

陈龙军, 林陈强, 张慧, 等. 嗜热芽胞杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草芽孢杆菌中的表达 [J]. 福建农业学报, 2019, 34 (5): 600–605.

CHEN L J, LIN C Q, ZHANG H, et al. Expression of α -Cyclodextrin Glycosyltransferase Gene of *Gebacillus* sp. CHB1 in *Bacillus subtilis* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 34 (5): 600–605.

嗜热芽胞杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草芽孢杆菌中的表达

陈龙军, 林陈强, 张慧, 贾宪波, 方宇, 陈济琛*

(福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003)

摘要:【目的】构建分泌表达 α -环糊精葡萄糖基转移酶 (α -CGTase) 的重组枯草芽孢杆菌, 实现 α -CGTase 的安全高效表达。【方法】通过 PCR 法扩增嗜热地芽孢杆菌 α -CGTase 基因, 运用 *EcoR* I/*Xho* I 分别对 α -CGTase 基因及 pBES 进行双酶切, 然后将该基因片段插入到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pBES 中, 再电转化法转化枯草芽孢杆菌 RIK1285; 对重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 发酵条件进行探索。【结果】(1) 利用发酵培养基分泌表达 α -CGTase, 重组枯草芽孢杆菌工程菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 发酵上清液产酶达到 $2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。(2) TB 为最适发酵培养基 (配方: 甘油 0.5%, 蛋白胨 1.2%, 酵母粉 2.4%, K_2HPO_4 1.64%, KH_2PO_4 0.23%); 在初始 pH 6.5, 温度为 37°C 下, 摆瓶发酵培养 24 h 后, α -环糊精酶的环化活性达到 $5.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是野生菌株嗜热地芽孢杆菌 ($0.66 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 8 倍。【结论】成功构建了枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 工程菌, 并确定其最适发酵培养基和培养条件。

关键词: 枯草杆菌工程菌; α -环糊精葡萄糖基转移酶; 表达; 优化

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

文章编号: 1008-0384 (2019) 05-600-06

Expression of α -Cyclodextrin Glycosyltransferase Gene of *Gebacillus* sp. CHB1 in *Bacillus subtilis*

CHEN Long-jun, LIN Chen-qiang, ZHANG Hui, JIA Xian-bo, FANG Yu, CHEN Ji-chen*

(Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract:【Objective】To construct a vector for expressing α -cyclodextrin glycosyltransferase (α -CGTase) gene in *Bacillus subtilis*. 【Method】The α -CGTase gene from *Gebacillus* sp. CHB1 was amplified by PCR. The *Eco* I-digested pBES and *Xho* I-digested α -CGT gene were connected and transformed into *B. subtilis* RIK1285. Subsequently, fermentation of the recombinant *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT was optimized. 【Result】(1) The α -CGTase gene was expressed in a fermentation medium to show an enzymatic activity of $2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ by *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT. (2) Medium TB with the formula of 0.5% glycerol, 1.2% peptone, 2.4% yeast extract, 1.64% K_2HPO_4 , and 0.23% KH_2PO_4 was found to be optimal for the fermentation. After fermentation in TB at 37°C for 24h, the α -CGTase activity reached $5.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was 8-fold of what the wild *Gebacillus* sp. CHB1 could generate. 【Conclusion】The engineered *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT was successfully obtained and the fermentation process optimized.

Key words: Engineered *Bacillus subtilis*; α -cyclodextrin glycosyltransferase; expression; optimization

0 引言

【研究意义】环糊精是生物酶催化淀粉等相关

基质经环化形成的环状寡聚糖, 由 6 个以上葡萄糖通过 α -1, 4-糖苷键联结而成, 通常由 6、7、8 个 D-吡喃葡萄糖单元构成, 称为 α -、 β -、 γ -环糊精。

收稿日期: 2019-03-12 初稿; 2019-04-22 修改稿

作者简介: 陈龙军(1983—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事微生物菌剂、酶工程及发酵工程研究(E-mail: monkeyirene@163.com)

* 通讯作者: 陈济琛 (1964—), 男, 研究员, 主要从事微生物菌剂研究 (E-mail: chenjichen2001@163.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2017J01056); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1022-7、2017R1022-2); 国家重点研发计划项目 (2018YFD0200706); 福建省农业科学院探索创新项目 (AA2018-13)

由于环糊精分子具有特殊的外表亲水、内里疏水的中空圆筒结构，能与许多客体分子形成包络物，进而改变客体分子的溶解度、稳定性等物理化学性质，在农药、食品、医药、化妆品和环保等领域具有广泛的应用^[1]。环糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, 简称 CGTase)是生产环糊精的重要工业用酶，鉴于环糊精的巨大应用价值，生产环糊精所必需的 CGTase 的制备成为了当今研究的热点。环糊精酶催化产物通常包含 α -、 β -、 γ -环糊精 3 种环糊精，根据主要产物的不同，将环糊精酶分类为 α -、 β -、 γ -环糊精酶。总结现有的报道，环糊精酶的获取方式大致归纳为 3 种：从自然界中筛选野生菌株；根据基因文库进行克隆表达；对已知目的基因片段进行蛋白质工程改良。其中野生菌株筛选不仅最为直接有效，而且也是后两种方式的基础^[2]。有关 CGT 酶的研究已经跨越了一个世纪，人们对环糊精酶也逐步提出了更高的要求：更高的产物专一性、更高的热稳定性、更稳定的耐碱性，甚至更强的抗有机试剂性能。

【前人研究进展】为了降低环糊精生产成本，提高 CGTase 的产量和催化特性，将 CGTase 基因采用基因工程方法进行异源表达被认为是最有效的途径之一。目前常见的基因表达系统主要有大肠杆菌、芽孢杆菌及酵母表达系统。其中大肠杆菌表达环糊精酶多有报道^[3-5]，酵母表达系统报道较少^[6-7]，并且效果不甚理想。而枯草芽孢杆菌表达系统，与其他表达系统相比具有明显的优势：首先，相对于大肠杆菌表达系统：枯草芽孢杆菌为非致病性、细胞壁组成简单、重组表达的蛋白内毒素低、较低密码子偏爱性、表达蛋白可溶性高、生物活性好^[8-9]。其次，相对于真核表达系统，其表达周期短，成本低，表达量较高。**【本研究切入点】**本课题组在前期工作中从 *Gebacillus sp.* CHB1 中分离获得了 1 种 α -环糊精酶，该酶最适反应温度达到 65℃，有较好的热稳定性，应用潜力巨大，并且该 CGT 基因在大肠杆菌 *E. coli* 及毕赤酵母中成功克隆表达^[10-12]。大肠杆菌表达量虽高，但易形成包涵体，对环糊精酶的分离造成困难，而毕赤酵母表达量较低。**【拟解决的关键问题】**本研究尝试选用枯草芽孢杆菌分泌表达系统表达嗜热芽孢杆菌 CHB1 α -CGTase，以期实现 α -CGTase 的安全高效表达，并对该工程菌的发酵温度、pH 和培养基等进行优化，为环糊精酶工程菌株的规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

嗜热芽孢杆菌 *Gebacillus sp.* CHB1 (含新型环糊精酶基因)、大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 为福建省农业科学院土壤肥料研究所保存；枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* strain RIK1285、大肠杆菌 *E. coli* 穿梭载体 pBE-S DNA 购自大连宝生物工程(TaKaRa)公司。

1.2 试剂与仪器

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Mark、*T₄*DNA 连接酶及 *B. subtilis* strain RIK1285 感受态细胞购自 TaKaRa 公司；DNA 切胶回收试剂盒、PCR 引物及质粒快速提取试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司，其余试剂均为国产或进口分析纯。3-18K 超高速冷冻离心机购自 Sigma 公司，PCR 仪购自基因有限公司，Multiskan FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 培养基

LB 培养基，Amp 终浓度 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。TSB (胰蛋白胨大豆肉汤培养基)：胰蛋白胨 1.5%，大豆蛋白胨 0.5%，氯化钠 0.5%。M9：葡萄糖 1%，维生素 B1 (单独灭菌) 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，Na₂HPO₄ 1.28%，KH₂PO₄ 0.3%，NaCl 0.05%，NH₄Cl 0.5%。TB：甘油 0.5%，蛋白胨 1.2%，酵母粉 2.4%，K₂HPO₄ 1.64%，KH₂PO₄ 0.23%。

1.4 α -环糊精酶基因引物设计与扩增

提取嗜热芽孢杆菌 *Gebacillus sp.* CHB1 基因组 DNA，并以此为模板，在 α -环糊精酶基因上下游分别添加限制性酶切位点 (*Xho* I 和 *Eco*R I)，设计上下游引物如下：

CGT-F: 5'-CCG CTC GAGA ATA AGG TAA ATT TTA CAT CG-3' (下划线为 *Xho* I 限制性酶切位点)；CGT-R: 5'-CCG GAA TTC GTT TTG CCA ATT CAC TAT AAT-3' (下划线为 *Eco*R I 限制性酶切位点)；用 PCR 扩增试剂盒进行 α -CGT 酶基因扩增。PCR 反应条件：94℃ 4 min；94℃ 60 s，58℃ 45 s，72℃ 2 min，循环 30 次；72℃ 10 min。DNA 切胶回收试剂盒进行 CGT 片段回收，备用。

1.5 重组表达质粒 pBE-CGT 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 分别对 pBE 载体及 CGT 片段进行双酶切，胶回收 CGT 基因片段及 pBE 线性载体；参照 TaKaRa 公司 *T4* DNA 连接酶使用说明书，将 CGT 基因片段与

pBES 线性载体混合, 进行连接反应, 连接产物转化感受态细胞 JM109, 经 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素抗性 LB 平板及菌落 PCR 鉴定, 构建重组枯草芽孢杆菌表达质粒 pBE-CGT; 同时提取相应质粒送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.6 重组芽孢杆菌的构建及筛选

采用电转化方法, 冰浴融化感受态细胞枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* strain RIK1285, 与 $3 \mu\text{L}$ 重组表达质粒 pBE-CGT 混匀, 设置电转化参数(电击参数 1500 V 、 $25 \mu\text{F}$ 、 200Ω), 将 pBE-CGT 载体导入感受态 *B. subtilis* strain RIK1285 中, 于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素抗性 LB 平板培养至转化子出现($24\sim48 \text{ h}$), 挑取若干克隆子进行 PCR 验证, 获得重组枯草芽孢杆菌重组 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT。

1.7 枯草芽孢杆菌的发酵培养

种子液培养: 挑取重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 单克隆于 LB 培养基生长 18 h ;

发酵培养: 按 1% 接种量将种子发酵液接种至 50 mL 发酵培养基, 在 37°C 摆床培养 36 h , 每隔一段时间取样, 将发酵液于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min 除菌体, 收集上清液, 测定 α -环糊精酶活力。

1.8 重组枯草杆菌表达外源蛋白条件优化

1.8.1 培养时间对产酶的影响 为考察重组枯草芽孢杆菌发酵不同阶段 α -环糊精酶活力变化, 在温度 37°C 、 $\text{pH}7.0$ 条件下, 进行工程菌产酶培养, 每隔 4 h 进行取样测定 OD_{600} 和环糊精酶活力, 发酵持续 32 h 。

1.8.2 培养温度对产酶的影响 为考察不同温度对重组枯草芽孢杆菌产环糊精酶能力的影响, 在 $\text{pH}7.0$ 条件下分别采用 25°C 、 30°C 、 37°C 、 40°C 培养, 24 h 后测定 OD_{600} 和环糊精酶活力。

1.8.3 初始 pH 对产酶的影响 为考察不同初始 pH 对重组枯草芽孢杆菌产环糊精酶能力的影响, 在温度 37°C 下, 调整初始发酵 pH 分别为 5.5 、 6.0 、 6.5 、 7.0 、 7.5 、 8.0 , 经过发酵 24 h 后, 测定 OD_{600} 和环糊精酶活力, 考察初始 pH 对环糊精酶表达量的影响。

1.8.4 初始培养基对产酶的影响 为考察不同初始培养基对重组枯草芽孢杆菌重组 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 产环糊精酶能力的影响, 在温度 37°C 、 $\text{pH}6.5$ 条件下, 分别对常用芽孢杆菌培养基(LB, TSB, M9, TB), 进行发酵培养 24 h , 筛选最适培养基。

1.9 CGTase 酶活性测定

测定 α -环糊精葡萄糖基转移酶活力的方法参照甲基橙褪色法^[13], 具体操作如下: 取 0.9 mL 预先用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液($\text{pH}6.0$)配制的 3% (w/v) 可溶性淀粉溶液于试管中, 置于 60°C 水浴锅内预热 2 min , 然后加入粗酶液或适当稀释的纯酶液 0.1 mL , 反应 10 min , 立即加入 1.0 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸终止反应, 再加入 1.0 mL ($\text{pH}6.0$) 的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基橙溶液, 混匀后于 16°C 下保温 20 min , 用酶标仪测定波长 505 nm 处的吸光度并根据空白计算褪色程度(ΔA), 最后根据 α -环糊精标准曲线计算出 α -环糊精的浓度。酶活力单位定义为: 60°C , $\text{pH}6.0$ 下, 每分钟催化产生 $1 \mu\text{mol}$ α -环糊精所需的酶量即为一个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 CGTase 表达质粒的构建

以 *EcoR I* 和 *Xho I* 为双酶切体系, 分别对载体 pBE 载体及 CGT 片段进行双酶切, 回收 2000 bp (CGT) 及 6000 bp 线性载体 pBE。转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆子, 提质粒进行单/双酶切验证, 电泳结果如图 1 所示, 在 2 、 6 及 8 kb 附近出现 2 条预期大小的 DNA 亮带, 说明大肠杆菌/芽孢杆菌穿梭表达质粒 pBE-CGT 成功构建。进一步通过电转化法将梭表达质粒 pBE-CGT 导入 *B. subtilis* RIK1285 感受态细胞, 筛选克隆子菌落进行 PCR 验证(引物 CGT-F/CGT-R)(图 2), 在 2 kb 左右出现预期大小条带; 同时将质粒送上海生工进行测序验证, 由测序结果可知, 环糊精酶重组枯草芽孢杆菌工程菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 构建完成。

2.2 重组枯草芽孢杆菌产环糊精酶

以基础培养基 LB 为发酵培养基, 对工程枯草芽孢杆菌菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 进行产酶培养, 每隔 4 h 测定芽孢杆菌生长情况及产酶量, 结果如图 3 所示。随着发酵时间延长, 细胞密度及酶活力均出现逐步上升的趋势, 发酵 16 h 细胞量趋于稳定, 菌体生长进入稳定期, 当发酵 24 h 后, 菌体浓度开始下降, 此时 α -环糊精酶活力达到最大值 $2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 之后伴随菌体进入衰亡期, 酶活力略微下降。因此, 发酵 24 h 为该工程菌的最适发酵时间。

2.3 重组枯草杆菌发酵环糊精酶条件优化

2.3.1 培养温度对产环糊精酶的影响 温度对微

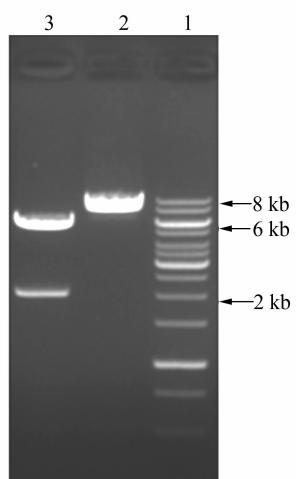
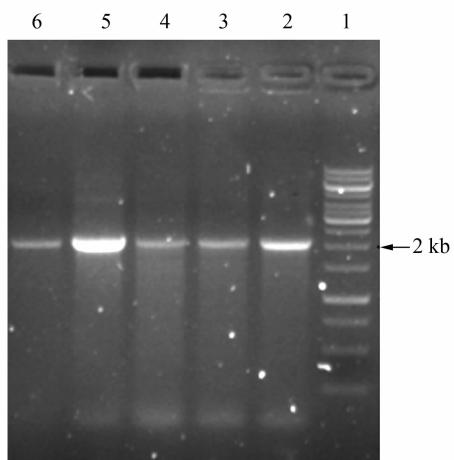


图1 重组表达载体 pBE-CGT 单/双酶切验证

Fig. 1 Verification of pBE-CGT obtained by single and double digestion

注: 1为1 kb DNA标准分子量; 2为重组载体单酶切; 3为重组载体双酶切。

Note: 1. DL 1 kb DNA Marker; 2. Single digestion; 3. Double digestion.

图2 重组芽孢杆菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 菌落 PCR 验证Fig. 1 PCR validation on *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT colonies

注: 1为1 kb DNA标准分子量; 2~6为CGT克隆子PCR。

Note: 1. DL 1 kb DNA Marker; 2~6. Colony PCR of CGT.

生物生长及生物酶活性具有重要影响; 温度的改变, 影响着微生物的代谢活动, 过低的温度可能使微生物生长停滞, 过高的温度可能导致微生物致死, 因此本试验考察了4个温度下, 工程菌经24 h发酵后的产酶情况, 结果如表1所示。随着温度的升高, 菌体逐渐升高, 生长旺盛; 然而环糊精酶活

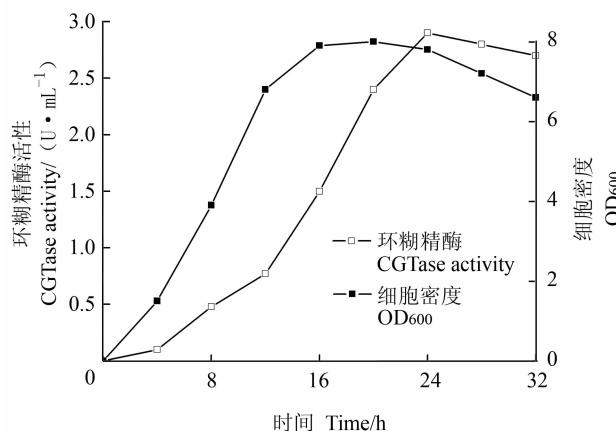


图3 初始工程菌发酵环糊精酶活力和生长曲线

Fig. 3 CGTase activity and cell growth in shaking-flask fermentation

性随温度的升高, 呈先上升后下降的趋势, 在37℃下酶活力达到最大值, 为最适表达温度。分析原因, 可能由于温度过低, 菌体生长缓慢酶表达量低; 随温度升高, 菌体产酶速度加快, 过高导致酶活降低, 可能高温产生更多的蛋白酶对环糊精酶产生降解。

表1 不同温度对菌体生长和产酶的影响

Table 1 Effects of temperature on growth and enzyme production of bacteria

温度 Temperature /℃	细胞密度 OD ₆₀₀	环糊精酶活力 CGTase activity (U·mL ⁻¹)
25	6.9	1.6±0.11a
30	7.3	2.1±0.16b
37	8.3	2.9±0.14c
40	9.5	1.9±0.15b

注: 同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。表2~3同。

Note: Values are the means±SD(n=3). Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$). The same as Table 2~3.

2.3.2 pH 对产环糊精酶的影响 pH是影响微生物生长及工程菌发酵过程中各种酶活性的一个重要因素, 因此, 本研究分析了不同pH下, 工程菌经24 h发酵后的产酶情况, 结果如表2所示。当控制初始pH在6.0~8.0时菌体生长旺盛, pH7.5时菌体量最高; 而在pH 6.5时酶活力达到最高, 说明中性偏碱性有利于菌体生长, 而中性偏酸性环境有利于外源环糊精酶基因的表达。因此, 虽然初

始 pH 在 7.5 时更有利于菌体生长, 但工程菌最适表达 pH 为 6.5。

表 2 不同 pH 对菌体生长和产酶的影响

Table 2 Effects of pH on growth and enzyme production of bacteria

酸碱度 pH	细胞密度 OD_{600}	环糊精酶活性 $CGTase\ activity/(U \cdot mL^{-1})$
5.5	7.3	$1.9 \pm 0.13a$
6.0	7.9	$2.7 \pm 0.17b$
6.5	8.1	$3.3 \pm 0.19c$
7.0	8.3	$3.0 \pm 0.15c$
7.5	8.4	$2.7 \pm 0.15b$
8.0	8.1	$2.1 \pm 0.12a$

2.3.3 不同培养基对产环糊精酶的影响 为了选择适合工程菌表达 α -CGT 酶并可用于下步优化的出发培养基, 将工程菌置于 4 种常见的枯草芽孢杆菌培养基中培养 24 h, 测定细胞密度及相应环糊精酶活力 (表 3)。由表 3 可知, 经 TB 培养基发酵后, 工程菌的细胞密度及环糊精酶活力均最高, 明显高于其他 3 种培养基, 究其原因: 相对 LB、TSB 培养基而言, TB 培养基有相对较高的 pH 缓冲能力, 稳定的 pH 环境更有利于菌体生长, 表达更多蛋白。相对 M9 而言, TB 含丰富的营养成分 (蛋白胨、甘油等) 更适合菌体生长, 因此有更多的菌体生产重组环糊精酶, 更有利于 α -CGT 酶的表达。因此最终确定 TB 为最优发酵培养基。在 pH6.5、37℃ 下, 进行工程菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 产 α -环糊精酶培养, 其菌体生长及产酶曲线如图 4 所示, 在发酵 24 h 胞外酶活达到最高, 为 $5.3\ U \cdot mL^{-1}$, 细胞密度达到 (OD_{600}) 12.3。

表 3 不同培养基对产环糊精酶的影响

Table 3 Effects of culture medium on growth and enzyme production of bacteria

初始培养基 Initial medium	细胞密度 OD_{600}	环糊精酶活性 $CGTase\ activity/(U \cdot mL^{-1})$
LB	8.3	$2.9 \pm 0.17a$
TSB	9.2	$3.5 \pm 0.16b$
M9	10.5	$4.1 \pm 0.13c$
TB	12.3	$5.3 \pm 0.21d$

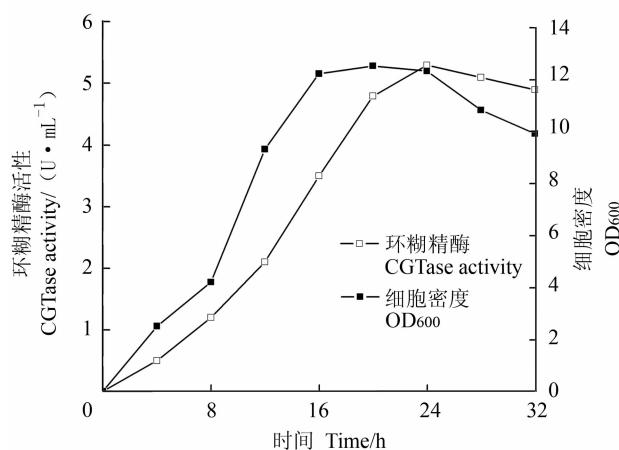


图 4 优化后工程菌发酵环糊精活力和生长曲线

Fig. 4 CGTase activity and cell growth in shaking-flask fermentation after optimization

3 讨论与结论

环糊精分子因其特殊的环状中空结构, 具有的很强包络能力, 应用广泛。随着人类生活品质的提高, 对环糊精的需求量日益增长。环糊精的工业化生产主要是有环糊精酶催化合成。因此环糊精酶的产量及活力对环糊精的生产至关重要。随着现代分子生物学的飞速发展, 运用基因工程手段, 实现 CGTase 基因的异源超量表达, 成为国内外研究的热点。本课题组前期已经实现了环糊精酶在大肠杆菌与酵母中的表达, 取得一定进展。

为进一步提高环糊精酶表达量, 探索环糊精酶最适表达系统, 本研究选择枯草芽孢杆菌表达系统, 成功构建了枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* RIK1285/pBE-CGT 工程菌, 并对工程菌发酵培养基种类及基础发酵条件进行了初步探索, 最终确定 TB 为该工程菌的最适发酵培养基, 在初始 pH 6.5、37℃ 下, 持续发酵 24 h 后, 细胞密度达到 12.3 (OD_{600}), 此时测得发酵上清液 α -环糊精酶活力同时达到最大值 $5.3\ U \cdot mL^{-1}$, 是野生菌 *Gebacillus* sp. CHB1 产 α -环糊精酶 ($0.66\ U \cdot mL^{-1}$) 的 8 倍^[14]。目前有关 α -环糊精酶的异源表达, 主要集中在大肠杆菌表达系统, 而枯草芽孢杆菌表达系统鲜见报道, 张佳瑜等^[7]研究来源于软化芽孢杆菌的 α -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中的表达, 表达量是野生菌株软化芽孢杆菌表达量的 9.8 倍, α -环糊精酶活力为 $4.9\ U \cdot mL^{-1}$ 。本研究结果虽最终提高倍数略低于前者, 但最终酶活力更高。另外, 虽然本研究枯草芽孢杆菌 α -环糊精酶表达量低于其在大肠杆菌中的表达量, 但相

对大肠杆菌表达系统而言，枯草芽孢杆菌遗传背景清晰，属于公认的食品工业安全菌，不含内毒素，具有良好的遗传稳定性，且分离纯化工艺简单，是环糊精酶乃至其他酶蛋白高效表达、最终实现规模化生产的重要途径。后期深入研究，将考虑通过信号肽、表达载体等的优化以及对酶分子的氨基酸序列进行定点突变，最大限度提高环糊精酶在枯草芽孢杆菌中的表达量，为其规模化生产提供技术支持。

参考文献：

- [1] CHEN J, WU J, LI Z F, et al. Gamma-cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77 (2): 245–255.
- [2] 金征宇, 柏玉香, 王金鹏. 环糊精葡萄糖基转移酶的筛选及其定向改造 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31 (2): 113–123.
- JIN Z Y, BAI Y X, WANG J P. Screen and Modification of Cyclodextrin Glycosyltransferase [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31 (2): 113–123. (in Chinese)
- [3] JARUNEE K, WANIDA P, VICHEN R, et al. Expression and characterization of a fusion protein-containing cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. A11 [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 50 (5): 427–435.
- [4] PENKA P, ALEXANDRA T, KALOYAN P. Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotransferase gene from the *alkaliphilic* *Bacillus pseudocalaliphilus* 8SB in *Escherichia coli* [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47 (12): 2139–2145.
- [5] LIU H, LI J H, DU G C, et al. Enhanced production of α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli* by systematic codon usage optimization [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39 (12): 1841–1849.
- [6] NAM S W, PARK H Y, KIM J H, et al. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23 (9): 727–730.
- [7] 张佳瑜, 吴丹, 李兆丰, 等. 来源于软化芽孢杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶在毕赤酵母和枯草杆菌中的表达 [J]. 生物工程学报, 2009, 25 (12): 1948–1954.
- ZHANG J Y, WU D, LI Z F, et al. Expression of *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (12): 1948–1954. (in Chinese)
- [8] 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.
- [9] LIDIA W, HELGA W, WIM J Q. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1694 (1–3): 299–310.
- [10] 陈龙军, 陈济琛, 林晓栩, 等. 嗜热芽孢杆菌CHB1环糊精酶基因优化及其在毕赤酵母中的表达 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37 (9): 994–999.
- CHEN L J, CHEN J C, LIN X X, et al. Codon Optimization And Expression Of Cyclodextrin Glycosyltransferase From *Gebacillus* sp. CHB1 In *Pichia pastoris*. [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37 (9): 994–999. (in Chinese)
- [11] 陈龙军, 陈济琛, 林新坚, 等. 环糊精酶基因在毕赤酵母中的组成型表达 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (1): 82–86.
- CHEN L J, CHEN J C, LIN X J, et al. Constitutive Expression of Cyclodextrin Glycosyltransferase in *Pichia pastoris* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (1): 82–86. (in Chinese)
- [12] 蔡海松, 林晓栩, 郭永华, 等. 信号肽及化学通透剂对环糊精葡萄糖基转移酶胞外分泌的影响 [J]. 微生物学通报, 2017 (3): 601–610.
- CAI H S, LIN X X, GUO Y H, et al. Effects of different signal peptides and chemical penetrators on extracellular production of recombinant cyclodextrin glycosyltransferase [J]. *Microbiology China*, 2017 (3): 601–610. (in Chinese)
- [13] LEJEUNE A, SAKAPUCHI K, IMANAKA T. A Spectrophotometric Assay for the Cyclization Activity of Cyclomaltohexaose (α -Cyclodextrin) Glucanotransferase [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 181: 6–11.
- [14] 叶学军. 地芽孢杆菌CHB1产CGTase的分离纯化及基因的克隆表达 [D]. 福州: 福州大学, 2014.
- YE X J. Purification And Expression Of Cyclodextrin Glycosyltransferase From *Gebacillus* sp. CHB1 [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2014. (in Chinese)

(责任编辑: 林海清)