

# 重组环糊精葡萄糖基转移酶温控型工程菌的构建及其培养条件的优化

凡 宁, 张洪斌\*, 凌 凯, 凌国庆, 胡雪芹

(合肥工业大学医学工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法从蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 中扩增了 $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶 ( $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase,  $\beta$ -CGTase) 基因, 将该基因克隆到pBV220质粒中, 转化*E. coli* DH5 $\alpha$ , 经氨苄青霉素抗性筛选和酶切验证后, 得到能表达 $\beta$ -CGTase的重组大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ /pBVcgt。通过对工程菌产酶条件的优化, 得到最佳产酶条件为: OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0、初始培养温度30℃、发酵培养基初始pH 8.0、温度梯度诱导39℃培养0.5 h, 40℃培养0.5 h, 41℃培养1 h, 42℃培养2 h。酶活力由优化前的445 U/mL提高到956 U/mL, 酶活力提高了1.15倍。温度梯度诱导比直接诱导酶活力提高20%。该酶的克隆表达以及发酵条件的研究表明, 该酶能在大肠杆菌原核表达体系中高效表达。

**关键词:** 蜡状芽孢杆菌;  $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶; 工程菌; 表达; 培养条件

## Construction of Temperature-Regulated Recombinant *Escherichia coli* for $\beta$ -CGTase Expression and Optimization of Culture Conditions

FAN Ning, ZHANG Hong-bin\*, LING Kai, LING Guo-qing, HU Xue-qin

(School of Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The  $\beta$ -CGTase gene from *Bacillus cereus* was cloned in pBV220 plasmid after PCR amplification. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . After ampicillin-resistance screening and restriction enzyme digestion analysis, we acquired recombinant *E. coli* DH5 $\alpha$ /pBVcgt. The optimum fermentation conditions in shaking flask were acquired as follows: OD<sub>600 nm</sub> = 1.0, initial culture temperature 30℃, initial medium pH 8.0, and gradient-temperature induction at 39℃ for 0.5 h followed by 40℃ for 0.5 h, 41℃ for 1 h and 42℃ for 2 h. The activity of  $\beta$ -CGTase under these fermentation conditions was increased from 445 to 956 U/mL, representing a 2.15-fold increase compared to that obtained before optimization. Cloning and expression of the  $\beta$ -CGTase gene showed that this enzyme could be expressed highly in *E. coli* expression system. Therefore, this study proves the possibility of protein engineering of  $\beta$ -CGTase for large-scale production of  $\beta$ -CD.

**Key words:** *Bacillus cereus*;  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase; engineered bacteria; expression; culture conditions

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 11-0155-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411031

环糊精葡萄糖基转移酶 (cyclodextrin glucanotransferase, CGTase, EC2.4.1.19) 是一种重要的工业用酶, 不仅能催化淀粉、糖原、麦芽寡聚糖等 $\alpha$ -1,4-葡萄糖聚合物合成环糊精 (cyclodextrin, CD), 也可用于一些糖类和配糖物的化学改性<sup>[1]</sup>。该酶属于 $\alpha$ -淀粉酶家族, 是一种多功能型酶, 除了具有环化作用, 也具有耦合和歧化作用, 同时还有弱的水解作用<sup>[2]</sup>。至今已从许多微生物中分离得到CGTase, 如:

*Bacillus* sp.<sup>[3]</sup>, *Paenibacillus* sp.<sup>[4]</sup>和*Thermoanaerobacter* sp.<sup>[5]</sup>, 其中以*Bacillus* sp.为主。CD是由多个D-吡喃葡萄糖单元通过 $\alpha$ -(1,4)糖苷键连接成的一类环状低聚糖。目前常用的环糊精主要有3种, 分别是由6、7、8个葡萄糖单元组成的 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -CD<sup>[6]</sup>。CDs是一种具有内疏水外亲水的筒形结构, 能与许多疏水客体化合物或功能基团形成包含物, 从而改变其物理或化学性质, 这种特殊的性质使环糊精在食品、医药、农业、化妆品、环保等

收稿日期: 2014-02-13

基金项目: 安徽省自主创新专项 (2013AKKG0391)

作者简介: 凡宁 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化工。E-mail: fanning56789@163.com

\*通信作者: 张洪斌 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物化工与酶工程。E-mail: hbzhang@hfut.edu.cn

领域具有广泛的应用<sup>[7-11]</sup>。目前环糊精的工业化生产均采用酶法合成,但由于野生菌株的产酶能力普遍较低以及低的转化率、加之生成的环糊精分离提纯困难等原因,导致环糊精生产成本太高,限制了它们的扩大生产和应用。因此为了获取适合工业化生产的CGTase产酶菌株,对CGTase进行分子生物学研究,构建工程菌株,获得稳定性好、产量高、易于分离纯化的重组CGTase越来越受到重视。Petrova<sup>[12]</sup>和Lee<sup>[13]</sup>等将CGTase基因克隆并转入到*E. coli*体内获得了表达,Takano等<sup>[14]</sup>将 $\beta$ -CGTase基因克隆并整合到*B. subtilis*体内,同样获得了表达。目前文献报道的重组CGTase工程菌均为异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导型,IPTG价格昂贵且去除方法复杂,一些国家已经明文规定在生产食用重组蛋白的发酵工艺中不能使用IPTG;本实验所使用的质粒pBV220是温控型的,操作简单且成本低,所以倍受人们的青睐。

本实验室通过在筛选平板中加入酚酞的方法从土壤中分离出一株能产 $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶( $\beta$ -CGTase)的芽孢杆菌*Bacillus cereus* strain LGQ01,将其基因克隆到质粒pBV220中,构建了温控型工程菌株*E. coli* DH5 $\alpha$ /pBV220-CGTase (pBVcgt),并对其发酵条件进行研究,这为今后环状糊精的酶法制备及扩大工业化生产应用打下了技术基础,使该酶能更好的应用在淀粉加工工业中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*Bacillus cereus* strain LGQ01由本实验室筛选;菌株*E. coli* DH5 $\alpha$ 由本实验室保存;克隆质粒PUC57和表达质粒pBV220均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

#### 1.1.2 酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA Marker、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒 日本TaKaRa公司;TaqDNA聚合酶、蛋白质Marker、考马斯亮蓝R-250、氨苄青霉素(Amp)、异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、X-gal、PCR产物纯化试剂盒 生工生物工程(上海)股份有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯级。普通LB培养基<sup>[15]</sup>,需要时加入终质量浓度为100  $\mu$ g/mL的Amp。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\beta$ -CGTase基因的克隆

基因克隆参考文献[16],以*Bacillus cereus* strain LGQ01的基因组DNA为模板,依据GenBank公布的*Bacillus* sp.菌株CGTase基因序列设计合成PCR所需的引

物为:上游引物:5'-CGCGGATCCATGATTCGCCAAGCTTTA-3';下游引物:5'-AAAACTGCAGTTACCAATTTGATATG-3'。上下游引物分别含有BamH I和Pst I限制性酶切位点。PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C, 3 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s; 55  $^{\circ}$ C, 1 min; 72  $^{\circ}$ C, 2 min, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min。将扩增得到的 $\beta$ -CGTase基因与PUC57载体连接后转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态,采用蓝白斑筛选后挑白色菌落在含有Amp的LB培养基中培养过夜,提取质粒进行酶切电泳分析和序列鉴定。序列鉴定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

#### 1.2.2 表达载体的构建及工程菌的筛选

对测序鉴定后的质粒PUC57-cgt和载体pBV220分别用BamH I和Pst I双酶切,凝胶电泳回收后,T4 DNA连接酶16  $^{\circ}$ C连接过夜。产物转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞,在转化平板上经Amp初步筛选,然后少量培养用酶切电泳分析方法筛选阳性克隆。

#### 1.2.3 $\beta$ -CGTase的表达和检测

把含有重组质粒的工程菌接种到含Amp的LB中,37  $^{\circ}$ C、250 r/min培养过夜,然后按1%接种量转接到含50 mL新鲜LB的三角瓶中,按上述培养条件至OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0时,42  $^{\circ}$ C诱导6 h后,4  $^{\circ}$ C、8 000  $\times$  g离心20 min收集菌体进行破碎,取上清检测其活力,并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳方法<sup>[17]</sup>分析表达产物。

#### 1.2.4 酶水解活力的测定<sup>[18]</sup>

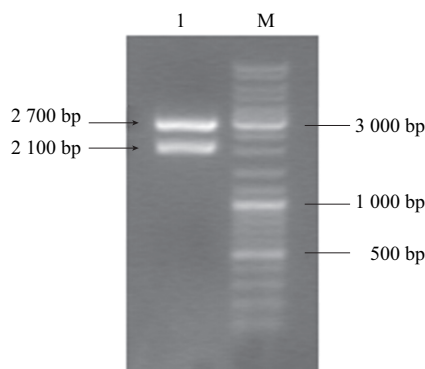
取10  $\mu$ L适当稀释的酶液,加入0.2 mol/L甘氨酸-NaOH缓冲液(pH 8.5) 0.2 mL,再加入0.2 g/100 mL可溶性淀粉0.2 mL,振荡,于40  $^{\circ}$ C水浴10 min,立即加0.5 mol/L醋酸0.5 mL终止反应,然后加入0.005%碘液显色3 min,同时以蒸馏水为空白,不加酶液为对照,在700 nm波长处测定吸光度(A),一个酶活单位定义为使吸光度下降10%的酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 $\beta$ -环糊精糖基转移酶工程菌的构建及表达

将PCR产物与PUC57载体连接后,挑白色菌落少量培养,提取其质粒用BamH I和Pst I双酶切,1.0%琼脂糖凝胶电泳,可在约2 100 bp处看到目的基因的条带(图1)。以测序确证的阳性克隆的质粒为模板扩增 $\beta$ -CGTase基因,将经BamH I和Pst I双酶切后的目的基因与pBV220载体连接后,得到重组表达质粒pBVcgt(图2)。然后将重组质粒转入*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态中,经氨苄青霉素抗性筛选和双酶切验证后,得到表达 $\beta$ -CGTase的重组大肠杆菌。重组表达质粒双酶切验证如图3所示。取

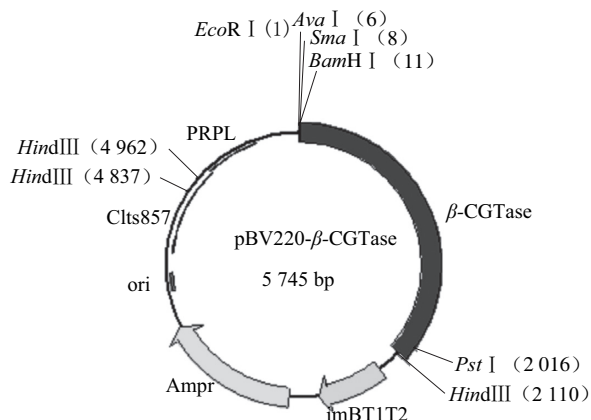
上清测酶活, 上清液中有明显的酶活力, SDS-PAGE电泳图如图4所示。说明该酶在大肠杆菌中成功获得表达。



1. *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切产物; M. DNA 标准分子质量。

图1 重组克隆载体PUC57-*cgt*酶切鉴定

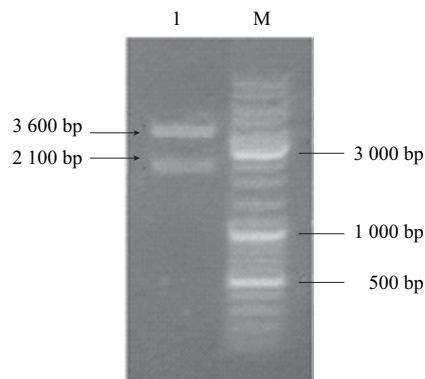
Fig.1 Restriction enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid PUC57-*cgt* by agarose gel electrophoresis



括号里数据指的是限制性酶切位点的位置。

图2 重组表达质粒pBV220-*cgt*

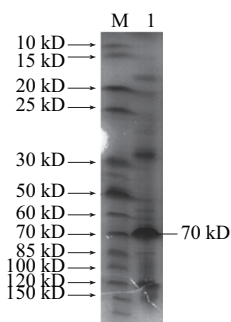
Fig.2 Expression plasmid pBV220-*cgt*



1. *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切产物; M. DNA 标准分子质量。

图3 重组表达载体pBV220-*cgt*酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid BV220-*cgt* by agarose gel electrophoresis



M. 蛋白标准分子质量; 1. 粗酶液。

图4  $\beta$ -CGTase表达的SDS-PAGE分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the recombinant  $\beta$ -CGTase from *E. coli* DH5 $\alpha$  (pBV*cgt*)

## 2.2 培养条件优化

### 2.2.1 诱导开始时菌浓 ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) 对 $\beta$ -CGTase 酶活力的影响

在50 mL含Amp的LB培养基 (pH7.0) 中按1%接种量接入种子液后, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min培养到菌浓 $OD_{600\text{ nm}}$ 值达到0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6时, 42  $^{\circ}\text{C}$ 诱导6 h后取出培养液处理后测酶活, 所得的工程菌菌浓与酶活力的关系如图5所示。菌浓较低时, 酶活力随菌浓增加而增大, 达到1.0时酶活力最高, 之后酶活力降低。菌浓在1.0时, 此时菌体处于对数生长期, 易于诱导而合成外源蛋白, 因此表现出较高的活力, 之后随着培养基中营养物质的消耗, 菌体比生长速率下降, 而导致产酶量下降。

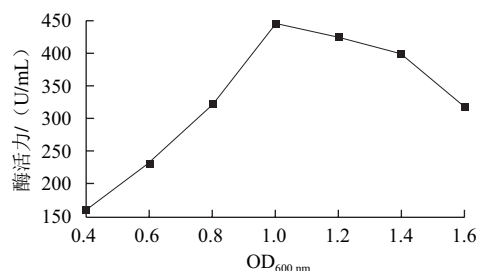


图5 诱导开始时菌体浓度对  $\beta$ -CGTase 酶活力的影响

Fig.5 Effect of  $OD_{600\text{ nm}}$  (initial cell density) on the activity of  $\beta$ -CGTase

### 2.2.2 初始培养温度对 $\beta$ -CGTase 酶活力的影响

在50 mL含Amp的LB培养基 (pH 7.0) 中按1%接种量接入种子液后, 菌体分别在28、30、32、35、37  $^{\circ}\text{C}$ , 250 r/min培养, 当菌浓 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别达到1.0时, 将温度均调至42  $^{\circ}\text{C}$ 诱导6 h后取样处理测定酶活力, 结果如图6所示。初始培养温度在30  $^{\circ}\text{C}$ 时酶活力最高, 之后随着培养温度升高酶活力迅速下降。可能是因为此时的培养温度和诱导温度之间温差较大从而有利于重组酶的诱导合成所致; 随着初始培养温度的升高, 温差逐渐减小, 产酶量也随之下降, 较低的培养温度不利于菌体的生长, 所以酶的表达量不高。

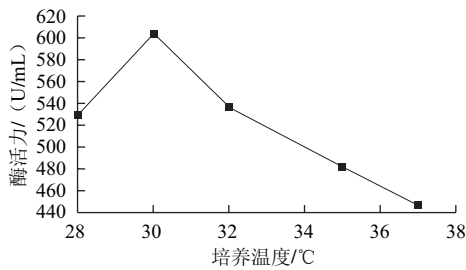


图6 初始培养温度对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

Fig.6 Effect of initial culture temperature on the activity of  $\beta$ -CGTase

2.2.3 发酵培养基初始pH值对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

在50 mL含Amp的LB培养基(pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)中按1%接种量接入种子液后, 30 °C、250 r/min培养, 当菌浓OD<sub>600 nm</sub>值均达到1.0时, 将温度调节到42 °C继续培养6 h后取样处理测定酶活力, 结果如图7所示。在发酵培养基初始pH值较低时酶活力随pH值的升高而增大, 在pH 8.0时达到最大, 之后降低。由此可知, 偏碱性环境较适合工程菌产酶, 强酸性和强碱性条件对工程菌产酶有抑制作用。

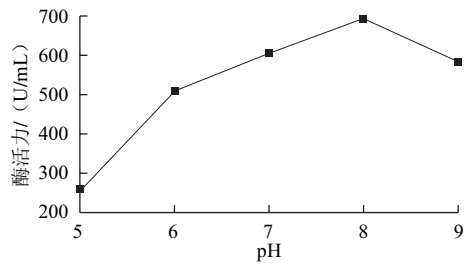


图7 发酵培养基初始pH值对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

Fig.7 Effect of initial medium pH on the activity of  $\beta$ -CGTase

2.2.4 诱导温度对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

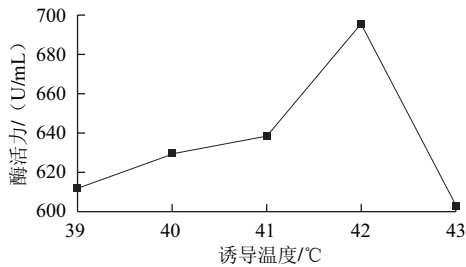


图8 诱导温度对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

Fig.8 Effect of induction temperature on the activity of  $\beta$ -CGTase

在50 mL含Amp的LB培养基(pH 8.0)中按1%接种量接入种子液后, 30 °C、250 r/min培养到OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0时, 分别在39、40、41、42、43 °C条件下诱导6 h后取样处理测定酶活力, 结果如图8所示。42 °C诱导最适合工程菌产酶, 较高温度则不利于产酶。这与载体pBV220自身的结构有关, 该载体含有编码对PL启动子有

抑制作用而又对温度敏感的cI蛋白基因*cIts857*, 该基因在30 °C时具有抑制启动子的活性, 而在42 °C时失活从而失去抑制启动子的活性, 此时的启动子具有极强的起始RNA转录的功能, 因此, 此温度下诱导表现出较高的酶活力。

2.2.5 诱导时间对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

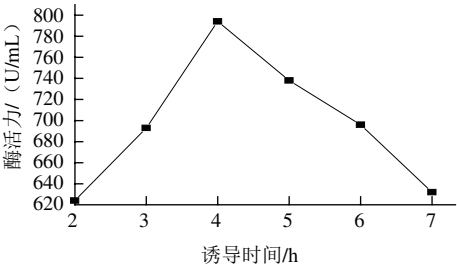


图9 诱导时间对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

Fig.9 Effect of induction time on the activity of  $\beta$ -CGTase

在50 mL含Amp的LB培养基(pH 8.0)中按1%接种量接入种子液后, 30 °C、250 r/min培养到OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0时, 42 °C分别诱导2、3、4、5、6、7 h后取样处理测定酶活力, 结果如图9所示。诱导4 h时产酶量最高, 延长诱导时间则不利于产酶。诱导时间与温控启动子有关, 许多研究表明, 该表达载体在42 °C的最佳诱导时间是4 h。如徐砾瑜等<sup>[19]</sup>研究利用温控表达载体pBV220, 在42 °C对外源基因*dhaB*及*yqhD*进行热击诱导表达4 h后, 获得了较高活力的酶。诱导时间较短, 启动子转录功能较低; 延长诱导时间对工程菌生长不利, 因此都表现出较低的酶活力。

2.2.6 温度梯度诱导对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

表1 温度梯度诱导对 $\beta$ -CGTase酶活力的影响

Table 1 Effect of induction at gradient temperatures on the activity of  $\beta$ -CGTase

| 梯度诱导时间分配   | 酶活力/(U/mL) |
|--|------------|
| (39 °C、0 h), (40 °C、1 h), (41 °C、2 h), (42 °C、1 h)     | 618        |
| (39 °C、0.5 h), (40 °C、0.5 h), (41 °C、1 h), (42 °C、2 h) | 956        |
| (39 °C、1 h), (40 °C、1 h), (41 °C、1 h), (42 °C、1 h)     | 828        |
| (39 °C、1 h), (40 °C、2 h), (41 °C、1 h), (42 °C、0 h)     | 524        |
| (39 °C、2 h), (40 °C、1 h), (41 °C、1 h), (42 °C、0 h)     | 440        |

在50 mL含Amp的LB培养基(pH 8.0)中按1%接种量接入种子液后, 30 °C、250 r/min培养到OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0时, 温度梯度设为: 39、40、41、42 °C。诱导4 h后测酶活力。由表1可知, 温度梯度诱导有利于工程菌产酶。最佳诱导温度的分配为: 39 °C诱导0.5 h, 40 °C诱导0.5 h, 41 °C诱导1 h, 42 °C诱导2 h。此时酶活力高于42 °C直接诱导4 h的活力, 是由于直接诱导时温度的变化一是使得菌体的生长压力突然增加不利于菌体生长; 二是蛋白基因*cIts857*突然失活, 导致启动子的抑制



作用突然消失,在短时间内合成大量的重组蛋白,由于合成速度太快导致重组蛋白未能正确折叠,形成较多的包涵体,所以表现出较低的酶活力。

### 3 讨论

本研究通过PCR扩增技术将从土壤中筛选的*Bacillus cereus* strain LGQ01的 $\beta$ -CGTase基因克隆到温控型表达载体pBV220中,转入*E.coli* DH5 $\alpha$ ,获得表达 $\beta$ -CGTase的重组大肠杆菌。SDS-PAGE结果显示,除了目的蛋白外,还含有一些其他杂蛋白,但目的蛋白表达量最多,分子质量为70 kD,与Zhou Yi等<sup>[20]</sup>报道的一致,与Petrova<sup>[12]</sup>和Lee<sup>[13]</sup>等报道的相近。通过对其发酵条件的优化研究表明,该酶能在温控原核表达体系中获得高效表达。这对该酶的大规模发酵具有重要意义。

本研究所采用的表达载体pBV220长度为3 666 bp,选择性标记为Amp抗性,不仅具有串联的PL和PR启动子,可以增强其启动作用;而且含有编码对PL启动子有抑制作用而又对温度敏感的*cI*蛋白基因*cIts857*调控基因*cI*,因此可用温度对插入其中的外源基因的转录进行调控。与T7诱导启动子相比,温控诱导不需要额外添加IPTG诱导剂,不仅操作简单,而且无毒无害,价格低廉,因此在本研究的基因工程产品工业化时,温控启动子比诱导启动子有其明显的优越性和现实意义。

通过对工程菌产酶条件的优化,酶活力由优化前的445 U/mL提高到956 U/mL,酶活力提高了1.15倍,得到最佳产酶条件为:OD<sub>600 nm</sub>值达到1.0,工程菌最初培养温度30℃、发酵培养基初始pH 8.0、梯度诱导39℃培养0.5 h,40℃培养0.5 h,41℃培养1 h,42℃培养2 h。温度梯度诱导比直接诱导效率高,酶活力提高了20%,原因是梯度诱导不利于包涵体的形成。本研究构建的温控型工程菌在高温诱导下表现出较高的水解酶活力,而目前报道的工程菌表达量都不高<sup>[21]</sup>,并且大都是IPTG诱导产酶,生产成本高且IPTG不易去除;何飞燕等<sup>[22]</sup>建立以酚酞作指示剂,在琼脂固态培养基上筛选环糊精糖基转移酶高产突变株的平板快速筛选法,从土壤分离物中筛选到1株葡萄糖基转移酶产生菌gxmfl,37℃、250 r/min摇床发酵3 d,产酶活力为1 524 U/mL。曹新志等<sup>[23]</sup>对1株产环糊精糖基转移酶的嗜碱芽孢杆菌的发酵条件进行优化后,发酵液的酶活可达5 400 U/mL左右。本实验构建的温控型工程菌产酶活力虽然低于这些野生菌产酶活力,但由于该工程菌具有产酶周期明显较短的优势,因此该酶是有望在 $\beta$ -环糊精的酶法制备工业化生产中得到应用的。但还需进一步对异源高效表达的条件进行研究,提高重组酶活力,使该工程菌能够产业化,真正为国民经济服务。

### 参考文献:

- [1] 张洪斌,凌国庆,胡雪芹,等. N<sup>+</sup>注入诱变选育 $\beta$ -环状糊精葡萄糖基转移酶高产菌株及其发酵条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 239-245.
- [2] LI Zhaofeng, WANG Miao, WANG Feng, et al.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 77(2): 245-255.
- [3] ATANASOVA N, PETROVA P, IVANOVA V, et al. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 149(2): 155-167.
- [4] CHAROENSARDI R, MURAKAMI S, AOKI K, et al. Cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Paenibacillus* sp.T16 isolated from hot spring soil in Northern Thailand[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 40(3): 333-340.
- [5] AVCI A, DONMEZ S. A novel thermophilic anaerobic bacteria producing cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(1): 36-42.
- [6] ONG R M, GOH K M, MAHADI N M, et al. Cloning, extracellular expression and characterization of a predominant  $\beta$ -CGTase from *Bacillus* sp.G1 in *E.coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(12): 1705-1714.
- [7] 孙涛,江波,潘蓓蕾. 环糊精葡萄糖基转移酶的生产及其在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 387-391.
- [8] 王佳,冯建国,马超,等. 环糊精包合技术及其在农药制剂加工中的应用[J]. 农药学报, 2013, 15(1): 23-31.
- [9] SINGH M, SHARMA R, BANERJEE U C. Biotechnological applications of cyclodextrins[J]. Biotechnology Advances, 2002, 20(5): 341-359.
- [10] MARTIN del VALLE E M. Cyclodextrins and their uses: a review[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1033-1046.
- [11] HIRANO K, ISHIHARA T, OGASAWARA S, et al. Molecular cloning and characterization of a novel  $\gamma$ -CGTase from alkaliphilic *Bacillus* sp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 193-201.
- [12] PETROVA P, TONKOVA A, PETROV K. Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotransferase gene from the alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2139-2145.
- [13] LEE Yongsuk, ZHOU Yi, PARK Dongju, et al.  $\beta$ -Cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification and properties[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(5): 865-873.
- [14] TAKANO T, FUKUDA M, MONMA M, et al. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 166(3): 1118-1122.
- [15] 张洪斌,朱春宝,胡又佳,等. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 492-497.
- [16] DUEDAHL-OLESEN L, PEDERSEN L H, LARSEN K L. Suitability and limitations of methods for characterisation of activity of malto-oligosaccharide-forming amylases[J]. Carbohydrate Research, 2000, 329(1): 109-119.
- [17] 周峻沛,潘璐,李俊俊,等. 黑颈鹤粪便分离菌*Arthrobacter* sp.GN14的 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因克隆表达与酶学特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 611-619.
- [18] 方善康. 微生物试验技术[M]. 济南: 山东大学出版社, 1986: 35-46.
- [19] 徐砺瑜,唐雪明,沈微,等. 产1,3-丙二醇温控重组大肠杆菌JMI09(pBV220-yqhD-dhaB)的构建[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 108-112.
- [20] ZHOU Yi, LEE Y S, PARK I H, et al. Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by a gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides with  $\beta$ -1,4 linkage[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(2): 151-157.
- [21] XU Bo, HUANG Zunxi, CHEN Baoying, et al. Review on study advances on cyclodextrin glucanotransferase function[J]. Journal Food Science, 2007, 28: 600-604.
- [22] 何飞燕,廖威,莫于旺,林华.  $\beta$ -环状糊精葡萄糖基转移酶菌株的双重诱变育种[J]. 中国酿造, 2010, 29(4): 154-157.
- [23] 曹新志,金征宇. 嗜碱芽孢杆菌产环糊精糖基转移酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 122-126.