

铜绿假单胞菌脂肪酶基因(*LipA*)在枯草芽孢杆菌 *pab02* 中的整合表达

张飞燕¹, 何敏^{1,2}, 王振华³, 潘康成^{1*}, 冯杰¹, 唐慧琴¹

(1.四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心, 四川 成都 611130; 2.德阳市畜牧食品局, 四川 德阳 618000;
3.成都农业科技职业学院, 四川 成都 611100)

摘 要: 对铜绿假单胞菌脂肪酶基因(*LipA*)进行克隆, 构建整合表达质粒 pHSG398–16S–*lipA*, 并在枯草芽孢杆菌 *pab02* 中整合表达。根据铜绿假单胞菌 *LipA* 基因设计引物, 扩增 *LipA* 基因, 并进行测序, 构建整合表达质粒 pHSG398–16S–*lipA*, 转化枯草芽孢杆菌 *pab02*, 并对转化后的阳性菌株进行诱导表达。结果显示, 成功从铜绿假单胞菌 A05 菌株中扩增到长 1 092 bp 的 *LipA* 基因, 该基因与铜绿假单胞菌 *LipA* 基因(登录号为 AB290342)的同源性高达 98%; 该基因共编码 311 个氨基酸(aa), 包含 26 个 aa 组成的信号肽和 285 个 aa 组成的成熟肽; 成功构建了整合表达质粒 pHSG398–16S–*lipA*, 并将 *LipA* 整合到枯草芽孢杆菌 *pab02* 染色体上, 获得了重组枯草芽孢杆菌 *pab02*–*lipA*; SDS–PAGE 分析结果表明, 脂肪酶蛋白得到了有效表达, 该蛋白的相对分子质量约为 37 000。

关 键 词: 铜绿假单胞菌; 枯草芽孢杆菌; 脂肪酶基因

中图分类号: Q939.11

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2017)02–0200–06

Clone and integrative expression of gene lipase *LipA* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Bacillus subtilis*

ZHANG Feiyan¹, HE Min^{1,2}, WANG Zhenhua³, PAN Kangcheng^{1*}, FENG Jie¹, TANG Huiqin¹

(1. Animal Microecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Deyang Animal Husbandry and Food Bureau, Deyang, Sichuan 618000, China; 3. Chengdu Agricultural Science and Technology Career Academy, Chengdu 611100, China)

Abstract: This experiment aimed to construct an integrative expression vector pHSG398–16S–*lipA*, and expressed gene *Pseudomonas aeruginosa* lipase (*LipA*) in *Bacillus subtilis* *pab02*. A pair of primers was designed based on sequence of gene *LipA*, and its *P. aeruginosa* A05 was cloned and sequenced, the followed by the construction of integrative expression plasmid pHSG398–16S–*lipA*, then it was transformed into *Bacillus subtilis* *pab02* for expression. The experiment obtained a 1 092 bp length of *LipA* encoded with 311 amino acids, contained a signal peptide with 26 amino acids and a mature peptide with 285 amino acids, it shared 98% homology with gene lipase A of *P. aeruginosa* (Accession No. AB290342). The integrative expression plasmid pHSG398–16S–*lipA* was successfully constructed and transformed into *B. subtilis* *pab02*. Result from SDS–PAGE analysis showed that the lipase A was successfully expressed and its relative molecule weight was about 37 000.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*; lipase gene

假单胞菌属脂肪酶(*Lipase*)因具有其他微生物脂肪酶所没有的生化特性而在脂肪酶应用领域倍受青睐,已被广泛应用于油脂、食品、医药、饲料、生物能源、纺织、洗涤剂、环境治理等领域^[1-5]。在饲料中添加脂肪酶可弥补动物肠源性脂肪酶的不足,提高对油脂类物质的消化利用率^[6]。铜绿假单胞菌为条件致病菌,其所产的脂肪酶应用受到限制,因此,需要寻找一种良好的表达系统来生产该菌脂肪酶。在大肠杆菌中表达的铜绿假单胞菌脂肪酶产物以包涵体形式存在,其表达量高,但有活性的脂肪酶无法直接得到^[7]。*Lipase* 基因已在 *E.coli* BL21(DE3)菌中被成功表达^[8],但其活性有待研究。枯草芽孢杆菌具有维持和调整动物肠道微生态平衡、分泌多种消化酶、提高饲料消化利用率、提高动物免疫力等功能^[9-12],具有不分泌毒素、安全性好、易于基因调控、无密码子偏向性、生长快、易于培养、外源蛋白可直接分泌到培养基中等优点,为优良的外源蛋白表达系统^[13-15]。韩振林等^[16]通过双蛋白酶缺失的枯草芽孢杆菌 *pWB980* 表达系统成功表达了 *Lipase* 基因,菌液中 *Lipase* 的酶活是原始菌株酶活的 2 倍多。目前用于外源蛋白表达系统的菌株主要为枯草芽孢杆菌 168 或蛋白酶缺失菌株。通过构建分泌表达载体来实现 *Lipase* 的分泌表达,而用自行分离的野生菌作为外源蛋白表达系统构建 *Lipase* 整合质粒进行整合表达的报道尚少。笔者从具有脂肪酶活性的铜绿假单胞菌中克隆 *LipA* 基因,构建整合表达质粒 *pHSG398-16S-lipA*,转化枯草芽孢杆菌 *pab02*,旨在为益生枯草芽孢杆菌 *pab02* 整合表达系统的建立和转基因新型微生态制剂的研制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

铜绿假单胞菌 A05、枯草芽孢杆菌 *pab02*、*E.coli* DH5 α 均由四川农业大学动物微生态研究中心保存;质粒 *pUC19* 和 *pHSG398* 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。

限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*HI、*Eco*R I 和 *T₄* DNA 连接酶和碱性磷酸酶(CIAP)均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);核酸染料、2 $\times$ *Taq* PCR Master Mix 购自天根生化科技(北京)有限公司;SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和柱式

DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌脂肪酶基因的扩增及重组质粒 *pUC19-lipA* 的构建与鉴定

参照 Nicholson^[17]的方法提取铜绿假单胞菌 A05 基因组 DNA。根据 GenBank 中的铜绿假单胞菌 *LipA* 基因序列设计引物 *P₁* 和 *P₂*(*P₁* 为 5'-CGGGA TCCCGTGCCACGCAGGTTATGAC-3', *P₂* 为 5'-C CAAGCTTAGCAGGAGGATTTTCTT CAC-3', 由北京天根公司合成,下划线分别为 *Bam*HI 和 *Hind* III 酶切位点),以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:2 $\times$ *Taq* Master Mix 12.5 μ L, 10 pmol/ μ L *P₁* 和 *P₂* 各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物,将纯化回收的 *LipA* 基因与 *pUC19* 质粒分别进行双酶切(10 $\times$ Buffer 5 μ L, *pUC19* 质粒或 *LipA* 基因 15 μ L, *Bam*HI 2 μ L, *Hind* III 3 μ L, ddH₂O 25 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h),胶回收 *LipA* 基因片段和线性化质粒 *pUC19*,连接并转化 *E.coli* DH5 α ,涂于抗性 LB 平板(Amp+100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。鉴定正确后,提取质粒进行 *Bam*HI、*Hind* III 双酶切鉴定。菌液送上海生工生物有限公司测序鉴定。

1.2.2 枯草芽孢杆菌 *pab02* 药敏试验

采用药敏纸片法测定枯草芽孢杆菌 *pab02* 对 13 种抗生素的敏感性,重复 3 次。13 种抗生素为林可霉素、土霉素、卡拉霉素、氨苄青霉素、四环素、红霉素、羟氨苄青霉素、庆大霉素、氯霉素、磺胺异噁唑、螺旋霉素、链霉素、甲氧苄啶,均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2.3 枯草芽孢杆菌 *pab02* 16S rRNA 的扩增及同源重组质粒 *pHSG398-16S* 的构建与鉴定

参照 NICHOLSON^[17]的方法提取枯草芽孢杆菌 *pab02* 基因组 DNA。在细菌 16S rRNA 通用引物中引入酶切位点 *Eco*R I(PF 为 5'-CGGAATTCAG AGTTTGATCCTGGCTCAG-3', PR 为 5'-CGGAA TTCCAAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 由天根生物科技(北京)有限公司合成,*Eco*R I 为下划线部

分)。PCR 反应体系及反应条件同上。PCR 产物经 2% AGE 电泳检测后,用胶回收试剂盒纯化、回收,送上海生工生物有限公司测序鉴定。用试剂盒提取 pHSG398 质粒,经 *EcoR* I 酶切(10× Buffer 5 μ L, pHSG398 25 μ L, *EcoR* I 2 μ L, ddH₂O 18 μ L; 37 °C 水浴 4 h)后纯化回收线性化 pHSG398 质粒,用碱性磷酸酶(CIAP)去除 5'端的磷酸(线性化 pHSG398 质粒 40 μ L, 10×Buffer 5 μ L, CIAP 2 μ L, ddH₂O 3 μ L, 50 °C 反应 30 min),用 DNA 胶回收试剂盒纯化、回收。将经 *EcoR* I 酶切后的枯草芽孢杆菌 pab02 16S rRNA 序列与去除 5'端磷酸后的线性化 pHSG398 质粒连接,并按 1 : 7(物质的量比)混合,用 T₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。用连接产物转化 *E.coli* DH5 α , 用氯霉素(Cm⁺)筛选阳性克隆,提取重组质粒 pHSG398-16S 进行 *EcoR* I 单酶切鉴定。

1.2.4 整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 的构建与鉴定

用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切重组质粒 pUC19-lipA 和同源重组质粒 pHSG398-16S 电泳、胶回收 *LipA* DNA 和线性化 pHSG398-16S 质粒。用 T₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,转化 *E.coli* DH5 α , 抗性平板(Cm⁺)筛选阳性克隆,提取重整表达质粒进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定(引物为 P₁、P₂)。

1.2.5 脂肪酶基因 *LipA* 在枯草芽孢杆菌 pab02 中的整合表达

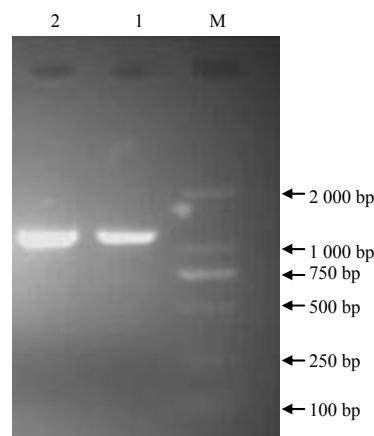
枯草芽孢杆菌 pab02 感受态细胞的制备参考 Nicholson^[17] 两步法进行。取 10 μ L 线性化的 pHSG398-16S-lipA 转入 200 μ L *B. subtilis* pab02 感受态细胞,轻轻混匀,再加入 1 mL 无抗性营养肉汤,于 37 °C 摇床振荡培养 2 h,取 100 μ L 均匀涂布于含氯霉素 5 μ g/mL 的抗性 LB 平板上进行筛选。整合表达的质粒 pHSG398-16S-lipA 不具有枯草芽孢杆菌的复制子,不能在枯草芽孢杆菌中自我复制,而质粒 pHSG398-16S-lipA 与枯草芽孢杆菌 pab02-16S-rRNA 具有同源序列,可发生单交换而将 pHSG398-16S-lipA 整合到枯草芽孢杆菌 pab02 染色体上,且枯草芽孢杆菌 pab02 对氯霉素具有敏感性(由药敏试验可知),因此,只有 pHSG398-16S-lipA 成功整合到染色体上的重组菌才能在 Cm⁺抗性平板上生长。将正确的重组子 pab02-lipA 发酵培养后,7 439×g 离心 5 min,取 900 μ L 上清液加

入 100 μ L 预冷的三氯乙酸冰浴 30 min, 15 521×g 离心 15 min,弃上清,用预冷的丙酮洗涤 3 次,室温晾干,加入 20 μ L Loading Buffer, 100 °C 加热 5 min, SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌 A05 *LipA* 基因扩增结果及重组质粒 pUC19-lipA 的构建与鉴定结果

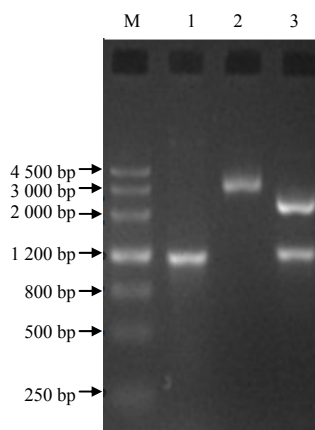
LipA PCR 产物的 2% AGE 检测结果表明,获得了约 1 100 bp 的预期产物(图 1)。将该片段插入 pUC19 质粒后构建的重组质粒经菌落 PCR 鉴定和 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 1% AGE 检测的结果见图 2。由图 2 可知,目的基因大小为 1 100 bp,载体大小为 2 700 bp,与预期大小相符。以上结果表明, *LipA* 基因已成功重组到质粒 pUC19 上。



M DL 2 000 DNA Marker ; 1、2 *LipA* 基因的 PCR 产物。

图1 *P. aeruginosa* A05 *LipA* 基因 PCR 产物的扩增结果

Fig.1 PCR amplification on gene *LipA* of *P.aeruginosa* A05



M DL 4 500 DNA Marker ; 1 质粒 pUC19-lipA 菌落 PCR 产物 ; 2 重组质粒 pUC19-lipA ; 3 pUC19-lipA 双酶切产物。

图2 重组质粒 pUC19-lipA 的菌落 PCR 和双酶切鉴定结果

Fig.2 Identification result of recombinant plasmid pUC19-lipA using colony PCR and double enzyme

2.2 脂肪酶基因 *LipA* 的测序鉴定

将阳性克隆菌液送公司测序,拼接后获得 1 092 bp 的 *LipA* 基因序列。该结果与预期一致。通过 Blast 在线比对,该段序列与已发表的 *P. aeruginosa* 脂肪酶 *LipA* 基因(登录号 AB290342)的同源性高达 98% 以上,包含 1 个 ORF,长度为 933 bp,编码 311 个氨基酸残基,包括前 26 个 aa 残基组成的信号肽和后 285 个 aa 残基组成的成熟肽。该基因的 SD 序列位于起始密码子 ATG 上游 8 bp 的 GAGA 处。由 *lipA* 基因推导出的氨基酸序列进行 NCBI-Blastp 检索及保守区域分析,发现该段氨基酸序列包含 1 个完整的脂肪酶水解活性区域 *lipA*,属于 Esterase-lipase superfamily 中的成员,此水解活性中心由亲核氨基酸残基(Ser108、Asp208 和 His264)构成催化三联体。

2.3 药敏试验结果

用药敏片法测定枯草芽孢杆菌 *Pab02* 对抗生素的敏感性结果见表 1。

表1 枯草芽孢杆菌Pab02对抗生素抑菌活性和敏感性的测定结果

Table 1 Results of the impact of *Bacillus subtilis* Pab02 on antibacterial activity and antibiotics sensitivity

药品	抑菌圈直径/mm	敏感性判定
螺旋霉素	31.35	S
卡拉霉素	30.67	S
红霉素	29.62	S
庆大霉素	26.39	S
链霉素	23.29	S
氯霉素	23.07	S
氨基青霉素	20.40	S
羟氨基青霉素	18.78	S
土霉素	13.43	L
四环素	12.41	L
林可霉素	10.85	L
磺胺异噁唑	0.00	R
甲氧苄啶	0.00	R

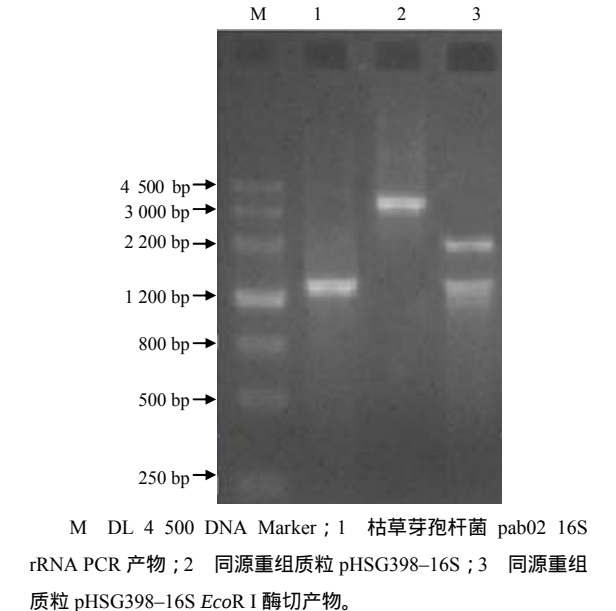
R 为耐药,抑菌圈直径 < 10 mm ;L 为中度敏感,抑菌圈直径为 10 ~ 15 mm S 为高度敏感,抑菌圈直径 > 15 mm。

由表 1 可见 枯草芽孢杆菌 *Pab02* 对螺旋霉素、卡拉霉素、红霉素、庆大霉素、链霉素、氯霉素、

氨基青霉素、羟氨基青霉素具有高度敏感性。因为质粒 pHSG398 具有氯霉素抗性基因,所以,本试验中选取氯霉素作为枯草芽孢杆菌 *Pab02* 表达系统的筛选标记。

2.4 同源重组质粒 pHSG398-16S 的构建与鉴定

16S rRNA PCR 产物经 2% AGE 检测后,得到 1 条 1 500 bp 左右的特异性条带,将 PCR 产物送往上海生物工程有限公司测序,经 BLAST 分析,结果正确。将构建获得的同源重组质粒 pHSG398-16S 用 *EcoR* I 单酶切处理,经 AGE 检测,得到约 1 400、2 200 bp 的 2 条 DNA 条带,条带大小与理论大小一致(图 3),表明已成功构建同源重组质粒 pHSG398-16S。

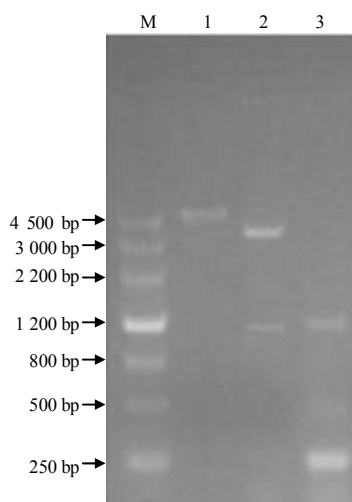


M DL 4 500 DNA Marker ; 1 枯草芽孢杆菌 *pab02* 16S rRNA PCR 产物 ; 2 同源重组质粒 pHSG398-16S ; 3 同源重组质粒 pHSG398-16S *EcoR* I 酶切产物。

图3 同源重组质粒pHSG398-16S的酶切鉴定结果
Fig.3 Identification result on the plasmid pHSG398-16S digested by *EcoR* I

2.5 整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 的构建

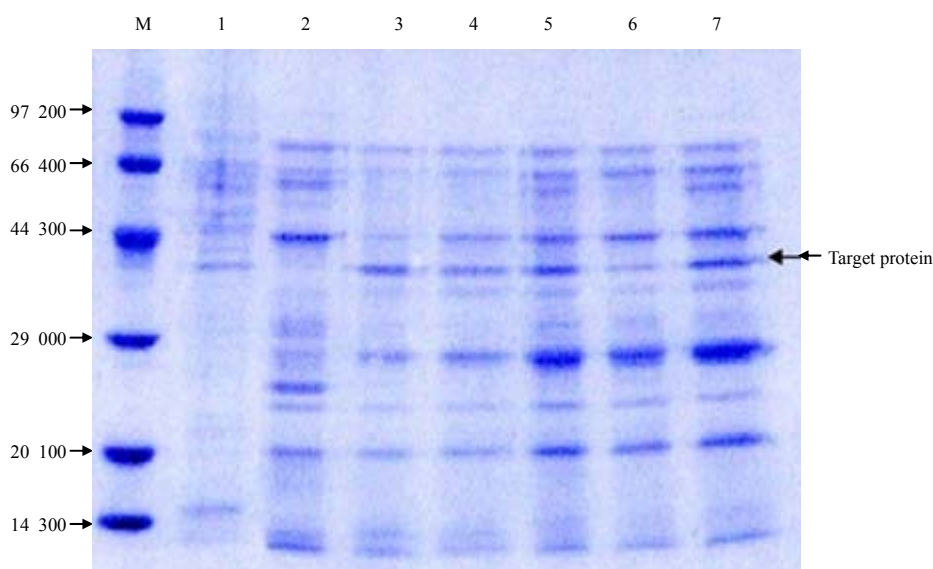
整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定,得到约 3 700、1 100 bp 的 2 条 DNA 条带,条带大小与理论大小一致。同时采用 *LipA* 基因扩增引物进行 PCR 验证,得到 1 条约 1 100 bp 的条带(图 4) 表明整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 已构建成功。



M DL 4 500 DNA Marker ; 1 整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA ; 2 整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 的 *Bam*H I、*Hind* III 酶切产物 ; 3 *LipA* 基因 PCR 产物。

图4 整合表达质粒pHSG398-16S-lipA的双酶切鉴定结果

Fig.4 Identification result on the plasmid pHSG398-16S-lipA digested by *Bam*H I and *Hind* III



M 97 200 DNA Marker ; 1 *P. aeruginosa* A05 上清液 ; 2 未转化的枯草芽孢杆菌 pab02 上清液 ; 3、4 培养 12 h 的重组枯草芽孢杆菌 pab02-lipA 上清液 ; 5、6、7 分别为培养 24、36、48 h 的重组枯草芽孢杆菌 pab02-lipA 上清液。

图5 重组芽孢杆菌pab02-lipA中表达产物的SDS-PAGE分析结果

Fig.5 Result from the SDS-PAGE analysis on recombinant *B. subtilis* pab02-lipA

3 结论与讨论

本试验中成功构建了以克隆质粒 pHSG398 为骨架,并以枯草芽孢杆菌 pab02 16S rRNA 基因为同源系列的源重组质粒 pHSG398-16S 和整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA,并将其转化至枯草芽孢杆菌 pab02 中进行诱导表达,SDS-PAGE 对表达蛋白进行验证的结果显示,重组质粒 pHSG398-16S-lipA 获得了成功表达,其蛋白的相对分子质量为 37 000。

2.6 脂肪酶基因 *LipA* 在枯草芽孢杆菌 pab02 中的整合表达

整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 转化枯草芽孢杆菌 pab02 获得的重组枯草芽孢杆菌 pab02-lipA,经在 LB/Cm⁺液体培养基中扩大培养,取培养至 12、24、36、48 h 的上清液进行 SDS-PAGE 检测,得到一条相对分子质量约 37 000 的蛋白条带,与阳性对照(*P. aeruginosa* A05 的上清液)的条带一致,阴性对照(未转化枯草芽孢杆菌 pab02 的上清液)未发现条带(图 5),表明整合表达质粒 pHSG398-16S-lipA 已成功整合到了枯草芽孢杆菌 pab02 的染色体上,*LipA* 基因得到了较好的表达,但发酵时间对重组枯草芽孢杆菌 pab02-lipA 表达脂肪酶蛋白量没有明显的影响。

构建整合表达质粒虽然克服了枯草芽孢杆菌表达系统中重组质粒不稳定性的问题,但仍存在整合的功能基因拷贝数和蛋白表达量不高的缺点。针对该问题,本研究中从整合质粒本身的构建和菌株表达系统两方面考虑,选用用于生产动物微生态制剂的枯草芽孢杆菌 pab02 菌株。该菌株具有较强的产酶能力,能分泌蛋白酶、淀粉酶等多种酶,但该菌的产酶特性对其用作表达外源蛋白的宿主菌是不利的,因此可通过基因敲除方法除去某些蛋白酶

基因,解除其对外源蛋白的降解,从而提高外源蛋白在发酵液中的积累。考虑到整合后的重组枯草芽孢杆菌 pab02-*lipA* 将开发成新型的多功能微生物制剂,因此,本研究未对其进行基因敲除改造。另外,为了提高整合的目的基因拷贝数及外源蛋白表达量,可以通过在构建的整合质粒中引入强启动子来增强基因的表达^[18-20]。本研究中构建的整合质粒中保留了 *LipA* 自身的启动子,虽然脂肪酶蛋白得到了表达,但表达效果不理想,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 查代明,闫云君.细菌脂肪酶基因表达调控的研究进展[J].微生物学报,2015,55(11):1378-1384. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20150117.
- [2] PANIZZA P, SYFANTOU N, PASTOR F I, et al. Acidic lipase Lip I.3 from a *Pseudomonas fluorescens*-like strain displays unusual properties and shows activity on secondary alcohols[J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(3): 722-732. DOI:10.1111/jam.12089.
- [3] JOSHI C, KHARE S K. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled *Jatropha* seed cake[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1): 32-37. DOI:10.1016/j.bcab.2012.08.006.
- [4] BOSE A, KEHARIA H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(3): 255-266. DOI:10.1016/j.bcab.2013.03.009.
- [5] KIM J, JANG S H, LEE C. An organic solvent-tolerant alkaline lipase from cold-adapted *Pseudomonas mandelii*: cloning, expression, and characterization[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2013, 77(2): 320-323. DOI: 10.1271/bbb.120733.
- [6] 刘德海,解复红,贾彬,等.脂肪酶及其在饲料工业中的应用研究进展[J].河南科学,2012,30(7): 878-881. DOI:10.3969/j.issn.1004-3918.2012.07.015.
- [7] QUYEN D T, VU H C, LE T T G. Enhancing functional production of a chaperone-dependent lipase in *Escherichia coli* using the dual expression cassette plasmid[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 29. DOI:10.1186/1475-2859-11-29.
- [8] 张煜星,武寒雪,祝建波,等.铜绿假单胞菌脂肪酶 *Lipase* 基因的原核表达[J].安徽农业科学,2008,36(35):15384-15385,15388. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2008.35.045.
- [9] 潘康成,吕道俊,何明清.正常菌群对动物免疫功能的影响研究进展[J].饲料工业,1999,20(9):24-26.
- [10] 潘康成,古丛伟,吴敏峰,等.饲用芽孢杆菌作用机理研究新进展[J].饲料与畜牧,2009(12):19-23.
- [11] LIU Y, LU F, CHEN G, et al. High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium-temperature α -amylase from *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(1): 119-124. DOI:10.1007/s10529-009-0112-4.
- [12] YING Q, ZHANG C, GUO F, et al. Secreted expression of a hyperthermophilic α -amylase gene from *Thermococcus* sp. HJ21 in *Bacillus subtilis*[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2012, 22(6): 392-398. DOI: 10.1159/000346215.
- [13] TURKI S. Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(10): 1551-1560. DOI:10.1007/s10529-013-1256-9.
- [14] YING Q, ZHANG C, GUO F, et al. Secreted expression of a hyperthermophilic α -amylase gene from *Thermococcus* sp. HJ21 in *Bacillus subtilis*[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2012, 22(6): 392-398. DOI: 10.1159/000346215.
- [15] TURKI S. Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(10): 1551-1560. DOI:10.1007/s10529-013-1256-9.
- [16] 韩振林,朱传合,赵明明,等.铜绿假单胞菌脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆与表达[J].食品与发酵工业,2006,32(1):11-14. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2006.01.003.
- [17] NICHOLSON W L, SELOW P. Sporulation, germination and outgrowth/[M]. Harwood C, Cutting S. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Chichester, UK: Wiley, 1990: 391-450.
- [18] CHEN J, GAI Y, FU G, et al. Enhanced extracellular production of α -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of *PrsA* lipoprotein[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37(4): 899-906. DOI:10.1007/s10529-014-1755-3.
- [19] 周艳敬,常晓娇,吴子丹,等.两种强启动子在枯草芽孢杆菌中调控表达研究[J].粮油食品科技,2015,23(2):68-72. DOI:10.3969/j.issn.1007-7561.2015.02.017.
- [20] WANG S, JEYASEELAN J, LIU Y, et al. Characterization and optimization of amylase production in wanglb, a high amylase-producing strain of *Bacillus*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 180(1): 136-151. DOI:10.1007/s12010-016-2089-5.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库