

一株新分离烟曲霉葡萄糖氧化酶的优化及生产

陈霞

合肥学院, 合肥 230601, 中国

摘要: 葡萄糖氧化酶 (GOx) 在化学、制药、纺织和其他生物技术工业中有许多新的应用。本研究旨在优化烟曲霉 AFS4 的生产葡萄糖氧化酶。从尼日利亚恩苏卡大学教职工宿舍的花园土壤中分离烟曲霉, 并筛选其葡萄糖氧化酶生产能力。通过生化测试和 18S-rDNA 测序确认分离物为烟曲霉。分离菌株被标记为烟曲霉 AFS4。在深层发酵系统中, 烟曲霉 AFS4 生产 GOx, 酶活力为 1591U μ mol/min, 蛋白质浓度为 3.89mg/ml。对 GOx 的生产条件进行了优化, 包括碳源、氮源、CaCO₃、pH 和发酵时间。葡萄糖 (80g/L) 是葡萄糖氧化酶 (GOx) 生产的最佳碳源, 其活性为 1542 μ mol/min。与其他测试的氮源相比, 蛋白胨 (3g/L) 更适合于 GOx 的生产, 其活性为 1231 μ mol/min。在生产培养基中添加 30g/L 的碳酸钙 (CaCO₃) 可提高 GOx 的产量。GOx 生产的最佳 pH 值为 6.5。在第 7 天, GOx 产量达到最高, 活性为 1517 μ mol/min。结果证明, 烟曲霉 AFS4 具有生产葡萄糖氧化酶用于各种工业应用的强大潜力。

关键词: 分离; 烟曲霉 AFS4; 18S-rDNA 序列; 优化; 葡萄糖氧化酶

Optimization and Production of Glucose Oxidase from a Newly Isolated Strain of *Aspergillus fumigatus*

Xia Chen

Hefei University, Hefei 230601, China

Abstract: Glucose oxidase (GOx) has several novel applications in chemical, pharmaceutical, textile, and other biotechnological industries. This study was aimed at optimizing the production of glucose oxidase from *Aspergillus fumigatus* AFS4. *Aspergillus fumigatus* was isolated from garden soil, obtained from staff quarters University of Nigeria, Nsukka and was screened for glucose oxidase production capability. Biochemical tests and 18S-rDNA sequencing were used to confirm the isolate as *Aspergillus fumigatus*. The isolate strain was tagged as *Aspergillus fumigatus* AFS4. GOx was produced from *Aspergillus fumigatus* AFS4 under submerged fermentation system with an enzyme activity of 1591U μ mol/min and protein concentration of 3.89mg/ml. Different conditions for GOx production which include carbon sources, nitrogen sources, CaCO₃, pH and fermentation time were optimized. Glucose (80g/L) was found to be the best carbon source for GOx production with GOx activity of 1542 μ mol/min. Peptone (3g/L) was found suitable for GOx production with GOx activity of 1231 μ mol/min compared to other nitrogen sources tested. CaCO₃ enhanced GOx production when 30g/L of it was used to supplement the production medium. The optimum pH



for GOx production was 6.5. The highest GOx production was obtained on the 7th day with GOx activity of 1517 μ mol/min. The results proved that *Aspergillus fumigatus* AFS4 has strong potential to produce glucose oxidase for various industrial applications.

Keywords: Isolation; *Aspergillus fumigatus* AFS4; 18S-rDNA sequence; Optimization; Glucose oxidase

葡萄糖氧化酶 (β -D-葡萄糖: 氧 1-氧化还原酶) 以分子氧为电子受体, 催化 β -D-葡萄糖氧化为葡萄糖酸和过氧化氢 (H_2O_2)。葡萄糖氧化酶最早由 Muller 从黑曲霉和灰绿青霉的菌丝体中分离出来, 并在不同来源 (昆虫、蜂蜜、藻类和微型真菌) 中检测到, 最近又从尼崎青霉中分离得到。从结构上讲, 葡萄糖氧化酶 (GOx) 是一种二聚糖蛋白, 由两个相同的多肽亚基组成, 它们通过二硫键共价连接在一起。葡萄糖氧化酶 (GOx) 活性依赖于黄素-腺嘌呤二核苷酸 (FAD), 这是一种在反应过程中被暂时还原的辅因子。该反应可分为还原步骤和氧化步骤。目前的研究重点是调控 GOx 产生的因素。GOx 的生产需要培养基成分 (例如碳、氮、 $CaCO_3$) 以及环境因素 (例如温度、pH 值和搅拌) [1]。必须优化这些因素才能有效生产 GOx。关于优化各种真菌生产 GOx 所需条件的报道很少。葡萄糖氧化酶是一种重要的商业酶, 因其在各行各业中的应用而广泛。它广泛应用于化工、能源、食品工业、纺织、制药和医疗领域。在这些应用中, 近年来 GOx 最引人注目和新颖的应用是在生物传感器和生物燃料行业。本研究的目的是分离产生 GOx 的真菌, 对分离菌株进行分子鉴定, 并利用分离的真菌优化生产 GOx 所需的条件。

一、材料与方法

邻联茴香胺二盐酸盐购自美国 Sigma 公司。用于蛋白质测定的 Folin-Ciocalteu 苯酚购自美国 Sigma-Aldrich Chemicals Limited 公司。辣根过氧化物酶、D(+)-葡萄糖、甘油、蛋白胨、乙醇购自美国 Sigma-Aldrich Chemicals Limited 公司。本研究所有设备及仪器均由尼日利亚恩苏卡大学生物化学系实验室组装。

根据 Clark 等人描述的方法, 从尼日利亚恩苏卡大学埃努古州校区的园地土壤中分离纯真菌培养物。根据 Martin 等人的鉴定, 该微生物通过光学显微镜鉴定为曲霉菌。采用 Eun-Ha Park 等人的方法筛选, 鉴定该菌为葡萄糖氧化酶产生菌。将分离的真菌培养于含有葡萄糖 (80g)、蛋白胨 (3.0g)、磷酸氢二铵 (0.388g)、磷酸二氢钾 (0.188g)、七水硫酸镁 (0.156g) 和琼脂 (20g) 的培养基中, 并在 pH 5.5 的 1 升乙酸钠缓冲液中培养。将培养液在 121 $^{\circ}C$ 下灭菌 15 分钟; 将培养液倒入培养皿中, 使其凝胶化。从纯培养菌落的边缘区域取一小片 (2mm) 真菌培养物, 并将其转移到含有上述培养基的培养皿中。将培养皿在 35 $^{\circ}C$ 下培养 3 天, 然后用含有 5% 葡萄糖 (w/v)、2% 甘油 (v/v)、0.1% 邻联茴香胺 (w/v)、60IU/ml 辣根过氧化物酶和 1% 琼脂 (w/v) 的乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) 溶液处理。用该溶液覆盖培养 4 天的真菌, 培养 1 小时。红棕色变色表示存在 GOx。

鉴定、筛选出 GOx 产量最高的真菌, 并将其在 4 $^{\circ}C$ 的 PDA 斜面上培养。

通过分子表征方法鉴定出具有 GOx 生产能力的真菌。使用 AccuPrep $^{\circ}$ DNA 提取试剂盒, 按照制造商的说明提取分离真菌的基因组 DNA (gDNA)。使用引物对 ITS 1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS 4 (5' - GCTGCGTTCTTCTTCATGATGC-3') 对真菌内部转录间隔区 (ITS) 进行 PCR 扩增。PCR 条件设定如下: 94 $^{\circ}C$ 预变性 3 分钟, 94 $^{\circ}C$ 变性 40 秒, 54 $^{\circ}C$ 退火 40 秒, 72 $^{\circ}C$ 延伸 40 秒, 72 $^{\circ}C$ 最终延伸 10 秒。琼脂糖凝胶电泳采用 1.5% 琼脂糖凝胶 (1.5g 琼脂糖溶于 100ml Tris-乙酸-EDTA (TAE) 缓冲液中)。将琼脂糖凝胶粉末微波溶解于 1 $\times$ TAE 缓冲液中。将混合物冷却至 55 $^{\circ}C$, 加入 12 μ l 溴化乙锭, 并在 37 $^{\circ}C$ 下冷却 30 分钟。将 DNA 梯状物 (6 μ l) 和扩增子 (10 μ l) 加入琼脂糖凝胶孔中, 然后在 100V 电压下电泳 1 小时。使用紫外灯箱/凝胶成像系统对凝胶上的 DNA 条带进行可视化。对获得的 DNA 序列进行 BLAST (核苷酸基本局部比对搜索工具) 搜索算法, 并使用基于快速傅里叶变换 (MAFFT) 版本 5 的多序列比对进行比对。使用分子进化遗传分析

(MEGA) 版本 7 对 ITS 序列数据进行系统发育分析。

为优化 Simpson 等人描述的 GOx 深层生产工艺, 培养基成分为: 葡萄糖 80% (w/v)、蛋白胨 0.3% (w/v)、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.04% (w/v)、 KH_2PO_4 0.0188% (w/v)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0156% (w/v)、 CaCO_3 3.5% (w/v)。用 1M NaOH 将培养基 pH 值调节至 6.0, 然后在 121℃ 高压灭菌 15 分钟。所有实验均在装有 100 ml 培养基的 250 ml 锥形瓶中进行。将四片纯培养的微生物接种于灭菌后的培养基中, 并在 30℃ 的定轨摇床 (150rpm) 中培养。收集发酵产物, 过滤后以 15000rpm 的转速离心 15 分钟。上清液即为粗酶。

我们还进行了为期 14 天的中试研究, 以确定适宜 GOx 生产的日期。实验的进行方式确保在后续研究中保持上一次实验中优化的参数。

在本研究中, 将培养基的 pH 值调整至不同水平 (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0), 以优化 GOx 的生产。

使用不同浓度 (即 10-120g/L) 的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖和木糖等碳源来优化 GOx 的产生和烟曲霉 AFS4 的生长。

测定了不同浓度 (1、2、3、4、5 和 6g/L) 的蛋白酶蛋白胨、酵母提取物和细菌蛋白胨对氮源的影响。

使用不同浓度 (10-60g/L) 的 CaCO_3 研究了 CaCO_3 对 GOx 产生的影响。

按照 Bergmeyer 等人描述的方法测定 GOx 活性, 以葡萄糖为底物, 邻联茴香胺为偶联剂。制备了试剂 A、B、C、D 和 E 用于测定。试剂 A 为 0.05M 乙酸钠缓冲液, pH 5.5; 试剂 B 为溶于 100ml 试剂 A 中的 O-联茴香胺溶液 (0.21mM); 试剂 C 为 β -D-葡萄糖溶液 (10%w/v); 试剂 D 为 24ml 试剂 B 和 5ml 试剂 C 的混合物; 试剂 E 为新鲜配制的 II 型辣根过氧化物酶溶液, 浓度为 60 紫外没食子酸单位/ml。反应混合物包含 2.9ml 试剂 D、0.1ml 试剂 E 和 0.1ml 酶溶液。使用紫外-可见分光光度计在 500nm 波长下, 每 15 秒测定一次吸光度, 持续 5 分钟。一个 GOX 活性单位定义为在 35℃、pH 5.5 的条件下, 每分钟催化 1 μ mole β -D-葡萄糖转化为 D-葡萄糖酸内酯和 H_2O_2 所需的酶量。

粗 GOx 的蛋白质含量测定方法参照 Lowry 等人的方法, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品。

深层发酵培养基的组成为: 葡萄糖 80% (w/v)、蛋白胨 0.3% (w/v)、磷酸氢二铵 0.04% (w/v)、磷酸二氢钾 0.0188% (w/v)、硫酸镁 $\cdot$ 7 水合物 0.0156% (w/v)、碳酸钙 3.5% (w/v), 50 mM 醋酸钠缓冲液 (pH 6.0)。将 100 ml 无菌发酵液接种于 250 ml 锥形瓶中, 每个锥形瓶接种四片烟曲霉 ASF4 纯培养物。将培养瓶置于 30℃、150rpm 的定轨摇床上培养 7 天。收集每个培养瓶中的发酵生物物质, 过滤后以 15000rpm 的转速离心 15 分钟。上清液即为粗酶。

二、结果与讨论

提取 S4 分离株的染色体 DNA, 并通过 PCR 扩增 18S rDNA。

扩增子的琼脂糖凝胶电泳图与 DNA 梯状图相比, 在约 500bp 处显示出清晰的条带。通过与 NCBI 数据库中获取的其他 15 个已知曲霉菌种序列进行比较, 对该序列进行了多重比对。结果以系统发育树的形式呈现, 证实 S4 分离株为烟曲霉。目标真菌分离株 (Query 136965) 与烟曲霉菌株 MG991595.1、MK719925.1 和 MH378448.1 的相似性高达 99%。

经过十四天的中试研究, 在发酵的第 7 天获得了最高的 GOx 产量 (1517 μ mol/min), 之后, 酶产量开始下降, 尽管 Bankar 等人报告称 GOx 产量的最佳发酵时间为 4 天。这种变化可能是由于真菌菌株、所用接种物的大小、诱导剂的类型或发酵系统以及 pH 值、温度和可用氧等环境因素造成的。Mukhtar 等人观察到第三天 (3) 的产量达到最大。最佳发酵后活性的下降可能是由于 GOx 与 D-葡萄糖反应过程中产生的 H_2O_2 的积累导致的。

生长或酶抑制。GOx 活性下降后又有所增加,可能是由于真菌对 H_2O_2 的适应,或者真菌可能被诱导产生过氧化氢酶来分解 H_2O_2 。这对于细胞的活力和 GOx 的稳定性至关重要。这表明过氧化氢酶的产生是由 GOx 活性的降低和高浓度的 H_2O_2 诱导的,并支持了本研究的结果。

在所研究的生理参数中,生长培养基的 pH 值通过诱导生物体的形态变化和酶的分泌起着重要作用。

在 pH 值 5.0 - 6.5 之间观察到酶产量最大,最适 pH 值为 6.5。最适 pH 值为 6.5,它通过增强营养物质的溶解度和吸收、酶活性、细胞膜形态、副产物的形成和氧化还原反应来影响微生物的生理机能。在生物体生长过程中观察到的 pH 值变化会影响培养基中产物的稳定性。大多数用于生产 GOx 的商业化菌株的最适 pH 值在 6.0 至 7.0 之间,有利于其生长和酶的产生,这与我们的发现呈正相关。

在基础培养基中添加了不同浓度的碳源 (20 - 120 g/L)。尽管烟曲霉 AFS4 在所有测试的碳源上都能生长,但当使用葡萄糖和蔗糖作为碳源时,GOx 活性水平显著升高。Bankar 等人报道,使用葡萄糖、蔗糖和糖蜜均可获得显著水平的 GOx。在本研究中,随着葡萄糖浓度从 20 增加到 80g/L,GOx 产量提高,但之后 GOx 产量没有显著增加。发现 GOx 生产的最佳葡萄糖浓度为 80g/L,酶活性为 1542 μ mol/min。与其他碳源相比,在补充葡萄糖的培养基中 GOx 活性最高,其次是蔗糖,尽管 Singh 和 Verma 报道蔗糖可显著提高 GOx 活性水平。葡萄糖是 GOx 基因转录的主要诱导物。与其他碳水化合物相比,GOx 对葡萄糖具有高度特异性。在微生物发酵过程中,碳源不仅是构建细胞物质的主要成分,还用于多糖的合成和作为能量来源。碳源的代谢速率通常会影响生物质的形成或初级或次级代谢物的产生。本研究与 Bankar et al. 的研究结果一致,他们报告称葡萄糖和蔗糖在黑曲霉中更有效地产生 GOx。

为了优化 GOx 的最大产量,我们使用了不同浓度 (1-6g/L) 的蛋白酶蛋白胨、酵母提取物和细菌蛋白胨。结果发现,蛋白酶蛋白胨是 GOx 生产的有效氮源。随着蛋白酶蛋白胨浓度从 1g/L 增加到 3g/L,GOx 产量增加,在 3g/L 浓度时达到最大活性 (1231 μ mol/min)。该浓度与 Fiedurek 和 Gromada 的报告一致。然而, Singh 和 Verma 报告称,1.5g/L 蛋白酶是黑曲霉生产 GOx 的最佳浓度。氮源浓度的增加产生了更高的生物量,但降低了 GOx 产量。这项研究与 Bankar 等人获得的类似结果一致[2,3]。

$CaCO_3$ 浓度从 10 增加到 30g/L 时,GOx 产量增加,超过该浓度时酶产量降低,因此,30g/L 是烟曲霉 AFS4 产生 GOx 的最佳 $CaCO_3$ 浓度。在生长培养基中添加碳酸钙可能导致代谢从糖酵解转向戊糖磷酸途径,从而增加 GOx 水平。Bankar 等人报道称,碳酸钙可能是黑曲霉中 GOx 的强诱导剂,并证明它对提高 GOx 产量至关重要。Bankar 等人发现 30g/L 的 $CaCO_3$ 是最高 GOx 产量的最佳浓度。然而, Singh 和 Verma 报道称 $CaCO_3$ 在 20g/L 浓度下即可促进 GOx 的产生。在生长培养基中添加碳酸钙会导致葡萄糖氧化酶 (GOx)、过氧化氢酶 (CAT)、6-磷酸果糖激酶 (6-PFK) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) 活性发生变化。Lui 等人报告称,在生长培养基中添加 $CaCO_3$ 会改变 6-磷酸果糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶产生 GOx 的情况[4]。6-PFK 是大多数活细胞中 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 途径的关键调节酶。Liu 等人进一步表明,在不含碳酸钙的培养基中生长的细胞会产生高水平的 6-PFK 和低含量的 G-6-PDH、GOx 和 CAT。在生长培养基中添加碳酸钙会增加 GOx 和 CAT 的产生,并减少 6-PFK 的合成。因此,这一观察结果与我们的研究结果相符,表明碳酸钙的加入伴随着代谢从糖酵解途径 (EMP) 向葡萄糖氧化酶 (GOx) 直接氧化葡萄糖的转变。

在优化条件 (葡萄糖 80g/L、蛋白胨 3g/L、 $CaCO_3$ 30g/L、pH 6.5,发酵时间为 7 天) 下,烟曲霉 AFS4 在深层发酵系统中生产 GOx,其酶活为 1591U μ mol/min,蛋白质浓度为 3.89mg/ml。

三、结论

这些研究为大规模生产工业和生物技术应用所需的葡萄糖氧化酶 (GOx) 提供了最佳条件。这丰富了关于产

生 GOx 的真菌的信息。此外, 研究结果表明烟曲霉 AFS4 可以作为葡萄糖氧化酶的潜在来源。

参考文献

- [1] Bankar S, Bule M, Singhal R, et al. Optimization of *Aspergillus Niger* fermentation for the production of glucose oxidase. *Food Bioprocess Technology*, 2008, 19: 47-56.
- [2] Bankar S, Bule M, Singhal R, et al. Glucose oxidase — An overview, *Biotechnology Advances*. 2009, 27: 489-501.
- [3] Bao J, Koumatsu K, Arimatsu Y, et al. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 15: 177-184.
- [4] Bergmeyer H, Gawehn K, Grassl M. *Methods of Enzymatic Analysis* Bergmeyer, HU, Second Edition, vol. 1. New York: Academic Press Inc, 1974.