

海洋芽孢杆菌 *Bacillus sp.* CAMT22370 所产葡萄糖氧化酶的分离纯化与表征

聂绮倩, 莫日坚, 徐德峰, 孙力军, 王雅玲, 叶日英

(广东海洋大学 食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋食品工程技术研究中心, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 前期筛选获得一株海洋源 *Bacillus sp.* CAMT22370 高产葡萄糖氧化酶菌株, 本研究进一步通过离子交换及分子筛层析使 *Bacillus sp.* CAMT22370 葡萄糖氧化酶纯化了 2.12 倍, 酶活得率 32.37%, 比活力达到 8.47 U/mg, 分子质量约为 50 kDa。酶学特性研究表明, 此酶在低温下有较好的催化活性, 最适温度为 30℃, 超过 30℃时酶活迅速下降, 45℃保温 2 h 活力降至 75%左右; 最适 pH 为 6.0, 在 5.0 以下和 7.0 以上时酶活迅速降低, 9.0 时损失 35%; Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 有明显激活作用, Na^+ 和 Zn^{2+} 有轻微激活作用, K^+ 和 Mg^{2+} 对酶活无显著影响, 而 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对酶活有明显抑制作用, 酶动力学参数 V_{max} 及 K_m 值分别为 26.85 ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$) 和 109.26 ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$), 以上酶学特性与现有酶制剂存在明显不同, 研究结果为该葡萄糖氧化酶的开发利用奠定了初步基础。

关键词: *Bacillus sp.* CAMT22370; 葡萄糖氧化酶; 分离; 酶学特性

中图分类号: R332 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2018)05-0068-09
DOI: 10.11759/hyhx20171017001

近年来随着海洋生物技术的兴起和对海洋生物资源开发意识的增强, 国内外对海洋微生物及其酶的研究进展迅速, 开发具有全新性质的酶已成为国际酶制剂研究的热点^[1-3]。葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOD)能高度专一性地催化 β -D-葡萄糖与空气中的氧反应, 使葡萄糖氧化成为葡萄糖酸和过氧化氢, 一方面可降低食品基质中的氧分压, 并减缓因葡萄糖存在而造成的褐变^[4]; 另一方面过氧化氢在过氧化氢酶的作用下产生新生态氧, 从而起到抑菌或杀菌功效^[5]。基于葡萄糖氧化酶良好的生物脱氧、脱糖及抑菌效果, 以及良好的安全性^[6], 目前已在面粉改良^[7, 8]、乳品脱氧^[9]、蛋品脱糖^[10]及果汁果酒保鲜^[11]等领域得到广泛应用。

目前葡萄糖氧化酶的工业化生产主要采用黑曲霉或青霉发酵^[12-15], 但在发酵过程中较低的表达量及较多杂蛋白的存在给分离纯化带来很大困难, 导致产品成本增高^[16-17], 且已报道的葡萄糖氧化酶最适温度多在 30~40℃的温度范围^[18], 而在 0~10℃的食品冷链温度下活力相对较低, 在冷藏对虾的黑变防控中效果不佳。基于葡萄糖氧化酶在生物体内分布的广泛性和海洋微生物酶的低温催化特性, 从代表性海洋生物资源中筛选高活力低温葡萄糖氧化酶

的目标微生物是发挥葡萄糖氧化酶优良应用潜力的前提^[19], 而酶的分离纯化是研究酶结构、功能和工业化应用的基础^[20]。本课题组前期从南海近海泥土中分离到一株高产葡萄糖氧化酶的海洋芽孢杆菌 *Bacillus sp.* CAMT22370, 本研究进一步对所产葡萄糖氧化酶进行纯化与表征, 以期为该酶的开发利用奠定初步基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DEAE-纤维素、Sephadex G-75 (美国 Pharmacia

收稿日期: 2017-10-17; 修回日期: 2017-11-20

基金项目: 广东省科技厅项目(2013B021100016, 2014B020205006); 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室开放课题(2014K03); 广东海洋大学大学生创新课题(CXXL2014042)

[Foundation: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2013B021100016, 2014B020205006; The Ministry of Agriculture in the East China Sea and Ocean Fishery Resources Development and Utilization of Key Laboratory, No. 2014K03; College Students Innovation Project of Guangdong Province, No. CXXL2014042]

作者简介: 聂绮倩(1995-), 女, 本科生, 从事食品科学与工程专业课程学习与基本科学研究; 徐德峰(1978-), 通信作者, 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事水产食品质量与安全控制研究, 电话: 13827198525, E-mail: 13827198525@163.com; 孙力军(1964-), 通信作者, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事水产食品质量与安全控制研究, 电话: 13828289466, E-mail: suncamt@126.com

公司); 中分子质量蛋白质 Marker(日本 Takara 公司); 丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 R-250、TEMED (英国 Fluka 公司); SDS (美国 Amersco 公司)。实验所用其它试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

UV2102 紫外可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司); pH-10精密酸度计(德国 Sartorius 公司); THZ-82 型水浴恒温振荡器(江苏金坛市荣华仪器制造有限公司); 中低压蛋白纯化系统、微型垂直板蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Eppendorf 5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Tecan infinite 200 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.3 *Bacillus* sp CAMT22370 活化、发酵与葡萄糖氧化酶活力测定

Bacillus sp CAMT22370 分离自环北部湾海泥, 保藏于本实验室, 使用时以 NaCl 含量 3%的营养琼脂 30℃培养 48 h 进行菌株活化, 种子培养液为 NaCl 含量 3%的常规 LB 液体培养基, 35℃下 150 r/min 培养 48 h 作为种子发酵液, 发酵培养基组成为氯化钠 35g、鱼粉蛋白胨 10 g、麦芽糖 10 g、CaCl₂ 0.5 g、蒸馏水 1 000 mL, 200 mL 培养基装于 500 mL 三角瓶, 121℃灭菌 20 min 成发酵培养基, 将种子液以 6%的体积比接种到发酵培养基, 28℃下 200 r/min 培养 72 h, 发酵结束后 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清得粗酶液, 粗酶液中葡萄糖氧化酶活力测定参照朱运平等人实验方法进行^[16]。

1.4 分离纯化

1.4.1 硫酸铵分级盐析

参照刘芳等^[17]的实验方法, 取一定体积的粗酶液, 在冰浴上分次缓慢加入充分研细的固体硫酸铵。第一次加硫酸铵至 30%饱和度, 冰浴静置 4 h, 然后于 4℃下, 12 000 r/min 离心 20 min 得到第一个沉淀组分, 记下所加硫酸铵的量作为盐析曲线的起点。继续加硫酸铵于上清至 50%饱和度, 同样条件下离心得到第二个组分, 继续收集 50%~70%和 70%~90%饱和度沉淀组分, 将每一级沉淀物分别溶解在一定体积的 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)中, 透析脱盐后测定其蛋白质含量和酶活力, 以每段组分的蛋白质含量和葡萄糖氧化酶活力对硫酸铵饱和度作图得盐析曲线。

1.4.2 DEAE-纤维素离子交换层析

参照顾磊^[18]实验方法, 20 mmol/L、pH 7.0 的 PBS

缓冲液平衡 DEAE-纤维素离子交换柱(2.5×50 cm, 50 mL), 取 5 mL 盐析脱盐后的酶液(总蛋白量约 15 mg)加样于离子交换柱, PBS 缓冲液充分洗柱(约 200 mL), 以 1.0 mol/L NaCl 溶液为 A 液, 20 mmol/L、pH 7.0 的 PBS 缓冲液为 B 液, A 与 B 液采用梯度混合器进行混合, 形成 NaCl 连续线性浓度梯度进行洗脱, 流速定为 4 mL/min, A₂₈₀ 检测蛋白洗脱峰, 收集蛋白峰并超滤浓缩(截留分子量 10 000Da), 调整至同一蛋白浓度后测定每峰的葡萄糖氧化酶活力, 收集最大活性峰处蛋白作为进一步纯化的样品。

1.4.3 Sephadex G-75 凝胶过滤层析

参照徐德峰实验方法^[19], 用 20 mmol/L、pH 6.0 的 PBS 缓冲液平衡 Sephadex G-75 凝胶柱, 取上一步收集的高酶活蛋白峰浓缩液 5 mL(约 5 mg 蛋白)作为分子筛层析的样品, PBS 缓冲液洗脱, 流速定为 1 mL/min, 收集蛋白峰并超滤浓缩, 调整至同一蛋白浓度后测定其葡萄糖氧化酶活力, 电泳检测高酶活蛋白峰纯度。

1.4.4 蛋白酶纯度鉴定与分子质量测定

采用 12%分离胶、5%浓缩胶的 SDS-PAGE 电泳检测纯化后的蛋白酶纯度, 结合标准蛋白分子质量初步确定目标葡萄糖氧化酶的分子质量, SDS-PAGE 操作程序参照文献[14]相应部分。样品与上样缓冲液混和后直接上样(每孔 20 μL), 采用 Bio-Rad 微型恒压电泳仪冰浴上电泳至溴酚蓝距前端约 0.5 cm 处结束电泳, 电压条件定为浓缩胶 80V, 分离胶 100V。电泳结束后以去离子水浸洗胶 2 次, 每次 20 s, 采用考马斯亮蓝染色对胶片进行染色观察, 分子质量测定根据分子质量标准蛋白 R_f 值与 LogM_r 之间的对应方程求出。

1.5 *Bacillus* sp. CAMT22370 源葡萄糖氧化酶的特征

1.5.1 最适温度及热稳定性

参照 Ozyilmaz 等实验方法^[20], 分别于 15、20、25、30、35、40、45℃下测定葡萄糖氧化酶的活力, 考察温度对葡萄糖氧化酶活力的影响, 根据实验结果绘制温度-活力曲线, 同时将酶液分别于上述温度下保温 2 h, 测定保温前后葡萄糖氧化酶活力的变化, 以最大活力处为对照, 由此计算其余温度点处的相对酶活力, 以相对活力对温度作图, 绘制葡萄糖氧化酶的热稳定性曲线。

1.5.2 最适 pH 与 pH 稳定性

参照文献[22-23], 分别配制 pH 为 3.5、4.0、4.5、

5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的缓冲溶液,然后将 50 μL 酶液与 200 μL 缓冲溶液混合,30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min 后测定葡萄糖氧化酶的活力,考察 pH 对葡萄糖氧化酶活力的影响,绘制 pH-酶活曲线,确定葡萄糖氧化酶的最适 pH,同时于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下放置 2 h,然后调整至最适 pH,测定葡萄糖氧化酶活力,以酶活对 pH 作图,绘制葡萄糖氧化酶的 pH 稳定性曲线。

1.5.3 金属离子对葡萄糖氧化酶活性的影响

在葡萄糖氧化酶的最适 pH 条件下,参照石淑钰等^[23]实验方法,将酶液与不同金属离子混和,金属离子终浓度为 10 mmol/L,于室温放置 2 h 后测定酶活,以未加入金属离子的样品为对照,考查各种金属离子对葡萄糖氧化酶活性的影响。

1.5.4 葡萄糖氧化酶动力学参数测定

参照徐德峰^[19]实验方法,在 50 mmol/L、pH 7.0 的 PBS 缓冲溶液中分别配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液(0~2%),考察底物浓度与反应速度的关系。根据实验数据采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法确定米氏方程中的 K_m 和 V_{max} 。

1.6 统计分析

每个数据均为 3 次测定平均值,采用均值 \pm 标准差表示,统计学检验采用 SPSS 13.0 中相应程序。

2 结果与分析

2.1 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶的分离纯化

2.1.1 葡萄糖氧化酶分段盐析

由于蛋白质构件分子氨基酸所带电荷的不同造成了不同蛋白质其溶解度与等电点不同,沉淀时所需的 pH 值与离子强度也不相同,因此改变盐浓度与溶液 pH 值,可将混合液中的蛋白质分批盐析。粗酶液中混杂有数量众多的杂蛋白,葡萄糖氧化酶的含量相对偏低,为浓缩粗酶液并初步纯化葡萄糖氧化酶,在柱层析之前,用固体硫酸铵对粗酶液进行了分段盐析,结果见图 1。

由图 1 可以看出,粗酶液中蛋白质的沉淀伴随着整个盐析过程,在 70% 饱和度前几乎呈线性变化趋势,估计与粗酶液中复杂的蛋白质组成有密切关系。当酶液中硫酸铵饱和度小于 30% 时,沉淀中葡萄糖氧化酶活力较低,当饱和度继续增加时,沉淀中葡萄糖氧化酶活力随硫酸铵饱和度的增加而增加,

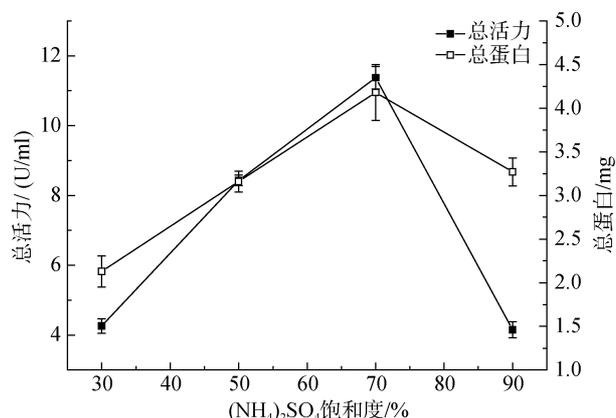


图 1 *Bacillus* sp. CAMT22370 源葡萄糖氧化酶盐析曲线
Fig. 1 Curve of ammonium sulfate precipitation of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370

达到 70% 时,葡萄糖氧化酶活力开始下降。据此,收集硫酸铵饱和度 30%~70% 的组分,离心收集沉淀即得粗酶。基于盐析原理分析,蛋白质分子表面的水化膜厚度及所带电荷的性质和电量是决定盐析分级沉淀效果的内在因素,本实验中高酶活部分集中在硫酸铵饱和度 30%~70% 之间,表明发酵液中葡萄糖氧化酶蛋白分子水化膜厚度及所带电荷处于中等水平。与王志新等^[24]先采用 90% 饱和度硫酸铵全部沉淀黑曲霉 A9 发酵液中蛋白后,再分离纯化其中葡萄糖氧化酶相比,本实验针对性更强。

2.1.2 葡萄糖氧化酶 DEAE-纤维素离子交换层析

取盐析后收集到的蛋白粗酶溶于少量 50 mmol/L、pH 7.0 的 PBS 洗脱液中,在相同的缓冲液中进行透析除盐, BaCl₂ 检测透析至溶液无 SO₄²⁻, 0.45 μm 超滤膜过滤后进行 DEAE-纤维素柱层析,结果见图 2。

由图 2 可以看出,经过 DEAE-纤维素离子交换层析共分出 4 个蛋白组分,酶活跟踪发现 P1 组分基本没有活性,且在洗脱初期被洗脱下来, P3 和 P4 组分活性也较低,葡萄糖氧化酶活力主要集中在 P2 处。将 DEAE-纤维素柱层析收集到的 P2 蛋白组分浓缩液取出 2 mL,进行 Sephadex G-75 凝胶过滤层析,以 50 mmol/L、pH 7.0 PBS 缓冲液 1.0 mL/min 恒速洗脱,记录 A_{280} nm 值并检测葡萄糖氧化酶活力,结果见图 2b。由图 2b 可以看出,经 DEAE-纤维素离子交换纯化后的 P2 蛋白在 Sephadex G-75 凝胶过滤又分出 Pa 和 Pb 两个组分,酶活检测发现其酶活主要集中在 Pb 处。通过多步纯化操作,使 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶纯化了 2.12 倍,酶活得率 32.37%,比活力达到 8.47 U/mg,纯化流程及结果见表 1。

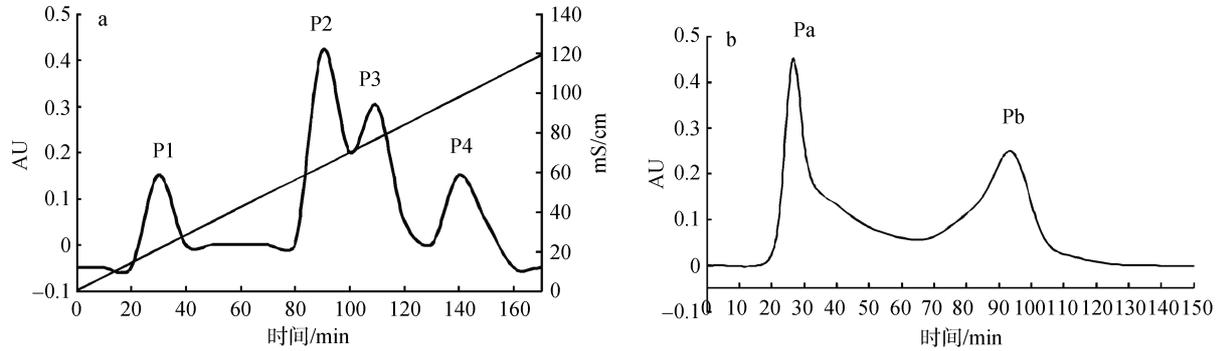


图 2 *Bacillus* sp. CAMT22370 发酵液(a) DEAE-纤维素与(b) Sephadex G-75 蛋白层析曲线

Fig. 2 Purification of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370 by (a) DEAE-cellulose chromatography and (b) molecular sieve chromatography

表 1 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶的分离纯化

Tab. 1 Purification procedures of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活力/(U/mg)	蛋白回收率/%	纯化倍数
粗酶液	72.3	289.5	4.00	100.00	1.00
硫酸铵沉淀	52.7	254.8	4.83	72.89	1.21
DEAE-纤维素	35.7	219.7	6.15	49.38	1.54
Sephadex G-75	23.4	198.2	8.47	32.37	2.12

2.1.3 葡萄糖氧化酶纯度鉴定与分子质量测定

将发酵液硫酸铵盐析浓缩酶液、DEAE-纤维素离子交换浓缩液和 Sephadex G-75 凝胶柱层析 Pb 组分进行 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 4。

由图 3 可以看出, 粗酶液经硫酸铵盐析沉淀后仍有较多杂蛋白, 经 DEAE-纤维素离子交换后杂蛋

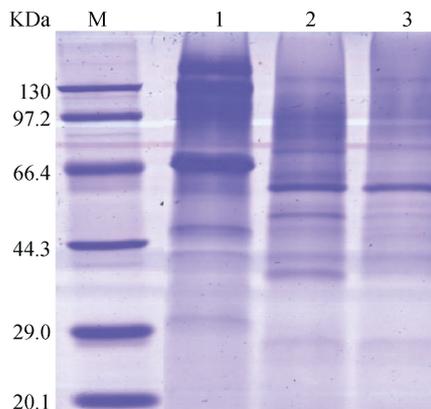


图 3 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶纯化流程电泳图谱

Fig. 3 Purification profiles of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370

M. 蛋白质分子质量; 1. 硫酸铵盐析浓缩液; 2. DEAE-纤维素层析浓缩液; 3. Sephadex G-75 层析浓缩液

M. molecular weight of marker proteins; 1. concentration solution purified by salting-out of ammonium sulfate; 2. concentration solution purified by DEAE-cellulose chromatography; concentration solution purified by Sephadex G-75 chromatography

白进一步减少, 进一步经 Sephadex G-75 凝胶柱层析后, 将 Pb 组分电泳检测, 发现只有一条主带, 将分子质量 M 及迁移率 R_f 值进行拟合, 得分子质量 M 与 R_f 间相关公式为 $\text{Log}M_r = -2.27R_f + 5.14 (R^2 = 0.9938)$, 根据迁移率计算纯化后的葡萄糖氧化酶分子质量为 68.72 kDa, 与苏莱等^[25]分离自黑曲霉 H1-9b 葡萄糖氧化酶分子质量 94.1 kDa 不同, 但与安玉麟等^[26]将黑曲霉葡萄糖氧化酶基因 66.5 kDa 的原核表达融合产物不同, 原因可能在于菌株来源不同, 其酶蛋白的合成和翻译后修饰存在不同。

2.2 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶的特征

2.2.1 葡萄糖氧化酶最适温度及热稳定性

在 20 mmol/L、pH 7.0 PBS 缓冲液中, 分别于 15、20、25、30、35、40、45℃ 下测定葡萄糖氧化酶活力, 考察温度对葡萄糖氧化酶活力的影响, 绘制温度-酶活力曲线, 同时各自温度下放置 2h 后再次于最适温度处测定酶活, 以保温前初始值为对照, 绘制温度-相对活力曲线, 结果见图 4。

由图 4 可以看出, *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶对温度的选择性与其它酶类具有一致性, 当温度较低时活力也较低, 当温度超出一定值时活力开始下降, 这反映了酶作为生物催化剂的结构本

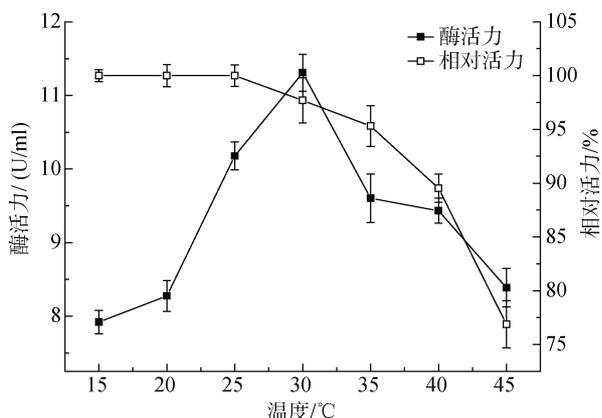


图4 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶最适反应温度及温度稳定性

Fig. 4 The optimal temperature and its stability at different temperature of glucose oxidases from *Bacillus* sp. CAMT22370

质。*Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶最适作用温度为 30°C, 之后酶活迅速下降。温度稳定性研究表明, 在 30°C 以前, 酶相对活性可维持在 95% 以上, 但当高于 30°C 时酶活开始迅速下降, 45°C 保温 2 h 活力降至 75% 左右, 综合研究表明, 本菌株所产葡萄糖氧化酶热稳定性较差, 而低温下可显示良好的酶学活性。石淑钰等^[23]自黄海海泥样品中分离出一株假单胞杆菌 *Pseudomonas migulae* GOD2, 热力学性质表明, 此菌株所产葡萄糖氧化酶在低温条件下具有较佳的催化活性, 20°C 时催化活力最高, 10°C 时仍具有较高的酶活, 但热稳定性较差, 随着温度升高酶活迅速降低, 60°C 处理 1 h 酶活基本丧失。本研究结果与石淑钰等的研究相似, 所分离的海洋细菌葡萄糖氧化酶均有较佳的低温催化活力, 提示海洋微生物产葡萄糖氧化酶的酶学性质与陆生菌株有显著的内在差别, *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶更适合在低温下使用, 提示在食品冷链保鲜中有应用潜力。而且, 本课题组进一步考察了 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶对南美白对虾冷链保鲜过程中品质的影响, 结果表明 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶不仅能有效防止对虾褐变, 而且对其色泽、气味、硬度、弹性、咀嚼性和黏附性等品质指标都有良好的保持作用^[27]。因此, 以上结果综合表明 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶在食品冷链保鲜中具有潜在应用价值。

2.2.2 葡萄糖氧化酶最适 pH 及 pH 稳定性

分别于 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、7.8 缓冲溶液中测定葡萄糖氧化酶的活力, 考察

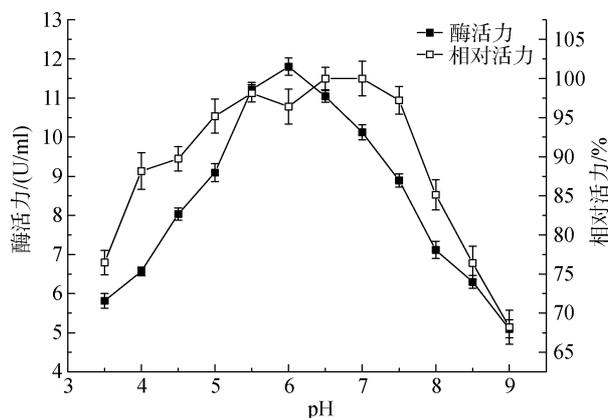


图5 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶最适 pH 及稳定性

Fig. 5 The optimum pH and its stability at different pH of glucose oxidases from *Bacillus* sp. CAMT22370

pH 对葡萄糖氧化酶活性及稳定性的影响, 结果见图 5。

由图 5 可以看出, 酶对 pH 变化较敏感, 其最适 pH 为 6.0, 在 5.0 以下和 7.0 以上时酶活迅速降低, 且稳定性也呈类似趋势, 在 pH 4.5 以下或 7.5 以上时酶活稳定性迅速下降, 当 pH 达到 9.0 时基本损失 35%。在最适 pH 及稳定性方面与毛秋霞等^[28]报道的 *Penicillium notatum* 青霉所产葡萄糖氧化酶最适 pH 6.5 相近, 但与石淑钰等^[23]分离出的 *Pseudomonas migulae* GOD2 葡萄糖氧化酶(最适 pH 7.0)不同, 总体来讲本课题组所分离的葡萄糖氧化酶较以往报道的葡萄糖氧化酶对 pH 更为敏感些, 可能是酶蛋白活性中心的催化结构对介质微环境中的电荷量要求较为苛刻, 当偏离 pH 5.0~7.0 时酶蛋白构象改变, 进而引起催化活力下降, 具体原因有待进一步研究。

2.2.3 金属离子对 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶活性的影响

分别配制 10 mmol/L 的 NaCl、KCl、MnCl₂、ZnCl₂、FeCl₃、FeSO₄、MgCl₂ 溶液, 将酶液与不同金属离子溶液等体积混和, 室温放置 2 h 后测定酶活, 以未加入金属离子的样品为对照, 考查各种金属离子对葡萄糖氧化酶活力的影响, 结果见图 6。

由图 6 可以看出, 在终浓度为 10 mmol/L 时, 金属离子种类对葡萄糖氧化酶活力有一定影响。Ca²⁺和 Mn²⁺有明显的激活作用, Na⁺和 Zn²⁺有轻微的激活作用, 对酶活有不同程度的抑制作用, K⁺和 Mg²⁺对酶活基本无影响, 而 Fe²⁺、Fe³⁺和 Cu²⁺对酶活有明显的抑制作用。就激活方面看, 其中以 Ca²⁺激活效果最

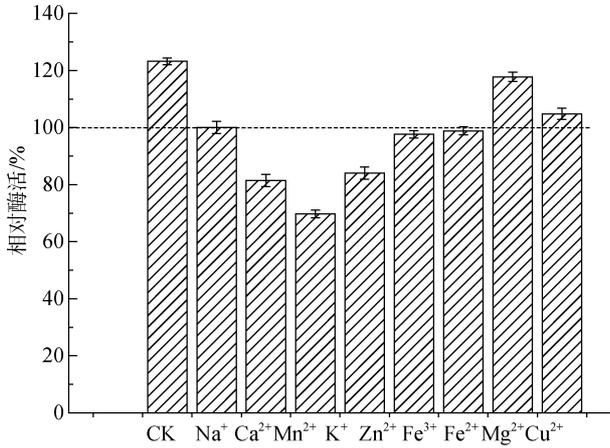


图 6 不同金属离子对 *Bacillus* sp. CAMT22370 产葡萄糖氧化酶活性的影响

Fig. 6 Influence of metal ions on glucose oxidase activity from *Bacillus* sp. CAMT22370

为明显, 与自身对照可使葡萄糖氧化酶活性提高 30%~40%, 但张茜等^[29]研究表明 Ca²⁺和 Mn²⁺对 *Penicillium amagasakiense* 青霉葡萄糖氧化酶活力基本无影响, 而与胡常英等报道的点青霉 HW2203 葡萄糖氧化酶应用特性较为类似^[30], 原因可能在于物种差异。

2.2.4 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶动力学参数测定

在 50 mmol/L、pH6.0 的 PBS 缓冲溶液中配制 0~2% 的葡萄糖溶液, 考察底物浓度与反应速度之间的关系。根据实验数据, 对变量进行线性拟合, 可得到米氏方程的线性拟合式, 根据方程可以计算出葡萄糖氧化酶的最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m , 结果见图 7。

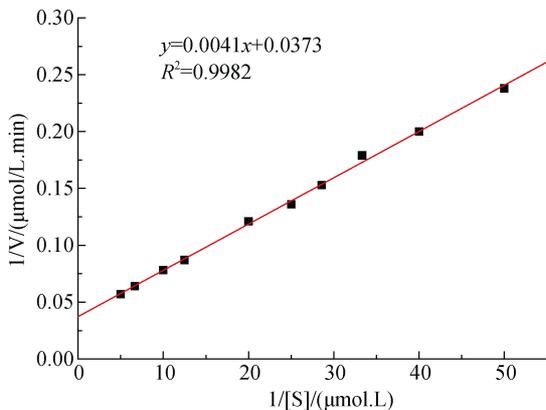


图 7 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶双倒数曲线
Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of glucose oxidases from *Bacillus* sp. CAMT22370

由图 7 根据拟合曲线得葡萄糖氧化酶对葡萄糖的 V_{max} 为 26.85 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 较黑曲霉 H1-9b 所产葡萄糖氧化酶 21.88 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 的最大反应速度略低些^[25], 而低于青霉 *Penicillium* sp. CBS 120262 葡萄糖氧化酶 35.71 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ^[31]。就 K_m 值而言, *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶为 109.26 mmol/L, 明显大于青霉 *Penicillium* sp. CBS 120262 葡萄糖氧化酶的 18.4 mmol/L 和黑曲霉 H1-9b 的 30.69 mmol/L。基于 V_{max} 和 K_m 定义可知, 该株海洋细菌 *Bacillus* sp. CAMT22370 所产葡萄糖氧化酶对葡萄糖的亲合力较黑曲霉和青霉菌葡萄糖氧化酶略低, 提示可进一步通过菌种改良提升酶的亲合力。

3 结论

通过多步纯化使 *Bacillus* sp. CAMT22370 葡萄糖氧化酶纯化了 2.12 倍, 酶活得率 32.37%, 比活力达到 8.47 U/mg, 分子质量为 50 kDa。酶学特性研究表明此酶最适温度为 30℃, 超过 30℃酶活迅速下降, 45℃保温 2 h 活力降至 75%左右; 该酶对 pH 变化较敏感, 其最适 pH 为 6.0, 在 5 以下和 7 以上时酶活迅速降低, 9.0 时基本损失 35%; 无机盐中 Ca²⁺和 Mn²⁺有明显的激活作用, Na⁺和 Zn²⁺有轻微的激活作用, K⁺和 Mg²⁺对酶活基本无影响, 而 Fe²⁺、Fe³⁺和 Cu²⁺对酶活有明显的抑制作用; 同时通过动力学分析得出酶蛋白动力学常数 V_{max} 为 26.85 mmol/(L·min)而 K_m 值为 109.26 mmol/L。基于所得菌株葡萄糖氧化酶良好的低温催化活性, 有望在冷链食品的保鲜中进行开发利用, 同时鉴于该酶的温度和 pH 敏感性, 在酶制剂的制备过程中需进一步研究活性保持技术。

参考文献:

- [1] 刘洋. 海洋微生物极端酶发酵条件优化及其酶学性质研究[D]. 杭州: 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2012: 14-17.
Liu Yang. Fermentation optimization and characterization of marine microorganism extremozymes[D]. Hangzhou: a master thesis for the Third Institute Oceanography, State Oceanic Administration, 2012: 14-17.
- [2] 韩尧跃, 林娟, 张建美, 等. 产琼脂糖酶海洋微生物的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 228-235.
Han Yaoyue, Lin Juan, Zhang Jianmei, et al. Isolation and identification of an agarase-producing marine microorganism and study on its enzymatic properties[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition),

- 2015, 43(2): 228-235. DOI: 10.631/issn.1000-2243. 2015. 02.0278.
- [3] 张琇, 孙谧, 王清印, 等. 海洋微生物溶菌酶的发酵优化与中试生产[J]. 化学工程, 2007, 35(7): 45-49.
Zhang Xiu, Sun Mi, Wang Qingyin, et al. Fermentation optimization and pilot production of a marine microorganism lysozyme[J]. Chemical Engineering, 2007, 35(7): 45-49.
- [4] Bankar S B, Bule M V, Singhal R S, et al. Glucose oxidase-an overview[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(4): 489-501.
- [5] Cruz A G, Castro W F, Faria J A F, et al. Glucose oxidase: A potential option to decrease the oxidative stress in stirred probiotic yogurt[J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 47: 512-515.
- [6] 魏杰, 杨仁党, 李雪云. 葡萄糖/葡萄糖氧化酶抗菌纸及抗菌性研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 124-127.
Guo Jie, Yang Rendang, Li Xueyun. Study on glucose/glucose oxidase antibacterial paper and its antimicrobial property[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(1): 124-127.
- [7] Guiseppi-Elie A, Choi S H, Geckeler K E. Ultrasonic processing of enzymes: effect on enzymatic activity of glucose oxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 58: 118-123.
- [8] Konishi T, Aoshima T, Mizuhashi F, et al. Safety evaluation of glucose oxidase from *Penicillium chrysogenum*[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, 66: 13-23.
- [9] Rasiah I A, Sutton K H, Low F L, et al. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants[J]. Food Chemistry, 2005, 89: 325-332.
- [10] Bonet A, Rosell C M, Caballero P A, et al. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: a study from macroscopic to molecular level[J]. Food Chemistry, 2006, 99: 408-415.
- [11] Sisak C, Csanadi Z, Ronay E, et al. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 1002-1007.
- [12] Parpinello G P, Chinnici F, Versari A, et al. Preliminary study on glucose oxidase-catalase enzyme system to control the browning of apple and pear purees[J]. Lebensmittel-Wissu.-Technology, 2002, 35: 239-243.
- [13] Karmali K, Karmali A, Teixeira A, et al. Assay for glucose oxidase from *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense* by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Analytical Biochemistry, 2004, 333: 320-327.
- [14] Crognale S, Pulci V, Brozzoli V, et al. 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.
- [15] Leskovac V, Trivić 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, 23(37): 731-750.
- [16] 朱运平, 褚文丹, 李秀婷, 等. 1株产胞外葡萄糖氧化酶黑曲霉的液体发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 90-98.
Zhu Yunping, Chu Wendan, Li Xiuting, et al. Fermentation condition optimization of *Aspergillus niger* producing extracellular glucose oxidase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(5): 90-98.
- [17] 刘芳, 甘芝霖, 赵金红, 等. 富士苹果中膜结合态多酚氧化酶分离纯化方法[J]. 农业机械学报, 2015, 36(2): 193-197.
Liu Fang, Gan Zhilin, Zhao Jinhong, et al. Isolation and purification method of membrane-bound polyphenol oxidase in Fuji apple, 2015, 36(2): 193-197.
- [18] 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[M]. 无锡: 江南大学博士论文, 2014: 4-6.
Gu Lei. Heterologous expression, molecular modification, and fermentation of glucose oxidase from *Aspergillus niger*[D]. Wuxi: a doctoral dissertation for Jiangnan University, 2014: 4-6.
- [19] 徐德峰. 高活力酸性蛋白酶曲霉融合子的选育及其在酱油发酵中的初步应用[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2010: 90-91.
Xu Defeng. Breeding of high activity of acid protease from *Aspergillus* fusant and preliminary utilization in soy sauce fermentation[D]. Guangzhou: a doctoral dissertation for Southern China University of Technology, 2010: 90-91.
- [20] Ozyilmaz G, Tukul S S, Alptekin O. Activity and storage stability of immobilized glucose oxidase onto magnesium silicate[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 35: 154-160.
- [21] Miron J, Vázquez J A, González M P, et al. Joint effect of nitrogen and phosphorous on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*: discussion of an experimental design with a risk of co-linearity[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 40(1): 54-63.
- [22] 范新蕾, 肖成建, 顾秋亚, 等. ARTP 诱变选育葡萄糖氧化酶高产菌株及发酵条件优化[J]. 工业微生物, 2015, 45(1): 15-19.
Fan Xinlei, Xiao Chengjian, Gu Qiuya, et al. ARTP

- mutation breeding of glucose oxidase-producing strains and optimization of fermentation conditions[J]. *Industrial Microbiology*, 2015, 45(1): 15-19.
- [23] 石淑钰, 张庆芳, 迟乃玉, 等. 一株海洋低温葡萄糖氧化酶菌株的筛选、鉴定及部分酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(5): 832-838.
Shi Shuyu, Zhang Qingfang, Chi Naiyu, et al. A strain of marine low-temperature glucose oxidase screening, identification and the preliminary research of part enzymology properties[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(5): 832-838.
- [24] 王志新, 李宁, 韩军, 等. 黑曲霉 A9 葡萄糖氧化酶的提取纯化[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(1): 64-69.
Wang Zhixin, Li Ning, Han Jun, et al. Extraction and purification of glucose oxidase from *Aspergillus Niger* A9[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(1): 64-69.
- [25] 苏茉, 高亚朋, 梁建荣, 等. 黑曲霉 H1-9b 葡萄糖氧化酶的分离纯化及部分性质研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(3): 181-184.
Su Mo, Gao Yapeng, Liang Jianrong, et al. Isolation, purification and some properties of glucose oxidase from *Aspergillus niger* H1-9b[J]. *Food Science*, 2011, 32(3): 181-184.
- [26] 安玉麟, 孙瑞芬, 张鹤龄, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的原核表达及其蛋白产物的 Western-blot 分析[J]. *华北农学报*, 2009, 24(4): 84-87.
An Yulin, Sun Ruifen, Zhang Heling, et al. Prokaryotic expression and western-blot analysis of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*[J]. *Acta agriculture and boreali-simica*, 2009, 24(4): 84-87.
- [27] 徐德峰, 叶日英, 李彩虹, 等. *Bacillus* sp. CAM-T22370 源葡萄糖氧化酶对南美白对虾贮藏性能的影响[J]. *食品科学*, 2017, 31(21): 259-264.
Xu Defeng, Ye Riying, Li Caihong, et al. Effect of glucose oxidase from the marine bacterium *Bacillus* sp. CAMT22370 on quality preservation of Pacific White Shrimp during cold storage[J]. *Food Science*, 2017, 31(21): 259-264.
- [28] 毛秋霞, 黄永芳, 陈甜女, 等. 几种葡萄糖氧化酶部分性质的比较[J]. *华南农业大学学报*, 2000, 21(2): 54-56.
Mao Qiuxia, Huang Yongfang, Chen Tiannv, et al. Comparison of the partial qualities of several glucose oxidases[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2000, 21(2): 54-56.
- [29] 张茜, 闫冰, 康劲翻, 等. 金属离子对青霉葡萄糖氧化酶的效应研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2010, 49(3): 396-399.
Zhang Xi, Yan Bing, Kang Jinhe, et al. Effects of metal ions on the activity of GOD from *Penicillium amagasakiense*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2010, 49(3): 396-399.
- [30] 胡常英, 刘丽娜, 王云鹏, 等. 点青霉 HW2203 葡萄糖氧化酶应用特性研究[J]. *生物学杂志*, 2008, 25(1): 31-34.
Hu Changying, Liu Lina, Wang Yunpeng, et al. Research of GOD applied characteristics from *Penicillium notatum* HW2203[J]. *Journal of Biology*, 2008, 25(1): 31-34.
- [31] Simpson C, Jordaan J, Gardiner NS, et al. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51(2): 260-266.

Purification and characterization of the glucose oxidase from a marine strain *Bacillus* sp. CAMT22370

NIE Qi-qian, MO Ri-jian, XU De-feng, SUN Li-jun, WANG Ya-ling, YE Ri-ying

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

Received: Oct. 17, 2017

Key words: *Bacillus* sp. CAMT22370; glucose oxidase; purification; enzymatic characteristics

Abstract: At previous study, a marine strain *Bacillus* sp. CAMT22370 with high activity of glucose oxidase was screened and in this research the purification and characterization of glucose oxidase were conducted with

ion-exchange and gel filtration chromatography. The result showed that the glucose oxidase was purified 2.12 fold with the recovery yield of 32.37%, the specific enzyme activity of 8.47 U/mg and molecular weight of 50 kDa. Furthermore, the characterization of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370 indicated that desirable catalyzing ability was observed at low temperature with the optimal temperature at 30°C and the activity sharply decreased when the temperature was above 30°C. Especially, 25% of the GOD activity lost when the enzyme was maintained at temperature of 45°C for 2h. The optimal pH for catalyzing was found at 6.0 and the activity dropped rapidly when the pH value was below 5.0 or above 7.0 and the activity loss of 35% was observed at pH of 9.0. The metal ions of Ca²⁺ and Mn²⁺ obviously enhanced the enzyme activity and the evident inhibition on activity was observed by metal ions of Fe²⁺, Fe³⁺ and Cu²⁺. In addition, Na⁺ and Zn²⁺ slightly enhanced the activity while the ions of K⁺ and Mg²⁺ had no effect on the enzyme activity. The dynamics of Vmax and Km were 26.85 μmol/(L·min) and 109.26 μmol/(L·min), respectively. This research demonstrated that there was evident difference in enzymatic characteristics between *Bacillus* sp. CAMT22370 and the reported data and set a preliminary base for developing and utilizing this glucose oxidase.

(本文编辑: 康亦兼)