

## 工业生物技术

# L-谷氨酸氧化酶与 CBD 的融合表达及其在微晶纤维素上固定化分析

宋辉<sup>1,2</sup>, 张文宇<sup>2</sup>, 王鹏举<sup>2</sup>, 谭焕波<sup>2</sup>, 苏文成<sup>2</sup>, 赵树欣<sup>1</sup>, 邹培建<sup>2</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

宋辉, 张文宇, 王鹏举, 等. L-谷氨酸氧化酶与 CBD 的融合表达及其在微晶纤维素上固定化分析. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1348–1361.

Song H, Zhang WY, Wang PJ, et al. Analysis of immobilized L-glutamate oxidase fused with cellulose binding domain on microcrystalline cellulose. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1348–1361.

**摘要:** 酶的固定化作为一种重要的技术, 已在生物催化领域得到了广泛的应用。现将来源于普拉特链霉菌 3304 (*Streptomyces platensis* NTU3304) 产生的胞外 L-谷氨酸氧化酶 (L-glutamate oxidase, Gox) 基因 *gox* 融合到来源于粪碱纤维单胞菌 *Cellulomonas fimi* 的纤维素结合域 (CBDcex) 的基因上, 构建表达载体 pETM10-Gox-CBD, 并在大肠杆菌中表达。通过蛋白纯化获得融合蛋白, 并命名为 Gox-CBD。利用 CBD 对微晶纤维素特异性吸附的特性将其固定在微晶纤维素上, 并对固定化酶的制备条件、结合量、酶学性质及其微晶纤维素结合稳定性等进行了研究。在 4 °C 条件下结合约 1 h, 融合蛋白 Gox-CBD 结合在纤维素上的结合量即可达到 9.0 mg/g。通过对重组型、融合表达游离的以及固定化在微晶纤维素上的谷氨酸氧化酶的酶学性质进行比较发现, 固定化酶的比酶活有所降低; 但固定化酶的热稳定性相对于游离酶有了很大的提高, 在 60 °C 孵育 30 min 后还保留有约 70% 的活性, 而游离的重组 Gox 在相同条件下几乎完全失去活性。当固定化结合蛋白在 pH<10 或者盐浓度>5 mmol/L 的 NaCl 条件下可以牢固结合。并且可以通过一步纯化方法固定化融合蛋白 Gox-CBD 于微晶纤维素上。因此, L-谷氨酸氧化酶与纤维素结合域融合表达的研究为蛋白的纯化及酶的固定化提供了一种新策略。

**关键词:** L-谷氨酸氧化酶, 纤维素结合域, 固定化

**Received:** March 1, 2016; **Accepted:** May 12, 2016

**Supported by:** Tianjin Municipal Science & Technology Project (No. 14ZCZDSY00057).

**Corresponding author:** Peijian Zou. Tel/Fax: +86-22-24828722; E-mail: zou\_pj@tib.cas.cn

天津科技支撑计划项目 (No. 14ZCZDSY00057) 资助。

# Analysis of immobilized L-glutamate oxidase fused with cellulose binding domain on microcrystalline cellulose

Hui Song<sup>1,2</sup>, Wenyu Zhang<sup>2</sup>, Pengju Wang<sup>2</sup>, Huanbo Tan<sup>2</sup>, Wencheng Su<sup>2</sup>, Shuxin Zhao<sup>1</sup>, and Peijian Zou<sup>2</sup>

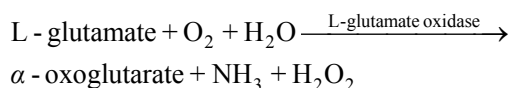
<sup>1</sup> College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup> National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Immobilization of enzymes is important and widely applied in biocatalysis. *Streptomyces platensis* gene *gox*, encoding an extracellular L-glutamate oxidase (Gox), was fused to cellulose binding domain (CBDcex) from *Cellulomonas fimi* and the recombinant protein Gox-CBD was expressed in *Escherichia coli*. The fusion protein (Gox-CBD) was immobilized onto microcrystalline cellulose. The preparation conditions, binding capacity, properties and stability of the immobilized enzyme were studied. Under the condition of 4 °C, for 1 hour, the fusion protein Gox-CBD was able to bind microcrystalline cellulose at a ratio of 9.0 mg of protein per gram of microcrystalline cellulose. Enzymatic properties of free and immobilized L-glutamic oxidase (Gox-CBD) were compared. The specific activity of the immobilized enzyme decreased, but its thermal stability increased a lot compared with that of the free Gox-CBD. After incubation at 60 °C for 30 min, 70% of the total activity remained whereas the free recombinant Gox completely lost its activity. The immobilized protein was tightly bound to microcrystalline cellulose at pH below 10 or more than 5 mmol/L NaCl. The fusion protein of Gox-CBD can be specifically immobilized on the microcrystalline cellulose on a single step. Therefore, our findings can provide a novel strategy for protein purification and enzyme immobilization.

**Keywords:** L-glutamate oxidase, cellulose binding domain, immobilized

L-谷氨酸氧化酶 (EC 1.4.3.11) (简称 Gox) 作为一种工具酶,它是一种以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基的黄素蛋白酶类,其作为一种工具酶,能专一地 将谷氨酸氧化脱氨基生成  $\alpha$ -酮戊二酸,同时伴随着氨气和过氧化氢的产生<sup>[1]</sup>。其催化反应式为:



谷氨酸氧化酶广泛应用于食品、化学和医药等领域<sup>[2]</sup>。利用谷氨酸氧化酶对谷氨酸的特异性催化反应原理建立的传感器及试剂盒可以在谷氨酸的生产中对谷氨酸的生产发酵进行实时监测<sup>[3]</sup>,在临床上可以对血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶和  $\gamma$ -谷氨酰基转移酶进行活性检测,

从而可以诊断身体组织如心脏和肝脏的健康状况<sup>[4]</sup>。根据 Gox 能将 L-谷氨酸氧化脱氨基作用生成  $\alpha$ -酮戊二酸的原理, Niu 等<sup>[5]</sup>对酶法生产  $\alpha$ -酮戊二酸进行了研究,从而给  $\alpha$ -酮戊二酸的生产提供了一个绿色生产工艺。由于 Gox 是一种应用比较广泛的工具酶,因而从它的发现至今,仍然是一种研究比较热门的工具酶之一。

Gox 已在毒蛇、动植物组织和微生物等<sup>[2, 6-9]</sup>中发现,微生物中主要来源于链霉菌属。而对来源于普特拉链霉菌 *Streptomyces platensis* NTU3304 胞外产生的 Gox 研究发现,它具有较高的比酶活和较强底物专一性等优于其他 Gox 的酶学特性<sup>[10]</sup>。

酶的固定化技术在工业生产中具有诱人的

前景,它易于从反应系统中分离,易于控制,并能反复利用,便于自动化生产<sup>[11]</sup>。而纤维素是分布最广、含量最多的多糖,是比较廉价的材料,可以作为实用的固定化酶的载体。在研究纤维素酶降解纤维素时,发现纤维素酶由两个结构域组成,即纤维素结合域(CBD)和纤维素催化域,两者之间通过 Linker (PT) 连在一起构成了纤维素酶,而 Linker 的存在能够更易于水解纤维素<sup>[12-13]</sup>。进一步研究发现,CBD 能够牢固地锚定纤维素底物,从而使酶能够更好地酶解底物。根据氨基酸序列、结合特异性和结构,将 CBD 分为 14 个家族,大部分属于 I、II、III 家族;CBD 包含有 30-180 个氨基酸,在一个蛋白中可能存在 1 个、2 个或者 3 个结合域<sup>[13]</sup>。来源于粪碱纤维单细胞 *Cellulomonas fimi* 的 CBDcex 属于 II a 家族,由  $\beta$ -筒状构成基本骨架<sup>[14]</sup>。已有一些酶与 CBD 融合表达,并对其酶学特性进行了研究及分析<sup>[15-19]</sup>。由于 CBD 能结合在纤维素载体上,它不仅可以作为亲和标签来纯化蛋白<sup>[20-21]</sup>,而且也用于酶的固定化研究<sup>[22]</sup>,通过加入 Linker 和酶切位点融合表达目的蛋白,从而节约了蛋白纯化的成本。

目前对 Gox 的固定化研究主要采用化学交联的方法,如通过戊二醛交联法<sup>[23-24]</sup>将谷氨酸氧化酶固定化,形成酶膜,然后置于安培电极上进行 L-谷氨酸的检测。但目前还没有将 Gox 与 CBD 重组表达的方式进行固定化的报道。

本论文主要是通过基因工程的方法将来源于 *Streptomyces platensis* NTU3304 的 Gox (GenBank Accession No. AF239797.1) 的基因<sup>[2]</sup>成功地在大肠杆菌内表达;并将该基因与来源于革兰氏阳性菌 *Cellulomonas fimi* 中纤维素结合蛋白域<sup>[25]</sup> (CBDcex) 融合表达,融合蛋白为

Gox-CBD,然后通过对融合蛋白进行一步纯化、酶学特性测定以及融合蛋白结合微晶纤维素(MCC)的酶学测定,并对融合蛋白结合 MCC 的稳定性进行了研究和探讨,以期对固定化 L-谷氨酸氧化酶在工业生产应用中提供理论依据和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 pETM10-CBDcex 和 pET-24a(+)由本实验室保存。菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  购自北京全式金生物技术有限公司。LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物(均购自 OXOID) 5 g/L,NaCl 10 g/L)用于 *Escherichia coli* 的培养。抗生素和诱导剂的储存浓度:硫酸卡那霉素 50 mg/mL,异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为 1 mol/L。4-氨基安替比林和 20 种氨基酸购自 Sigma。苯酚购自上海泰坦科技有限公司。过氧化氢标准液购自 Alfa Aesar 公司。辣根过氧化物酶购自南京建成生物工程研究所。

Trans2K Plus DNA Marker 和 T4 DNA ligase 购自北京全式金生物技术有限公司。限制性内切酶和蛋白 Marker 均购自 Thermo Scientific 公司。琼脂糖购于天根生化科技(北京)有限公司。高纯度质粒小提试剂盒购买自 Axgen 公司。PCR 高纯度片段回收试剂盒购买自 Omega 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪生物技术有限公司。HisTrap<sup>TM</sup> FF 购自 GE 公司。PCR 扩增引物合成和 DNA 测序由金唯智生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达质粒 pET-24a(+)-Gox 和 pETM10-Gox-CBD 的构建

为了便于 Gox 的异源表达及其后期纯化,根

据大肠杆菌密码子偏好性,将 Gox 的碱基序列进行优化,由上海捷瑞生物技术有限公司进行全基因合成。通过 *Nde* I/*Xho* I 酶切位点构建在 pET-24a(+) 上,并命名为 pET-24a(+)-Gox。

以 pET-24a(+)-Gox 为模板,使用 PCR 扩增引物(表 1)扩增 Gox 基因片段。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 20 s,63 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳,检测目的条带。检测到目的条带以后,使用 cycle-pure 核酸一步纯化试剂盒将目的基因片段回收,得到完整的 *gox* 基因片段。用 *Nco* I 和 *Hind* III 核酸内切酶对目的基因片段和载体 pETM10-CBDcex 进行酶切,37 °C 酶切 1 h。使用 cycle-pure 核酸一步回收试剂盒回收目的基因片段,载体使用胶回收试剂盒回收。将片段和载体使用 T4 DNA 连接酶连接,然后转化 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 对得到的克隆进行菌落 PCR 验证,将阳性克隆进行 DNA 序列测定,确定构建正确的序列,并命名为 pETM10-Gox-CBD。

表 1 PCR 引物的设计

Table 1 Design of PCR primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer A	CATGCCATGGCTGCGGCCAAGACGT GTCAG
Primer B	CCCAAGCTTGCCTGCACCAGCGCTG GTAACAACGTCCTC

Note: the underlined bases represent *Nco* I and *Hind* III cutting site respectively.

### 1.2.2 重组蛋白 Gox 与 Gox-CBD 的表达与纯化

将 pET-24a(+)-Gox 与 pETM10-Gox-CBD 表达质粒转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中,对目的蛋白的表达情况进行研究。异源蛋白可溶性表达是由多因素决定的,它与基因序列、

载体、蛋白结构、宿主及培养条件等密切相关<sup>[26]</sup>,为了提高目的蛋白的可溶性,重组蛋白 Gox 和 Gox-CBD 的表达分别采用 16 °C, IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 培养 12 h 和 16 °C, IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 培养 12 h 的条件进行诱导表达。

根据蛋白表达条件进行菌体的培养,然后用缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl) 悬浮充分,加入终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 (PMSF),高压匀浆破碎仪破碎 3 遍,低温离心 (4 °C、15 000 r/min 离心 1 h),收集上清,然后用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤除杂质。采用 HisTrap<sup>TM</sup> FF 亲和层析柱纯化蛋白,用缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑) 梯度洗脱,根据峰图收集有活性洗脱液,并进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.2.3 结合量测定及蛋白定量

称取 1.0 g 微晶纤维素 (MCC) 于 15 mL 离心管中,先用去离子水洗 2 遍 (5 000 r/min 离心 5 min),然后使用缓冲液 C (20 mmol/L KPB, 100 mmol/L NaCl, pH 7.4) 平衡 MCC,离心并倒去上清液。将 10 mL 纯化的蛋白 (蛋白浓度为 1.435 mg/mL) 与 MCC 于 4 °C 孵育 4 h,期间取样 (10、20、25、30、60、90、120 和 240 min) 测定结合量。结合完成后,4 °C 离心,倒去并保留上清液,然后使用含有 1 mol/L NaCl 的缓冲液 D (20 mmol/L KPB, 1 mol/L NaCl, pH 7.4) 对非特异结合蛋白进行洗脱。将各部分收集,测定蛋白浓度。蛋白结合量即为结合前的蛋白总量减去离心上清液与洗脱上清液的蛋白总和。结合蛋白使用 10% 的 SDS-PAGE 分析检测。

蛋白定量方法:蛋白测定法采用 Bradford 法测定。

### 1.2.4 酶活测定

通过 4-氨基安替吡啉苯酚法来测定过氧化氢的增加量<sup>[8]</sup>。将 1 mL 的反应液在 30 °C 反应 10 min, 测定其在 505 nm 下每分钟吸光值的增加量。Gox 一个酶活单位的定义为: 30 °C 下每分钟释放 1 μmol 过氧化氢所需的酶量。1 mL 的反应液体系包括 10 U/mL 的过氧化物酶、25 mmol/L 的 L-谷氨酸、2 mmol/L 的 4-氨基安替吡啉、10 mmol/L 的苯酚和适量的酶于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中。

### 1.2.5 重组酶 Gox 和 Gox-CBD 的酶活性质

分别对异源表达的 Gox、游离的 Gox-CBD 和固定到 MCC 的 Gox-CBD 进行酶活性检测。通过对温度、热稳定性、pH、金属离子的影响和底物特异性来对重组表达的 GOX、Gox-CBD 和固定在微晶纤维素上的 Gox-CBD 进行检测(以下实验每组平行测定多次)。

**最适反应温度:**按照酶活测定方法,将等量的纯酶分别于 20–80 °C 的条件下测定酶活,以所测的不同反应温度下的最高酶活为 100%,研究不同温度对酶的影响。

**热稳定性测定:**按照酶活测定方法,将等量的酶置于 20–80 °C 条件下,在不同温度下孵育 30 min,然后测定剩余酶的酶活,以最高酶活为 100%,研究其热稳定性。

**最适反应 pH:**按照酶活测定方法,将纯化的酶置于 pH 4.5–8.5 (pH 4.5–5.5 为 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液; pH 6.0–8.0 为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液; pH 8.0–9.0 为含有 0.1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl) 范围内,在最适反应温度下测定酶活,以所测的最高酶活为 100%,研究不同 pH 下对其活性的影响。

**金属离子的影响:**按照酶活测定方法,在

反应液中加入不同的金属离子,以对照组不含金属离子为 100%,研究金属离子对其的影响。

**底物特异性:**按照酶活测定方法,将以 L-谷氨酸为底物的换成其他的氨基酸,测定不同底物对其的影响,以 L-谷氨酸为底物测定的酶活为 100%。

**操作稳定性:**按照酶活测定方法,将固定化酶置于反应液中,然后离心倒去反应液,将固定化酶用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 多次离心洗涤固定化酶,洗去表面残留的未反应的底物和反应后的产物,然后,重新转入底物溶液中测定残留酶活力,如此反复操作,以初始酶活为 100%,考察随着使用次数的增加,固定化酶的酶活力保留情况。

### 1.2.6 结合稳定性测定

将固定化的 Gox 进行结合稳定性研究,纤维素结合域有可能会被双蒸水、低盐 (<5 mmol/L) 或 pH>9 的缓冲液等洗脱掉<sup>[27]</sup>,为了使纤维素结合域能够牢固地结合在纤维素,通过测定这些条件对结合蛋白的影响,并确定 Gox 结合到 MCC 上稳定性的参数,以便为以后的应用提供参考。

**低盐的影响:**配制 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.4),然后进行洗脱,再对洗脱液进行 SDS-PAGE、蛋白定量以及酶活测定,测定使用该缓冲液对结合蛋白的影响。

**低盐耐受度检测:**配制含有 1 mol/L NaCl 的去离子水,然后对结合蛋白进行梯度 (NaCl 梯度为 1 mol/L、0.5 mol/L、0.2 mol/L、0.1 mol/L、90 mmol/L、50 mmol/L、30 mmol/L、20 mmol/L、15 mmol/L、10 mmol/L、5 mmol/L、0 mmol/L) 洗脱,每个梯度以 10 倍体积 (CV) 进行洗脱,对蛋白洗脱液进行蛋白浓度测定。

pH 对结合量的影响：在缓冲液缓冲范围内，配制 pH 4.5–12 (pH 4.5–5.5 为 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液；pH 6.0–8.0 为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液；pH 8.0–9.0 为含有 0.1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl；pH 9.0–10.0 为 0.1 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液；pH 11.0 为 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液；pH 12.0 为 0.1 mol/L 的氯化钾-氢氧化钠缓冲液) 的缓冲液，对结合蛋白进行洗脱检测。

### 1.2.7 $K_m$ 值的测定

在标准酶活测定方法的条件下，测定底物 L-谷氨酸的浓度在 3–15 mmol/L 下的反应速度，按照 Lineweaver-Burk 双倒数法，分别对重组 Gox、游离 Gox-CBD 和固定化的 Gox-CBD 的  $K_m$  和比活力进行测定。

### 1.2.8 一步纯化融合蛋白 Gox-CBD

按照 1.2.2 操作，将菌体经破碎离心上清液与 MCC 4 °C 孵育 4 h，结合完成后，将结合液通过重力柱，然后使用含有 1 mol/L NaCl 的缓冲液 D (20 mmol/L KPB, 1 mol/L NaCl, pH 7.4) 对非特异结合蛋白进行洗脱。各部分取样用 10% 的 SDS-PAGE 分析检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建

通过序列检索与分析，密码子优化 Gox 基因，以全基因合成的 pET-24a(+)-Gox 为模板，PCR 扩增 *gox* 的基因片段，然后通过 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切及 T4 DNA 连接酶的连接，将 *gox* 连接在已构建完成的 pETM10-CBDcex 载体上，最终完成表达载体 pETM10-Gox-CBD 的构建。Gox 通过 Linker 连接到 CBD 的 N 端，Linker 的加入确保融合蛋白保持自身的生物活性<sup>[28]</sup>。结

果显示，扩增的片段大小约 2 000 bp (图 1)，与目标基因带大小一致。然后，对转化质粒提取单菌落，进行菌落 PCR 验证，将与目的条带大小一致的送交测序，并将测序结果通过 DNAMAN 序列比对，测序正确的确定为阳性克隆。

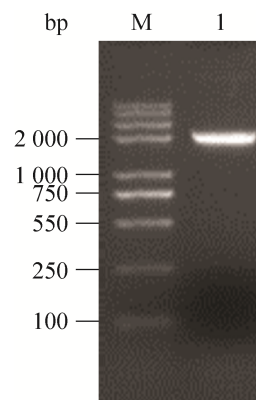


图 1 *gox* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The amplification of *gox* gene by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of *gox* gene.

### 2.2 融合蛋白 Gox-CBDcex 的表达

根据 1.2.2 的实验条件，将表达载体 pET-24a(+)-Gox 与 pETM10-Gox-CBD 转化到 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中，16 °C 培养 12 h，10% 的 SDS-PAGE 检验，融合蛋白分子量大小分别约为 78 kDa (图 2) 和 88 kDa (图 3)，与理论分子量一致。

来源于 *Streptomyces platensis* NTU3304 的 Gox 是由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三个亚基构成的，分子量约为 74 kDa<sup>[2]</sup>。经蛋白序列比对发现，它与链霉菌 X-119-6 (*Streptomyces* sp. X-119-6) 的蛋白序列约有 84% 的序列一致性，并且都有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基结构。Arima 等<sup>[8]</sup>在大肠杆菌重组表达实验中发现，当采用灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 的金属内肽酶进行消化处理，不仅催化活性提高了，而且恢复了同源二聚体的结构，其酶活

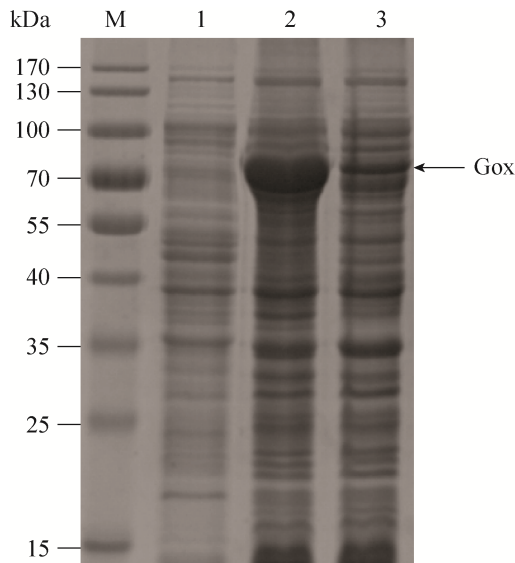


图2 诱导表达重组蛋白 Gox 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The recombinant protein Gox was induced, expressed and analysed on SDS-PAGE. M: molecular weight marker; 1: the cell extract before IPTG induction as control; 2: the whole bacteria extract after IPTG induction; 3: the soluble fraction after IPTG induction.

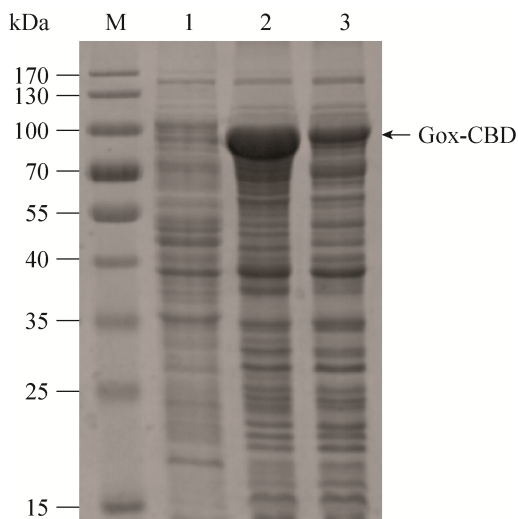


图3 诱导表达重组蛋白 Gox-CBD 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 The recombinant protein Gox-CBD was induced, expressed and analysed on SDS-PAGE. M: molecular weight marker; 1: the cell extract before induction as a control; 2: the whole bacteria extract after IPTG induction; 3: the soluble fraction after IPTG induction.

特性几乎接近于野生菌株产生的 Gox。本研究通过大肠杆菌来表达重组 Gox 蛋白, 蛋白分子量约为 78 kDa, 而成熟蛋白的分子量约为 74 kDa, 这是由于蛋白的翻译后修饰的作用。而在固定化研究中, 融合表达蛋白 Gox-CBD 是以前体蛋白的形式存在的, 本论文是对固定化到纤维素载体的融合蛋白的初步探索以及可行性进行研究。

### 2.3 融合蛋白 Gox-CBD 的纯化

将重组表达载体 pET-24a(+)-Gox 和 pETM10-Gox-CBD 分别转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中。挑取单菌落培养在含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养作为一级种子液, 然后, 按 1 : 100 的比例转接至 2 L 的摇瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至菌体浓度 ( $OD_{600}$ ) 约为 0.6 时, 开始诱导表达, 诱导表达条件参照 2.2。

离心收获细菌 (4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 000 r/min, 30 min), 然后加入含有终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 的裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl) 悬浮菌泥。使用高压破碎仪破碎菌液 3 遍, 将细胞破碎液通过高速离心 (4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 离心 1 h) 收集上清液。将上清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤除杂, 使用 Ni-NTA 亲和层析纯化。操作过程中各步骤分别取样将通过 10% 的 SDS-PAGE 进行分析检测, 约在 78 kDa 和 88 kDa 处分别得到了纯化蛋白 Gox 和 Gox-CBD (图 4)。

### 2.4 纤维素结合融合蛋白的测定

融合蛋白具有 CBD 标签, 而来源于 *Cellulomonas fimi* 的 CBDcex 标签具有很强的结合纤维素能力<sup>[29-30]</sup>, 通过将过量融合蛋白 Gox-CBD 与 MCC 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下不同时间段取样, 可

以确定 Gox-CBD 的结合量, 非特异结合的蛋白将通过加入含有 1 mol/L NaCl 的缓冲液 D 除去。通过在不同时间段对蛋白进行取样检测, 确定其吸附结合到 MCC 上的蛋白结合量。结果表明, 融合蛋白结合到 MCC 的量约为 9.0 mg/g (图 5)。

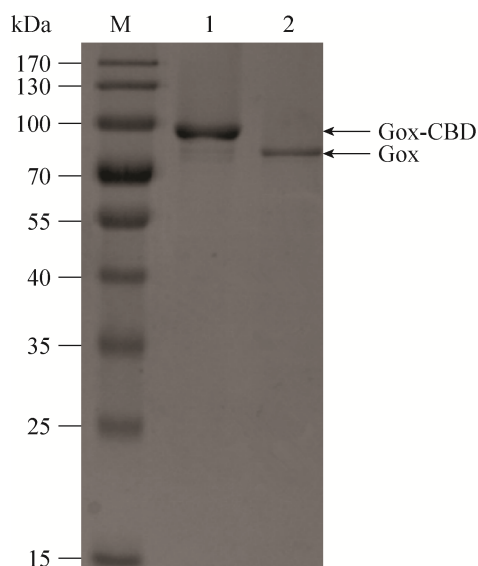


图 4 SDS-PAGE 分析: Ni-NTA 柱亲和和纯化重组蛋白 Gox-CBD 和 Gox

Fig. 4 SDS-PAGE analysis: the recombinant protein Gox-CBD and Gox were purified via Ni-NTA affinity chromatography. M: molecular weight marker; 1: purified protein Gox-CBD; 2: purified protein Gox.

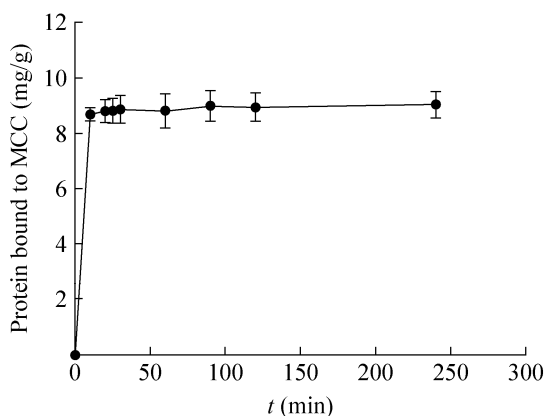


图 5 Gox-CBD 结合微晶纤维素 (MCC) 的结合量  
Fig. 5 The capacity of Gox-CBD binding to MCC.

## 2.5 Gox 与 Gox-CBD 的酶学特性测定

### 2.5.1 不同 pH 对酶活性的影响

使用不同 pH 的缓冲液 (pH 4.5–5.5 为 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液; pH 6.0–8.0 为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液; pH 8.0–9.0 为含有 0.1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl) 对重组表达的 Gox、游离和固定化到 MCC 上的 Gox-CBD 的酶活进行测定, 按照酶学测定方法进行操作。实验结果表明, 在 pH 约 6.5 时, 酶活达到最大, 为该酶的最适反应 pH; 当随着 pH 的升高时, 酶活不断下降 (图 6)。

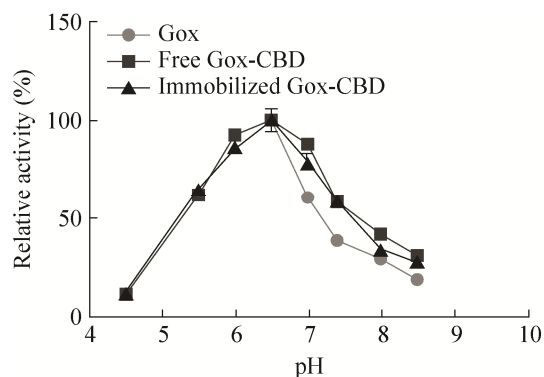


图 6 pH 值对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on enzymes activity.

### 2.5.2 最适反应温度和热稳定性

本实验对重组表达的 Gox、游离和固定化到 MCC 上的 Gox-CBD 的最适反应温度进行了测定, 测定方法按照标准酶活测定方法操作。结果表明, 在温度为 20–40 °C 时, 随着温度的升高, 酶活也在逐步升高; 当到达 40 °C 时, 酶活达到最大值, 随着温度的升高, 不同重组 Gox、游离 Gox-CBD 和固定化 Gox-CBD 的酶活逐渐降低 (图 7)。

同时, 将重组 Gox、游离和固定化 Gox-CBD 置于 20–80 °C 条件下 30 min, 待温度降至室温后进行酶活检测, 以测定其热稳定性。结果显示, 融合表达的游离和固定化的 Gox 的热稳定性有



一定提高,而固定化 Gox-CBD 比游离 Gox-CBD 具有更高的热稳定性;特别是在 60 °C 时,重组表达的 Gox 几乎失去了活性,而固定化的 Gox 酶活保存有 70%左右的活性(图 8)。

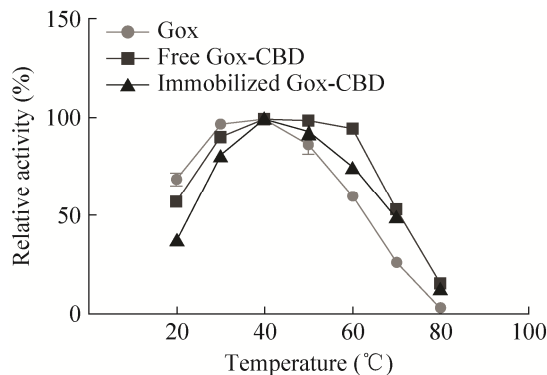


图 7 温度对酶的活性影响  
Fig. 7 Effect of temperature on the enzymes activity.

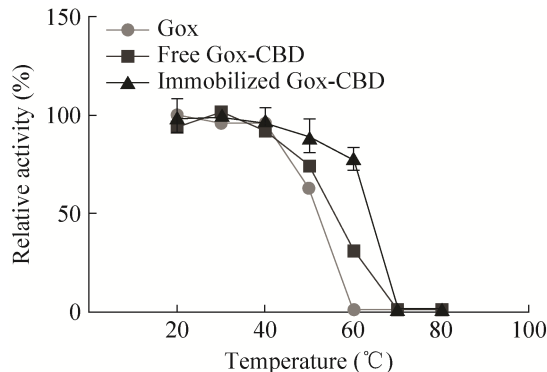


图 8 酶的热稳定性  
Fig. 8 Thermal stability of the enzymes.

### 2.5.3 金属盐对酶活性的影响

在酶的反应液中加入终浓度为 1 mmol/L 的金属盐溶液,测定金属盐离子对酶活性的影响,采用标准酶活测定方法进行酶活测定,以未加入金属盐溶液的反应为对照,并记作 100%。结果显示, HgCl<sub>2</sub> 和 CuCl<sub>2</sub> 对重组 Gox、游离 Gox-CBD 和固定化 Gox-CBD 的酶活具有明显的抑制作用(图 9)。

### 2.5.4 酶的底物特异性

由表 2 可知, Gox 除对 L-谷氨酸起作用外,

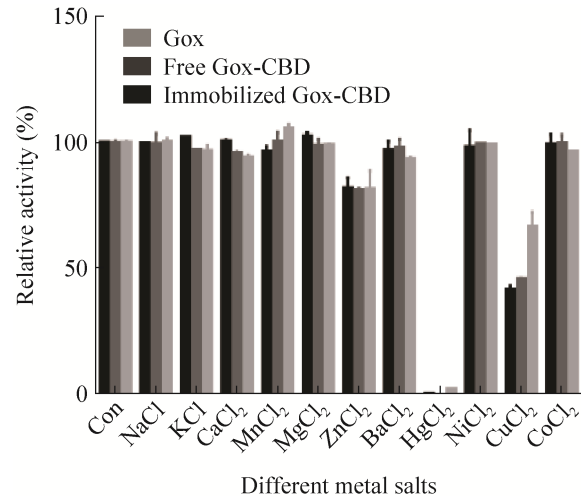


图 9 不同金属离子对酶活性的影响  
Fig. 9 Effect of different metal ions of enzyme activity.

表 2 Gox 底物特异性分析

Table 2 The substrates specificity of Gox

Amino acids	Recombinant Gox (relative activity, %)	Free Gox-CBD (relative activity, %)	Immobilize d Gox-CBD (relative activity, %)
L-Glutamic acid	100	100	100
L-Glutamine	0.70	1.73	1.11
L-Aspartic acid	0	0	0
L-Asparagine	0	0	0
Glycine	0	0	0
L-Alanine	0	0	0
L-valine	0	0	0
L-Leucine	0	0	0
L-Isoleucine	0	0	0
L-Methionine	0	0	0
L-Serine	0	0	0
L-Threonine	0	0	0
L- Cysteine	0	0	0
L-Proline	0	0	0
L-Phenylalanine	0	0	0
L-Tyrosine	0	0	0
L-Tryptophan	0	0	0
L-Lysine	0	0	0
L- Arginine	0	0	0
L- Histidine	0	0	0

还对 L-谷氨酰胺有微弱的活性,对其他的氨基酸则没有反应。而来源于 *Streptomyces platensis* NTU3304 胞外产生 Gox, 具有优于其他 L-谷氨酸氧化酶更好的性能<sup>[10]</sup>。针对重组表达的 L-谷氨酸氧化酶,很有可能是因为产生前体蛋白,而没有经过翻译后修饰,以及蛋白的空间结构发生了微弱的变化引起的,从而影响底物特异性。

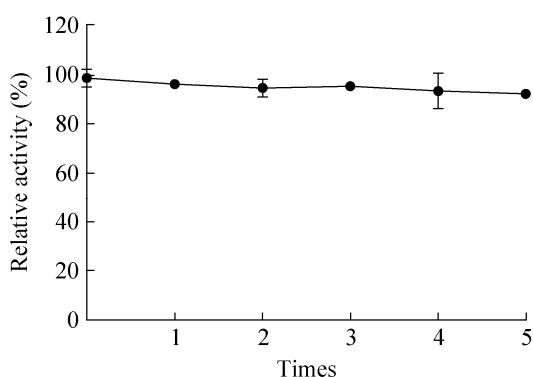


图 10 固定化 Gox-CBD 的操作稳定性

Fig. 10 Operational stability of immobilized Gox-CBD.

### 2.5.5 操作稳定性研究

在实际应用中酶的重复使用效率是评价固定化酶的重要指标之一<sup>[31]</sup>,尤其是在工业应用中。从图 10 中可以看出,经 5 次重复性操作后,固定化酶的酶活依然可以保存有较高的活性,从验证结果中可以说明固定化酶 Gox-CBD 具有较好的操作稳定性。

### 2.6 固定化酶 Gox-CBD 结合稳定性研究

纤维素结合蛋白能牢固地结合在微晶纤维素上,但由于在不同操作条件下对结合到 MCC 上的 Gox 结合稳定性产生影响<sup>[27]</sup>。因此,本实验研究了不同操作条件对固定化 Gox-CBD 与 MCC 的结合稳定进行了研究。试验结果显示(图 11),使用在 Tris-HCl (pH 7.4) 的条件下, Gox-CBD 与 MCC 结合稳定性较高,即使洗脱

40 CV, 固定化酶的结合量也没有发生变化。对于盐耐受程度,使用 1 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱,实验结果表明,通过梯度洗脱的过程中没有检测到结合蛋白从纤维素载体上洗脱下来,直到 NaCl 浓度降到 5 mmol/L 时,开始检测到了有 Gox-CBD 洗脱下来(图 12),很有可能由于氢键或者疏水作用的原因<sup>[15]</sup>,但洗脱过程中融合蛋白洗脱下来是一个很缓慢的过程,当最后使用 200 CV 去离子水继续洗时,发现还是有残留蛋白结合在纤维素载体上。从图 13 中可以看出 pH 对结合蛋白的影响,在 pH 为 4-10 时, Gox-CBD 与 MCC 结合稳定,但当 pH 10 时,

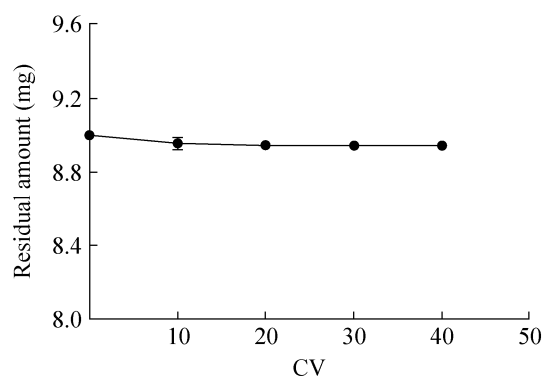


图 11 低盐 (50 mmol/L Tris-HCl) 对结合蛋白的影响

Fig. 11 Effect of low salt (50 mmol/L Tris-HCl) on the protein binding capacity.

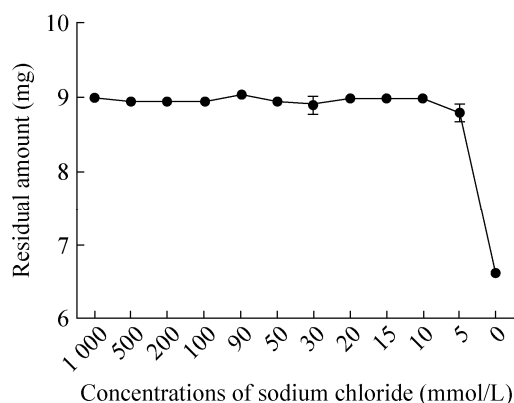


图 12 结合蛋白的盐耐受性

Fig. 12 The salt tolerance of binding protein.

开始有蛋白从纤维素载体上洗脱下来,但由于在 pH 10 时, L-谷氨酸氧化酶几乎已失去活性,因此,只要保证在 Gox 活性范围内则可保证牢固结合到微晶纤维素上。

## 2.7 $K_m$ 值的测定

$K_m$  是酶对底物亲和力程度的重要特征性常数,  $K_m$  越大表示酶与底物亲和力越弱,  $K_m$  越小表示酶与底物的亲和力越强。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,通过酶活测定结果分别计算  $1/V$  和  $1/[S]$ , 计算得到 Gox、游离 Gox-CBD 和固定化 Gox-CBD 的  $K_m$  (表 3)。结果表明,固定化和游离的 Gox-CBD 的  $K_m$  值高于重组表达的 Gox, 融合表达重组酶对底物的亲和力低于重组 Gox, 固定化后比酶活略有降低。这很有可能是由于在固定化的过程中只有 CBD 参与完成的定向固定化<sup>[32]</sup>, 对酶的结构影响不是太大。

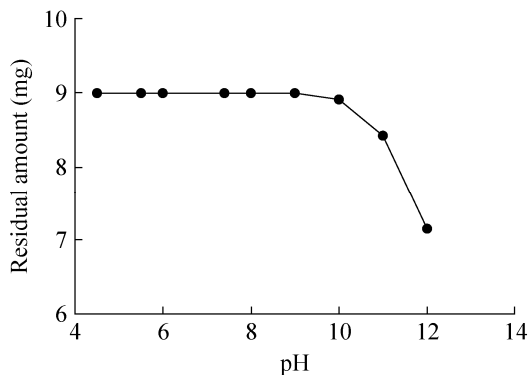


图 13 不同 pH 对结合蛋白的影响

Fig. 13 Effect of different pH of protein binding capacity.

表 3 酶常数的测定

Table 3 Determination of enzyme constant

Enzyme	$K_m$ (mmol/L)	Specific activity (U/mg)
Recombinant Gox	4.6	10.2
Free Gox-CBD	10.5	10.0
Immobilized Gox-CBD	10.0	9.0

## 2.8 一步纯化融合蛋白 Gox-CBD

融合蛋白 Gox-CBD 的一步纯化操作:将上述操作的蛋白直接与 MCC 结合,并对蛋白结合过程中各部分取样进行 SDS-PAGE 检测 (图 14)。从图中可以看出,通过一步纯化可以得到纯度比较高的蛋白,因此在后期应用中可以通过简单破碎处理,然后将破碎液与 MCC 进行孵育结合,从而实现目的蛋白的快速高效的纯化,节约时间,并将蛋白纯化成本降到最低。

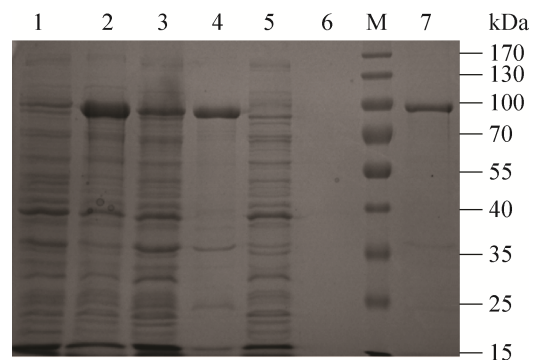


图 14 SDS-PAGE 分析 Gox-CBD 的一步纯化固定到 MCC 上

Fig. 14 SDS-PAGE analysis of one step purification of Gox-CBD bound to MCC. M: molecular weight marker; 1: control; 2: whole bacteria; 3: soluble fraction of whole cell lysate; 4: insoluble fraction of whole cell lysate; 5: flow through; 6: washing fraction; 7: bound to MCC.

## 3 结论

本文通过构建 CBD 与 Gox 的重组质粒,然后转化到 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中,并成功进行了融合蛋白 Gox-CBD 的重组表达。优化表达条件为诱导物 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L 条件下, 16 °C 诱导表达过夜。通过对重组表达的 Gox、游离 Gox-CBD 和固定到微晶纤维素上的 Gox-CBD 进行相关酶学性质的分析。纯化的融合蛋白 (Gox-CBD), 在 4 °C 条件下, 固定 1 h

左右几乎可以结合饱和,达到 9.0 mg/g;该重组酶 Gox、游离酶 Gox-CBD 和固定化酶 Gox-CBD 的最适反应 pH、最适温度明显变化;固定化酶 Gox-CBD 相对于重组蛋白 Gox 的比酶活略有降低,但在热稳定性上固定化酶比游离酶提高了很多,在 60 °C 放置 30 min 还保留有 75% 的活性,而游离酶则完全丧失了活性。并可以通过一步纯化的方法将融合蛋白 Gox-CBD 固定到微晶纤维素上,得到比较纯的蛋白,该方法具有操作方法简便、经济实惠、节约成本、蛋白结合量高等特点。

而目前的固定化研究中主要以戊二醛为交联剂的化学法。戊二醛是一种双功能偶联剂,它对酶来说是一种变性剂,在固定化的过程中是由戊二醛的醛基与蛋白氨基的相互作用,这样容易造成目的蛋白活性位点的空间结构发生变化,并且还很有可能由于醛基与氨基的错综交互,酶分子的活性中心受到醛基的束缚,活性中心受到破坏,产生空间位阻,极大地降低了酶蛋白的活性及改变酶的底物特异性,甚至导致酶分子失活<sup>[33]</sup>。而与重组表达的 Gox 相比,融合蛋白 Gox-CBD 固定到 MCC 的研究中,其还保留有较高的酶活活性。

通过对固定化 Gox 的物化特性进行分析,对于以后的应用是必不可少的。本文根据纤维素结合蛋白的特性,以廉价的纤维素为载体研究酶的固定化,为以后以纤维素为载体固定化 L-谷氨酸氧化酶提供了研究基础,如:1) 可以通过亲和吸附的方法将酶固定到纤维素载体上制作成酶膜,用于传感器,对工业发酵 L-谷氨酸产品进行监测分析及在临床医学上的应用等;2) 利用固定化 Gox 也可以对  $\alpha$ -酮戊二酸酶催化的方法进行生产,便于后期产物的分离纯化,实现

生态友好型生产  $\alpha$ -酮戊二酸。通过本文的研究,为固定化酶的研究及应用提供了新策略。

## REFERENCES

- [1] Bi CY, Li L, Li JL. Research progress on L-glutamate oxidase. Chin Bull Life Sci, 2012, 24(2): 169-173 (in Chinese).  
毕春元, 李玲, 李敬龙. L-谷氨酸氧化酶的研究进展. 生命科学, 2012, 24(2): 169-173.
- [2] Chen CY, Wu WT, Huang CJ, et al. A common precursor for the three subunits of L-glutamate oxidase encoded by *gox* gene from *Streptomyces platensis* NTU3304. Can J Microbiol, 2001, 47(3): 269-275.
- [3] Basu AK, Chattopadhyay P, Roychudhuri U, et al. Development of biosensor based on immobilized L-glutamate oxidase for determination of monosodium glutamate in food. Ind J Exp Biol, 2006, 44(5): 392-398.
- [4] Huang XJ, Choi YK, Im HS, et al. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. Sensors, 2006, 6(7): 756-782.
- [5] Niu PQ, Dong XX, Wang YC, et al. Enzymatic production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid from L-glutamic acid via L-glutamate oxidase. J Biotechnol, 2014, 179: 56-62.
- [6] Sukhacheva MV, Netrusov AI. Extracellular L-glutamate oxidase of *Streptomyces* sp. Z-11-6: obtainment and properties. Microbiology, 2000, 69(1): 17-20.
- [7] Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon, 2002, 40(6): 659-665.
- [8] Arima J, Tamura T, Kusakabe H, et al. Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. J Biochem, 2003, 134(6): 805-812.
- [9] Wachiratianchai S, Bhumiratana A, Udomsopagit S. Isolation, purification, and characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. 18G. Electr J Biotechnol, 2004, 7(3): 9-10.

- [10] Chen CY, Su YC. Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 3304. *Anal Chim Acta*, 1991, 243: 9–15.
- [11] Xu L, Hou HP. Research progress in immobilization of enzyme. *Liquor-Mak Sci Technol*, 2010, (1): 86–89, 94 (in Chinese).  
徐莉, 侯红萍. 酶的固定化方法的研究进展. *酿酒科技*, 2010, (1): 86–89, 94.
- [12] Black GW, Rixon JE, Clarke JH, et al. Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *J Biotechnol*, 1997, 57(1/3): 59–69.
- [13] Levy I, Shoseyov O. Cellulose-binding domains: biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 2002, 20(3/4): 191–213.
- [14] Nagy T, Simpson P, Williamson MP, et al. All three surface tryptophans in type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Lett*, 1998, 429(3): 312–316.
- [15] Ong E, Gilkes NR, Miller RC, et al. Enzyme immobilization using a cellulose-binding domain: properties of a  $\beta$ -glucosidase fusion protein. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13(1): 59–65.
- [16] Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, et al. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Prot Expr Purific*, 2001, 21(3): 386–392.
- [17] Santiago-Hernández J, Vásquez-Bahena J, Calixto-Romo M, et al. Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBD<sub>Cex</sub> from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 40(1): 172–176.
- [18] De Los Ángeles Calixto-Romo M, Santiago-Hernández JA, Vallejo-Becerra V, et al. Expression, purification and immobilization of the intracellular invertase INVA, from *Zymomonas mobilis* on crystalline cellulose and Nylon-6. *J Industr Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(11): 1455–1463.
- [19] Wang JJ, Zhu JG, Min C, et al. CBD binding domain fused  $\gamma$ -lactamase from *Sulfolobus solfataricus* is an efficient catalyst for (-)  $\gamma$ -lactam production. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 40.
- [20] Wan W, Wang DM, Gao XL, et al. Expression of family 3 cellulose-binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(3): 789–798.
- [21] Hong J, Wang YR, Ye XH, et al. Simple protein purification through affinity adsorption on regenerated amorphous cellulose followed by intein self-cleavage. *J Chromatogr A*, 2008, 1194(2): 150–154.
- [22] Li M, Yang J, Qu H, et al. Novel immobilization of arginase I via cellulose-binding domain and its application in producing of L-ornithine. *Appl Biochem Microbiol*, 2014, 50(1): 43–48.
- [23] Matsumoto K, Sakoda K, Osajima Y. Determination of L-glutamate by amperometric flow-injection analysis using immobilized glutamate oxidase: manifold for simultaneous detection of component signal and blank signal. *Anal Chim Acta*, 1992, 261(1/2): 155–159.
- [24] Burmeister JJ, Gerhardt GA. Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Anal Chem*, 2001, 73(5): 1037–1042.
- [25] Ong E, Greenwood JM, Gilkes NR, et al. The cellulose-binding domains of cellulases: tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 1989, 7(9): 239–243.
- [26] Schein CH, Noteborn MHM. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat Biotechnol*, 1988, 6(3): 291–294.
- [27] Novy R, Yaeger K, Miller S. New pET expression

- vectors generate fusion proteins with cellulose binding domains. *Novag Innovat Newsl*, 1997, 7: 4–7.
- [28] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357–1369.
- [29] Ong E, Gilkes NR, Miller RC, et al. The cellulose - binding domain (CBD<sub>Cex</sub>) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi*: production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 42(4): 401–409.
- [30] Bray MR, Gilkes NR, Kilburn DG, et al. Probing the role of tryptophan residues in a cellulose-binding domain by chemical modification. *Prot Sci*, 1996, 5(11): 2311–2318.
- [31] Bai YX, Li YF, Wang MT. Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(4): 540–547.
- [32] Cao LM, Chen HL. The methods of oriented immobilized enzymes and the activities of enzymes affected by oriented immobilization. *J Chin Biotechnol*, 2003, 23(1): 22–29 (in Chinese).  
曹黎明, 陈欢林. 酶的定向固定化方法及其对酶生物活性的影响. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(1): 22–29.
- [33] Li Y. Enzymes immobilization and their application. *J Mol Catal*, 2008, 22(1): 86–89.  
李晔. 酶的固定化及其应用. *分子催化*, 2008, 22(1): 86–89.

(本文责编 郝丽芳)