此酶的使用效果不够理想;如果按照 1.5 U 的量使用普鲁兰酶,则粉丝并条现象基本消失,所制作的粉丝的断条率大约为 2.5%,与添加明矾获得的粉丝非常接近;继续增加酶的用量对进一步提高粉丝质量没有明显的作用,因此每克芡糊淀粉 1.5 U 普鲁兰酶是比较合适的用量。这个结果与采用 GsP 处理芡糊的效果基本一致^[6],所获得的粉丝的质量也很接近。

红薯粉是粉丝制作的另一种重要的原材料,由于部分保留了红薯香甜的口感及更多的营养成分而受到人们的欢迎。由于红薯粉是一种未经提纯的初级农产品,成分复杂,因此以红薯粉为原料制作粉丝时有一定的困难^[7]。表 3 是 BsBsP 用于红薯粉粉丝制作的实验结果。

由表 3 可知,以红薯粉为原料制作的粉丝断条率明显比采用纯淀粉为原料制作的粉丝的断条率高。采用 BsBsP 水解芡糊可以解决煮丝阶段并条问题,也能在一定程度上降低产品断条率,但断条率只能降低到 10%左右,而且酶的用量需要达到 3 U,

增加酶的用量并不能进一步提高粉丝的质量。本课题组前期开发的两种耐热型中性普鲁兰酶 GsP 和 PUL3665 用于红薯粉粉丝制作时,成品粉丝的断条率可以降低到 5%左右^[7],但与纯淀粉粉丝的质量仍有差距。BsBsP 用于以红薯粉为原料的粉丝制作时其工艺条件还需要进一步改进。在所试验的方法中,用红薯淀粉替代大约 50%的红薯粉可以明显改进粉丝质量,在使用 1.5 U 的 BsBsP 的条件下,所获得的成品粉丝断条率一般可以降低到 7%~9%,基本达到优质粉丝的质量标准,但由此获得的粉丝的风味明显不如纯红薯粉粉丝。另外由于红薯粉种类繁多且质量差距很大,BsBsP 用于红薯粉丝制作的效果很不稳定,因此其使用方法还需要进行更详细的探索。从产品质量考虑,BsBsP 目前只适合于淀粉为原料的粉丝制作。

表 3 添加 BsBsP 对红薯粉丝质量的影响

Table 3 Effects of BsBsP addition on the quality of sweet potato vermicelli

添加量/ (U/g 淀粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失 率/%
0	严重并条	无法检测	无法检测	无法检测
0.5	部分并条	25±6	703±12	7.3±1.1
1.0	部分并条	14.5±2.5	711±8	8.7±1.4
1.5	少量并条	13.5±1.5	701±17	7.2±0.7
3.0	少量并条	9±2	707±15	7.5±1.3
6.0	少量并条	10±2	715±13	7.0±0.2
加明矾	少量并条	3.5±1.5	677±25	7.9±1.3

3 讨论

作者研究了枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因 *BsP* 的表达,结果表明在枯草芽孢杆菌中 *BsP* 可以高效分泌到胞外,在大肠杆菌中则可以少量分泌到胞外。本研究采用的表达载体 pLac03 和 pUP43 本身均不含信号肽编码区,因此重组蛋白质的分泌表达是依靠自身结构完成的。用信号肽分析软件 TatP (<https://services.healthtech.dtu.dk/>)对 *BsP* 基因编码的蛋白质序列进行分析显示,蛋白质的 N 端可能存在双精氨酸(twin-arginine translocation, Tat)信号肽,其中第 5、6 位的连续两个精氨酸是其核心区。对 *BsP* 基因表达在大肠杆菌胞质内的重组蛋白质 EcBsP 和表达在枯草芽孢杆菌细胞外的蛋白质 BsBsP 进行 N 端测序显示,两种蛋白质的 N 端序列

一致且均与按照 *BsP* 基因序列推测的蛋白质序列完全一致。Sec 途径和 Tat 途径是细菌最重要的蛋白质分泌途径。其中,通过 Sec 途径分泌的蛋白质在分泌过程中其 N 端的一段信号肽会被切除,而通过 Tat 途径分泌的蛋白质由于采用先折叠后分泌的方式穿过细胞膜,一般不存在 N 端信号肽切除的现象^[8]。N 端测序和软件分析均显示,基因 *BsP* 的表达产物通过 Tat 途径分泌到细胞外。作者所在课题组前期对枯草芽孢杆菌的近缘微生物嗜热脂肪地芽孢杆菌(*G. stearothermophilus*)和地表地芽孢杆菌(*G. subterraneus*)的普鲁兰酶基因 *GsP* 和 *pul3665* 研究发现,两者在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中均能依靠自身结构实现分泌表达。其中,*GsP* 蛋白质的 N 端测序显示,其胞外蛋白质的 N 端未发生信号肽切除的现象,因此推测其分泌表达是通过 Tat 途径实现的,但用 TatP 等信号肽预测软件对这个蛋白质的 N 端进行分析时却并未发现有 Tat 或其他形式的信号肽。图 12 是上述 3 种普鲁兰酶 N 端部分氨基酸序列的比对结果,3 种蛋白质的序列具有一定的同源性。对 3 种蛋白质分子全域序列进行比对显示,*BsP* 与另外两种蛋白质的同源性在 50%左右,而 3 种分子均为 I 型普鲁兰酶,推测三者在各自细胞中应具有相同或相似的功能。从图 12 还可以看出,在 3 种蛋白质中只有 *BsP* 有典型的双精氨酸结构(—R—R—),其他两种蛋白质都只有第 6 位有一个精氨酸,其中 *GsP* 的精氨酸残基左右两侧甚至都不是碱性氨基酸。人们对大肠杆菌研究发现,双精氨酸(—R—R—)结构是双精氨酸途径信号肽的核心,这个特征几乎一成不变^[19-20]。但本研究及文献[13]的结果显示,*GsP* 基因在大肠杆菌中表达产物分泌到胞外的量显然超过 *BsP*。朱新文等报道的基因 *pul3665* 在大肠杆菌中分泌表达的量也显然超过本文大肠杆菌胞外 *BsP* 的量。由此可见,在非大肠杆菌来源的蛋白质中,双精氨酸(—R—R—)序列可能不一定是 Tat 信号肽的必须结构,判断一种蛋白质是否能通过 Tat 途径实现分泌表达不能过于依赖这一特征。

作者还发现,*BsP* 基因在大肠杆菌中的表达产物能否分泌到胞外还和培养条件有关。采用 TB 培养基培养的细胞表达的重组酶可以少量分泌到胞外,而采用 LB 培养基培养的细胞在诱导表达后培养液中未检测到明显的普鲁兰酶酶活。有关

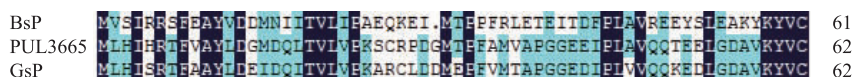


图 12 3种普鲁兰酶 N 端序列比对

Fig. 12 Sequence alignment of N terminal of three pullulanases

GsP 的研究也发现了类似的情况。枯草芽孢杆菌及其近缘微生物已经有多个普鲁兰酶基因被克隆并实现了异源表达,如嗜热喜油地芽孢杆菌(*G. thermoleovorans*)^[11]、热链型地芽孢杆菌(*G. thermocatenulatus*)^[21]等。作者所在课题组早年研究了苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)的普鲁兰酶基因 *BIP* 和 *BtP* 在大肠杆菌中的表达^[22-23],这些研究均以 LB 培养基培养细胞,均未发现重组酶利用自身结构分泌到细胞外的现象。从本研究结果看,如果采用本研究的条件对上述基因重新进行研究有可能获得不同的结果。

BsP 基因在胞质内和细胞外的表达产物表现出不同的性质。*BsP* 基因在大肠杆菌胞质中的表达产物 EcBsP 和在枯草芽孢杆菌胞外表达产物 BsBsP 的氨基酸序列一致,但前者比酶活为 27.7 U/mL,而后者为 153.7 U/mg,后者为前者的 5.5 倍。枯草芽孢杆菌是一种公认食品安全的微生物,而胞外产物的提取可以省去细胞破碎的过程,因此更有利于技术的实际应用,因此枯草芽孢杆菌更适合于 *BsP* 基因

的表达。从蛋白质电泳的情况看, BsBsP 在枯草芽孢杆菌中的表达量还不够理想,明显小于另一种普鲁兰酶 *GsP* 的表达量,这导致发酵液中 BsBsP 的酶活相比 *GsP* 没有表现出应有的优势。*BsP* 表达量不够高的一个重要原因可能是其基因中含有较多的细菌稀有密码子。在细菌密码子中,精氨酸的密码子 AGA 和 AGG 是对基因表达水平影响较大的稀有密码子。在 *BsP* 基因中,AGA 和 AGG 密码子合计共有 15 个,占全部精氨酸密码子的 41.7%,而 *GsP* 蛋白质虽然有 52 个精氨酸残基,但 *GsP* 基因却完全没有上述两种密码子。从密码子情况看,通过密码子、表达条件等的优化, BsBsP 蛋白质的发酵水平还有很大的提升空间。

4 结语

枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因 *BsP* 表达产物利用双精氨酸途径可以实现高效分泌表达。分泌表达产物 BsBsP 具有较高的比酶活,在以淀粉为原料的粉丝制作中有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 聂尧,严伟,徐岩. 工业属性普鲁兰酶的开发及其催化性能改善的研究进展[J]. 生物加工过程, 2013, 11(1): 104-112.
- [2] 乔宇,丁宏标,王海燕,等. 普鲁兰酶的研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(3): 189-194.
- [3] 郭卫红,任佳伟,戴宝杰,等. 一种高纯度直链淀粉的制备方法[P]. 中国专利: 201510404965.1, 2015-09-23.
- [4] 史苗苗,高群玉,郑琳,等. 普鲁兰酶加酶量对蜡质玉米抗性淀粉影响及性质研究[J]. 粮食与油脂, 2012, 25(4): 16-19.
- [5] 沈微,肖亚朋,王兵波,等. 一种以淀粉支链水解酶替代明矾的酶法粉丝制作方法[P]. 中国专利: 201510439893.4, 2015-12-02.
- [6] 王婕,朱新文,德青美朵,等. 一种中性普鲁兰酶的高效表达及重组酶在粉丝制作中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(14): 122-127.
- [7] 朱新文,德青美朵,王婕,等. 一种中性普鲁兰酶及其在红薯粉丝制作中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(8): 59-69.
- [8] KUNAMNENI A, SINGH S. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1399-1404.
- [9] 李美蓉,汪小波,黄英,等. 蜡样芽孢杆菌 GXBC-3 三个普鲁兰酶基因的表达及其酶学特性[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 83-92.
- [10] LI Y, ZHANG L, NIU D, et al. Cloning, expression, characterization, and biocatalytic investigation of a novel bacilli thermostable type I pullulanase from *Bacillus* sp CICIM 263[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(44): 11164-11172.
- [11] AYADI D Z, ALI M B, JEMI S, et al. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 473-481.
- [12] MALLE D, ITOH T, HASHIMOTO W, et al. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from

- Bacillus subtilis* strain 168[J]. *Acta Crystallographica*, 2006, 62(4):381-384.
- [13] 肖亚朋,沈微,李婷霖,等.嗜热脂肪土芽孢杆菌普鲁兰酶基因的异源表达及重组酶性质[J].食品与发酵工业,2018,43(5):30-36.
- [14] KAHAR U M, NG C L, CHAN K G, et al. Characterization of a type I pullulanase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 reveals an unusual substrate hydrolysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(14):6291-6307.
- [15] ANAGNOSTOPOULOS C, SPIZIZEN J. Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1961, 81(5):741-746.
- [16] 沈微,俞玲,陈献忠,等.麦芽糖 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J].食品与发酵工业,2011,37(6):1-5.
- [17] 孙利鹏,德青美朵,朱新文,等.一种高耐热普鲁兰酶的克隆表达、酶学性质及其在粉丝制作中的应用[J].食品工业科技,2020,41(5):113-118,123.
- [18] BERKS B C, SARGENT F, PALMER T. The Tat protein export pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(2):260-274.
- [19] LEE P A, TULLMAN D, GEORGIU G, et al. The bacterial twin-arginine translocation pathway[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60(1):373-395.
- [20] DELISA M P, TULLMAN D, GEORGIU G. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(10):6115-6120.
- [21] LI L M, DONG F Y, LIN L, et al. N-terminal domain truncation and domain insertion-based engineering of a novel thermostable type I pullulanase from *Geobacillus thermocatenulatus*[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2018, 66(4):10788-10798.
- [22] 林杰,沈微,饶志明,等.苏云金芽孢杆菌普鲁兰酶编码基因 *amyX* 的鉴定与重组酶性质研究[J].安徽农业科学,2008,36(17):7155-7156,7161.
- [23] 张明焱,沈微,饶志明,等.地衣芽孢杆菌普鲁兰酶编码基因的鉴定[J].生物学杂志,2009,26(2):8-10.

科技信息

欧盟批准苯甲酸、甲酸钙和富马酸制剂作为饲料添加剂

2021年11月30日,欧盟发布条例(EU) 2021/2097,批准苯甲酸、甲酸钙和富马酸制剂(Benzoic acid, calcium formate and fumaric acid)作为饲料添加剂用于育肥火鸡和饲养繁殖火鸡,本条例自发布之日起第二十天生效。

该添加剂所属类别为“功能性添加剂”,功能组别为“其他功能性添加剂”;识别号为4d14;用于上述动物时在含水率12%全价饲料中的最低质量分数为500 mg/kg,最高质量分数为1 000 mg/kg;批准期限至2031年12月20日。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.欧盟批准苯甲酸、甲酸钙和富马酸制剂作为饲料添加剂[EB/OL]. (2021-12-1).http://www.tbguide.com/xwdt/gxw/202112/t20211201_1853401.html