

来源于异形曲霉的葡萄糖氧化酶催化活性和热稳定性改良

余尚霖^{1,2}, 周乔^{1,2}, 张宏海², 柏映国², 罗会颖², 杨小军^{1*}, 姚斌^{2*}

1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100

2 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

余尚霖, 周乔, 张宏海, 柏映国, 罗会颖, 杨小军, 姚斌. 来源于异形曲霉的葡萄糖氧化酶催化活性和热稳定性改良[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 296-307.

YU Shanglin, ZHOU Qiao, ZHANG Honghai, BAI Yingguo, LUO Huiying, YANG Xiaojun, YAO Bin. Improvement of catalytic activity and thermostability of glucose oxidase from *Aspergillus heteromorphus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 296-307.

摘要: 葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD, EC 1.1.3.4)是一种耗氧脱氢酶, 可催化葡萄糖产生葡萄糖酸和过氧化氢, 这种特殊的作用机制使其具有良好应用前景。但天然 GOD 催化活力低、热稳定性差成为制约其工业化生产应用的主要因素。本研究以目前报道的热稳定性好的葡萄糖氧化酶 *At*GOD 为源序列, 通过进化分析, 以期获得性能优良的 GOD。筛选并成功合成了 6 个基因进行功能验证, 其中异形曲霉(*Aspergillus heteromorphus*)的葡萄糖氧化酶 *Ah*GODB 在毕赤酵母中表达后表现出较好的热稳定性和催化活性。其最适温度为 40 °C, 比活力为 112.2 U/mg, 70 °C 处理 5 min 后的剩余酶活为 47%。为进一步提高其活性和热稳定性, 利用定向进化结合理性设计的方法获得多个突变体。其中, 突变体 T72R/A153P 最适温度由野生型酶的 40 °C 提高到 50 °C, 比活力由 112.2 U/mg 提高到 166.1 U/mg, 70 °C 处理 30 min 后的剩余酶活由野生型酶的完全失活提高到 33%。综上所述, 本研究获得的葡萄糖氧化酶突变体在催化活性和热稳定性上有所提升, 具有一定的应用潜力。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 定向进化; 理性设计; 催化活性; 热稳定性

资助项目: 黑龙江省重点研发计划(2022ZX02B16); 国家现代农业产业技术体系(CARS-41)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Heilongjiang Province (2022ZX02B16) and the China Agriculture Research System (CARS-41).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Xiaojun, yangxj@nwsuaf.edu.cn; YAO Bin, yaobin@caas.cn

Received: 2024-06-03; Accepted: 2024-07-22; Published online: 2024-07-23

Improvement of catalytic activity and thermostability of glucose oxidase from *Aspergillus heteromorphus*

YU Shanglin^{1,2}, ZHOU Qiao^{1,2}, ZHANG Honghai², BAI Yingguo², LUO Huiying², YANG Xiaojun^{1*}, YAO Bin^{2*}

1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Glucose oxidase (GOD) is an oxygen-consuming dehydrogenase that can catalyze the production of gluconic acid hydrogen peroxide from glucose, and its specific mechanism of action makes it promising for applications, while the low catalytic activity and poor thermostability have become the main factors limiting the industrial application of this enzyme. In this study, we used the glucose oxidase *At*GOD reported with the best thermostability as the source sequence for phylogenetic analysis to obtain the GOD with excellent performance. Six genes were screened and successfully synthesized for functional validation. Among them, the glucose oxidase *Ah*GODB derived from *Aspergillus heteromorphus* was expressed in *Pichia pastoris* and showed better thermostability and catalytic activity, with an optimal temperature of 40 °C, a specific activity of 112.2 U/mg, and a relative activity of 47% after 5 min of treatment at 70 °C. To improve its activity and thermal stability, we constructed several mutants by directed evolution combined with rational design. Compared with the original enzyme, the mutant T72R/A153P showcased the optimum temperature increasing from 40 to 50 °C, the specific activity increasing from 112.2 U/mg to 166.1 U/mg, and the relative activity after treatment at 70 °C for 30 min increasing from 0% to 33%. In conclusion, the glucose oxidase mutants obtained in this study have improved catalytic activity and thermostability, and have potential for application.

Keywords: glucose oxidase; directed evolution; rational design; catalytic activity; thermostability

葡萄糖氧化酶是一种黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 依赖性氧化酶, 属于葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶超家族。在有氧条件下, GOD 以氧分子为电子受体, 专一性地催化 β -D-葡萄糖生成 D-葡萄糖酸内酯和过氧化氢, 随后葡萄糖酸内酯水解产生葡萄糖酸^[1]。基于其催化特点, GOD 在饲料、食品、医疗和化工等领域被广泛应用。GOD 具有提高动物生产性能、维护肠道健康、增强总抗氧化能力和免疫力、缓解应激等功能, 可作为一种

饲用抗生素替代品在饲料行业使用^[2]。

GOD 来源广泛, 在真菌和昆虫中均有分布, 起初 GOD 几乎都通过微生物自然发酵生成, 但天然菌株具有表达量低、发酵能力差以及产生的蛋白质分离纯化困难等问题, 限制了 GOD 规模化生产和应用^[3]。选择合适的宿主进行异源表达是实现 GOD 高效生产的有效手段, 来源于曲霉和青霉的葡萄糖氧化酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[4]、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[5]、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)^[6-7]

等菌株中成功表达。其中巴斯德毕赤酵母作为一种甲醇诱导型宿主,不仅基因诱导表达可控、外源蛋白表达水平可观,并且自身分泌蛋白少,是 GOD 目前最理想的异源表达宿主之一^[8]。

为了满足不同行业的实际需求,需要选择合适来源的 GOD 进行性能的改良,以达到事半功倍的效果。利用蛋白质工程技术对 GOD 进行分子改良是提高其性能满足应用需求的有效途径,目前关于 GOD 的分子改良研究主要集中在热稳定性的提升。Ning 等^[9]利用计算机软件分析 GOD 结构并进行定点突变,获得了 T_m 值提高了 4.4 °C 的突变体。Tu 等^[10]通过引入疏水作用力、优化蛋白表面电荷分布的方式成功将野生型 GOD T_{50} 值提高了 7.5 °C; Jiang 等^[11]通过增加糖基化修饰位点、优化相关氨基酸的 FAD 结合能的方式将黑曲霉 GOD 的 T_m 值提高了 9.5 °C。利用蛋白质工程技术提升酶热稳定性的同时通常会造成酶活性的损失^[12-13]。因此分子改良研究中,在不损失酶活性的前提下提高其热稳定性具有重要意义。

本课题组前期从土曲霉(*Aspergillus terreus*)中分离得到一种超耐热葡萄糖氧化酶 AtGOD,在 90 °C 下处理 2 min 后剩余酶活达 90%,但其活性较低^[14]。本研究以 AtGOD 为模板,通过进化分析筛选出了 6 种葡萄糖氧化酶,用毕赤酵母异源表达后进行酶学性质分析,最终筛选出热稳定性较好、活性较高的异形曲霉(*Aspergillus heteromorphus*)葡萄糖氧化酶 AhGODB,随后结合定向进化和理性设计方法对其进行分子改良,进一步提高其活性和热稳定性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司,用于基因克隆;毕

赤酵母 GS115 菌株和载体 pPICZ α A 均购自 Invitrogen 公司,用于外源基因的表达。

DNA 聚合酶和 DNA 产物纯化试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;随机突变试剂盒 Gene Morph II 购自 Aligent 公司;限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Bgl* II 和 *Dpn* I 均购自 ThermoFisher Scientific 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和邻联茴香胺均购自 Amresco 公司。博来霉素(Zeocin)购自 Invitrogen 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖氧化酶基因的挖掘

以本课题组前期获得的超耐热土曲霉葡萄糖氧化酶 AtGOD 蛋白序列为模板,在 GenBank 数据库检索同源氨基酸序列,选取同源性在 70%–90% 的序列,利用 MEGA 11 构建系统进化树,根据与 AtGOD 的亲缘关系的远近选定研究对象。苏州金唯智生物科技有限公司按照毕赤酵母密码子偏好性进行葡萄糖氧化酶基因的优化合成。

1.2.2 重组载体构建

设计特异性引物,以合成的基因为模板,扩增葡萄糖氧化酶基因并在下游加入 6 \times His 标签。目的基因片段经胶回收纯化后分别连接到经过 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶处理后的表达载体 pPICZ α A 上,构建重组载体,随后转化到大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1。将菌液涂布在 LB (含有 50 μ g/mL Zeocin) 固体培养基上 37 °C 培养 12–16 h,挑取阳性转化子培养后进行 DNA 序列测定。

1.2.3 葡萄糖氧化酶异源表达和纯化

提取重组载体质粒,用 *Bgl* II 线性化处理 after 电击转化到 *P. pastoris* GS115 感受态细胞,菌

液涂布在 YPD (含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin) 平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。从 YPD 平板上挑取转化子, 参照毕赤酵母表达手册(Invitrogen, K171001)进行诱导表达。诱导表达结束后, 菌液经 8 000 r/min 离心 15 min 后收集上清发酵液。利用 10 kDa 膜包浓缩发酵液至 20 mL 左右, 再经过 5 mL Ni NTA Beads 6FF 层析柱纯化, 酶液经不同咪唑浓度(20–500 mmol/L, pH 7.5)的 NTA 溶液洗脱, 纯化后的酶液使用 20 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 7.4)透析, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。利用 SDS-PAGE 分析蛋白分子量大小和纯化结果。

1.2.4 葡萄糖氧化酶活力测定

对 GOD 酶活测定方法^[15]进行调整。采用 1.45 mL 反应体系: 2.5 mg/mL 邻联茴香胺溶于 100 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 6.0); 18 mg/mL 葡萄糖溶液; 9 U/mL 辣根过氧化物酶; 50 μL 稀释至合适浓度的酶液。混匀后的反应体系在标准条件(30 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.0)下反应 3 min 后, 加入 1 mL 2 mol/L 硫酸终止反应。终止后的反应溶液在 OD_{540} 下测定吸光度。酶活单位(U)定义为: 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0 条件下, 每 min 氧化 1 μmol 葡萄糖所消耗的酶量。反应均重复 3 次, 数据表示为 mean \pm SD。

1.2.5 葡萄糖氧化酶性质测定

在 pH 6.0 条件下, 测定酶液在不同温度下的活性确定最适温度; 用 pH 6.0 缓冲液将酶液稀释到浓度大约为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理不同时间后立即冰浴 2 h。在标准条件下测定酶剩余活力, 绘制热稳定性曲线。

配制 pH 2.0–12.0 缓冲液, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测定酶活力确定酶最适 pH; 用不同 pH 缓冲液稀释酶液至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右, 室温处理 1 h 后标准条件下测定酶剩余活力, 绘制 pH 稳定性曲线。

配制不同浓度(5–200 mmol/L)葡萄糖作为

反应底物, 在标准条件下测定酶活力。利用 GraphPad Prism 5 软件分析数据, 拟合 Michaelis-Menten 曲线, 得到动力学参数米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max}), 计算出转化数(k_{cat}), 评估催化效率(k_{cat}/K_m)。上述反应均重复 3 次, 数据表示为 mean \pm SD。

1.2.6 葡萄糖氧化酶 AhGODB 随机突变库的构建和筛选

以重组载体 pPICZ α A-AhgodB 为模板, 利用易错 PCR 的方法对 AhgodB 基因进行随机突变, 通过调整 PCR 体系中模板含量控制基因突变比例, 构建随机突变库。PCR 详细步骤参照随机突变试剂盒说明书(Gene Morph II)。向 PCR 产物中加入 1 μL Dpn I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h 以消化野生型基因模板。PCR 产物转化到感受态细胞 Trans1-T1 后, 在含有 Zeocin 的 LB 固体培养基上培养 12–16 h, 挑取阳性转化子进行 DNA 序列测定以确定突变频率。

提取突变库质粒, 用 Bgl II 线性化处理 after 电击转化到 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 挑取转化子在 His-MM 平板诱导表达 48 h。平板放入 90 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱处理 9 min 后倒入显色液, 根据转化子周围的棕色圈大小进行筛选。GOD 显色液的配制方法为: 2 mL 18% 的葡萄糖溶液, 400 μL 辣根过氧化物酶溶液(90 U/mL), 200 μL 1% 邻联茴香胺甲醇溶液, 溶于 10 mL 含 1% 琼脂糖溶液中。挑取转化子于 30 μL 真菌裂解液中, 98 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min。以裂解产物为模板, 设计特异引物进行 PCR 扩增, 胶回收后连接到 pPICZ α A 载体上, 重组载体经转化后挑取阳性转化子进行序列测定, 以确定突变位点。

1.2.7 葡萄糖氧化酶 AhGODB 理性设计及组合突变

利用蛋白质耐热性人工智能模型 Preoptem (PMID: 38647756), 对蛋白质中所有的氨基酸残

基进行扫描,根据预测的单点突变体相对于野生型耐热性的差异,来确定与耐热性相关的突变位点,并进行理性设计,验证突变体的功能。以重组载体 pPICZ α A-*AhgodB* 为模板,设计特异性引物进行 PCR。向 PCR 产物中加入 1 μ L *Dpn* I 酶,37 $^{\circ}$ C 处理 2 h 以消化野生型模板。PCR 产物转化到感受态细胞 Trans1-T1 后,在含有 Zeocin 的 LB 固体培养基上培养 12–16 h,挑取阳性转化子进行 DNA 序列测定以确保定点突变成功。

获得的定点突变体在毕赤酵母中异源表达,对其纯化酶液进行性质分析。将热稳定性提升明显的突变体的突变位点进行组合,构建组合突变体。

1.2.8 分子动力学模拟

使用 GROMACS 5.0 软件包和 CHARMM 36 力场对突变体进行了分子动力学模拟。使用最陡梯度法最小化能量,以排除其他干扰因素。首先将系统在 NVT 集合中平衡 10 000 步,然后在 NPT 集合中平衡 10 000 步,最后在 300 K 温度下,利用 PME 算法,以 2 fs 的时间步长对突变体进行了 50 ns 的分子动力学模拟,分析重组酶的均方根偏差值和均方根波动值。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖氧化酶筛选

对 *AtGOD* 进行 BLAST 检索,在目标区内共获得了 64 种可能的葡萄糖氧化酶。将这些葡萄糖氧化酶蛋白序列进行多序列比对并用 MEGA 11 软件构建系统进化树(图 1,红色标注的为成功合成的基因,蓝色标注为未成功合成的基因)。选取了 11 个与 *AtGOD* 亲缘关系最近的 GOD 按毕赤酵母密码子偏好性进行基因合成,其中仅有 6 个葡萄糖氧化酶(分别命名为 *AgGODA*、*ArGODA*、*AeGODA*、*AhGODA*、

AwGODA 和 *AhGODB*)的基因成功合成,详细信息如表 1 所示。

2.2 葡萄糖氧化酶表达、纯化和性质测定

2.2.1 葡萄糖氧化酶的表达和纯化结果

六种葡萄糖氧化酶的重组载体经线性化处理转入 GS115 菌株,在含有 Zeocin 的 YPD 平板上培养 48 h。从 6 个平板上分别挑取 96 个转化子进行诱导表达,诱导表达结束后检测上清液 GOD 活性。只有 *ArGODA* 和 *AhGODB* 这两种重组酶表现出明显 GOD 活性,选取 *ArGODA* 和 *AhGODB* 中活性最高的单克隆扩大培养。

收集 *ArGODA* 和 *AhGODB* 这两种重组酶的上清发酵液,浓缩后通过镍柱亲和层析纯化,收集 80 mmol/L NTA 洗脱液。SDS-PAGE 结果显示两种蛋白电泳条带单一,表观分子量大小约为 75 kDa,大于理论分子量 65 kDa (图 2),这可能是毕赤酵母对外源蛋白进行了糖基化修饰的结果。

2.2.2 *ArGODA* 和 *AhGODB* 酶学性质分析

重组 *ArGODA* 和 *AhGODB* 的最适温度均为 40 $^{\circ}$ C,在 30–70 $^{\circ}$ C 范围内 *AhGODB* 表现出更高的活性(图 3A)。*AhGODB* 的热稳定性要略优于 *ArGODA*,70 $^{\circ}$ C 处理 5 min 后的剩余酶活分别为 47%和 40%,处理 10 min 后剩余酶活分别为 14%和 7% (图 3B)。两种酶的最适 pH 值均为 6.0, *ArGODA* 在 pH 5.0–8.0 时的活性高于 *AhGODB* (图 3C),并且在 pH 3.0–12.0 时表现出更好的稳定性(图 3D)。

ArGODA 和 *AhGODB* 比活力分别为 55.0 U/mg 和 112.2 U/mg, K_m 值分别为 29.2 mmol/L 和 30.6 mmol/L,催化效率(k_{cat}/K_m)分别为 2.8 mmol/(L·s)和 5.0 mmol/(L·s) (表 2)。*AhGODB* 具有更好的热稳定性和更高的活性,因此选择 *AhGODB* 进行后续分子改良研究。

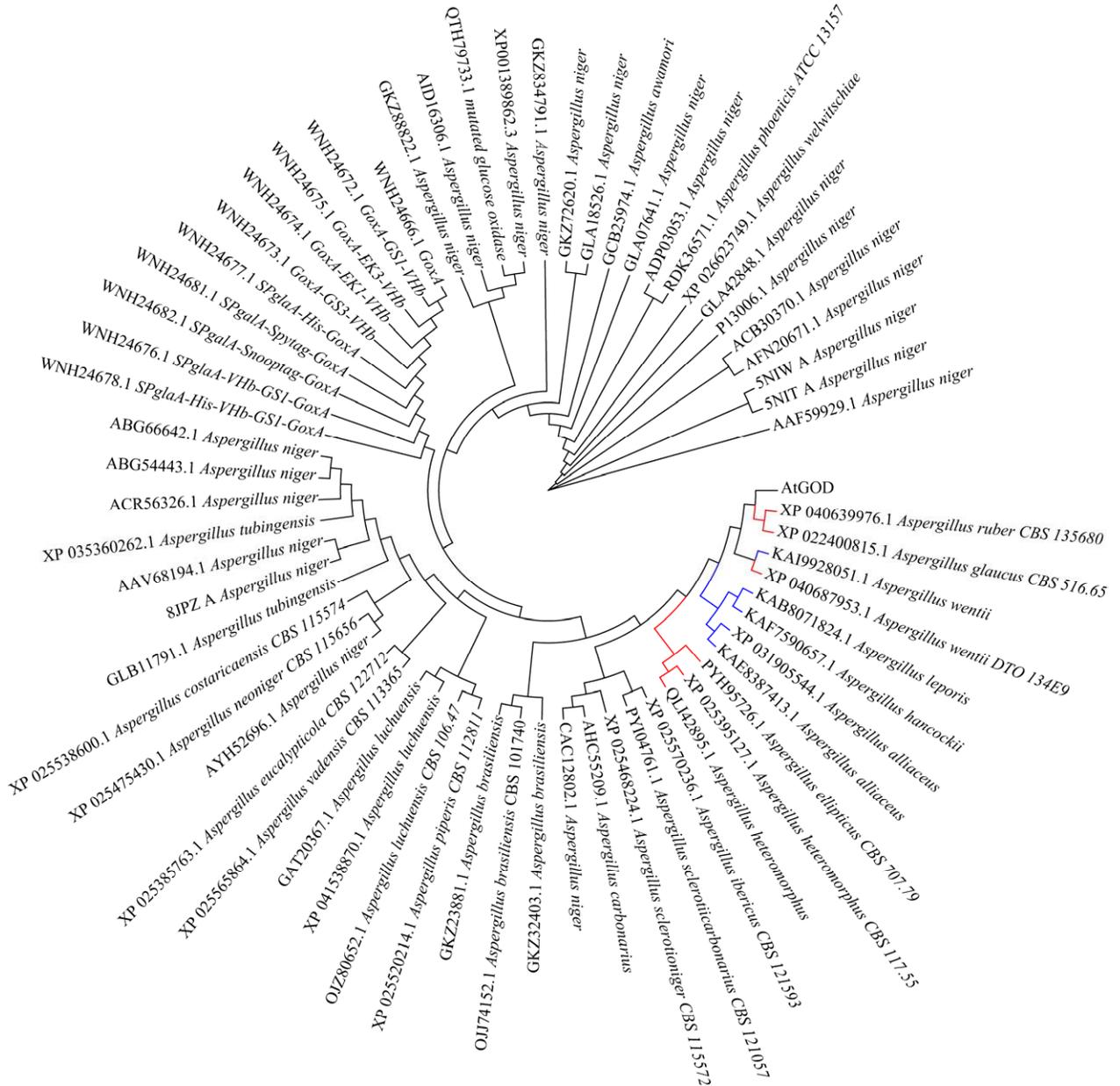


图 1 GOD 进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of GOD.

表 1 成功合成的 6 个葡萄糖氧化酶的信息

Table 1 Details of the six GODs successfully synthesised

| Enzyme | Length (aa) | GenBank number | Source | Percent identity (%) |
|--------|-------------|----------------|----------------------------------|----------------------|
| AgGODA | 607 | XP_022400815.1 | <i>Aspergillus glaucus</i> | 89.5 |
| ArGODA | 607 | XP_040639976.1 | <i>Aspergillus ruber</i> | 88.2 |
| AeGODA | 612 | PYH95726.1 | <i>Aspergillus ellipticus</i> | 73.8 |
| AhGODA | 605 | XP_025395127.1 | <i>Aspergillus heteromorphus</i> | 72.5 |
| AwGODA | 608 | XP_040687953.1 | <i>Aspergillus wentii</i> | 72.2 |
| AhGODB | 589 | QLI42895.1 | <i>Aspergillus heteromorphus</i> | 72.7 |

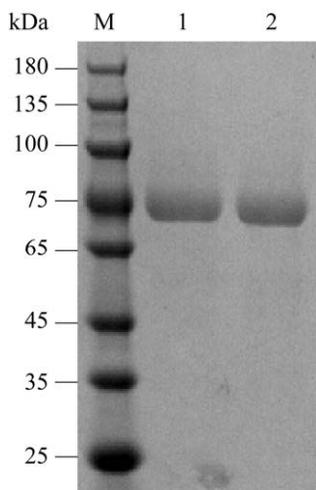


图2 *ArGODA* 和 *AhGODB* 的 SDS-PAGE 分析
M: 蛋白标记; 泳道 1: *ArGODA*; 泳道 2: *AhGODB*。
Figure 2 SDS-PAGE analysis of the *ArGODA* and *AhGODB*. Lane M: Protein marker; Lane 1: *ArGODA*; Lane 2: *AhGODB*.

2.3 突变体筛选、纯化和性质测定

2.3.1 突变体筛选和纯化

通过调整 PCR 体系中模板含量控制突变频率, 当体系中模板含量为 750 ng 时, 其蛋白序列发生 1-2 个氨基酸残基突变, 突变比例约为 0.3%。从文库中筛选了近 2 000 个突变体, 进行一定程度热处理后, 约 500 个转化子周围出现棕色圈。挑取了 12 个棕色圈面积较大的转化子进行表达和性质测定, 其中一个随机突变体的活性和热稳定性均有提高, 测序结果显示其 249 位点的缬氨酸(Val)突变为异亮氨酸(Ile)。

根据耐热模型预测的结果, 按照差异值从高到低排列, 选取了 50 个与野生型差异值最高的位点并对这些位点进行定点突变实验。定点

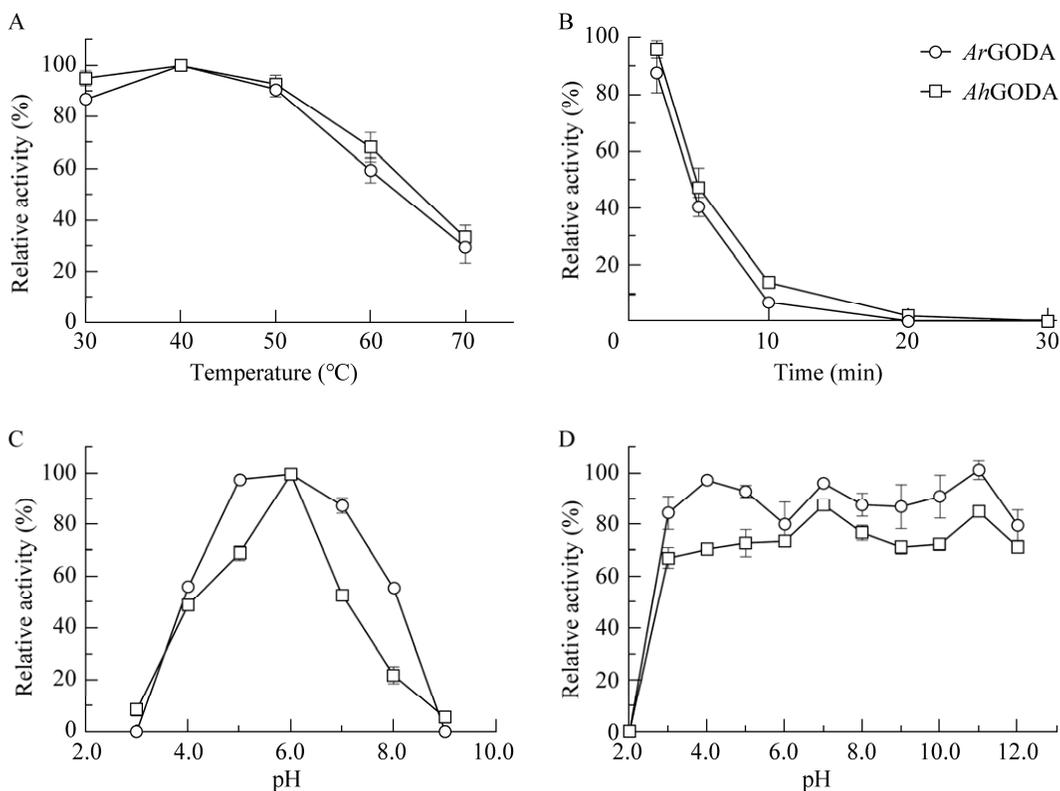


图3 *ArGODA* 和 *AhGODB* 的酶学性质 A: 最适温度; B: 70 °C热稳定性; C: 最适 pH; D: pH 稳定性。

Figure 3 The enzymatic properties of *ArGOD* and *AhGODB*. A: Optimal temperature; B: Thermostability at 70 °C; C: Optimal pH; D: pH stability.

表 2 *Ar*GODA 和 *Ah*GODB 的比活力和动力学参数Table 2 Specific activity and kinetic parameters of *Ar*GODA and *Ah*GODB

| Enzyme | Specific activity (U/mg) | K_m (mmol/L) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m (mmol/(L·s)) |
|----------------|--------------------------|----------------|------------------------|----------------------------|
| <i>Ar</i> GODA | 55.0±1.0 | 29.2±3.7 | 80.7±7.2 | 2.8 |
| <i>Ah</i> GODB | 112.2±3.5 | 30.6±3.0 | 152.9±10.5 | 5.0 |

突变体的重组质粒成功构建后再进行表达和筛选。其中突变体 T72R 和 A153P 表现出较好的热稳定性,将这 2 个突变位点进行组合,获得组合突变体 T72R/A153P。

将上述突变体扩大培养,纯化其蛋白。SDS-PAGE 结果显示,所有酶液蛋白电泳条带单一,且表观分子量均为 75 kDa 左右,均大于理论分子量(图 4)。

2.3.2 突变体酶学性质分析

突变体 T72R/A153P 的最适温度为 50 °C,较 *Ah*GODB 提高 10 °C,在 70 °C 保持约 63% 的相对活性。其余突变体的最适温度均为 40 °C,与 *Ah*GODB 一致(图 5A)。突变体在 70 °C 热稳

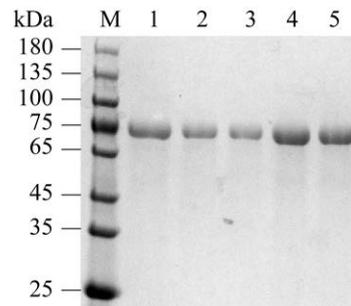


图 4 *Ah*GODB 和突变体的 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白标记;泳道 1: *Ah*GODB;泳道 2: V249I;泳道 3: T72R;泳道 4: A153P;泳道 5: T72R/A153P。
Figure 4 SDS-PAGE analysis of the *Ah*GODB and mutants. M: Protein marker; Lane 1: *Ah*GODB; Lane 2: V249I; Lane 3: T72R; Lane 4: A153P; Lane 5: T72R/A153P.

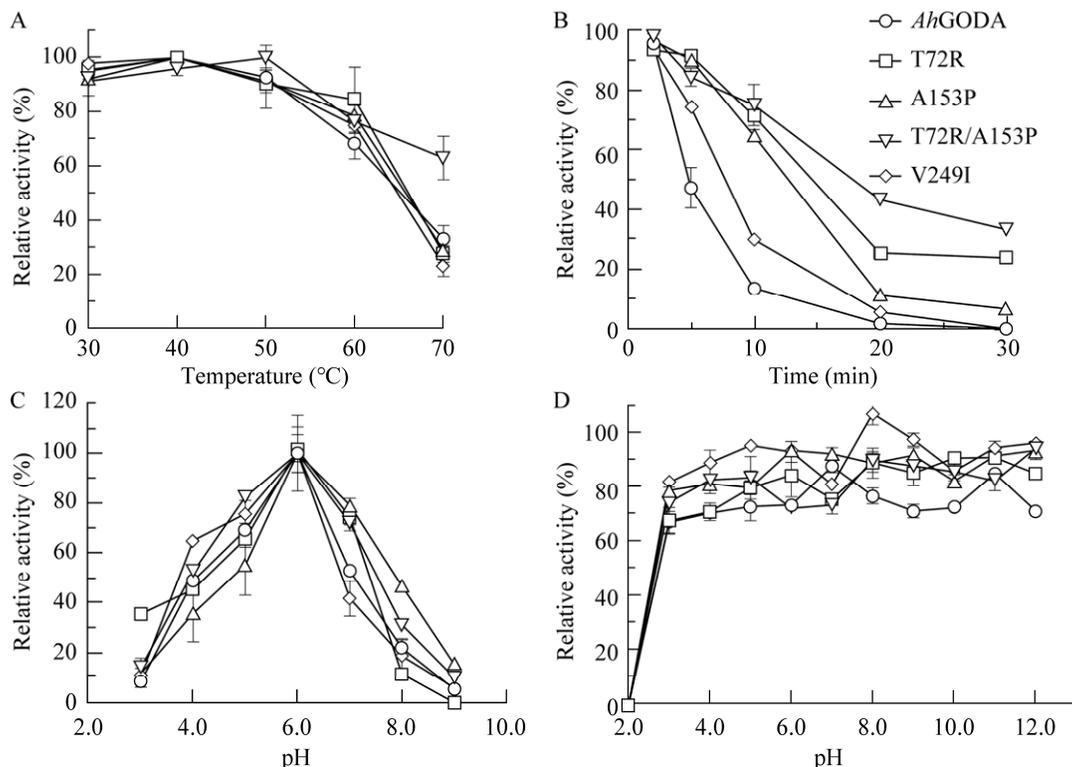


图 5 *Ah*GODB 和突变体的酶学性质 A: 最适温度; B: 70 °C 热稳定性; C: 最适 pH; D: pH 稳定性。
Figure 5 The enzymatic properties of *Ah*GODB and mutants. A: Optimal temperature; B: Thermostability at 70 °C; C: Optimal pH; D: pH stability.

定性较 *AhGODB* 有不同程度的提升, 其中 V249I 在 70 °C 处理 5 min 和 10 min 后剩余酶活分别为 74% 和 30%, 与 *AhGODB* 相比分别提高 27% 和 16%; T72R、A153P 和 T72R/A153P 在 70 °C 处理 30 min 后的剩余酶活分别为 24%、7% 和 33%, 而 *AhGODB* 在 70 °C 处理 30 min 后完全失活(图 5B)。突变体最适 pH 与 *AhGODB* 一致, 均为 6.0(图 5C), 在 pH 3.0–12.0 内相对稳定, 并且在 pH 3.0–6.0 和 pH 8.0–12.0 表现出比 *AhGODB* 更高的稳定性(图 5D)。

突变体的活性较 *AhGODB* 均有提高, 其中 A153P 比活力为 118.6 U/mg, 与 *AhGODB* (112.2 U/mg) 相近。T72R、T72R/A153P 和 V249I 比活力分别为 145.3 U/mg、166.1 U/mg 和 176.6 U/mg, 较 *AhGODB* 分别提升 30%、48% 和 57%。测定突变体的动力学参数, 除 A153P 的 K_m 值下降外, 其余突变体的 K_m 值均有不同程度的上升。3 个单点突变体的催化效率提升幅度为 22%–24%。尽管组合突变体 T72R/A153P 转换数提高 31%, 但 K_m 值提升了 32%, 导致其催化效率偏低, 为 4.9 mmol/(L·s) (表 3)。

2.4 突变体结构分析

72 和 153 位点均位于蛋白结构表面, 而 249 位点位于蛋白内部, 且 3 个突变位点均无相互作用。72 位点突变为精氨酸(Arg)后减少了与脯氨酸(Pro) 82 的氢键, 用静电作用力替代了与天冬氨酸(Asp) 86 的一个氢键作用力; 153 位点突变后与 Asp156 作用力由传统氢键变成了相对较

弱的 C–H 氢键, 与组氨酸(His) 163 形成的疏水作用替代了与苏氨酸(Thr) 157 的氢键作用; 249 位点由 Val 突变为更加疏水的异亮氨酸, 但减少了与亮氨酸(Leu) 122 的疏水作用力(图 6)。

对 *AhGODB* 和 T72R/A153P 进行了分子动力学模拟, 分析其均方根偏差(root mean square deviation, RMSD) 和均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF) 值。T72R/A153P 的 RMSD 值要低于 *AhGODB*, 这说明突变体的稳定性有所提高(图 7A); T72R/A153P 突变体在 72 位点附近的 RMSF 值要低于 *AhGODB*, 说明该位点的突变提高了周围氨基酸残基的刚性, 在 150 位点附近的氨基酸残基柔性增加, 有可能是减少了氢键所导致(图 7B)。

3 讨论

有研究报道称在植物、哺乳动物的组织提取物中检测到 GOD 活性, 但随着研究的深入, 发现其并不具有真正意义上的 GOD 蛋白。细菌中检测到的 GOD 活性并不是由 GOD 表现出来的, 而是由依赖于 NAD 的葡萄糖脱氢酶引起的。Bauer 等^[6]从 3 个数据库中筛选得到了 50 条 GOD 序列, 其中 45 条来源于真菌, 仅有 5 条来源于昆虫, 而哺乳动物、植物和细菌中没有检索到潜在 GOD 序列, 因此绝大部分 GOD 资源来源于真菌。本研究挖掘出了 6 个来源于丝状真菌的 GOD, 并将其用毕赤酵母进行异源表达, 其中只有赤曲霉(*Aspergillus ruber*) ArGODA 和异

表 3 *AhGODB* 和突变体的比活力和动力学参数

Table 3 Specific activity and kinetic parameters of *AhGODB* and mutants

| Enzyme | Specific activity (U/mg) | K_m (mmol/L) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m (mmol/(L·s)) |
|---------------|--------------------------|----------------|------------------------|----------------------------|
| <i>AhGODB</i> | 112.2±3.5 | 30.6±3.0 | 152.9±10.5 | 5.0 |
| T72R | 145.3±5.2 | 31.5±2.0 | 190.8±6.4 | 6.1 |
| A153P | 118.6±1.3 | 27.2±2.0 | 165.9±6.6 | 6.1 |
| T72R/A153P | 166.1±9.9 | 40.5±2.9 | 199.6±10.2 | 4.9 |
| V249I | 176.6±3.7 | 35.8±2.6 | 220.6±9.9 | 6.2 |

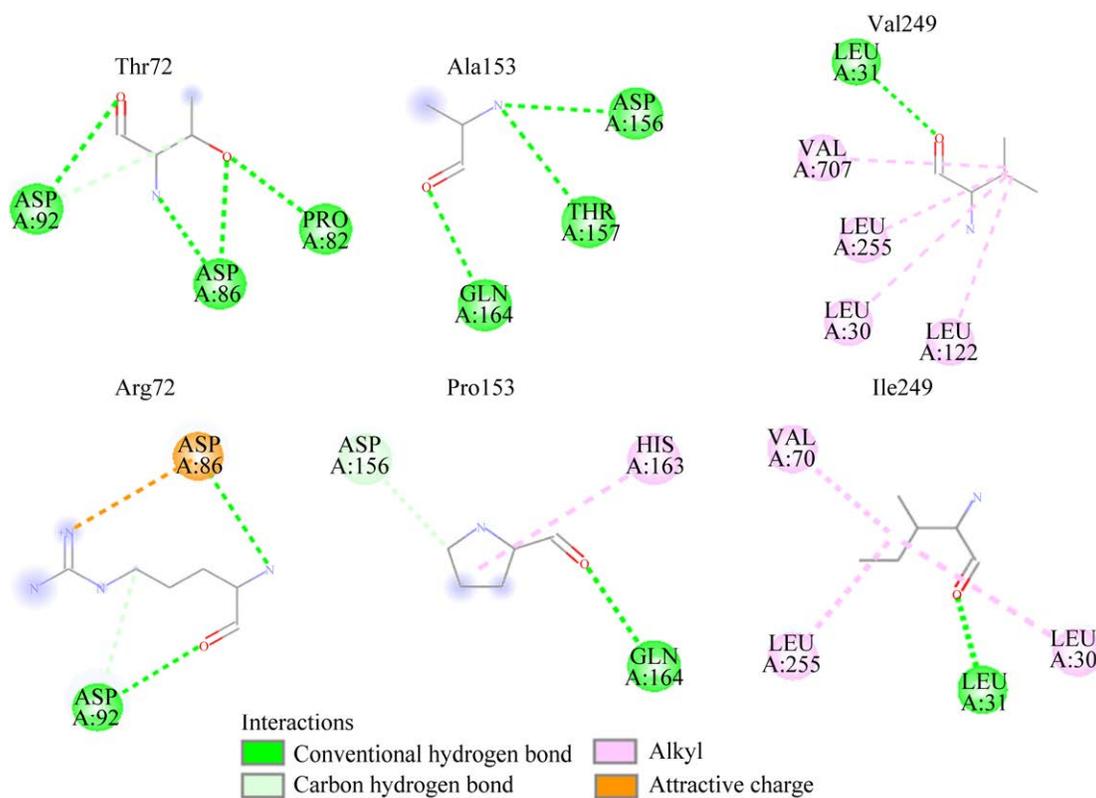


图 6 突变位点作用力变化 A: 氨基酸。

Figure 6 Interactions change at mutant sites. A: Amino acid.

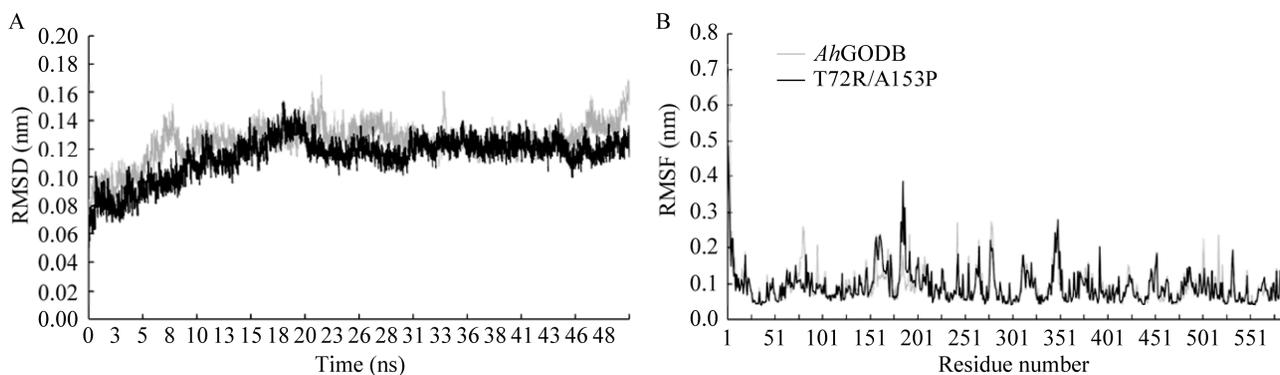


图 7 分子动力学模拟结果 A: 均方根偏差; B: 均方根波动。

Figure 7 Results of molecular dynamics simulation. A: Root mean square deviation; B: Root mean square fluctuation.

形曲霉(*Aspergillus heteromorphus*) AhGODB 表现出明显活性, 在实验室前期的研究中也发现挖掘到的 GOD 很少能在异源宿主中表现出活性, 其原因有待进一步分析。

通常真菌来源的 GOD 最适温度在 25–60 °C 之间, 其中来源于尼崎青霉 GOD 最适温度普遍较低, 而来源于塔宾曲霉 GOD 的最适温度达到 60 °C^[17]。AhGODB 的最适温度为 40 °C, 与黑

曲霉 GOD 一致^[3,6]。而组合突变体 T72R/A153P 最适温度提高到了 50 °C, 并且在 70 °C 保持约 63% 的相对活性, 在 70 °C 处理 20 min 后的剩余活性约为 43%, 黑曲霉 GOD 在 70 °C 处理 20 min 后能保持约 10% 的剩余活性^[10], 突变体 T72R/A153P 的热稳定性优于黑曲霉 GOD。尼崎青霉 GOD 的催化效率要高于黑曲霉 GOD^[18]。Liu 等^[19]表达的异形曲霉 GOD 的催化效率为 1.1 mmol/(L·s), 而 AhGODB 的催化效率为 5.0 mmol/(L·s), 约是前者的 4.5 倍。AhGODB 及其突变体 T72R/A153P 具有一定的应用潜力, 且其性能可以通过蛋白质工程技术进一步提升。

在蛋白质高级结构中, loop 结构通常表现出较强的柔性, 对酶的稳定性和催化活性发挥着重要作用。Lu 等^[20]通过删除 α -淀粉酶活性中心附近的柔性 loop 结构, 不仅提高了突变体的热稳定性, 其催化效率也提高了约 426 倍。在 AhGODB 辅因子结合区周围存在一段 loop 结构(氨基酸残基 70-95), 72 位点恰好位于这段 loop 上。本研究利用分子动力学模拟对突变体 T72R/A153P 性能改变的可能机制进行了初步的分析。72 位点发生突变后, 附近氨基酸残基的 RMSF 值降低, 表明该 loop 区域的刚性及稳定性得到了增强, 一定程度上增加了辅因子 FAD 结合稳定性, 这可能是 72 突变体热稳定性和活性均有所提高的原因。脯氨酸 Pro 是一种刚性的氨基酸, 其特有的环状结构使其具有更小的构象熵, 有利于提高蛋白结构的稳定性。因此, 引入 Pro 是提高蛋白热稳定性常用的策略之一。田健^[21]向甲基对硫磷水解酶中引入脯氨酸成功将 T_m 值提高了 3.3 °C。在 153 位点引入刚性 Pro 提高了 AhGODB 热稳定性, 但 153 位点突变后丢失了 1 个氢键, 取而代之的是强度较弱的疏水作用力, 这可能是其热稳定性提升不明显的原因。将 249 位点的缬氨酸 Val 突变为

为更加疏水的异亮氨酸 Ile, 增加了内部环境的疏水性, 但突变后丢失了 1 个疏水作用键, 这可能是其活性提升显著但热稳定性提升不明显的原因。除了 loop 区、Pro 及内部疏水性外, 还包括表面电荷性、氢键、盐桥等影响酶活性和稳定性的因素, 在今后的工作中可以结合不同的策略, 进一步提高 AhGODB 的稳定性和活性, 提升其产业价值。

4 结论

本研究通过进化分析挖掘出了一种热稳定性良好且酶活力较高葡萄糖氧化酶 AhGODB, 并对其性质进行了分析。为了进一步提高其热稳定性和活性, 利用定向进化结合理性设计的方法对其进行分子改良研究, 获得了性能较为优良的突变体, 具有一定的应用潜力, 为葡萄糖氧化酶活性和热稳定性改良提供了思路和线索。

REFERENCES

- [1] BANKAR SB, BULE MV, SINGHAL RS, ANANTHANARAYAN L. Glucose oxidase: an overview[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 489-501.
- [2] LIANG ZQ, YAN YR, ZHANG W, LUO HY, YAO B, HUANG HQ, TU T. Review of glucose oxidase as a feed additive: production, engineering, applications, growth-promoting mechanisms, and outlook[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(5): 698-715.
- [3] GUO Y, LU FX, ZHAO HZ, TANG YC, LU ZX. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(2): 498-509.
- [4] WITT S, SINGH M, KALISZ HM. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1405-1411.
- [5] MALHERBE DF, du TOIT M, CORDERO OTERO RR, van RENSBURG P, PRETORIUS IS. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(5): 502-511.
- [6] MENG Y, ZHAO M, YANG M, ZHANG Q, HAO J,

- MENG Y. Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(4): 393-400.
- [7] GAO ZW, LI ZF, ZHANG YH, HUANG HQ, LI M, ZHOU LW, TANG YM, YAO B, ZHANG W. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon optimization[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(3): 507-514.
- [8] BELYAD F, KARKHANEI AA, RAHEB J. Expression, characterization and one step purification of heterologous glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 9029 in *Pichia pastoris*[J]. EuPA Open Proteomics, 2018, 19: 1-5.
- [9] NING XY, ZHANG YL, YUAN TT, LI QB, TIAN J, GUAN WS, LIU B, ZHANG W, XU XX, ZHANG YH. Enhanced thermostability of glucose oxidase through computer-aided molecular design[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 425.
- [10] TU T, WANG Y, HUANG HQ, WANG YR, JIANG X, WANG ZX, YAO B, LUO HY. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution[J]. Food Chemistry, 2019, 281: 163-170.
- [11] JIANG X, WANG YR, WANG Y, HUANG HQ, BAI YG, SU XY, ZHANG J, YAO B, TU T, LUO HY. Exploiting the activity-stability trade-off of glucose oxidase from *Aspergillus niger* using a simple approach to calculate thermostability of mutants[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128270.
- [12] LIAO H, GONG JY, YANG Y, JIANG ZD, ZHU YB, LI LJ, NI H, LI QB. Enhancement of the thermostability of *Aspergillus niger* α -L-rhamnosidase based on PoPMuSiC algorithm[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(8): e12945.
- [13] de SOUZA AR, de ARAÚJO GC, ZANPHORLIN LM, RULLER R, FRANCO FC, TORRES FAG, MERTENS JA, BOWMAN MJ, GOMES E, Da SILVA R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93(Pt A): 20-26.
- [14] 黄火清, 涂涛, 罗会颖. 一种超耐热葡萄糖氧化酶 AtGOD 及其基因和应用: CN112877306B[P]. 2021-07-20.
- HUANG HQ, TU T, LUO HY. An ultra-heat-resistant glucose oxidase AtGOD and its gene and application: CN112877306B[P]. 2021-07-20.
- [15] HATZINIKOLAOU DG, HANSEN OC, MACRIS BJ, TINGEY A, KEKOS D, GOODENOUGH P, STOUGAARD P. 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.
- [16] BAUER JA, ZÁMOCKÁ M, MAJTÁN J, BAUEROVÁ-HLINKOVÁ V. Glucose oxidase, an enzyme “ferrari”: its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 472.
- [17] KRIAA M, HAMMAMI I, SAHNOUN M, AZEBOU MC, TRIKI MA, KAMMOUN R. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a novel *Aspergillus tubingensis* glucose oxidase steady on broad range of pH and temperatures[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(11): 2155-2166.
- [18] HOLLAND JT, HARPER JC, DOLAN PL, MANGINELL MM, ARANGO DC, RAWLINGS JA, APBLETT CA, BROZIK SM. Rational redesign of glucose oxidase for improved catalytic function and stability[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37924.
- [19] LIU ZM, YUAN MX, ZHANG XY, LIANG QP, YANG M, MOU HJ, ZHU CL. A thermostable glucose oxidase from *Aspergillus heteromorphus* CBS 117.55 with broad pH stability and digestive enzyme resistance[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 176: 105717.
- [20] LU ZH, WANG QH, JIANG SJ, ZHANG GM, MA YH. Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermos-stability and specific activity of alkaline α -amylase Amy703[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22465.
- [21] 田健. 计算机辅助分子设计提高蛋白质热稳定性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- TIAN J. Study on improving thermal stability of Proteins by computer-aided molecular design[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese).