

基于表达元件优化提高脱氧雪腐镰刀菌烯醇解毒酶DepB在枯草芽孢杆菌中的表达水平

严茹雪, 李越, 牛家峰, 陆兆新, 孟凡强, 朱萍, 吕凤霞*
(南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 本研究实现了脱氧雪腐镰刀菌烯醇解毒酶DepB在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) RIK 1285中的异源表达, 但DepB较低的发酵水平限制了其在食品加工和饲料中的应用, 可采用转录和翻译相结合的策略提高DepB在枯草芽孢杆菌中的表达水平。首先, 选择9个单启动子替换原始启动子 P_{43} , 其中单启动子 P_{spoVG} 介导的重组菌经发酵后酶活力最高, 酶活力为29.59 U/mL。其次, 选择4个具有较高DepB表达水平的启动子 (P_{43} 、 P_{sacB} 、 P_{spoVG} 和 P_{aprE}) 构建16个双启动子系统, 其中, DepB在双启动子 P_{aprE} - P_{spoVG} 的介导下活力达到最高, 为48.87 U/mL。此外, 通过对启动子 P_{aprE} - P_{spoVG} 的核心区域 (-35和-10区) 进行优化, Mutant-5酶活力高达69.17 U/mL, 是原始菌株 (14.45 U/mL) 的4.79倍。在此基础上, 通过优化启动子 P_{spoVG} 的核糖体结合位点序列, 进一步提高了DepB的表达水平, RBS15酶活力为115.15 U/mL, 是原始菌株的7.97倍。研究表明, 转录和翻译相结合策略是提高重组蛋白发酵水平的有效手段。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 枯草芽孢杆菌; 表达元件; 启动子; 核糖体结合位点

Enhanced Expression of Deoxynivalenol-Degrading Enzyme DepB in *Bacillus subtilis* by Optimizing Expression Elements

YAN Ruxue, LI Yue, NIU Jiafeng, LU Zhaoxin, MENG Fanqiang, ZHU Ping, LÜ Fengxia*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A deoxynivalenol-degrading enzyme DepB was successfully expressed in *Bacillus subtilis* RIK 1285 in this study, but the fermentation level of DepB was low, which hinders its application in food and feed processing. Thus, an integrative strategy of transcriptional and translational regulation was explored to enhance the expression level of DepB. First, nine single strong promoters were selected to replace the original promoter P_{43} , among which the recombinant bacteria mediated by the promoter P_{spoVG} gave the highest enzyme activity of 29.59 U/mL after fermentation. Second, four promoters (P_{43} , P_{sacB} , P_{spoVG} , and P_{aprE}) with relatively high DepB expression levels were chosen to construct a dual-promoter system. DepB mediated by the dual promoter P_{aprE} - P_{spoVG} reached the highest activity of 48.87 U/mL. Moreover, the DepB activity of Mutant-5 with optimized core region (-35 and -10 boxes) of P_{aprE} - P_{spoVG} reached 69.17 U/mL, which was 4.79 times higher than that of the original strain (14.45 U/mL). Finally, DepB expression level was further improved by optimizing the ribosome binding site (RBS) sequence of the promoter P_{spoVG} , and the enzyme activity of RBS15 reached 115.15 U/mL, which was 7.97-fold higher than that of the original strain. The results suggest that combined transcriptional and translational regulation is an effective strategy to improve the fermentation level of recombinant proteins.

Keywords: deoxynivalenol; *Bacillus subtilis*; expression elements; promoter; ribosome binding site

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230403-013

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0041-07

引文格式:

严茹雪, 李越, 牛家峰, 等. 基于表达元件优化提高脱氧雪腐镰刀菌烯醇解毒酶DepB在枯草芽孢杆菌中的表达水平[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 41-47. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230403-013. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272267)

第一作者简介: 严茹雪 (1998—) (ORCID: 0009-0008-2328-7055), 女, 硕士, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: 2020108034@stu.njau.edu.cn

*通信作者简介: 吕凤霞 (1963—) (ORCID: 0000-0002-5318-235X), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: lufengxia@njau.edu.cn

YAN Ruxue, LI Yue, NIU Jiafeng, et al. Enhanced expression of deoxynivalenol-degrading enzyme DepB in *Bacillus subtilis* by optimizing expression elements[J]. Food Science, 2024, 45(2): 41-47. (in Chinese with English abstract)
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230403-013. <http://www.spkx.net.cn>

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON), 又名呕吐毒素, 是由禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌、粉色镰刀菌和黄色镰刀菌等真菌侵染谷物后所产生的一种有毒次级代谢产物, 广泛存在于小麦、玉米等粮谷类原料及其制品中, 对人类和动物的健康造成巨大威胁^[1-2]。当DON进入食物链时, 会威胁食品安全并危害人类健康, 引起急性和慢性毒性, 如食欲不振、恶心、呕吐、胃肠炎腹泻、免疫抑制和体质量下降等^[1,3-5]。因此, 迫切需要制定有效的措施预防和控制食品及饲料工业中的DON污染。

近年来, DON生物降解方法倍受关注, 对DON生物降解的研究主要包括微生物降解法和酶解毒法。研究已证实微生物降解法的有效性, 但由于微生物及其代谢产物的分解能力较弱, 影响了实际的降解效果, 而微生物降解的本质也是一种通过酶对毒素进行解毒的方法。相比传统的物理、化学脱毒方法存在效果不稳定、饲料营养成分损失大、影响饲料适口性等缺点, 酶解毒法具有解毒效率高、特异性强、对粮食、饲料和环境无污染等优势, 因而在食品加工和食品安全领域中显示出巨大的应用价值^[6-7]。研究报道, DON的C3位上羟基和C12/13环氧基团是DON的主要毒性基团, 也是生物降解的主要研究位点^[8-10]。其中C3位上羟基的氧化和异构化是目前报道最多、研究最为透彻的解毒方式, 且许多DON解毒酶已被挖掘^[8,10-13]。例如, 醌依赖性醇脱氢酶DepA/QDDH/DDH能够将DON氧化为毒性较小的3-酮基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-keto-DON)^[8,11,13], 再经过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 依赖性醌还原酶DepB/AKR13B2/AKR6D1将3-keto-DON还原, 生成无毒的3-异构-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-*epi*-DON), 即C3位的异构化^[12-13], 这也是目前阐述的最为详细的DON生物转化途径, 解毒效果专一。其中, DepB作为DON生物转化途径中第二步关键酶, 可将中间产物3-keto-DON完全降解为无毒的3-*epi*-DON, 且单向不可逆。尽管目前所挖掘出的DON解毒酶基因均实现了在大肠杆菌中的异源表达, 但表达水平不高^[12], 且DON解毒酶基因在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 安全级表达系统中异源表达的研究鲜见报道。

枯草芽孢杆菌作为研究最为透彻的革兰氏阳性菌, 具有无致病性、易于遗传操作、发酵周期短等特点, 已被食品药品监督管理局认证为GRAS (generally recognized as safe) 菌株^[14]。枯草芽孢杆菌表达系统广泛用于各种工业酶制剂的生产, 如普鲁兰酶^[15]、L-天冬酰

胺酶^[16]、酰胺酶^[17]和 α -淀粉酶^[18]等。研究表明, 表达元件中的不同启动子具有不同的转录强度, 通过控制酶基因的转录水平进而影响重组酶的表达水平, 单个启动子的替换和串联启动子被用来提高重组酶在枯草芽孢杆菌中的表达水平^[17,19-21]。此外, 核糖体结合位点 (ribosomal binding site, RBS) 是影响重组酶表达水平的另一个因素, 不同RBS具有不同翻译起始速率, 它可以在翻译水平上调控酶基因的表达水平^[22-24]。因此, 采用转录和翻译相结合的策略可以实现重组酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达。

本研究实现DON解毒酶DepB在枯草芽孢杆菌RIK1285中的异源表达, 并通过表达元件的优化, 包括信号肽筛选、单个启动子替换、双启动子系统构建、启动子核心区域 (-35和-10区) 优化和RBS工程相结合的系统策略, 以提高DepB在枯草芽孢杆菌中的表达水平, 旨在为DON解毒酶工业化应用和酶制剂开发提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌168、克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、表达宿主枯草芽孢杆菌RIK1285和表达载体pP43NMK均由本实验室保存。编码DepB的DNA序列 (GenBank: KFL28068.1) 由南京金斯瑞生物科技股份有限公司进行密码子优化和合成。本研究所用引物由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

硫酸卡那霉素 北京索莱宝科技有限公司; 胶回收试剂盒DC301及质粒小量提取试剂盒DC201、2 \times Phanta Master Mix、ClonExpression II One Step Cloning Kit 南京诺唯赞健康科技有限公司; 预染Marker 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 蛋白Marker 26610 美国赛默飞世尔科技公司; 硝酸纤维素膜 美国通用公司; ECL发光试剂盒 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

发酵培养基^[25]: 45 g/L蔗糖、12 g/L玉米淀粉、15 g/L蛋白胨、0.8 g/L尿素、2.612 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 、2.041 g/L KH_2PO_4 、1.845 g/L $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 、3 g/L NaCl, pH 7。

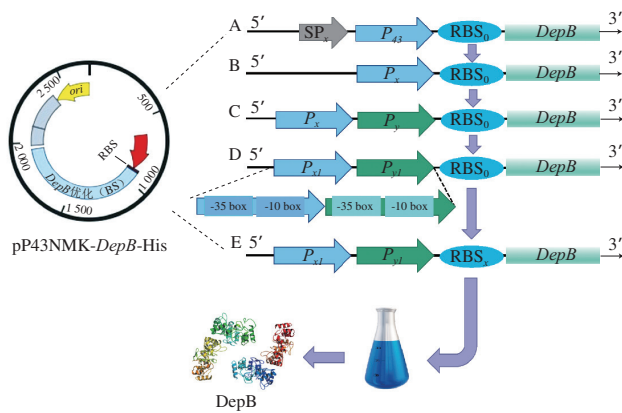
1.2 仪器与设备

PTC-100TM聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、HC164-5052高电流电泳仪 美国Bio-Rad公司; NanoDrop 2000核酸定量仪 美国Thermo公司; UV-2450紫外分光光度计 日本Shimadzu公司。

1.3 方法

1.3.1 表达载体的构建

利用引物对 *DepB*-F、*DepB*-R 通过 PCR 扩增 C 端带有 His 标签的 *DepB* 目的基因，通过引物对 V1 和 V2 对空质粒 pP43NMK 进行线性化。后通过同源重组的方法将目的基因和线性化的质粒组装，得到 *DepB*-His 重组表达载体。同时，利用上述方法以枯草芽孢杆菌 168 及空质粒 pHT43 为模板扩增出 10 条不同类型的信号肽，分别融合到目的基因 *DepB* 的 N 端得到相应的表达载体。此外，为提高重组 *DepB* 在枯草芽孢杆菌中的表达水平，8 个组成型启动子 (P_{aprE} 、 P_{secA} 、 P_{ylbP} 、 P_{hag} 、 P_{fusA} 、 P_{spoVG} 、 P_{yyvD} 和 P_{amyE}) 及一个诱导型启动子 P_{sacB} ，16 个双启动子用来替换原始启动子 P_{43} (图1)。为了进一步提高启动子的转录水平，对启动子的核心区域进行突变。采用同样的方法，设计了 19 个 RBS 序列替换原始的 RBS 序列。启动子和 RBS 工程的示意图见图1。测序正确的载体通过 Gryczan 等^[26]的方法转化至枯草芽孢杆菌 RIK1285 感受态细胞中。



A.信号肽替换; B.单个启动子的替换; C.双启动表达系统的构建; D.启动子 P_{aprE} - P_{spoVG} 核心区域的优化; E. RBS 序列的替换。SP_x代表不同的信号肽; P_x和 P_y代表不同的启动子; RBS_x代表不同的 RBS 序列; -35 和 -10 区代表启动子的核心区域。

图1 表达元件的优化示意图

Fig.1 Schematic diagram of the optimization of expression elements

1.3.2 重组 *DepB* 在枯草芽孢杆菌中的表达情况分析

将重组菌株接种至发酵培养基，在 37 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h；含 P_{sacB} 启动子介导的菌株在 37 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600 nm} = 0.8，加入诱导剂（蔗糖溶液）至终质量浓度为 3 g/100 mL，于 20 °C、200 r/min 条件下培养 72 h。发酵结束后，于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min，收集上清液以及菌体，上清液作为胞外蛋白样品；菌体用 5 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（200 mmol/L NaCl, pH 7.5）重悬，然后在 4 °C 条件下超声破碎 20 min，离心取上清液，上清液为胞内蛋白样品。通过

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分离细胞内和细胞外的蛋白样品，分析蛋白表达情况。

1.3.3 *DepB* 活力测定

依据 Carere 等^[12]的方法，将 20 μL 粗酶液加入到含有 50 mmol/L Tris-HCl、150 μmol/L NADPH 和 100 μmol/L 3-keto-DON 的 300 μL 反应体系（pH 7.0）中。然后，将反应体系在 30 °C 孵育 5 min。使用紫外-可见分光光度计检测 340 nm 波长处吸光度的下降。一个酶活力单位（U）定义为每分钟消耗 1 μmol NADPH 所需的酶量。

1.3.4 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

胞内外蛋白样品与蛋白上样缓冲液混匀，沸水浴 10 min，然后通过 SDS-PAGE 对蛋白进行分离检测。对于 Western blot 实验，将 SDS-PAGE 分离的蛋白转膜至硝酸纤维素膜上，用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h，然后将膜置于 1:20 000 稀释的抗 His-Tag 抗体中，在 4 °C 条件下孵育 16 h。然后将该膜用 TBST 缓冲液洗 3 次，再用 TBS 洗一次，每次洗膜 15 min。最后用高灵敏的 ECL 发光试剂盒进行化学发光。

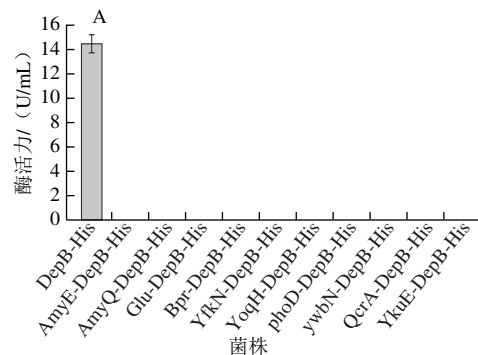
1.4 数据处理与分析

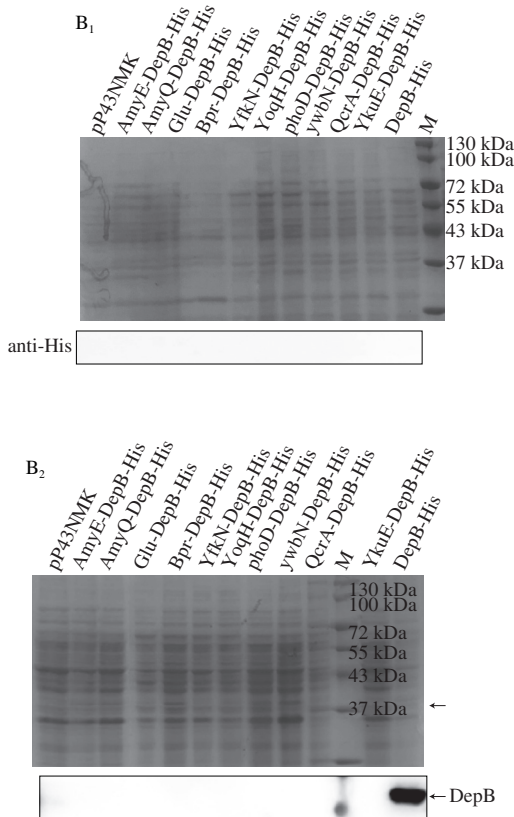
本研究的所有实验均重复 3 次，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计分析均使用 Origin 2021 软件。

2 结果与分析

2.1 *DepB* 在枯草芽孢杆菌 RIK1285 中的异源表达

N 端未融合信号肽的 *DepB* 重组菌和 10 个融合了不同类型信号肽的 *DepB* 重组菌经摇瓶发酵，制备粗酶液，测定 *DepB* 活力，并对重组菌进行发酵验证。结果表明，融合不同类型信号肽的重组 *DepB* 未能实现胞内外分泌（图2），而 N 端未融合信号肽的重组 *DepB* 实现了胞内表达，其酶活力为 14.45 U/mL。另外，Western blot 分析结果显示在 37 kDa 附近具有特异性蛋白条带，与 *DepB* 的理论分子量（38.5 kDa）一致（图2B），实现了 *DepB* 在枯草芽孢杆菌中的异源表达。





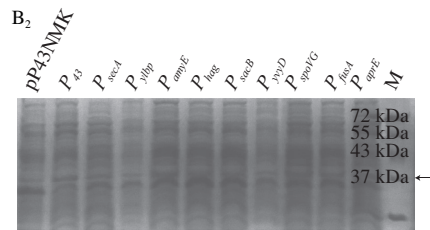
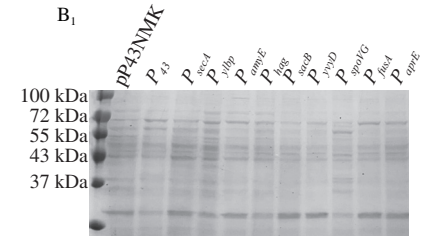
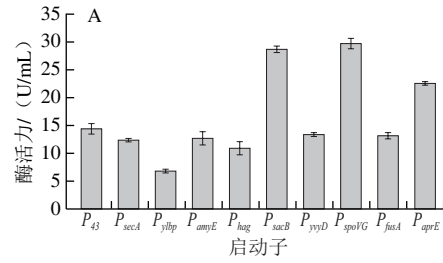
A.不同信号肽介导的重组DepB活力; B.重组DepB的SDS-PAGE和Western blot分析。M.标准蛋白Marker, 下同。下标1.胞外; 下标2.胞内; 图3同。

图2 不同信号肽介导的DepB表达水平

Fig. 2 Expression levels of DepB mediated by different signal peptides

2.2 单启动子对重组菌株表达水平的影响

为了在转录水平上提高DepB的表达水平, 选择了9个具有较强转录水平的启动子替代原始启动子 P_{43} 。发酵72 h后, 不同启动子介导的DepB表达效果差异较大, 启动子 P_{sacB} 、 P_{spoVG} 和 P_{aprE} 表现出比 P_{43} 启动子更好的性能, 酶活力分别为28.61、29.59 U/mL和22.44 U/mL(图3A)。其中启动子 P_{spoVG} 所介导的DepB酶活力最高, 是原始菌株的2.05倍, 重组菌株胞内样品SDS-PAGE分析如图3B所示, 在37 kDa附近具有特异性蛋白条带。研究表明, 启动子 P_{spoVG} 也是具有强转录水平的启动子, 其介导的酰胺酶、 α -淀粉酶AmyZ1和普鲁兰酶的表达水平均高于 P_{43} 所介导的表达水平^[17,27-28], 这与本研究结果一致。而在启动子 P_{43} 介导下的DepB产量比启动子 P_{yyd} 更高, 这与Niu Jiafeng等^[29]采用启动子 P_{yyd} 所介导的I型L-天冬酰胺酶(BIaase)表达水平更高的研究结果相反。由此可见, 即使是在同一启动子的启动下, 不同基因的表达水平也各不相同。



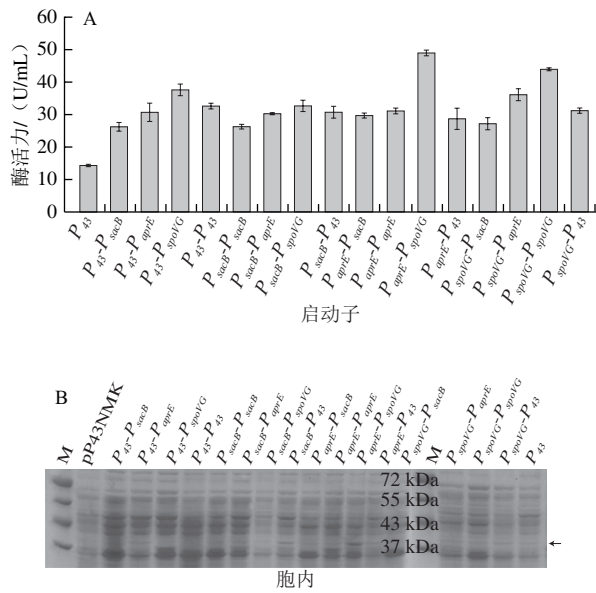
A.不同启动子介导的重组DepB活力; B.重组DepB的SDS-PAGE分析。

图3 不同启动子介导的重组DepB表达水平

Fig. 3 Expression levels of recombinant DepB mediated by different single promoters

2.3 串联启动子对重组菌株表达水平的影响

据报道, 双启动子表达系统是提高重组酶表达水平的有效手段。串联启动子系统是通过将不同的单启动子插入到另一个启动子的下游构建, 其转录强度也各不相同^[17,30-31]。为了进一步提高重组DepB产量, 以单启动子的表达水平为基础, 进行双启动子系统的构建。选择了4个具有较高DepB表达水平的启动子(P_{sacB} 、 P_{43} 、 P_{aprE} 和 P_{spoVG}), 构建了16个双启动子系统。如图4A所示, P_{43} - P_{aprE} 、 P_{43} - P_{spoVG} 、 P_{43} - P_{43} 、 P_{sacB} - P_{aprE} 、 P_{sacB} - P_{spoVG} 、 P_{sacB} - P_{43} 、 P_{aprE} - P_{aprE} 、 P_{aprE} - P_{spoVG} 、 P_{spoVG} - P_{aprE} 和 P_{spoVG} - P_{43} 较最优单启动子 P_{spoVG} 的表达水平更高。其中, 启动子 P_{aprE} - P_{spoVG} 所介导的DepB活力最高, 为48.87 U/mL, 是原始菌株的3.38倍。此外, SDS-PAGE分析如图4B所示, 在37 kDa附近具有特异性蛋白条带。Guan Chengran等^[30]也报道了类似结果, 其研究中6个双启动子中只有2个比单启动子的转录强度高, 这是因为双启动子的强度并不是单一启动子启动强度的简单相加。



A.不同双启动子介导的重组DepB活力; B.重组DepB的SDS-PAGE分析。

图4 不同双启动子表达载体介导下的重组DepB的表达水平

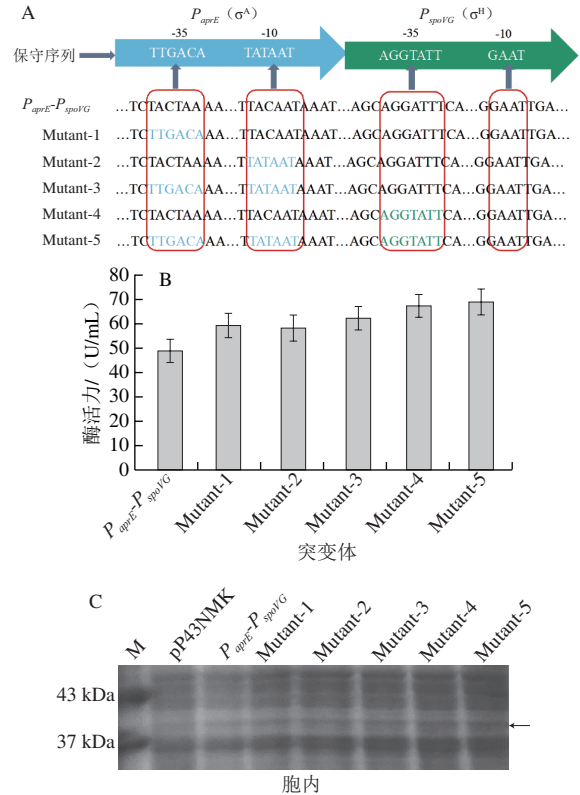
Fig. 4 Expression levels of recombinant DepB mediated by various dual-promoter systems

这16个双启动子系统所介导的DepB活力各不相同,与 P_x - P_{sacB} 双启动子系统相比, P_x - P_{spoVG} 的表达水平更高。这一结果可能是因为双启动子系统的表达强度主要取决于与报告基因相邻启动子的启动强度^[17,31]。结果表明,双启动子系统是在转录水平上提高重组蛋白产量的有效策略。

2.4 启动子核心区域改造对重组菌株表达水平的影响

启动子的转录强度与其保守区域(-35和-10区)密切相关,对这些核心区域的修饰被认为是提高重组蛋白产量的有效方法^[32-34]。因此,为了进一步提高串联启动子 P_{aprE} - P_{spoVG} 的转录强度,对启动子 P_{aprE} 和 P_{spoVG} 的核心区进行改造。 P_{spoVG} 和 P_{aprE} 分别是 σ^H 和 σ^A 依赖型启动子,其核心区域的保守序列如图5A所示^[35-36]。然而, P_{spoVG} 和 P_{aprE} 的保守序列与枯草芽孢杆菌中 σ^H 和 σ^A 依赖型启动子的-35和-10区的保守序列并不完全匹配,故将启动子 P_{aprE} 和 P_{spoVG} 的-35和-10区分别/组合突变为相应的保守序列,构建了5个突变体(图5A)。如图5B所示,Mutant-1、Mutant-2和Mutant-3(Mutant-1和Mutant-2分别是启动子 P_{aprE} 的-35区和-10区突变,Mutant-3是启动子 P_{aprE} 的-35和-10区组合突变)的酶活力分别为59.55、58.58 U/mL和62.18 U/mL,分别是原始菌株的4.12、4.05倍和4.30倍。Mutant-4(启动子 P_{spoVG} 的-35区突变)酶活力为67.19 U/mL,是原始菌株的4.65倍。这表明在双启动子系统中与报告基因相邻的启动子是一个更加关键的启动子,对控制重组蛋白的表达水平至关重要。此外,Mutant-5(启动子 P_{spoVG} 和 P_{aprE} 的-35和-10区域的组合突变)酶活力为69.17 U/mL(图5B),是原始菌株的

4.79倍。另外,SDS-PAGE分析如图5C所示,在37 kDa附近具有特异性蛋白条带。Li He等^[27]通过启动子保守区域的改造,成功提高了 α -淀粉酶AmyZ1在枯草芽孢杆菌中的表达水平,这与本研究结果一致,说明通过优化启动子的核心区域提高异源蛋白的生产水平是一种有效方法。



A.启动子保守区域优化示意图; B.不同突变体的重组DepB活力; C.重组DepB的SDS-PAGE分析。

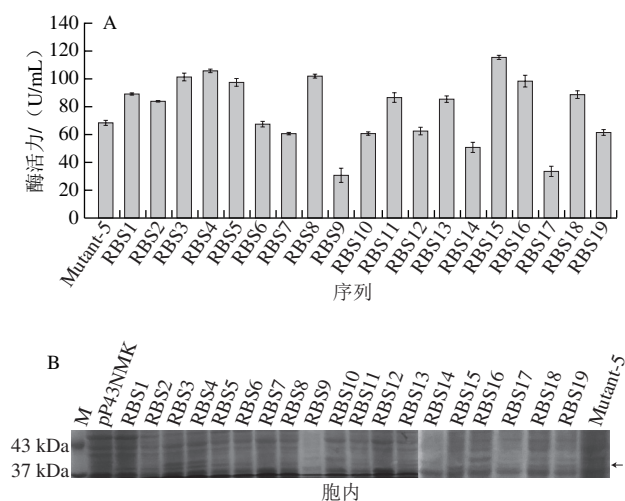
图5 双启动子系统保守区域改造

Fig. 5 Modification of core region of dual-promoter P_{aprE} - P_{spoVG}

2.5 RBS序列对重组菌株表达水平的影响

据报道,目的蛋白的表达水平不仅与启动子的转录强度有关,还受翻译起始速率的调控^[37-39]。RBS序列是决定翻译起始速率和蛋白表达水平的关键因素,优化该区域被认为是提高重组蛋白产量的有效策略^[40]。因此,为了在翻译水平上进一步提高重组DepB的表达水平,选择了19个RBS序列替换Mutant-5的原始RBS序列(RBS 0: AAAGGAGGTGAAATGTACAC)。RBS 1~RBS 14是在枯草芽孢杆菌或大肠杆菌中使用的具有高蛋白表达水平的RBS序列,RBS 15~RBS 19是通过在线软件RBS Calculator v2.0 (<https://salislab.net/software/>)设计的具有不同翻译起始速率的RBS序列。如图6A所示,在不同RBS序列的介导下,DepB的表达水平各不相同。与原始RBS序列相比,RBS 1~5、RBS 8、RBS 11、RBS 13、RBS 15、RBS 16和RBS 18所介导的DepB具有更高的表

达水平。与原始菌株相比,通过RBS Calculator v2.0设计的5个RBS序列中有3个(RBS 15、RBS 16和RBS 18)具有更高的表达水平,结果表明RBS Calculator v2.0是有效的预测软件。在RBS 15的介导下,重组DepB的酶活力达到了115.15 U/mL,是Mutant-5的1.66倍,是原始菌株的7.97倍。另外,SDS-PAGE分析也证实了这一结果(图6B),说明基于优化RBS序列是在翻译水平上提高重组蛋白产量的有效策略。



A.不同RBS介导下的重组DepB活力; B.重组DepB的SDS-PAGE分析。

图6 不同RBS介导下的重组DepB表达水平

Fig. 6 Expression levels of recombinant DepB mediated with different RBS sequences

3 结论

本研究实现了DON解毒酶DepB在枯草芽孢杆菌中的异源表达,但其表达水平有限。为了提高其表达水平,通过转录和翻译相结合的方法,包括单启动子的筛选和替换、双启动子系统的构建、启动子核心区域(-35和-10区)的优化以及RBS序列的替换,提高了重组DepB的产量。优化后,DepB的酶活力由14.45 U/mL提高到了115.15 U/mL,是含有 P_{43} 启动子的原始菌株的7.97倍。上述结果不仅提供了提高枯草芽孢杆菌中重组蛋白表达水平的系统性方法,也为DON解毒酶在谷物原料及饲料中的应用提供了依据。

参考文献:

[1] MISHRA S, SRIVASTAVA S, DEWANGAN J, et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(8): 1346-1374. DOI:10.1080/10408398.2019.1571479.

[2] TIAN Y, ZHANG D C, CAI P L, et al. Elimination of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: current status and future perspectives[J]. *Trends in*

Food Science & Technology, 2022, 124: 96-107. DOI:10.1016/j.tifs.2022.04.002.

- [3] GAO H, NIU J F, YANG H, et al. Epimerization of deoxynivalenol by the *Devosia* strain A6-243 assisted by pyrroloquinoline quinone[J]. *Toxins*, 2021, 14(1): 16. DOI:10.3390/toxins14010016.
- [4] HASSAN Y, ZHU H H, ZHU Y, et al. Beyond ribosomal binding: the increased polarity and aberrant molecular interactions of 3-*epi*-deoxynivalenol[J]. *Toxins*, 2016, 8(9): 261. DOI:10.3390/toxins8090261.
- [5] PAYROS D, ALASSANE-KPEMBI I, PIERRON A, et al. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms[J]. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(12): 2931-2957. DOI:10.1007/s00204-016-1826-4.
- [6] QU R, JIANG C M, WU W Q, et al. Conversion of DON to 3-*epi*-DON *in vitro* and toxicity reduction of DON *in vivo* by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Food & Function*, 2019, 10(5): 2785-2796. DOI:10.1039/c9fo00234k.
- [7] TIAN Y, TAN Y L, LIU N, et al. Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 395. DOI:10.3389/fmicb.2016.00395.
- [8] QIN X J, ZHANG J, LIU Y R, et al. A quinoprotein dehydrogenase from *Pelagibacterium halotolerans* ANSP101 oxidizes deoxynivalenol to 3-keto-deoxynivalenol[J]. *Food Control*, 2022, 136: 108834. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.108834.
- [9] ZHAI Y Y, ZHONG L, GAO H, et al. Detoxification of deoxynivalenol by a mixed culture of soil bacteria with 3-*epi*-deoxynivalenol as the main intermediate[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2172. DOI:10.3389/fmicb.2019.02172.
- [10] HE W J, ZHANG L, YI S Y, et al. An aldo-keto reductase is responsible for *Fusarium* toxin-degrading activity in a soil *Sphingomonas* strain[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9549. DOI:10.1038/s41598-017-08799-w.
- [11] CARERE J, HASSAN Y I, LEPP D, et al. The enzymatic detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol: identification of DepA from the DON epimerization pathway[J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(6): 1106-1111. DOI:10.1111/1751-7915.12874.
- [12] CARERE J, HASSAN Y I, LEPP D, et al. The identification of DepB: an enzyme responsible for the final detoxification step in the deoxynivalenol epimerization pathway in *Devosia* mutants 17-2-E-8[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1573. DOI:10.3389/fmicb.2018.01573.
- [13] HE W J, SHI M M, YANG P, et al. A quinone-dependent dehydrogenase and two NADPH-dependent aldo/keto reductases detoxify deoxynivalenol in wheat via epimerization in a *Devosia* strain[J]. *Food Chemistry*, 2020, 321: 126703. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126703.
- [14] EJAZ S, KHAN H, SARWAR N, et al. A review on recent advancement in expression strategies used in *Bacillus subtilis*[J]. *Protein & Peptide Letters*, 2022, 29(9): 733-743. DOI:10.2174/0929866529666220803163335.
- [15] MENG F Q, ZHU X Y, NIE T, et al. Enhanced expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* by new strong promoters mined from transcriptome data, both alone and in combination[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2635. DOI:10.3389/fmicb.2018.02635.
- [16] NIU J F, MENG F Q, ZHOU Y W, et al. Non-classical secretion of a type I *L*-asparaginase in *Bacillus subtilis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 180: 677-683. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.104.

- [17] KANG X M, CAI X, HUANG Z H, et al. Construction of a highly active secretory expression system in *Bacillus subtilis* of a recombinant amidase by promoter and signal peptide engineering[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 833-841. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.144.
- [18] YAO D B, SU L Q, LI N, et al. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 69. DOI:10.1016/j.bej.2021.107948.
- [19] LIU Z M, ZHENG W H, GE C L, et al. High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 89. DOI:10.1186/s12866-019-1461-3.
- [20] ZHANG J J, KANG Z, LING Z M, et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 543-548. DOI:10.1016/j.biortech.2013.07.129.
- [21] LIU Y H, SHI C S, LI D K, et al. Engineering a highly efficient expression system to produce BcaPRO protease in *Bacillus subtilis* by an optimized promoter and signal peptide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 903-911. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.175.
- [22] SUN H, YANG J L, SONG H. Engineering mycobacteria artificial promoters and ribosomal binding sites for enhanced sterol production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 162: 107739. DOI:10.1016/j.bej.2020.107739.
- [23] PAN M Y, LI J H, LV X Q, et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 124: 54-62. DOI:10.1016/j.enzmictec.2019.01.012.
- [24] JIN P, KANG Z, YUAN P H, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 21-30. DOI:10.1016/j.ymben.2016.01.008.
- [25] JIA M M, XU M J, HE B B, et al. Cloning, expression, and characterization of *L*-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(39): 9428-9434. DOI:10.1021/jf402636w.
- [26] GRYZAN T J, CONTENTE S, DUBNAU D. Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 134(1): 318-329. DOI:10.1128/jb.134.1.318-329.1978.
- [27] LI H, YAO D B, PAN Y, et al. Enhanced extracellular raw starch-degrading α -amylase production in *Bacillus subtilis* by promoter engineering and translation initiation efficiency optimization[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 127. DOI:10.1186/s12934-022-01855-9.
- [28] LIU X, WANG H, WANG B, et al. Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 163. DOI:10.1186/s12934-018-1011-y.
- [29] NIU J F, YAN R X, SHEN J, et al. Cis-element engineering promotes the expression of *Bacillus subtilis* type I *L*-asparaginase and its application in food[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6588. DOI:10.3390/ijms23126588.
- [30] GUAN C R, CUI W J, CHENG J T, et al. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*[J]. New Biotechnology, 2016, 33(3): 372-379. DOI:10.1016/j.nbt.2016.01.005.
- [31] ZHANG K, SU L Q, DUAN X G, et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16: 32. DOI:10.1186/s12934-017-0649-1.
- [32] ZHOU C Y, YE B, CHENG S, et al. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 111. DOI:10.1186/s12934-019-1159-0.
- [33] LEE S J, PAN J G, PARK S H, et al. Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(1/2): 16-20. DOI:10.1016/j.jbiotec.2010.06.021.
- [34] PHAN T T P, NGUYEN H D, SCHUMANN W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 167-172. DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.10.006.
- [35] YANG S, DU G C, CHEN J, et al. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4151-4161. DOI:10.1007/s00253-017-8142-7.
- [36] 张琳, 刘平, 王阳, 等. 枯草芽孢杆菌 P_{spovG} 启动子改造与表征[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(5): 20-27.
- [37] BORKOWSKI O, GOELZER A, SCHAFFER M, et al. Translation elicits a growth rate-dependent, genome-wide, differential protein production in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Systems Biology, 2016, 12(5): 870. DOI:10.15252/msb.20156608.
- [38] LEVIN-KARP A, BARENHOLZ U, BAREIA T, et al. Quantifying translational coupling in *E. coli* synthetic operons using RBS modulation and fluorescent reporters[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, 2(6): 327-336. DOI:10.1021/sb400002n.
- [39] SALIS H M, MIRSKY E A, VOIGT C A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(10): 946-950. DOI:10.1038/nbt.1568.
- [40] 张大伟, 康倩. 枯草芽孢杆菌蛋白质表达分泌系统发展及展望[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(1): 1-10. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.01.001.