

葡萄糖氧化酶基因在解脂耶氏酵母中的表达及发酵优化

刘晓筱^{1,2}, 张娟^{*1,2}, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{1,2}

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

摘要: 葡萄糖氧化酶(β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; EC 1.1.3.4, 简称 GOD)是生物领域中至关重要的工具酶之一,被广泛应用于食品工业、饲料工业、纺织、医药等行业中。作者构建了一株重组解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 1-28,分泌 GOD,并进一步运用单因素实验与正交实验在摇瓶水平对其发酵培养基进行了优化。实验结果显示,最佳发酵培养基配方为:甘油 20 g/L,酵母膏 2.64 g/L,氯化铵 2.64 g/L,无水硫酸镁 0.13 g/L,磷酸二氢钾 0.32 g/L,维生素 B₁ 3.34×10^{-4} g/L,初始 pH 值 6.0。优化后 GOD 发酵产量达到 11.0 U/mL,较初始发酵培养基 GOD 产量提高了 72%。在此基础上进行 3 L 罐发酵,重组菌在甘油补料 30 g/L, pH 为 5.0 时,28 ℃发酵 190 h,发酵液酶活达到 81.6 U/mL。

关键词: 解脂耶氏酵母;葡萄糖氧化酶;发酵优化

中图分类号: TQ 925 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)12—1233—09

Expression of Glucose Oxidase Gene in *Yarrowia lipolytica* and Fermentation Optimization

LIU Xiaoxiao^{1,2}, ZHANG Juan^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}

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

Abstract: Glucose oxidase (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; EC 1.1.3.4, GOD) has gained considerable commercial importance in the last few years due to its multitude of applications in the chemical, food, pharmaceutical, beverage, biotechnology and other industries. In this study, the fermentation medium of the recombinant *Yarrowia lipolytica* strain 1-28 that was constructed to secrete GOD was optimized through single-factor and orthogonal tests. The optimal fermentation medium was consisted of 20 g/L glycerol, 2.64 g/L yeast extract, 2.64 g/L NH₄Cl, 0.13 g/L MgSO₄, 0.32 g/L KH₂PO₄, 3.34×10^{-4} g/L Vitamin B₁ at pH 6.0. The yield of GOD corresponded to 11.0 U/mL

收稿日期: 2016-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470160);国家高技术研究发展计划项目(2011AA100905);中国博士后科学基金特别资助项目(114957)。

* 通信作者: 张娟(1981—),女,山东德州人,工学博士,主要从事食品微生物生理学与生物化学及食品酶制剂发酵方面的研究。

E-mail: zhangj@jiangnan.edu.cn

引用本文: 刘晓筱, 张娟, 陈坚, 等. 葡萄糖氧化酶基因在解脂耶氏酵母中的表达及发酵优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1233-1241.

when cultured in the optimized medium, which was 72% higher than that at initial conditions. When fermented in the 3 L tank at 28 °C for 190 h, the enzyme activity of GOD reached 81.6 U/mL at pH 5.0 and glycerol feeding at the concentration of 30 g/L.

Keywords: recombinant *Yarrowia lipolytica*, glucose oxidase, fermentation optimization

葡萄糖氧化酶 (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; EC 1.1.2.3.4, 简称 GOD) 是一种黄素糖蛋白^[1], 其催化反应专一性较强, 对 β -D-葡萄糖有高度的专一性。葡萄糖氧化酶分子为二聚体, 含有两个亚基, 相对分子质量约为 130 000~170 000^[2], 每个亚基可结合一个 FAD 分子, 因此每个酶分子有两个 FAD 结合位点。GOD 是一种需氧脱氢酶, 以氧为电子受体, 能专一地将 β -D 葡萄糖氧化为葡萄糖酸, 氧被还原生成过氧化氢 (H_2O_2)^[3]。从 GOD 催化葡萄糖氧化反应的机理可以看出, 辅酶 FAD 从 β -D 葡萄糖夺走两个 H 原子形成还原态辅酶 $FADH_2$ ^[4], 同时 β -D 葡萄糖被氧化生成 δ -葡萄糖酸内酯, 随后 δ -葡萄糖酸内酯水解生成 δ -葡萄糖酸, 还原态的 GOD 被氧化成氧化态的 GOD 并生成 H_2O_2 ^[5-6], 见图 1。

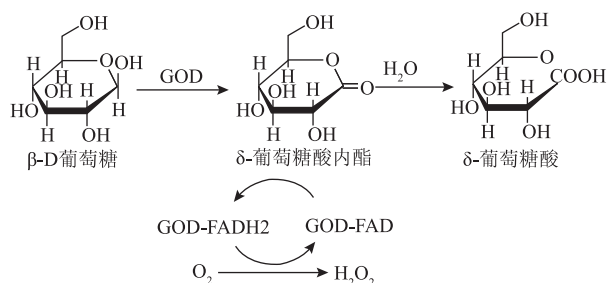


图 1 GOD 催化反应 β -D 葡萄糖机理示意图

Fig. 1 Catalytic reactions of β -D glucose mediated by GOD

葡萄糖氧化酶是酶技术领域中最主要的工具酶之一, 因其可以与氧和葡萄糖发生催化反应, 而被广泛应用于食品^[7-9]、饲料、医药等众多相关领域^[10-11], 在面制品、啤酒生产、牛奶生产以及食品除氮抗氧化等领域有着极其重要的作用和巨大的市场需求^[12]。

葡萄糖氧化酶的工业大规模发酵生产主要采用黑曲霉^[13]和青霉菌株^[14], 但黑曲霉和青霉在发酵过程中产生的大量杂蛋白质对后期的分离纯化工作造成很大的困难, 且大大增加了生产成本。在传统技术领域, 葡萄糖氧化酶的生产菌株一直通过物

理方法如紫外线、 γ 射线和化学方法如亚硝基胍等诱变方法进行筛选。2000 年以后, 通过基因工程和分子生物学技术, 不同来源的 GOD 基因已成功在同源、异源宿主细胞中得到克隆、测序和表达^[15-16]。然而, 这些重组菌在生产过程中抗生素或诱导剂的添加, 给 GOD 在食品领域的应用带来了安全隐患。总体而言, 已构建重组菌生产的 GOD 尚不能满足食品加工领域对安全性的要求。因此, 构建食品级的表达体系是迫切需要的。

Y. lipolytica 在 1942 年首次被分离得到, 是研究最为广泛的非常规酵母之一, 可应用于生产有机酸、酶(蛋白酶、脂肪酶、酯酶及磷酸酶)、单细胞蛋白及单细胞油脂等。*Y. lipolytica* 曾经作为关于生理学、遗传学、二态性、基因控制、蛋白质表达及脂质积累研究的模式系统^[17]。*Y. lipolytica* 可利用葡萄糖、乙醇、乙酸及疏水性基质(如烷类、脂肪酸类及油)等作为碳源, 且可分泌有机酸及蛋白质等代谢产物。20 世纪末, 人们将其开发成一种具有异源蛋白表达潜力的新型优良酵母表达系统。近年来, *Y. lipolytica* 作为异源蛋白表达宿主的研究进展很快^[18]。*Y. lipolytica* 自身具备对常用抗生素的抗性, 应用中一般选择营养型标记, 如 LEU2、URA3, 这样避免了抗生素基因带来的安全性问题^[19]。目前, *Y. lipolytica* 被认为是非致病性的, FDA 将其划定为 Generally Regarded As Safe (GRAS), 可以用于食品和药物生产领域。

作者将 *Aspergillus niger* BBE11721 葡萄糖氧化酶基因在解脂耶氏酵母中进行表达, 宿主为符合食品安全要求的营养缺陷型 *Yarrowia lipolytica* 菌株, 构建了一株高效分泌 GOD 的重组菌 *Yarrowia lipolytica* 1-28。该重组菌发酵过程无需添加抗生素, 无甲醇诱导, 食品安全性较高。通过单因素及正交实验对 *Yarrowia lipolytica* 1-28 生产 GOD 的发酵培养基在摇瓶水平进行了优化, 并在 3 L 发酵罐上进行了初步的发酵条件探索, 为后续工业化的开发研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

E.coli JM109 用于构建和增值重组质粒;质粒 pPIC9K/GOD 用于 *Aspergillus niger* 葡萄糖氧化酶基因扩增的模板;*Y.lipolytica* Po1h (Ura⁻, ΔAEP, ΔAXP, Suc⁺) 为表达宿主;质粒 pINA1297 用于构建重组载体。以上均由江南大学生物工程学院生物系统与生物加工工程研究室提供。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L):氯化钠 10,蛋白胨 10,酵母粉 5。

YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母粉 10。

YNB 培养基(g/L):葡萄糖 20,YNB1.7,硫酸铵 5。

PPB 培养基(g/L):蔗糖 20,酵母提取物 1.32,氯化铵 1.32,磷酸二氢钾 0.32,无水硫酸镁 0.132,维生素 B₁ 3.34×10⁻⁴;溶于 pH 6.0 的柠檬酸盐缓冲液中^[20]。

固体培养基在此基础上添加 2 g/dL 琼脂粉。

1.3 培养方法

Y.lipolytica 种子培养条件:从-80℃保藏的工程菌甘油管点至 YPD 固体培养基,28℃培养过夜,用接种针挑取单菌落接种于 YPD 液体培养基中,于 28℃培养 18~24 h,转速为 200 r/min。

Y.lipolytica 发酵培养条件:采用 PPB 培养基,接种体积分数为 10%,于 28℃培养,转速为 200 r/min,培养至发酵结束。

3 L 发酵罐培养条件:罐装液量 1.0 L(优化后 PPB 培养基),接种体积分数 10%,搅拌转速 600 r/min,通气量 2.0 vvm。当溶氧第一次反弹且大于 60%时开始流加 50 g/dL 甘油,并调整转速 600~800 r/min 以维持溶氧不高于 30%。

1.4 DNA 操作

1.4.1 质粒 DNA 提取 使用从上海生物工程公司购买的质粒提取试剂盒完成质粒提取,实验步骤参照说明书进行。

1.4.2 限制性酶切反应 限制性酶切反应使用从 TaKaRa 公司购买的限制性内切酶完成,实验步骤参照说明书进行。

1.4.3 DNA 片段回收 DNA 片段的回收使用从

TaKaRa 公司购买的胶回收试剂盒完成,实验步骤参照说明书进行。

1.4.4 DNA 定点突变方法 DNA 定点突变引物设计及操作使用从 TaKaRa 公司购买的突变试剂盒完成,实验步骤参照说明书进行。

1.4.5 酵母基因组提取 酵母基因组的提取使用从北京天根公司购买的酵母基因组提取试剂盒,实验步骤参照说明书进行。

1.4.6 大肠杆菌感受态细胞制备及转化方法 大肠杆菌感受态细胞的制备采用 TaKaRa 公司两步法试剂盒制备。

1.4.7 *Y.lipolytica* 感受态细胞的制备及转化 采用醋酸锂转化法^[21]进行 *Y.lipolytic* 感受态细胞的制备与转化。

1.5 *Aspergillus niger* GOD 基因的克隆与分析

以含有 *Aspergillus niger* GOD 基因的重组质粒 pPIC9K/GOD 为模板,根据 NCBI 数据库中 GOD 基因序列设计含 *Sfi* I 和 *Bam*H I 酶切位点的两端引物,采用 50 μL 反应体系进行 PCR 反应,参数为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 S,52℃退火 30 S,72℃延伸 2 min,34 个循环;72℃延伸 10 min。引物序列如下:

上游引物 P1:5'-TACGGCCGTTCTGGCCAATG GCATTGAAGCCAGCCTC -3' (下划线为 *Sfi* I 酶切位点)

下游引物 P2:5'-CGCGGATCCTTCACTGCATG GAAGCATAATCTTCC-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点)

按照 TaKaRa 公司胶回收试剂盒中的实验步骤进行回收 PCR 产物。

1.6 表达载体 pINA1297/GOD 的构建与转化

将用引物 P1 和 P2 进行 PCR 得到的产物与 pINA1297 用 *Sfi* I 和 *Bam*H I 进行双酶切,用柱回收试剂盒回收目的基因,胶回收试剂盒回收载体片段,然后两者经 T4 连接酶连接过夜,连接液转化到 *E. coli* JM109。用含 100 μg/mL 氨苄霉素的 LB 平板筛选阳性转化子,提取质粒,经上海生工测序正确,得到重组载体 pINA1297/GOD。将重组载体转化 *Y. lipolytica* Po1h,提取酵母 DNA,PCR 扩增鉴定阳性转化子。

1.7 分析方法

1.7.1 菌体生物量的测定 测定菌液在分光光度

计 600 nm 波长处的吸光度值,即 OD_{600} 。

1.7.2 GOD 酶活力测定 参考文献[22]。

1.7.3 残余甘油浓度测定 Nash 比色法测定甘油质量浓度^[23]。

2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建

将转化后菌液涂布筛选平板 YNBcasa, 挑取长出的菌落, 采用菌落 PCR 鉴定其是否为重组子, 成功筛选出阳性单菌落, 见图 2。



图 2 菌落 PCR 验证

Fig. 2 Picture of colony PCR

2.2 GOD 基因在 *Y. lipolytica* Po1h 中的分泌表达

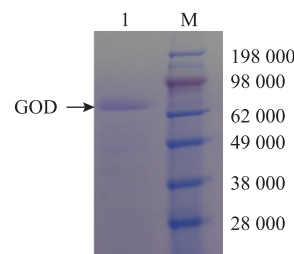
阳性转化子在 YPD 平板上活化培养一定阶段, 接种到种子液体培养基 YPD 中, 24 h 后转接至发酵培养基 PPB 中, 28 °C 培养 120 h, 测定 GOD 酶活。

转化子发酵测酶活得到一株产酶能力较强的菌株 *Yarrowia lipolytica* 1-28, 培养 120 h 后酶活达到 6.4 U/mL, 是野生型黑曲霉分泌所得酶活的 2.8 倍。利用 SDS-PAGE 分析重组 GOD 在 *Y. lipolytica* 中的表达情况, 结果见图 3。重组解脂耶氏酵母产生的 GOD 与黑曲霉 GOD 蛋白质的理论相对分子质量 65 600^[24]接近。

2.3 碳源对菌体生长和 GOD 酶活的影响

按照碳源质量分数相等的原则, 将初始 PPB 培养基中的蔗糖分别替换为甘油、葡萄糖、山梨醇、乳糖、果糖和麦芽糖 6 种碳源以探究不同碳源种类对重组菌发酵的影响。如图 4 所示, 碳源替换为甘油、果糖和葡萄糖时, 对重组菌的生长影响不大; 而以麦芽糖、乳糖和山梨醇为碳源时, 菌体量显著降低。当以甘油为碳源时, GOD 产量显著提高, 达到 8.2 U/mL, 比对照提高了 30%。而以其他原料为碳源时,

酶活均降低。因此, 选择甘油作为碳源生产 GOD。



1: *Y. lipolytica* 1-28 发酵上清液; M: marker.

图 3 重组菌 *Y. lipolytica* 1-28 表达 GOD 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of GOD in *Y. lipolytica* 1-28

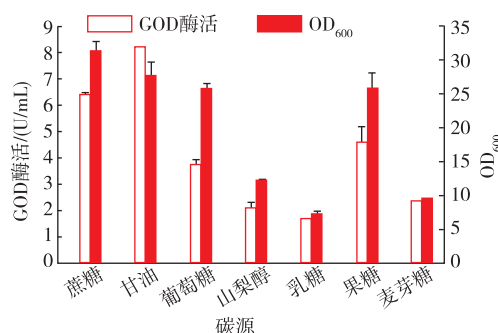


图 4 不同碳源对菌体生长和 GOD 酶活的影响

Fig. 4 Effects of different carbon sources on cell growth and GOD production

进一步探究甘油浓度对重组菌发酵的影响。如图 5 所示, 甘油质量浓度在 10~40 g/L, 甘油质量浓度的提高对菌体的生长有促进作用; 当甘油质量浓度在 10~30 g/L 之间时, GOD 产量随菌体量的提高而增加, 可能是由于甘油量的增加促进了菌体的生长, 从而影响产酶; 结果表明, 初始甘油质量浓度 30 g/L 对产酶的影响最好, GOD 酶活最高达到 10.9 U/mL; 当甘油质量浓度高于 30 g/L 时, 随着甘油质量浓度的增加, GOD 酶活下降, 这可能是由于过多的甘油对菌体产酶产生了抑制作用。结合菌体生长与产酶性能, 确定甘油的初始质量浓度为 30 g/L。

2.4 氮源对菌体生长和 GOD 酶活的影响

在上述实验的基础上进一步优化培养基中的氮源, 将初始 PPB 培养基中的酵母提取物和氯化铵按照氮源质量分数相等的原则替换为其它氮源。如图 6 所示, 菌体细胞对尿素的利用率较高, 而对硝酸钾的利用率最低, OD_{600} 值仅为 10, 对酵母提取

物、蛋白胨、氯化铵的利用效果差异不大。结果表明,选择酵母提取物作为单一氮源,产酶效果最佳,酶活达到 10.3 U/mL,而蛋白胨及两种复合氮源对 GOD 的产量影响不大,尿素、硝酸钾和氯化铵均使产酶量降低。针对菌株产 GOD 能力,选择酵母提取物作为氮源。

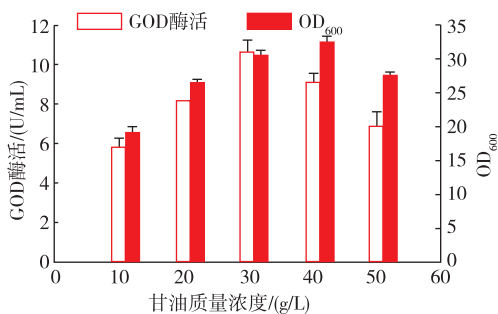


图5 甘油质量浓度对菌体生长和 GOD 酶活的影响

Fig. 5 Effects of concentration of glycerol on cell growth and GOD production

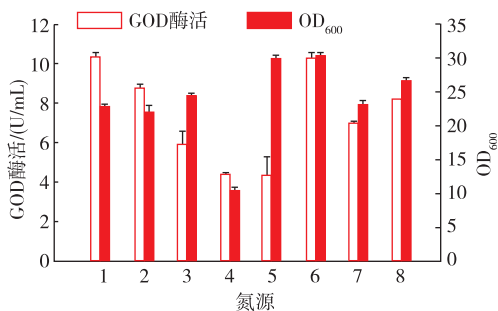


图6 不同氮源对菌体生长和 GOD 酶活的影响

Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on cell growth and GOD production

2.5 无机盐对菌体生长和 GOD 酶活的影响

在上述实验的基础上,将培养基中的无水硫酸镁分别替换为七水硫酸锌、硫酸锰、七水硫酸亚铁、无水氯化钙以及四水合钼酸铵。如图 7 所示,相较于无水硫酸镁,其它无机盐对酵母的生长和产酶并没有提高,均呈现下降趋势。

2.6 pH 对菌体生长和 GOD 酶活的影响

进一步探究培养基初始 pH 值对重组酵母菌株发酵的影响。将培养基的初始 pH 值分别控制为 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0,进行重组菌株发酵培

养,实验结果见图 8。初始 pH 值为 6.0 时,重组菌菌体量最高,OD₆₀₀ 值达到 15,酶活也达到最高,为 10.1 U/mL。因此,选择发酵培养基的初始 pH 值为 6.0。

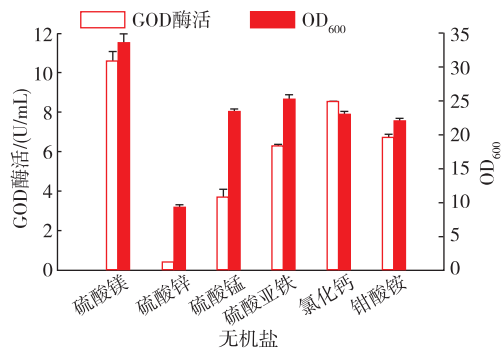


图7 不同无机盐对菌体生长和 GOD 酶活的影响

Fig. 7 Effects of different mineral salt growth on cell growth and GOD production

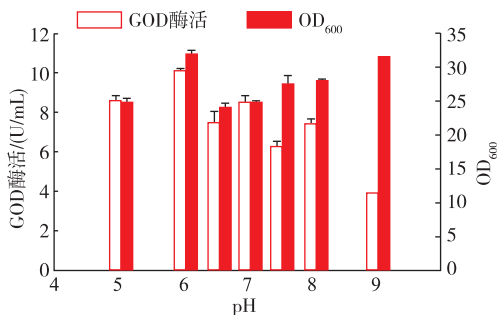


图8 不同初始 pH 对菌体生长和 GOD 酶活的影响

Fig. 8 Effects of pH on cell growth and GOD production

2.7 发酵培养基的正交设计优化

结合单因素实验结果,选择甘油、酵母提取物、氯化铵及硫酸镁进行四因素三水平的正交实验设计,以确定重组菌株的最佳发酵条件。因素与水平设计表见表 1,实验结果见表 2。

表 1 正交实验因素和水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平	A 甘油质量浓度/(g/L)	B 酵母提取物质量浓度/(g/L)	C 氯化铵质量浓度/(g/L)	D 无水硫酸镁质量浓度/(g/L)
1	20	1.32	0	0.13
2	30	2.64	2.64	0.20
3	40	10	5	0.25

表 2 正交实验结果与分析

Table 2 Analysis of the orthogonal experimental results

序号	A	B	C	D	GOD 酶活
1	1	1	1	1	5.84
2	1	2	2	2	5.73
3	1	3	3	3	3.73
4	2	1	2	3	4.67
5	2	2	3	1	5.33
6	2	3	1	2	2.76
7	3	1	3	2	3.27
8	3	2	1	3	4.84
9	3	3	2	1	4.22
均值 1	5.100	4.593	4.480	5.130	
均值 2	4.253	5.300	4.873	3.920	
均值 3	4.110	3.570	4.110	4.413	
极差	0.990	1.730	0.763	1.210	

根据实验结果分析,对葡萄糖氧化酶酶活影响的主次顺序为:酵母提取物>无水硫酸镁>甘油>氯化铵,最佳组合:甘油 20 g/L、酵母膏 2.64 g/L、氯化铵 2.64 g/L、无水硫酸镁 0.13 g/L。

2.8 摇瓶发酵条件优化前后 GOD 酶活对比

通过以上实验,初步优化得到重组菌株产 GOD 的发酵培养基为:甘油 20 g/L,酵母膏 2.64 g/L,氯化铵 2.64 g/L,无水硫酸镁 0.13 g/L,磷酸二氢钾 0.32 g/L,维生素 B₁ 3.34×10^{-4} g/L,初始 pH 值 6.0,发酵温度 28 ℃。优化前后重组菌的发酵情况见图 9。优化后 GOD 产量明显提高,酶活达到 11.0 U/mL,较优化前 GOD 产量提高了 72%。

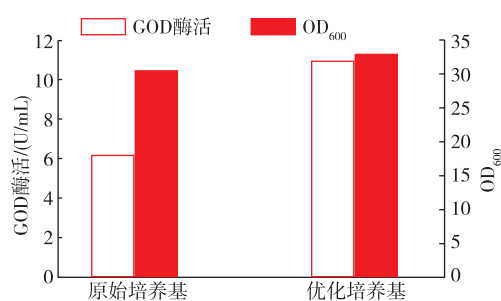


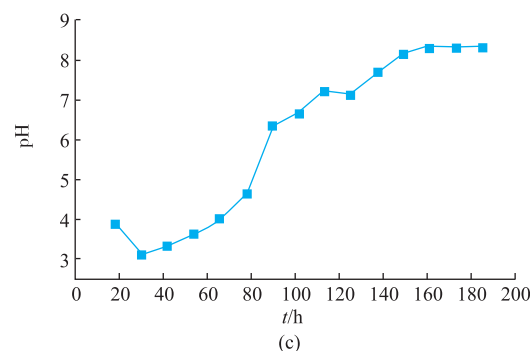
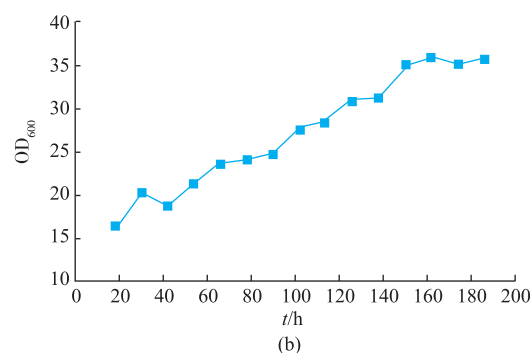
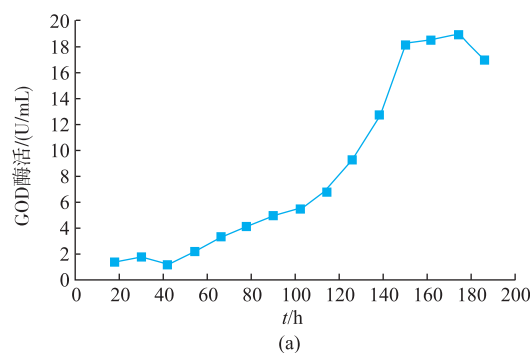
图 9 原始培养基与最优培养基发酵结果的对比

Fig. 9 Comparison of original medium and the optimum medium

2.9 3 L 罐上 GOD 的发酵生产

前述研究了重组菌株 *Yarrowia lipolytica* 1-28

在摇瓶水平上的发酵条件优化,在此基础上,对 3 L 发酵罐上 *Yarrowia lipolytica* 1-28 生产 GOD 的发酵过程进行了初步研究。将重组菌 *Y. Lipolytica* 1-28 以 10% 的接种体积分数接种至 3 L 发酵罐中,当 DO 反弹且大于 60% 时开始流加甘油以表达重组蛋白。由于甘油流加时间过长或流速过快时,产酶均受到抑制,因此选择短时流加甘油,甘油流速为 7.5 g/h,总共流加甘油量为 20 g/L。3 L 发酵罐流加甘油发酵生产的过程见图 10。在整个发酵过程中,菌体量显示稳步增加,后达到平稳状态,最终达到 35 g/L。发酵前期随着菌体量的增长,溶液 pH 先下降至 pH 3.1,随后反弹,甘油停止流加后,pH 很快上升直至 8.5 左右。发酵过程持续 200 h,在 172 h 处酶活最高,达 18.9 U/mL。



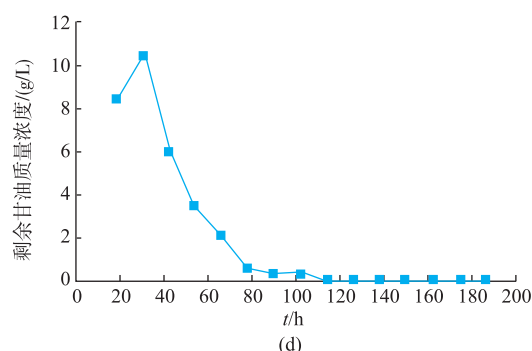


图 10 *Y. Lipolytica* 1-28 在 3 L 罐上发酵过程图

Fig. 10 Fermentation result of *Y. Lipolytica* 1-28 at a 3 L bioreactor

2.10 改进 pH 控制策略

pH 控制方式对产物的积累起着重要的作用^[25]。综合发酵情况可以看出,在 pH 自然变化的情况下,发酵液的 pH 先维持较低水平,发酵后期 pH 升高到较高水平,前后 pH 变化范围较大。且在 pH 上升至 5.0 左右时,GOD 开始快速积累。为了充分发挥解脂耶氏酵母的发酵性能,分别控制发酵液 pH 为 4.0、5.0、6.0,在 3 L 罐上进行研究。

如图 11 所示,控制 pH 对 *Y. Lipolytica* 1-28 产 GOD 产生较大影响,GOD 酶活得到显著的提高。当控制 pH 分别为 4.0 和 5.0 时,GOD 的酶活差异不大,其最高酶活分别为 57.9 U/mL 和 61.0 U/mL。而

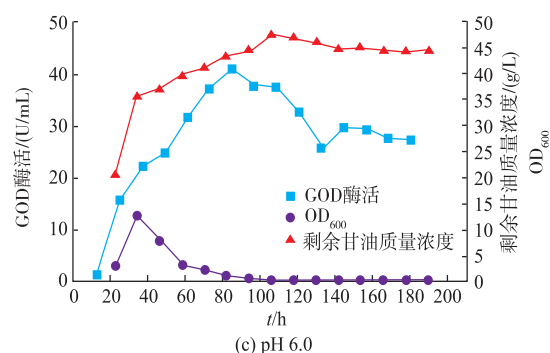


图 11 pH 对 *Y. Lipolytica* 1-28 在 3 L 罐上发酵的影响

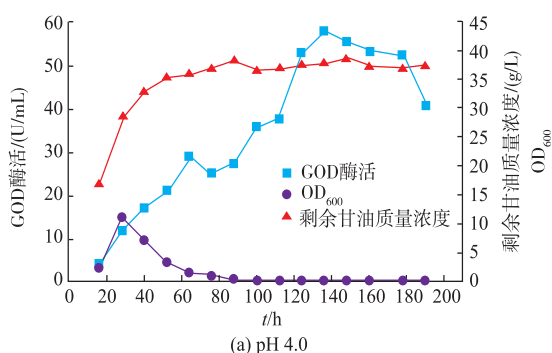
Fig. 11 Fermentation result of *Y. Lipolytica* 1-28 at a 3L bioreactor with pH control

当 pH 控制为 6.0 时,GOD 最高酶活相对较低,为 40.9 U/mL。

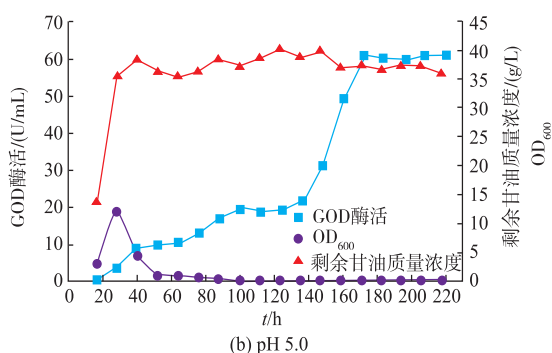
2.11 甘油补料对 3 L 罐发酵产酶的影响

在 3 L 发酵罐上,用 4 M NaOH 和 2 M H₂SO₄ 控制 pH 恒定为 5.0,分别考察了不补料和甘油补料 20 g/L(见章节 3.10)、30、40、50 g/L 的产酶情况。结果如图 12 所示。

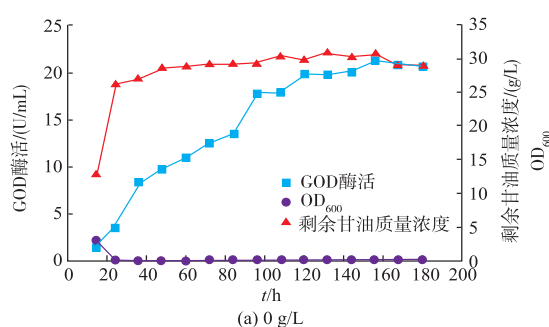
在不补料情况下,调控发酵液 pH 为 5.0,GOD 的最高酶活为 21.2 U/mL。在甘油补料 30 g/L,发酵 190 h,发酵液酶活达到最高为 81.6 U/mL,与 3.10 中甘油补料为 20 g/L 相比,提高 33.8%。甘油补料 40 g/L 和 50 g/L 时,甘油过剩对产酶产生了抑制作用,且产酶期延长,其 GOD 最高酶活分别为 30.6 U/mL 和 25.9 U/mL。



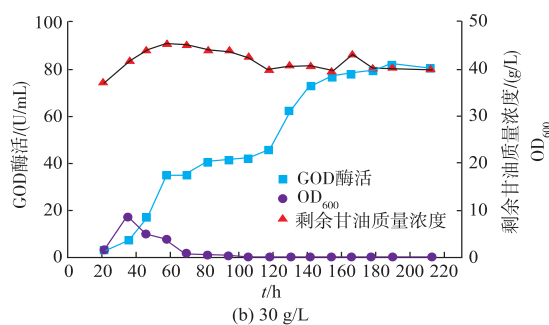
(a) pH 4.0



(b) pH 5.0



(a) 0 g/L



(b) 30 g/L

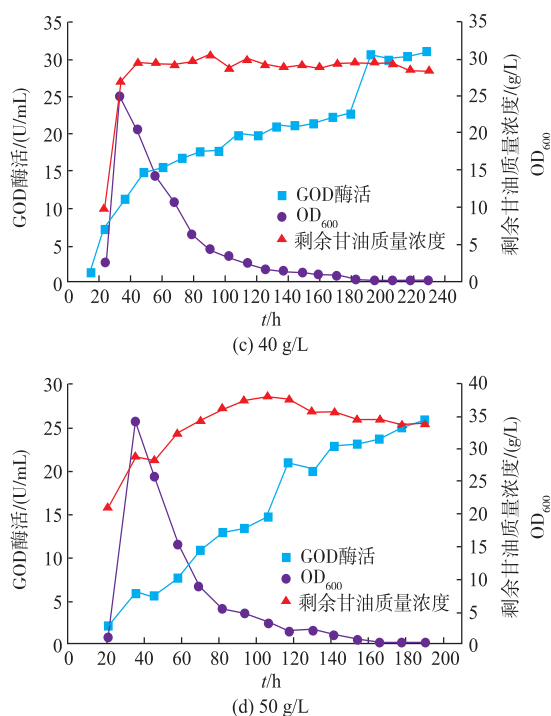


图 12 甘油补料对 *Y. Lipolytica* 1-28 在 3 L 罐上发酵的影响

Fig. 12 Time-course of fed-batch fermentation by Glycerol feeding

参考文献:

- [1] HATZINIKOLAOU D G, MACRIS B J. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1995, 17(6): 530-534.
- [2] KALISZ H M, HENDLE J, SCHMID R D. Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1997, 47(5): 502-507.
- [3] HATZINIKOLAOU DG, HANSEN O C, MACRIS B J, et al. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1996, 46(4): 371-381.
- [4] WITT S, WOHLFAHRT G, SCHOMBURG D, et al. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose [J]. **The Biochemical Journal**, 2000, 347: 553-559.
- [5] MEYER M, WOHLFAHRT G, KNABLEIN J, et al. Aspects of the mechanism of catalysis of glucose oxidase: A docking, molecular mechanics and quantum chemical study [J]. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998, 12(5): 425-440.
- [6] PLUSCHKELL S, HELLMUTH K, RINAS U. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger* [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1996, 51(2): 215-220.
- [7] WANG Shuqing, LIU Xiuhua. Glucose oxidase and its application on food industry [J]. **Food Science and Technology**, 2001, 3(116): 30-31. (in Chinese)
- [8] NAKAO K, KIEFNER A, FURUMOTO K, et al. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors [J]. **Chemical Engineering Science**, 1997, 52(21-22): 4127-4133.
- [9] KLEINlein J, ROSENBERG M, MARKOS J, et al. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* - study of mass transfer in an airlift bioreactor [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2002, 10(3): 197-205.
- [10] KANG Hui, LI Hongfei, HAO Xiaoxia. Brief introduction of glucose oxidase and its application [J]. **Agriculture Engineering Technology**, 2008(1): 16-19. (in Chinese)
- [11] LIU Chao, YUAN Jianguo, WANG Yuanxiu, et al. Progress on glucose oxidase [J]. **Food and Drug**, 2010, 12(7): 285-289. (in Chinese)

3 结语

作者构建了分泌表达黑曲霉来源葡萄糖氧化酶的解脂耶氏酵母重组菌株,通过单因素实验与正交实验,得到优化后发酵培养基组成如下:甘油 20 g/L,酵母膏 2.64 g/L,氯化铵 2.64 g/L,无水硫酸镁 0.13 g/L,磷酸二氢钾 0.32 g/L,维生素 B1 3.34×10^{-4} g/L,初始 pH 值 6.0, 28 °C 发酵。采用优化培养基及发酵条件培养重组菌株, GOD 发酵酶活达到 11.0 U/mL,较优化前 GOD 产量提高了 72%。在 3 L 发酵罐上,采用在摇瓶水平上的最优营养条件,进一步进行了 pH 控制和甘油流加策略的研究。在调控 pH 为 5.0 恒定,短时流加甘油量为 30 g/L 时, GOD 酶活可达到 81.6 U/mL。综上所述,通过 pH 控制策略和流加发酵策略的优化对重组解脂耶氏酵母产 GOD 有显著的提高,为食品安全级菌株高产葡萄糖氧化酶的工业生产奠定了基础。

Chinese)

- [12] CRUEGER A, CRUEGER W. Glucose transforming enzymes[M]. Netherlands:Springer,1990.
- [13] KONA R P, QURESHI N, PAI J S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and cornsteep liquor[J]. **Bioresource Technology**, 2001, 78(2):123-126.
- [14] PETRUCCIOLI M, FENICE M, PICCIONI P. Distribution and typology of glucose-oxidase activity in the genus *Penicillium*[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 1993, 17(6):285-288.
- [15] FREDERICK K R, TUNG J, EMERICK R S, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1990, 265(7):3793-3802.
- [16] KRIECHBAUM M, HEILMANN H J, WIENTJES F J, et al. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3[J]. **FEBS Letters**, 1989, 255(1):63-66.
- [17] BANKAR A V, KUMAR A R, ZINJARDE S S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009, 84(5):847-865.
- [18] BORDES F, FUDALEJ F, DOSSAT V, et al. A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2007, 70(3):493-502.
- [19] NICAUD J M, MADZAK C, BROEK P v d, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. **FEMS Yeast Research**, 2002, 2(3):371-379.
- [20] WAN Dan, SUN Keqin, LIU Song, et al. Fermentation optimization of pro-transglutaminase produced by a recombinant *Yarrowia lipolytica* strain[J]. **Food Science and Technology**, 2014(4):5-9.(in Chinese)
- [21] XUAN J M, FOURNIER P, GAILLARDIN C. Cloning of the LyS5 gene encoding saccharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration[J]. **Current Genetics**, 1988, 14(1):15-21.
- [22] BANKAR S B, BULE M V, SINGHAL R S, et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase[J]. **Food Bioprocess Tech**, 2009, 2(4):344-352.
- [23] ZHANG Yongsheng, GAO Hui, WANG Yanping. Determination of glycerol content in clavulanic acid broth by spectrophotometry[J]. **Journal of Tianjin University of Science & Technology**, 2006, 21(1):15-17.(in Chinese)
- [24] 顾磊. *Aspergillus niger* 葡萄糖氧化酶的异源分泌表达、分子改造和发酵生产[D]. 无锡:江南大学, 2014.
- [25] MORGUNOV I G. Enhanced α -ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(19):8711-8718.

会 议 消 息

第三届生物识别与应用国际会议(ICBEA 2019)

会议时间:2019-05-29 至 2019-05-31

会议地点:瑞典 斯德哥尔摩

主办单位:ICBEA 2019

联系人:罗女士

电话:+86-28-86528465

Email:icbea@cbees.net

官方网址:http://www.icbea.org/

会议简介:2019年第三届生物识别与应用国际会议将于2019年5月29-31日在瑞典斯德哥尔摩,瑞典精英酒店举行。

会议亮点:1. ICBEA 2019 录用的文章能发表在国际会议论文集上,被 Ei Compendex 和 Scopus 等检索。

2. 来自荷兰屯特大学的 Raymond Veldhuis 教授,应邀成为 ICBEA 2019 的委员会成员。

3. 2019年5月31日将安排考察活动。