

# 黑曲霉中提取葡萄糖氧化酶的探索

## I. 葡萄糖氧化酶合成及其性质\*

杨惠英 李弘毅 刘建忠 鲁统部 计亮年

(中山大学化学与化学工程学院 生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘要** 多次筛选培育获得含有较高活力葡萄糖氧化酶的黑曲霉菌株 ZBY-7, 在原有培养基条件的基础上, 研究了培养时间、培养温度、pH 中和剂的浓度对生产葡萄糖氧化酶影响. 并进一步对细胞浸出液的葡萄糖氧化酶性质进行研究. 实验结果表明: 胞外葡萄糖氧化酶含量远低于胞内酶.

**关键词** 黑曲霉, 葡萄糖氧化酶, 发酵合成, 性质

**分类号** Q 554. 2

葡萄糖氧化酶 (GOD) 是酶技术领域一种非常重要的酶, 由于 GOD 与生命重要物质葡萄糖和氧的密切关系, 导致了它在科研、医药和工业生产上广泛的应用. GOD 广泛分布于动物、植物及微生物体内, 由于在动植物体中提取有一定局限性, 从酶量来说也不丰富, 而霉菌在一定条件下, 产生 GOD 的能力强, 便于大规模生产. GOD 的主要霉菌来源于黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和青霉菌 (*Penicillium notatum* or *amasakiense*). Nakamura<sup>[1]</sup>对以上 2 种来源的 GOD 做了详细地比较后发现: 前者远比后者的 pH 与活性曲线峰宽得多. 本文对黑曲霉生物合成 GOD 的条件及其性质进行了详细研究.

## 1 材料与方法

(1) 菌种为本室筛选保存的黑曲霉 ZBY-7.

(2) 培养基为原产酶培养基<sup>[2]</sup>.

(3) GOD 的制备: 取一支黑曲霉 ZBY-7 接种在液体培养基中培养 42 h, 过滤除去滤液, 用蒸馏水洗涤菌丝体多次, 置冰箱滤干 1 d, 不挤压, 称质量 ( $m$ ) 后冰浴研磨, 用蒸馏水或缓冲液 ( $V$  为 50 mL) 在冰箱中过夜, 过滤取滤液待用.

(4) GOD 酶比活力 ( $\lambda$  (GOD)  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 和酶活力 ( $\Delta$  (GOD)  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 的测定方法见文献 [3].

\* 国家自然科学基金 (29571033)、国家教委博士点基金和南京大学配位化学国家重点实验室资助项目

收稿日期: 1998-01-21 杨惠英, 女, 59 岁, 副研究员

## 2 结果和讨论

### 2.1 培养条件对生产 GOD 的影响

黑曲霉是需氧菌, 通气量对孢子的萌发、菌体的增殖和酶的形成都有直接关系, 因此, 摇床的转速对菌体的生产和酶的产量有很大影响, 所以把摇床转速固定在较高点 (220~250 r/min), 每瓶培养液为 50 mL, 研究了各种因素对胞内酶的产酶影响。

2.1.1 培养时间对产 GOD 的影响 测定了不同培养时间 ( $t$ ) 对菌体生成胞内、外的  $\Delta$  (GOD) 的影响 (表 1)。结果表明,  $t$  为 42 h  $\Delta$  (GOD) 最高, 胞内酶高于胞外酶 4~10 倍。

表 1 培养时间对 GOD 酶活力的影响

Tab. 1 Effect of culture time on GOD activity

$t/h$	12	18	24	30	36	42	48	54	60	72
$m/g$	/	1.0	2.5	2.0	2.0	2.0	2.5	3.5	3.5	3.5
胞内 $\lambda$ (GOD) / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	/	3.48	4.31	8.70	18.0	20.0	13.0	9.10	8.82	8.75
胞内 $\Delta$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	/	3.48	10.8	17.5	36.0	39.0	32.6	31.8	30.8	30.6
胞外 $\lambda$ (GOD) / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	/	/	/	0.06	0.13	0.29	0.21	0.15	0.08	0.07
胞外 $\Delta$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	/	/	/	3.0	6.5	14.5	10.5	7.5	4.0	3.5

2.1.2 培养温度对产 GOD 的影响 将黑曲霉菌种在 25~37 $^{\circ}\text{C}$  进行产酶培养, 培养温度 ( $\theta$ ) 在 30~35 $^{\circ}\text{C}$  之间, 尤其在 30 $^{\circ}\text{C}$  为最好 (表 2)。经多次实验发明, 如果在培养开始 15~

表 2 培养温度对 GOD 活力的影响

Tab. 2 Effect of culture temperature on GOD activity

$\theta/^{\circ}\text{C}$	25	28	30	31	32	33	34	35	37
$m/g$	1.0	1.5	3.5	3.0	3.0	3.0	3.25	3.2	2.5
胞内 $\lambda$ (GOD) / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	4.27	8.51	13.8	15.3	15.9	15.0	14.7	12.8	5.43
胞内 $\Delta$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	4.27	12.8	67.9	45.9	47.7	45.0	47.8	41.0	13.6
胞外 $\lambda$ (GOD) / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0.10	0.25	0.97	1.03	0.96	1.17	1.01	1.04	0.68
胞外 $\Delta$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	5.0	12.5	19.4	51.5	48.0	58.5	50.5	52.0	33.0

20 h 将  $\theta$  固定在 30~35 $^{\circ}\text{C}$ , 以后降至 30~31 $^{\circ}\text{C}$ , 产 GOD 量最高, 产酶量将增加 3~4 倍, 因为菌丝体的生长需要较高的温度, 而酶的生长则需要较低的温度。

2.1.3 中和剂对产 GOD 的影响 在培养过程中, 由于不溶性  $\text{CaCO}_3$  是霉菌的生长载体, 在葡萄糖酸发酵及 GOD 合成中, 添加不同量  $\text{CaCO}_3$  进行产酶研究, 结果发现 (图 1,  $t=48$  h): 随  $d(\text{CaCO}_3)$  增大,  $\Delta$  (GOD) 增加; 当  $d(\text{CaCO}_3)$  高于 35 g/L 时, 菌体受到抑制, 因此, 采用  $d(\text{CaCO}_3)$  为 35 g/L 进行研究。

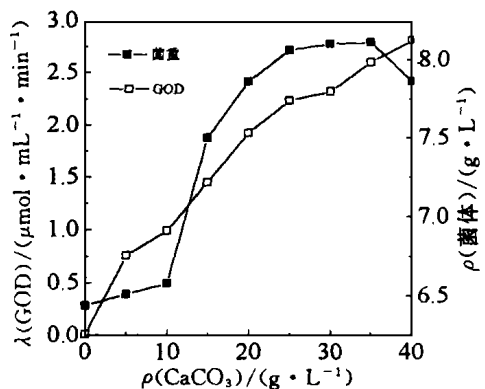


图 1  $d(\text{CaCO}_3)$  对 GOD 合成的影响

Fig. 1 Effect of  $d(\text{CaCO}_3)$  on GOD synthesis

## 2.2 GOD性质

(1) 葡萄糖氧化生成葡萄糖酸的反应 pH值. 在不同 pH值的 0.06 mol/L磷酸缓冲液下测定酶活力 (表 3). GOD的最适反应 pH为 5.5~ 5.7.

表 3 底物溶液 pH值对 GOD酶活力的影响

Tab. 3 Effect of pH on GOD activity

pH	3.5	4.0	4.6	5.0	5.5	5.7	6.0	7.0	8.0
$\lambda(\text{GOD}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	2.01	2.23	2.30	2.40	2.52	2.53	2.00	1.60	1.20

(2) 反应温度. 在不同温度下测定酶活力 (表 4). GOD最适反应温度为 30~ 32°C.

表 4 温度对 GOD活力测定的影响

Tab. 4 Effect of temperature on GOD activity

$\theta / ^\circ\text{C}$	20	25	28	30	32	35	40	45	50
$\lambda(\text{GOD}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	1.70	2.12	2.31	2.50	2.50	2.43	1.84	1.23	0.77

(3) GOD的热稳定性. 将 pH 5.6的 GOD酶液在不同的温度下 (20~ 70°C) 放置 30 min后, 分别测定酶活力 (表 5), 温度高于 30°C时 GOD开始失活, 到 70°C时 GOD完全失活, 所以 GOD浸取液一定要贮存在冰箱中.

表 5 GOD的热稳定性

Tab. 5 Thermal stability of GOD

$\theta / ^\circ\text{C}$	4	20	25	30	35	40	45	50	60	70
$\lambda(\text{GOD}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	3.05	3.04	3.03	3.05	2.97	2.86	2.43	2.21	1.80	0.20

(4) GOD的酸碱稳定性. 将不同 pH的相同 $\lambda(\text{GOD})$ 的 GOD酶液在 35°C放置 5h, 分别测定 $\lambda(\text{GOD})$ (表 6), pH小于 5.0及大于 6.5时, GOD都会失活, 而 pH 8.0时将严重失活, GOD最适贮存 pH为 5.0~ 6.5.

表 6 GOD酸碱稳定性

Tab. 6 Acid-base stability of GOD

pH	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0
$\lambda(\text{GOD}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	2.41	2.62	2.75	2.92	3.07	3.00	2.97	2.80	0.77

(5) 低级醇的影响. 在 20°C, pH 5.5, 按 h为 1: 5将醇和酶液混合 (忽略醇与水混合时的体积变化), 测定不同时间 GOD的活力 (图 2). 低级醇对 GOD有一定的激活作用, 且随着放置时间的增大, 酶的失活速率比较慢, 这与早期有关报道<sup>[4]</sup>结果相同, 这是因为醇的羟基对 GOD表面的糖蛋白有很好的保护作用.

(6) 表面活性剂的影响. 在 20°C, pH 5.5, 按 h为 1: 5将 d为 2% 表面活性剂和酶液混合, 测定不同时间 GOD的活力 (图 3). 十六烷基三甲基氯化铵 (CTAC), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 对 GOD有明显的失活作用, 与 Tsuge<sup>[5]</sup>报道相同; 十二烷基苯磺酸钠 (SDS) 对 GOD也有失活作用, 但强度小于 CTAC和 CTAB, 与 Malcom<sup>[6]</sup>报道相同. 中性表面活性剂吐温-80对 GOD活力基本无影响.

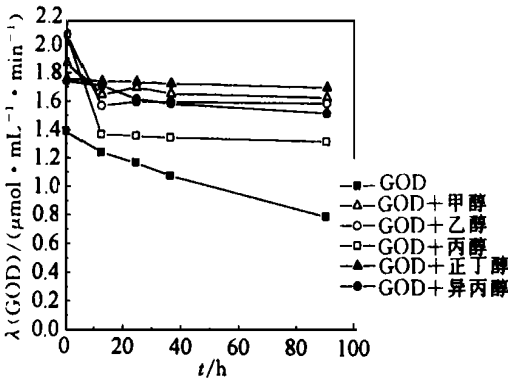


图 2 低级醇对 GOD 活力影响

Fig. 2 Effect of lower alcohol on GOD activity

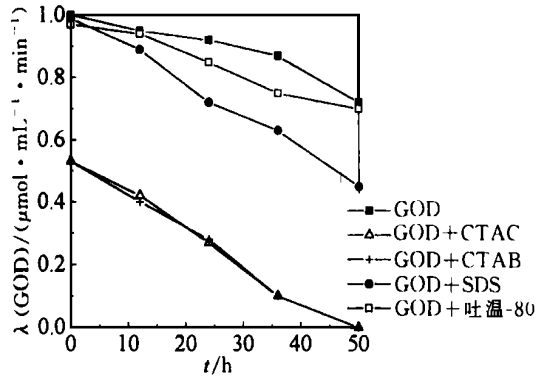


图 3 表面活性剂对 GOD 活力影响

Fig. 3 Effect of surface active agent on GOD activity

## 参 考 文 献

- 1 Nakamatsu T, Akamatsu T, Miyajima R, et al. Microbial production of glucose oxidase. *Agr Biol Chem*, 1975, 39 (9): 1803~ 1811
- 2 杨惠英, 计亮年, 陈特强, 等. 发酵生产葡萄糖酸钙的控制. *工业微生物*, 1988, 18 (6): 9~ 14
- 3 Lu T B, Peng X T, Yang H Y, et al. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. *Enzyme and Microb Tech*, 1996, 19: 339~ 342
- 4 Reed G. *Enzymes in food processing*. New York: Academic Press, 1966. 176
- 5 Tsuge H, Suzuki M, Kito N, et al. Inactivation of glucose oxidase by cationic detergent, hexadecyltrimethylammonium bromide. *Agric Biol Chem*, 1984, 48 (1): 19~ 28
- 6 Jones M N, Manley P, Wilkinson A. The dissociation of glucose oxidase by sodium *n*-dodecyl sulphate. *Biochem J*, 1982, 203 (1): 285~ 291

## Exploration on the Extraction of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*

### I The Synthesis of Glucose Oxidase and Its Property

Yang Huiying\* Li Hongyi Liu Jianzhong Lu Tongbu Ji Liangnian

**Abstract** The *Aspergillus niger* strain ZBY-7, which contained higher activity of glucose oxidase (GOD), was obtained by screening of various cultures. On the basis of original culture medium, effect of culture time, culture temperature, pH, neutralizer concentration on glucose oxidase production and the properties of glucose oxidase for the cell leaching liquor were studied. The result indicates that the intracellular glucose oxidase activity is much higher than the extracellular enzyme.

**Keywords** *Aspergillus niger*, glucose oxidase, fermentation synthesis, property

\* School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China