

点青霉 (*Penicillium notatum*) AS 3.3871

葡萄糖氧化酶的研究

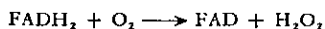
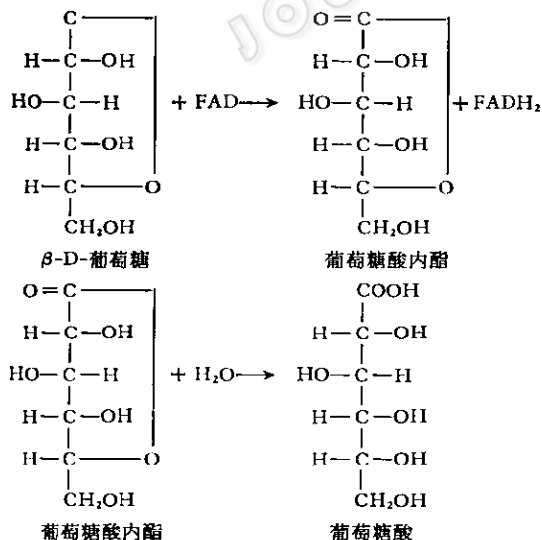
葡萄糖氧化酶协作组*

摘 要

从 367 株青霉菌和曲霉菌中筛选获得产生葡萄糖氧化酶的优良菌株 *Penicillium notatum* AS 3.3871。纸层析鉴定酶促反应产物为葡萄糖酸。以硝酸钠为氮源,蔗糖为碳源的合成培养基 (pH 5.6), 于 26℃ 通气培养后, 静置一段时间, 每毫升发酵液的酶活力可达 15—18 单位。发酵液经弱酸性阳离子交换树脂柱层析, 可得浓缩的酶制剂, 该酶制剂可将蛋清中的葡萄糖脱除, 防止干蛋白片在储存期的“褐变”。

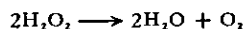
一、前 言

葡萄糖氧化酶首先由 Müller^[1] 从黑曲霉无细胞提取物中发现, 后来 Keilin 等^[2,3] 通过对部分提纯的葡萄糖氧化酶的研究, 发现该酶含有非蛋白的辅基: 黄素-腺嘌呤-二核苷酸 (FAD)。葡萄糖氧化酶是一种典型的需氧脱氢酶, 其正确的名称应为“β-D-吡喃型葡萄糖需氧脱氢酶”。它专一地催化葡萄糖氧化为葡萄糖酸。

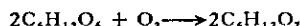


在自然状态下或在一般酶制剂中, 葡萄糖氧化酶

经常与过氧化氢酶联系在一起。过氧化氢酶催化过氧化氢的分解:



以上二酶联合催化反应如下:



在过量氧的存在下, 该酶制剂可从某系统中除去葡萄糖。反之, 在过量葡萄糖的存在下可除去氧气。按此原理, 该酶制剂能广泛应用于各类食品制造^[4,5]、器械除氧防锈^[6]等方面。另外, 鉴于葡萄糖氧化酶的作用高度专一性, 它也被用于一些复杂生化体系中的葡萄糖的定量测定^[7-9]。

为了适应各方面的需要, 我们开展了葡萄糖氧化酶生产菌的筛选、培养条件及应用试验。本文扼要报道主要研究结果。

二、材料和方法

1. 菌种 由中国科学院微生物所菌种保藏组提供青霉菌 38 株, 曲霉菌 20 株。由微生物所霉菌组提供青霉菌 305 株, 曲霉菌 4 株, 合计青霉菌 343 株, 曲霉菌 24 株。

2. 斜面种子培养 采用察氏培养基, 接种后于 27℃ 培养 (青霉菌培养 7 天, 曲霉菌培养 4 天)。

3. 摇瓶培养 筛选用的培养基组成为: 蔗糖 5%, 硝酸钠 0.2%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.05%, 氯化钾 0.05%, pH 5.6。条件试验用的培养基组成见正文。

取 25 毫升培养基分装于 200 毫升三角瓶中, 于 30℃ 振荡培养 5 天, 用脱脂棉滤除菌体后, 取滤液测定酶活力。

4. 葡萄糖氧化酶活力测定 参照 Покровская^[10] 的方法测定。取 250 毫升三角瓶, 加入 2% 葡萄糖——0.06M, pH 5.6 醋酸缓冲液 25 毫升及 1 毫升适当浓度酶液, 于 30℃ 振荡 1 小时, 然后加入 0.1N 氢氧化钠 20 毫升以终止反应, 用 0.1N 盐酸滴定剩余氢氧化钠。对照先加氢氧化钠, 后加酶液, 不振荡, 其他操作

* 协作组由中国科学院微生物研究所、江苏化工研究所、北京化工厂、江苏清江蛋厂组成。

同上。依据盐酸的滴定值计算生成的葡萄糖酸量。在上述条件下,每分钟催化氧化1微克分子葡萄糖,产生1微克分子葡萄糖酸,为一个酶活力单位。

5. 葡萄糖氧化酶酶促反应产物的纸层析 参照 Pásková 等^[11]和 Buch 等^[12]法,使用长30厘米的新华一号滤纸,溶剂系统为丁醇:甲酸:水=10:1:5,取用有机相,于25℃下行展开,吹干,用0.04%溴酚蓝(溶于95%乙醇)显色。

6. 葡萄糖氧化酶的提取 参照 Покровская^[13]方法,取弱酸性阳离子交换树脂110(华北药厂产品),用1N氢氧化钠及1N盐酸交替处理,装柱,再用0.1M, pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液平衡。将滤除菌丝的发酵液用醋酸钠调pH至4.5,通过上述处理好的交换柱,达到一定交换量后(每毫升树脂约交换400单位酶),先用0.1M, pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液淋洗,再用0.6M, pH 5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱,洗脱峰比较集中,有效收率为81—85%,过氧化氢酶的吸附与洗脱条件与葡萄糖氧化酶相近似,故产品中含有一定量过氧化氢酶,能满足蛋品脱糖之用。

7. 蛋清中葡萄糖含量的定量测定 参照 Somogyi^[14]方法。用磷钨酸沉淀蛋白质,用 Somogyi-铜试剂测定澄清滤液中的葡萄糖。

系统应是点青霉 (*Penicillium notatum*)。

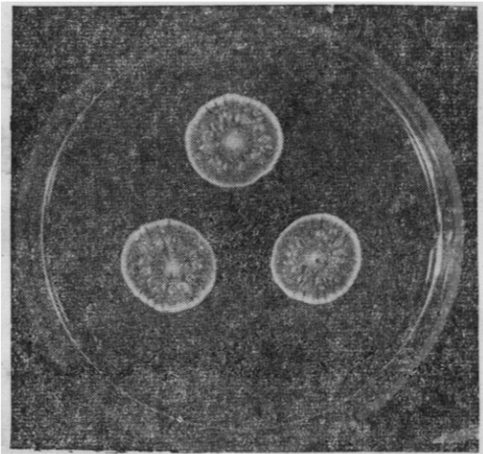


图1 AS 3.3871 菌落形态

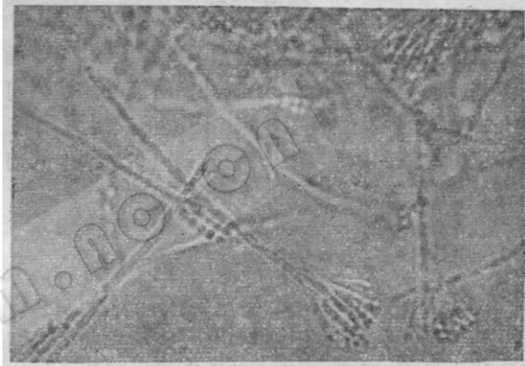


图2 AS 3.3871 菌株显微照相

三、实验结果

(一)筛选试验

1. 试验菌株产葡萄糖氧化酶活力 测定343株青霉菌和24株曲霉菌,其中3株青霉菌产生葡萄糖氧化酶量较高,并有一定数量过氧化氢酶,占受试青霉菌株0.9%(见表1)。

表1 青霉菌和曲霉菌的葡萄糖氧化产酶活力比较

菌种类别	菌株数	0—0.56 单位/毫升		0.56—1.35 单位/毫升		1.35—2.38 单位/毫升	
		菌株数	(%)	菌株数	(%)	菌株数	(%)
青霉菌	343	321	93.6	19	5.5	3	0.9
曲霉菌	24	24	100	0	0	0	0

继之,对活力较高的青霉菌 AS 3.3871 进行了进一步的研究。

2. AS 3.3871 青霉菌的鉴定* AS 3.3871 青霉菌自北京土壤中分离,在察氏培养基中,菌落局限型,茸毛状,有明显辐射状沟纹,呈轮状外观,分生孢子多,亮绿色,表面有黄色液滴,菌落反面黄色,略扩散于培养基中(图1)。帚状枝非对称型,一般作双轮分枝,很少侧枝,分生孢子球形或近似球形,光滑,一般2.6—3.6微米(图2)。根据以上形态特征,按 Raper 等^[15]分类

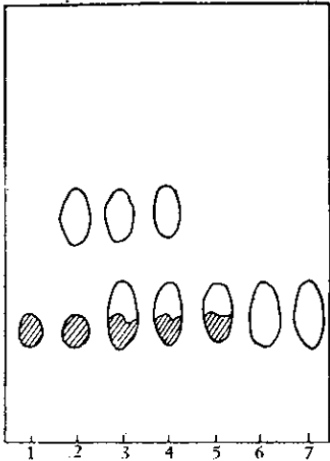


图3 葡萄糖氧化酶反应产物纸层析图谱
衬底浅蓝色 ○黄色 ●深蓝色

- 1.氯化钠水溶液; 2.磷酸钠缓冲液; 3.商品葡萄糖氧化酶反应产物; 4.点青霉 AS 3.3871 葡萄糖氧化酶反应产物; 5.葡萄糖酸钠水溶液; 6.用H型 Dowcx-50 树脂处理的葡萄糖酸钠(被转成葡萄糖酸); 7.葡萄糖内酯水溶液(即葡萄糖酸)。

* 鉴定工作由微生物研究所齐祖嗣同志协助完成。

3.点青霉 AS 3.3871 酶促反应产物的鉴定 点青霉 AS3.3871 发酵液与葡萄糖反应后,产物的纸层析图谱,在浅蓝色衬底上呈现三个斑点(两个黄色,一个蓝色),参照对照样品可判定, R_f 值最小的深蓝色斑点是反应系统中的钠盐, R_f 值最大的黄色斑点为反应系统中的磷酸盐, R_f 值居中的黄色斑点为反应产物葡萄糖酸(图 3)。从而证明点青霉 AS 3.3871 发酵液的反应确系葡萄糖氧化酶所催化,底物葡萄糖被氧化为葡萄糖酸。

(二)培养条件试验

为提高发酵液中酶活力,对 AS 3.3871 青霉菌进行了培养条件试验。在各条件试验中,下述几种培养基成分保持不变,即磷酸二氢钾 0.1%,硫酸镁 0.05%,氯化钾 0.05%。

1.不同氮源对酶形成的影响 将菌培养在 7% 蔗糖, 0.6% 硝酸钠及与此相当的其他氮源培养基中,在 30℃ 摇床振荡培养 5 天。试验结果见表 2。结果说明以硝酸钙为氮源,酶活力最高,硝酸钠次之, AS 3.3871 用氨态氮与有机氮几乎不能形成葡萄糖氧化酶。考虑到硝酸钙没有工业制品,试剂硝酸钙价值较贵,故以后试验采用硝酸钠为氮源。

表 2 不同氮源对酶形成的影响

氮源	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	NaNO ₃	Ca(NO ₃) ₂	豆饼粉
酶活 (单位/ 毫升发酵液)	0	0.66	0.21	1.17	3.36	5.00	0.50

2.不同碳源对酶形成的影响 在以 0.6% 硝酸钠为氮源,30℃ 振荡培养 5 天的条件下,比较了不同碳源对菌形成酶的影响,碳源浓度为 7%。由表 3 可见,以多糖为原料不产生葡萄糖氧化酶,对葡萄糖有一定纯度的要求,而对蔗糖则要求不严格,故以后试验用 7% 蔗糖为碳源。

表 3 不同碳源对酶形成的影响

碳源	白薯粉	胚芽饼粉	试剂葡萄糖	食用葡萄糖	试剂蔗糖	试剂砂糖
酶活 (单位/毫升发酵液)	0	0	5.46	3.11	4.7	5.21

3.不同温度对酶形成的影响 根据摇瓶和 50 升罐试验,25℃ 对酶的形成较 30℃ 略为有利(表 4)。

4.发酵后期静置对提高酶活力的影响 在旋转摇床培养时,4—5 天酶活力变化不大,当改为往复式摇床培养时,酶活力最初随培养时间增加而上升,后又随培养时间延长而很快下降,如在活力达到高峰,不再振

表 4 不同温度对酶形成的影响

酶活 培养方式	温度	酶活力(单位/毫升发酵液)	
		25℃	30℃
摇瓶 50 升罐	25℃	3.86	3.32
	30℃	3.84	3.29

荡而改为静置时,酶活力不但不减反而略有提高(表 5)。

表 5 摇瓶培养后期静置对提高酶活力的影响

培养条件	酶活(单位/毫升发酵液)					
	48小时	60小时	72小时	84小时	96小时	120小时
连续振荡	2.77	3.02	3.36	0	0	0
48小时后静置		2.95	3.16	3.28	—	3.66
60小时后静置			3.46	3.53	—	4.06
72小时后静置				3.82	—	3.53
84小时后静置					0.34	0.57

根据上述试验结果,在深层通风发酵时,也仿用此方法,即当酶活力达到稳定水平不再增长时,停风、停搅拌,放置一定时间,结果有和摇瓶类似的结果(表 6)。

表 6 深层通风发酵后期静置对提高酶活的影响

批号	静置前酶活 (单位/毫升)	静置后酶活* (单位/毫升)	增长 (单位/毫升)
1	12.64	15.20	2.56
2	13.36	17.70	4.34
3	13.19	15.70	2.51
4	14.03	18.20	4.17

* 第一批静置 5 小时,其他三批静置 23 小时。

(三)用葡萄糖氧化酶制剂脱除蛋清中的葡萄糖

由于新鲜鸡蛋清中含有约 0.45% 的葡萄糖,所以

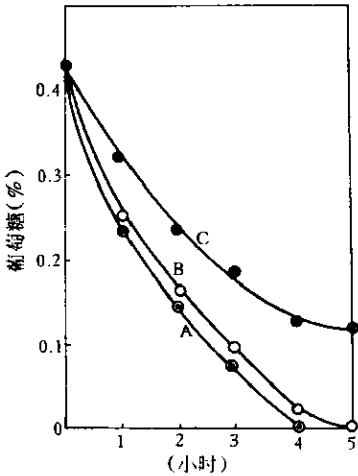


图 4 酶用量和脱糖的关系

pH 7.2, 30℃, 0.3% 双氧水,酶的用量:
A. 281 单位/升; B. 234 单位/升; C. 94 单位/升。

引起制成品干蛋白片储存期“褐变”，影响产品质量。

如前所述，酶制剂除含有葡萄糖氧化酶外，尚含有足够数量的过氧化氢酶，实验证明，在双氧水的存在下，上述酶制剂在适当条件下可有效地将蛋清中的葡萄糖脱除到 0.01% 以下，从而防止干蛋白片储存期发生“褐变”反应。

1. 葡萄糖氧化酶的最适用量 实验分三组进行，首先将蛋清 pH 调至 7.2，每组分别加入不同量的酶液，置 30℃ 水浴中保温，分批加入 0.3% 的双氧水，每小时取样一次测定蛋清中葡萄糖含量，结果如图 4 所示，随酶用量之增加，脱糖速度递增，每升蛋清加入 94 单位酶液(C 组)，酶量不足，脱糖不净。每升蛋清加入 234 单位以上酶液(B 组 A 组)可在 5 小时以内将糖脱除到 0.01% 以下。

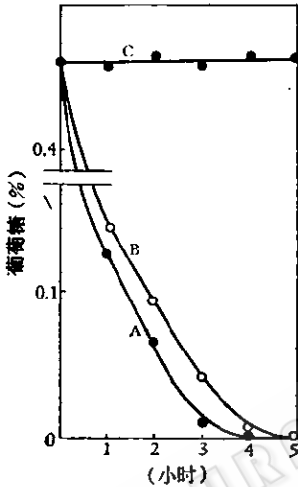


图 5 pH 对脱糖的影响
30℃, 281 单位/升酶液, 0.3% 双氧水,
A. pH 6.0; B. pH 7.0; C. pH 9.0。

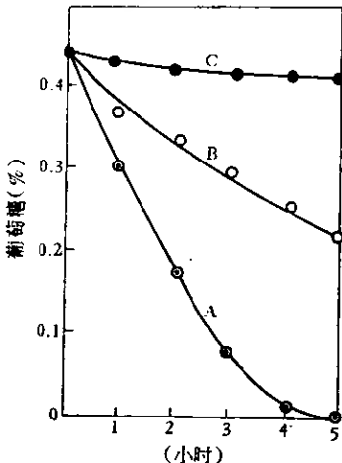


图 6 双氧水的用量对脱糖的影响
30℃ pH 7.0, 234 单位/升酶液, 双氧水用量:
A. 0.3%; B. 0.1%; C. 0%。

2. 脱糖反应的最适 pH 实验在三个不同 pH 下进行，结果如图 5 所示，随 pH 升高脱糖速度递减。pH 9.0(C 组)完全不能脱糖，pH 6.0(A 组)脱糖虽快但调 pH 时耗酸量很大，并且蛋清混浊，也不宜采用，以 pH 7.0 附近(B 组)效果最好。

3. 双氧水的最适用量 双氧水经过氧化氢酶催化分解所释放的氧为葡萄糖氧化酶所必需。双氧水的用量试验分三组进行，每组每批加入不同量的 30% 双氧水结果如图 6 所示，随双氧水用量加大，脱糖速度递增，以 A 组 0.3% 双氧水用量较为适宜。

讨 论

关于碳源、氮源对青霉菌及黑曲霉形成葡萄糖氧化酶的影响已有不少报道，Munk^[1]、Tholey^[12] 等发现铵态氮抑制酶的形成，Покровская^[13] 注意到在以麦芽汁为氮源的自然培养基上不产生葡萄糖氧化酶。我们试验的结果与上述报道是一致的，即铵态氮，有机氮不利于酶的形成。在碳源方面，一般都采用单糖或双糖，尚未见用多糖，点青霉 AS 3.3871 在淀粉培养基上基本上不形成葡萄糖氧化酶，但我们发现绳状青霉 AS 3.3872 在淀粉培养基上能产生大量的酶，说明菌种之间差异很大。

葡萄糖氧化酶对金属杂质比较敏感，用铁罐发酵，酶活极低，在铁制容器中贮存，酶活下降，培养基中含量较低的金属杂质也有影响，试验中发现，将黄青霉 AS3.536 培养在以食用葡萄糖为碳源的培养基上所测得的酶活仅为试剂葡萄糖培养基中的 10—20%，加入适量的螯合剂 EDTA 可以显著提高酶活，接近以试剂葡萄糖为碳源的水平。

后期静置可以提高发酵液中的酶活，可能有两种原因，一是防止酶的失活，一是促使菌丝自溶使内酶释放，Покровская^[13] 等提出，在深层通气培养过程中，为了防止酶的失活，前期通气，后期嫌气培养，这一点和我们在往复摇床上的结果比较一致，即长时间振荡培养酶活急剧下降，但是在发酵罐上并不如此，我们采用持续大通风量，并未发现酶活下降，而后期静置所以能提高发酵液酶活，很可能是由于内酶释放的缘故。显微镜下观察，静置后菌丝断裂破碎增多，发酵液粘度增加就是证明之一。

蛋清酶法脱糖较之长期沿用的自然发酵法有显著的优越性：工艺过程大为缩短，收率提高，产品色、味均有改进。如辅以胰酶处理，则可提高打擦度，获得全面合格的干蛋白片。

参 考 资 料

- [1] Müller, D.: *Chem. Ztg.*, 50:101, 1926.
- [2] Keilin, D. and Hertree, E. F.: *Nature*, 157:

- 801, 1946.
- [3] Keilin, D. and Hertree, E. F.: *Biochem. J.*, **42**:221—229, 1948.
- [4] Baldwin, R. R. et al: *Food Technol.*, **7**(7): 275—282, 1953.
- [5] Barton, R. R. et al: *Food Eng.*, **27**(12):79, 1955.
- [6] Garland, W. F.: A. D.: 268168, 1961.
- [7] Keilin, D. and Hartree, E. F.: *Biochem. J.*, **42**:230—238, 1948.
- [8] Adams, E. C., Jr, et al: *Science*, **125**:1082—1083, 1957.
- [9] Baton, R. R.: *Anal. Biochem.*, **14**(2):258—260, 1966.
- [10] Покровская, Н. В.: Белки в медицине и народном хозяйстве, 183—184, 1965.
- [11] Paskova, J. and Munk, V.: *Chromatog.*, **4**: 241—243, 1960.
- [12] Buch, M. L.: *Anal. Chem.*, **24**:489—491, 1952.
- [13] Покровская, Н. В. и др.: Ферментная и спиртовая промышленность, **5**:21—24, 1966.
- [14] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **160**:61—68, 1945.
- [15] Raper, K. B., et al: A Manual of the Penicillina, 367, The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1949.
- [16] Munk, V., et al: *Folia Microbiologica*, **8**(4): 203, 1963.
- [17] Tholey, G. et al: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **159**(12):2512—2517, 1965.
- [18] Покровская, Н. В. и др.: *Микробиология*, **31**(5):788—794, 1962.
- [19] Витковская, В. А. и др.: Изобретение, Промышленные Образцы, Товарные Знаки, **181**: 951, 1964.