

黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母 SMD1168 中的表达

陈楠, 肖成建, 范新蕾, 李汉广, 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在毕赤酵母 SMD1168 中利用乙醇氧化酶 *AOX1* 强启动子表达黑曲霉葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOD)。提取黑曲霉 *Aspergillus niger* PCTC 的基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增获得葡萄糖氧化酶基因, 将目的基因插入到具有 *AOX1* 强启动子的表达载体 pPICZαA 上, 经电转化导入毕赤酵母 SMD1168 中。经 zeocin 抗性平板初筛、摇床复筛以及 SDS-PAGE 蛋白质电泳的检测, 获得了一株产葡萄糖氧化酶活力的菌株, 该菌株在 30 ℃、200 r/min 的培养条件下, 经体积分数 1.0% 的甲醇诱导发酵 1 d 可获得 1.12 U/mL 的酶活。对该菌株进行了摇瓶产酶条件优化, 其最佳发酵条件为: 在 pH 5、30 ℃ 下经体积分数 1.5% 甲醇诱导 7 d, 酶活为 32 U/mL。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 黑曲霉; 毕赤酵母; 异源表达; 启动子

中图分类号: TQ 920.1 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)09-0975-07

Expression of *Aspergillus niger* Glucose Oxidase Gene in *Pichia pastoris* SMD1168

CHEN Nan, XIAO Chengjian, FAN Xinlei, LI Hanguang, YU Xiaobin*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Aspergillus niger* glucose oxidase (GOD) was expressed in *Pichia pastoris* SMD1168 with the alcohol oxidase gene promoter (*AOX1*). A gene of glucose oxidase from *Aspergillus niger* PCTC was cloned. The gene was fused to the pPICZαA plasmid which had the alcohol oxidase gene promoter (*AOX1*) and expressed in *Pichia pastoris* SMD1168. After screening by zeocin gradient resistance plate, shake culture, and the SDS-PAGE analysis of proteins in the culture, one strain was obtained, which gave the highest enzyme activity (1.12 U/mL) after one day induction by 1% methanol. Through the optimization of the shake flask experiments, the highest enzyme activity of 32 U/mL was achieved in the flask by induction for 7 d under optimal conditions (30 ℃, 200 r/min, pH 5 and 1.5% methanol).

Keywords: glucose oxidase, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, heterologous expression, promoter

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (JUSRP111A24); 江苏省高校优势学科建设工程项目 (111206)。

* 通信作者: 余晓斌 (1965—), 男, 安徽芜湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵法生产功能食品因子方面的研究。

E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 陈楠, 肖成建, 范新蕾, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母 SMD1168 中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(09): 975-981.

葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOD)系统命名为 β -D-葡萄糖:氧化还原酶(EC1.1.3.4)。葡萄糖氧化酶能专一性地氧化 β -D-葡萄糖,生成葡萄糖酸和过氧化氢,因而具有除氧、抗氧化、去除葡萄糖以及生成葡萄糖酸的作用,近几十年来被广泛应用于与人体健康密切相关的食品、医药、生物技术等行业^[1]。例如,它能有效地改善小麦面筋的组织结构,提高面团的持气性、弹性、韧性和持水性,从而提升了面包的质量^[2];在白葡萄酒生产中,加入 GOD/CAT 系统后,可有效防止酚类和多酚氧化酶对白葡萄酒产生的严重褐变^[3];葡萄糖氧化酶催化产生的过氧化氢可在纺织品中充当漂白剂的作用^[4];葡萄糖氧化酶也可作为抑制微生物的成分添加到口腔护理产品中^[5];此外,葡萄糖氧化酶是新型传感器中的重要组成部分,可以用来测定糖含量^[6]。

目前,葡萄糖氧化酶广泛采用黑曲霉或青霉发酵进行大规模生产,但在此过程中常常伴有过氧化氢酶、淀粉酶及纤维素酶等大量杂蛋白的产生^[7]。近10年来,巴斯德毕赤酵母表达系统的操作简单、表达量高、稳定性强、能进行多种翻译后加工修饰等特点使其成为目前应用最广泛的外源蛋白质的表达系统之一^[8]。两种从青霉 *Penicillium variable* P16^[9] 和黑曲霉 9029^[10] 获得的 GOD 基因都在巴斯德毕赤酵母中获得了表达,前者在发酵 11 d 的条件下酶活为 0.33 U/mL,后者的酶活最高为 1.62 U/mL。作者采用的黑曲霉 PCTC 与上述文献报道的霉菌、葡萄糖氧化酶基因序列的相似度分别为 96% 和 99%。

作者从黑曲霉 PCTC 中克隆了 GOD 基因,并用其转化蛋白质缺陷型毕赤酵母 SMD1168,以期获得高效表达 GOD 蛋白酶缺陷型毕赤酵母生产用菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 黑曲霉菌株 PCTC: 由作者所在实验室保存,葡萄糖氧化酶基因来自该菌株;质粒 pMD18-T: 用来构建克隆载体;大肠杆菌 JM109: 用来构建和克隆目的基因;质粒 pPICZ α A: 用来表达目的基因;毕赤酵母 SMD1168: 作为表达目的基因的宿主。

1.1.2 试剂与仪器 工具酶、PCR 相关试剂、*Xho*I、*Not*I 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶: 购自 Takara 公

司; *Pme*I: 购自纽英伦生物技术有限公司;真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 标准相对分子质量 marker 和 Amp(氨苄青霉素)等: 购自上海生工生物有限公司;琼脂糖、辣根过氧化物酶、邻联茴香胺等: 购自 Sigma 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺: Bio-Rad 产品;色谱纯甲醇及其他试剂(分析纯): 均购自国药集团;PCR 仪和电转化仪: Eppendorf 公司;电泳仪: 北京六一仪器厂。

1.1.3 培养基

1) *Aspergillus niger* PCTC 活化培养基 (PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 加水 1 L, 煮沸 30 min, 用两层纱布过滤, 补水至 1 L, 加入 20 g 葡萄糖, 自然 pH, 121 °C 下灭菌 20 min。配置固体培养基时加入 2 g/dL 琼脂粉。

2) *Aspergillus niger* PCTC 种子培养基: 葡萄糖 9 g/dL, KH₂PO₄ 0.09 g/dL, MgSO₄·7H₂O 0.09 g/dL, (NH₄)₂PO₄ 0.18 g/dL, 尿素 0.05 g/dL, 玉米粉 0.9 g/dL, 吐温-60 (TW-60) 1.5 g/dL; 自然 pH, 121 °C 下灭菌 20 min。

3) LB 培养基: 蛋白胨 1 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, NaCl 1 g/dL; pH 7.0, 121 °C 下灭菌 20 min, 配置固体平板时加入 2 g/dL 琼脂粉。抗性培养基中 Amp 的最终质量浓度是 100 μ g/mL。

4) LLB 培养基: 蛋白胨 1 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, NaCl 1 g/dL; pH 7.0, 121 °C 下灭菌 20 min。配置固体平板时加入 2 g/dL 琼脂粉。抗性培养基中 zeocin 的终质量浓度为 25 μ g/mL。

5) YPD 培养基: 在约 800 mL 的去离子水中加入酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 定容至 900 mL, 高压灭菌后, 加入 100 mL 10 $\times$ D。配制固体培养基时加入 2 g/dL 琼脂。抗性培养基中 zeocin 的终质量浓度为 100 μ g/mL, 4 °C 避光保存。

6) YPG 培养基: 用 10 $\times$ GY 代替 YPD 培养基中的 10 $\times$ D。

7) YPDS 培养基: 在约 800 mL 的去离子水中加入酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, D-山梨醇 182.2 g, 定容至 900 mL, 高压灭菌后, 加入 100 mL 10 $\times$ D。配制固体培养基时加入 2 g/dL 琼脂。抗性培养基中 zeocin 的终质量浓度为 100 μ g/mL, 4 °C 避光保存。

8) BMMY 培养基: 酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 加入 800 mL 水中, 121 °C 下灭菌 20 min, 冷却至室温

加入灭菌的 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 100 mL, 10×YNB 100 mL, 500×B(过滤灭菌) 2 mL, 甲醇 5 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和目的基因的克隆

1) 黑曲霉 PCTC 菌体预处理: 采用 POD 培养基平板活化黑曲霉 PCTC, 于 28 °C 下培养 24 h, 刮取孢子配置成悬液, 接种到含有 50 mL 种子液的 250 mL 摇瓶中。取培养好的种子液以相同的方法接种到含有 1.5% 吐温-60 (TW-60) 的摇瓶中, 于 200 r/min, 30 °C 摇床中培养 24 h。将数颗灭菌的玻璃珠加入到摇瓶中, 置于 200 r/min 摇床中振荡 3~4 h, 取 15~20 mL 的菌液进行抽滤。

2) 基因组 DNA 的提取: 取上述抽滤好的菌体采用试剂盒法提取基因组 DNA, 参照上海生工真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书提取黑曲霉 PCTC 的基因组 DNA。

3) 目的基因的获得: 设计如下引物:

GOD-F: 5'-ATGCAGACTCTCCTTGTGAG-3'

GOD-R: 5'-TCACTGCATGGAAGCATAAT-3'

以黑曲霉基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化回收后, 在 T4 连接酶的作用下连接到 pMD18-T 载体上, 并转化 *E. coli* JM109, 获得重组质粒 pMD18-T-GOD1, 经菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆子。

在克隆 *A. niger* PCTC 葡萄糖氧化酶基因时, 上游引物 5' 端引入了位于表达载体 pPICZαA 的 α-factor 信号肽 *XhoI* 酶切位点序列 (下划线部分) 和 *Kex2* 信号肽酶切位点序列 (粗体部分), 同时去除了葡萄糖氧化酶完整阅读框中的信号肽序列, 下游引物引入了 *NotI* 酶切位点序列 (下划线部分), 其序列如下:

GOD-F1: 5'-CTCGAGAAAAGAAGCAATGGCA TCGAAGC-3'

GOD-R1: 5'-GCGGCCGCTCACTGCATGGAAG CATAAT-3'

以重组质粒 pMD18-T-GOD1 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化回收后, 在 T4 连接酶的作用下连接到 pMD18-T 载体上, 并转化 *E. coli* JM109, 经菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆子, 同时提取 pMD18-T-GOD 质粒送至上海生工生物工程有限公司测序进行验证。

1.2.2 重组质粒的构建 用 *XhoI* 和 *NotI* 分别将

pPICZαA 和 pMD18-T-GOD 质粒酶切。用胶回收试剂盒将 pMD18-T-GOD 质粒的酶切产物和 pPICZαA 质粒的酶切产物回收纯化。在 T4 连接酶的作用下构建 pPICZαA-GOD, 转化 *E. coli* JM109, 经 zeocin 抗性平板筛选和菌落 PCR 鉴定, 同时送至上海生工测序验证, 保存测序正确的菌株。

1.2.3 毕赤酵母的转化及筛选 采用电转化法。重组质粒 pPICZαA-GOD 经 *PmeI* 酶切后线性化。用线性化 pPICZαA-GOD 质粒电击转化毕赤酵母 SMD1168 感受态细胞, 然后将转化细胞涂于含 100 μg/mL zeocin 的 YPDS 平板上, 30 °C 培养 3 d。随机挑选阳性菌落转接液体 YPD (含 100 μg/mL, 以下同), 培养 3 d 后离心收集细胞, 用试剂盒提取基因组 DNA 并以其为模板, 以 5' *AOX1* 和 GOD-R1 为引物进行 PCR 扩增以筛选、鉴定转化子 SMD1168-GOD。AOX1 引物如下:

5' *AOX1*: GACTGGTTCCAATTGACAAGC

3' *AOX1*: GCAAAATGGCATTCTGACATCC

将 YPDS 平板 (zeocin 100 μg/mL) 上转化的单菌落用无菌牙签依次点种到含 zeocin 质量浓度分别为 500、1000、2 000 μg/mL 的 YPDS 平板上, 30 °C 培养 2~3 d, 观察酵母转化子的生长情况, 逐级筛选含有多拷贝目的基因的重组酵母菌株。

1.2.4 摇瓶发酵条件的优化 为了提高毕赤酵母的产酶活性, 作者对 pH 值、诱导温度、甲醇体积分数和诱导时间等 4 个因素进行了优化。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 培养基中进行活化, 然后接入 15 mL YPG 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养至对数生长期, 室温沉淀 1~2 h, 倒掉上层培养基, 转入 50 mL (250 mL 三角瓶) 液体诱导培养基 BMMY, 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。pH 设置为 4、5、6、7、8 五个梯度; 诱导温度分别设为 15、20、25、30、35 °C; 甲醇体积分数选择 0.5%、1%、1.5%、2%、3% 五个浓度, 72 h 后测定培养物的细胞密度以及上清液的葡萄糖氧化酶。每天取样测定酶活性、OD₆₀₀ 来确定最佳发酵时间。每组实验均设置 3 个平行实验来确定诱导表达时间。

1.2.5 重组葡萄糖氧化酶的分离纯化 采用饱和硫酸铵沉淀法。将重组酵母 SMD1168-GOD 的培养液于 5 000 r/min 离心 5~10 min, 收集上清液即为粗

酶液。向粗酶液中加入饱和硫酸铵,于 4 ℃静置过夜,10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,即为纯化后的酶液。

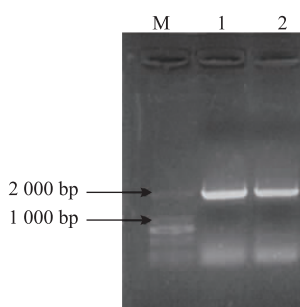
1.2.6 SDS-PAGE 检测 利用粗酶液和纯化后的酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,经过考马斯亮蓝染色及脱色,利用凝胶成像系统进行分析。

1.2.7 酶活性的测定 酶活性测定方法采用 Sigma 公司和周建芹^[1]的方法并加以改进:配置 21 μmol/mL 的双氧水标准液,反应体系中含有 2.5 mL 的 0.21 mmol/L 的邻联茴香胺溶液,0.4 mL 的 10 g/dL 葡萄糖溶液,0.1 mL 的 60 U/mL 的辣根过氧化物酶,再加入不同体积的 21 μmol/mL 双氧水,在 37 ℃下预热 5 min,加醋酸-醋酸钠缓冲溶液补到 10 mL,在 OD₅₂₅ 下测定吸光度,以吸光度为横坐标,以浓度为纵坐标制作标准曲线。样品的测定用 1 mL 稀释好的样品代替双氧水,反应 1 min 测定 OD 值然后计算酶活性大小,酶活性单位定义为:37 ℃下,每分钟催化产生 1 μmol 的双氧水所需要的酶量做为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉 GOD 基因的分析

如图 1 所示,用黑曲霉 PCTC 基因组 DNA 及引物 GOD-F 和 GOD-R 进行 PCR 扩增可获得一条约 2.0 kb 的 DNA 片段。通过测序和比对分析显示,该片段包含 GOD 基因,其全长为 1 818 bp,编码 605 个氨基酸,将其序列与 Genbank 中其他葡萄糖氧化酶基因的序列进行对比,其相似度在 92%~98% 之间。



M: DNA Marker DL2000; 1, 2: PCR amplification products

图 1 黑曲霉基因组 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification from PCTC

2.2 重组表达载体的构建与鉴定

将用引物 GOD-F1 和 GOD-R1 经 PCR 扩增并纯化回收的黑曲霉 GOD 基因连接到 pMD18-T 上。将质粒 pMD18-T-GOD 和 pPICZαA 进行双酶切以构建重组质粒,见图 2。用重组质粒转化感受态大肠杆菌 *E.coli* JM109,并在含 zeocin 的 LB 平板上筛选阳性菌落。随机挑选 21 个菌落,利用 AOX1 引物对挑取的菌落进行 PCR 鉴定,结果有 20 个菌落出现了阳性结果,显示有 5.4 kb 大小的条带,为目的基因和 pPICZαA 片段大小的总和(1.8 kb+3.6 kb)。对 PCR 鉴定结果正确的重组质粒进行 NotI 和 XhoI 双酶切鉴定,图 3 为酶切产物的电泳结果,显示有 1.8 kb 和 3.6 kb 大小的条带,分别为目的基因和表达载体片段的长度,证明 GOD 基因已经插入到表达载体 pPICZαA 中。重组质粒测序结果显示,目的基因的完整阅读框序列已正确插入到 pPICZαA 载体 α-factor 信号肽下游,重组表达载体 pPICZαA-GOD 构建正确。

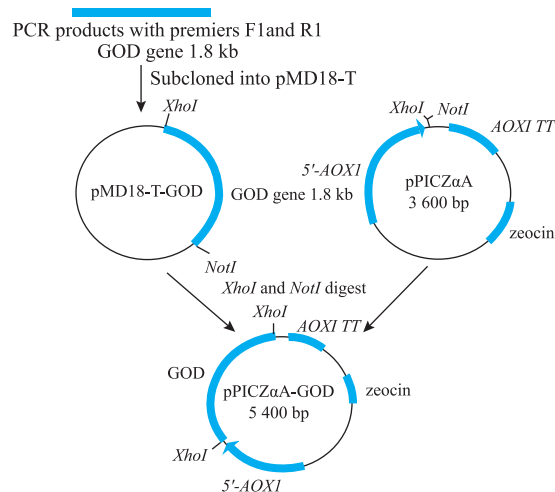


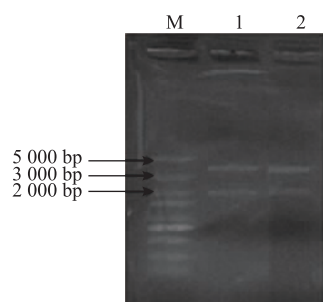
图 2 重组质粒 pPICZαA-GOD 构建示意图

Fig. 2 Diagram for construction of the recombinant plasmid pPICZαA-GOD

2.3 毕赤酵母宿主菌转化与筛选

将已经线性化的重组表达载体 pPICZαA-GOD 电击转化,2~3 d 后长出约 50 个酵母转化子。用牙签挑取转化单菌落依次点种在含有 zeocin 质量浓度分别为 500、1 000、2 000 μg/mL 的 YPDS 平板上。3 d 后,酵母转化子在 YPDS 抗性梯度平板上的生长情况见图 4。结果表明,随着 zeocin 质量浓度的逐级增加,长出的酵母转化子逐渐减少,a 和 b 为长

势良好的菌株,而 c 则为点种后未生长的菌,仍为点种前的形态。挑取在 YPDS 平板(zeocin 2 000 $\mu\text{g/mL}$)上生长较好的重组酵母单菌落,进行下一步的筛选鉴定。对筛选得到的若干菌株进行摇瓶复筛,通过体积分数 1.0% 的甲醇诱导发酵 1 d 获得了一株产酶最高为 1.12 U/mL 的菌株。



M:DNA Marker DL5000;1,2:products of pPICZ α A-GOD

图 3 重组质粒 pPICZ α A-GOD 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pPICZ α A-GOD with double restriction enzymes digestion with double restriction enzymes digestion

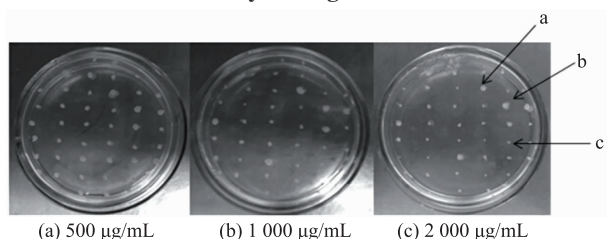
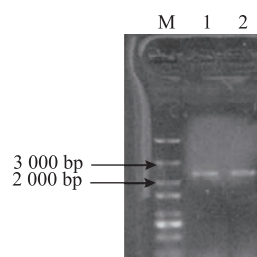


图 4 酵母转化子的抗性筛选

Fig. 4 Screening of *P.pastoris* transformants by zeocin resistance

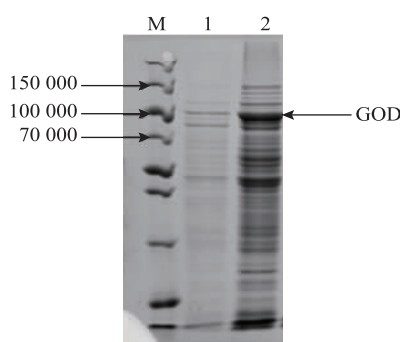
挑取上述重组酵母的基因组,用作 PCR 鉴定的模板,利用上游引物 5'-AOX1 和下游引物 GOD-R1 进行 PCR 扩增,所得产物经电泳检测,结果见图 5。以重组酵母基因组 DNA 为模板扩增的 PCR 产物有 2.1 kb 大小的条带,为葡萄糖氧化酶基因和部分 AOX1 启动子序列大小的总和 (1.8 kb+0.3 kb),证明目的基因已经定向整合到重组酵母菌株的基因组上。利用筛选出来的 SMD1168-GOD 菌株的培养物上清液做蛋白质 SDS-PAGE 电泳,可见一条浓染的、大小约为 90 000 的蛋白质条带,见图 6。黑曲霉的 GOD 亚基相对分子质量为 65 000~95 000,因此该结果提示 SMD1168-GOD 可以表达黑曲霉 GOD 蛋白。图 7 则为通过饱和硫酸铵沉淀法,纯化 SMD1168-GOD 菌株培养物上清液获得的 GOD 的 SDS-PAGE 电泳图谱。



M:DNA Marker DL2000;1,2:PCR products of pPICZ α A-GOD

图 5 重组质粒 pPICZ α A-GOD 的 PCR 鉴定

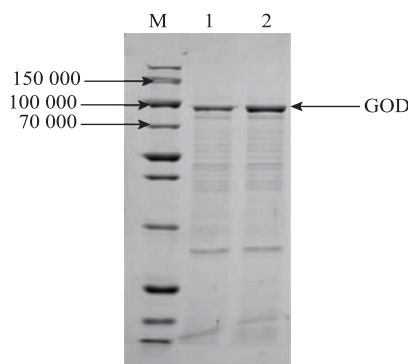
Fig. 5 PCR identification of pPICZ α A-GOD



M:Protein marker;1,2:the purified GOD

图 6 SMD1168-GOD 菌株培养液上清液蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of proteins in the culture supernatant of SMD1168-GOD



M:Protein marker;1:SMD1168;2:SMD1168-GOD

图 7 GOD 纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the purified GOD

2.4 重组酵母发酵条件的优化

对 pH 值、诱导温度、甲醇浓度和诱导时间等 4 个因素进行了优化。结果表明,当 pH 为 5 时,重组酵母的葡萄糖氧化酶表达活力最高,见图 8a。当 pH 继续升高时,酶活性开始下降,这可能是由于酶在弱碱性的环境下变的不稳定造成的;不同温度下诱

导产酶发现,30℃下产酶较高,见图8b;甲醇体积分数对产酶也有很大影响,由图8c可以看出,随着甲醇体积分数的增加,酶活性和菌浓度显著增加,但是当其体积分数达到1.5%的时候,酶活性不再提高,且菌体的密度也开始下降,这说明甲醇体积分数过高时会抑制重组酵母产酶及生长;随着诱导时间的增加,菌体密度持续增加,酶活性也不断增加,二者存在着正相关,在第7天时葡萄糖氧化酶的活性达到最高,为17.25 U/mL,见图8d。通过发酵条件的优化,获得了最佳发酵条件为pH 5,30℃下经

1.5%甲醇诱导8 d,获得的酶活最高为32 U/mL,是优化前的28倍。与Crognale等^[9]利用青霉*P16* GOD基因表达的酶活相比较,不仅酶活提高了96倍,且在发酵时间上减少了4 d。在表达宿主的选择上,作者采用了蛋白质缺陷型毕赤酵母SMD1168,可以将GOD分泌到细胞外,与刘虎军等^[12]在毕赤酵母GS115中表达GOD相比较,不仅酶活提高了15%,且便于下游的提纯生产。与GUO等^[13]比较,在培养基中补加甲醇的体积分数降低了0.5%,减少了甲醇对细胞的毒性。

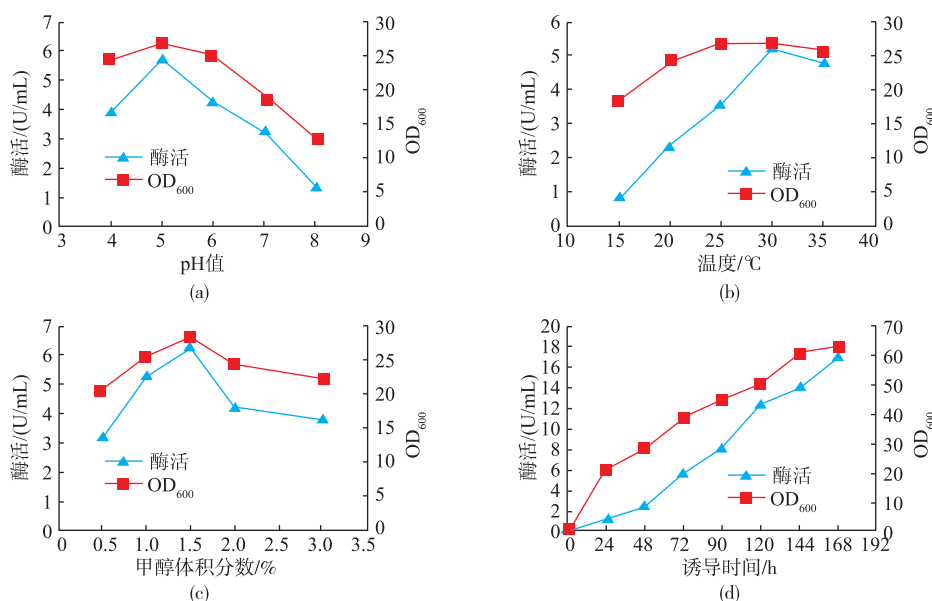


图8 重组酵母发酵条件的优化

Fig. 8 Optimization of fermentation conditions

3 结语

毕赤酵母的选择显著影响外源基因的表达,本研究所选择的毕赤酵母宿主SMD1168是蛋白缺陷型菌株,其*Pep4*基因突变,缺失蛋白水解酶活性,对表达产物降解少^[14],可能会对葡萄糖氧化酶的表达量产生影响。

毕赤酵母表达系统通常以分泌表达和胞内表达两种方式产生外源蛋白质。作者剔除了GOD基因自身长为66 bp的信号肽序列,将其成熟肽编码序列融合在 α -mating factor信号肽序列下游,使得葡萄糖氧化酶能够分泌表达,便于下游的提取和纯化。另外,在 α -mating factor信号肽序列上存在*Ste13*内肽酶酶切位点(Glu-Ala-Glu-Ala)和*Kex2*内肽酶酶切位点(Glu-Lys-Arg)^[15],作者在设计扩增

GOD基因的上游引物时,剔除了*Ste13*内肽酶酶切位点,而引入了*Kex2*内肽酶酶切位点,从而避免了表达蛋白质的N-端带有的多余氨基酸残基。

本研究获得的重组菌能够在以甲醇作为惟一碳源的培养基上生长,并在其诱导下高效表达葡萄糖氧化酶基因,在pH 5、30℃下,以1.5%的甲醇诱导7 d,其酶活性达32 U/mL。周亚凤^[16]等利用pPIC9质粒将来源于黑曲霉的葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母GS115中表达,酶活30~40 U/mL;Masaki Yamaguchi^[10]等利用pGAP启动子在毕赤酵母X33中表达黑曲霉9029 GOD基因,培养重组酵母14 d后,培养物上清液的平均酶活仅有1.23 U/mL。一般认为不同的表达系统和表达宿主对外源基因的表达会产生很大的影响;选择不同的启动子和信号肽也会影响外源蛋白质的表达;此外,重组酵母不同

的拷贝数同样会对外源蛋白质的表达量产生巨大作用。因此,通过利用不同的表达载体和宿主菌、选

用不同的启动子和信号肽、筛选高拷贝的菌株会进一步提高重组菌的 GOD 表达水平。

参考文献:

- [1] BANKS J G, BOARD R G, SPARKS N H. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 1986, 8(2-3): 103-147.
- [2] BONET A. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality; a study from macroscopic to molecular level [J]. **Food Chemistry**, 2006, 99(2): 408-415.
- [3] GOMEZ E, MARTINEZ A, LAENCINA. Prevention of oxidative browning during wine storage[J]. **Food Research International**, 1995, 28: 213-217.
- [4] TZANOV T. Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching[J]. **Biotechnol**, 2002, 93(1): 87-94.
- [5] AFSETH J, ROLLA G. Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase[J]. **Caries Res**, 1983, 17(5): 472-475.
- [6] CHANG G. Glucose concentration determination based on silica sol-gel encapsulated glucose oxidase optical biosensor arrays[J]. **Talanta**, 2010, 83(1): 61-65.
- [7] KAPAT A, JUNG J K, PARK Y H. Improvement of extracellular recombinant glucose oxidase production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of different feeding strategies[J]. **Biotechnology Letters**, 1998, 20(3): 319-323.
- [8] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. **FEMS Microbiol Rev**, 2000, 24(1): 45-66.
- [9] CROGNAL S. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39: 1230-1235.
- [10] MASAKI Y, YUSUKE T, ATSUNORI N, et al. Secretory and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2007, 55(2): 273-278.
- [11] ZHOU Jianqin, CHEN Shao, WANG Jianwen. A simple and convenient method to determine the activity of glucose oxidase[J]. **Experimental Technology and Management**, 2008, 25: 58-60. (in Chinese)
- [12] LIU Hujun, LUO Wei, FAN Xinlei, et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* PCTC in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 615-621. (in Chinese)
- [13] Y G, F L, H Z, et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris* [J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2010, 162(2): 498-509.
- [14] FENG Jiankai, SUN Wanbang, CHEN Fuchao, et al. Plasmid construction and expression in *Pichia pastoris* SMD1168 of recombinant human interleukin-10 and purification[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2010, 212(3): 168-172. (in Chinese)
- [15] BRAKE A J. α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1984(15): 4642-4646.
- [16] ZHOU Yafeng, ZHANG Xianen, LIU Hong, et al. Cloning and expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in methylotrophic yeast[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2001, 17(4): 400-405. (in Chinese)