第 34 卷第 5 期
2018 年 5 月

FOOD & MACHINERY 食品与机械

Vol.34, No.5
May 2018

DOI:10.13652/j.issn.1003－5788.2018.05.005

嗜酸芽孢杆菌普鲁兰酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化

Expression of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase in *Escherichia coli* and its optimization of fermentation

杨向会[1,2,3]　陈　晟[1,2,3]　吴　敬[1,2,3]

YANG Xiang-hui[1,2,3]　*CHEN Sheng*[1,2,3]　*WU Jing*[1,2,3]

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室,江苏 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,江苏 无锡　214122;3. 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室,江苏 无锡　214122)

(1. *State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*; 2. *School of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*; 3. *Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu* 214122, *China*)

摘要:为了在 3 L 发酵罐水平上提高重组菌 *E.coli* BL 21(DE3)/ pET20b(＋)-BapulA 的普鲁兰酶的表达量和胞外分泌,将嗜酸芽孢杆菌普鲁兰酶(*Bacillus acidopullulyticus*)在大肠杆菌中进行重组表达,并在 3 L 发酵罐水平上对重组菌进行发酵优化,考察了发酵条件对重组酶表达的影响。重组菌发酵的最佳条件为:发酵前期菌体生长温度和 pH 分别为 30 ℃和 7.0,当菌体浓度 OD_{600} 达到 50 时,发酵温度降低至 25 ℃,此时调节 pH 为 6.2,同时开始流加乳糖[0.4 g/(L·h)]进行诱导;在发酵过程中,当菌体浓度 OD_{600} 依次达到 15,45,75 时,分别加入浓度为 1.5 g/L 的甘氨酸,当菌体 OD_{600} 为 105 时,再加入浓度为 3 g/L 的甘氨酸。发酵结束后普鲁兰酶的胞外酶活达 659.0 U/mL,最高总酶活达 1 910.1 U/mL,与摇瓶的初始总酶活(41.1 U/mL)和胞外酶活(6.5 U/mL)相比,分别提高了 45.4 倍和 100 倍。

关键词:普鲁兰酶;重组表达;发酵优化;pH;甘氨酸

Abstract: To increase expression and extracellular secretion of pullulanase of the recombinant strain *E.coli* BL21(DE3)/pET20b(＋)-BapulA at 3 L fermentor level. Expression of recombinant pullulanase in *E. coli* and further optimization of fermentation at the 3 L fermenter Firstly. The effects were investigaged, including the fermentation temperature, pH, IPTG concentration, induction time and glycine concentration on the expression of recombinant pullulanase. The optimum fermentation conditions were showed as followed: the growth temperature and pH of the pre-induction cells were 30 ℃ and 7.0, respectively. When the cell density reached 50 OD_{600}, the fermentation temperature was shifted to 25 ℃, and the pH was adjusted to 6.2 with lactose flow rates of 0.4 g/(L·h). During the fermentation process, glycine was added at the concentration of 1.5 g/L when the cell density of OD_{600} reached 15, 45 and 75, respectively. When OD_{600} reached 105, glycine was added at a concentration of 3 g/L. The optimal total and extracellular pullulanase activity were 1 910.1 U/mL and 659.0 U/mL, respectively, which represent 45.4 and 100-fold compared with those observed under initial conditions.

Keywords: pullulanase; recombinant expression; fermentation optimization; pH; glycine

普鲁兰酶是一种脱支酶,能够专一地水解支链淀粉(或普鲁兰多糖等相关聚合物)中 α-1,6-糖苷键[1],所以普鲁兰酶在淀粉加工工业得到了广泛的应用。普鲁兰酶与淀粉水解酶(α-淀粉酶、β-淀粉酶)复配使用时,淀粉质原料的利用率明显提高,对节约成本和提高产物转化率有重要意义,因此普鲁兰酶是淀粉加工中不可或缺的非大宗关键酶制剂[2-3]。

早期国内外有关普鲁兰酶的研究主要集中在菌株的筛选上[4-6],许多产普鲁兰酶的微生物被发现,但由于多数的野生菌株发酵产普鲁兰酶的酶活较低,限制了其在工业上的应用。因此,对野生菌来源的普鲁兰酶在工程菌中进行异源表达,以提高蛋白表达量,成为目前研究主流。至今已从多

基金项目:国家杰出青年基金(编号:31425020);江苏省重点研发计划项目(编号:BE2017319);中央高校基本科研业务费专项资金(编号:JUSRP51706A)

作者简介:杨向会,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:陈晟(1981—),女,江南大学副教授,博士。
E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-01-29

种微生物中克隆出普鲁兰酶基因并对其进行异源表达[7-8]，但重组后的普鲁兰酶表达仍存在产量低或不能有效分泌的问题。为解决此类问题，Duan 等[9]通过分阶段控制发酵温度和添加甜菜碱的方法，使普鲁兰酶的可溶性表达量和胞外分泌得到显著提高。Zou 等[10]通过流加甘氨酸使普鲁兰酶的胞外酶活提高了 22.6 倍。来源于 *Bacillus acidopullulyticus* 的普鲁兰酶具有良好的酶学性质(耐酸，耐热)，最适温度 60 ℃，最适 pH 5.0，可以和多种淀粉水解酶复配使用，能够满足淀粉工业应用的要求。大肠杆菌表达系统具有蛋白表达水平高、易于高密度发酵等众多优点[11]，已有多达 60%的重组蛋白在大肠杆菌系统中进行表达[12]。

Chen 等[13]在大肠杆菌中重组表达来源于 *Bacillus acidopullulyticus* 的普鲁兰酶，并在 5 L 发酵罐水平进行发酵，在发酵温度 20 ℃条件下酶活达 1 156 U/mL；其诱导温度过低无法在工业上实现大规模生产；针对此问题，本研究拟将 *Bacillus acidopullulyticus* 普鲁兰酶在大肠杆菌中进行重组表达，并对重组菌进行 3 L 发酵罐发酵优化，在本研究中采用工业生产上可实现的发酵温度 25 ℃，大幅度提高了普鲁兰酶的表达量和胞外酶活，以期为普鲁兰酶的工业应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E.coli* JM 109 和 BL21(DE3)：本实验室保藏；

带有 *Nco* Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ酶切位点的重组质粒 pET20b(+)-*Bapul*A：由上海捷瑞公司合成，其中普鲁兰酶基因 *Bapul*A(GeneBank Accession No. Ax203843.1)来源于 *Bacillus acidopullulyticus*。

1.1.2 培养基

摇瓶 TB 培养基：$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g/L，KH_2PO_4 2.31 g/L，酵母粉 24 g/L，甘油 5 g/L，蛋白胨 12 g/L，甜菜碱 2.4 g/L；

发酵罐基础培养基：KH_2PO_4 13.5 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.4 g/L，$(NH_4)_2HPO_4$ 4.0 g/L，$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 1.7 g/L，工业酵母粉 2 g/L，工业蛋白胨 1 g/L，甘油 8 g/L，微量金属液 10 mL，甜菜碱 5 g/L；

发酵罐补料培养基：$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 18.35 g/L，工业酵母粉 4.8 g/L，甘油 600 g/L，工业蛋白胨 2.4 g/L。

1.1.3 主要试剂

*Nco*Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ：分子级，宝生物工程(大连)有限公司；

普鲁兰多糖：分析纯，东京化成工业株式会社；

甘氨酸：分析纯，国药化学试剂有限公司。

1.1.4 主要仪器

发酵罐：BioFlo /celliGen115 型，德国 Eppendorf NBS 公司；

高效液相色谱系统：安捷伦 1200 型，美国 Agilent 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 摇瓶培养 将菌株从甘油管中接种于 LB 培养基中，在 37 ℃，200 r/min 下培养 8 h。以 5%的接种量转接至 50 mL TB 培养基内，在 200 r/min，37 ℃下，OD_{600} 为 1.0～1.2 时，加入 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导，25 ℃培养 48 h。

1.2.2 发酵罐培养

(1) 种子培养：将菌株从甘油管中接种至 100 mL LB 培养基中，37 ℃，200 r/min 下培养 8～9 h。

(2) 3 L 发酵罐培养：将种子培养液按 10%接种量接种至发酵罐中，加入终浓度为 100 μg/mL 的氨苄霉素，初始温度设定为 30 ℃或 37 ℃，维持溶氧 30%，通过补加氨水来维持 pH 为 7.0。当发酵罐中甘油耗尽，溶氧快速反弹时，开始流加补料培养基。当 OD_{600} 分别达到 25，50，75 时，降温至 25 ℃，此时调节 pH 到 6.2，同时以一定流速流加乳糖进行诱导，期间用 20%的磷酸和氨水控制 pH 为 6.2。在发酵过程中，当 OD_{600} 达到 15，45，75，105 时，根据试验需要补加一定量的甘氨酸。

1.3 分析方法

1.3.1 普鲁兰酶酶活力的测定 将 0.1 mL 稀释一定倍数的普鲁兰酶液(空白加高温灭活的普鲁兰酶)加入到 1.9 mL 的普鲁兰多糖溶液中，60 ℃反应 10 min，加入 3 mL 的 DNS 溶液终止反应后，在沸水中反应 7 min，加去离子水补足 15 mL。在 540 nm 波长处测吸光值。普鲁兰酶酶活定义为：每分钟生成 1 μmol 还原糖的酶量定义为一个酶活力单位。

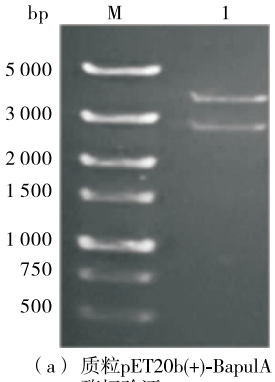
1.3.2 甘氨酸含量的测定 将待测发酵液在 12 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀，在上清液中按 1∶1 的体积比加入 100 g/L 的三氯乙酸。充分混匀后，在室温下静置 2 h，12 000 r/min 下离心 40 min，将离心后的上清液过滤，所得样品即可用于高效液相(HPLC)检测。

色谱条件：色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C_{18} (250 mm × 4.6 mm)，柱温 40 ℃，流速 0.8 mL/min，检测器为紫外检测器，检测波长 338 nm，洗脱方式为梯度洗脱。

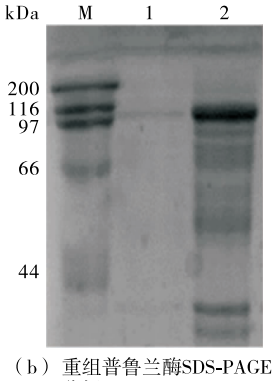
2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建与发酵

将质粒 pET20b(+)-*Bapul*A 热激转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态，涂布于带有氨苄霉素抗性的平板，挑选单菌落至 10 mL LB 培养基中，培养 8 h 提取质粒，并用 *Nco* Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ进行双酶切验证，结果见图 1。从图 1(a)可知，电泳



(a) 质粒pET20b(+)-BapulA酶切验证



(b) 重组普鲁兰酶SDS-PAGE分析

M. 蛋白 Marker (200 kDa) 1. 胞外上清 2. 胞内上清

图 1 重组大肠杆菌的构建和重组普鲁兰酶的 SDS-PAGE

Figure 1 Construction of recombinant *E.coli* and SDS-PAGE analysis of recombinant pullulanase

条带与理论值一致,表明重组质粒转化宿主菌成功,得到重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-*Bapul*A。将该菌株进行摇瓶发酵,培养 48 h 后取发酵液进行离心、破壁。胞外上清和胞内上清中的最高酶活分别为 6.5,35.6 U/mL,最高总酶活为 41.1 U/mL。将胞外上清、胞内上清进行蛋白电泳检测[见图 1(b)],条带大小均与重组蛋白理论分子量(约 102 kDa)一致,表明来源于 *Bacillus acidopullulyticus* 的普鲁兰酶在大肠杆菌中成功表达。

2.2　生长阶段温度对重组菌生长和产酶的影响

在 3 L 发酵罐高密度发酵生产重组普鲁兰酶的过程中,本研究对重组菌生长阶段分别采取不同的培养温度以探究温度对重组菌生长及产酶的影响,结果见图 2。重组菌生长阶段的温度分别为 30,37 ℃,诱导温度均为 25 ℃。与起始发酵温度 37 ℃相比,起始发酵温度在 30 ℃条件下最终菌体生物量(OD_{600})略低,见图 2(a)。从图 2(b)～(d)可知,与生长阶段温度为 37 ℃相比,在生长阶段温度为 30 ℃条件下更有利于产酶,该条件下普鲁兰酶的最高胞内酶活和胞外酶活分别达 684.1,240.1 U/mL,最高总酶活为 890.6 U/mL。据报道,pET-20b(+)质粒在表达外源蛋白时往往伴随着目的蛋白的本底表达[11],重组大肠杆菌在较低温度下的生长会通过减少形成无活性的包涵体来提高可溶性蛋白的比例[14],而在较高的生长温度下目的蛋白的本底表达会引起宿主细胞的应激反应,这种应激反应最终导致目的蛋白形成聚集体并在细胞内积累,这对发酵后期菌体的产酶不利[11]。因此,在发酵过程中控制菌体的生长阶段温度为 30 ℃。

2.3　诱导阶段 pH 对重组菌生长和产酶的影响

大肠杆菌生长过程中,pH 过高或者过低,都会导致菌体生长异常,需要控制 pH 范围以保证菌体正常生长和产酶。因此,本研究在分别控制诱导阶段 pH 为 6.2,7.0 的条件下,考察了 pH 对重组菌生长和产酶的影响,结果见图 3。

在重组菌的摇瓶发酵过程中,当发酵液的 pH>7.0 时,普鲁兰酶的酶活力迅速下降,在 48 h 发酵结束后,酶活仅为 3.2 U/mL[见图 3(a)]。若在发酵过程中,每隔一段时间,通过添加 20%磷酸以维持发酵液的 pH 在 6.2～7.0,普鲁兰酶的活力会随着发酵时间的延长而增加,普鲁兰酶的酶活最高达 201.0 U/mL。重组普鲁兰酶的最适 pH 为 5.0,当 pH 过高时,重组酶酶活显著下降[15]。从图 3(b)中可以看出,重组酶在室温放置 48 h 后,pH 6.2 下的该酶残余酶活显著高于 pH 7.0 的。综上,发酵液 pH 维持在 6.2 最佳。

从摇瓶发酵结果可以看出,诱导阶段发酵液的 pH 显著影响重组菌产酶,因此在重组菌 3 L 发酵罐发酵过程中需对诱导阶段的 pH 进行优化。与诱导阶段发酵液 pH 为 7.0 时相比,pH 为 6.2,尽管菌体生物量有所降低[见图 3(c)],但是在该条件下普鲁兰酶最高胞内酶活[见图 3(d)]、胞外酶活[见图 3(e)]和总酶活[见图 3(f)]分别是 pH 7.0 条件下的 1.12,17.65,1.40 倍。

2.4　乳糖流加速率对重组菌生长和产酶的影响

鉴于乳糖诱导强度对目的蛋白表达有重要影响,本研究对乳糖流加速率进行了优化,结果见图 4。从图 4(a)可知,当乳糖流加速度为 0.2,0.4 g/(L·h)时,最高菌体浓度

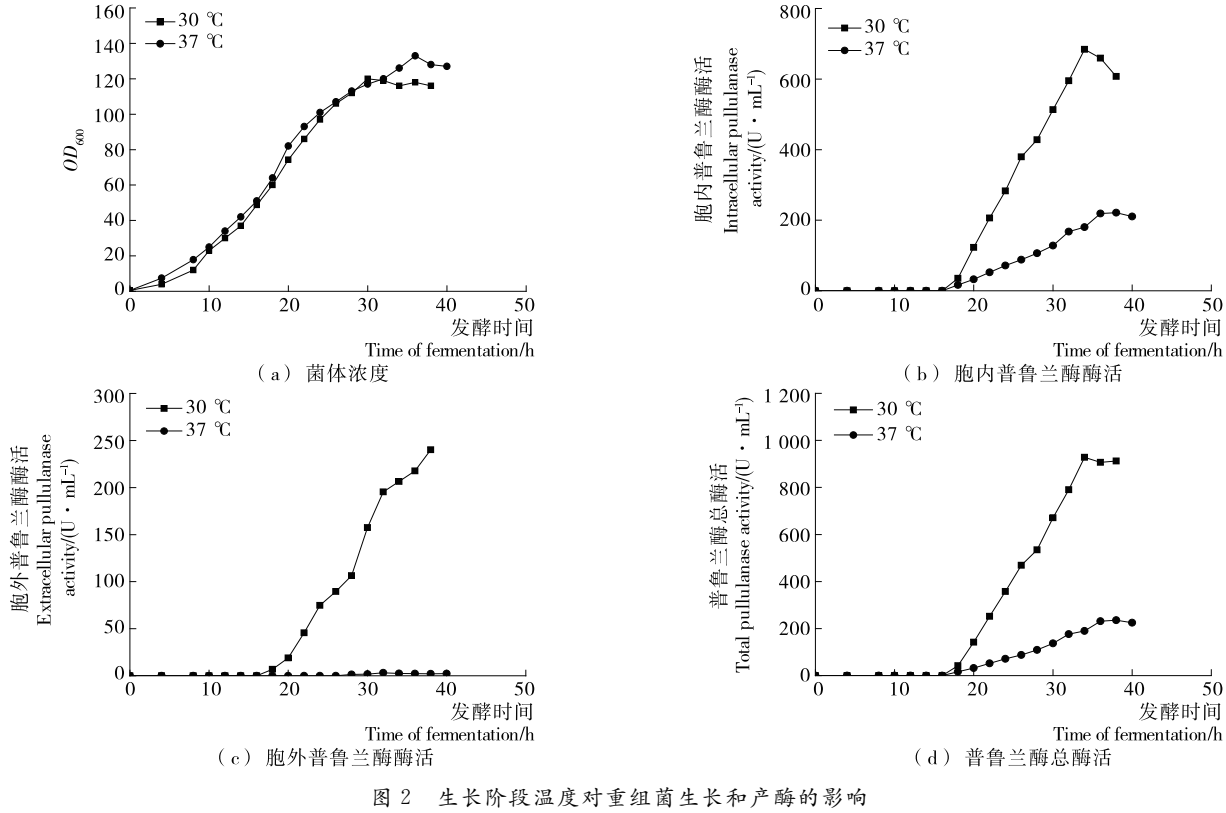
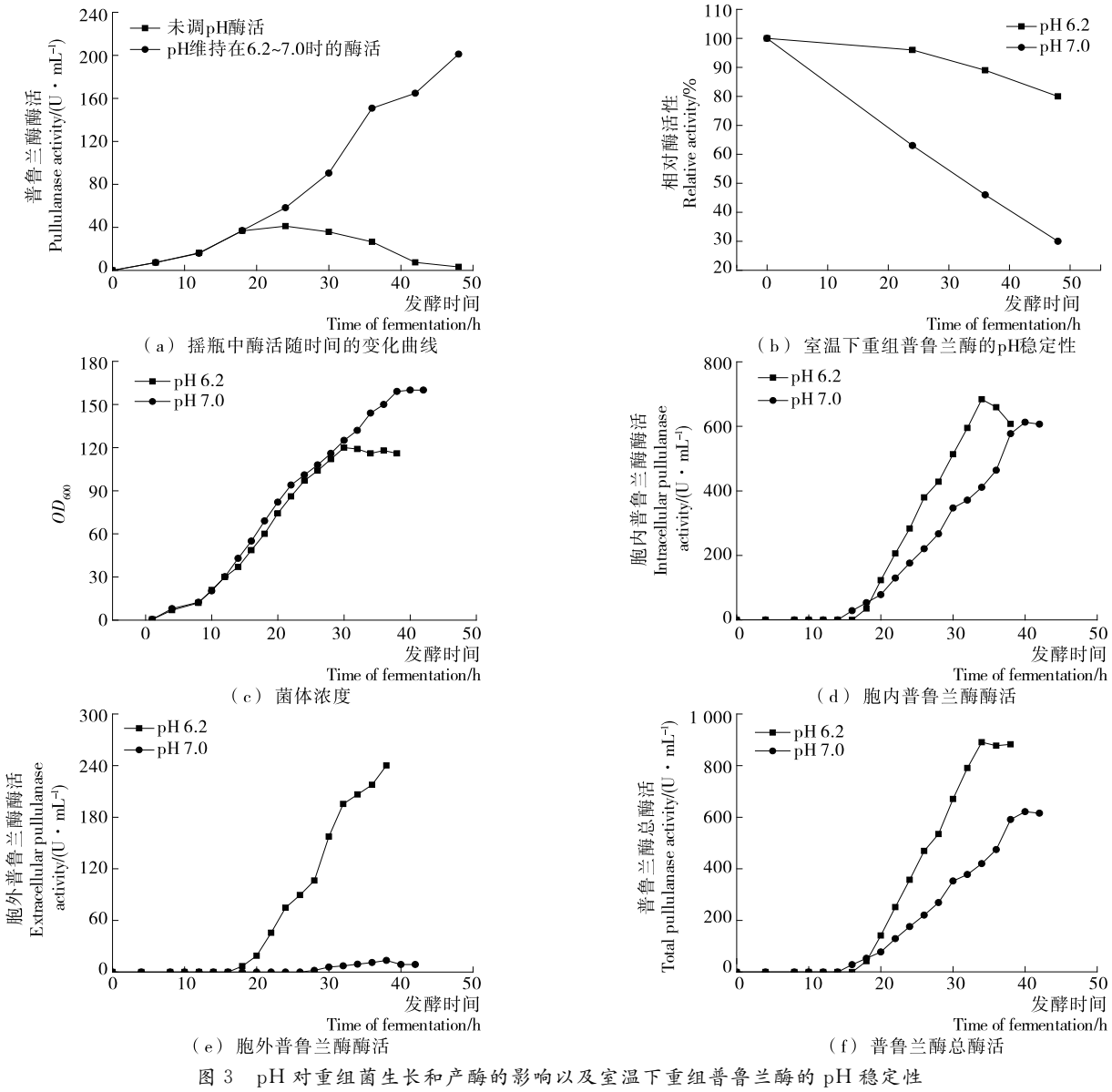


图 2　生长阶段温度对重组菌生长和产酶的影响

Figure 2　Effect of temperature on OD_{600} and pullulanase production during growth phase



(a) 摇瓶中酶活随时间的变化曲线　(b) 室温下重组普鲁兰酶的pH稳定性

(c) 菌体浓度　(d) 胞内普鲁兰酶酶活

(e) 胞外普鲁兰酶酶活　(f) 普鲁兰酶总酶活

图 3　pH 对重组菌生长和产酶的影响以及室温下重组普鲁兰酶的 pH 稳定性

Figure 3　Effect of pH on OD_{600} and pullulanase production in induction stage and pH stability of recombinant pullulanase at room temperature

(OD_{600})分别为 129,120;而当乳糖流加速率为 0.6 g/(L·h)时,菌体浓度(OD_{600})显著降低,说明低诱导强度对重组菌生长影响较小,而较高的诱导强度则可能由于代谢压力大而导致菌体浓度降低。由图 4(b)～(d)可以看出,乳糖的流加速率对重组菌产酶也有显著影响,诱导强度过低或过高都不利于产酶,最佳的乳糖流加速率是 0.4 g/(L·h),在此条件下,普鲁兰酶的最高胞内酶活和胞外酶活分别达到 684.1,240.1 U/mL,总酶活达到 890.6 U/mL。

2.5　诱导时间对重组菌生长和产酶的影响

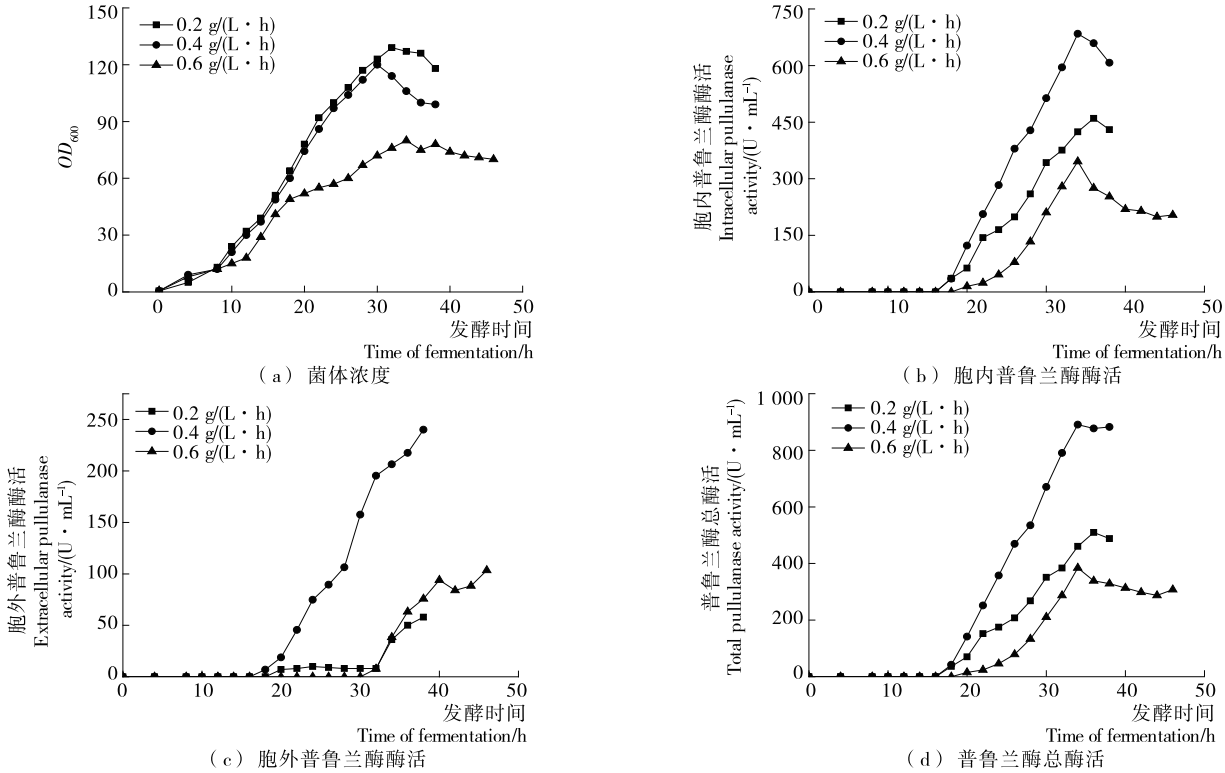
诱导时间也是影响大肠杆菌表达重组蛋白的条件之一,合适的诱导时间既可使菌体高效生长,又不影响目的蛋白的产量[16]。本研究发现,尽管在菌体 OD_{600} 为 15 时,向发酵液中加入 7.5 g/L 甘氨酸,但是胞外分泌效率依然较低。因此,分别在菌体浓度 OD_{600} 达到 25,50,75 时开始诱导,考察了诱导时间对重组菌生长和产酶的影响,结果见图 5。

从图 5 可知,当诱导 OD_{600} 为 25,50 时,重组菌最终生物量均较低,而当诱导 OD_{600} 为 75 时,菌体浓度显著提高。在重组菌产酶过程中,诱导 OD_{600} 为 25 时,菌体产酶最低,可能是菌体浓度较低时诱导易导致菌体过早产酶,因而不利于菌体的良好生长,最终影响产酶,重组酶酶活偏低。当诱导 OD_{600} 为 50 时,重组普鲁兰酶的最高胞内酶活和胞外酶活分别为 684.1,240.1 U/mL,总酶活达到 890.6 U/mL;在诱导 OD_{600} 为 75 时,重组酶酶活下降,可能是在菌体浓度过高时诱导,菌体的细胞膜通透性变差,不利于目的蛋白的转运。综合菌体生长和产酶情况,最佳诱导时间为 OD_{600} 达到 50 时。

2.6　分批加入甘氨酸对重组菌生长和产酶的影响

虽然通过以上多个条件的优化,普鲁兰酶的表达量得到了大幅度提高,但是大部分蛋白都位于周质空间,并未分泌到胞外。可能是由于 pET-20b(+)载体上的 PelB 信号肽主

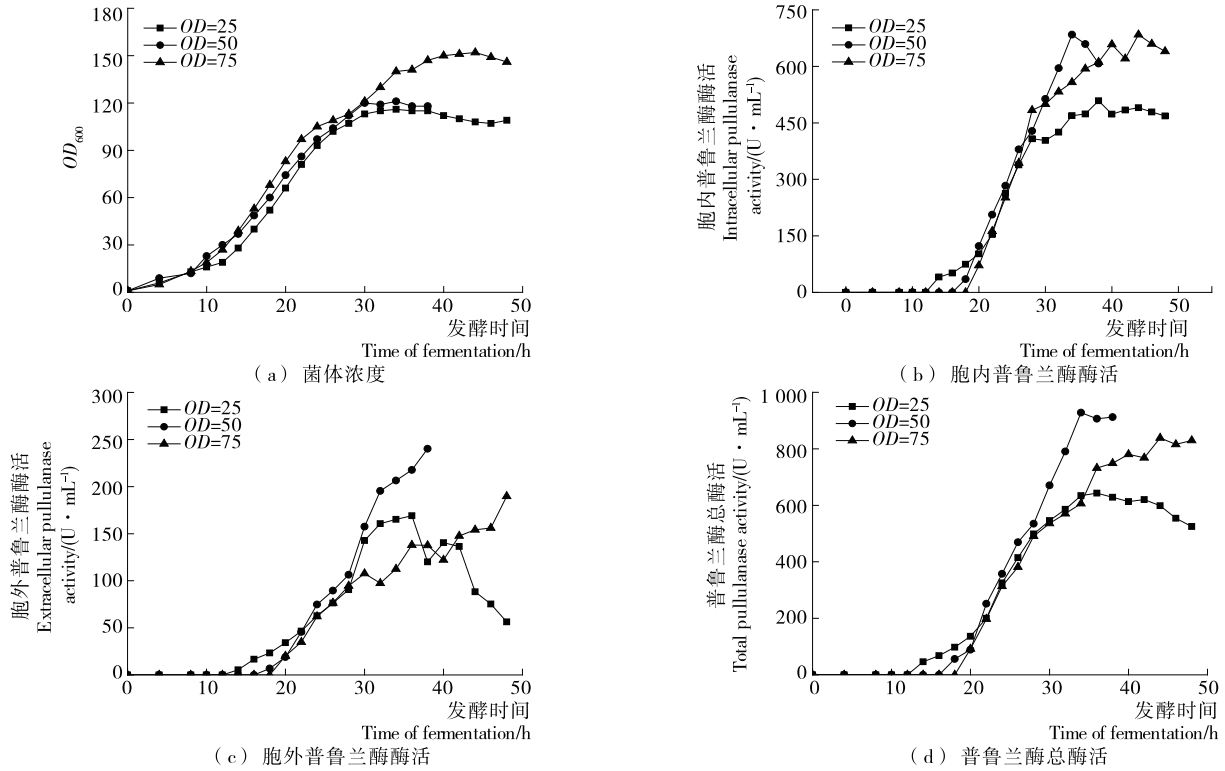
要用于外源蛋白在周质空间的积累,难以到达胞外;或者所用条件不利于重组酶分泌[7]。为了提高胞外表达水平,需要研究增强胞外分泌的方法,本研究尝试加入甘氨酸以提高胞外酶活。文献[17]报道,在培养基中添加一定浓度甘氨酸有助于普鲁兰酶的胞外分泌,而高浓度(>5 g/L)的甘氨酸则会抑制菌体生长。因此,通过分批加入适量的甘氨酸以维持



(a) 菌体浓度　(b) 胞内普鲁兰酶酶活　(c) 胞外普鲁兰酶酶活　(d) 普鲁兰酶总酶活

图 4　乳糖流加速度对重组菌生长和产酶的影响

Figure 4　Effect of lactose flow rates on OD_{600} and pullulanase production



(a) 菌体浓度　(b) 胞内普鲁兰酶酶活　(c) 胞外普鲁兰酶酶活　(d) 普鲁兰酶总酶活

图 5　诱导时间对重组菌生长和产酶的影响

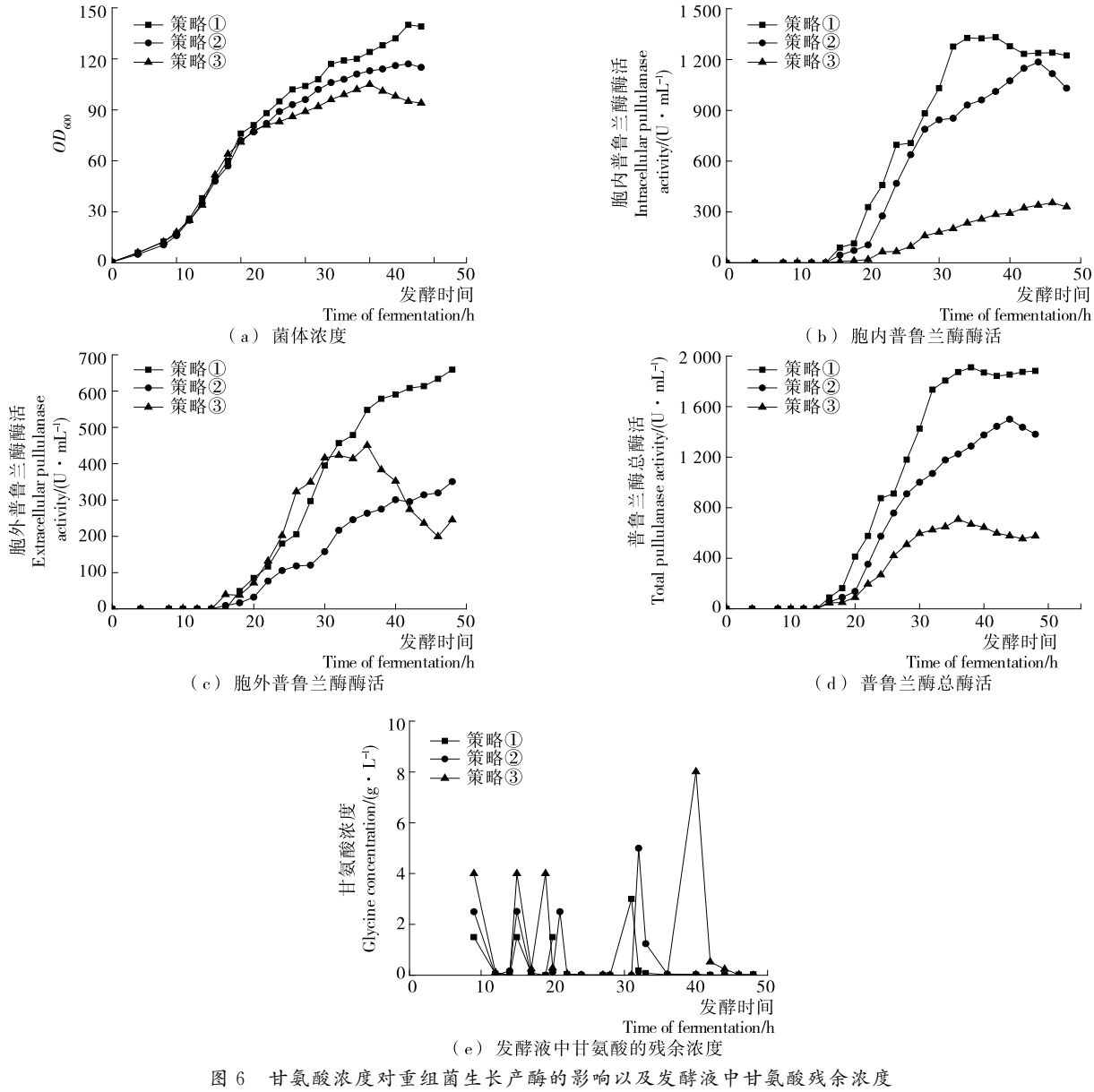
Figure 5　Effect of induced point on OD_{600} and pullulanase production

发酵液中的甘氨酸浓度在 1～5 g/L，可能达到既不影响菌体生长，又能促进目的蛋白胞外分泌的目的。甘氨酸优化的具体策略如下：① 在菌体浓度 OD_{600} 依次达到 15，45，75 时分别加入浓度为 1.5 g/L 的甘氨酸，菌体浓度 OD_{600} 达到 105 时，再加入浓度为 3 g/L 的甘氨酸；② 在菌体浓度 OD_{600} 依次达到 15，45，75 时分别加入浓度为 2.5 g/L 的甘氨酸，菌体浓度 OD_{600} 达到 105 时，再加入浓度为 5 g/L 的甘氨酸；③ 在菌体浓度 OD_{600} 依次达到 15，45，75 时分别加入浓度为 4 g/L 的甘氨酸，菌体浓度 OD_{600} 达到 105 时，再加入浓度为 8 g/L 的甘氨酸，结果见图 6。

从图 6 可知，与策略②和策略③相比，在策略①的条件下，菌体浓度和胞内酶活、胞外酶活以及总酶活均为最高。在此策略下加入到发酵液中的甘氨酸浓度较低，在之后的短时间内甘氨酸即被耗尽[见图 6(e)]，表明加入低浓度的甘氨酸可在不影响重组菌生长的同时促进重组酶的胞外分泌；最终最高胞外酶活和胞内酶活分别达到 659.0，1 331.2 U/mL，最高总酶活为 1 910.1 U/mL。甘氨酸能使细胞膜的通透性增强，有效促进目的蛋白分泌，但较高浓度的甘氨酸易导致菌体生长受到抑制，菌体浓度和产酶也随之降低。研究结果表明，分批加入适宜浓度的甘氨酸可有效促进普鲁兰酶的胞外分泌，从而提高普鲁兰酶的可溶性表达，因此，采用策略①来提高重组普鲁兰酶可溶性表达和胞外分泌是可行的。

3　结论

本研究的目的是在 3 L 发酵罐水平上提高重组菌 *E. coli* BL 21(DE3)/ pET20b(＋)-*Bapul*A 的普鲁兰酶的表达量和胞外分泌。重组蛋白在大肠杆菌中的表达会受到多因素的影响，如发酵过程中的温度、pH 和诱导浓度等。经过以上策略的优化，重组普鲁兰酶的最高总酶活达到 1 910.1 U/mL，与摇瓶最高总酶活相比，提高了9.5倍。在后续研究中，还



(a) 菌体浓度　(b) 胞内普鲁兰酶酶活

(c) 胞外普鲁兰酶酶活　(d) 普鲁兰酶总酶活

(e) 发酵液中甘氨酸的残余浓度

图 6　甘氨酸浓度对重组菌生长产酶的影响以及发酵液中甘氨酸残余浓度

Figure 6　Effect of glycine concentration on OD_{600} and pullulanase production and glycine residues in fermentation broth

可通过选择其他表达载体,以减少重组酶本底表达;或者优化信号肽,以期获得高效的重组蛋白胞外分泌效率,为普鲁兰酶的工业应用提供依据。

参考文献

[1] DOMAN P M, BARDOWSKI J. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(2): 107-121.

[2] ALI G, RIHOUEY C, LE C D, et al. Effect of carboxymethyl groups on degradation of modified pullulan by pullulanase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(1): 109-115.

[3] 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): 1 399-1 404.

[4] 王培立, 初晓宇, 伍宁丰. 一株普鲁兰酶产生菌的筛选及其基因克隆和酶学特性研究[J]. 生物技术进展, 2013(4): 264-269.

[5] 乔宇. Ⅰ型普鲁兰酶产业菌的筛选及其基因克隆、分子改造和高密度发酵表达研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012: 22-25.

[6] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 2001, 28(1): 39-43.

[7] 严伟, 聂尧, 徐岩. 长野芽胞杆菌(*Bacillus naganoensis*)普鲁兰酶在大肠杆菌中的活性表达与分泌调控[J]. 微生物学报, 2013, 53(2): 145-153.

[8] SU Zhe, LU Fu-ping, GAO Qiang, et all. Cloning and expression of a thermostable pullulanase gene from *Thermotoga maritima* MSB8 in *Bacillus subtilis* WB600[J]. China National Science and Technology Platform, 2010, 4th(iCBBE): 1-4.

[9] DUAN Xu-guo, CHEN Jian, WU Jing. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 379-385.

[10] ZOU Chun, DUAN Xu-guo, WU Jing. Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 174-179.

[11] CORREA A, OPPEZZO P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: advantages of high-throughput screening[J]. Biotechnol J., 2011, 6(6): 715-730.

[12] SØRENSEN H P. Towards universal systems for recombinant gene expression[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 27.

[13] CHEN A-na, LI Yan-mei, LIU Xiu-xia, et al. Soluble expression of pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus* in *Escherichia coli* by tightly controlling basal expression[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(12): 1 803-1 810.

[14] DUAN Xu-guo, CHEN Jian, WU Jing. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes[J]. Bioresource Technology, 2013, 146(10): 379-385.

[15] LAPPALAINEN A, NIKUPAAVOLA M L, SUORTTI T, et al. Purification and characterization of *Bacillus-acidopulluly-ticus* pullulanase for enzymitic starch modification[J]. Starch-Starke, 1991, 43(12): 477-482.

[16] 陈伟, 李伟, 朱虎, 等. 重组大肠杆菌产耐高温 Fe-SOD(H29A)的发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(4): 381-386.

[17] 邹纯. 重组 *Bacillus deramificans* 普鲁兰酶的高效胞外表达及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 28-30.

(上接第 5 页)

[11] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1980, 624(1): 13-20.

[12] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.

[13] 毕爽, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 超声处理对黑豆蛋白结构和功能性质的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 153-160.

[14] PALLARES I, VENDRELL J, AVILéS F X, et al. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α-chymotrypsin[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 342(1): 321-331.

[15] NAKAJOU K, WATANABE H, KRAGH-HANSEN U, et al. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants[J]. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2003, 1 623(2): 88-97.

[16] DELGADO Y, MORALES-CRUZ M, HERNÁNDEZ-ROMÁN J, et al. Chemical glycosylation of cytochrome c improves physical and chemical protein stability[J]. BMC Biochemistry, 2014, 15(1): 16.

[17] ZHANG Qiu-ting, TU Zong-cai, XIAO Hui, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(1): 30-37.

[18] HU Hao, WU Jia-hui, LI-CHAN Eunice C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655.

[19] HOFFMAN D R. Immunochemical identification of the allergens in egg white[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1983, 71(5): 481-486.

[20] MARTOS G, LOPEZ-EXPOSITO I, BENCHARITIWONG R, et al. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011, 127(4): 990-997.

[21] CARRARD A, RIZZUTI D, SOKOLLIK C. Update on food allergy[J]. Allergy, 2015, 70(12): 1 511-1 520.

[22] KAHLERT H, PETERSEN A, BECKER W M, et al. Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE[J]. Molecular Immunology, 1992, 29(10): 1 191-1 201.

[23] 麻小娟. 糖基化对卵白蛋白的构象及其抗原性和过敏原性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2011: 1-12.