

研究报告

# 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

张佳瑜<sup>1,2</sup>, 吴丹<sup>1,2</sup>, 李兆丰<sup>1,2</sup>, 陈晟<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>, 吴敬<sup>1,2</sup>

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 通过 PCR 扩增软化芽孢杆菌  $\alpha$ -CGT 酶基因, 将基因片段分别克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 和大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体 pMA5 中, 分别转化毕赤酵母 KM71 和枯草杆菌 WB600。结果表明, 重组毕赤酵母发酵上清液中  $\alpha$ -CGT 酶活性仅 0.2 U/mL, 重组枯草杆菌产酶达到 1.9 U/mL。对重组枯草杆菌发酵条件进行了优化, 当以 TB 为出发培养基, 初始 pH 6.5, 温度为 37°C 时, 摇瓶培养 24 h 后  $\alpha$ -CGT 酶环化活性达到 4.5 U/mL (水解活性为 3200 IU/mL), 是野生菌株软化芽孢杆菌表达量的 9.8 倍。

**关键词:** 毕赤酵母, 枯草杆菌,  $\alpha$ -CGT 酶, 表达, 优化

## Expression of *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*

Jiayu Zhang<sup>1,2</sup>, Dan Wu<sup>1,2</sup>, Zhaofeng Li<sup>1,2</sup>, Sheng Chen<sup>1,2</sup>, Jian Chen<sup>1,2</sup>, and Jing Wu<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** The *cgt* gene was isolated from *Paenibacillus macerans* by PCR amplification and was inserted into vectors of pPIC9K and pMA5. The recombinant vectors were transformed to *Pichia pastoris* KM71 and *Bacillus subtilis* WB600, respectively. The results showed that  $\alpha$ -CGTase activity in the culture media of recombinant *P. pastoris* was only 0.2 U/mL, while it was 1.9 U/mL in recombinant *B. subtilis*. In addition, we optimized the culture conditions of the recombinant *B. subtilis* strain. After cultivation at 37°C for 24 h with shake flask, the CGTase forming activity in culture media reached to 4.5 U/mL (hydrolysis activity was 3200 IU/mL), which is 9.8-fold to that of the original strain *P. macerans*.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -CGTase, expression, optimization

环糊精是由 6 个以上葡萄糖连结而成的环状低聚糖化合物, 其中最常用的是  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -环糊精, 它们分别由 6、7、8 个 D-吡喃葡萄糖单元构成。由于环糊精分子具有独特的疏水空腔结构, 能包含疏水

**Received:** September 21, 2009; **Accepted:** November 11, 2009

**Supported by:** Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2007019), Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (No. SKLF-MB-200802), Program of Innovation Team of Jiangnan University (2008CXTD01).

**Corresponding author:** Jing Wu. Tel: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

江苏省自然科学基金(No. BK2007019), 食品科学与技术国家重点实验室科研基金(No. SKLF-MB-200802), 江南大学创新团队项目(No. 2008CXTD01)资助。

性客体分子, 从而改变客体分子的溶解度、稳定性等物理化学性质, 因此在食品、医药、农业等领域具有广泛的应用<sup>[1]</sup>。

随着环糊精的应用越来越广, 生产环糊精所必需的环糊精葡萄糖基转移酶(简称 CGT 酶, EC 2.4.1.19) 的制备已经成为了当今研究的热点<sup>[2]</sup>。目前, 已经发现胞外分泌 CGT 酶的微生物种类很多, 大多数为细菌, 其中工业上所使用生产菌株一般为芽孢杆菌。虽然很多研究致力于通过优化培养基组成和培养条件来提高这些生产菌株的生产能力, 但由于天然菌株本身具有比较严格的调控机制, 因此, 通过发酵条件的优化来提高其产 CGT 酶的能力是有限的, 这也造成了 CGT 酶具有较低的产量和较高的生产成本, 是目前环糊精生产成本居高不下的原因之一。

为了大幅提高酶的产量和生产强度, 将 CGT 酶基因采用基因工程方法过量表达被认为是最有效的途径之一。常用的基因工程宿主菌有大肠杆菌、枯草杆菌以及酵母<sup>[3]</sup>。大肠杆菌在表达外源蛋白时, 易形成不溶性包涵体, 提取时需要破碎细胞, 增加了成本。Lee 等<sup>[4]</sup>将来源于嗜碱性 *Bacillus firmus* 的  $\beta$ -CGT 酶基因插入到含有一分泌型 pel B 信号肽的表达载体 pET-20b(+) 中, 然后转入宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS 进行重组表达, 在最佳培养条件下, 胞外  $\beta$ -CGT 酶的产量比天然芽孢杆菌高 9 倍。Kim 等<sup>[5]</sup>以 pET-22b(+) 质粒为载体在 *E. coli* 中表达 *Brevibacillus brevis* CD162 的 *cgt* 基因, 通过降低诱导温度到 30°C 或加入 0.5 mol/L 甘露醇作为渗透压剂的办, 酶的活性提高 34 倍。枯草杆菌作为工业中应用较广泛的分泌表达宿主, 与其他革兰氏阳性菌相比, 在某些方面具有明显的优势: 第一, 枯草杆菌属于公认的食品工业安全菌; 第二, 枯草杆菌具有强大的蛋白分泌能力; 第三, 无明显密码子偏好性; 第四, 有关转录、翻译、蛋白折叠和分泌机理已被广泛研究<sup>[6-7]</sup>。Marja 等<sup>[8]</sup>以 *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase 启动子构建质粒在枯草杆菌中表达 *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 的 *cgt* 基因, 酶的产量

提高 33 倍(无酶表达活性的具体报道)。Kyeong-A SIN 等<sup>[9]</sup>以 pUP110Ce 为载体, 将来源于 *Bacillus ohbensis* 的  $\beta/\gamma$ -CGT 酶基因表达于 *B. subtilis* 中, 测得水解活性 30 U/mL。

与细菌表达系统相比, 较完善的酵母表达系统在表达外源蛋白时稳定性较好, 分泌表达能力强, 表达量高。但不容忽视的是, 外源基因在酵母中表达存在密码子偏爱性, 以及细菌来源的基因在真菌中表达可能会因为各种原因而不表达, 可以说存在一种表达偏爱性。CGT 酶发展数十年, 只有一篇在酵母中表达该酶的文献<sup>[3]</sup>, 胞外酶活也仅为 0.28 U/mL(环化活性)。对 CGT 酶在酵母中表达可行性的探索目前未有报道。

本实验室在前期工作中已将来源于 *Paenibacillus macerans* 的 *cgt* 基因在 *E. coli* 中成功克隆表达<sup>[10-11]</sup>。基于食品工业安全宿主菌为出发点, 本研究尝试选用毕赤酵母和枯草杆菌分泌表达系统表达 *P. macerans*  $\alpha$ -CGT 酶, 研究了温度、pH 和培养基对重组枯草杆菌产酶的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

*P. macerans* JFB05-01(保藏号: CCTCC No. M208063)<sup>[11]</sup>; 克隆宿主菌: *E. coli* JM109; 表达宿主菌: *Pichia pastoris* KM71, *B. subtilis* WB600(his<sup>-</sup> nprB<sup>-</sup> nprE18<sup>-</sup> aprE<sup>-</sup> epr<sup>-</sup> bpf<sup>-</sup> mpr); 表达质粒 pPIC9K<sup>[12]</sup>和 pMA5<sup>[13]</sup>均为本实验室保藏。pGEM-T simple 购自大连宝生物工程公司。

### 1.2 试剂

营养琼脂、蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxoid。酵母无氨基基本氮源培养基(YNB)、遗传霉素 G418 购自上海生工生物工程公司。工具酶、基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。标准  $\alpha$ -环糊精购自中国上海 Sigma 公司(分子量 973)。

### 1.3 培养基

LB 培养基, Amp 终浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。MD、YPD、BMGY、BMMY 培养基, 重组酵母常用培养基<sup>[12]</sup>。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%。营养肉汁+1%淀粉培养基。M9: 葡萄糖 1%, 维生素 B1(单独灭菌) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.28%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{NaCl}$  0.05%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5%。TB: 甘油 0.5%, 蛋白胨 1.2%, 酵母粉 2.4%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.64%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.23%。

### 1.4 重组质粒 pPCGT 和 pMCGT 的构建

提取软化芽孢杆菌的基因组 DNA, 并以此为模板用 PCR 扩增试剂盒分离  $\alpha$ -CGT 酶基因。PCR 反应条件: 94°C 4 min; 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 130 s, 循环 30 次; 72°C 10 min。PCR 引物如下: P1(5'-3'): GGCGAATTCTCACCCGATACGAGC(正向引物); P2(5'-3'): ATAAGAATGCGCCGCTTAATTTTGCCAG(反向引物); P3(5'-3'): ACGAGGAATTCATGAAATCGCGGTAC(正向引物); P4(5'-3'): CGCGGATCCTTAATTTTGCCAGTCCAC(反向引物)。P1、P2 分别含 *EcoR* I 和 *Not* I 的限制性酶切位点, P3、P4 分别含 *EcoR* I 和 *Bam*H I 的限制性酶切位点。以 P1、P2 为引物扩增得到成熟的 *cgt* 基因片段, 将其克隆、纯化、回收后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K, 构建重组质粒 pPCGT。以 P3、P4 为引物扩增得到 *cgt* 基因及其自身信号肽的片段, 将其插入 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pMA5, 构建重组质粒 pMCGT。

### 1.5 工程菌的构建及培养

#### 1.5.1 毕赤酵母转化、筛选及培养

将表达载体 pPCGT, 经 *Bgl* II 酶切线性化后回收含有目的基因的条带, 电击转入 *P. pastoris* KM71 感受态细胞中, 在 MD 平板长出单克隆, 再经 YPD/G418 平板筛选多拷贝转化子, G418 浓度筛选梯度依次为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL, 高拷贝转化子经 PCR 鉴定。pPIC9K 空质粒处理同上, 转化菌作为阴性对照。将鉴定正确的单菌落接种至 5 mL YPD 培养基, 200 r/min、30°C 培养 16 h, 以 10% 的接种量接入 BMGY 培养基, 30°C 培养 24 h, 离心收集全部菌体, 转入 BMMY 培养基, 30°C 培养 120 h, 每 24 h 补加 0.5% 的甲醇。

#### 1.5.2 枯草杆菌转化及培养

枯草杆菌转化参照 Spizizen 的方法<sup>[14]</sup>。挑取转入表达宿主 *B. subtilis* 的单克隆于 LB 培养基生长 9 h, 按 1% 接种量将种子发酵液接入 50 mL 发酵培养基, 在 37°C 摇床培养 30 h, 每隔一段时间取样, 将发酵液于 12 000 r/min 离心 2 min 除菌体, 收集上清液。

### 1.6 分析方法

DNA 琼脂糖凝胶电泳和表达产物的 SDS-PAGE 按文献<sup>[15]</sup>方法进行。 $\alpha$ -CGT 酶活性的测定分别测其水解活性<sup>[16]</sup>和环化活性<sup>[17-18]</sup>。甲基橙法测定环化活性方法: 含量取 1%(W/V)可溶性淀粉溶液 1 mL 和 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_3$  缓冲液(pH 7.0) 2 mL, 与 0.1 mL 适当稀释的酶液混匀, 40°C 水浴中反应 10 min 后, 立即冰浴中止反应; 再加入 1.2 mol/L HCl 溶液 0.1 mL 及 0.035 mmol/L 甲基橙溶液 2 mL, 15°C 静置 30 min, 在 507 nm 下测定吸光度。以吸光度下降百分数对[CD]作图, 得到的线性关系作为工作曲线, 一个酶活单位(U)定义为在上述条件下每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -环糊精所需的酶量。未特别指明均表示其环化活性。菌体的浓度采用分光光度法测定。

### 1.7 重组枯草杆菌外源蛋白表达条件优化

#### 1.7.1 培养温度对产酶的影响

分别采用 25°C、30°C、37°C、40°C 培养, 24 h 后测定  $OD_{600}$  和酶活。

#### 1.7.2 初始 pH 对产酶的影响

在最适温度下调节初始 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 24 h 后测定  $OD_{600}$  和酶活。

## 2 结果

### 2.1 重组 *P. pastoris* KM 71/pPCGT 的构建与表达

以提取的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到成熟的 *cgt* 片段, 其长度大小经凝胶电泳验证为 2.1 kb。将 *cgt* 基因片段插入 pGEM-T simple 质粒中, 测序后发现 *cgt* 基因所编码的氨基酸序列与网上氨基酸序列(GenBank Accession No. P04830)完全一致。纯化回收目的基因后分别与同样酶切纯化回收的毕赤酵母表达载体 pPIC9K 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑选阳性克隆, 提质粒, 双酶切鉴定, 获得重组质粒, 命名为 pPCGT。重组质粒经相应酶切位

点双酶切, 显示两条明显的条带, 条带大小与预期相符, 证明 $\alpha$ -CGT 酶基因已成功连接到 pPIC9K。

重组质粒 pPCGT 经 *Bgl* II 线性化、纯化回收后, 电转 *P. pastoris* KM 71 感受态细胞, 涂布 MD 平板, 转化子转接到不同浓度的 G418 的 YPD/G418 平板上, 筛选具有高拷贝的 *cgt* 基因的菌株, 从 G418 浓度为 1 mg/mL 的 YPD/G418 平板上挑取单菌落, PCR 鉴定正确。而将鉴定正确的重组 *P. pastoris* KM 71/pPCGT 接入 BMMY 培养后测得胞外酶活 0.2 U/mL, SDS-PAGE 未检测到目的蛋白条带。

## 2.2 重组 *B. subtilis* WB600/pMCGT 的构建与表达

重组质粒 pMCGT 的构建过程与 2.1 中的 pPCGT 类似。重组质粒经相应酶切位点双酶切, 显示条带大小与预期相符, 证明 $\alpha$ -CGT 酶基因已成功连接到 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pMA5。

将重组质粒 pMCGT 转化枯草芽孢杆菌 WB600, 获得重组枯草芽孢杆菌 WB600/pMCGT。通过质粒提取和限制性酶切鉴定确认了重组菌构建成功。pMA5 空质粒处理同上, 转化宿主菌作为阴性对照。

重组枯草芽孢杆菌 WB600/pMCGT 和 WB600/pMA5 分别接入 LB 培养基表达, 每隔一定时间取样, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液按照方法 1.6 测酶活。测得重组枯草芽孢杆菌 WB600/pMCGT 上清发酵液酶活力为 1.9 U/mL, 而阴性对照 WB600/pMA5 检测不到酶活。利用 12% SDS-PAGE 对重组枯草杆菌发酵上清液、破壁上清和破壁后沉淀进行检测, 在发酵上清液中发现与 $\alpha$ -CGT 酶分子量相对应的 72 kD 处有条带(图 1), 而阴性对照中没有相应条带, 并且破壁上清和破壁后沉淀也无相应条带, 表明 $\alpha$ -CGT 酶成功分泌到胞外。

## 2.3 重组枯草杆菌外源蛋白表达条件优化

### 2.3.1 培养温度对产酶的影响

表 1 为不同温度对菌体生长和产酶的影响。在 37°C 下有利于菌体生长和产酶, 为最适温度。温度过低, 菌体生长缓慢; 随温度升高, 菌体产酶速度加快, 过高导致酶活降低。

### 2.3.2 初始 pH 对产酶的影响

表 2 结果显示, 控制初始 pH 在 6.0~7.5 有利于

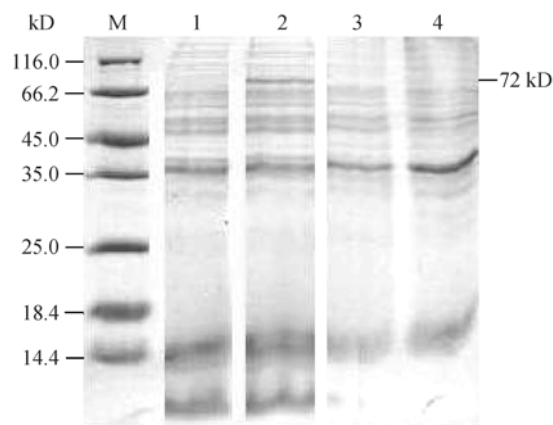


图 1  $\alpha$ -CGT 酶表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression of  $\alpha$ -CGTase. M: protein marker; 1: *B. subtilis* WB600(pMA5) induced; 2: WB600 (pMCGT) induced; 3: soluble fraction of WB600(pMCGT); 4: cellular insoluble fraction of WB600(pMCGT).

表 1 温度对 $\alpha$ -CGT 酶发酵生产的影响

Table 1 Effect of temperature on the production of  $\alpha$ -CGTase

Temperature(°C)	$OD_{600}$	CGTase activity (U/mL)
25	7.65	0.9
30	8.83	1.2
37	9.25	1.9
40	10.45	0.8

表 2 初始 pH 对 $\alpha$ -CGT 酶发酵生产的影响

Table 2 Effect of initial pH on the production of  $\alpha$ -CGTase

Initial pH	$OD_{600}$	CGTase activity (U/mL)
5.5	8.08	0.9
6.0	8.91	1.6
6.5	8.78	2.0
7.0	9.45	1.9
7.5	9.27	1.7
8.0	8.90	0.8

菌株产酶, 在 pH 6.5 时酶活最高, 说明中性偏酸性环境有利于外源基因的表达, 初始 pH 在 7.0 时更有利于菌体生长。

### 2.3.3 初始培养基对产酶的影响

为了选择适合重组枯草杆菌 WB600 表达 $\alpha$ -CGT 酶并可用于下步优化的出发培养基, 将重组菌株置于 6 种较典型的枯草杆菌培养基中进行培养, 测定  $OD_{600}$  和酶活(图 2)。在这些培养基中, TB 培养

基有相对较高的 pH 缓冲能力,丰富的营养成分更适合菌体生长,因此有更多的菌体生产重组酶,最有利于 $\alpha$ -CGT 酶的表达,如图 3,在最优培养基下,发酵 24 h 后胞外酶活达到 4.5 U/mL。

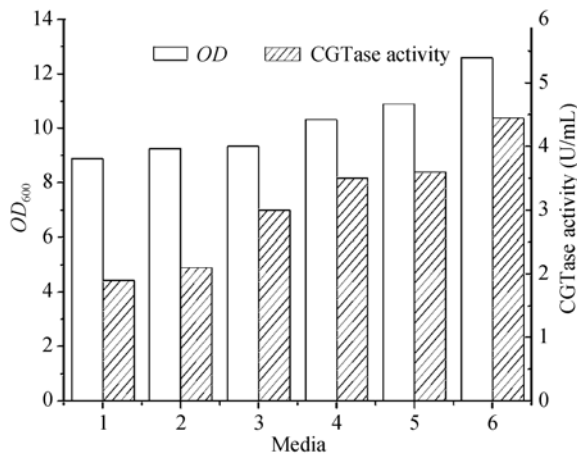


图 2 发酵出发培养基对菌体生长和产 $\alpha$ -CGT 酶的比较  
Fig. 2 Effect of media on cell growth and production of  $\alpha$ -CGTase. 1: LB; 2: LB+1% glucose; 3: TSB; 4: nutrient broth+1% starch; 5: M9; 6: TB.

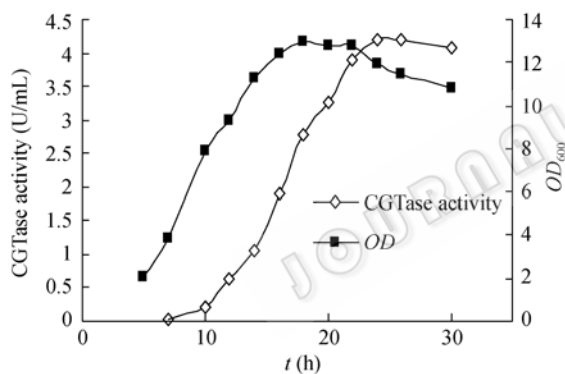


图 3 摇瓶条件下重组 *B. subtilis* WB600 产 CGT 酶的发酵过程  
Fig. 3 Recombinant  $\alpha$ -CGTase production by *B. subtilis* WB600 in shake flask.

### 3 讨论

环糊精分子具有独特的中空桶状结构,提供了一种在分子水平上改变被包裹物物理化学性质的有效手段,从而引起各个领域的广泛注意。随着人类生活品质的改善,对它的需求正日益增长,其在工业中的应用比例大致为:食品工业 80%,医药 10%,农药 5%~10%,其他方面很少<sup>[1]</sup>。环糊精的工业化生

产均采用酶法合成,即在 CGT 酶催化作用下,通过环化反应转化淀粉及相关基质合成环糊精。虽然本实验室前期已将 CGT 酶在大肠杆菌中表达,但是为了满足食品工业的需求,本研究从世界公认的食品工业安全宿主菌(GRAS)出发,考虑选择酵母和枯草杆菌这两种工业上常用的基因工程宿主菌来表达 CGT 酶。

外源基因在酵母中能分泌表达且可进行高密度培养,并且基因是整合到染色体 DNA 上,所以其稳定性较好。但是,外源基因在酵母中表达存在密码子偏爱性,偏爱性不好,表达量低,同时还可能会因为各种原因而不表达。本研究通过日本 Kazusa DNA 研究所提供的网站(<http://www.kazusa.or.jp/>)对 *cgt* 密码子在毕赤酵母中的使用频率进行了分析,计算出毕赤酵母低频率使用密码子在该基因中所占比例为 20%,表明密码子偏爱性较差。此外,从氨基酸水平上分析,运用糖基化位点预测软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)发现 *P. macerans*  $\alpha$ -CGT 酶氨基酸序列中存在 9 个潜在的 N-糖基化位点, Blast 同源性分析表明这些糖基化位点在 CGT 酶家族中高度保守(图 4)。以来源于 *Bacillus circulans* 251 的 CGT 酶(与本研究蛋白同源性是 68.367%)的三维结构为模板,根据 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)网站进行晶体结构分子模拟得到 *P. macerans*  $\alpha$ -CGT 酶空间结构模型,如图 5 所示,该酶由 A、B、C、D、E 五个结构域组成,9 个潜在的糖基化位点分布于这 5 个结构域,并且有些在分子表面,有些在分子内部,因此这些糖基化位点可能会影响到酶与底物的结合。这些分析结果表明 CGT 酶可能不适宜在酵母中表达。这种可能性在本实验结果中得到了验证。本研究将 CGT 酶基因克隆到酵母表达载体 pPIC9K 并转化毕赤酵母 KM71,结果发酵液中只能检测到少许酶活,电泳结果没有发现目的蛋白。究竟是密码子不偏爱、糖基化还是其他原因造成 CGT 酶在酵母中表达量低还需要进一步的实验验证。

与酵母相比,枯草杆菌无明显密码子偏爱性,不会发生糖基化,并且 *B. subtilis* 具有单层细胞膜组成的较简单的细胞外壳,分泌蛋白可直接释放到培

P04830			60
AAC04359	SPDTSVDNKVNFST	TDVIYQIVTDRFADGDR	TNNPAGDAFSGDRSNL
ACB71089	SPDTSVDNKVNFST	TDVIYQIVTDRFADGDR	TNNPAGDAFSGDRSNL
P31835	SPDTSVDNKVNFST	TDVIYQIVTDRFADGDR	TNNPAGDAFSGDRSNL
	SPDTSVNNKLNFS	TDVYQIVTDRFVDGNS	ANNPTGAAFSSDHSNL
	*****:	*****:	*****:
P04830			120
AAC04359	INDGYLTGMGVTAL	WISQPVENITSVIKYSG	VNNTSYHGYWARDFKQ
ACB71089	INDGYLTGMGVTAL	WISQPVENITSVIKYSG	VNNTSYHGYWARDFKQ
P31835	INDGYLTGMGVTAL	WISQPVENITAVINYS	GVNNTAYHGYWRDFK
	INDGYLTGMGITAL	WISQPVENITAVINYS	GVNNTAYHGYWRDFK
	*****:	*****:	*****:
P04830			180
AAC04359	LIDTAHAHNKVV	IDFAPNHTSPADRD	NPFGAENGALYDNGS
ACB71089	LIDTAHAHNKVV	IDFAPNHTSPADRD	NPFGAENGALYDNGS
P31835	LIDTLTITSRDL	RPQPHVSGRAGTNP	GFAENGALYDNGS
	LIAAAHSHNIK	VVMDFAPNHTNPAS	TDPSFAENGALYD
	** :	.	.. *.. :*
...			
P04830	SFVSSIYGGDHP	VFTFGEWYLGADQ	TGDNKIFANESGMN
AAC04359	SFVSSIYGGDHP	VFTFGEWYLGADQ	TGDNKIFANESGMN
ACB71089	SFVSSIYGGDHP	VFTFGEWYLGADQ	TGDNKIFANESGMN
P31835	SYVSSIYSSANP	VFTFGEWFLGPEM	TQDNINFANQSGM
	*****:	*****:	*****:
...			
P04830	I IERKFSSAAL	VAINRNSAAYPI	SGLLSSLPAGTYS
AAC04359	I IERKFSSAAL	VAINRNSAAYPI	SGLLSSLPAGTYS
ACB71089	I IERKFSSAAL	VAINRNSAAYPI	SGLLSSLPAGTYS
P31835	VYERKFGSNVAL	VAVNRSSITAYPI	ISGALTALPNGTY
	: *****:	*****:	*****:
...			
P04830	FTLAAGGTAVW	QYTAPETSPAIGN	VGPTMGQPGNIVT
AAC04359	FTLAAGGTAVW	QYTAPETSPAIGN	VGPTMGQPGNIVT
ACB71089	FTLAAGGTAVW	QYTAPETSPAIGN	VGPTMGQPGNIVT
P31835	FTLAAGGTAVW	QYTTTESSPII	GNVGPTMGKPGNT
	*****:	*****:	*****:
...			
P04830	VTWEGGNHTY	TPASGVGT	VTVDWQN 687
AAC04359	VTWEGGNHTY	TPASGVGT	VTVDWQN 687
ACB71089	VTWEGGNHTY	TPSSGVAT	VTVDWQN 687
P31835	*****:	*****:	*****:

图 4  $\alpha$ -CGT 酶的多重序列比对

Fig. 4 Multiple alignment of amino acid sequences of  $\alpha$ -CGTases. P04830, AAC04359, ACB71089, P31835 indicate the aa sequences of  $\alpha$ -CGTase from *P. macerans* JFB05-01, *Paenibacillus macerans* strain IFO3490, *Paenibacillus* sp. JB-13, *Bacillus macerans*, respectively. Boxes indicate the potential N-glycosylation site.

培养基中。本研究构建了 *P. macerans*  $\alpha$ -CGT 酶枯草杆菌表达系统。由于采用的是组成型质粒, 所以产酶不需要诱导; 将  $\alpha$ -CGT 酶基因及其自身信号肽一并克隆到表达质粒 pMA5 上, 转化 *B. subtilis* WB600,

获得了胞外产  $\alpha$ -CGT 酶的基因工程菌株。将重组菌以 TB 为培养基, 初始 pH 6.5, 37°C 恒温培养 24 h 后, 测得发酵上清液酶环化活力 4.5 U/mL(水解活性 3200 IU/mL), 是野生菌产酶的 9.8 倍。对重组菌发

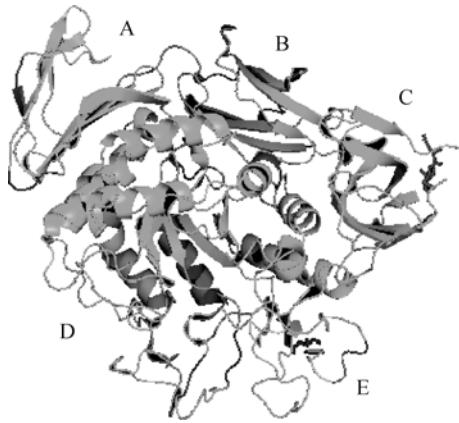


图 5 *P. macerans*  $\alpha$ -CGT 酶的模拟三维结构

Fig. 5 Simulated three dimensional structure of *P. macerans*  $\alpha$ -CGTase. Red areas indicate the potential N-glycosylation site.

酵条件的进一步优化, 可提高其产酶量, 以满足食品工业的需求。

## REFERENCES

- [1] Chen J, Wu J, Li ZF, *et al.* Gamma-cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **77**(2): 245–255.
- [2] Tonkova A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb Tech*, 1998, **22**(8): 678–686.
- [3] Nam SW, Park HY, Kim JH, *et al.* Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**(9): 727–730.
- [4] Lee KW, Shin HD, Lee YH. Extracellular overproduction of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase in a recombinant *E. coli* using secretive expression system. *J Microbiol Biotechnol*, 2002, **12**(5): 753–759.
- [5] Kim MH, Lee JK, Kim HK, *et al.* Overexpression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* in *Escherichia coli* by control of temperature and mannitol concentration. *Biotechnol Tech*, 1999, **13**(11): 765–770.
- [6] Wong SL. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**(5): 517–522.
- [7] Lidia W, Helga W, Wim JQ. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1694**(1-3): 299–310.
- [8] Marja P, Dan H, Sirpa A, *et al.* Production of cyclomalto-dextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 in *B. subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**(5): 584–591.
- [9] Kyeong-A S, Akira N, Haruhiko M, *et al.* Extracellular production of *Bacillus ohbensis* cyclodextrin glucanotransferase by *B. subtilis*. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, **57**(2): 346–347.
- [10] Cheng C, Li ZF, Li B, *et al.* Production of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biol Eng*, 2009, **7**(3): 57–62.  
成成, 李兆丰, 李彬, 等. 利用重组大肠杆菌生产  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶. *生物加工过程*, 2009, **7**(3): 57–62.
- [11] Chen J, Wu J, Li ZF, *et al.* Cloning and expression of a kind of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase gene: CN patent, 101294149. 2008-10-29.  
陈坚, 吴敬, 李兆丰, 等. 一种  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆与表达: 中国专利, 101294149. 2008-10-29.
- [12] Wang Y, Hua ZZ, Liu LM. High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(4): 635–639.  
王芸, 华兆哲, 刘立明. 重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略. *生物工程学报*, 2008, **24**(4): 635–639.
- [13] Dartois V, Coppee JY, Coison C, *et al.* Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(5): 1670–1673.
- [14] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, **44**(10): 1072–1078.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [16] Wang YP, Tan ZF, Duan YX, *et al.* Fermentation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. HA-1. *Food Ferment Ind*, 2006, **32**(2): 12–15.  
王雁萍, 谈重芳, 段宇珩, 等. *Bacillus* sp. HA-1 产环糊精葡萄糖基转移酶发酵工艺研究. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(2): 12–15.
- [17] Lejeune A, Sakaguchi K, Imanaka T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal Biochem*, 1989, **181**(1): 6–11.
- [18] Li ZF, Zhang JY, Wang M, *et al.* Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing  $\alpha$ -cyclodextrin specificity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**(3): 483–490.