产碱性淀粉酶重组枯草芽孢杆菌的构建与发酵优化

王静丽[1]，刘 松[1]，堵国成[*1,2]，陈 坚[1,2]

（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. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：碱性淀粉酶催化淀粉在碱性环境中高效降解，广泛应用于纺织退浆、洗涤、制药等领域。通过信号肽筛选，将来源于嗜碱单胞菌 *Alkalimonas amylolytica* 的碱性淀粉酶基因于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB600 实现分泌表达，并优化了重组菌产酶的发酵条件。在最佳信号肽 ywbN 介导下，重组 *B. subtilis* 发酵 51 h，胞外 AmyK 酶活最高达 146.86 U/mL，且能在发酵上清液中检测到与 AmyK 理论相对分子质量（60 kDa）一致的蛋白质条带。通过单因素实验优化了发酵培养基（糊精 32 g/L，蛋白胨 12 g/L，酵母粉 24 g/L，KH_2PO_4 2.32 g/L，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g/L），并在发酵 24 h 后添加 0.2 g/dL Na_2CO_3 调节发酵液 pH，发酵 72 h 胞外 AmyK 酶活达 640.33 U/mL，较优化前提高了 336%，是目前已报道重组 B. subtilis 产碱性淀粉酶的最高水平。研究结果为 AmyK 发酵生产的工业化提供了数据支撑。

关键词：碱性淀粉酶；信号肽；重组枯草芽孢杆菌；发酵优化；碳酸钠

中图分类号：Q 813　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)03—0296—07

Construction and Fermentation Optimization of a Recombinant *Bacillus subtilis* Producing Alkaline Amylase

WANG Jingli[1]，*LIU Song*[1]，*DU Guocheng*[1,2]，*CHEN Jian*[1,2]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Alkaline amylase，which could efficiently hydrolyze starch under alkaline conditions，has been widely used in textile desizing field，detergent industry，and pharmaceutical production. In this study，alkaline amylase from *Alkalimonas amylolytica*（AmyK）was screened through signal peptide and expressed in *Bacillus subtilis* WB600. The fermentation condition of the recombinant strain was then optimized. The extracellular AmyK activity of the recombinant *B. subtilis* could reach a maximal level of 146.86 U/mL with 51 h fermentation mediated by ywbN signal peptide. There was a protein band observed in the culture supernatant which was consistent for the theoretical molecular weight of 60 kDa for AmyK. The fermentation medium was optimize via a single factor test and determined as dextrin of 32 g/L，tryptone of 12 g/L，yeast extract of 24 g/L，KH_2PO_4 of 2.32 g/L，and

收稿日期：2014-11-21

基金项目：国家 863 计划项目（2012AA022202，2011AA100905）；教育部长江学者和创新团队发展计划项目（IRT1135）。

* **通信作者**：堵国成（1965—），男，江苏常州人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术、代谢工程技术的研究。E-mail：gcdu@jiangnan.edu.cn

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ of 16.43 g/L with pH regulated by 0.2% w/v Na_2CO_3 after 24 h fermentation. The AmyK activity reached to 640.33 U/mL after 72 h, increasing by 336% when compared with the initial medium, which was the highest yield of alkaline amylase for the reported recombinant *B. subtilis* strains. This study provided a experimental support for the commercial production of AmyK from fermentation.

Keywords: alkaline amylase, signal peptide, recombinant *Bacillus subtilis*, fermentation optimization, sodium carbonate

α-淀粉酶(EC3.2.1.1)催化淀粉、糖原等分子中α-1,4-糖苷键水解,生成糊精、麦芽寡糖、麦芽糖和葡萄糖等产物[1-2]。在碱性条件下,能高效完成上述催化反应的α-淀粉酶即为碱性淀粉酶,一般产自嗜碱微生物,稳定 pH 范围为 9.0~11.0[3-6]。碱性淀粉酶广泛应用于纺织退浆、洗涤剂添加、淀粉加工、医药生产等领域[7-8]。

通过发酵法高效生产碱性淀粉酶已成为国内外研究者关注的热点。日本学者 Horikoshi[9]首次报道了产自嗜碱芽孢杆菌 A-40-2 的碱性淀粉酶,此后通过自然环境筛选、物理化学诱变获得碱性淀粉酶生产菌株的研究陆续报道,但产酶水平有限。随着分子生物学技术的发展,构建高产重组菌成为提高碱性淀粉酶产量的重要途径。Murakami[10-11]等分别将来源于芽孢杆菌 *Bacillus halodurans* 38C-2-1 和 MS-2-5 的碱性淀粉酶基因在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达,胞内酶活达 10 U/mL 和 52 U/mL,分别较野生菌提高 45 倍和 104 倍。Wang[1]等将来源于嗜碱单胞菌 *Alkalimonas amylolytica* 的碱性淀粉酶(AmyK)基因在 *E. coli* 表达,胞外酶活达 116.75 U/mL。然而,重组菌产酶的总体水平并不高,有待进一步提升。

与其他原核微生物表达系统相比,枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 系统具有诸多优势:仅有单层细胞外膜,分泌信号肽效率高,可将外源蛋白质直接分泌至培养基,提高下游纯化效率[12];广泛用于多种工业酶的生产,发酵技术成熟[13];非致病性,被列为国际公认的安全微生物(GRAS);遗传背景清楚,质粒和噬菌体载体类型丰富[14];密码子偏好性不明显[15]。

作者所在课题组前期研究中,将 AmyK 成功于毕赤酵母 *Pichia pastoris*[16]表达,发酵 120 h,酶活达 600 U/mL,但生产强度较低,仅为 5 U/(mL·h)。为进一步缩短 AmyK 发酵生产的周期,通过筛选信号肽,将 AmyK 在 *B. subtilis* 中表达,并对重组菌的发酵培养基和条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

B. subtilis WB600, *E. coli* JM109, pET-22b(+)-amyK[16], *E. coli-B. subtilis* 穿梭质粒 pMA0911-SPs,均为作者所在实验室保藏;克隆质粒 pMD18-T-simple,购于 TaKaRa(大连)生物工程有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10;pH 7.0 。

TB 培养基(g/L):蛋白胨 12,酵母粉 24,甘油4,KH_2PO_4 2.32,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43;pH 7.0。

1.3 方法

1.3.1 AmyK 表达载体的构建与转化 以 pET-22b(+)-*amyK*(含 AmyK 基因编码序列)为模板,PCR 扩增得到 AmyK 基因,引物见表 1。扩增条件为:95 ℃预变性 5 min,98 ℃变性 10 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 2 min,30 个循环。将扩增得到的 AmyK 基因片段与 pMD18-T-simple 连接,转化 *E. coli* 感受态细胞 JM109。涂布平板,37 ℃培养过夜,提取质粒。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

底物	引物序列(5′-3′)	大小/bp
P1	ACGCGTCGACATGTCAGAACTTCCACAGATTCCTCCA	37
P2	CGGGATCCTTAAAATCCGCCATTAAAAGATGGGTG	35

用 *Sal* I 和 *Bam*H I 分别双酶切 pMD18-T-simple/*amyK* 和含有不同信号肽的 *E. coli-B. subtilis*

穿梭载体 pMA0911-SPs,再用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的连接酶连接，连接过夜后转化 *E. coli* 感受态细胞 JM109，通过菌落 PCR 验证筛选阳性克隆。挑选阳性克隆于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 ℃培养过夜，提取质粒进行酶切验证及测序鉴定。序列测定由上海生工有限公司完成。采用化学转化法[17]转化重组质粒至 *B. subtilis* WB600。在含有 50 μg/mL 卡那霉素(Km)平板上挑选阳性克隆，菌落 PCR 并酶切验证。构建成功的重组菌于-80 ℃甘油管保藏。

1.3.2 重组质粒稳定性的测定

1)分离稳定性:挑取重组菌株单菌落,接种至 5 mL 不含 Km 的 LB 培养基中，于 37 ℃培养 12 h 作为种子液，再按体积分数 1%的接种量转种于另一 LB 培养基中培养 24 h,即得传 20 代的菌液。将该菌液稀释至 10^{-5}~10^{-6},取 100 μL 涂布于 LB 平板上,待长出菌落后,从中挑取 100 个单菌落分别点种在无 Km 的 LB 平板和含 Km 的 LB 平板上,置于 37 ℃培养 12 h 后统计平板上的单菌落数，作为传 20 代质粒分离稳定性的计算指标。如此每隔 24 h 按体积分数 1%的接种量重新接种培养，直至传到 100 代,计算稳定性。

2)结构稳定性:分别取 20 代、60 代、100 代的菌液,提取质粒后用 *Sal* I、*Bam*H I 双酶切,验证目的条带的存在。

详见文献[18]。

1.3.3 AmyK 的表达和检测 取甘油管保藏菌株在含 Km 的固体 LB 平板上划线,于 37 ℃恒温培养箱培养过夜，挑取活化后的单菌落接种至 LB 培养基培养,37 ℃、200 r/min 条件下摇床培养 12 h，以体积分数 4%接种量接种至发酵培养基，同样条件下振荡培养 72 h。取一定量发酵液,于 4 ℃,12 000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液（即粗酶液）测定 AmyK 酶活。

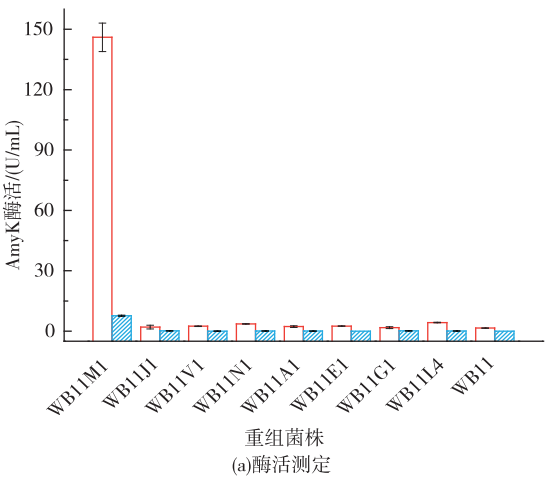
1.3.4 淀粉酶活力测定 碱性淀粉酶测定采用 DNS 法[19]。取 0.5 mL 可溶性淀粉,0.75 mL 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.5,20 mmol/L),50 ℃预热 5 min 后，加入 0.1 mL 适当稀释的粗酶液,50 ℃反应 5 min。取 1 mL 反应液加入到 1 mL DNS 中,混匀,沸水浴 15 min,冰浴冷却后定容至 10 mL,540 nm 下测定吸光值。根据标准曲线计算酶活。酶活单位的定义:碱性淀粉酶每分钟降解底物(可溶性淀粉)生成 1 μmol 还原糖(以葡萄糖计算)所需要的酶量为一个酶活力单位。

1.3.5 菌体生物量的测定 利用分光光度计检测经适当稀释的菌液在 600 nm 波长处的吸光度值,即 OD_{600}。

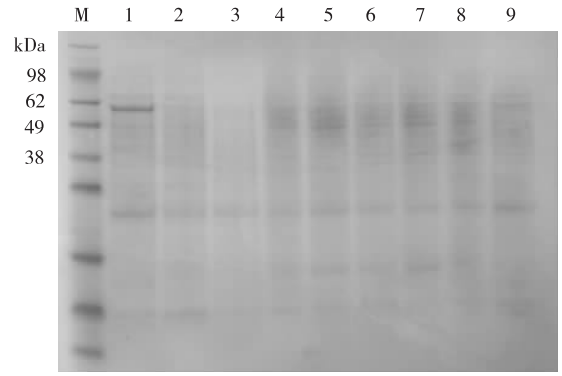
2 结果与分析

2.1 产 AmyK 重组菌的构建与表达

参照方法 1.3.1 构建了分别含有信号肽 ywbN、yncM、estA、yweA、amyX、nprE、vpr、yvgO 的重组表达载体 pMA0911M1、pMA0911J1、pMA0911V1、pMA 0911N1、pMA0911A1、pMA0911E1、pMA0911G1、pMA 0911L4。测序结果显示,AmyK 基因序列完全正确。将重组表达载体分别转化 *B. subtilis* WB600,构建重组菌株 WB11M1、WB11J1、WB11V1、WB11N1、WB11A1、WB11E1、WB11G1、WB11L4，以不带有 AmyK 基因的空质粒 pMA0911 转化 *B. subtilis* WB600,构成重组菌 WB11 作为空白对照菌株。不同重组菌于 TB 培养基 37 ℃,200 r/min 摇床培养 72 h,结果见图 1。由图 1(a)可知,在信号肽 ywbN 的介导下，胞外胞内酶活最高，分别为 146.86 U/mL、7.69 U/mL，分泌效率达 95%，因此 ywbN 为 AmyK 分泌表达的最佳信号肽。为了进一步验证重组菌的发酵结果，对 8 株重组菌 WB11M1、WB11J1、WB11V1、WB11N1、WB11A1、WB11E1、WB11G1、WB11L4 和对照菌 WB11 的胞外上清液进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 1(b),只有 WB11M1 在 60 kDa 处有一条清晰的蛋白质条带,大小与 AmyK 相对分子质量相符合,与前面酶活测定结果一致。



(a)酶活测定



(b)SDS-PAGE分析

图 1 不同菌株胞内外酶活比较及胞外上清液 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 AmyK production in recombinant strains and the SDS-PAGE analysis of AmyK distribution in culture supernatants

质粒稳定性分析显示,重组菌 WB11M1 连续传 100 代后,仍有 80%细胞带有质粒,此外,酶切 20 代、60 代、100 代重组菌的质粒,目的条带均存在,说明 pMA0911M1 在重组菌中可稳定存在。

2.2 重组菌 WB11M1 发酵条件优化

2.2.1 碳源对重组菌生长和 AmyK 产量的影响

按照碳源质量浓度相等的原则,将初始 TB 培养基中的甘油分别替换为 1.2 g/dL 的 9 种碳源(图 2(a)),研究碳源种类对重组菌发酵的影响。以麦芽糖、木糖、可溶性淀粉、玉米淀粉、糊精为碳源时,菌体生长较好,OD_{600} 为 20 左右,发酵结束 pH 均为 8 以上。其他碳源条件下,重组菌 OD_{600} 仅为 10 左右,发酵结束 pH 约为 6,几乎不产 AmyK。因此,碱性条件可能有利于重组菌产 AmyK。糊精为最适产酶碳源,发酵 72 h 胞外酶活达 295.52 U/mL,比初始培养基提高了 101%。

在上述实验的基础上,优化糊精质量浓度提高 AmyK 产量(图 2(b))。糊精质量浓度低于 40 g/L 时,菌体量和 AmyK 胞外酶活随糊精质量浓度的提高而增加。糊精初始质量浓度分别为 40 g/L 和 32 g/L 时,OD_{600} 和 AmyK 胞外酶活达到最大值,分别为 34.41, 417.36 U/mL。因此,发酵培养基糊精的最佳质量浓度为 32 g/L。发酵结束时,糊精初始质量浓度低于 40 g/L 的发酵液均呈明显碱性,而糊精初始质量浓度为 44 g/L 时,发酵液 pH 较接近 7。糊精质量浓度过高引起发酵液 pH 的下降,可能是导致 AmyK 产量大幅下降的重要原因。

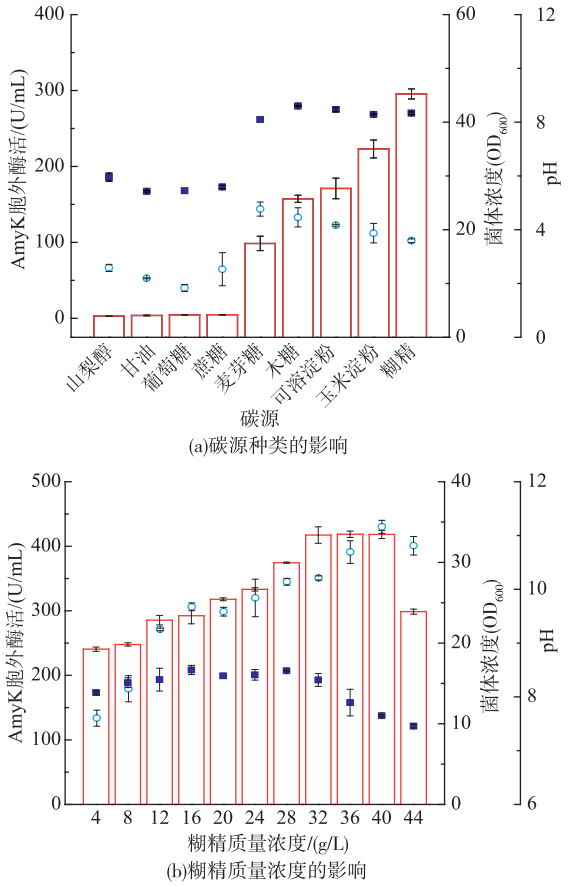


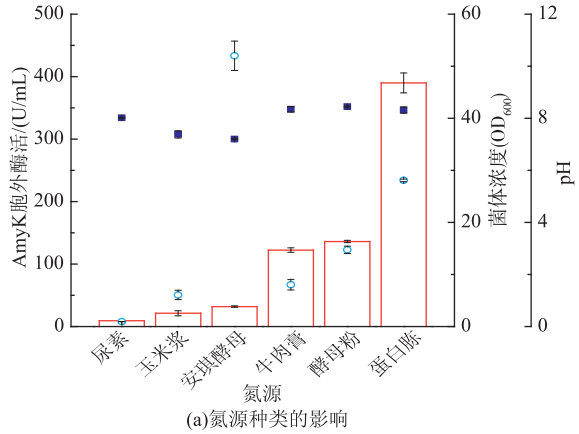
图 2 碳源对菌体生长和产酶的影响

Fig. 2 Effect of carbon source on biomass, pH, and AmyK production

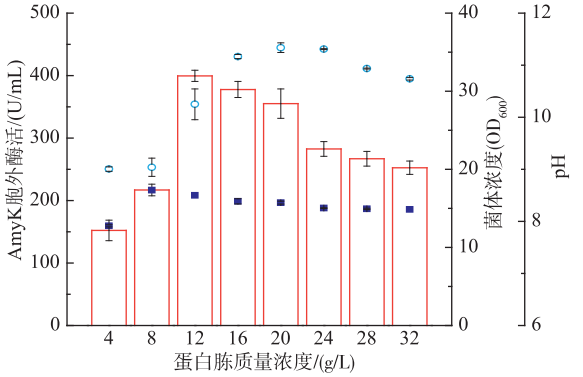
2.2.2 氮源对重组菌生长和 AmyK 产量的影响

以 32 g/L 的糊精为碳源,按照含氮质量浓度相等的原则,优化 TB 培养基中的氮源(图 3(a))。重组菌对安琪酵母的利用效果最好,OD_{600} 达到 52,蛋白胨、酵母粉其次,OD_{600} 为 28.08。除以安琪酵母、玉米浆为氮源外,发酵结束 pH 为 8 左右。以蛋白胨、酵母粉为氮源,胞外 AmyK 酶活最高达 390 U/mL。安琪酵母虽然适于菌体生长,但不能同时促进菌体产酶。以尿素、玉米浆为氮源时,菌体生长很差,酶活也很低。因此,蛋白胨、酵母粉为产 AmyK 最适氮源。保证蛋白胨、酵母粉质量的比例为 1:2,优化蛋白胨、酵母粉的质量浓度提高 AmyK 产量(图 3(b))。菌体量和 AmyK 酶活均随蛋白胨、酵母粉质量浓度的增加先增加后减小,当蛋白胨质量浓度 20 g/L,酵母粉质量浓度 40 g/L 时,OD_{600} 最大达 35.58;当蛋白胨质量浓度 12 g/L,酵母粉质量浓度 24 g/L 时,胞外酶活最高达 400 U/mL。发酵结束 pH

也随蛋白胨、酵母粉质量浓度的增加先升高后降低,当蛋白胨质量浓度 8 g/L、酵母粉质量浓度 16 g/L 时,pH 最高 8.6。因此,最适产酶氮源为蛋白胨质量浓度 12 g/L,酵母粉质量浓度 24 g/L。



(a)氮源种类的影响



(b)蛋白胨质量浓度的影响

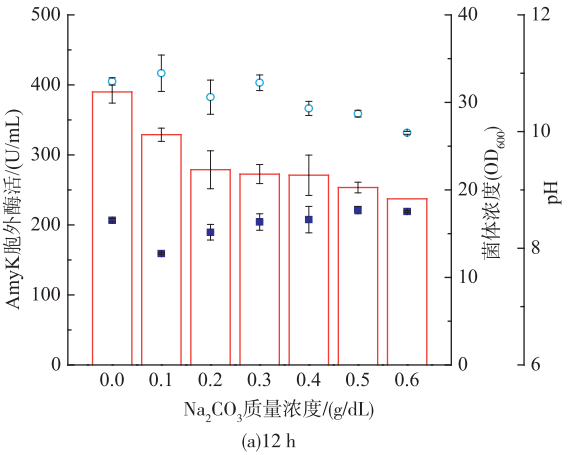
图 3　氮源对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3　Effect of nitrogen source on biomass,pH,and AmyK production

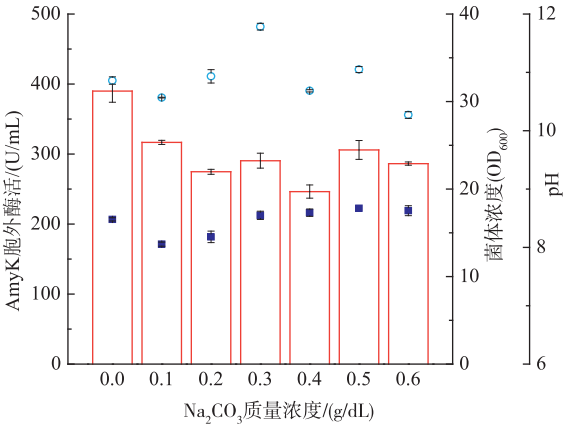
2.2.3 *碳酸钠对重组菌生长和 AmyK 产量的影响*

碳源种类优化结果表明，偏碱性的环境可能促进 AmyK 表达。因此,发酵过程中调控 pH 有望进一步提高 AmyK 的产量。目前,Na_2CO_3 作为一种重要的 pH 调节剂已被广泛用于 pH 的调节[20-22]。预实验表明 Na_2CO_3 质量浓度高于 0.6 g/dL 时,发酵液 pH 高于 9.3,因 *B. subtilis* 耐受碱能力差,生物量急剧下降而使 AmyK 产量很低(结果未显示)。因此,Na_2CO_3 质量浓度选择 0.1~0.6 g/dL,分别于发酵开始后 12、18、24、30 h 添加,结果见图 4。于 12 h 添加 Na_2CO_3,随着 Na_2CO_3 质量浓度增加,发酵结束 pH 先下降后缓慢上升,OD_{600} 无明显规律,添加 Na_2CO_3 未能提高 AmyK 产量。18 h 添加效果同 12 h。于 24 h 添加 Na_2CO_3，随着 Na_2CO_3 质量浓度增加，发酵结束 pH 缓慢上升,OD_{600} 总体逐渐降低,Na_2CO_3 质量浓度为 0.6 g/dL 时,OD_{600} 只有 20 左右;胞外 AmyK 酶活先增加后减小,Na_2CO_3 质量浓度为0.2 g/dL 时,胞外酶活最高达 481.98 U/mL,较优化前提高 15%。30 h 添加效果同 24 h,Na_2CO_3 质量浓度为 0.1 g/dL 时,酶活最高达 460.54 U/mL。根据发酵过程及结果发现,选择在菌体生长非常快的对数时期（12 h,18 h)添加 Na_2CO_3、提高外部 pH 并不能提高 AmyK 的产量,而选择在菌体生长基本稳定的稳定期（24 h,30 h）添加 Na_2CO_3 却能有效提高 AmyK 的产量。

Manabe[21]等的研究也表明,外部 pH 上移可提高 *B. subtilis* 产淀粉酶。一般认为,其原因如下:在淀粉酶释放到培养基之前直接提高其折叠效率和/或稳定性;通过去质子及细胞壁丙氨酸缺失,增加细胞壁的负电性,间接稳定淀粉酶;膜结合丝氨酸蛋白酶 HtrA、HtrB 活力下降; 外部 pH 上移激活或抑制了相关基因簇,由此引起的次级效应导致淀粉酶产量提高。



(a)12 h



(b)18 h

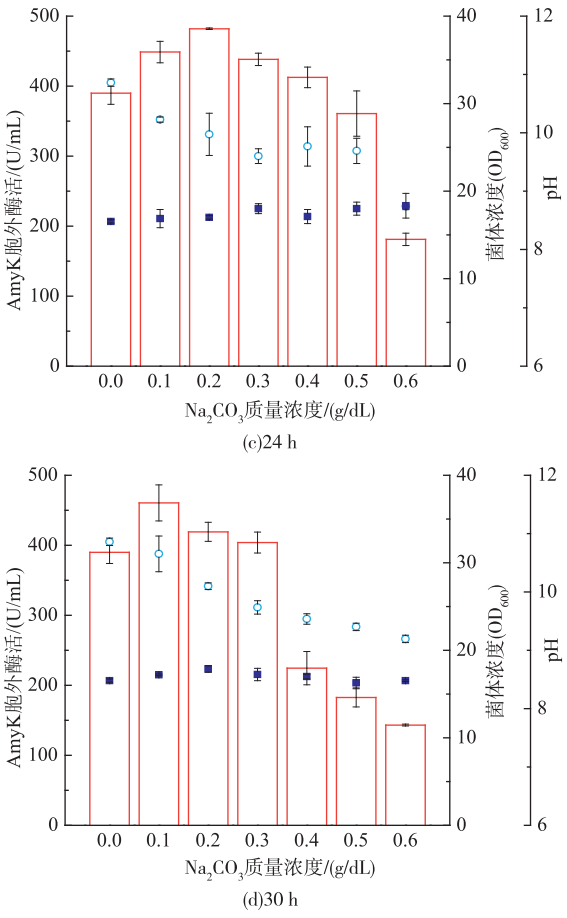


图 4　碳酸钠浓度及添加时间对菌体生长和产酶的影响

Fig. 4　Effect of Na_2CO_3 concentration and adding time on biomass, pH, and AmyK production

2.2.4　接种量对重组菌生长和 AmyK 产量的影响

接种量直接决定接入发酵培养基的菌体量，因此对菌体生长有一定影响，进而会影响重组菌株的产酶量。研究中针对不同接种量对菌体生长和产酶的影响进行了探索，分析了接种量为体积分数 2%、4%、8%、12%、16%时重组菌的发酵情况，结果见图 5。随着接种量的增加，酶活先增加后减小，接种量为体积分数 12%时，酶活最高达 640.33 U/mL。

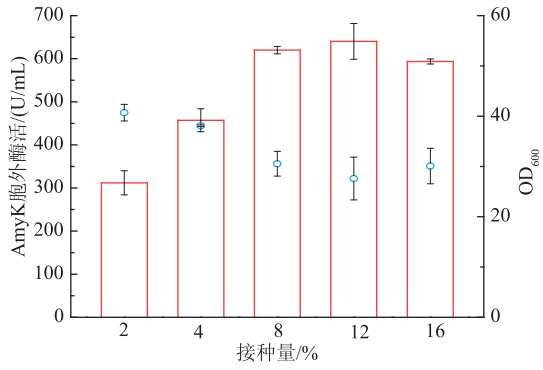


图 5　接种量对菌体生长和产酶的影响

Fig. 5　Effect of inoculum size on biomass, and AmyK production

3　结　语

碱性淀粉酶在碱性环境中可以保持稳定并高效催化降解淀粉，广泛应用于纺织退浆、洗涤剂添加、淀粉加工、医药生产等领域。不同的酶都有其分泌表达的最适信号肽，因此产酶重组枯草芽胞杆菌构建中对信号肽的选择应引起高度重视。此外，本课题组前期研究中将 AmyK 分别于 *E. coli* 和 *P. pastoris* 进行表达，前者酶活只有 60 U/mL，后者发酵周期长达 120 h[16]。因此，进行酶的异源表达时，宿主的选择对于达到高发酵水平和高生产强度尤为重要。研究中通过信号肽筛选，将来源于 *A. amylolytica* 的碱性淀粉酶基因在 *B. subtilis* 中成功实现胞外表达，并优化了发酵培养基成分和发酵液的 pH。优化后碱性淀粉酶酶活最高达 640.33 U/mL，比优化前提高了 336%，生产强度达到 8.9 U/(mL·h)，比其在 *P. pastoris* 中提高了 78%[16]。上述结果表明，*B. subtilis* 是 AmyK 的理想表达宿主。此外，发酵过程中添加 Na_2CO_3 提高 AmyK 产量的策略，不仅为重组 *B. subtilis* 发酵罐上选择优化控制策略提供了有效依据，而且为其他酶类的发酵过程优化提供了重要参考。

参考文献：

[1] Wang N, Zhang Y H, Wang Q H, et al. Gene cloning and characterization of a novel alpha-amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica*[J]. **Biotechnol J**, 2006, 1(11): 1258-1265.

[2] 吴襟，彭平，沈文，等. 嗜碱性芽胞杆菌碱性 α 淀粉酶的纯化和性质 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(6): 852-856.
WU Jin, PENG Ping, SHEN Wen, et al. Purification and characterization of α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain BG-CSN[J]. **Chin J Biochem Mol Biol**, 2005, 21(6): 852-856.(in Chinese)

[3] Burhan A, Nisa U, Gokhan C, et al. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant

amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6[J]. **Process Biochem**, 2003, 38(10): 1397-1403.

[4] Hagihara H, Igarashi K, Hayashi Y, et al. Novel alpha-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus isolate* KSM-K38[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(4): 1744-1750.

[5] Kuilderd H, Wu G. Applied technology-simultaneous desizing and scouring with enzymes-simultaneous fabric desizing and scouring, using alkaline alpha-amylase and an alkaline scouring enzyme, reduces water[J]. **AATCC Rev-Am Assoc Text Chem Color**, 2008, 8(6): 33-36.

[6] 杨海泉, 刘龙, 李江华, 等. 碱性淀粉酶的发酵生产及其应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 432-439.
YANG Haiquan, LIU Long, LI Jianghua, et al. Advances of alkaline amylase production and applications [J]. **Chin J Biotech**, 2012, 28(4): 432-439.(in Chinese)

[7] Hashim S O, Delgado O, Hatti-Kaul R, et al. Starch hydrolysing *Bacillus halodurans* isolates from a Kenyan soda lake [J]. **Biotechnol Lett**, 2004, 26(10): 823-828.

[8] Malhotra R, Noorwez S M, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54[J]. **Lett Appl Microbiol**, 2000, 31(5): 378-384.

[9] Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms[J]. **Agri Biol Chem**, 1971, 35(11): 1783-1791.

[10] Murakami S, Nishimoto H, Toyama Y, et al. Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant α -Amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli* [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2007, 71(10): 2393-2401.

[11] Murakami S, Nagasaki K, Nishimoto H, et al. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing α -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2008, 43(4-5): 321-328.

[12] Fu L L, Xu Z R, Li W F, et al. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion[J]. **Biotechnol Adv**, 2007, 25(1): 1-12.

[13] Palva I. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis* [J]. **Gene**, 1982, 19(1): 81-87.

[14] Rey M W, Ramaiya P, Nelson B A, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus species*[J]. **Genome Biol**, 2004, 5(10): r77-12.

[15] Wong S L. Advances in the use of *Bacillus Subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins [J]. **Curr Opin Biotechnol**, 1995, 6(5): 517-522.

[16] Yang H Q, Liu L, Shin Hyun-dong, et al. Comparative analysis of heterologous expression, biochemical characterization optimal production of an alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. **Biotechnol Prog**, 2013, 29(1): 39-47.

[17] Reilly B E, Spizizen J. Bacteriophage deoxyribonucleate infection of competent *Bacillus subtilis* [J]. **J Bacteriol**, 1965, 89: 782-790.

[18] 蒋岚, 杨永华, 龚毅, 等. 稀有密码子对 proUK 基因在大肠杆菌中高表达的影响[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 64-67.
JIANG Lan, YANG Yonghua, GONG Yi, et al. The rare coden effects the overexpression of Human proUK Gene in *Escherichia coli*[J]. **Chin J Biotech**, 1999, 15(1): 64-67.(in Chinese)

[19] Fuwa H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate [J]. **J Biochem**, 1954, 41: 583-603.

[20] Galyuk E N, Lando D Y, Egorova V P, et al. Na_2CO_3 influence on DNA double helix stability: Strong anion destabilizing effect[J]. **J Biomol Struct Dyn**, 2003, 20(6): 801-809.

[21] Manabe K, Kageyama Y, Tohata M, et al. High external pH enables more efficient secretion of alkaline alpha-amylase AmyK38 by *Bacillus subtilis*[J]. **Microb Cell Fact**, 2012(11): 74.

[22] Whang L M, Yang K H, Yang Y F, et al. Microbial ecology and performance of ammonia oxidizing bacteria (AOB) in biological processes treating petrochemical wastewater with high strength of ammonia: effect of Na_2CO_3 addition [J]. **Water Sci Technol**, 2009, 59(2): 223-231.