

钙离子协同溶氧提高重组 β -CGT酶的可溶性表达量

周媛媛¹, 李兆丰^{1,2}, 顾正彪^{1,2}, 班宵逢^{1,2}, 洪雁^{1,2}, 程力^{1,2}, 李才明^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 环糊精葡萄糖基转移酶(Cyclodextrin glycosyltransferase, 简称 CGT 酶)能够通过环化反应生成环糊精,但天然菌株发酵产酶的水平较低,使得环糊精的生产成本居高不下,因此旨在通过异源表达以及发酵优化策略来提高 CGT 酶的表达量。首先将来源于 *Bacillus xiaoxiensis* STB08 的 *cgt* 基因插入质粒 pET-20b(+)中,在宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行分泌表达,在适宜的培养基中发酵 96 h 后,胞外酶活为 34.66 U/mL。然后对发酵条件进行优化,改变溶氧以及添加一定终浓度的 Ca^{2+} 可使酶活提高到 66.86 U/mL 及 83.15 U/mL,且溶氧与 Ca^{2+} 协同作用可使酶活提高到 105.69 U/mL,相比于优化发酵条件之前提高了 204.93%。最后通过蛋白质定位分析及流式细胞分析对溶氧及添加 Ca^{2+} 影响发酵水平的机理进行了研究。结果表明,较低的溶氧能够减少重组大肠杆菌包涵体的形成,且溶氧较低时细胞活性较高,但溶氧过低时菌体浓度太低,不能满足菌体正常生长及代谢的需求。而添加 Ca^{2+} 能够减少包涵体的形成,同时 Ca^{2+} 对细胞有较好的保护作用,因此,在溶氧以及 Ca^{2+} 的协同作用下,能够保证菌体的高生长浓度,且 Ca^{2+} 能够增加细胞透性并保护细胞,使得活细胞数目显著增多。该研究提高了 CGT 酶在大肠杆菌中的可溶性表达量,为该酶的工业化生产提供了新的策略及方法,也可为相关酶的发酵优化提供参考。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶;异源表达;发酵优化;溶氧;钙离子

中图分类号:Q 555

文章编号:1673-1689(2023)10-0016-08

DOI:10.12441/spyswjs.20220403001

Ca^{2+} Coordinated Dissolved Oxygen to Improve Soluble Expression of Recombinant β -CGTase

ZHOU Yuanyuan¹, LI Zhaofeng^{1,2}, GU Zhengbiao^{1,2}, BAN Xiaofeng^{1,2},
HONG Yan^{1,2}, CHENG Li^{1,2}, LI Caiming^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) can generate cyclodextrin by cyclization reaction; however, the production is limited in natural bacterial strains, which results in high costs for cyclodextrin production. Thus, the authors aimed to enhance the expression of CGTase by heterologous expression and fermentation optimization strategies. First, the *cgt* gene derived from

收稿日期: 2022-04-03 修回日期: 2022-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072171)。

* 通信作者: 李才明(1984—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事淀粉生物技术研究。E-mail:caimingli@jiangnan.edu.cn

Bacillus xiaoxiensis STB08 was inserted into the plasmid pET-20b(+) and expressed in the host strain *Escherichia coli* BL21(DE3). After 96 h of fermentation in a suitable culture medium, the extracellular enzyme activity reached 34.66 U/mL. Subsequently, the fermentation conditions were optimized by changing the dissolved oxygen and adding a certain final concentration of Ca^{2+} , which led to an increase in enzyme activity to 66.86 U/mL and 83.15 U/mL, respectively. Furthermore, the synergistic effect of dissolved oxygen and Ca^{2+} increased the enzyme activity to 105.69 U/mL, representing a 204.93% improvement compared to that before fermentation optimization. Finally, the mechanism of dissolved oxygen and Ca^{2+} addition on the fermentation level was studied by protein localization analysis and flow cytometry. The results showed that the lower dissolved oxygen could reduce the formation of inclusion bodies in recombinant *E. coli*, with higher cellular activity observed at lower dissolved oxygen levels. However, the excessively low dissolved oxygen resulted in insufficient cell density to meet the needs of normal bacterial growth and metabolism. The addition of Ca^{2+} could reduce the formation of inclusion bodies and provide good cellular protection. Therefore, the synergistic effect of dissolved oxygen and Ca^{2+} ensured a high growth concentration of bacteria, and Ca^{2+} increased cell permeability and protected the cells, resulting in a significant increase in viable cell count. This study improved the soluble expression of CGTase in *E. coli*, providing a new strategy and method for its industrial production, as well as serving a reference for the fermentation optimization of the related enzymes.

Keywords: cyclodextrin glucosyltransferase, heterologous expression, fermentation optimization, dissolved oxygen, Ca^{2+}

环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclodextrin glycosyltransferase, 简称 CGT 酶, EC 2.4.1.19) 是从细菌细胞中得到的一类胞外酶,它是 α -淀粉酶大家族的关键成员^[1-3]。CGT 酶共有 A~E 5 个结构域,能够催化 4 种不同类型的反应,分别为水解、歧化、环化和偶合反应,具有极大的应用价值^[4-5],近年来,随着环糊精在食品、医药、化工、农业以及化妆品等领域的广泛应用,CGT 酶成为研究的热点^[6]。目前已经发现多种能够天然生产 CGT 酶的菌种,大多数为细菌,包括 *Paenibacillus macerans*^[7]、*Bacillus stearothermophilus*^[8]、*B. megaterium*^[9]等。

大部分来源的 CGT 酶的热稳定性相对较低,而来源于 *B. xiaoxiensis* STB08 的 CGT 酶的热稳定性较高(60 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期为 12.5 min)。工业上生产环糊精所使用的 CGT 酶主要来自天然芽孢杆菌,少量为基因工程菌^[10-11],相比野生菌在培养过程中容易感染杂菌、发生回复突变、发酵上清液中酶活单位低等特点,重组菌培养方式简便,上清液中酶活单位高,目的蛋白质所占比较大,都使得在发酵过程中制备 CGT 酶的成本进一步降低。但 CGT 酶在

发酵过程中,经常会遇到外源蛋白质形成包涵体、胞外表达量难以提高等问题,限制了 CGT 酶的大规模生产以及在工业中的应用^[12]。因此,有必要提高 CGT 酶的胞外表达量。

在合适的宿主中外源表达 *cgt* 基因被认为是目前提高 CGT 酶产量的主要且有效的手段。大肠杆菌是实验室研究和工业生产首选的表达系统,因此使用大肠杆菌系统来表达重组蛋白成为一种快速简单的方法。如 Li 等利用大肠杆菌系统表达 *P. macerans* 的 CGT 酶,诱导 90 h 时 CGT 酶活力可达 22.5 U/mL^[13]。但目前胞外表达量还是较低,且对发酵条件(如溶氧、钙离子)影响大肠杆菌产酶的机理研究较少,同时有关溶氧以及钙离子对大肠杆菌产酶的协同作用未见报道。因此,有必要系统研究溶氧及钙离子对大肠杆菌发酵产酶的影响。

作者将来源于 *B. xiaoxiensis* STB08 的 β -CGT 基因插入质粒 pET-20b(+) 中,在宿主菌 *E. coli* BL21 中进行分泌表达,对能够显著影响 β -CGT 酶发酵生产的发酵条件(溶氧、钙离子)的影响机理进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种与质粒:小溪芽孢杆菌 *B. xiaoxiensis* STB08、质粒 pET-20b(+), 表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 均由作者所在实验室传代并保藏。

主要试剂:限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bam*H I、聚合酶、T₄DNA 连接酶、胶回收试剂盒、琼脂糖:均购自 TaKaRa(大连)公司;超级感受态制备试剂盒等试剂:均购自生工生物(上海)有限公司;各种培养基组分:购自 Oxoid 公司。

1.2 主要仪器

Applied Biosystems Pro Flex PCR 仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;Mini Protein3 蛋白质电泳系统:美国 Bio-Rad 公司产品;T-6V 可见分光光度计:南京菲勒仪器有限公司产品;FACS Aria II 流式细胞分选仪:美国碧迪公司产品。

1.3 培养基

LB 液体培养基(组分 g/L):酵母粉 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10; LB 固体培养基为在 LB 液体培养基中再添加 1.5 g/dL 的琼脂粉。

发酵培养基(组分 g/L):玉米浆膏 24, 大豆蛋白胨 6, 葡萄糖 2, 麦芽糖 4, KH_2PO_4 2.32, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 16.43。

1.4 实验方法

1.4.1 重组 β -CGT 酶的生产 种子培养:将保存在超低温冰箱中的甘油菌株解冻,混合均匀后使用移液枪吸取 100 μL 至 LB 液体培养基中,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 发酵摇床中培养 10~12 h。发酵培养:将得到的种子液使用移液枪吸取 2 mL 至发酵培养基中,然后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵摇床中培养 96 h 得到重组 β -CGT 酶液。

1.4.2 β -CGT 酶环化活力的测定 β -CGT 酶环化活力的测定参照李才明的方法^[14]。

1.4.3 菌体浓度的测定 通过光密度(Optical density)的大小来反映菌体数量,用 OD_{600} 表示。

1.4.4 重组 CGT 酶的亚细胞定位 重组 CGT 酶的定位参照李兆丰的方法^[15]。胞外 CGT 酶:发酵结束后发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为胞外 β -CGT 酶;不溶性包涵体:在分离出周质空间与胞内 CGT 酶的细胞碎片中加入 1 g/dL SDS-PAGE 上样缓冲液,并在沸水浴中煮沸 10 min, 离心

后的上清液即为不溶性包涵体。

1.4.5 细胞透性分析 重组大肠杆菌细胞透性的测定参照李兆丰的方法^[15]。即发酵结束后的发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体,用 PBS 洗涤 2 遍,稀释至一定浓度后加入 10 mmol/L NPN,用荧光分光光度计测定荧光值,测定参数为:缝宽 1 nm、激发波长 350 nm、发射波长 420 nm。

1.4.6 流式细胞仪(FCM)分析 对于 FCM 分析,参照文献[16]使用碘化丙啶(PI)以及羧基二乙酰荧光素(cFDA)双染的方法对细菌细胞进行染色,略有改动。首先将不同条件下的细胞于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用 cFDA 避光染色 30 min,接着用 PI 进行染色,染色的细菌需在 1 h 内进行 FCM 分析。

1.4.7 数据处理 使用 Prism graphpad 8.0 软件作图,使用 SPSS 26.0 中的单因素方差分析(ANOVA)对数据进行显著性分析($P < 0.05$),流式细胞数据使用 Flowjo 10 软件分析作图。

2 结果与分析

2.1 重组大肠杆菌 BL21/ pET20b(+)-cgt 的构建与表达

将来源于 *B. xiaoxiensis* STB08 的 *cgt* 基因插入质粒 pET-20b(+)中,在宿主菌 *E. coli* BL21 中成功分泌表达,得到基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b(+)-*cgt*,进行摇瓶发酵培养得到粗酶液。

2.2 重组 β -CGT 酶的摇瓶发酵条件优化

在 TB 培养基的基础上,经过对温度、发酵时间、pH、碳源、氮源等进行优化后,最终以玉米浆膏 24 g/L、大豆蛋白胨 6 g/L、葡萄糖 2 g/L、麦芽糖 4 g/L, KH_2PO_4 2.32 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 16.43 g/L 作为最优发酵培养基,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 条件下发酵 96 h 后胞外酶活达到 34.66 U/mL,接着对能够显著影响 β -CGT 酶发酵生产的发酵条件(溶氧、钙离子)进一步优化,并对其影响机理进行分析。

2.2.1 溶氧对重组 β -CGT 酶摇瓶发酵的影响 在摇瓶发酵阶段,溶氧的改变主要是通过控制摇瓶中的装液量变化。基于摇瓶发酵培养基优化结果,选取不同的装液量(30、50、70、100、120、150 mL),接种体积分数为 4%,每隔 12 h 取样测定菌体浓度 OD_{600} 以及重组大肠杆菌的胞外酶活力,并对发酵结束后的胞外 β -CGT 酶以及不溶性包涵体进行 SDS-PAGE 分析,探究不同的溶氧对重组 β -CGT 酶摇瓶

发酵的影响。

如图 1 所示,当装液量较少(30、50 mL)即发酵液中的溶氧含量较高时,由于其传氧系数较高,重组大肠杆菌迅速生长,菌体浓度增长很快,其 OD₆₀₀ 最高,但在此条件下重组大肠杆菌的产酶水平却是最低的,推测可能是由于重组大肠杆菌的生长速度过快导致其形成了较多的不溶性包涵体,同时菌体生长速度过快也会导致代谢物的大量积累,影响发酵体系的 pH 以及酶的稳定性等从而抑制菌体产酶,并且由于装液量较少,在发酵过程中也会增加发酵液的挥发,发酵过程中发酵液体积减少过多不利于菌体进行产物合成;装液量过多(150 mL)会使

发酵液中的溶氧含量过低,无法满足菌体正常生长及代谢的需要,在此条件下菌体浓度过低,同时重组大肠杆菌的产酶水平也较低;而当装液量为 70、100、120 mL 时,重组大肠杆菌的菌体浓度 OD₆₀₀ 处于较为适宜的水平,对应的产酶水平也较高,因此在能够维持重组大肠杆菌正常生长的情况下,尽可能避免其菌体快速生长是提高产酶水平的关键。同样,邹纯等发现在短小芽孢杆菌发酵中,尽可能避免其快速生长是提高产酶的关键^[17]。综合考虑重组大肠杆菌的生长繁殖以及产酶情况,选取菌体浓度适当且产酶水平较高的装液量 100 mL 作为最优装液量,发酵 96 h 后其胞外酶活达到 66.86 U/mL。

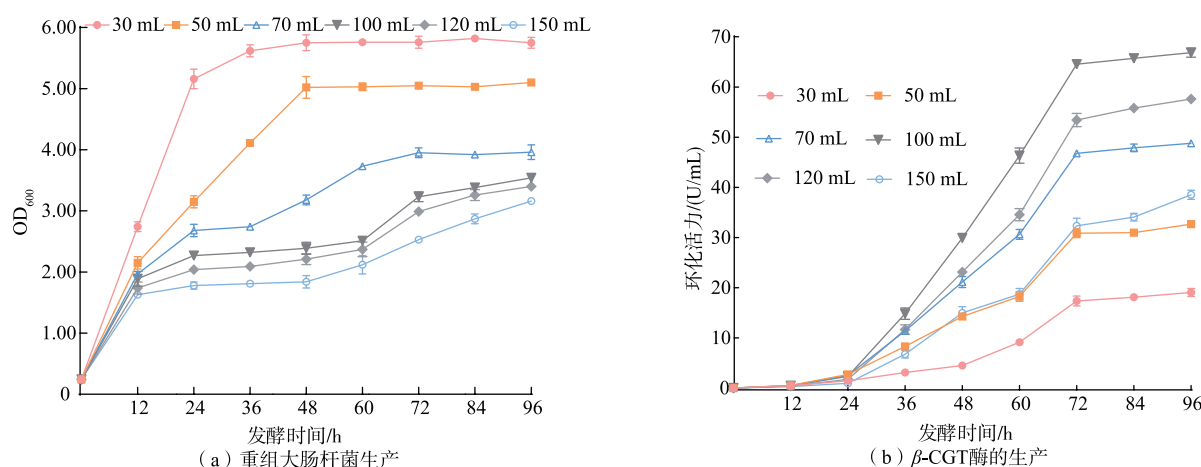
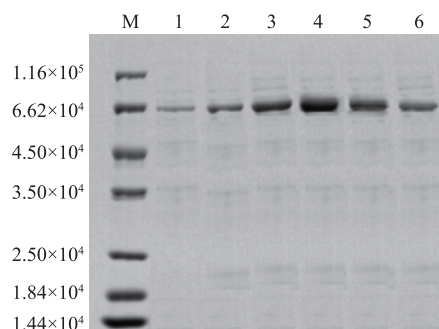


图 1 溶氧对重组大肠杆菌生长和产 β -CGT酶的影响

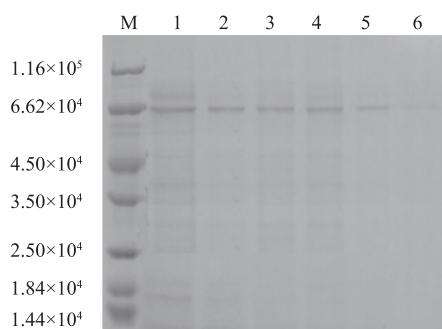
Fig. 1 Effects of dissolved oxygen on the growth and β -CGTase production of recombinant *E. coli*

对重组大肠杆菌的包涵体以及发酵结束的粗酶液进行 SDS-PAGE 分析,如图 2 所示,分泌至胞外的酶量较多,这可能是由于在不同的溶氧条件下,细胞外膜透性较大。随着发酵液中的溶氧增大,重组大肠杆菌形成的不溶性包涵体越多。这是由于在较高的溶氧条件下,发酵前期重组大肠杆菌菌体浓度迅速增加,合成了较多的目标蛋白质,同时,转录、翻译以及折叠蛋白质的速度过快,导致大量目标蛋白质无法正确折叠而形成包涵体^[18],而包涵体的大量存在会严重堵塞内膜转运通道,因此选择适宜的装液量(100 mL)对其生长及产酶至关重要。同时可以看出,在最优装液量条件下胞外酶条带最粗,说明在此条件下重组大肠杆菌分泌到胞外的酶量最多,这与酶活测定结果一致。

由上述结果可知,溶氧对于重组大肠杆菌的细胞影响较显著,故进一步利用流式细胞术(Flow cytometry, FCM)对在不同溶氧条件下发酵结束的重组大肠杆菌菌体进行分析。cFDA(羧基二乙酸荧光素)是二乙酸荧光素的一种衍生物,当细胞膜完整时,其水解的荧光素就会逐渐在细胞内积累,常被用作细胞活性的标签,而 PI(碘化丙啶)无法透过完好的细胞膜进入细胞,只有当细胞死亡或凋亡后,它能够进入细胞^[19],作者采用 cFDA-PI 双重荧光染色法来表征溶氧对重组大肠杆菌细胞的影响。如图 3 所示,左上区域(Q1)表示 PI 标记的死细胞,Q2 区为 PI 与 cFDA 同时标记的已受损但仍然存活的细胞,Q3 区为 cFDA 标记的活体细胞,Q4 区为细胞碎片。



(a) 胞外酶



(b) 不溶性包涵体

E. coli 分别在 30 mL(条带 1)、50 mL(2)、70 mL(3)、100 mL(4)、120 mL(5)、150 mL(6)装液量下诱导 96 h; M: 蛋白质标准相对分子质量。

图 2 不同溶氧下胞外酶和不溶性包涵体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of extracellular enzyme and insoluble inclusion bodies under different dissolved oxygen levels

当发酵液中的溶氧量过高时(装液量 30 mL),虽然菌体浓度高,即菌体数量较多,但 Q1 区的细胞数目为 72.5%,说明过高的溶氧会导致细胞严重受损,使细胞失去维持细胞稳态和代谢物的功能,导致大部分细菌机械性坏死;当发酵液中的溶氧量有所降低时(50~120 mL),Q3 区即活细胞数目显著增加,同时 Q2 区的细胞数目也显著增加,这说明适当降低溶氧能够使得细胞活性增大。在最优溶氧条件下(即装液量为 100 mL),Q3 区的活细胞数目最多,即能够用来分泌产酶的活细胞数目最多,故其产酶情况最好;而当溶氧过低(装液量为 150 mL)时,不足以满足细菌正常生长的需求,故选取最适宜的溶氧对于细胞活性以及生长产酶的影响至关重要。

2.2.2 金属离子对重组 β -CGT 酶摇瓶发酵的影响
发酵过程中的金属离子主要由各种无机盐提供,无机盐类所提供的金属离子对于细胞生长以及产物合成有着重要的影响,能够影响细胞物质的组成以及能量代谢,同时,金属离子作为酶的辅基,还可以

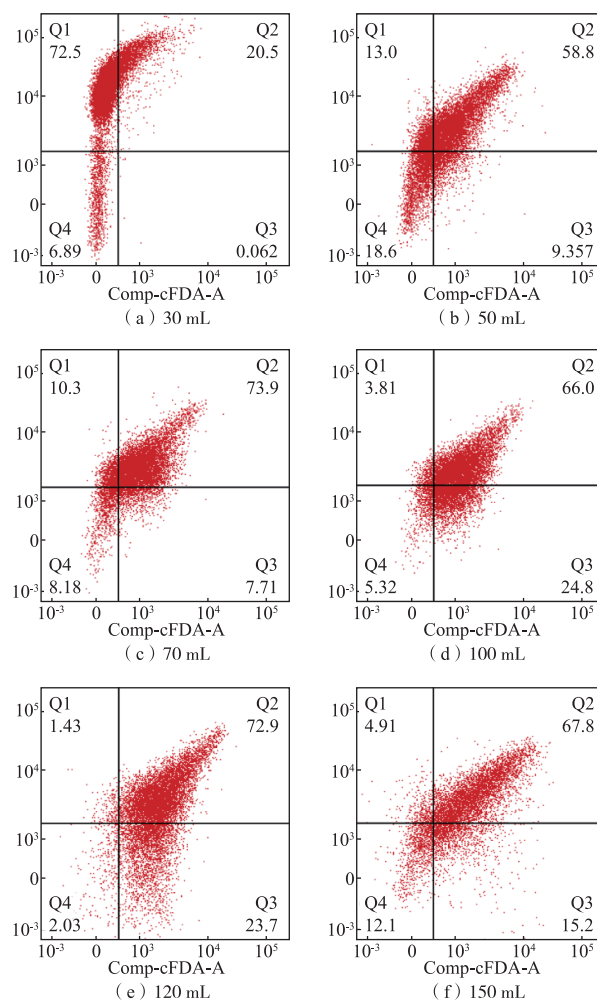
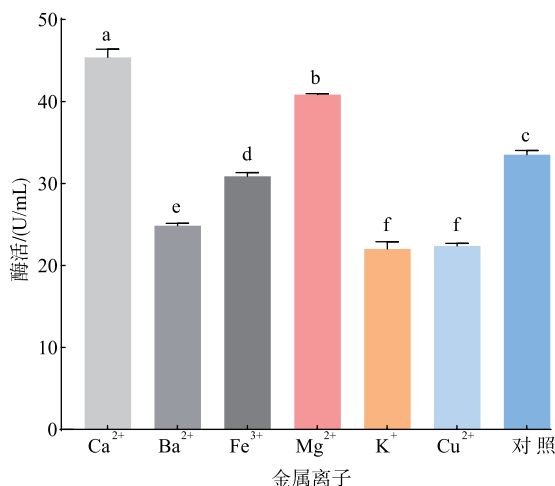


图 3 不同溶氧下重组大肠杆菌的 FCM 分析

Fig. 3 FCM analysis of recombinant *E. coli* under different dissolved oxygen levels

作为一些关键酶的辅助因子。作者在发酵培养基(50 mL)中分别添加终浓度为 5 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Cu^{2+} ,以不添加金属离子的培养基作为对照,探究各种金属离子对重组大肠杆菌产酶的影响。如图 4 所示,添加 Ca^{2+} 以及 Mg^{2+} 对于重组大肠杆菌产酶有促进作用,同样,李才明等发现添加 Ca^{2+} 能明显激活酶的活力^[20],与本研究结果一致。随着发酵时间的延长,发酵液的 pH 随之增大,不利于重组大肠杆菌生长及产酶,而 Ca^{2+} 能沉淀磷酸盐,并且可以与磷酸盐和蛋白质相互作用提供相对较低的 pH 环境,因此有利于其产酶, Ca^{2+} 的添加还具有其他的作用,如 Ca^{2+} 的渗透调节作用使得一些营养物质易于进入细胞内部^[21],同时推测其能够增大细胞膜的通透性。由于添加 Ca^{2+} 对于促进重组大肠杆菌胞外产酶作用最为显著,故最终在发酵培养基中

添加一定终浓度的 Ca^{2+} 以提高酶活, 进一步对其浓度进行优化, 发现在发酵培养基中添加终浓度为 25 mmol/L 的 Ca^{2+} , 胞外酶活达到最高。



图中不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 4 金属离子对重组大肠杆菌胞外产酶的影响

Fig. 4 Effects of different metal ions on extracellular enzyme production of recombinant *E. coli*

为了探究钙离子是否能够增大重组大肠杆菌细胞的通透性, 对添加钙离子以及对照组的细胞外膜的透性测定分析, 并对发酵结束后的包涵体进行 SDS-PAGE 分析。如图 5 所示, 荧光值的大小 (荧光相对强度) 可以用来评价 *E. coli* 细胞外膜透性大小, 添加一定浓度的钙离子后, 重组大肠杆菌的细胞外膜透性显著增大, 说明添加一定浓度的钙离子可以增大其细胞外膜的透性, 故重组 β -CGT 酶更容易穿过细胞外膜分泌到胞外。如图 6 所示, 添加钙离子相比于不添加钙离子, 重组大肠杆菌形成的不溶性包涵体较少, 说明钙离子有利于重组大肠杆菌减少包涵体的形成。综上, 其分泌到胞外的可溶性酶较多。

2.2.3 钙离子协同溶氧对重组 β -CGT 酶摇瓶发酵的影响 摇瓶优化发酵结果说明溶氧以及 Ca^{2+} 的添加均对重组大肠杆菌胞外产酶均具有显著影响, 故进一步优化添加 Ca^{2+} 条件下的溶氧水平, 分别于 30、50、70、100、120、150 mL 发酵液中添加终浓度为 25 mmol/L 的 Ca^{2+} , 如图 7 所示, 在装液量为 30 mL 时, 添加终浓度为 25 mmol/L 的 Ca^{2+} 酶活最高, 发酵 96 h 后酶活为 105.69 U/mL。观察其生长曲线可知, 在 30 mL 发酵液中添加 Ca^{2+} 其菌体浓度远高于其他组, 而其对应的胞外产酶量也是最高的。这是因为

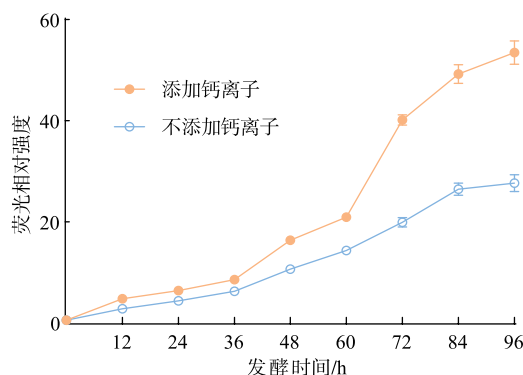
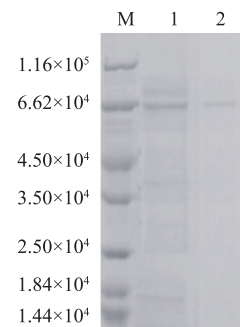


图 5 添加钙离子对重组大肠杆菌细胞外膜的影响

Fig. 5 Effect of Ca^{2+} addition on the outer membrane of recombinant *E. coli*



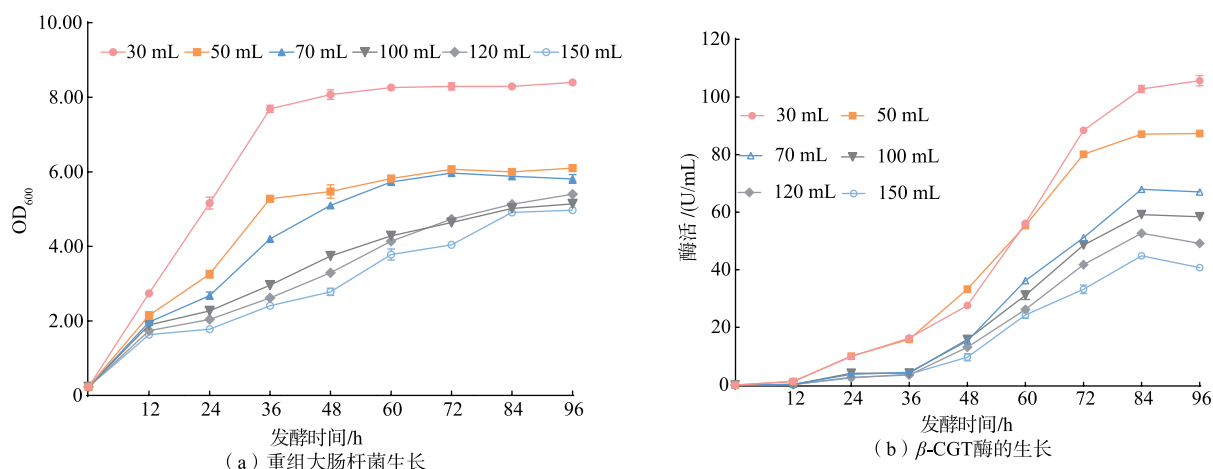
E. coli 分别在不添加钙离子及添加 25 mmol/L 终浓度的钙离子条件下诱导 96 h (条带 1、2); M: 蛋白质标准相对分子质量。

图 6 不添加钙离子及添加钙离子时的不溶性包涵体的 SDS-PAGE 分析

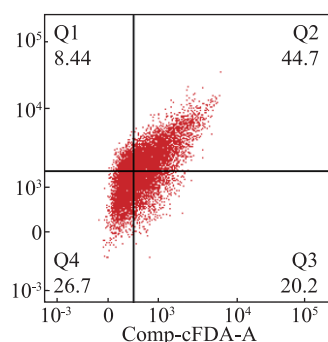
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of insoluble inclusion bodies without and with Ca^{2+} addition

在保证菌体生长浓度较高的同时, Ca^{2+} 增加细胞的通透性同时保护细胞, 并促使细胞及时将 CGT 酶分泌至胞外, 故推测 Ca^{2+} 以及溶氧对于重组 β -CGT 酶的摇瓶发酵具有协同促进作用。

有文献报道钙离子对于细菌细胞有强大的保护作用^[22], 为了验证 Ca^{2+} 对于重组大肠杆菌细胞是否具有保护作用, 作者采用流式细胞术并用 cFDA-PI 双重荧光染色法来探究 Ca^{2+} 对重组大肠杆菌细胞的影响。如图 8 所示, 在溶氧较高 (30 mL) 发酵液中添加 Ca^{2+} 后可以看出活细胞数目显著增加。当发酵液中的溶氧较高时, 细菌生长较快且 OD_{600} 较高, 但同时菌体生长过快, 代谢物积累就会过多, 导致其细胞损伤较大, 坏死细胞较多, 而添加 Ca^{2+} 后, 发现 Q1 区的机械性坏死细胞数目显著较少, 同时 Q3 区的活细胞数目显著增多, 故可以确定 Ca^{2+} 对于细

图 7 钙离子协同溶氧对重组大肠杆菌生长和产 β -CGT 酶的影响Fig. 7 Effects of Ca^{2+} coordinated dissolved oxygen on the growth and β -CGTase production of recombinant *E. coli*

胞有一定的保护作用。



E. coli 分别在添加 25 mmol/L 终浓度的 Ca^{2+} 诱导 96 h。

图 8 钙离子协同溶氧对重组大肠杆菌影响的 FCM 分析

Fig. 8 FCM analysis of the effect of Ca^{2+} coordinated dissolved oxygen on recombinant *E. coli*

3 结 语

实现了来源于 *B. xiaoxiensis* STB08 的 β -CGT 基因在大肠杆菌中的克隆与表达,发现溶氧以及 Ca^{2+} 对于重组大肠杆菌发酵产酶具有协同作用,即在较高的溶氧条件下添加 Ca^{2+} ,重组大肠杆菌的胞外酶活水平达到最高。机理分析表明,较高的溶氧能够保证菌体较高的生长浓度,但在此条件下机械性坏死的细胞过多,而 Ca^{2+} 的添加很好地保护了细胞,使得活细胞数目增加,同时 Ca^{2+} 的添加减少了包涵体的形成,并使得细胞的通透性增大,促使细胞及时将 CGT 酶分泌至胞外。可为相关酶的发酵优化提供新的参考。

参考文献:

- [1] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 415-428.
- [2] 武迪, 张玲, 吴梦棋, 等. 环糊精促进 *Burkholderia cepacia* 转化胆固醇生成胆甾-4-烯-3,6-二酮[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(7): 89-96.
WU D, ZHANG L, WU M Q, et al. *Burkholderia cepacia* bioconverts cholesterol to cholest-4-ene-3,6-Dione promoted by cyclodextrin[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(7): 89-96. (in Chinese)
- [3] CID-SAMAMED A, RAKMAI J, MEJUTO J C, et al. Cyclodextrins inclusion complex: preparation methods, analytical techniques and food industry applications[J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132467.
- [4] 单丽媛, 刘龙, 李江华, 等. 利用环糊精糖基转移酶转化合成 AA-2G 的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(1): 27-32.
SHAN L Y, LIU L, LI J H, et al. Enzyme synthesis of AA-2G by cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(1): 27-32. (in Chinese)
- [5] SONNENDECKER C, ZIMMERMANN W. Change of the product specificity of a cyclodextrin glucanotransferase by semi-rational mutagenesis to synthesize large-ring cyclodextrins[J]. *Catalysts*, 2019, 9(3): 242.

- [6] DENG C, LI J H, SHIN H D, 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.
- [7] 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.
- [8] 范博望. *Bacillus stearothermophilus* 环糊精葡萄糖基转移酶在短小芽孢杆菌中的重组表达、发酵优化及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [9] ZHOU J W, LIU H, DU G C, et al. Production of α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus megaterium* MS941 by systematic codon usage optimization[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(41): 10285-10292.
- [10] LEEMHUIS H, KELLY R M, DIJKHUIZEN L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 85(4): 823-835.
- [11] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2014, 5: 172.
- [12] CHEN X T, HUANG L P, SUN J J, 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.
- [13] LI Z F, LI B, GU Z B, et al. Extracellular expression and biochemical characterization of α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. **Carbohydrate Research**, 2010, 345(7): 886-892.
- [14] 李才明. β - 环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中的分泌表达及其热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [15] 李兆丰. 软化类芽孢杆菌 α - 环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [16] SHAHRYARI S, ZAHIRI H S, HAGHBEEN K, et al. High phenol degradation capacity of a newly characterized *Acinetobacter* sp. SA01: bacterial cell viability and membrane impairment in respect to the phenol toxicity[J]. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2018, 164: 455-466.
- [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.
- [18] SINGH S M, PANDA A K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005, 99(4): 303-310.
- [19] STIEFEL P, SCHMIDT-EMRICH S, MANIURA-WEBER K, et al. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide[J]. **BMC Microbiology**, 2015, 15: 36.
- [20] 李才明, 黄敏, 顾正彪, 等. 来源于 *Bacillus circulans* 的重组 β -CGT 酶的分离纯化及其生化性质分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(4): 360-368.
- LI C M, HUANG M, GU Z B, et al. Purification and characterization of recombinant β -CGTase from *Bacillus circulans* STB01 [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2018, 37(4): 360-368. (in Chinese)
- [21] IHSEN J, KOWARIK M, DILETTOSO S, et al. Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*[J]. **Microbial Cell Factories**, 2010, 9: 61.
- [22] NORRIS V, GRANT S, FREESTONE P, et al. Calcium signalling in bacteria[J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, 178(13): 3677-3682.