

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

陈龙军¹, 陈济琛¹, 林晓栩^{1,2}, 邱宏端², 林新坚¹, 蔡海松^{*1}

(1. 福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350003; 2. 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108)

摘要: 为实现新型 CGTase 在毕赤酵母中的高效表达, 提取嗜热芽孢杆菌 CHB1 基因组 DNA 为模块, PCR 扩增野生型基因 CGT1, 编码 680 个氨基酸。将该基因进行密码子优化 CGT2, 与野生型基因 CGT1 分别插入分泌型载体 pPICZαA 转化毕赤酵母 GS115, 获得两株酵母工程菌 GS115/pPICZαA-CGT1 和 GS115/pPICZαA-CGT2; 经甲醇诱导表达 120 h 后, CGT2 活力达 0.62 U/mL, 是优化前 CGT1 (0.37 U/mL) 活性的 1.7 倍; 进一步对 GS115/pPICZαA-CGT2 进行摇瓶发酵条件优化, 确定其最优发酵条件为: pH 6.5、28 °C、200 r/min、每 24 小时补加体积分数 1.5% 的甲醇诱导, 120 h 后其胞外酶活力达到 1.26 U/mL, 是优化前的两倍。

关键词: 嗜热芽孢杆菌 CHB1; 环糊精酶; 密码子优化; 毕赤酵母

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)09-0994-06

Codon Optimization and Expression of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Gebacillus* sp. CHB1 in *Pichia pastoris*

CHEN Longjun¹, CHEN Jichen¹, LIN Xiaoxu^{1,2}, QIU Hongduan², LIN xinjian¹, CAI Haisong^{*1}

(1. Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. College of Biological science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: To achieve high-level expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Gebacillus* sp. CHB1 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115, the DNA sequence (CGT1) encoding 680 amino acids was amplified. The CGT2 was synthesized based on the codon preference of *Pichia pastoris*. Then CGT1 and CGT2 were respectively fused to the pPICZαA and expressed in *Pichia pastoris*. Two strains (GS115/pPICZαA-CGT1 and GS115/pPICZαA-CGT2) were obtained. After methanol induction for 120 h in a shake flask, the enzyme activity of CGT2 reached 0.62 U/mL, 1.7 times higher than CGT1 (0.37 U/mL). Shake flask experiments were conducted to optimize the

收稿日期: 2016-01-24

基金项目: 国家公益性农业科研专项项目(201303094-05); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2014R1022-3); 福建财政社会公益研究项目(2060302); 福建省自然科学基金项目(2017J01056)。

作者简介: 陈龙军(1983—), 男, 福建泉州人, 工学硕士, 助理研究员, 主要从事生物化工、酶工程及发酵工程方面的研究。

Email: monkeyirene@163.com

*** 通信作者:** 蔡海松(1972—), 男, 福建福州人, 理学学士, 副研究员, 主要从事农业微生物方面的研究。Email: 13706989716@163.com

引用本文: 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(09): 994-999.

fermentation conditions. Highest enzyme activity achieved to 1.26 U/mL by induction for 120 h under the optimal conditions. (pH 6.5, 28°C, 200 r/min, inoculation amount of 1.5% methanol), two times higher than before.

Keyword: *Gebacillus* sp.CHB1, cyclodextrin glycosyltransferase, codon optimization, *Pichia pastoris*

环糊精(cyclodextrins, 简称 CD)作为一类重要的工农业原材料,广泛运用于食品、医药、化妆品和环保等领域^[1]。而环糊酶(cyclodextrin glycosyltransferase, 简称 CGTase)是生物酶法生产环糊精的重要工业用酶,它属于 α -淀粉酶家族中的一类复合型多功能酶^[2],能够催化环化反应、歧化反应、偶合反应和水解反应。根据现有的报道,CGTase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^[3-4]。

尽管不断有新的 CGTase 得到分离鉴定,但是天然菌株稳定性差、产酶量低、分离纯化困难、不易工业化等缺陷极大限制了 CGTase 的工业化应用。随着近代分子生物学及基因工程技术的发展,运用生物工程手段实现 CGTase 基因的异源超量表达成为国内外研究的热点。其中原核表达多有报道^[5-7],但真核酵母系统表达 CGTase 鲜见报道,目前仅见两篇文献^[8-9]有相关报道,表达效果亦不甚理想。毕赤酵母作为一种高效表达系统,遗传背景清晰,成功实现了多种外源蛋白质的高效表达,探索环糊精酶在毕赤酵母中表达的可行性具有重要意义。因此作者以前期从嗜热芽孢杆菌 CHB1 中分离获得的新型环糊精酶基因为基础,以毕赤酵母 GS115 为表达系统,通过密码子优化,比较密码子调整对环糊精酶表达效果的影响,以期实现其在毕赤酵母的异源表达,为该 CGTase 的实际应用提供理论与技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 嗜热芽孢杆菌 CHB1 (含新型环糊精酶基因)、*Escherichia coli* DH5 α :作者所在实验室保存;GS115、pPICZ α A:Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂与仪器 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA Mark、T₄ DNA 连接酶:TaKaRa 公司;DNA

切胶回收试剂盒、PCR 引物、博来霉素及质粒快速提取试剂盒:上海生工股份有限公司;其余试剂均为国产或进口分析纯。3-18K 低温高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司;PCR 仪:基因有限公司;蛋白质电泳仪:美国 BIO-RAD 公司;Multiskan FC 全自动酶标仪:美国 Thermo 公司。

1.1.3 培养基

1)地芽孢杆菌 CHB1 生长培养基(组分 g/L):大豆蛋白胨 10,牛肉浸膏 5,氯化钠 0.2;pH 7.0。

2)低盐 LB 培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸膏 5,氯化钠 5;固体培养基添加 2 g/dL 琼脂。

3)YPG 培养基(g/L):胰蛋白胨 20,酵母粉 10,甘油 20;固体培养基添加 2 g/dL 琼脂。

4)BMGY 培养基:蛋白胨 20 g,酵母浸出物 10 g,加入 500 mL 水,121°C 灭菌 20 min,冷至室温加入灭菌的 PBS 100 mL,10 $\times$ YNB 100 mL,500 $\times$ B 2 mL(过滤除菌),10 $\times$ GY 100 mL,定容到 1 L;

5)BMMY 培养基:蛋白胨 20 g,酵母浸出物 10 g,加入 500 mL 水,121°C 灭菌 20 min,冷却至室温加入灭菌的 PBS 100 mL,10 $\times$ YNB 100 mL,500 $\times$ B 2 mL(过滤除菌),甲醇 5 mL,定容到 1 L。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 和质粒的提取 地芽孢杆菌 CHB1 基因组 DNA 的提取参照 Zhou J^[10] 的方法进行。质粒的提取参照质粒提取试剂盒说明书的方法进行(上海生工股份有限公司)。

1.2.2 野生型环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆 根据地芽孢杆菌 CHB1 环糊精葡萄糖基转移酶基因(CGT1 基因)序列,设计上下游引物如下:

CGT-F1:5'-CTGAATTCGCTGGAATCTTAATAAGG-3'(下划线为限制性酶 *Eco*R I);

CGT-R1:5'-TGGCGGCCGCGTTTGGCAATTC ACTATAA-3'(下划线为限制性酶 *Not* I);

以地芽孢杆菌 CHB1 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增 CGT1 基因,扩增条件如下:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72

℃延伸 90 S, 30 个循环; 72 ℃后延伸 10 min; 4℃保存; PCR 产物进行 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检测, 通过胶回收纯化 PCR 产物, 16 ℃下与 pMD18-T 载体进行过夜连接, 连接产物转化感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 α , 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 同时提取 pMD18T-CGT1 质粒送至上海生工有限公司测序验证。

1.2.3 环糊精酶(CGT)基因密码子优化及克隆 根据 CGT1 的氨基酸组成, 考虑毕赤酵母的碱基偏好性^[1], 进行密码子优化, 同时在 CGT1 基因首末端分别引入限制性酶切位点 *EcoR* I 及 *Not* I, 将优化序列 CGT2 送至上海生工生物工程有限公司合成, 连入 pMD-18T 载体, 构建质粒 pMD18T-CGT2。

1.2.4 原始基因与优化基因表达载体及重组菌构建 载体 pMD18T-CGT1、pMD18T-CGT2 及 pPICZ α A 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切, 分别胶回收 CGT1、CGT2 基因片段及 pPICZ α A 线性载体; 参照 TaKaRa 公司 T4 DNA 连接酶使用说明书, 将 CGT1、CGT2 基因片段分别与 pPICZ α A 线性载体混合进行连接反应, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 经 25 μ g/mL 博来霉素抗性 LB 平板及菌落 PCR 鉴定, 构建重组酵母表达质粒 pPICZ α A-CGT1 和 pPICZ α A-CGT2; 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。

分别用限制性内切酶 *Sac* I、*Pme* I 对重组表达载体 pPICZ α A-CGT1 和 pPICZ α A-CGT2 进行线性化, 胶回收后, 利用电转化方法导入感受态毕赤酵母 GS115 中, 于 100 μ g/mL 博来霉素抗性 YPG 平板培养至转化子出现, 对转化子进行 PCR 验证。

1.2.5 重组酵母诱导表达 CGTase 效果比较 将筛选获得的环糊精酶重组工程菌分别接种在含有 100 mL YPG 培养基的 500 mL 摇瓶中, 在 200 r/min、30 ℃下培养 24 h; 以 5% 的接种体积分数接种于含有 200 mL BMGY 培养基的 500 mL 摇瓶中, 培养至 OD₆₀₀ 为 6~8。4 ℃、5 000 r/min 收集酵母细胞, 同时补加适量 BMMY 培养基重悬酵母, 以后每 24 小时取样测环糊精酶活力, 并补加 1% 甲醇。

1.2.6 环糊精酶摇瓶发酵条件优化 为提高环糊精酶在毕赤酵母中的表达效率, 作者对影响酵母表达的重要因素(诱导温度、pH 值、诱导甲醇体积分数等)进行优化。将重组菌接种于含 100 mL YPG 培

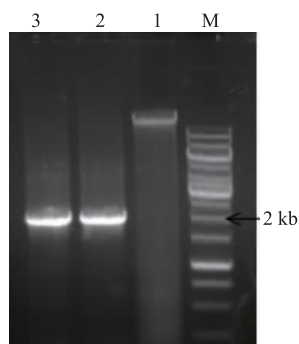
养基的 500 mL 摇瓶中。在 200 r/min、30 ℃下培养 24 h, 以 5% 的接种体积分数接种到含有 BMGY 培养基的 250 mL 的摇瓶中, 在 200 r/min、30 ℃下培养 24 h; 4 ℃、5 000 r/min 收集酵母细胞, 同时补加适量 BMMY 培养基重悬酵母。以后每 24 小时补加 1% 的甲醇进行诱导产酶。诱导温度分别设为 22、25、28、30、32 ℃; pH 设置为 4、5、5.5、6、6.5、7 共六个梯度; 甲醇体积分数梯度为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%; 诱导表达时间的优化以每 24 小时取样测定酶活性、OD₆₀₀ 来确定最佳发酵时间。每组设置 3 个平行实验, 分别测定环糊精酶活性和细胞密度 OD₆₀₀ 值。

1.2.7 环糊精酶活性测定 测定环糊精葡萄糖基转移酶活力的方法参照甲基橙褪色法^[1]并作适当改进。取 50 mmol/L pH 6.0 磷酸钠缓冲液配制的 3 g/dL 可溶性淀粉溶液 0.9 mL 于试管中, 将试管置于 60 ℃水浴锅内预热 2 min, 然后往试管内加入离心得到的发酵液上清液即粗酶液或适当稀释的纯酶液 0.1 mL, 反应 10 min, 加入 1.0 mL、1 mol/L 盐酸溶液终止反应, 再加入 0.1 mmol/L 的甲基橙溶液 1.0 mL, 振荡混匀后于 16 ℃保温 20 min, 用酶标仪于波长 505 nm 处测定溶液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 -环糊精的质量浓度。酶活性单位定义为: 60 ℃、pH 6.0 下, 每分钟催化产生 1 μ mol α -环糊精所需的酶量为一个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 嗜热芽孢杆菌基因组提取及原始环糊精酶基因克隆

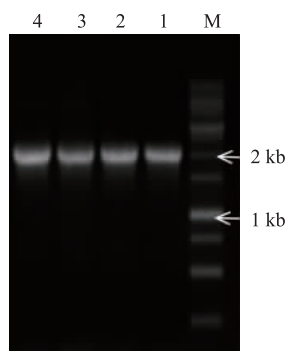
以嗜热芽孢杆菌 CHB1 的基因组 DNA 为模板, 以 CGT-F1 和 CGT-R1 为上下游引物扩增原始环糊精酶 CGT1, 电泳结果见图 1。扩增获得大小在 2 000 bp 左右的特异性 DNA 片段, 与目的基因片段大小(2 031 bp)一致。进一步进行基因测序, 结果显示扩增序列与原始环糊精酶 100% 一致, 至此, 成功获得大小和序列均正确的原始环糊精酶 CGT1。将克隆获得的 CGT1 与 pMD18T 连接, 通过 CGT-F1/CGT-R1 引物进行菌落 PCR 验证, 结果见图 2。在 2 kb 左右获得预期大小的 DNA 片段, 经测序后构建获得克隆载体 pMD18T-CGT1。



M:DL 1 kb DNA Marker;1:*Gebacillus* sp.CHB1 genome,2~3:CGT gene.

图 1 嗜热芽孢杆菌基因组及 CGTase 基因 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of CGT gene and *Gebacillus* sp.CHB1 genome



M:DL 1 kb DNA Marker;1~4:Colony PCR of CGT1

图 2 克隆载体 pMD18T-CGT1 菌落 PCR 验证

Fig. 2 Colony PCR validation of pMD18T-CGT1

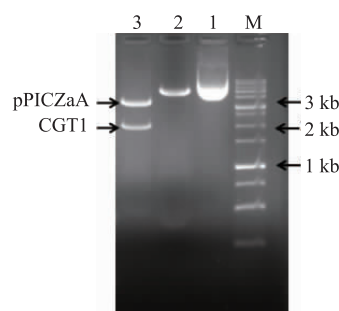
2.2 重组表达载体构建及验证

以 *EcoR* I 和 *Not* I 为双酶切体系,分别对载体 pMD18T-CGT1、pMD18T-CGT2 及 pPICZαA 进行双酶切,回收 2 000 bp (CGT1)、2 000 bp (CGT2) 及 3 600 bp 线性载体 pPICZαA。将回收片段 CGT1 和 CGT2 分别与线性载体 pPICZαA 连接,筛选克隆子进行菌落 PCR 验证,电泳结果见图 3。出现了预期大小的两条带;挑取 2、4 号克隆子提质粒送上海生工进行测序验证,由测序结果看出,原始基因 CGT1 和优化基因 CGT2,均正确插入到 pPICZαA,成功构建分泌型重组质粒 pPICZαA-CGT1 和 pPICZαA-CGT2。

2.3 重组环糊精酶毕赤酵母工程菌构建及验证

将重组表达质粒 pPICZαA-CGT1 和 pPICZαA-CGT2 经相应内切酶线性化后,分别电转化毕赤酵母,提取重组酵母基因组进行 PCR 验证,以酵母信

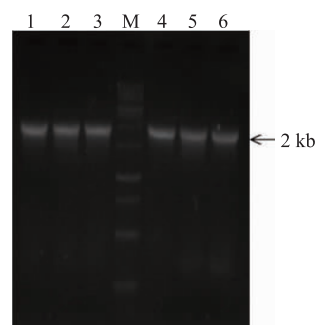
号肽为基础设计上游引物 α-factor (5'-CAAATTCGGCTGAAGCTGTCATC-3'),分别以 CGT-R1、CGT-R2 为下游引物,进行原始基因与优化基因的扩增验证,电泳结果见图 4。重组酵母可扩增得到大小 2 100 bp,与预期大小一致,同时将 PCR 产物送上海生工进行测序,结果显示环糊精酶基因已成功整合入酵母染色体,并处于分泌信号肽 α 因子下游;至此获得两株稳定遗传的环糊精酶重组毕赤酵母工程菌,GS115/pPICZαA-CGT1 和 GS115/pPICZαA-CGT2。



M:DL1kb DNA Marker;1:pPICZαA-CGT1;2:pPICZαA-CGT2 digested with *Pme* I;3:pPICZαA-CGT1 digested with *EcoR* I and *Not* I

图 3 重组载体 pPICZαA-CGT 构建

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of pPICZαA-CGT1 and pPICZαA-CGT2



M:DL1kb DNA Marker;1~3:PCR of CGT1;4~6:PCR of CGT2

图 4 重组酵母基因组 PCR 鉴定结果

Fig. 4 PCR of recombinant *Pichia pastoris*

2.4 重组菌诱导产酶效果比较

以相同的诱导条件,诱导重组酵母 GS115/pPICZαA-CGT1 与 GS115/pPICZαA-CGT2 表达环糊精酶,比较密码子优化前后环糊精酶的活性变化。由图 5 产酶曲线可看出,诱导 96 h 后酶活力趋于稳定,经过 120 h 诱导后,原始环糊精酶 CGT1 酵母胞外表达活性达到最高,为 0.37 U/mL,是张佳瑜^[9]

等表达的环糊精酶活性的 1.6 倍。而优化基因 CGT2 经过 120 h 后活性达到 0.62 U/mL, 是优化前 CGT1 活性的 1.7 倍, 说明通过碱基偏好性的优化, 将原始基因中的低频密码子优化成酵母表达系统中的高频密码子, 有利于提高环糊精酶在毕赤酵母中的表达量。

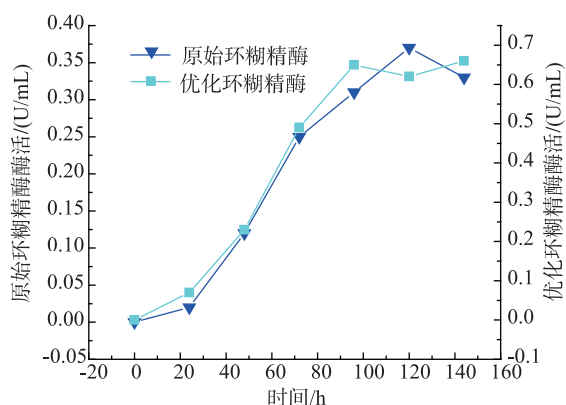


图 5 密码子优化前后环糊精酶工程菌表达效果比较

Fig. 5 Comparison of cyclodextrin enzyme activities between GS115/pPICZαA-CGT1 and GS115/pPICZαA-CGT2

2.5 重组菌发酵条件优化

对碱基优化后的环糊精酶工程菌 GS115/pPICZαA-CGT2 进行发酵条件优化, 以诱导发酵 120 h 为最佳诱导时间, 优化包括诱导温度、pH 及甲醇诱导体积分数等主要因素, 结果见图 6(a)。随着诱导温度的提升, 环糊精酶活性逐渐升高, 当诱导温度达到 28 °C, 环糊精酶活性达到最大值 0.76 U/mL, 随着温度继续升高, 活性逐渐下降, 究其原因可能是高温加速了酵母自身蛋白酶的表达, 导致环糊精酶蛋白被降解。不同 pH 对酵母表达外源蛋白具有重要影响, 结果见图 6(b)。环糊精酶胞外活性随着 pH 的逐渐升高, 呈现先上升后下降的趋势, 在 pH 6.5 时, 活性达到最高的 0.96 U/mL。甲醇作为碳源及诱导剂, 其添加量对环糊精酶的表达至关重要。由图 6(c)可知, 随着甲醇体积分数的增加, 酶活力及菌体量逐渐增加, 当甲醇体积分数大于 2% 时, 酶活力达到最大值, 随后逐渐降低, 可能是由于甲醇本身对酵母细胞的毒性, 过量的甲醇不利于表达外源蛋白质。通过主要条件的优化, 获得最佳发酵条件: pH 6.5, 温度 28 °C, 甲醇体积分数为每 24 小时 1.5%, 诱导 120 h 酶活力达到 1.26 U/mL, 是优化前的 2 倍。

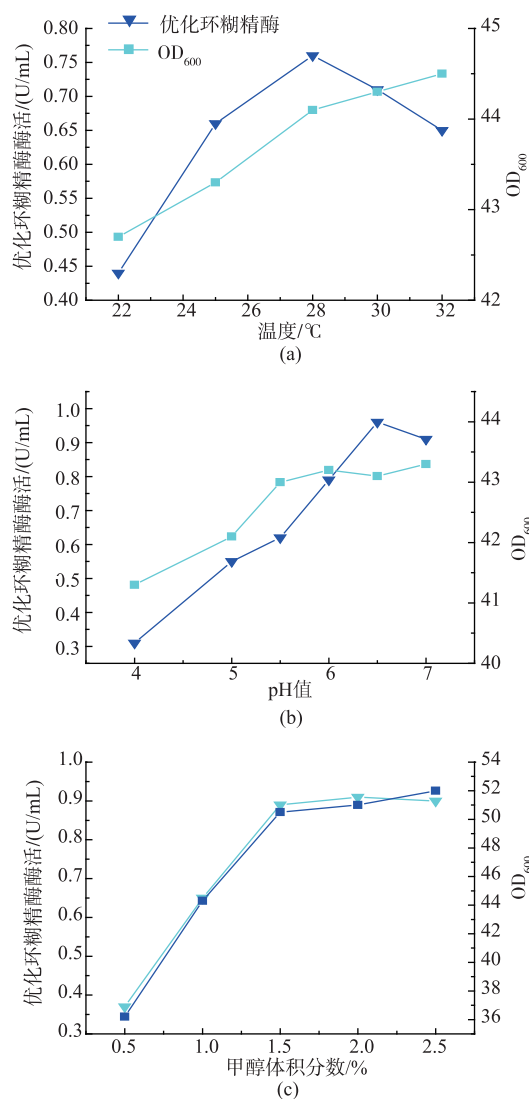


图 6 重组菌的发酵条件优化

Fig. 6 Optimization of fermentation conditions

3 结 语

作者从嗜热脂肪芽孢杆菌 CHB1 中扩增获得新型 CGT 酶基因全序列, 并实现了其在毕赤酵母中的异源表达。原始基因 CGT1, 在切除其自身信号肽, 插入 pPICZαA 表达载体的 α-Factor 信号肽之后, 转化毕赤酵母 GS115, 获得了基因工程菌 GS115/pPICZαA-CGT1, 其胞外环糊精酶活力为 0.37 U/mL, 高于张佳瑜^[9]等表达的环糊精酶活性。碱基密码子优化后的 CGT2, 通过同样手段构建获得工程菌 GS115/pPICZαA-CGT2, 其胞外酶活力达到 0.62 U/mL, 是优化前 CGT1 活性的 1.7 倍; 进一步对该重组菌进行发酵条件优化, 确定最优条件为 pH

6.5、28 ℃、200 r/min、每 24 小时补加 1.5% 的甲醇诱导,120 h 后其胞外酶活力达到 1.26 U/mL,是优化前的 2 倍。

许多研究表明,外源基因密码子优化对提高外源蛋白质表达量具有显著作用,可提高几倍甚至数十倍^[13-15]。本研究通过毕赤酵母密码子优化网站(<http://www.kazusa.or.jp/>、<http://www.genscript.com>等)及赵翔^[11]关于毕赤酵母密码子的分析,对野生环糊精酶基因密码子在毕赤酵母中的使用频率进行分析,发现毕赤酵母低频率密码子在该基因中所占比例高达 11%,经过密码子优化后低频密码子使用频率降至 6%,其酵母表达活性相应提高了 1.7 倍,说明密码子优化对 CGT 的表达效率确实有一定促

进作用,但表达仍不甚理想,亦低于前期大肠杆菌的表达效果。进一步通过氨基酸序列分析,发现在环糊精酶 AA 序列中含有多达 11 个潜在糖基化位点序列 Asn-Xaa-Thr/Ser (其中 aa 代表所有氨基酸);这些位点可能导致环糊精酶在毕赤酵母内被过度糖基化,从而影响了环糊精酶的活性。下阶段考虑对酶蛋白实施去糖基化改造,考察糖基化对酶活力的具体影响;同时优化其他相关因素如信号肽、表达载体、表达宿主等,最大限度提高其在酵母中的表达效果。另外,鉴于本研究的环糊精酶基因来自芽孢杆菌,考虑通过芽孢杆菌同源表达系统实现该环糊精酶的高效表达,为环糊精酶的实际应用奠定基础。

参考文献:

- [1] 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[D]. 无锡:江南大学,2009.
- [2] LI Z F, WANG M, WANG F, et al. Gamma-cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications[J]. *Apply Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 245-255. (in Chinese)
- [3] JIN Zhengyu, BAI Yuxiang, WANG Jinpeng. Screen and modification of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(2): 113-123. (in Chinese)
- [4] HU Jing, CHEN Yuru, WEI Xia, et al. Screening, Optimized fermentation and enzymatic properties of a *Bacillus subtilis* producing cyclomaltodextrin glucanotransferase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(4): 97-102. (in Chinese)
- [5] JARUNEE K, WANIDA P, VICHIEEN 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.
- [6] PENKA P, ALEXANDRA T, KALOYAN P. 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.
- [7] 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.
- [8] 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. (in Chinese)
- [9] ZHANG Jiayu, WU Dan, LI Zhao Feng, et al. Expression of *Paenibacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*[J]. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1948-1954. (in Chinese)
- [10] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [11] ZHAO Xiang, HUO Keke, LI Yuyang. Codon usage analysis in *Pichia pastoris*[J]. *Chin J Biotech*, 2000, 16(3): 308-311. (in Chinese)
- [12] LEJEUNE A, SAKAGUCHI K, IMANAKA T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 181(1): 6-11.
- [13] YANG J, LIU L. Codon optimization through a two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger* lip2 gene in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 63(3): 164-169.
- [14] WU A B, CHEN H D, TANG Z Z, et al. Synthesis of drosophila melanogaster acetylcholinesterase gene using yeast preferred codons and its expression in *Pichia pastoris*[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175(1): 403-405.
- [15] CHEN Hui, ZHAO Haixia, WANG Hongning, et al. Increasing expression level of phytase gene (phyA) in *Pichia pastoris* by changing rare codons[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(2): 171-175. (in Chinese)