

定点突变提高毕赤酵母产葡萄糖氧化酶的氧化稳定性

闻一凡^{1,2}, 顾磊^{1,2}, 张娟^{1,2}, 堵国成^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过定点突变的方法, 将来源于黑曲霉 *Aspergillus niger* 的葡萄糖氧化酶的甲硫氨酸替换为亮氨酸, 以期提高葡萄糖氧化酶的耐氧化性。野生型的葡萄糖氧化酶和突变酶 M305L、M524L、M556L 和 M582L 的基因分别在巴斯德毕赤酵母中分泌表达, 对突变酶与野生型葡萄糖氧化酶纯化后进行性质比较。结果表明: 突变酶的耐氧化性与野生型葡萄糖氧化酶相比均有不同程度的提高, 其中, 突变酶 M556L 在 100 mmol/L 和 500 mmol/L 过氧化氢存在下的氧化稳定性是野生型葡萄糖氧化酶的近 2 倍, 且催化效率 (k_{cat}/K_m) 提高至野生型葡萄糖氧化酶的 2.08 倍。定点突变后, 突变酶的最适反应温度为 35 °C, 与野生型葡萄糖氧化酶基本保持一致, 同时, 突变酶 M524L 的 pH 稳定范围由 4.0~6.0 扩展到 3.0~7.0。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 重组; 定点突变; 黑曲霉; 巴斯德毕赤酵母

中图分类号: Q 939.97 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)12—1260—08

Enhancing Oxidative Stability of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* by Site-Directed Mutagenesis

WEN Yifan^{1,2}, GU Lei^{1,2}, ZHANG Juan^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Aiming to improve the catalytic activity and oxidative stability of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. This work conducted site-directed mutagenesis based on an analysis of the protein structure. Four methionines (M582L, M524L, M556L and M305L) were selected as the mutation sites and individually replaced with leucine. The native GOD and the mutated GOD were separately expressed in *P. pastoris* GS115. In the presence of H₂O₂ (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, and 500 mM) at 35 °C for 2 h, the oxidative stability of the mutants increased compared to the wild-type under most of the circumstances. Meanwhile, M556L showed a higher (2 folds than the wild-type) oxidative stability of all in the presence of both 100 mM and 500 mM H₂O₂ for 2 h. Compared to the wild-type enzyme, the k_{cat}/K_m value of M556L increased (2.08 folds than the wild-type). The thermol stability of the mutants remained unchanged while the stable pH range of M524L was extended from

收稿日期: 2014-09-27

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100905); 国家自然科学基金项目(31470160)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术、代谢工程技术方面的研究。E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

4.0-6.0 to 3.0-7.0 compared to the wild-type. It is a fact that a more stable enzyme with higher oxidative stability is an ideal choice in most of the industrial application of GOD.

Keywords: recombinant, glucose oxidase, site-directed mutagenesis, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*

葡萄糖氧化酶 (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; EC1.1.3.4, 简称 GOD) 是一种富含糖基的黄素蛋白, 它利用分子氧作为电子受体, 专一性催化 β -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢^[1]。葡萄糖氧化酶的主要来源是黑曲霉, 但黑曲霉产葡萄糖氧化酶酶活低、催化效率低、杂蛋白质多, 使得其在实际应用中有一定的局限性^[2-3]。目前毕赤酵母表达系统是倍受关注的真核表达系统, 将黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在该系统中进行表达在近年来屡见不鲜。

GOD 在食品保鲜、葡萄糖酸生产等工业领域有重要的应用价值^[4]。在制药领域中, GOD 可用来检测葡萄糖含量; 在食品工业中用来除去葡萄糖或者氧气以提高各种产品的色泽、味道等, 同时由于反应产生过氧化氢, 也可起到杀菌作用^[1,5]。在食品添加剂领域作为抗菌剂的应用中, GOD 的作用原理主要是产生的过氧化氢具有杀菌作用, 然而, 过氧化氢的积累会抑制 GOD 的活性而影响其本身的催化效率。研究发现, 当过氧化氢浓度达到 30 mmol/L 时就会对 GOD 活性产生抑制作用^[6]。提高 GOD 对氧的耐受性可使该酶在应用中更加稳定。

近年来, 国内外有很多关于提高酶耐氧化性的研究, 其中包括用抗氧化性较强的氨基酸取代甲硫氨酸的方式来减少由于氨基酸残基被氧化而引起的酶活降低甚至失活^[7]。来自嗜热脂肪土芽孢杆菌属 US110 的 α -淀粉酶 197 位蛋氨酸被置换为丙氨酸后, 该突变体在 1.8 mol/L 的 H_2O_2 的存在下处理 60 min 后保留了 70% 的活性^[8]。Peng 等人^[9]通过将 N-酰基-D-氨基酸酰胺水解酶 221 位蛋氨酸替换为亮氨酸后, 酶催化效率 k_{cat}/K_m 提高了 2.4 倍。

葡萄糖氧化酶的定向分子改造方面有很多相关研究^[10-12], 但在提高其耐氧化性方面鲜有报道。另外, 有文献报道, 葡萄糖氧化酶的每个单体中除辅酶 FAD 外, 有 3 个关键氨基酸残基参与催化反应, 即 412 位的谷氨酸残基和 516、559 位的组氨酸残基。有多个证据指明 His516 是主要催化基团^[13-14]。

作者在前人研究的基础上, 选择靠近关键氨基酸残基的 M305, M524, M556 和 M582 等 4 个可能的关键点进行定点突变体的构建以提高葡萄糖氧化酶的氧化稳定性和催化效率。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

葡萄糖氧化酶基因 GOD: 由作者所在实验室从黑曲霉 *Aspergillus niger* BBE11721 中获得并构建在重组毕赤酵母表达载体 pPIC9K-GOD 上; 菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109, 载体 pPIC9K(amp+) 和毕赤酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115(His-); 均由作者所在实验室保存。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0。添加氨苄青霉素 0.1 mg/mL 用于质粒筛选。

1.2.2 YPD 培养基 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L。一般用于种子活化。

1.2.3 BMGY 生长培养基 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 甘油 10 g/L, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0。一般用于发酵基本培养。

1.2.4 BMMY 诱导培养基 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 甲醇体积分数 1%, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0。一般用于发酵诱导培养。

1.2.5 MD 培养基 YNB 13.4 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 20 g/L。添加遗传霉素 0.25 mg/mL, 用于阳性转化子初筛。

1.3 工具酶和生化试剂

Phusion high-fidelity DNA polymerase、限制性内切酶 *DpnI* 和限制性内切酶 *MspI*; Thermo Scientific 公司; DNA 相对分子质量标准、质粒提取试剂盒和 YNB; 上海生工生物公司; 葡萄糖; 国药集团化学试剂有限公司; 邻联茴香胺、葡萄糖氧化酶、

辣根过氧化物酶:Sigma 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.4 方法

1.4.1 培养方法

1) *E. coli* 种子培养条件:培养基装液量为 10%,采用 250 mL 摇瓶进行培养,培养温度为 37 °C,培养时间为 10 h,转速为 200 r/min。

2) *P. pastoris* 种子培养条件:种子甘油管保藏在 -80 °C 超低温冰箱中,划线活化菌种后,挑单菌落,接种于 50 mL YPD 中(50 mL 培养基/500 mL 三角瓶中),于 30 °C、200 r/min 培养 24 h。

3) *P. pastoris* 发酵培养条件:将培养好的种子液接种到 50 mL(500 mL 三角瓶)液体生长培养基 BMGY 中,其中接种体积分数为 10%。置于摇床中,培养温度为 30 °C,转速为 200 r/min。培养 24 h 后离心收集全部菌体,生理盐水洗涤 2 次,重悬后菌体全部转入 50 mL(500 mL 三角瓶)液体诱导培养基 BMMY 中,置于 30 °C、200 r/min 摇床培养,每 24 小时补加体积分数 1% 的甲醇,诱导产酶。

1.4.2 定点突变 以重组质粒 pPIC9K-GOD 为模板,设计突变引物,进行全质粒 PCR。反应体系含 5×FD PCR buffer 5 μL, DNTP Mixture 2 μL, 模板 DNA 1 μL, 上游引物各 1 μL, Phusion 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL, 加双蒸水至终体积为 25 μL。5×FD PCR buffer 5 μL, DNTP Mixture 2 μL, 模板 DNA 1 μL, 下游引物各 1 μL, phusion 酶 0.5 μL, DMSO 1.5 μL, 加双蒸水至终体积为 25 μL。反应 5 个循环后,将对应 PCR 反应液混合,继续反应 25 个循环。PCR 条件:8 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 15 s;53 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 11 min(5 个循环);72 °C 延伸 10 min。混合后扩增条件:98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 15 s;53 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 11 min(25 个循环);72 °C 延伸 10 min。PCR 产物 DpnI 消化,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布在含氨苄青霉素 LB 平板上。挑取阳性克隆子培养后测序。

1.4.3 重组葡萄糖氧化酶工程菌的构建与表达 将测序成功突变质粒 pPIC9K-GOD 用 *MssI* 单酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母 *P. pastoris* GS115,转化液涂布于 MD 平板上,30 °C 培养至转化子出现。挑取 200 个转化子,点种到含 0,1.0,1.5,2.0,2.5 g/L 的遗传霉素(G418)的 YPD 培养基平板上,30 °C 同步培养 2 d 后,鉴定转化子的 G418 抗性,在

含高浓度遗传霉素(G418)平板上生长较好的为高拷贝阳性转化子,将被用于后续发酵表达。电转化及筛选方法参见操作手册^[15]。由于 G418 抗性水平大致依赖于所整合的细菌卡那霉素基因数目,因而也反映了重组质粒的整合拷贝数。

将筛选获得的高拷贝酵母工程菌作为生产菌株,将其接种于 YPD 培养基中进行种子活化,在 30 °C、200 r/min 下培养 24 h,然后以 10% 接种体积分数转接到基本发酵培养基 BMGY 中,并在 30 °C、200 r/min 下培养 24 h。然在 BMGY 培养基中培养到 OD₆₀₀ 为 1.6~1.7 时转入 50 mL (500 mL 三角瓶)液体诱导培养基 BMMY 中,置于 30 °C、200 r/min 摇床培养,每 24 小时补加体积分数 1% 的甲醇,诱导产酶,每隔 12 小时取样,即为粗酶液。以表达野生型,即未经突变的产重组 GOD 的 *P. pastoris* GS115 为对照菌株。

1.4.4 葡萄糖氧化酶的纯化 将酶液于 4 000 r/min 离心 5 min,收集发酵上清液,置于 10 000 的透析袋中,在 1 L A 液(20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液)中进行透析除盐,以保证阴离子交换柱的吸附性质。收集透析后的发酵液,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。蛋白质的纯化采用 Hitrap™ Q FF(1 mL)阴离子交换层析柱。使用 B 液(20 mmol/L 磷酸二氢钠-1M 氯化钠溶液)梯度洗脱,流速 1 mL/min,分步收集洗脱峰中的样品,经过酶活测定,确定目的样品所在的收集管,得到电泳纯的目标蛋白质。

1.5 分析方法

1.5.1 葡萄糖氧化酶酶活测定 酶活力单位定义:在 35 °C、pH 6.0 的条件下,1 min 从 1 μmol 的 β-D-葡萄糖氧化成 D-葡萄糖酸和 H₂O₂ 所需的酶量为 1 个葡萄糖氧化酶酶活力单位,以 U/mL 表示。葡萄糖氧化酶酶活测定方法见文献[16]。

1.5.2 蛋白质质量浓度的测定 用 Bio-Rad 公司生产的 Bradford 蛋白质质量浓度测定试剂盒测定,以 BSA 作标准曲线。

1.5.3 米氏常数(K_m),催化效率(k_{cat}/K_m)的测定 在 35 °C、pH 6.0 的条件下,以 β-D-葡萄糖和苯醌为催化反应底物,改变葡萄糖浓度(2~100 mmol/L)和苯醌浓度(0.5~10 mmol/L)。分别测定 GOD 酶活力随时间变化曲线,获得 GOD 酶动力学常数 K_m 和 V_{max} ,同时计算 k_{cat} 。酶液统一蛋白质质量浓度至 100 μg/mL。

1.5.4 酶的耐氧化性测定 用 Brandford 试剂盒将野生型葡萄糖氧化酶和突变酶的酶液统一到同一蛋白质质量浓度,采用无载体交联技术固定化野生型葡萄糖氧化酶与突变酶。取 100 μL 酶液,加入通用过氧化物酶,缓慢滴加聚乙二醇 2 000,之后加入 25% 戊二醛,将混合物放入摇床(30 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min)培养,用 10 mmol/L 丙二酸钠缓冲液(pH 5.0)充分悬浮混合液,8 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,并重复上述操作,直到上清液中无法检测到酶活。

将固定化后的野生型葡萄糖氧化酶和突变酶放在不同浓度 H_2O_2 (10、20、50、100、500 mmol/L) 中处理,处理温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,处理时间为 2 h,缓冲液为丙二酸钠缓冲液(pH 5.0, 10 mmol/L)。处理后离心,倒掉上清液,并用缓冲液洗沉淀直到上清液中无法检测到过氧化氢。将沉淀用等体积的缓冲液溶解,离心并充分重悬后测定剩余酶活。

1.5.5 最适 pH 值和酸碱稳定性的分析 测定不同 pH 条件对葡萄糖氧化酶酶活力和稳定性影响时, pH 范围为 2.0~9.0,所需不同 pH 的缓冲液包括:pH 为 2.0~8.0 时 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液;pH 为 9.0 时采用 20 mmol/L Tris-盐酸缓冲液。pH 对葡萄糖氧化酶稳定性测定时,处理条件为将高浓度纯化后的葡萄糖氧化酶用不同 pH 的缓冲液溶解,35 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h,测定相应残留酶活力。相对酶活力(100%)的定义为不同 pH 处理条件下,最高酶活力为 100%。

1.5.6 最适温度和热稳定性的分析 测定葡萄糖氧化酶最适反应温度时,温度变化范围为 10~70 $^{\circ}\text{C}$,缓冲液为柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.5, 20 mmol/L)和柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0, 20 mmol/L)。葡萄糖氧化酶的温度稳定性测得的条件为 55、60、65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min,缓冲液为柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.5, 20 mmol/L)和柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0, 20 mmol/L)。相对酶活力(100%)的定义为不同反应温度条件下,测得的最高酶活力为 100%。

2 结果与讨论

2.1 突变位点的确定

据报道,多种酶在应用过程中氧化失活的主要原因是甲硫氨酸(Met)残基在强氧化环境下会被氧化成其含硫衍生物^[17]。位于活性位点周围的甲硫氨

酸,氧化后生成的含硫衍生物支链形状较大。较大的含硫衍生物会导致酶活性位点立体阻碍,致使酶与底物不能完美结合,酶活力会降低甚至失活。为了提高葡萄糖氧化酶耐氧化特性,可以采用不易被氧化且体积较小氨基酸进行突变,例如亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、异亮氨酸(Ile)、丙氨酸(Ala)、苏氨酸(Thr)^[18]。理论上来说,甲硫氨酸突变为亮氨酸,提高蛋白质的疏水性,减少空间位置阻力,增强酶和底物的相互作用,在酶促反应中,底物过渡态的电荷与酶蛋白活性中心附近的电荷有相互作用,蛋白质细微结构的变化也会影响到基态和过渡态之间的能量差,而影响反应的活化能。葡萄糖氧化酶反应包括氧化半反应和还原半反应,有多个证据指明 His516 是主要催化基团。His516, His559 和 Glu412 是参与酶反应的关键氨基酸残基。通过对 GOD 酶分子 3-D 结构分析发现, M305, M524, M556 和 M582 是位于活性位点周围的 4 个 Met 位点,见图 1。对这 4 个 Met 残基的分子改造可能对葡萄糖氧化酶耐氧化提高具有关键性的作用。

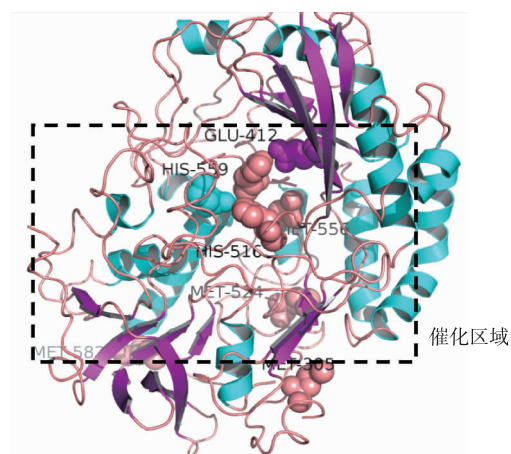


图 1 葡萄糖氧化酶蛋白质结构分析

Fig. 1 Model structure of glucose oxidase

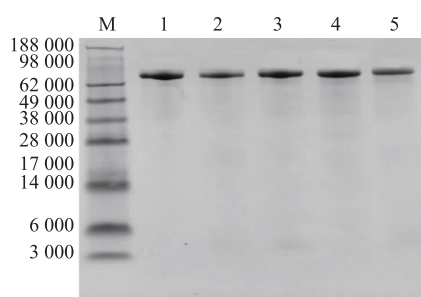
2.2 重组葡萄糖氧化酶菌株的构建、筛选表达和重组葡萄糖氧化酶的纯化

以含有野生型葡萄糖氧化酶基因的重组质粒 pPIC9K-GOD 为模板,利用互补 PCR 引物扩增,得到含有突变的双链环,转化 *E. coli* JM109 中。通过氨苄抗性筛选和测序分析,确定突变位点与目标设计的突变位点一致。

将测序正确的 4 个突变体转化到 *P. pastoris* GS115 中进行表达。通过利用不同浓度梯度的遗传

霉菌的平板筛选方法,筛选到具有高拷贝数的阳性转化子,并通过摇瓶发酵使得突变酶分泌表达。

突变体粗酶液经过阴离子柱纯化后,收集的酶蛋白质的 SDS-PAGE 电泳结果显示单一条带,说明已经纯化到相对分子质量约为 66 000 的均一目的蛋白质条带,从而可以进行下一步的酶学性质研究,见图2。



M: 蛋白质 marker; Lane 1: 突变株 M524L; Lane 2: 突变株 M556L; Lane 3: 突变株 M582L; Lane 4: 突变株 M305L; Lane 5: 野生型

图 2 GOD 纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of glucose oxidase

2.3 突变酶与野生型葡萄糖氧化酶耐氧化性比较

对于确定酶的耐氧化性的方法,目前较常用的是比较其不同浓度过氧化氢条件下的稳定性。葡萄糖氧化酶在反应过程中会产生过氧化氢,酶活测定原理一般是通过测定所产生的过氧化氢的量来计算酶活,如果直接用液体酶液,在测定剩余酶活时会产生误差。因此,首先通过无载体交联固定化的方法将葡萄糖氧化酶固定,把固定化酶放入不同浓度的过氧化氢中一段时间后,将固定化酶离心,用缓冲液洗涤,重悬,然后测定固定化酶的剩余酶活,比较分子改造后的酶与野生型葡萄糖氧化酶的氧化稳定性。

对不同浓度 H_2O_2 条件下葡萄糖氧化酶稳定性变化见图 3。随着 H_2O_2 浓度逐渐升高,葡萄糖氧化酶酶活残留逐渐降低。同时相比于野生型葡萄糖氧化酶,突变酶的耐氧化性均有不同程度的提高。其中突变酶 M556L 在 100 mmol/L 和 500 mmol/L 过氧化氢存在下是对照酶的两倍。

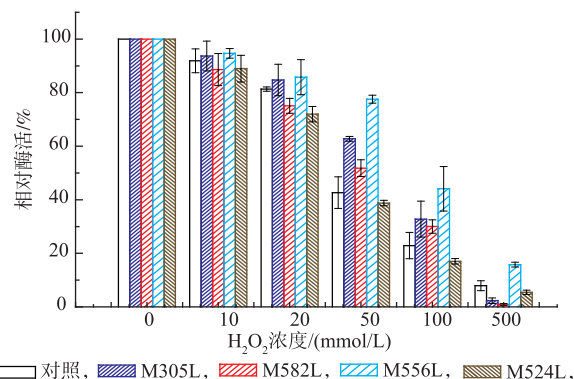


图 3 野生型葡萄糖氧化酶与突变酶的耐氧化性比较

Fig. 3 Oxidative stability of the wild-type and glucose oxidase mutants

结果表明, Met 残基在酶氧化敏感性方面的关键性。当 Met 556 被 Leu 替代时,突变体酶的耐氧化性提高幅度最大。由此可以推断, Met 556 应该是 GOD 耐氧化性提高的关键位点。Met 残基被氧化后氧化衍生物侧链体积增大,导致活性位点空间位阻,由此可以致使酶活力降低甚至失活。Met 305 位点虽然不位于酶催化区域中心,但其在酶催化中心附近,该位点被替代后突变体耐氧化性也获得较大提高。

2.4 突变酶与野生型葡萄糖氧化酶的反应动力学比较

表 1 显示, M556L 和 M305L 的比酶活与野生型葡萄糖氧化酶相比都有所提高,其中突变酶 M556L 和 M305L 比酶活分别提高至野生型葡萄糖氧化酶

表 1 野生型葡萄糖氧化酶和突变酶的比酶活及动力学常数

Table 1 Kinetic parameters and specific activities of GOD and its mutants

酶	比酶活/(U/mg)	K_m /(mmol/L)	k_{cat}/s^{-1}	$(k_{cat}/K_m)/(mmol/(L \cdot s))$
对照	120.14±1.13	35.71±0.57	570.31±4.58	15.97±0.31
M524L	19.71±0.03	34.81±2.54	556.14±1.27	15.98±6.77
M305L	152.92±1.23	17.67±0.57	314.08±2.81	17.78±0.69
M556L	179.75±0.03	20.89±3.60	693.91±2.16	33.21±0.81
M582L	24.09±0.99	21.02±1.00	312.78±3.21	14.88±0.98

注:表中酶学常数均是针对底物葡萄糖而言的。酶动力学数据为 3 次重复实验的结果。

的1.5倍和1.25倍;与野生型葡萄糖氧化酶相比,4个突变体的 K_m 均降低,酶的 K_m 值与酶底物结合能力相关。一般来说,Leu是小分子氨基酸,利用小分子氨基酸对其他大分子氨基酸进行突变会导致酶的底物结合能力增加,其原因可能是由于突变后酶催化位点周围静电作用导致的。

多数情况下,耐氧化性定点突变可能会导致酶的转化数降低,突变体底物结合能力增强,从而导致酶 k_{cat}/K_m 增大。突变酶M556L和M305L的催化效率均有所提高,其中,M556L是对照菌株所产酶的2.08倍,M524L基本不变,而M582L略微降低。其中M556L在亲和力提高了41.5%的情况下,转化数也稍有提高,为21.7%。这可能是由于M556L比较靠近活性中心的关键催化氨基酸。类似的例子有Holland等通过对黑曲霉GOD基因进行饱和和突变发现,当132位的苏氨酸突变成丝氨酸时,特异性常数 k_{cat}/K_m 从8.39 mmol/(L·s)提高为23.8 mmol/(L·s),同时对底物亲和力降低了3%^[19]。本研究中突变酶M556L在未损失对底物亲和力的同时,催化效率有所提高,具有较好的效果。

2.5 突变酶与野生型葡萄糖氧化酶酶学性质比较

2.5.1 最适pH值和酸碱稳定性的分析 在35℃下测定野生型葡萄糖氧化酶和突变酶在pH 2.0~9.0时的酶活性,确定GOD的最适pH值,结果见图4。葡萄糖氧化酶GOD耐氧化性分子改造前后,与野生型葡萄糖氧化酶相比,M524L和M556L最适pH无明显变化,突变酶M305L、M582L的略有降低。

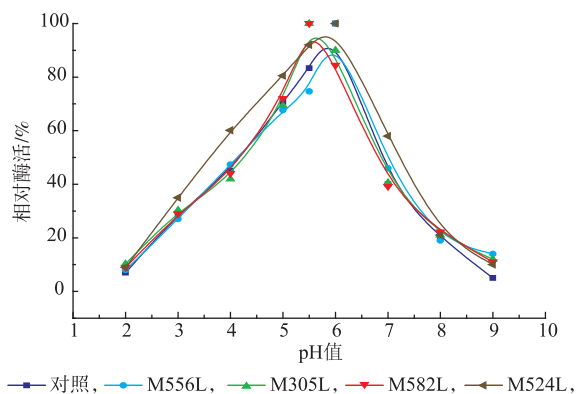


图4 不同pH对GOD和突变体酶活性的影响

Fig. 4 Optimum pH value of the wild-type and glucose oxidase mutants

酸碱稳定性结果见图5。分子改造后突变体

M305L、M582L稳定pH范围与野生型葡萄糖氧化酶相比较,没有发生显著变化。突变体M524L的稳定pH范围由5.0~6.0变宽至4.0~7.0。同时突变体M524L在pH 4.0或7.0条件下稳定性也增强显著。在pH 4.0条件下处理后,酶活残留由野生型葡萄糖氧化酶的45.0%提高至60.1%;在pH 7.0条件下处理后,酶活残留由野生型葡萄糖氧化酶的40.2%提高至58%。通常来说,大部分酶的pH作用范围都比较窄,黑曲霉来源的葡萄糖氧化酶的pH作用范围一般是5~6,偏酸性。pH稳定性的提高对葡萄糖氧化酶实际应用有重要作用。

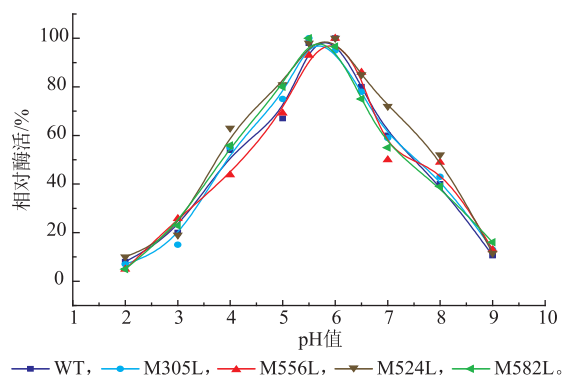


图5 不同pH对GOD和突变体稳定性的影响

Fig. 5 pH stability of the wild-type and glucose oxidase mutants

2.5.2 最适温度和热稳定性的分析 酶对温度的改变非常敏感,酶活与温度的变化一般是呈指数变化的。测定10、20、30、40、50、60、70℃的突变酶的酶活力,确定突变酶的最适反应温度。温度对突变酶酶活的影响见图6。突变酶的最适温度是35℃,与野生型葡萄糖氧化酶相比基本不变。

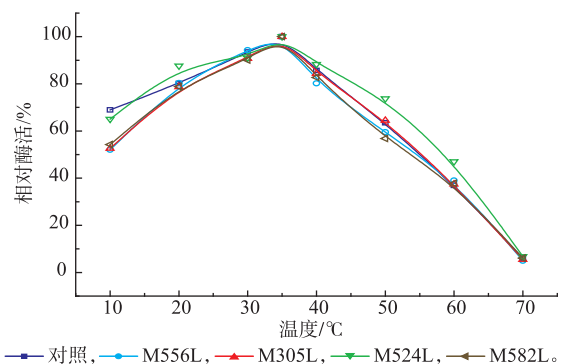


图6 野生型葡萄糖氧化酶与突变酶的最适反应温度比较

Fig. 6 Optimum temperature of the wild-type and glucose oxidase mutants

将野生型和突变株酶液分别放置于不同温度中保温 30 min 后,迅速放置冰上,并测定野生型葡萄糖氧化酶与突变酶的剩余酶活,评价酶的热稳定性。如图 7 所示,野生型葡萄糖氧化酶与突变酶的酶活均有所降低,与野生型葡萄糖氧化酶相比,突变 M524L 的热稳定性更高,在 60 °C 的条件下能够保持 52% 的酶活力,同时 M556L 的热稳定性与野生型葡萄糖氧化酶相比也有所提高,在 60 °C,剩余酶活由 40% 提高到 50%。

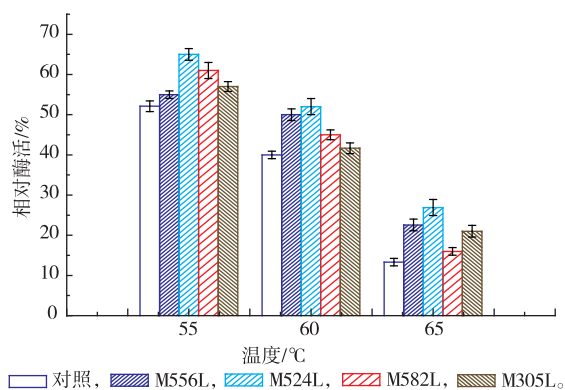


图 7 野生型葡萄糖氧化酶与突变酶热稳定性比较

Fig. 7 Thermostability of the wild -type and glucose oxidase mutants

3 结 语

Met 305、Met 556、Met 524 和 Met 582 氨基酸残基分别通过单点突变替代成 Leu 后,突变体耐氧化性均有所提高。这进一步证明位于活性位点周围的 4 个 Met 位点对该酶的耐氧化性提高具有重要影响。活性中心附近的氨基酸残基的氧化是酶活受到抑制的原因之一,氨基酸替换可以增强酶的耐氧化性,提高酶的稳定性。

多数情况下,耐氧化性定点突变会导致突变体底物结合能力增强,从而引起酶 k_{cat}/K_m 增大,提高酶的催化能力。这一观点在本研究中得到了进一步的验证。突变株 M556L 在未损失酶与底物亲和力的情况下产酶的催化效率是野生型葡萄糖氧化酶的 2.08 倍,这使得该突变株非常具有应用前景。底物结合能力增加可能是由于突变后酶催化位点周围静电作用导致的。

葡萄糖氧化酶在实际应用中易被氧化、稳定性差的报道较多,但并未提到具体的解决方法以提高该酶的耐氧化性。作者参考了其它酶的研究方法,通过一定的改进,对葡萄糖氧化酶的定向改造进行探讨,提高了该酶对过氧化氢的耐受力,获得了稳定性好、催化效率高的突变体,为其工业化应用奠定了基础,也为今后对该酶的研究提供了新的线索和方向。

参考文献:

- [1] BANKAR S B, BULE M V, SINGHAL R S, et al. Glucose oxidase-an overview[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 489-501.
- [2] CAVALCANTI A, SHIRINZADEH B, KRETLY L C. Medical nanorobotics for diabetes control[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2008, 4: 127-138.
- [3] LIU Q, XU X, REN G, et al. Enzymatic biofuel cells[J]. *Prog Chem*, 2006, 18: 1530-1537.
- [4] WONG C M, WONG K H, CHEN X D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78: 927-938.
- [5] BHATTI H N, SALEEM N. Characterization of glucose oxidase from *Penicillium notatum*[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2009, 47: 331.
- [6] BAO J, KOUMATSU K, FURUMOTO K. Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 22: 33-41.
- [7] YANG H, LIU L, WANG M, et al. Structure-based engineering of methionine residues in the catalytic cores of alkaline amylase from *Alkalimonas amylolytica* for improved oxidative stability[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 7519-7526.
- [8] KHEMAKHEM B, ALI M B, AGHAJARI N, et al. Engineering of the α -amylase from *Geobacillus stearothermophilus* US100 for detergent incorporation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102: 380-389.
- [9] PENG I, LO K Y, HSU C H, et al. Increasing the storage and oxidation stabilities of N-acyl-D-amino acid amidohydrolase by

- site-directed mutagenesis of critical methionine residues[J]. **Process Biochemistry**, 2012, 47: 1785-1790.
- [10] ZHU Z, WANG M, GAUTAM A, et al. Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer[J]. **Biotechnology Journal**, 2007, 2: 241-248.
- [11] PRODANOVIC R, OSTAFE R, SCACIOC A, et al. Ultrahigh throughput screening system for directed glucose oxidase evolution in yeast cells[J]. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 2011, 14: 55-60.
- [12] HORAGUCHI Y, SAITO S, KOJIMA K, et al. Construction of mutant glucose oxidases with increased dye-mediated dehydrogenase activity[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2012, 13: 14149-14157.
- [13] Leskovac V, Trivic S, Wohlfahrt G, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors[J]. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2005, 37: 731-750.
- [14] HECHT H, KALISZ H, HENDLE J, et al. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å resolution [J]. **Journal of Molecular Biology**, 1993, 229: 153-172.
- [15] CREGG J M, HIGGINS D R. *Pichia* Protocols[M]. New Jersey: Humana Press, 2007.
- [16] SANDIP B, BANKAR, Mahesh V. Bule, Rekha S. Singhal. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase[J]. **Food Bioprocess Technology**, 2009, 2: 344-352.
- [17] VOGT W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 1995, 18: 93-105.
- [18] LIN L L, LO H F, CHIANG W Y, et al. Replacement of methionine 208 in a truncated *Bacillus sp.* TS-23 α -amylase with oxidation-resistant leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide[J]. **Current Microbiology**, 2003, 46: 211-216.
- [19] 刘瑜, 李丕武. 黑曲霉葡萄糖氧化酶高产基因工程菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2013, 7: 4.
- LIU Yu, LI Peiwu. Review on high-level *Aspergillus niger* glucose oxidase production engineering strains[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2013, 7: 4. (in Chinese)

科技信息

美国批准姜黄提取物为“安全使用物质”(GRAS)

2016年9月13日美通社消息,多卡斯生物技术公司(DoCas Biotech)产品姜黄提取物(BCM-95)获得FDA批准成为食品中“安全使用物质”(GRAS)。

据悉,姜黄提取物在食品中最大使用量为180毫克/每人每天,在医用食品中最大使用量为1000毫克/每人每天。

[信息来源]国家质检总局[EB/OL]. 美国批准姜黄提取物为“安全使用物质”(GRAS) (2016-10-11). http://jckspaqj.aqsiq.gov.cn/wxts/gwflfg/201609/t20160920_474268.htm