

研究报告

一株产葡萄糖氧化酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质表征

张庆芳^{1,2}, 刘春莹^{1,2}, 王倩倩^{1,2}, 迟雪梅^{1,2}, 于爽^{1,2}, 陈立功^{1,2}, 迟乃玉^{*1,2}

1 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622

2 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622

张庆芳, 刘春莹, 王倩倩, 迟雪梅, 于爽, 陈立功, 迟乃玉. 一株产葡萄糖氧化酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质表征[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 888-898

Zhang Qingfang, Liu Chunying, Wang Qianqian, Chi Xuemei, Yu Shuang, Chen Ligong, Chi Naiyu. Screening, identification and enzymatic characterization of a marine glucose oxidase strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 888-898

摘 要:【背景】海洋中蕴藏着大量未被开发利用的微生物种质资源, 而且海洋微生物产的酶类因其具有耐低温、耐高压和耐高盐等明显区别于陆地微生物所产酶类的特点而备受关注。【目的】从渤海海域海泥样品中分离筛选产葡萄糖氧化酶的菌株, 并研究其酶学性质。【方法】通过平板初筛和酶活复筛, 确定产葡萄糖氧化酶的菌株; 通过形态学鉴定和构建系统发育树分析, 对产葡萄糖氧化酶的菌株进行酶学性质研究。【结果】筛选到一株产葡萄糖氧化酶的菌株(31号), 经生理生化特征和多序列分析确定为担子菌属(*Basidiomycete*); 31号菌株所产葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)在 25–35 °C 内有较高酶活, 达 20 U/mL; 最适反应温度为 30 °C, 而且在 0 °C 时仍有酶活; 在 pH 7.0 环境下酶活性最高, 在 pH 5.0–7.0 之间活性较为稳定, 酶活残余率较高; 5 mmol/L 的 Ni^{2+} 、 Na^{+} 和 Zn^{2+} 对酶活的促进作用尤其显著, 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对 GOD 酶活性有显著抑制作用; Cu^{2+} 、 K^{+} 和 Ca^{2+} 对酶活性有抑制作用, 而且浓度越高抑制作用越显著, 不同浓度的 β -巯基乙醇、乙二胺四乙酸、曲拉通-100、次硫酸钠和二硫苏糖醇对 GOD 酶活性均有显著抑制作用。【结论】31号菌株是一株极具研究价值的产低温葡萄糖氧化酶的菌株, 为葡萄糖氧化酶的生产提供了良好的种质资源, 为后续研究积累了相关数据, 同时也填补了利用该菌生产葡萄糖氧化酶的空白。

关键词: 海洋微生物; 葡萄糖氧化酶; 筛选

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0311100); 大连市科技创新基金(2018RQ13)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311100); Dalian Science and Technology Innovation Fund (2018RQ13)

*Corresponding author: E-mail: cny7566@126.com

Received: 2021-06-18; Accepted: 2021-09-30; Published online: 2021-12-31

Screening, identification and enzymatic characterization of a marine glucose oxidase strain

ZHANG Qingfang^{1,2}, LIU Chunying^{1,2}, WANG Qianqian^{1,2}, CHI Xuemei^{1,2}, YU Shuang^{1,2}, CHEN Ligong^{1,2}, CHI Naiyu^{*1,2}

1 School of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

2 Liaoning Province Marine Microbial Engineering Technology Research Center, Dalian 116622, Liaoning, China

Abstract: [Background] There are abundant undeveloped microbial germplasm resources in the ocean, and the enzymes produced by marine microorganisms have attracted attention because of their tolerance to low temperature, high pressure, and high salt, which are different from those produced by terrestrial microorganisms. [Objective] To isolate and screen out the strains producing glucose oxidase (GOD) from the mud samples of the Bohai Sea, and to study its enzymatic properties. [Methods] The GOD-producing strain was preliminarily screened with plate culture method and re-screened based on enzyme activity. The candidate was identified based on morphological, physiological, and phylogenetic characteristics. The enzymatic properties of the GOD produced by the strain screened out were further characterized in detail. [Results] Strain No. 31 that produced GOD was screened out and initially identified as *Basidiomycete* sp. based on morphological and phylogenetic characteristics. The GOD produced by strain No. 31 had high activity reaching 20 U/mL at 25–35 °C. This enzyme had the optimum reaction temperature at 30 °C and still had activity at 0 °C. Its activity was stable between pH 5.0 and 7.0 and peaked at pH 7.0. Ni^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} can improve GOD activity, and high concentrations of Ni^{2+} , Na^+ , and Zn^{2+} had significant effect. Different concentrations of β -mercaptoethanol, urea, EDTA, Triton-100, sodium hyposulfite, and DTT had significant inhibitory effect on GOD activity. [Conclusion] The experimental results prove that strain No. 31 is a valuable strain producing GOD tolerant to low temperature, which provide a good strain resource for the production of GOD, accumulate relevant data for follow-up research, and fill the blank of using this fungus to produce GOD.

Keywords: marine microorganisms; glucose oxidase; screening

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)的欧盟系统编号为 EC 1.1.3.4^[1-3], 通常呈黄色, 粉末状, 易溶于水, 但完全不溶于酒精、甘油、乙二醇和乙醚等有机溶剂^[4-7], 是一种高特异性的氧化还原酶^[8-10], GOD 也是一种重要的工业用酶^[8-9,11-12]。在有氧的环境下, GOD 可以催化 β -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢, 反应过程分为 2 个半反应且具有专一性^[13-15]。GOD 具有脱氧杀菌且无副作用的特点^[1,16-17], 如其可以

改变肠道病菌的生存环境、改善肠道酸性的消化环境、保护肠道上皮细胞的完整及解除霉菌中毒和药物中毒的毒性等。GOD 应用非常广泛, 在医药行业方面, GOD 传感器现已成为检测葡萄糖的主要工具^[18-21]; 在食品方面, GOD 可代替传统食品添加剂, 在使面团松软、避免食物褐化、抑制红酒腐败和保持食品风味等方面均具有应用; GOD 在生物燃料生产方面也已取得卓越成果, 为能源危机和环境污染问题减

轻了压力；作为饲料添加剂，GOD 具有维持肠道微生态平衡的优势。GOD 可以从动植物体内分离，也可由微生物发酵产生，目前可产 GOD 的菌株往往来源于陆地，其中霉菌占多数^[22-24]。

由于我国对 GOD 的研究相对于其他国家起步较晚，目前我国 GOD 产业存在以下问题：

(1) 生产成本较高、产品纯度较低和产品稳定性较差^[25-27]；(2) 研究对象来源多为陆地环境，例如霉菌和昆虫等，所产 GOD 属于中高温酶，而对低温 GOD 的研究较少^[28]。微生物具有来源广泛、生产成本低和生长周期短等优点^[16,28-29]，对微生物来源 GOD 的研究对象主要集中于霉菌和细菌，其中以曲霉研究得最多，而对酵母菌来源的 GOD 研究得较少^[30]，尤其是海洋担子菌属来源的 GOD，目前已报道的只有刘春莹等^[31]从海洋中筛选到一株海洋担子菌。海洋约占全球总表面积的 71%，海洋中蕴藏着丰富的微生物资源，由于海洋区别于陆地的低温、高压、高盐等特点，海洋微生物所产的酶类往往具有耐低温等不同于陆地微生物所产酶的明显特点^[30-33]。低温酶也被称作适冷酶、冷活性酶或嗜冷酶，是一类能在低温条件下催化生化反应的酶^[34-35]。低温酶的最大特点是在 0 °C 条件下依然具备酶活性，最佳反应温度通常低于 40 °C^[36-37]。在低温条件下低温酶催化活性很高，在实际生活或生产中具有广阔的发展前景。在已报道的研究中，GOD 的最适温度范围一般为 28–40 °C，属中高温酶类^[38-39]，而从海洋中分离的高产低温 GOD 的菌株很少，只有刘春莹等筛选到的一株担子菌^[31]、一株柠檬酸杆菌^[40]、石淑钰等^[41]筛选到的一株假单胞杆菌和叶日英等^[42]筛选到的一株蜡状芽孢杆菌，而且 GOD 酶活较低，均需提高。

本研究利用海洋微生物进行工业化大规模生产 GOD 具有极大的优势和潜力。本研究通过

平板初筛及酶活复筛，从大连地区渤海海域海泥样品中分离得到一株产低温 GOD 的菌株；通过形态学鉴定和分子生物学分析确定其种属；通过测定生长曲线及酶活曲线，对菌株的酶学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

中国辽宁大连渤海海域(123°371'E, 39°697'N)海泥，取样深度 25–30 m。

1.1.2 培养基

富集培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母膏 5.0，NaCl 1.0，葡萄糖 2.0，pH 7.2。

筛选培养基(g/L)：葡萄糖 80.0，蛋白胨 3.0，KH₂PO₄ 2.0，MgSO₄·7H₂O 0.7，KCl 0.5，NaNO₃ 4.0，CaCO₃ 3.5，可溶性淀粉 10.0，脱氧胆酸钠 0.3，KI 1.7，琼脂 20.0。

发酵培养基/种子培养基：葡萄糖 60.0，蛋白胨 3.0，KH₂PO₄ 0.2，MgSO₄·7H₂O 0.7，KCl 0.5，NaNO₃ 4.0，pH 7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

胰蛋白胨、琼脂粉，北京阳光生物科技有限公司；酵母膏、蛋白胨、酵母浸粉、革兰氏染色液，北京奥博星生物科技有限公司；NaCl，天津市大茂化学试剂厂；葡萄糖，天津市科米欧化学试剂有限公司。低温恒温培养箱，上海艾朗实验设备有限公司；恒温摇床，上海同安医疗用品制造有限公司；电热恒温，上海精宏实验设备有限公司；酶标仪，赛默飞世尔科技公司；显微镜，Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株初筛

250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 蒸馏水及玻璃珠，在 103.4 kPa 条件下灭菌 20 min 后加入 10 g 海泥样品，于 25 °C、160 r/min 摇床中振荡

15 min, 取出后静置 5 min, 取 1 mL 上层液体加入富集培养基中, 于 25 °C、200 r/min 培养 24 h。将富集后的菌液梯度稀释, 取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度的稀释液各 80 μ L 分别涂布在筛选培养基上, 25 °C 倒置培养 4 d, 挑取使培养基产生透明圈并变成蓝紫色或紫黑色的菌株划线纯化。

1.2.2 菌株复筛

挑取纯化后的单菌落接种于 5 mL 发酵培养基中, 25 °C、200 r/min 培养 48 h。种子液以 1% 的接种量转接于 100 mL 发酵培养基中, 25 °C、200 r/min 培养 24 h, 将发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测酶活。

1.2.3 菌种鉴定

(1) 形态学鉴定

将酶活较高的菌株划线在固体发酵培养基上, 25 °C 恒温倒置培养 2 d, 观察菌落形态。挑取单菌落用简单染色法进行染色, 利用显微镜观察菌体形态。

(2) 分子生物学鉴定

将纯化的菌株送至 TaKaRa (上海) 公司进行 rDNA ITS 鉴定。

1.2.4 酶活测定

采用邻联茴香胺-辣根过氧化物酶法检测酶活, 将酶活检测方法改进如下:

对照组: 将邻联茴香胺溶液 150 μ L 和辣根过氧化物酶溶液 10 μ L 混合溶液加入 96 孔板中, 并于 25 °C 保温 10 min, 然后分别加入 150 μ L 5% 葡萄糖溶液和 30 μ L 粗酶液, 立刻测 OD_{460} 值。设置 3 组平行实验。

实验组: 将邻联茴香胺溶液 150 μ L 和辣根过氧化物酶溶液 10 μ L 混合溶液加入 96 孔板中, 并于 25 °C 保温 10 min; 将 150 μ L 粗酶液和 750 μ L 5% 葡萄糖溶液混合均匀后于 30 °C 保温 5 min, 然后取 180 μ L 加入到邻联茴香胺-辣根过氧化物酶混合溶液中, 振荡 10 s, 测 OD_{460}

值。设置 3 组平行实验。

酶活力单位定义: 在上述实验条件下, 每分钟催化反应产生 1 ng 过氧化氢所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U/mL)。

酶活计算公式:

$$Y = [(A - A_0) + C] / K \times N / T / M$$

式中: Y: 葡萄糖氧化酶活力, U/mL; A: 实验组的吸光度; A_0 : 对照组的吸光度; K: 标准曲线的斜率; C: 标准曲线的截距; N: 酶液的总稀释倍数; T: 反应时间, min; M: 酶液体积, mL。

邻联茴香胺溶液: 取 7 mg 邻联茴香胺用 95% 的乙醇溶解, 转移至容量瓶中用 95% 乙醇定容至 100 mL, 保存于 4 °C。

辣根过氧化物酶溶液: 取辣根过氧化物酶 5 mg 用 20 mL 无菌水溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中定容(使用期限 2-3 d)。

5% 的葡萄糖溶液: 取 5 g 葡萄糖用无菌水溶解并定容至 100 mL。

1.2.5 酶学性质研究

接种 31 号菌株于 5 mL 种子培养基中, 25 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.55-0.60, 然后以 1% 的接种量转接于 100 mL 发酵培养基中, 25 °C、200 r/min 培养 28 h, 将发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行酶学性质研究。本研究对酶的最适反应温度及温度稳定性、最适反应 pH 及 pH 稳定性、不同浓度金属离子和不同浓度化学试剂对酶活的影响进行了研究。

(1) 最适反应温度及温度稳定性测定

取 150 μ L 粗酶液和 750 μ L 5% 的葡萄糖溶液混合均匀, 分别于 0、5、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 °C 水浴 5 min; 取 150 μ L 邻联茴香胺溶液和 10 μ L 辣根过氧化物酶溶液混合溶液加入 96 孔板中, 并于 25 °C

保温 10 min, 然后取 180 μL 酶反应液加入到邻联茴香胺-辣根过氧化物酶混合溶液中, 振荡 10 s, 测 OD_{460} ; 对照组直接加入 150 μL 5% 葡萄糖溶液和 30 μL 粗酶液。根据酶在不同温度下的活性绘制曲线, 确定酶的最适反应温度。同时将酶液分别置于不同温度(0–65 $^{\circ}\text{C}$)保温 1 h, 然后在最适反应 pH 和最适反应温度下检测残余酶活, 与未经过处理的酶液进行比较, 计算相对活性。设置 3 组平行实验。

(2) 最适反应 pH 及 pH 稳定性测定

在最适温度下, pH 值为 3.0–14.0 的 50 mmol/L 缓冲液(pH 3.0–5.0 磷酸盐-柠檬酸盐, pH 6.0–10.0 Tris-HCl, pH 11.0–14.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$)中测定 GOD 酶活, 根据酶在不同 pH 条件下的活性绘制曲线, 确定酶的最适反应 pH 值。同时, 将酶液分别置于 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲液(pH 3.0–5.0 磷酸盐-柠檬酸盐, pH 6.0–10.0 Tris-HCl, pH 11.0–14.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$)中孵育 1 h, 然后在最适反应 pH 和最适反应温度下检测残余酶活, 与未经过处理的酶液进行比较, 计算相对活性。设置 3 组平行实验。

(3) 不同浓度金属离子对 GOD 酶活的影响

取 750 μL 5% 的葡萄糖溶液于 2 mL 离心管中, 加入终浓度为 1 mmol/L 或 5 mmol/L 含有金属离子(Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^{+} 和 Zn^{2+})的试剂, 再加入 150 μL 酶液混合均匀, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min; 取 150 μL 邻联茴香胺溶液和 10 μL 辣根过氧化物酶混合溶液加入 96 孔板中, 并于 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。然后取 180 μL 酶反应混合液加入到邻联茴香胺-辣根过氧化物酶混合溶液中, 振荡 10 s, 测 OD_{460} 值。对照组直接加入相应体积的 PBS (pH 7.4)。设置 3 组平行实验。

(4) 不同浓度化学试剂对 GOD 酶活的影响

取 750 μL 5% 的葡萄糖溶液于 2 mL 离心管

中, 加入终浓度为 1 mmol/L 或 5 mmol/L 的 β -巯基乙醇、尿素、乙二胺四乙酸、曲拉通-100、吐温-80、2,3-丁二酮、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、十二烷基硫酸钠和二硫苏糖醇等化学试剂, 再加入 150 μL 酶液混合均匀, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min; 取 150 μL 邻联茴香胺溶液和 10 μL 辣根过氧化物酶混合溶液加入 96 孔板中, 并于 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 然后取 180 μL 酶液混合液加入到邻联茴香胺-辣根过氧化物酶混合溶液中, 振荡 10 s, 测 OD_{460} 值。对照组直接加入相应体积的 PBS (pH 7.4)。设置 3 组平行实验。

1.3 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 23 软件处理浓度金属离子和化学试剂对 GOD 酶活影响的相关数据。

2 结果与分析

2.1 产低温 GOD 菌株的筛选

在筛选培养基上培养 48 h 后, 得到一株产生透明圈并变成紫黑色的菌株, 对该菌株进行三区划线纯化。将纯化后得到的单菌落接种于发酵培养基上, 发酵后进行酶活检测复筛, 确定该菌株为产葡萄糖氧化酶菌株, 编号为 31 号。

2.2 形态学鉴定

将 31 号菌株划线于固体发酵培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后观察菌落形态(图 1), 单个菌落呈白色, 不透明, 表面光滑且边缘整齐, 中

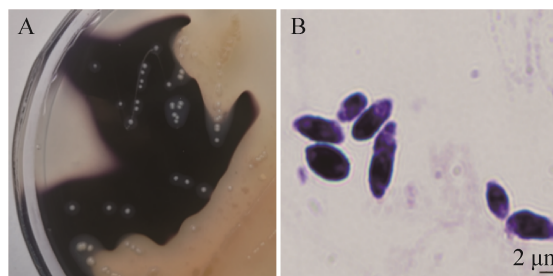


图 1 31 号菌株的菌落形态(A)和显微形态(B)

Figure 1 The colonial morphology (A) and micrograph (B) of bacterial strain No. 31.

间凸起,易挑取;挑取单菌落染色后进行显微形态观察,该菌株为椭圆形。

2.3 分子生物学鉴定

将 31 号菌株的序列提交至 GenBank 并上传该序列(GenBank 登录号: MZ522112),在数据库中进行 BLAST 比对,分析表明该菌株与担子菌属(*Basidiomycete*)菌株相似性高达 99%,结合形态学鉴定确定 31 号菌株为担子菌(图 2)。

2.4 最适反应温度及温度稳定性测定

由图 3 最适温度曲线可知,该酶的最适反应温度为 30 °C,酶活力单位达 20 U/mL;温度低于或高于 30 °C 时酶活降低;在 25–35 °C 内有较高酶活,达到最适温度酶活的 80%以上;50 °C 时的酶活不足最适温度酶活的 40%;

10 °C 时的酶活高于最适温度酶活的 25%;在 35–65 °C 内,随着温度的升高酶活快速降低;在 0 °C 时仍有酶活。

由图 4 可知,该酶在低于 35 °C 的环境下具有较好的热稳定性,保温 1 h 处理后酶活仍保留 70%以上;当温度高于 35 °C 时,酶的热稳定性急剧下降,45 °C 温育 1 h 后酶活仅剩余 10%左右。

2.5 最适反应 pH 及 pH 稳定性测定

由图 5 最适反应 pH 曲线可知,该葡萄糖氧化酶在 pH 7.0 的环境下酶活性最高,当 pH 值增大或减小时,酶活下降,但相对于增大 pH 值来说,降低 pH 值时,酶活降低的速度更慢,表明该酶更适合在酸性或偏弱碱性条件下发挥作用。

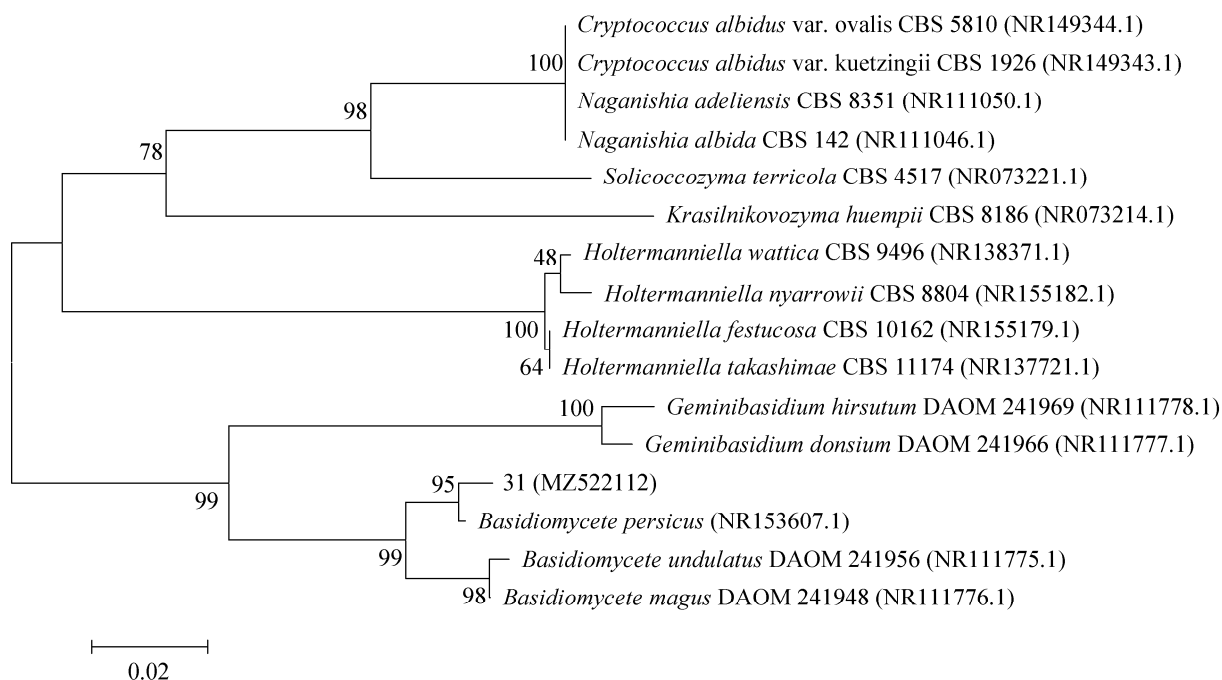


图 2 31 号菌株及相关菌株基于 rDNA ITS 序列采用邻接法构建的系统发育树 Bootstrap 次数设置为 1 000; 分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率; 括号内表示 GenBank 登录号; 左下角标尺表示 2% 的序列进化差异

Figure 2 The phylogenetic tree based on rDNA ITS sequence of strain No. 31 and other related strains, constructed by neighbor-joining method. Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; The parentheses represent the GenBank login number; Ruler represents 2% of sequence evolutionary differences.

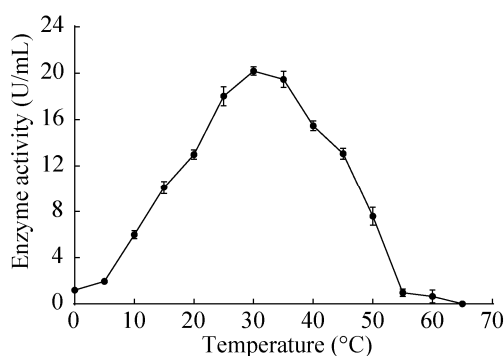


图3 葡萄糖氧化酶的最适反应温度

Figure 3 The optimum temperature of GOD.

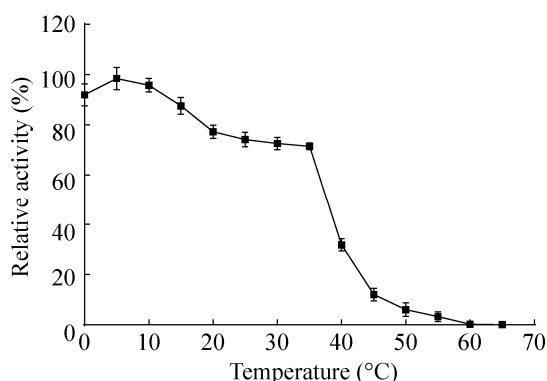


图4 葡萄糖氧化酶的温度稳定性 相对酶活为100%时的绝对酶活为20 U/mL

Figure 4 The thermal stability of GOD. The absolute enzyme activity when the relative enzyme activity is 100% is 20 U/mL.

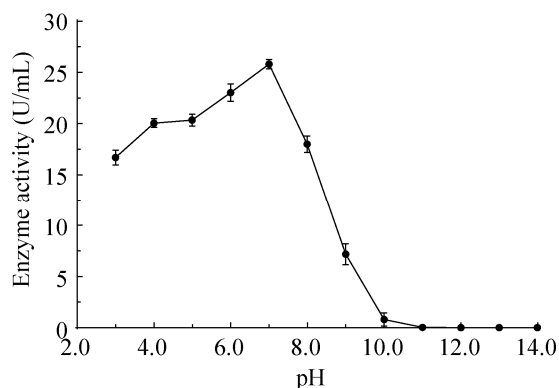


图5 葡萄糖氧化酶的最适反应 pH

Figure 5 The optimum pH of GOD.

由图6可知,该葡萄糖氧化酶在pH 5.0–7.0范围内较为稳定,剩余酶活力在70%以上;当pH为9.0时,相对酶活力剩余仅为20%左右;当pH大于10.0时,酶液几乎失活,所以该酶适合保存在偏弱酸性的环境中。

2.6 不同浓度金属离子对 GOD 酶活的影响

如表1所示,5 mmol/L 的 Ni^{2+} 、 Na^+ 和 Zn^{2+}

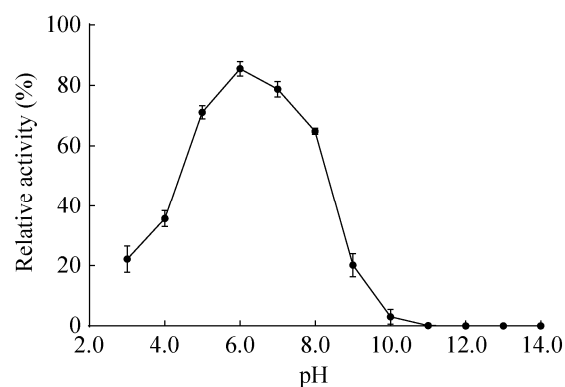


图6 葡萄糖氧化酶的 pH 稳定性 相对酶活为100%时的绝对酶活为19.8 U/mL

Figure 6 The pH stability of GOD. The absolute enzyme activity when the relative enzyme activity is 100% is 19.8 U/mL.

表1 不同浓度金属离子对酶活的影响(相对活性,%)

Table 1 Effects of different concentrations of metal ions on enzyme activity (relative activity (%))

金属离子 Metal ions	1 mmol/L	5 mmol/L
Control	100.0±0.3a	100.0±4.5c
Ni^{2+}	107.5±0.7a	126.0±5.6b
Na^+	101.4±5.5a	149.7±4.5a
Mn^{2+}	106.8±5.5a	79.7±6.8d
Zn^{2+}	103.4±4.8a	131.6±2.3ab
Ag^+	0±0c	0±0e
Cu^{2+}	45.9±6.3b	4.1±3.4e
K^+	93.2±6.8a	70.7±9.0d
Ca^{2+}	98.6±4.1a	66.1±2.3d
Mg^{2+}	108.2±2.7a	105.6±7.9c

注: 相对酶活为100%时的绝对酶活为16.2 U/mL。不同小写字母表示差异显著

Note: The absolute enzyme activity when the relative enzyme activity is 100% is 16.2 U/mL. Different lowercase letters indicate significant differences.

对酶活的促进作用尤其显著, 浓度为 5 mmol/L 的 Na^+ 和 Zn^{2+} 分别提高了约 50% 和 30% 的酶活性; 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对 GOD 酶活性有显著抑制作用; Cu^{2+} 、 K^+ 和 Ca^{2+} 对酶活性有抑制作用, 而且浓度越高抑制作用越显著, 浓度为 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 几乎使酶活性被完全抑制; 当向反应体系中加入 Ag^+ 时, 反应体系内产生白色沉淀, 无法检测出酶活, 可能是 Ag^+ 使酶失活。

2.7 不同浓度化学试剂对 GOD 酶活的影响

由表 2 结果可知, 不同浓度的 β -巯基乙醇、乙二胺四乙酸、曲拉通-100、次硫酸钠和二硫苏糖醇对 GOD 酶活性均有显著抑制作用; 浓度为 5 mmol/L 的乙二胺四乙酸和二硫苏糖醇对酶活性抑制率分别达到 78.6% 和 86.3%; 浓度为 1 mmol/L 的次硫酸钠对酶活性的抑制率达到

表 2 不同浓度化学试剂对酶活的影响(相对活性, %)
Table 2 Effects of different concentrations of chemical reagents on enzyme activity (relative activity (%))

试剂 Reagents	1 mmol/L	5 mmol/L
Control	100.0±1.7b	100.0±3.9b
β -巯基乙醇 β -mercaptoethanol	48.2±6.8c	34.3±5.2e
尿素 Urea	97.1±6.7b	82.9±1.3c
乙二胺四乙酸 EDTA	29.6±2.8de	21.4±2.6ef
曲拉通-100 Triton-100	33.7±4.6cd	60.4±3.0d
吐温-80 Tween-80	110.3±2.8ab	92.6±4.3bc
2,3-丁二酮 2,3-butanedione	117.9±6.5a	125.8±6.4a
次硫酸钠 Sodium hyposulfite	14.6±0.9e	25.9±5.8ef
十二烷基硫酸钠 SDS	126.0±8.4a	30.8±0.9e
二硫苏糖醇 DTT	33.5±2.7cd	13.7±7.7f

注: 相对酶活为 100% 时的绝对酶活为 14.9 U/mL。不同小写字母表示差异显著

Note: The absolute enzyme activity when the relative enzyme activity is 100% is 14.9 U/mL. Different lowercase letters indicate significant differences.

85% 以上, 而高浓度的次硫酸钠对酶活性的抑制率不足 75%。不同浓度的 2,3-丁二酮对酶活性有不同程度的促进作用, 高浓度的 2,3-丁二酮对酶活性的促进作用大于低浓度。

3 讨论与结论

在已发表的研究中, 石淑钰等^[41]从黄海海水中筛选出一株假单胞菌(*Pseudomonas migulae*) GOD2 菌株, 研究确定其产葡萄糖氧化酶最适温度为 20 °C; 刘春莹等^[31]从大连黄海海域海泥中筛选得到一株酵母菌(WYQ 23), 经过形态学及分子生物学鉴定, 确定该菌株为担子菌(*Basidiomycete* sp.), 通过发酵条件优化确定最适温度为 25 °C, 经优化菌株产低温 GOD 酶活力为 1.67 U/mL; 刘春莹等^[40]从大连黄海海域海泥中分离出一株高产 GOD 的细菌, 鉴定为柠檬酸杆菌属(*Citrobacters*), 其最适温度为 15 °C, 经诱变产 GOD 酶活力为 1.77 U/mL; 叶日英等^[42]从海泥样品中筛选得到一株产葡萄糖氧化酶的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 该菌在常规 LB 液体培养条件下葡萄糖氧化酶活力最高为 8.8 U/mL, 所产酶最适作用温度为 14 °C, 最适 pH 为 7.0; 辛国芹等^[43]从临沂果园土样中得到一株产葡萄糖氧化酶(GOD)活性较好的菌株, 命名为 Bla-6, 其产 GOD 酶活为(10.50±0.25) U/mL。本研究以大连渤海海域海泥为样品, 通过平板显色法初筛和酶活复筛, 获得一株葡萄糖氧化酶活力达 20 U/mL 的高产低温 31 号菌株。与前人^[9,31,40-42]筛选的菌株相比, 该菌株在酶活方面具有显著优势, 而且该菌株为低温菌株, 在工业生产方面有较好的应用前景。

本研究通过平板培养和简单染色, 对 31 号菌株的菌落形态和显微形态进行了观察, 发现其菌落为白色、不透明、表面光滑且边缘整齐、中间凸起、易挑取、显微状态下呈较大的

椭圆状。通过分子生物学鉴定确定该菌株为担子菌(*Basidiomycete* sp.), 为研究海洋产低温 GOD 菌株增加了选择, 对 GOD 资源库的扩充具有重要意义。最适反应温度及温度稳定性结果表明, 31 号菌株所产 GOD 酶在 25–35 °C 内有较高酶活, 最适反应温度为 30 °C, 而且在 0 °C 时仍有酶活, 印证了该酶为低温酶。最适反应 pH 及 pH 稳定性结果表明, 在 pH 7.0 环境下酶活性最高, 在 pH 5.0–7.0 间活性较为稳定, 酶活残余率较高, 表明该酶适合保存在偏弱酸性的环境中。不同浓度金属离子及化学试剂对酶活性影响结果显示, 5 mmol/L 的 Ni^{2+} 、 Na^{+} 和 Zn^{2+} 对酶活的促进作用尤其显著, 浓度为 5 mmol/L 的 Na^{+} 和 Zn^{2+} 分别提高了约 50% 和 30% 的酶活性; 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 对 GOD 酶活性有显著抑制作用; Cu^{2+} 、 K^{+} 和 Ca^{2+} 对酶活性有抑制作用, 而且浓度越高抑制作用越显著, 浓度为 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 几乎使酶活性被完全抑制; 不同浓度的 β -巯基乙醇、乙二胺四乙酸、曲拉通-100、次硫酸钠和二硫苏糖醇对 GOD 酶活性均有显著抑制作用; 浓度为 5 mmol/L 的乙二胺四乙酸和二硫苏糖醇对酶活性抑制率分别达到 78.6% 和 86.3%; 浓度为 1 mmol/L 的次硫酸钠对酶活性的抑制率达到 85% 以上, 而高浓度的次硫酸钠对酶活性的抑制率不足 75%。不同浓度的 2,3-丁二酮对酶活性有不同程度的促进作用, 高浓度的 2,3-丁二酮对酶活性的促进作用大于低浓度。

本研究为后期对 31 号菌株发酵、产酶条件优化及酶学性质研究积累了相关数据, 研究表明 31 号菌株具有高产 GOD 特性, 且所产 GOD 具有低温酶特性, 开发潜力巨大, 为我国 GOD 的工业化提供宝贵资源以及一定的参考和理论依据。

REFERENCES

- [1] 李蓉, 张庆芳, 迟乃玉. 微生物葡萄糖氧化酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 1-5
Li R, Zhang QF, Chi NY. Research advance of glucose oxidase from microorganisms[J]. China Brewing, 2018, 37(3): 1-5 (in Chinese)
- [2] 高立云. 一种快速葡萄糖氧化酶活性测定方法与应用效果研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2017
Gao LY. Study of rapid activity analytic assay and application performance evaluation of glucose oxidase[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2017 (in Chinese)
- [3] Matos ALS, Moreira JPDL, Luiz RR, Silva EPD, Rodacki M, Gómez JFB, Zajdenverg L. Comparison of glucose measurement on dried blood spots versus plasma samples in pregnant women with and without anemia[J]. Archives of Endocrinology and Metabolism, 2020, 64(4): 454-461
- [4] 高齐霖, 肖安超, 王海伦, 张庆芳, 胡善松, 迟乃玉, 刘春莹. 渤海海域低温 GOD 菌株筛选及鉴定[J]. 科技创新与生产力, 2019(3): 19-22
Gao QL, Xiao AC, Wang HL, Zhang QF, Hu SS, Chi NY, Liu CY. Screening and identification of cryogenic GOD strain in Bohai sea[J]. Sci-Tech Innovation and Productivity, 2019(3): 19-22 (in Chinese)
- [5] 葛建忠. 新型葡萄糖氧化酶的基因克隆、表达和性质改良[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019
Ge JZ. Gene cloning, expression and molecular improvement of novel glucose oxidase[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [6] Ruales-Salcedo AV, Higuera JC, Fontalvo J, Woodley JM. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2019, 74(3/4): 77-84
- [7] Smith SB, Sweatt CR, Carstens GE. Supplementary prenatal copper increases plasma triiodothyronine and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression but depresses thermogenesis in newborn lambs[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2020, 33(3): 506-514
- [8] 付长涛. 发酵法生产葡萄糖氧化酶[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2017
Fu CT. Production of glucose oxidase by fermentation[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2017 (in Chinese)
- [9] 辛国芹, 董佩佩, 汪祥燕, 赵影, 刘秀侠, 徐海燕, 谷巍. 产葡萄糖氧化酶菌株的诱变筛选及遗传稳定性研

- 究[J]. 中国酿造, 2016, 35(11): 69-72
- Xin GQ, Dong PP, Wang XY, Zhao Y, Liu XX, Xu HY, Gu W. Mutation screening and genetic stability of glucose oxidase-producing strain[J]. China Brewing, 2016, 35(11): 69-72 (in Chinese)
- [10] Liu J, Liu GH, Chen ZM, Zheng AJ, Cai HY, Chang WH, Li C, Chen J, Wu ZK. Effects of glucose oxidase on growth performance, immune function, and intestinal barrier of ducks infected with *Escherichia coli* O88[J]. Poultry Science, 2020, 99(12): 6549-6558
- [11] 王佰涛, 杨文玲, 杨婧芳, 刘德海, 陈国参, 权淑静. 葡萄糖氧化酶的微生物发酵生产工艺研究[J]. 中国饲料, 2021(5): 91-95
- Wang BT, Yang WL, Yang JF, Liu DH, Chen GC, Quan SJ. Study on microbial fermentation technology of glucose oxidase[J]. China Feed, 2021(5): 91-95 (in Chinese)
- [12] Eskandarifar A, Rasouli MA, Mansouri M, Moosavi S, Fotoohi A. Validity of glucose measurements in the blood by a glucometer reagent strip in critically ill infants[J]. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2019, 13(1): 464-466
- [13] 权淑静, 胡虹, 解复红, 刁文涛, 张秀江, 杜志敏, 陈国参. 产胞外葡萄糖氧化酶菌株的筛选、鉴定及酶学性质初步研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(11): 58-61
- Quan SJ, Hu H, Xie FH, Diao WT, Zhang XJ, Du ZM, Chen GC. Screening, identification and enzymatic characterizations of extracellular glucose oxidase producing strain[J]. China Brewing, 2020, 39(11): 58-61 (in Chinese)
- [14] 于秀华. 葡萄糖氧化酶、维生素 C 对面粉粉质特性影响的研究[J]. 粮食加工, 2017, 42(3): 18-19
- Yu XH. Study on the influence of glucose oxidase and vitamin C on flour properties[J]. Grain Processing, 2017, 42(3): 18-19 (in Chinese)
- [15] Chen L, Zhou YC, Tang XX, Yang CH, Tian YD, Xie R, Chen T, Yang JP, Jing MW, Chen FK, et al. EGFR mutation decreases FDG uptake in non-small cell lung cancer via the NOX4/ROS/GLUT1 axis[J]. International Journal of Oncology, 2019, 54(1): 370-380
- [16] Yoshida K, Awaji K, Shimizu S, Iwasaki M, Oide Y, Ito M, Dairaku T, Ono T, Kashiwagi Y, Sato K. Preparation of microparticles capable of glucose-induced insulin release under physiological conditions[J]. Polymers, 2018, 10(10): 1164
- [17] Gan L, Loke FWL, Cheong WC, Ng JSH, Tan NC, Zhu ZZ. Design and development of ferrocene-containing chitosan-cografted-branched polyethylenimine redox conjugates for monitoring free flap failure after reconstructive surgery[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 186: 113283
- [18] 郭贺楠, 杨勇智, 董冰, 蒋民, 王春林, 曹云鹤. 葡萄糖氧化酶研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(4): 10-14
- Guo HN, Yang YZ, Dong B, Jiang M, Wang CL, Cao YH. Research progress on glucose oxidase[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2018, 54(4): 10-14 (in Chinese)
- [19] 廖兆民, 蔡俊, 林建国. 微生物葡萄糖氧化酶的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(367): 308-315
- Liao ZM, Cai J, Lin JG. Research progress of microbial glucose oxidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(367): 308-315 (in Chinese)
- [20] 沈萍. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007
- Shen P. Microbiology Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007 (in Chinese)
- [21] 方军成, 宋聪, 尤瑞祺, 郭荣富. 葡萄糖氧化酶的生产及其在动物生产中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(10): 125-129
- Fang JC, Song C, You RQ, Guo RF. Production of glucose oxidase and its application in animal production[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 48(10): 125-129 (in Chinese)
- [22] Wan XY, Zhang HW, Pan W, Li N, Tang B. An enzyme nanopocket based on covalent organic frameworks for long-term starvation therapy and enhanced photodynamic therapy of cancer[J]. Chemical Communications: Cambridge, England, 2021, 57(44): 5402-5405
- [23] Dabhade A, Jayaraman S, Paramasivan B. Development of glucose oxidase-chitosan immobilized paper biosensor using screen-printed electrode for amperometric detection of Cr(VI) in water[J]. 3 Biotech, 2021, 11(4): 1-11
- [24] Koike K, Sasaki T, Hiraki K, Ike K, Hirofujii Y, Yano M. Characteristics of an extended gate field-effect transistor for glucose sensing using an enzyme-containing silk fibroin membrane as the bio-chemical component[J]. Biosensors, 2020, 10(6): 57
- [25] He Y, Yang X, Yuan R, Chai YQ. A novel ratiometric SERS biosensor with one Raman probe for ultrasensitive microRNA detection based on DNA hydrogel amplification[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(16): 2643-2647
- [26] Shao LH, Li YH, Huang FF, Wang X, Lu JQ, Jia F, Pan ZA, Cui XY, Ge GL, Deng XW, et al. Complementary autophagy inhibition and glucose metabolism with rattle-structured polydopamine@mesoporous silica nanoparticles for augmented low-temperature photothermal therapy and *in vivo* photoacoustic

- imaging[J]. *Theranostics*, 2020, 10(16): 7273-7286
- [27] Jabariyan S, Zanjanchi MA, Arvand M, Sohrabnezhad S. Colorimetric detection of glucose using lanthanum-incorporated MCM-41[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 203: 294-300
- [28] Nie Q, Wang L, Gong XD, Xiang JW, Xiao Y, Xie J, Yang L, Chen HM, Gan YW, Chen ZG, et al. Altered expression patterns of the sumoylation enzymes E1, E2 and E3 are associated with glucose oxidase- and UVA-induced cataractogenesis[J]. *Current Molecular Medicine*, 2018, 18(8): 542-549
- [29] Vidé J, Bonafos B, Fouret G, Benlebna M, Poupon J, Jover B, Casas F, Jouy N, Feillet-Coudray C, Gaillet S, et al. *Spirulina platensis* and silicon-enriched *Spirulina* equally improve glucose tolerance and decrease the enzymatic activity of hepatic NADPH oxidase in obesogenic diet-fed rats[J]. *Food & Function*, 2018, 9(12): 6165-6178
- [30] Han QZ, Wang HY, Wu D, Wei Q. Preparation of PbS NPs/RGO/NiO nanosheet arrays heterostructure: function-switchable self-powered photoelectrochemical biosensor for H_2O_2 and glucose monitoring[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 173: 112803
- [31] 刘春莹, 王一茜, 迟乃玉, 张庆芳. 海洋低温葡萄糖氧化酶生产菌种的选育及发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2019, 38(4): 110-115
- Liu CY, Wang YQ, Chi NY, Zhang QF. Screening and fermentation conditions optimization of low temperature glucose oxidase-producing strain from ocean[J]. *China Brewing*, 2019, 38(4): 110-115 (in Chinese)
- [32] Zou Q, Luo S, Wu HT, He DL, Li XH, Cheng GJ. A GMC oxidoreductase GmcA is required for symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 394
- [33] Nahalka J, Hrabarova E. Prebiotic peptides based on the glycocodon theory analyzed with FRET[J]. *Life*, 2021, 11(5): 380
- [34] 李唯一. 产低温脂肪酶菌株筛选、发酵条件优化及其酶学性质研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2021
- Li WY. Screening of low temperature lipase producing strain, optimization of fermentation conditions and study on enzymatic properties[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2021 (in Chinese)
- [35] Jiao WZ, Ji JF, Li FJ, Guo JL, Zheng YJ, Li SB, Xu WW. Activation of the Notch-Nox4-reactive oxygen species signaling pathway induces cell death in high glucose-treated human retinal endothelial cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(1): 667-677
- [36] Brownlee BJ, Bahari M, Harb JN, Claussen JC, Iverson BD. Electrochemical glucose sensors enhanced by methyl viologen and vertically aligned carbon nanotube channels[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(34): 28351-28360
- [37] Gras DE, Mansilla N, Rodríguez C, Welchen E, Gonzalez DH. *Arabidopsis thaliana* SURFEIT1-like genes link mitochondrial function to early plant development and hormonal growth responses[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(2): 690-704
- [38] Ridhuan NS, Abdul Razak K, Lockman Z. Fabrication and characterization of glucose biosensors by using hydrothermally grown ZnO nanorods[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13722
- [39] Serricchio M, Hierro-Yap C, Schädeli D, Ben Hamidane H, Hemphill A, Graumann J, Ziková A, Bütikofer P. Depletion of cardiolipin induces major changes in energy metabolism in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms[J]. *FASEB Journal*, 2021, 35(2): e21176
- [40] 刘春莹, 胡善松, 张庆芳, 李美玉, 于爽, 迟乃玉. 海洋低温葡萄糖氧化酶细菌选育及其酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 52-58
- Liu CY, Hu SS, Zhang QF, Li MY, Yu S, Chi NY. Breed marine bacteria producing cold-active glucose oxidase and enzyme properties analysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(13): 52-58 (in Chinese)
- [41] 石淑钰, 张庆芳, 迟乃玉, 王贵鹏, 窦少华. 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 SY, Zhang QF, Chi NY, Wang GP, Dou SH. 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 (in Chinese)
- [42] 叶日英, 徐德峰, 孙力军, 王雅玲, 王俊峰, 莫日坚, 王嘉伟, 包艳. 海洋源高产葡萄糖氧化酶细菌的筛选和主要酶学性质[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(4): 672-678
- Ye RY, Xu DF, Sun LJ, Wang YL, Wang JF, Mo RJ, Wang JW, Bao Y. Screening and main enzymatic property of high-producing glucose oxidase bacteria from marine environment[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(4): 672-678 (in Chinese)