



专论与综述

环糊精葡萄糖基转移酶高效异源表达研究进展

李晓涵² 郝建华^{*1,3} 郭姣梅² 王伟¹ 孙晶晶¹ 刘均忠¹

1 农业农村部极地渔业开发重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071

2 上海海洋大学食品学院 上海 201306

3 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 江苏 连云港 222005

摘要: 环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)酶法合成环糊精是目前生产环糊精的主要方法。本文介绍了用于生产环糊精葡萄糖基转移酶的几种工程菌株: 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌以及毕赤酵母, 其中大肠杆菌是目前应用最广泛的用于表达 CGTase 的表达系统。除此之外, 本文还总结了高效表达环糊精葡萄糖基转移酶的有效策略: 选择合适的表达载体、启动子以及信号肽, 以及密码子优化和分子伴侣共表达, 以期在相关 CGTase 研究领域开展研究提供参考。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶, 大肠杆菌, 枯草芽孢杆菌, 酵母, 异源表达, 策略

Advance in high-level heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase

LI Xiao-Han² HAO Jian-Hua^{*1,3} GUO Jiao-Mei² WANG Wei¹ SUN Jing-Jing¹
LIU Jun-Zhong¹

1 Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, Shandong 266071, China

2 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Jiangsu Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resource, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

Abstract: The cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) are enzymes that used to synthesize cyclodextrin, and this method of production of cyclodextrin is mostly used at present. We described several engineering strains which were used to produce CGTase including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pichia pastoris*, and the expression system of *E. coli* is one of the most widely used. In addition, we also summarized the effective strategies for high efficient expression of CGTase including

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311106); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD67); Major Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Province (2019GHY112030); Science and Technology Development Plan of Southern District of Qingdao (2018-4-002-ZH)

***Corresponding author:** Tel: 86-532-85841193; E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

Received: 08-04-2019; **Accepted:** 13-06-2019; **Published online:** 10-07-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0311106); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2020TD67); 山东省重点研发计划(2019GHY112030); 青岛市市南区科技发展规划(2018-4-002-ZH)

***通信作者:** Tel: 0532-85841193; E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-04-08; **接受日期:** 2019-06-13; **网络首发日期:** 2019-07-10

appropriate expression vector, promoter and signal peptide, codon optimization, co-expression with molecular chaperone. The purpose of this review is to provide a reference for relevant research of CGTase.

Keywords: Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Yeast, Heterologous expression, Strategy

环糊精(cyclodextrin, CD)是一类环状低聚糖,由多个D-吡喃葡萄糖单元通过 α -1,4糖苷键连接起来而组成。常见的环糊精包括 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精,分别由6、7和8个葡萄糖单元组成。CD分子具有外部亲水性和内部疏水性,可以容纳疏水性分子或基团形成包合物,并且可以改变被包埋物的理化性质,如挥发性、溶解度及化学反应性能等。目前环糊精已经广泛应用于食品、药品、化妆品、纺织和生物技术等众多领域。

酶法合成是工业生产环糊精的主要方法,即以淀粉或相关基质作为底物,利用环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)的环化反应合成环糊精。由于能够产生CGTase的天然菌株一般具有相对严格的调控机制,导致CGTase的产量低、成本高且产物特异性差^[1]。因此通常使用基因工程的方法构建CGTase基因重组载体,通过蛋白质的异源表达实现重组酶的高效表达。一般选用的宿主菌为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母。

1 CGTase的异源表达

1.1 CGTase在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌是常用于生产重组蛋白的宿主之一,与其他原核表达系统相比,大肠杆菌因其遗传背景清楚、繁殖快、成本低、操作简便、可大规模高密度发酵培养等优点被广泛应用于外源蛋白表达研究。

Hao等^[2]将原始菌株Y-112中的目的基因cgt在大肠杆菌BL21中表达,通过优化诱导条件获得可溶性且活性较高的重组蛋白。环化反应是CGTase催化的特征反应,是催化直线型淀粉低聚糖链生产环糊精的一种分子内的转糖基反应。环

化活力的一个酶活单位(U)通常定义为在最适反应条件下每分钟生成1 μ mol环糊精所需的酶量。比活力用每毫克蛋白所含的酶活力单位数表示(U/mg)。Yang等^[3]构建重组质粒pET28b(+)-CGTase在大肠杆菌BL21中表达,通过优化培养基成分及诱导条件, α -CGTase的环化活力提高了2.1倍。在最佳发酵条件下尝试500 L发酵罐发酵, α -环化活力达到45.2 U/L。郭永华等^[4]通过易错PCR随机突变来源于嗜热脂肪芽孢杆菌CHB1的CGTase,得到突变体ep-9在大肠杆菌BL21(DE3)中表达,突变株的总环化比活力比原始酶提高了34%,并且在pH稳定性方面较原始酶有所提高。Li等^[5]用大肠杆菌BL21表达来源于*Paenibacillus macerans* JFB05-01的 α -CGTase,并通过两段控温诱导(25 $^{\circ}$ C诱导32 h,然后30 $^{\circ}$ C诱导58 h)提高CGTase的表达效率,胞外 α -CGTase活性比在25 $^{\circ}$ C恒定温度下进行诱导时的活性高45%。该实验使用荧光探针N-苯- α 萘胺(NPN)评估大肠杆菌外膜的渗透性,用比色探针邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)评估内膜的渗透性,证明诱导温度从25 $^{\circ}$ C变为30 $^{\circ}$ C导致两种膜的渗透性明显增加,促进了CGTase胞外分泌。从目前的研究情况来看,大肠杆菌是表达异源CGT酶最有效及最常用的宿主细胞。利用*E. coli*过量表达CGTase有利于其大规模生产,对降低环糊精的生产成本起到了巨大的推动作用。

1.2 CGTase在枯草芽孢杆菌中的表达

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)表达CGTase与大肠杆菌相比具有一定的优势。首先枯草芽孢杆菌是良好的分泌型宿主,可以实现重组蛋白的胞外分泌,不会形成不溶性的包涵体;其次枯草芽孢杆菌的细胞壁不含内毒素,是非致病性的土壤微

生物, 被美国授予 GRAS (generally recognized as safe) 等级, 具有更高的安全性, 因此更适用于 CGTase 在食品领域的生产和应用。

Paloheimo 等^[6]构建了含有 α -淀粉酶启动子和信号序列以及 *cgt* 基因的质粒 pALK156, 在枯草芽孢杆菌 ALKO2189 中进行表达, 通过发酵罐发酵得到产酶量 1.2 g/L, 是原始菌株嗜碱性芽孢杆菌 ATCC21783 产酶量的 33 倍。Sin 等^[7]以 pUP110Ce 为载体, 将来源于 *Bacillus ohbensis* 的 CGTase 基因表达于 *B. subtilis* 中, 测得水解活性为 30 U/mL。唐上华等^[8]将来源于嗜碱性芽孢杆菌 N-227 的 β -CGTase 基因整合到枯草芽孢杆菌 1A289 的染色体上, 通过反复地随机整合, 得到一株遗传稳定的整合型基因工程菌株 BS16-7-7, 其产 β -CGTase 的环化活力达到 13 000 U/mL。

虽然用枯草芽孢杆菌作为宿主菌表达 CGTase 的安全性更高, 而且可以实现胞外表达, 但与大肠杆菌表达系统比较, 枯草芽孢杆菌表达系统还不是很成熟。在进一步发展和完善枯草芽孢杆菌表达系统过程中, 势必要不断完善和扩大枯草芽孢杆菌载体系统和宿主系统^[9]。探索更加适合 CGTase 在枯草芽孢杆菌中高效表达的载体和信号肽, 建立适用于枯草芽孢杆菌的分子伴侣与目标蛋白共表达体系是实现枯草芽孢杆菌工业化生产 CGTase 所努力的方向。

1.3 CGTase 在酵母中的表达

相比于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌这类传统的原核表达系统, 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)具有以下优势: (1) 蛋白表达量高。*P. pastoris* 甲醇代谢启动子 AOX1 是目前已知最有效的启动子之一, 通过甲醇的充分诱导, AOX1 的转录产物可以达到整个细胞转录产物的 30% 以上。(2) 分泌效率高。外源蛋白在毕赤酵母中的分泌不易形成包涵体。(3) 更好的后加工处理能力。*P. pastoris* 的真核表达系统能够为外源蛋白的折叠修饰及后处理提供较合适的环境和条件。(4) 稳定性好。外源基因能以同源

重组的方式整合到毕赤酵母基因组中, 不需要抗生素的筛选即能自行保持稳定^[10]。(5) 易于目的蛋白的分离纯化。与其他表达系统相比, *P. pastoris* 系统分泌出的自身蛋白非常少, 这就有利于后期的蛋白分离纯化。

目前 *P. pastoris* 常用的表达系统主要包括两种: 诱导型和组成型。Kabacaoğlu 等^[11]将来源于 *Bacillus* sp. SD5 中的 CGTase 基因在 *Pichia pastoris* X33 中用甲醇诱导胞外表达, 经过纯化后酶的环化活力为 13.92 U/mL。陈龙军等^[12]利用酵母 pGAP 启动子成功实现了 CGTase 在 *P. pastoris* X-33 中的组成型表达, 并通过优化发酵条件(pH 6.5, 温度 28 °C, 甘油添加量 2.5%/24 h, 发酵 120 h)使酶环化活力达到 0.36 U/mL, 是优化前的 1.7 倍。

毕赤酵母目前已是仅次于大肠杆菌的最常用蛋白表达系统, 已有数千种蛋白通过毕赤酵母表达系统成功表达。近年来, 毕赤酵母也已被美国 FDA 认定为 GRAS, 这有利于 CGTase 更好地应用于食品领域。

2 CGTase 高效异源表达策略

2.1 表达载体及启动子

为提高异源蛋白的产量, 在大肠杆菌中开发了大量的表达载体, 载体上的启动子对于异源蛋白表达起着关键的作用。目前基于 T7 启动子的 pET 表达系统是大肠杆菌中最常用的载体系统, 但利用 T7 启动子可能会因为蛋白表达率过高形成大量包涵体^[13]。因此 Deng 等^[14]研究了启动子 T7、trp、lacUV5 以及杂合启动子 tacI、tacII 对 CGTase 表达的影响, 旨在找到一个更合适的启动子来表达 CGTase, 其中 tacI 表现出最高的转录活性, 在对 tacI 启动子间隔序列进行优化后, 细胞外 CGTase 歧化活性达到 170.6 U/mL, 是原始菌株歧化活性(25.2 U/mL)的 7 倍。

目前大肠杆菌异源表达目的蛋白选用的启动子多为可控制表达, 通过 IPTG 诱导表达或温度控制。实验室多用 IPTG 进行诱导表达, 多项研究表

明降低 IPTG 诱导温度有利于 CGTase 的可溶性表达^[15-18]。虽然 IPTG 诱导是目前最常用的诱导方式,但是 IPTG 有毒且价格昂贵,因此存在着局限性,不利于工业化生产。相比 IPTG,乳糖作为一种易被菌体代谢吸收的诱导剂,无毒、价格低廉、诱导条件温和、诱导表达的蛋白可溶性好,国内外已有多种工程菌菌株应用乳糖培养基发酵使目的蛋白得到高效表达。林晓栩等^[19]分别用乳糖与 IPTG 诱导表达来源于 *Geobacillus* CHB1 的重组高温 CGTase,发现乳糖诱导的胞外酶活性较高,表明乳糖诱导更利于重组 CGTase 的可溶性表达。在诱导起始菌浓度 OD_{600} 为 1.4 的条件下,加入 0.5% 的乳糖 25 °C 诱导,经过初步优化,CGTase 总环化活力最高可达 21.35 U/mL,胞外酶的环化活力达到 19.87 U/mL。

在枯草芽孢杆菌表达系统中,表达质粒主链对基因表达效率有直接影响。李才明等^[20]构建分泌型表达载体 cgt/pST,在枯草芽孢杆菌 WB600 中成功表达了 β -CGTase,之后又通过摇瓶发酵条件优化及添加亮氨酸、天冬氨酸及 Fe^{3+} ,将胞外环化酶活提高到 36.9 U/mL。这是目前报道的 β -CGTase 在枯草芽孢杆菌中胞外表达的最高 β -环化活力。启动子是实现枯草芽孢杆菌外源基因高效表达的关键。为了实现外源蛋白质在枯草芽孢杆菌的高水平分泌表达,研究人员在启动子筛选方面进行了多次尝试,许多研究表明双启动子可以显著提高异源基因的表达水平。Yang 等^[21]利用启动子陷阱技术在地衣芽孢杆菌基因组 DNA 中筛选到一种包含一个杂合启动子和 *PluxS* 的双启动子,有望在枯草芽孢杆菌中高效表达异源蛋白。Zhang 等^[22]通过优化启动子在 *B. subtilis* CCTCC M2016536 中高效表达 β -CGTase,筛选出表达 CGTase 活力较高的 6 个启动子 P_{srf} 、 P_{xyl} 、 P_{gsiB} 、 P_{HpaII} 、 $P_{amyQ'}$ 、 P_{nprE} ,分别与表达酶活最高的启动子 P_{amyQ} 构建了 6 种双启动子。结果表明双启动子 P_{HpaII} - P_{amyQ} 产生最高的细胞外 β -CGTase 活性(30.5 U/mL),并通过 3 L 发酵罐发酵使胞外 β -CGTase 活性达到 571.2 U/mL。

醇氧化酶基因的启动子 P_{AOX1} 是毕赤酵母表达系统中最常用的启动子,尤其在 *P. pastoris* 的大规模、高密度发酵培养中应用广泛,已实现了多种外源蛋白的高效表达。 P_{AOX1} 属于诱导型启动子,需要甲醇做诱导剂来启动基因表达,而甲醇易燃、易挥发、有毒等特性限制了 P_{AOX1} 的广泛应用^[23]。Zhang 等^[24]以 pPIC9K 为表达载体,将来源于 *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB 的 CGTase 基因导入 *Komagataella phaffii*,通过密码子优化和发酵条件优化(温度 28 °C,接种量 6%,甲醇添加量 1.5%)得到酶的最大环化活力 3 885.1 U/mL。这是到目前为止以酵母表达 CGTase 酶活报道的最大值。

2.2 信号肽

由于大肠杆菌一般将重组蛋白分泌在胞内,这样会使重组蛋白不能正确折叠或被降解而失去活性,并使目的蛋白的提取和纯化过程变得复杂。因此,通过利用高匹配度的信号肽引导重组蛋白胞外分泌是提高目的蛋白高效异源表达的有效策略。文献报道利用信号肽可以成功实现外源重组蛋白在大肠杆菌中的分泌表达^[25]。信号肽首先介导目的蛋白跨过内膜转运到周质空间,然后通过非特异性渗漏或培养基添加剂等方法促进周质中的蛋白释放到胞外培养基中,实现蛋白的胞外分泌。*OmpA*^[26]、*PelB* 是目前大肠杆菌异源表达常用的信号肽,除此之外一些新型高效的信号肽不断被研究发现。

Sonnendecker 等^[27]比较了大肠杆菌信号肽 *PelB*、*DacD* 和野生菌株 G825-6 自身的信号肽 G825-6 CGTase SP 对重组 CGTase 胞外分泌的影响,结果显示 *DacD* 与其他两种信号肽相比不仅能够最高效地促进 CGTase 胞外分泌,还能提高总酶活。Ismail 等^[28]研究了信号肽定点突变对重组环糊精酶在大肠杆菌中分泌表达的影响,结果表明调整信号肽氨基酸组成可以促进重组 CGTase 分泌到周质及培养基,减少包涵体数量,并且可以减少细胞裂解,推测原因是因为突变信号肽 N 端带正电荷的氨基酸与细胞质膜阴离子磷脂的互相作用可

以增加分泌效率。Jonet 等^[29]突变 *Bacillus* sp. G1 自身天然信号肽获得信号肽 M5 引导来源于 *Bacillus* sp. G1 的 CGTase 在大肠杆菌表达。与大肠杆菌自身信号肽相比, 胞外 CGTase 分泌量提高了 1.9 倍, 且细胞裂解量少。随后该团队 Ling 等^[30]从 *Bacillus lehensis* G1 的细胞外蛋白中筛选出 14 种信号肽与 CGTase 融合, 实验证明 14 种信号肽都能引导 CGTase 分泌到胞外培养基。其中 GlcNAc-binding protein A (GAP) 效果最好, 与天然信号肽 G1 相比, 细胞外和周质的 CGTase 环化活性分别提高了 735% 和 205%, 细胞裂解量只增加了约 1.7 倍。

与大肠杆菌实现胞外分泌需要穿过两层膜不同, 枯草芽孢杆菌只需要穿过一层细胞膜即可实现蛋白的胞外分泌。因此, 芽孢杆菌是生产外源蛋白的理想宿主, 但是由于分泌途径中的瓶颈, 导致产量不尽如人意, 而信号肽的作用是能够保证分泌蛋白质的正确定位和转移。周勇等^[31]对枯草芽孢杆菌体系中 Sec 和 Tat 这两个主要分泌途径的信号肽进行了筛选, 结果显示 Tat 途径中的 phoD 信号肽分泌效果明显优于其他信号肽。总体而言, 目前枯草芽孢杆菌分泌表达 CGTase 研究报道中所选用的信号肽种类较少, 也未见有系统性研究信号肽结构对 CGTase 胞外分泌效果影响的报道。

对于通常用于酵母的分泌表达载体, 可用于选择的信号肽一般分为两类: 酵母自身的信号肽和基因本身的信号肽。最常用和最有效的信号肽是 α 因子前导肽。尽管外源基因的信号肽本身可介导目的蛋白的分泌, 但已显示自身信号肽可优于外源蛋白信号肽序列^[32]。张燕等^[33]分别利用带有 α 分泌信号肽的质粒 pPICZaA-cgt、pPIC9k-cgt 与带有自身信号肽的质粒 pPICZA-sig-cgt 在毕赤酵母胞外表达 CGTase, 结果显示利用 CGTase 自身信号肽能够将 CGTase 分泌至胞外, 但利用酵母表达载体上的信号肽分泌表达效果更佳, 胞外表达酶活高于不带信号肽的胞内表达, 且实验操作更

简便。

2.3 密码子优化

过去很长一段时间, 人们一直认为同义密码子取代是无关紧要的。但是研究证明, 即使一个同义密码子的替换也可能会影响基因的表达水平、蛋白质的折叠以及蛋白质结构及功能的改变^[34]。由于产生 CGTase 的天然菌株与表达宿主菌具有种属差异, CGTase 在宿主菌表达一般在一定程度上受到相应 tRNA 匮乏的不利影响。密码子优化就是在保证不改变 CGTase 氨基酸序列的基础上将酶基因的密码子优化为表达宿主菌偏好型。经研究^[17,35-36]证明, 该方法能大幅度提高外源蛋白的表达量。

Liu 等^[35]用优化后的培养条件同时表达经过密码子优化的 *coa-cgt* 和野生型 *wta-cgt*, 通过 3 L 发酵罐发酵, 培养 27 h 胞外 CGTase 酶活达到最大, 与野生型酶基因 *wta-cgt* 表达(环化活力 14.6 U/mL)相比, 密码子优化基因(环化活力 47.55 U/mL)的分泌水平增加了 226%, 该实验证明了密码子优化是提高 α -CGTase 酶活经济有效的方法。Jiang 等^[36]将来源于 *Paenibacillus macerans* 的 CGTase 基因进行密码子优化后导入质粒 pET-28a(+)并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, 与未优化的野生酶基因表达相比, 明显缩短了发酵时间。王琰等^[17]对 *Bacillus clarkii* 7364 来源的 γ -CGTase 按照大肠杆菌偏爱密码子进行优化, 构建了工程菌株 pET22b(+)- γ -CGTase/*E. coli* BL21(DE3), 通过在 28 °C 低温条件下诱导实现了 γ -CGTase 的高效可溶性表达, 结果显示该酶催化产物中 γ -环糊精的比例高达 90.9%, 与天然酶的 79% 相比提高了 15%。

外源基因中(G+C)mol% 含量过高或过低都会对其转录产生显著影响, 进而影响其空间折叠、翻译以及胞内降解, 最终影响蛋白的表达。研究表明适合在毕赤酵母表达的基因(G+C)mol% 含量应在 40%–50% 的范围内^[10]。张燕等^[33]通过将 CGTase 基因中的中低偏爱性密码子替换为酵母高偏爱性密码子, 并将序列(G+C)mol% 含量从 37%

提升到 39%。将来源于 *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB 菌株的 γ -CGTase 在毕赤酵母中高效表达, 环化活力达到了 83.65 U/mL, 是野生菌活力的 39.3 倍, 是大肠杆菌表达活力的 8.7 倍^[33]。通过密码子优化提高异源蛋白表达量的研究近年来有不少报道^[37-39], 这些研究结果都表明密码子优化能够有效提高异源蛋白的表达量。随着基因技术的飞速发展, 密码子优化成为一种获取异源基因的表达最为简洁有效的方式。

2.4 分子伴侣共表达

在大肠杆菌中表达的 CGTase 因不能正确折叠形成天然构型, 所以易聚集形成没有活性的包涵体, 研究表明分子伴侣和折叠酶作为共表达的折叠辅助蛋白, 可以在一定程度上增加异源蛋白的可溶性表达。截至目前, 分子伴侣触发因子(trigger factor, TF)、肽基脯氨酸顺反异构酶(peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, PPIase)、伴侣蛋白 GroEL/ES 和热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)中的 Hsp70 (DnaK-DnaJ-GrpE)等已经被报道有助于不同重组蛋白的蛋白质折叠活性。

郭永华等^[40]构建了 5 种分子伴侣共表达系统 pKJE7、pKJE8、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 共表达重组质粒 pET-28a(+)-ompA-*cgt*, 结果表明目的蛋白的可溶性表达量均有不同程度的提高, 其中能同时表达 3 种分子伴侣蛋白(DnaK-DnaJ-GrpE、GroEL-GroES 和 TF)的 pKJE8 共表达效果最为明显, 且在 25 °C、0.50 g/L L-阿拉伯糖诱导条件下胞外酶环化活力达到最大 11.2 U/mL。

3 结语

近年来, 随着分子生物学研究的深入, 基因改造和异源表达技术日趋成熟。与此同时, 商业上对于环糊精的生产也提出了更高的要求, 利用 CGTase 的转糖基功能转化抗坏血酸(Vc)生成性质更加稳定的 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基抗坏血酸(AA-2G)是目前环糊精酶应用的研究热点。通过研究高效高产的 CGTase 可以降低该应用的生产成本, 得到纯度更

高的 AA-2G, 因此 CGTase 生产技术的创新对于满足环糊精的生产需求至关重要。本文介绍的用于异源表达 CGTase 的不同种类工程菌以及有利于 CGTase 高效表达的各种策略表明, 目前对于 CGTase 的表达研究已经取得了一些成果, 但是表达体系和策略没有普遍适用性, 重组 CGTase 的胞外生产强度普遍较低和产物特异性差等问题仍然限制着 CGTase 的工业生产应用, 研究更加高效及具有良好产物特异性的重组 CGTase 仍然任重道远。

REFERENCES

- [1] Chen XT, Huang LP, Sun JJ, et al. Production and characterization of a new α -cyclodextrin glycosyltransferase from a marine strain of *Bacillus* sp. Y112[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2017, 11(3): 236-241
- [2] Hao JH, Huang LP, Chen XT, et al. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by strain Y112[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 140: 8-15
- [3] Yang YN, Shan WX, Wang PW, et al. Upscale production of a recombinant cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli*[J]. 3 Biotech, 2017, 7(3): 207
- [4] Guo YH, Chen JC, Jia XB, et al. Improving soluble expression of *Geobacillus* sp. B1 CGTase by errorprone PCR[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(10): 1551-1560 (in Chinese)
郭永华, 陈济琛, 贾宪波, 等. 应用易错 PCR 技术提高环糊精葡萄糖基转移酶的可溶性表达[J]. 微生物学报, 2016, 56(10): 1551-1560
- [5] Li Y, Liu J, Wang YL, et al. A two-stage temperature control strategy enhances extracellular secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase in *Escherichia coli*[J]. AMB Express, 2017, 7: 165
- [6] Paloheimo M, Haglund D, Aho S, et al. Production of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 in *B. subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 36(5): 584-591
- [7] Sin KA, Nakamura A, Masaki H, et al. Extracellular production of *Bacillus ohbensis* cyclodextrin glucanotransferase by *B. subtilis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(2): 346-347
- [8] Tang SH, Wang L, Zhou XY, et al. Expression of integrated β -cyclodextrin glucanotransferase gene in genome of *B. subtilis*[J]. Industrial Microbiology, 1995, 25(1): 1-4 (in Chinese)
唐上华, 王磊, 周新宇, 等. 嗜碱性芽孢杆菌 N-227 环状糊精葡萄糖基转移酶基因在枯草杆菌中的整合表达[J]. 工业

微生物, 1995, 25(1): 1-4

- [9] Yu XX, Tian J, Liu XQ, et al. Research progress of *Bacillus subtilis* expression system and its promoter regulatory elements[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(2): 35-44 (in Chinese)
余小霞, 田健, 刘晓青, 等. 枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 35-44
- [10] Zhu W, Hu YJ, Xie LP, et al. Related strategies and research progress of efficient expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2018, 49(4): 417-425 (in Chinese)
朱文, 胡又佳, 谢丽萍, 等. 毕赤酵母高效表达外源蛋白的相关策略及研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(4): 417-425
- [11] Kabacaoglu E, Budak BK. Heterologous expression of β - γ -type cyclodextrin glycosyltransferase of newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. SD5 in *Pichia pastoris*[J]. Starch, 2017, 69(9/10): 1600365
- [12] Chen LJ, Chen JC, Lin XJ, et al. Constitutive expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(1): 82-86 (in Chinese)
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
- [13] Han RZ, Liu L, Shin HD, et al. Site-saturation engineering of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* to enhance substrate specificity towards maltodextrin for enzymatic synthesis of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(13): 5851-5860
- [14] Deng C, Li JH, Shin HD, et al. Efficient expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* by promoter engineering and downstream box evolution[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 266: 77-83
- [15] Wang Y, Li J, Yang GW, et al. Study of soluble expression in *Escherichia coli* of α -cyclodextrin glycosyl transferase produced by *Paenibacillus macerans* and properties of its derivatives[J]. China Food Additives, 2017(2): 81-86 (in Chinese)
王琰, 李皎, 杨国武, 等. 多黏芽孢杆菌产 α -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的可溶性表达及其转化产物特异性研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(2): 81-86
- [16] Shen EH, Li XQ, Wu HW. Cloning, expression and characterization of recombinant β -cyclodextrin glucosyltransferase[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(11): 77-81 (in Chinese)
谌恩华, 李相前, 吴华伟. β -环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆、表达及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 77-81
- [17] Wang Y, Wan Y, Li J, et al. Expression and characterization of a recombinant γ -cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus clarkii* 7364[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(2): 7-12 (in Chinese)
王琰, 万一, 李皎, 等. *Bacillus clarkii* 7364 γ -环糊精葡萄糖基转移酶的可溶性表达及其催化特性分析[J]. 生物加工过程, 2017, 15(2): 7-12
- [18] Guo YH. Molecular modification of the thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016: 67 (in Chinese)
郭永华. 嗜热环糊精葡萄糖基转移酶的分子改造[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2016: 67
- [19] Lin XX, Lin XJ, Qiu HD, et al. Expression of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) gene in recombinant *Escherichia coli* induced by lactose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(17): 114-120, 126 (in Chinese)
林晓栩, 林新坚, 邱宏端, 等. 乳糖诱导对重组大肠杆菌表达 CGTase 的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 114-120, 126
- [20] Li CM, Huang M, Shi JZ, et al. Enhancing the extracellular expression of β -CGTase from *Bacillus circulans* STB01 by metal ions and amino acids[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(7): 1-8 (in Chinese)
李才明, 黄敏, 石建中, 等. 金属离子协同氨基酸提高重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 1-8
- [21] Yang MM, Zhang WW, Ji SY, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56321
- [22] Zhang K, Su LQ, Duan XG, et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 32
- [23] Shi YC, Wang FZ, Jiang JP, et al. Screening and identification of constitutive promoter for high-level expression in *Pichia pastoris*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13): 110-116 (in Chinese)
石义超, 王凤忠, 江均平, 等. 毕赤酵母组成型高效表达启动子的筛选鉴定[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 110-116
- [24] Zhang JG, Zhang Y, Li ML. High-level secretion and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Komagataella phaffii*[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 259: 126-134
- [25] Li B, Wang L, Su LQ, et al. Glycine and Triton X-100 enhanced secretion of recombinant α -CGTase mediated by OmpA signal peptide in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology

- and Bioprocess Engineering, 2012, 17(6): 1128-1134
- [26] Cheng J, Wu D, Chen S, et al. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8): 3797-3802
- [27] Sonnendecker C, Wei R, Kurze E, et al. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus* cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16: 87
- [28] Ismail NF, Hamdan S, Mahadi NM, et al. A mutant L-asparaginase II signal peptide improves the secretion of recombinant cyclodextrin glucanotransferase and the viability of *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(5): 999-1005
- [29] Jonet MA, Mahadi NM, Murad AMA, et al. Optimization of a heterologous signal peptide by site-directed mutagenesis for improved secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(1): 48-58
- [30] Ling HL, Rahmat Z, Murad AMA. Proteome-based identification of signal peptides for improved secretion of recombinant cyclomaltodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2017, 61: 47-55
- [31] Zhou Y, Xu G, Yang LR, et al. Effects of signal peptides's optimization on the secretion of lipase S in *Bacillus subtilis*[J]. China Biotechnology, 2015, 35(9): 42-49 (in Chinese)
周勇, 徐刚, 杨立荣, 等. 信号肽优化在枯草芽孢杆菌体系中对脂肪酶 LipS 分泌表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9): 42-49
- [32] Lou RJ, Luo LL, Zhang X, et al. Research progress and prospects on *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biology, 2010, 27(5): 73-76 (in Chinese)
娄瑞娟, 罗利龙, 张霞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展和前景展望[J]. 生物学杂志, 2010, 27(5): 73-76
- [33] Zhang Y, Li ML, Zhang JG. High-level expression of codon optimized γ -cyclodextrin glycosyltransferase by *Pichia pastoris*[J]. Industrial Microbiology, 2017, 47(1): 24-30 (in Chinese)
张燕, 李梦腊, 张建国. γ -环糊精糖基转移酶在毕赤酵母中高效表达[J]. 工业微生物, 2017, 47(1): 24-30
- [34] Angov E. Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(6): 650-659
- [35] Liu H, Li JH, Du GC, 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
- [36] Jiang YJ, Zhou J, Wu RF, et al. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and its application in 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18: 53
- [37] Gvritishvili AG, Leung KW, Tombran-Tink J. Codon preference optimization increases heterologous PEDF expression[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15056
- [38] Tang LX, Jiang RX, Zheng K. Enhancing the recombinant protein expression of halohydrin dehalogenase HheA in *Escherichia coli* by applying a codon optimization strategy[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49(4): 395-401
- [39] Han L, Wang H, Wang JQ, et al. Transient expression of codon optimized nattokinase genes in tomato fruits[J]. Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition), 2016, 47(1): 73-79 (in Chinese)
韩岚, 王欢, 王佳琪, 等. 密码子优化的纳豆激酶基因在番茄果实中的瞬时表达[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2016, 47(1): 73-79
- [40] Guo YH, Chen JC, Jia XB, et al. Effects of chaperone co-expression on heterologous solubility expression of thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 518-526 (in Chinese)
郭永华, 陈济琛, 贾宪波, 等. 分子伴侣共表达对嗜热环糊精葡萄糖糖基转移酶异源可溶性表达的影响[J]. 微生物学报, 2016, 43(3): 518-526