微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

May 20, 2014, 41(5): 832−838
© 2014 by Institute of Microbiology, CAS
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.130773

研究报告

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

石淑钰　张庆芳　迟乃玉　王贵鹏　窦少华*

(大连大学 生命科学与技术学院 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心　辽宁 大连　116622)

摘　要：【目的】从海洋样品中分离筛选出产葡萄糖氧化酶菌株。【方法】采用双层平板筛选法进行初筛、复筛确定一株酶活较好的菌株，命名为 GOD2 (Glucose oxidase)。通过形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析研究其分类地位，并对其产生的葡萄糖氧化酶进行分离纯化和部分酶学性质的研究。【结果】细菌 GOD2 为产葡萄糖氧化酶菌株且遗传稳定，初步鉴定该菌株为假单胞杆菌(*Pseudomonas migulae*)，其所产酶最适反应温度为 20 °C，热稳定性较差，40 °C 剩余相对酶活 80%；超过 40 °C 酶活力迅速下降。【结论】GOD2 是一株极具研究价值的产低温葡萄糖氧化酶菌株。目前没有关于利用该菌生产葡萄糖氧化酶的报道。

关键词：海洋，低温，葡萄糖氧化酶，假单胞杆菌

A strain of marine low-temperature glucose oxidase screening, identification and the preliminary research of part enzymology properties

SHI Shu-Yu　ZHANG Qing-Fang　CHI Nai-Yu　WANG Gui-Peng　DOU Shao-Hua*

(*Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center*, *College of Life Science and Technology*, *Dalian University*, *Dalian*, *Liaoning* 116622, *China*)

Abstract: [Objective] To isolate strains producing glucose oxidase from the sample of sea mud and sea sand in Yellow Sea. **[Methods]** The strain isolated by plate culture and enyme activity determination, which was identified based on its morphology characteristics, physiobiochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, parts of the glucose oxidase properties were studied, also. **[Results]** The strain GOD2 (glucose oxidase) was identified as *Pseudomonas* (*Pseudomonas migulae*), and the optimum reaction temperature of the enzyme was 20 °C, with the poor thermal stability, the relative activity of the remaining 80% at 40 °C. Enzyme activity decline rapidly above 40 °C. **[Conclusion]** GOD2 had a highly research value, and there is no report about it to produce glucose oxidase, at present.

Keywords: Ocean, Low-temperature, Glucose oxidase, *Pseudomonas*

基金项目：国家 863 计划子课题(No. 2007AA021306)
*通讯作者：Tel：86-411-87402624；✉：doushaohua@dlu.edu.cn
收稿日期：2013-11-13；接受日期：2013-12-26；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-01-09

1904 年人们就发现了葡萄糖氧化酶，但是没有引起足够重视。一直到 1928 年，Muler 才进一步通过实验肯定了此酶的作用，命名为葡萄糖氧化酶，将它纳入脱氢酶类[1]。此后很多研究人员对此酶进行了大量的研究，在 1961 年国际生化协会酶委员会将该酶系统命名为 β-D-葡萄糖氧化还原酶(EC 1.1.3.4，glucose oxidase，简称 GOD)。它是一种能够将 β-D-葡萄糖专一氧化成为葡萄糖酸内酯和过氧化氢的酶[2]。反应式如下：

$$O_2 + C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}} C_6H_{12}O_7 + H_2O_2。$$

葡萄糖氧化酶应用领域十分广泛，在食品、轻工业、医药及生物等领域都有应用[3]。在食品行业中，由于葡萄糖氧化酶可以除去食品中的葡萄糖，因此可以防止食品发生褐变或获得纯度较高的低聚糖[4-5]；此外还具有脱氧、杀菌、食品中葡萄糖的定量分析等应用。在医药行业主要应用于葡萄糖的快速检测，如尿糖试纸、血糖试纸。此外还可以生产葡萄糖酸和生物传感器(电极)。葡萄糖氧化酶广泛存在于动物、植物以及微生物体内。目前我国生产的工业酶制剂纯度较低，一直都依赖进口，因此寻找进口酶制剂的代替品具有重要意义。

在微生物发酵生产中主要是利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)和青霉菌(*Penicillium*)，Fiedurek[6]筛选出一株能在淀粉上生长的黑曲霉 GIV10；Liu[7]、Ganadu[8]等先后研究了黑曲霉及青霉的发酵工艺，并用不同方法优化了产酶条件；Miron 等[9]通过浸没培养黑曲霉发酵菌株优化生产 GOD；中国科学院微生物研究所曾筛选出一株青霉菌，以液化淀粉培养液代替蔗糖作碳源，具有相当高的产酶能力，降低了 GOD 生产费用；但是，后续的提纯操作有一定难度。海洋资源非常丰富，其中微生物资源很少被人们利用。从海洋中筛选产葡萄糖氧化酶的菌株还未见报道。海洋中的微生物通常都有极端性，而且具有寡营养的特点，在极端环境中也可以生存。人们研究葡萄糖氧化酶都主要集中在中高温酶，低温酶研究甚少。本实验从海洋样品中通过平板快速筛选及摇瓶筛选等方法得到一株低温葡萄糖氧化酶产生菌，并对其进行了鉴定和部分酶学性质的初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海洋样品采集：采样地点：黄海海域(123.396°E，36.701 4°N)；样品种类：海水和海泥(采样深度 6−30 m)。

1.1.2 培养基：平板分离培养基：底层培养基(g/L)：葡萄糖 80，蛋白胨 3，$(NH_4)_2HPO_4$ 0.388，KH_2PO_4 0.188，$MgSO_4·7H_2O$ 0.156，$CaCO_3$ 3.5，琼脂 20；上层培养基(g/L)：葡萄糖 80，可溶性淀粉 100，KI 1.7，去氧胆酸钠 0.2，琼脂 20，pH 5.6。

初始发酵培养基(g/L)：葡萄糖 80，蛋白胨 3，KH_2PO_4 2，$MgSO_4·7H_2O$ 0.7，KCl 0.5，pH 5.6。

纯化培养基(细菌培养基，g/L)：牛肉膏 5，蛋白胨 10，NaCl 10，琼脂 20，pH 7.0。

种子培养基(LB 培养基，g/L)：蛋白胨 10，牛肉膏 5，NaCl 10，pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖氧化酶菌株的初筛：取 10 mL 海水样品和 10 g 海沙样品，分别装在经灭菌($1×10^5$ Pa、20 min)处理装有 100 mL 无菌水且含有玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中，振荡 30 min。然后用无菌水从 10^{-1} 依次梯度稀释至 10^{-8}，分别用移液器吸取 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 三个梯度的稀释液 0.1 mL，均匀涂布于灭菌的分离培养基上，25 °C 培养 3 d 后置于 4 °C 静置 2 d，然后置于室温下存放至出现透明圈。选取透明圈中的菌株接种到纯化平板培养基中培养。

1.2.2 葡萄糖氧化酶菌株的复筛：将初筛纯化得到的平板培养基上的菌株以点接种的形式再次接种到初筛培养基上，然后跟初筛步骤相同，验证是否能再次出现透明圈。由于葡萄糖氧化酶在氧化葡萄糖的过程中会产生葡萄糖酸，葡萄糖酸和底层培养基中的 $CaCO_3$ 反应可生成可溶性的葡萄糖酸钙，所以底层产生了透明圈。将出现透明圈的菌株转接

于含有发酵培养基的摇瓶中连续培养 3 d，测定发酵液的酶活力。

1.2.3 粗酶液的制备：将上述筛选出来的菌株接种于发酵培养基中，于 25 °C 恒温摇床培养 3 d，摇床转速 150 r/min。发酵完毕，用移液器吸取 2 mL 置于 2.5 mL 离心管中，4 °C、8 000 r/min 离心 15 min，除去菌体后得粗酶液。

1.2.4 酶活力的测定：葡萄糖氧化酶的酶活力测定采用靛蓝胭脂红褪色分光光度法[10]。原理是葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化，产生葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢能使靛蓝胭脂红褪色，以此测定葡萄糖氧化酶的活力。

准确吸取 0、1、2、3、4、5、6 mL 过氧化氢标准溶液(12 mg/L)，分别置于 25 mL 比色管中，加入 1.3 mL 靛蓝胭脂红溶液(1.0×10^{-3} mol/L)和 3.0 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液，再加入蒸馏水稀释至 25 mL，于沸水浴中加热 13 min，流水冷却比色管 5 min；用 1 cm 比色皿，以蒸馏水作参比，在波长 615 nm 处测定其吸光度 A。以 $\lg(A_0/A)$对过氧化氢浓度作图，得标准曲线。A_0 为不加入过氧化氢时的吸光度值。

分别取 4 mL 的 0.2 mol/L 葡萄糖溶液和 1 mL 葡萄糖氧化酶粗酶液置于试管中，20 °C 保温 5 min，将酶液加入葡萄糖溶液中 20 °C 反应 10 min，冰浴终止反应，得酶促反应液。在 25 mL 具塞比色管中，分别加入 3.0 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液、1.3 mL 靛蓝胭脂红溶液和 1.0 mL 的上述反应液，稀释至 25 mL，于沸水中加热 13 min 后，取出用流水冷却 5 min，终止反应；用 1 cm 比色皿，在 615 nm 处，以蒸馏水作参比，测定其吸光度 A。根据上面的标准曲线计算酶活力。酶活力单位规定为：20 °C 条件下，1 min 内催化葡萄糖反应产生 1 μg 过氧化氢所需的酶量为 1 个活力单位(U/mL)。

1.2.5 菌种鉴定方法：(1) 形态学观察。

在平板培养基上观察菌落形状、颜色、大小等形态学特征，通过不同染色方法在光学显微镜(10×100)下观察菌体形态。

(2) 生理生化鉴定方法。

参照《常见细菌系统鉴定手册》(第 8 版)相关内容[11]，对该菌种进行淀粉水解、明胶液化、V-P 实验、甲基红试验、尿酶试验、过氧化氢试验、葡萄糖氧化发酵试验、Tween80 试验。

(3) 分子生物学鉴定方法。

1) 采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA。应用 16S rRNA 两端保守区域设计引物：Forward primer 7F (5′-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3′)和 Reverse primer 1540R (5′-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)进行 PCR 扩增[12]。扩增反应体系模板(基因组 DNA 20–50 ng/μL) 0.5 μL，5×Buffer 2.5 μL，dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μL，7F primer (10 μmol/L) 0.5 μL，1540R primer (10 μmol/L) 0.5 μL，补加 ddH_2O 至 25 μL。扩增反应条件为 98 °C 3min；98 °C 25 s，55 °C 25 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。

2) 16S rRNA 基因测序测定及分析：PCR 扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。得到的 16S rRNA 核苷酸序列登录 NCBI，输入 GenBank 数据库进行 BLAST 比对，获取与其核酸序列相似度高的菌种。采用 MEGA 5.0 软件进行多序列匹配比对，计算相似序列之间的进化距离，利用 Neighbor-Joining 构建系统发育树。各分支上的数字是 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比[13-15]。

1.2.6 酶的分离纯化：(1) $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀。

在粗酶液中加入饱和度为 10%–80% 的 $(NH_4)_2SO_4$ 溶液，4 °C 盐析 12 h，蛋白沉淀用 pH 7.0 磷酸缓冲液溶解，分别测定每个梯度盐析得到的沉淀酶活，最后收集含有酶活性的蛋白沉淀溶解进行后续实验。

(2) 透析和超滤。

$(NH_4)_2SO_4$ 溶解得到的酶液装入预先处理好的透析袋中，4 °C 透析，用硝酸盐溶液检测透析袋外部，无沉淀产生时除去 NaCl，同时除去小分子物质和金属离子。将透析完成的样品转入截留分子

量为 10 kD，经过预处理的超滤管超滤，4 °C、5 000 r/min 离心 20 min，小心取出浓缩液，4 °C 保藏备用。

(3) Sephacry I Tm S-200 柱层析。

柱层析是在具有多孔网状结构的凝胶颗粒的分子筛作用下，根据分离样品中分子质量大小的差异进行洗脱分离的一项技术。按照分子在层析凝胶中的保留时间逐步洗脱。取 5 mL 超滤后酶液加入预先用 pH 6.8 磷酸缓冲液平衡过的 Sephacry ITm S-200 凝胶柱(φ1.6×50) cm，调节恒流泵，洗脱速度控制在 0.3 mL/min。调节自动收集器，每管收集 6 mL，测定酶活。

(4) SDS-PAGE 电泳。

采用 SDS-PAGE 鉴定酶的纯化程度，用考马斯亮蓝染色法确定电泳条带的位置。SDS 蛋白质复合物长度与其分子量成正比，电泳迁移率主要取决于分子量的大小。电泳结束后，染色、脱色，若得到单一条带，即为纯化的葡萄糖氧化酶。

电泳指标：分离胶 12%，浓缩胶 5%，起始电压 50 V，时间 30 min，然后改 100 V 电压，时间 2 h，考马斯亮蓝 R250 染色。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

对黄海海域海水和海泥样品进行初筛和复筛得到 6 株具有 GOD 活性的菌株，其酶活如表 1 所示。挑选酶活最高的一株命名为 GOD2，测得酶活力为 5.51 U/mL。用甘油保藏法将筛选得到的菌株保藏起来，并以这个菌种进行后续试验。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学鉴定：由图 1 可知，菌株 GOD2 在平板培养基上菌落为圆形，边缘整齐，黄色，表面光滑，湿润，半透明状，黏稠，在培养基上易成片存在，用接种环易挑取。由图 2 可知镜检革兰氏染色阴性，杆状，末端钝圆。

2.2.2 生理生化特征：按照《常见细菌系统鉴定手册》(第 8 版)[11]关于革兰氏阴性杆菌的相关检索，对菌株 GOD2 的生理生化特征进行检验和测定，结果见表 2。可以初步确定该菌为革兰氏阴性杆菌。

表 1 从样品中分离菌株的酶活

Table 1 Enzyme activity of glucose oxidase produced by strain which was isolated from samples

菌株 Strain	GOD1	GOD2	GOD3	GOD4	GOD5	GOD6
酶活 Enzyme activity (U/mL)	3.21	5.51	4.58	3.66	4.86	2.45

图 1 GOD2 筛选验证照片

Figure 1 Screening validation photo of strain GOD2

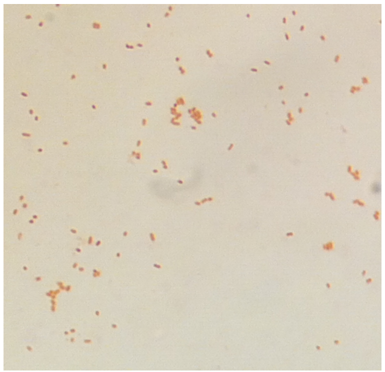

图 2 GOD2 革兰氏染色照片(1 000×)

Figure 2 The micro-morphology of strain GOD2 (1 000×)

表 2 菌株 GOD2 生理生化特征
Table 2 Traditional taxonomical properties of srtain GOD2

特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
淀粉水解 Starch hydrolysis	–	明胶液化 Gelatin liquification	–
V-P	–	尿酶试验 Urinary enzyme test	+
甲基红试验 Methyl red test	+	过氧化氢试验 Hydrogen peroxide test	–
葡萄糖氧化发酵试验 Oxidation of glucose fermentation experiments	产酸产气	Tween80 试验 Tween80 test	–

注：+：≥90%菌株为阳性；–：≥90%菌株为阴性.

Note: +: Denotes more than 90% of bacteria was positive; –: Denotes more than 90% of bacteria was negative.

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析：将扩增得到的 16S rRNA 基因电泳检测，测得其序列长度为 1 429 bp。经 BLASTn 软件序列分析，结果表明细菌 GOD2 与假单胞杆菌同源性最高。从 GenBank 中调取与细菌 GOD2 同源性较高的 13 株菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 3)，结果显示，GOD2 与 *Pseudomonas migulae* (NR_024927.1)在同一分支中，一致性达到了 99.13%。根据菌株的形态学特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析，鉴定细菌 GOD2 为假单胞杆菌(*Pseudomonas migulae*)-米氏假单胞菌。

2.3 葡萄糖氧化酶的分离纯化

粗酶液经 4 °C $(NH_4)_2SO_4$ 盐析得到的蛋白质沉淀均无活性，说明$(NH_4)_2SO_4$分级沉淀对该酶影响很大，故粗酶液直接进行透析、超滤除杂浓缩。浓缩液经 Sephacry I ^{Tm} S-200 凝胶柱层析，结果如图 4 所示。

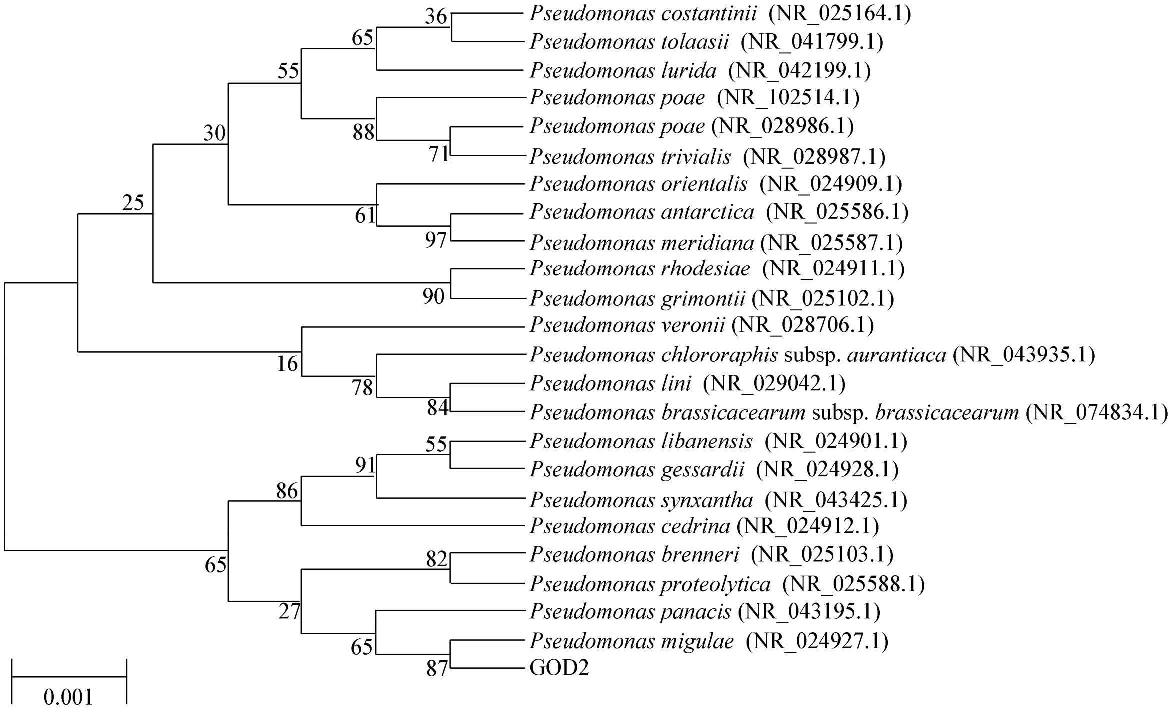

图 3 根据菌株 GOD2 及其相关菌株 16S rRNA 基因构建的系统发育树图

Figure 3 Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining approach based on the 16S rRNA gene of strain GOD2 and related strains

注：括号内数字为 GenBank 登录号；分支数表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比；图例 0.001 为遗传距离.

Note：The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Numbers at nodes present bootstrao percentages (based on 1 000 samplings). Bar: 0.001 sequence divergence.

2.4 SDS-PAGE 电泳结果

粗酶液及经过透析、超滤、Sephacry I Tm S-200 层析纯化处理后的酶液分别进行 SDS-PAGE 电泳，得到的电泳结果如图 5 所示。粗酶液经过透析、超滤、Sephacry I Tm S-200 层析处理后电泳得到了单一条带，说明纯化效果较好。根据相对迁移率分子量的关系，可以估算出该低温葡萄糖氧化酶的分子质量约为 39 kD。

2.5 pH 对 GOD2 葡萄糖氧化酶活力的影响

在 20 °C 不同 pH 条件下测定纯化后的葡萄糖氧化酶活力，结果见图 6。该酶的最适作用 pH 范围在 6.0−8.0，最适 pH 为 7.0。

2.6 温度对 GOD2 葡萄糖氧化酶活力的影响

在 pH 7.0 条件下，测定 10−40 °C 温度范围酶活力与温度的关系，结果见图 7。GOD2 葡萄糖氧化酶活力在 20 °C 达到最高，在 10 °C 时仍具有较高的酶活。

2.7 温度对 GOD2 葡萄糖氧化酶稳定性的影响

将酶液在不同温度中保温 1 h，在 20 °C、pH 7.0 条件下，测定 GOD2 葡萄糖氧化酶残余活力。结果见图 8，GOD2 葡萄糖氧化酶稳定性较差，在 60 °C 处理 1 h，酶活基本丧失。

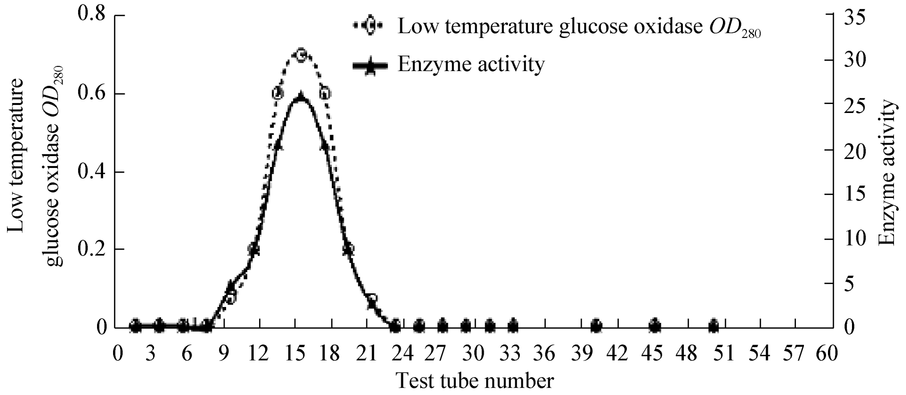

图 4 Sephacry I^{Tm} S-200 凝胶柱层析洗脱结果

Figure 4 The eluting result of Sephacry I^{Tm} S-200 column chromatography

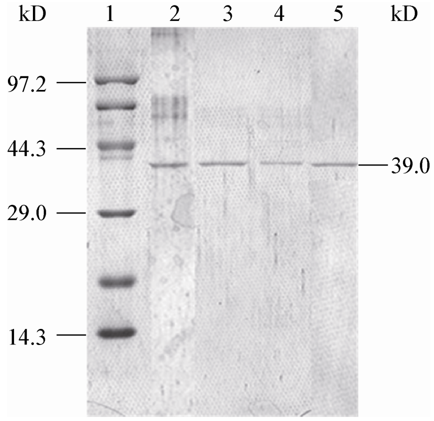

图 5 酶液 SDS-PAGE 电泳结果

Figure 5 SDS-PAGE of enzyme solution at different stages of purfication

注：1：Marker；2：粗酶液；3：透析液；4：超滤液；5：纯化酶液.

Note: 1: Marker; 2: Thick enzyme fluid; 3: Dialysate; 4: Ultrafiltrate; 5: Purified enzyme liquid.

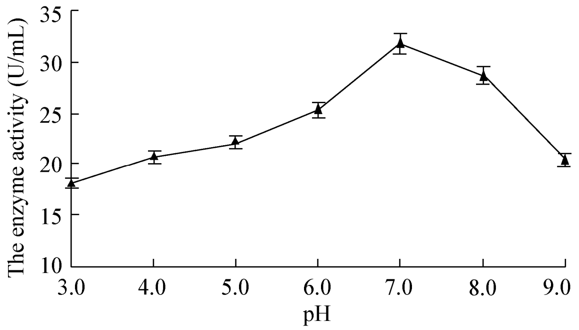

图 6 pH-酶活力曲线

Figure 6 Effects of pH on glucose oxidase activity of GOD2

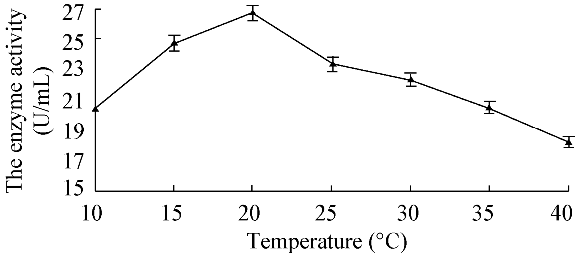

图 **7** 温度-酶活力曲线

Figure 7 Effect of temperature on glucose oxidase activity of GOD2

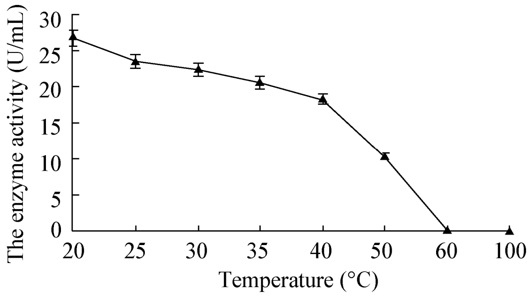

图 **8** 温度-酶稳定性曲线

Figure 8 Effect of temperature on glucose oxidase stability of GOD2

3 结论

低温微生物多来自极端低温环境中。本研究筛选的菌株 GOD2 来自黄海海水中，鉴定为米氏假单胞杆菌。对其所产葡萄糖氧化酶酶学性质进行研究，其所产葡萄糖氧化酶最适 pH 为 7.0，最适温度为 20 °C，热稳定性较差，属于低温酶类。目前没有对低温葡萄糖氧化酶的报道，在工业上常用的菌种为黑曲霉和青霉，未曾见假单胞杆菌产低温葡萄糖氧化酶的研究。低温葡萄糖氧化酶可以应用于低温保鲜、食品和药品的低温生产中[16]，具有相当大的市场应用价值，在工业生产中具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

[1] 李友荣, 张艳玲, 纪西冰. 葡萄糖氧化酶的生物合成产生菌的筛选及产酶条件的研究[J]. 工业微生物, 1993, 23(3): 1-6.

[2] Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ, et al. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46: 371-381.

[3] Gouda MD, Singh SA, Rao AG, et al. Thermal inactivation of glucose oxidase: mechanism and stabilization using additives[J]. Journal of Biochemistry, 2003, 278: 24324-24333.

[4] Sisak C, Csamnadi Z, Ronay E, et al. Elimination of glucose in egg using immobilized glucose oxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 1002-1007.

[5] Mislovicova D, Michalkova E, Vikartovska A. Immobilized glucose oxidase on different supports for biotransformation removal of glucose fromoligosaccharide mixtures[J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 704-709.

[6] Fiedurek J. Glucose oxidase synthesis by *Aspergillus niger* GIV-10 on starch[J]. Acta Microbiologica Polonica, 1991, 40(3/4): 197-203.

[7] Liu JZ, Yang HY, Wang LP. Synthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* in resting cell culture system[J]. Letters in Applied Microbiology, 1990, 29(5): 33-41.

[8] Ganadu ML, Andreotti L, Vitali I, et al. Glucose oxidase catalyses the reduction of O_2 to H_2O_2 in the presence of irradiated TiO_2 and isopropyl alcohol[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2002, 1(12): 951-954.

[9] Miron J, Gonzalez MP, Pastrana L, et al. Murado diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(5): 615-620.

[10] 周建芹, 陈韶华, 王剑文. 测定葡萄糖氧化酶活力的一种简便方法[J]. 实验技术与管理, 2008, 25(12): 58-60.

[11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[12] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 679-703.

[13] Kimura MA. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions nucleotide sequence[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980(16): 111-120.

[14] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular evolution[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

[15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

[16] 邢良英, 王远山, 郑裕国. 葡萄糖氧化酶的生产及应用[J]. 食品科技, 2007(6): 24-30.