

红藻源新型抗氧化剂己糖氧化酶的异源表达优化及酶学特性表征

马卫林, 包怡, 陆跃乐, 朱林江*, 陈小龙
(浙江工业大学生物工程学院 杭州 310014)

摘要 天然抗氧化功能的活性多肽和食品酶具有绿色、安全及可靠的特点, 广受欢迎。己糖氧化酶是一种底物谱广且具有除氧、酸化、提高蛋白交联等功能的氧化酶, 可作为一种新型绿色多功能的食品添加剂。为了提高己糖氧化酶在毕赤酵母中的过量表达, 系统比较不同基因型的宿主菌株、表达方式以及多拷贝数转化子等因素对己糖氧化酶异源表达的影响。应用新建立的 3 步筛选法获得不同基因型的转化子并比较其发酵酶活, 结果表明, 甲醇代谢缓慢的 Mut^r 型宿主有利于己糖氧化酶的表达; 而甲醇诱导表达方式优于组成型表达方式; 较高的己糖氧化酶基因拷贝数表达相对更高的酶活。然而, 优化以上表达因素, 己糖氧化酶表达水平仍不高, 最高摇瓶发酵酶活为 4.92×10^{-2} U/mL。重组酶的纯化研究表明存在 3 种蛋白, 分子质量分别为 62, 40 ku 和 29 ku, 即己糖氧化酶的原酶和经蛋白酶切割而成的 2 个二聚体亚基, 其中原酶的活性较低且占比最高, 可能是表达活性偏低的原因之一。酶学特性研究表明, 重组酶的最适条件为 50~60 °C、pH 4.0, 且常温条件 (20 °C) 下可维持 50% 的活性。低温条件 (20~60 °C) 和酸性条件 (pH 3.0~6.0), 己糖氧化酶酶活较为稳定, 说明其是一种耐酸性较好的抗氧化酶, 适用于酸性食品的保鲜和抗氧化应用。

关键词 己糖氧化酶; 毕赤酵母; 食品用酶; 天然抗氧化剂

文章编号 1009-7848(2023)08-0041-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.005

食品保鲜剂和抗氧化剂是食品添加剂的一个重要组成部分, 能够防止食品氧化褐变、褪色、维生素破坏以及变质产生异味等。近年来, 随着人们环境保护和食品安全意识的日益提高, 绿色、环保、多功能且无副作用的食品添加剂受到越来越多的关注。与人工合成的食品保鲜剂和抗氧化剂相比, 天然来源且具有抗菌、抗氧化等功能的活性多肽或食品酶则更加安全可靠, 越来越受人们的喜欢。其中, 己糖氧化酶 (Hexose oxidase, D-hexose:O₂ 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.5, HOX) 具有除氧、酸化、提高蛋白交联等功能, 可作为一种潜在的安全、无毒、功能多样的绿色食品添加剂, 在食品保鲜和抗氧化方面具有重要的应用价值^[1]。

HOX 最早是由 Ikawa 等^[2]于 1969 年从新英格兰海岸的两种红藻即皱波角叉菜 (*Chondrus crispus*) 和克里斯塔海藻 (*Euthora cristata*) 中发现的。该酶能够催化多种己糖和二糖的氧化, 生成相应的内酯并释放出 H₂O₂, 包括 D-果糖、D-葡萄糖、

D-半乳糖、麦芽糖、乳糖和纤维二糖等。广泛的底物特异性使其区别于葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOD), GOD 一般只特异性催化 D-葡萄糖的氧化。HOX 的催化反应消耗 O₂ 并释放 H₂O₂, 且生成的内酯能够自发水解为相应的醛酸, 因而作为抗氧化剂、酸化剂、面粉改良剂和抑菌剂, 在食品工业和畜牧业等方面应用广泛^[3-5]。天然的 HOX 大多来源于红藻类^[6-8], 因含量低、提取步骤繁琐、成本高而无法实现工业化生产。随着基因工程技术的发展, 针对 HOX 的异源表达已有相应的研究。比如, 皱波角叉菜来源的 HOX 基因已被克隆并分别在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[9]、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[10]、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)^[11] 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)^[9, 12] 中实现了表达。其中大肠杆菌中不能实现活性表达, 而毕赤酵母中表达活性相对较高。为了进一步研究毕赤酵母中表达己糖氧化酶, 本研究针对其表达策略进行综合评价。

毕赤酵母表达系统是一种较为成熟的真核表达系统, 不仅具有发酵营养要求低、操作简单的优点, 而且具有真核细胞表达后修饰的能力, 同时也能表达结构相对复杂的或易形成包涵体的蛋白等^[13-14]。其分泌表达目的蛋白, 在胞外蛋白中占比

收稿日期: 2022-08-18

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2019C02088)

第一作者: 马卫林, 男, 硕士生

通信作者: 朱林江 E-mail: zhulinjiang@zjut.edu.cn

较高,简化了下游处理过程。毕赤酵母表达重组蛋白的水平,与不同表达策略相关,包括宿主菌株基因型、重组表达方式以及多拷贝转化子筛选等^[14]。其中,典型宿主菌株基因型包括甲醇代谢正常 Mut⁺型和甲醇代谢缓慢 Mut^s型,重组表达方式包括甲醇诱导型和组成型等。目前并未针对己糖氧化酶在毕赤酵母中过量表达的策略进行分析或综合评价。本研究优化己糖氧化酶在毕赤酵母中的表达策略,并对重组表达的酶进行纯化和酶学表征,对其应用具有一定的参考价值。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、培养基和引物

大肠杆菌 (*E. coli*)DH5 α 菌株感受态购自上海生工生物工程股份有限公司, Mut⁺型的毕赤酵母 GS115 菌株为实验室保藏, Mut^s型的毕赤酵母 KM71 菌株由本学院孙杰老师赠送,质粒 pPIC9k、

pPICZ α A、pGAPZ α A、pUC18 由本实验室保藏。

LLB 培养基:0.5%酵母粉,1%蛋白胨,1%NaCl,pH 值调至 7.0。高压蒸汽灭菌 121 $^{\circ}$ C,20 min。配制固体培养基时添加 1.5%的琼脂粉。YPD 培养基:酵母粉 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%。配制固体培养基时添加 1.5%的琼脂粉。YPDS 培养基:酵母粉 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,山梨醇 1 mol/L。配制固体培养基时添加 1.5%的琼脂粉。MD 培养基:无氨基酵母氮源(YNB)13.4 g/L,葡萄糖 20 g/L,生物素 4×10^{-4} g/L,琼脂糖 20 g/L。MMH 培养基:YNB 13.4 g/L,甲醇 5 g/L,生物素 4×10^{-4} g/L,琼脂粉 20 g/L,组氨酸 4×10^{-2} g/L。

0.28 mmol/L 邻联茴香胺(*O*-Dianisidine)溶液的配制方法如下:取 1.7 mg 邻-联二茴香胺溶于 25 mL 磷酸盐缓冲液中。

本试验所用引物如表 1 所示。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
9kHOX-F	TCGAAGGATCCAAGAATTCATGGCTACCTTGCCACAAAAAGAC
9kHOX-R	GAATTCCTGGATCCTTCGAATAATTAG
piczMCS-F	GAAACCATATGCTGCAGTCTAGAGAATTCACGTGGCCAGCCGGCCGT
piczMCS-R	GAATTCCTAGACTGCAGCATATGGTTTCGAATAATTAGTTGTTTTTTG
piczHOX-F	CAACTAATTATTCGAAACCATATGGCTACCTTGCCACAAAAAGACC
piczHOXHis-R	CTCAATGATGATGATGATGATGGCATGCCTTAGTCTGTTTTGG
TT-SphI-F	CATCATCATCATCATCATTGAG
TT-BamHI-R	GAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCCGCACAAACGAAGGTCTCAC
pgapz-HOX-F	GAACAACATATTCGAAACGAGGAATTCATGGCTACCTTGCCACAAAAAG
pgapz-MCS-F	CATTGCTGCAGCTATTCGCTAGCGATCGGTACCTCGAGCCGGCGGCCGCCA
pgapz-MCS-R	CTAGCGAATAGCTGCAGCAATGTGTGAATTCCTCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATTG
Gap-pUC18-F	CGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTTTTTTGTAGAAATGTC
Gap-pUC18-R	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTTTTAGATAAGGACAGGAGAGATG
RT-gap-F	GGTCTTTTGTAGTGGCGGTC
RT-gap-R	TTGTCCGGTGTCAACGAGGAG
RT-HOX-F	GGCCAGGTGTGATTGGAAGA
RT-HOX-R	AACCAGCATGACCACCCAAA

1.2 仪器与设备

S1000 PCR 仪、ChemiDoc MP 凝胶成像仪,美国 Bio-rad 公司;Avanti J-26XP 高速冷冻离心机,美国 Beckman 公司;PB-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;LC480 荧光定量 PCR 仪,罗氏有限公司;ND-ONE-W 超微量核酸蛋白测定仪 Nan-

oDrop ONEC,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SpectraMax 190 酶标仪,美国分子仪器(上海)有限公司。

1.3 重组表达质粒的构建

1.3.1 pPIC9k-HOX 的构建 首先将红藻 (*C. crispus*) 来源的氨基酸序列(GenBank 数据库登录

号为 AAB49376)提交至华大青兰生物科技(无锡)有限公司进行人工合成密码子优化的 *HOX* 基因,并将 *HOX* 基因插入到 pPIC9k 的 *EcoRI/NotI* 之间,获得含 α 因子信号肽的原始质粒 pPIC9k- α -*HOX*。在此基础上删除 α 因子信号肽构建了重组质粒 pPIC9k-*HOX*,即采用引物 9kHOX-F/9kHOX-R 扩增原始质粒后进一步克隆试剂盒进行自身环化连接。

1.3.2 pPICZ-*HOX* 的构建 首先采用引物 piczMCS-F/piczMCS-R 扩增保藏质粒 pPICZ α A 进行反向 PCR 扩增,删除信号肽并引入多克隆位点,采用一步克隆试剂盒进行自环化后得到不含信号肽的质粒 pPICZ-*NdeI*。接着将 PCR 扩增得到的 *HOX* 基因(引物为 piczHOX-F/piczHOXHis-R, DNA 模板为 pPIC9k-*HOX* 质粒)和终止子 TT 片段(引物为 TT-*SphI*-F/TT-*BamHI*-R, DNA 模板为质粒 pPIC9k)与由 *NdeI* 和 *BamHI* 双酶切线性化质粒 pPICZ-*NdeI* 进行一步克隆连接,得到重组表达载体 pPICZ-*HOX*。

1.3.3 pGAPZ-*HOX* 的构建 采用引物 pgapz-MCS-F 和 pgapz-MCS-R 扩增保藏质粒 pGAPZ α -A,删除信号肽并自环化连接得到 pGAPZ-AM 质粒。接着将 PCR 扩增得到的 *HOX* 基因(引物为 pgapz-*HOX*-F/piczHOX-R, DNA 模板为 pPIC9k-*HOX* 质粒)和终止子 TT 片段(引物为 TT-*SphI*-F/TT-*BamHI*-R, DNA 模板为质粒 pPIC9k)由 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切线性化质粒 pGAPZ-AM 进行一步克隆连接,得到重组表达载体 pPICZ-*HOX*。

1.4 平板显色法筛选多拷贝菌株

参照邵赵伟^[15]的试验方法对转化子进行初筛,具体方法如下:用无菌牙签挑取 YPDS 平板上的 KCXH 菌株,用无菌水稀释后分别点到具有编号的 MMH 平板。将平板于 30 °C 培养箱倒置培养 48 h 后。将显色液倾倒入 MMH 平板上。并用无菌水作为阴性对照,以葡萄糖氧化酶 GOD 试剂做为阳性对照。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证拷贝数

参照宣姚吉等^[16]的方法进行实时荧光定量 PCR 验证。首先,以 KM71 菌株基因组为模板,采用 Gap-pUC18-F/Gap-pUC18-R 引物,扩增 *GAPDH* 基因,并采用一步克隆试剂盒连接至质粒

pUC18,得到标准质粒 pUC18-*GAPDH*。提取各重组菌株的基因组,作为实时荧光定量 PCR 的检测样品。

根据拷贝数换算公式:拷贝数 = $6.023 \times 10^{14} \times$ 质粒的浓度 / ($660 \times$ 基因片段长度),计算出每微升标准质粒所含的总拷贝数。将质粒稀释至每微升 $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ 个拷贝,以各浓度质粒为模板,分别进行实时荧光定量 PCR。以起始模板中质粒拷贝数的对数作为横坐标,测得的 Ct 值作为纵坐标,建立含 *GAPDH* 基因和 *HOX* 基因质粒的双标准曲线。

将各菌株测得的 Ct 值分别代入两条标准曲线中,求出样品中 *GAPDH* 基因 *HOX* 的起始拷贝数。由于 *GAPDH* 基因在毕赤酵母基因组中是单拷贝,因此样品中 *HOX* 基因拷贝数 = *HOX* 基因起始拷贝数 / *GAPDH* 基因起始拷贝数。

1.6 重组 *HOX* 的纯化

重组菌株的发酵液离心后弃去上清,将细胞沉淀重悬于磷酸钾缓冲液中。使用高压匀浆机破碎菌液。收集细胞破碎液,离心后得到的上清液即为粗酶液。将粗酶液通过 Ni 柱进行分离纯化,用 300 mmol/L 咪唑洗脱。透析和浓缩后备用。将纯化后的重组 *HOX* 进行 SDS-PAGE 分析并测定蛋白浓度。

1.7 *HOX* 酶活测定方法

在 96 孔板的每孔中分别加入 0.28 mmol/L 邻联茴香胺溶液 120 μ L、10%葡萄糖溶液 25 μ L、1 U/mL 辣根过氧化物酶溶液 10 μ L,加入 20 μ L 待测样品。迅速混匀,置于酶标仪中。设定温度 35 °C,检测波长 460 nm,每隔 1 min 测定一次吸光值,连续测定 20 min,计算每分钟吸光度增加值的平均值。

1.8 重组 *HOX* 酶学特性分析

1.8.1 最适反应温度的测定 将未添加酶液的反应体系分别在 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C 及 80 °C 条件下保温 5 min,然后加入重组 *HOX* 酶液进行反应,并测定各温度条件下 *HOX* 的酶活力。

1.8.2 最适反应 pH 值的测定 分别用 50 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.0~5.0)、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0~8.0)、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 配制邻联茴香胺溶液,然后加入重

组 HOX 酶液进行反应,于 35 ℃测定各 pH 值条件下 HOX 的酶活力。

1.8.3 热稳定性的测定 将酶液分别于 20,30,40,50,60,70 ℃及 80 ℃条件下保温 1 h, 然后于 35 ℃条件下测定 HOX 的剩余酶活力。

1.8.4 底物催化活性的测定 不同糖类底物催化活性的测定。根据上述 HOX 活性测定方法,在最适反应温度和 pH 值下,分别以葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、蔗糖和纤维二糖作为反应底物进行酶活测定。将最适底物的酶活设为 100%, 计算催化其它底物时的相对酶活。

2 结果与讨论

2.1 表达 HOX 的重组质粒构建

根据前期研究发现, 构建含有 α 因子信号肽

的重组表达质粒, 难以检测到重组己糖氧化酶的活性, 所以本研究主要构建不含信号肽的重组表达菌株。为了优化 HOX 的过量表达策略, 选择 2 种基因型的毕赤酵母菌株和 3 种基因组整合型的表达质粒, 如图 1 所示。毕赤酵母菌株包括甲醇代谢正常型 Mut⁺ 的 GS115 菌株和甲醇代谢缓慢型 Mut^s 的 KM71 菌株。构建的重组质粒如图 1 所示, 包括 pPIC9k-HOX、pPICZ-HOX、pGAPZ-HOX。由甲醇诱导表达的重组质粒 pPIC9k-HOX 线性化后转化至 GS115 菌株, 筛选获得 Mut⁺ 型菌株, 记为 GKX 菌株。由甲醇诱导表达的重组质粒 pPICZ-HOX 线性化后转化至 KM71 菌株, 筛选 Mut^s 型菌株, 记为 KCX 菌株。组成型表达的重组质粒 pGAPZ-HOX 线性化后转化至 KM71 菌株, 筛选 Mut^s 型菌株, 记为 KPX 菌株。

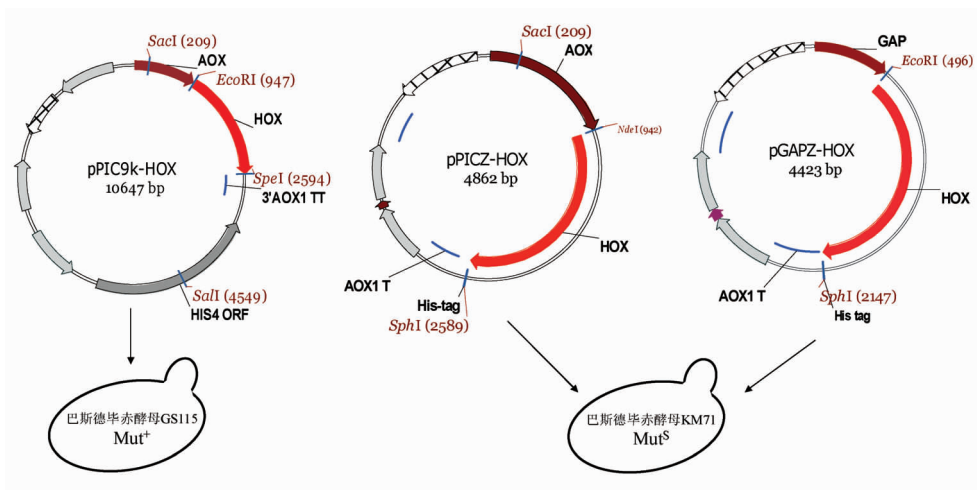


图 1 构建不同类型的重组毕赤酵母菌株的示意图

Fig.1 Schematic diagram for the construction of different types of recombinant *Pichia* strains

2.2 基于平板显色的高通量筛选方法的建立

建立基于酶活的高通量筛选方法, 有助于筛选高活性的重组毕赤酵母转化子。结合之前报道的用于筛选葡萄糖氧化酶的方法^[15], 利用己糖氧化酶能够氧化葡萄糖生成 H₂O₂ 的特性, 在辣根过氧化物酶辅助下, 可与邻联茴香胺进行显色反应, 即平板显色法。采用 3 步法, 如图 2a 所示, 首先通过高抗性平板筛选出具有耐受较高抗生素浓度的菌落; 将菌落接种至两块一致并进行序列标记的 MM 平板(GKX 菌株)或 MMH 平板(KCX 菌株)或

MDH 平板(KPX 菌株); 培养后将显色剂倒入其中一块平板进行显色反应。若表达己糖氧化酶的阳性菌落则会显现棕色, 如图 2c 所示。

以商品化的葡萄糖氧化酶为对照, 检验该方法的灵敏度, 结果如图 2b 所示。5 号格为以超纯水作为阴性对照, 6、7、10、11、12 号格代表的 GOD 活性分别为: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 U/mL, 结果表明在酶活仅为 0.01 U/mL 时即可显色, 具有较高的显色灵敏度。将平板显色筛选方法用于高活性重组毕赤酵母菌株的筛选, 如图 2c 所示。

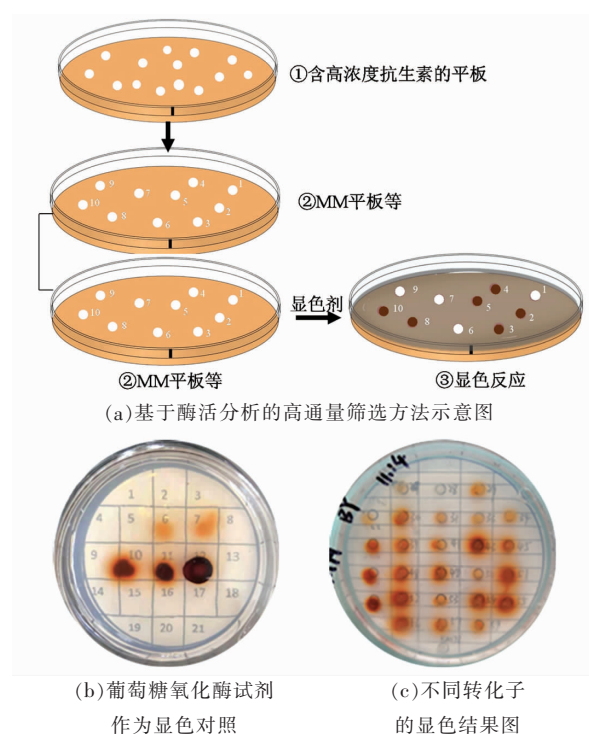


图 2 基于己糖氧化酶活性的平板筛选方法

Fig.2 Plate screening method based on hexose oxidase activity

2.3 不同重组表达策略的比较

通过高抗平板初筛、平板显色复筛和三角瓶发酵验证,最终筛选得到 6 株 Mut^+ 型的甲醇诱导表达的 GKX 菌株、10 株 Mut^s 型的甲醇诱导表达的 KCX 菌株和 6 株 Mut^s 型的组成型表达的 KPX 菌株,如表 2 所示。其中表达酶活最高的菌株为 KCX56 菌株,发酵酶活为 4.92×10^{-2} U/mL。

采用之前报道的基于双标准曲线的实时荧光定量 PCR 法^[6],对筛选得到的重组菌株的 *HOX* 基因拷贝数进行了测定。将 *GAPDH* 基因克隆至 pUC18 质粒上获得的重组质粒和含 *HOX* 基因的重组质粒为标准样,制作标准曲线,用于定量分析每一个重组菌株的基因组上的 *HOX* 基因的拷贝数,结果如表 2 所示。重组菌株的 *HOX* 基因拷贝数在 1~6 个拷贝之间,其中 KCX56 菌株含有 6 个拷贝。

比较 Mut^+ 型的 GKX 菌株和 Mut^s 型的 KCX 菌株发现,在相同拷贝数的情况下,KCX 菌株具有较高的酶活。相较于 GS115 菌株,KM71 菌株衍生的重组菌有利于己糖氧化酶的表达。此外,

GS115 菌株衍生的重组菌,在上罐发酵过程中,由于其甲醇代谢旺盛,溶氧需求大,很难控制其在高密度发酵时的溶氧需求。因此, Mut^s 型菌株有利于己糖氧化酶的发酵制备。

比较甲醇诱导表达的 KCX 菌株和组成型表达的 KPX 菌株,这些菌株均由 Mut^s 型的 KM71 菌株衍生而来,在相同拷贝数的情况下,KCX 菌株表现出更高的己糖氧化酶的活性,提示甲醇诱导表达策略更有利于己糖氧化酶的表达。

拷贝数对重组毕赤酵母菌株的蛋白表达具有显著影响,随着拷贝数增加,己糖氧化酶的表达水平上升。GKX 菌株中,GKX35 具有最高的酶活,即为 1.53×10^{-2} U/mL,该菌株具有 4 个 *HOX* 基因的拷贝。表达酶活最高的 KCX 菌株是 KCX56 菌株,含有 6 个 *HOX* 基因的拷贝。KPX 菌株中,筛选得到最高拷贝数为 3,即 KPX30,其表达酶活为 1.92×10^{-2} U/mL。分子质量相对较小的重组表达质粒 pPICZ-HOX 有利于高拷贝数菌株的构建。

虽然宿主菌株的甲醇代谢能力、*HOX* 基因的表达策略、*HOX* 基因拷贝数等因素对重组毕赤酵母菌株表达己糖氧化酶的活性有一定影响,但是优化这些基因表达元件后对己糖氧化酶表达水平并未获得较大提升,这些重组表达菌株的表达水平仍处于较低水平。在毕赤酵母菌株中高效表达己糖氧化酶仍需进一步研究潜在的关键因素。

2.4 重组己糖氧化酶的酶学性质

为了进一步认识重组表达的己糖氧化酶的应用特性,对其纯化并进行酶学特性研究,结果如图 3 所示。将 KCX56 菌株诱导表达后,经高压匀浆破碎、镍柱纯化得到纯酶,检测蛋白质浓度为 270 μ g/mL。通过 SDS-PAGE 验证如图 3a 所示,预测的重组 *HOX* 蛋白大小为 62 ku。此外,根据之前研究表明^[12],己糖氧化酶具有被蛋白酶切割并成熟化的功能,形成 2 个分子质量分别为 40 ku 和 29 ku 的亚基。SDS-PAGE 图谱中显示,纯化的 *HOX* 蛋白主要为完整肽链的 62 ku 蛋白,40 ku 和 29 ku 的成熟化亚基的含量较少。由于完成切割的 *HOX* 蛋白的活性较高^[9],而在重组表达的蛋白中,经过成熟化 *HOX* 的比例较低,这可能是重组表达的己糖氧化酶活性偏低的原因之一。

如图 3b 所示,重组己糖氧化酶的最适反应温

表2 筛选得到的不同基因型的重组菌株

Table 2 Screened recombinant strains of different genotypes

菌株名称	宿主菌株	质粒	拷贝数	摇瓶酶活/ $10^{-2} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$
GKX07	GS115	pPIC9k	1	0.65 ± 0.07
GKX09			3	1.08 ± 0.15
GKX15			2	0.87 ± 0.08
GKX25			2	0.51 ± 0.09
GKX35			4	1.53 ± 0.21
GKX79			4	1.32 ± 0.12
KCX11			KM71	pPICZA
KCX18	2	1.34 ± 0.19		
KCX19	2	1.90 ± 0.21		
KCX21	2	1.00 ± 0.17		
KCX26	2	1.20 ± 0.2		
KCX43	4	3.81 ± 0.15		
KCX51	1	2.20 ± 0.18		
KCX52	3	3.51 ± 0.0011		
KCX55	3	3.23 ± 0.0023		
KCX56	6	4.92 ± 0.0027		
KPX01	KM71	pGAPZA		
KPX06			1	0.42 ± 0.09
KPX16			2	1.51 ± 0.23
KPX21			2	0.69 ± 0.05
KPX30			3	1.92 ± 0.31
KPX40			1	0.31 ± 0.09

度为 50~60 ℃。在反应温度为 50 ℃时,酶活性达到最高。在小于 50 ℃时,酶活随着反应温度的升高而不断升高。当反应温度大于 60 ℃,酶活逐渐降低,但仍能保持在 80%以上。在温度为 20 ℃,仍表现出 50%的相对酶活,表明重组己糖氧化酶在常温条件下能保持一定的活性。如图 3c 所示,重组己糖氧化酶的最适反应 pH 为 4.0,即酸性条件下表现出最高的酶活,适用于酸性食品的保鲜和抗氧化。

纯化的重组己糖氧化酶的热稳定性如图 3d 所示,在温度为 20~60 ℃之间,酶活较为稳定,保温 1 h 后仍能维持在 70%~90%之间的活性。当温度超过 60 ℃,酶活力迅速下降。在 70 ℃时,酶活损失约 80%。当温度达到 80 ℃时,酶完全失活。该红藻来源的重组己糖氧化酶不能耐受高温条件。重组己糖氧化酶的 pH 稳定性如图 3e 所示,将纯酶置于不同 pH 值的缓冲液及最适反应温度 50 ℃条件下放置 5 h,测定残留酶活。当酶置于 pH 3.0~

6.0 之间环境下时,酶活十分稳定,保持 90%左右的活性,表明该酶具有很强的耐受酸性环境能力,进一步证实己糖氧化酶适用于偏酸性食品的除氧保鲜和抗氧化保护。当置于中性或偏碱性环境中时,酶活难以维持,活性下降较快,在 pH 9.0 环境中,5 h 内残留 60%的活性。

己糖氧化酶是一种底物谱广泛的氧化还原酶,本研究选择了葡萄糖、果糖、半乳糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖作为底物,比较重组 HOX 的底物催化活性,结果如图 3f 所示。在最适温度(50 ℃)和 pH 值(4.0)条件下,进行重组 HOX 氧化反应。以酶的最适底物对应的酶活设为 100%,计算与其它底物反应时的相对酶活,结果表明重组 HOX 对以上 6 种糖均具有不同程度的催化活性,其中葡萄糖是 HOX 的最适底物,对乳糖和麦芽糖也具有较高的活性,证实己糖氧化酶可用于不含葡萄糖而富含二糖的食品的保鲜和抗氧化保护,如富含麦芽糖的面制品和富含乳糖的乳制品等。

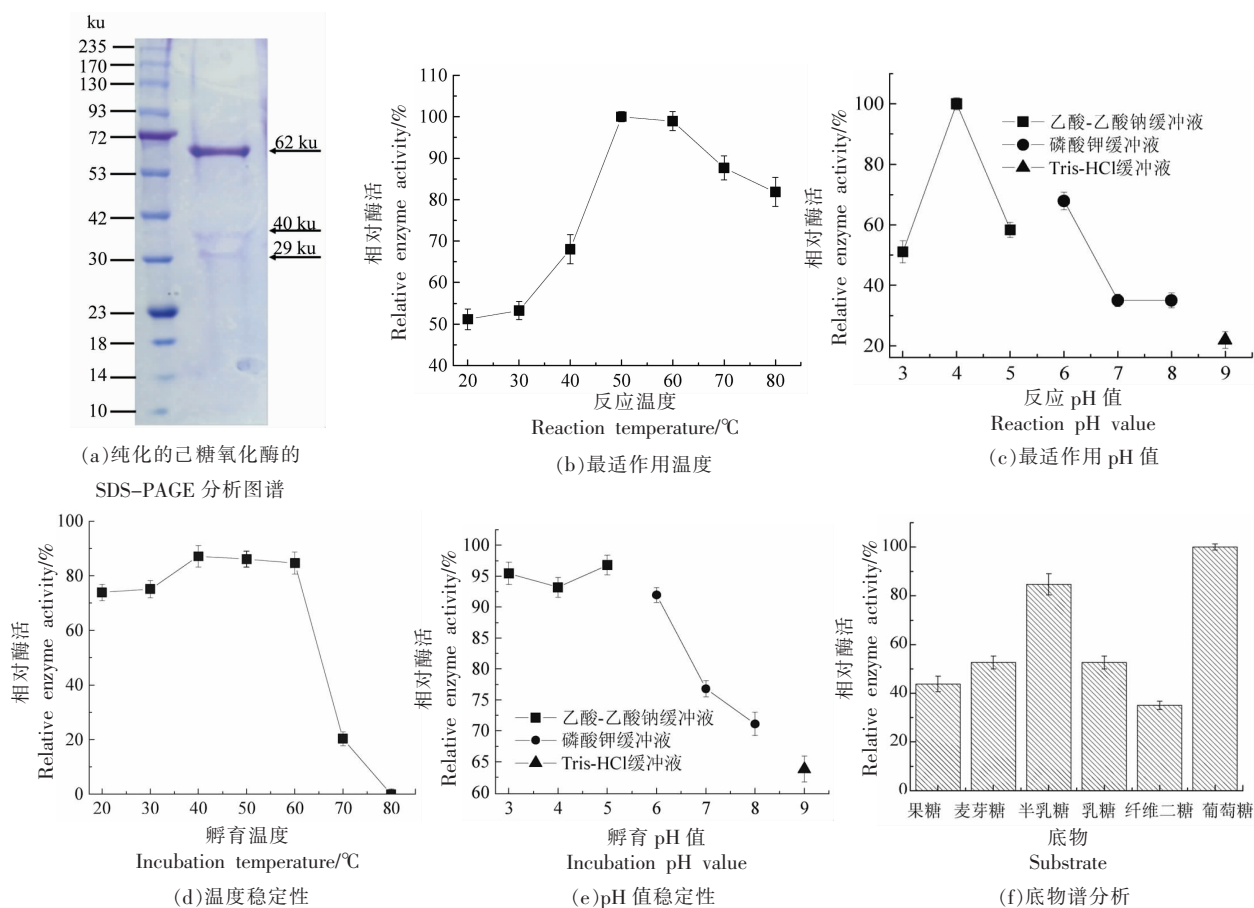


图 3 重组己糖氧化酶的酶学性质

Fig.3 Enzymatic properties of recombinant hexose oxidase

3 结论

作为新型保鲜和抗氧化添加剂,红藻来源的己糖氧化酶的制备是限制其推广应用的瓶颈之一。本研究综合评价了己糖氧化酶在毕赤酵母中过量表达的不同策略,并表征了重组表达的己糖氧化酶的特性。应用 3 步法筛选,获得了 6 株 Mut⁺ 型甲醇诱导表达重组菌株、10 株 Mut^s 型甲醇诱导表达重组菌株和 6 株 Mut^s 型组成型表达重组菌株。比较这些重组菌株的发酵酶活,结果表明甲醇代谢缓慢的 Mut^s 型毕赤酵母酵母菌株有利于己糖氧化酶的表达和发酵;相比于组成型表达策略,甲醇诱导型表达方式获得更高的活性;HOX 基因拷贝数的增加,有助于酶活的提高。虽然优化了以上表达策略,但是己糖氧化酶在毕赤酵母菌种的表达水平并不高,最高摇瓶发酵酶活为 4.92×10^{-2} U/mL,其高效表达的限制性因素仍需进一步研究。

针对纯化的重组己糖氧化酶的酶学特性研究表明,其最适底物为葡萄糖,对麦芽糖、乳糖、果糖等均具有催化活性。最适温度为 50~60 °C,在 20 °C 时仍维持 50% 的活性。最适反应 pH 值为 4.0,即适用于酸性环境。在低温条件和低 pH 值条件,其稳定性较好。综上,该重组己糖氧化酶可用于一些葡萄糖含量少而其它糖类含量高如麦芽糖(面制品)和乳糖(乳制品)等且偏酸性的相关食品,用于常温条件下保鲜和抗氧化。

参 考 文 献

- [1] 包怡, 胡友明, 朱林江, 等. 己糖氧化酶的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 218-223.
BAO Y, HU Y M, ZHU L J, et al. Research progress on hexose oxidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(3): 218-223.

- [2] IKAWA M, MA D S, MEEKER G B, et al. Use of *Chlorella* in mycotoxin and phycotoxin research[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1969, 17(3): 425-429.
- [3] SØE J B, PETERSEN L W, SOEE J B. Method of reducing or preventing Maillard reactions in potato with hexose oxidase: US6872412B2[P]. 2005-03-29 [2022-02-18].
- [4] JR RAND A G. Direct enzymatic conversion of lactose to acid: Glucose oxidase and hexose oxidase[J]. Journal of Food Science, 1972, 37(5): 698-701.
- [5] ALMEIDA E L, CHANG Y K. Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour[J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 49(1): 64-72.
- [6] BEAN R, HASSID W. Carbohydrate oxidase from a red alga, *Iridophycus flaccidum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1956, 218(1): 425-436.
- [7] JR SULLIVAN J D, IKAWA M. Purification and characterization of hexose oxidase from the red alga *Chondrus crispus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1973, 309(1): 11-22.
- [8] OGASAWARA K, YAMADA K, HATSUGAI N, et al. Hexose oxidase-mediated hydrogen peroxide as a mechanism for the antibacterial activity in the red seaweed *Pilophora subcostata*[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149084.
- [9] WOLFF A M, HANSEN O C, POULSEN U, et al. Optimization of the production of *Chondrus crispus* hexose oxidase in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2001, 22(2): 189-199.
- [10] STOUGAARD P, HANSEN O C. Hexose oxidase-encoding DNAs and methods of use thereof: US7745599B1[P]. 2010-06-29[2022-02-18].
- [11] COOK M W, THYGESEN H V. Safety evaluation of a hexose oxidase expressed in *Hansenula polymorpha* [J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41: 523-529.
- [12] HANSEN O C, STOUGAARD P. Hexose oxidase from the red alga *Chondrus crispus*: Purification, molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(17): 11581-11587.
- [13] CREGG J M, CEREGHINO J L, SHI J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Molecular Biotechnology, 2000, 16(1): 23-52.
- [14] YANG Z L, ZHANG Z S. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(1): 182-195.
- [15] 郜赵伟. 葡萄糖氧化酶基因密码子优化及其在毕赤酵母中的高效表达[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- GAO Z W. Codon optimization and high level expression in *Pichia pastoris* of glucose oxidase [D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [16] 宣姚吉, 周祥山, 张元兴. 实时荧光定量 PCR 检测毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(12): 1236-1243.
- XUAN Y J, ZHOU X S, ZHANG Y X. Determination of copy number of foreign gene in genome of *Pichia pastoris* by real-time fluorescent quantitative PCR[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2009, 22(12): 1236-1243.

Optimization of Heterologous Expression of Novel Antioxidant Hexose Oxidase from Red Alga and Its Enzymatic Properties

Ma Weilin, Bao Yi, Lu Yuele, Zhu Linjiang*, Chen Xiaolong

(College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract Active peptides or food enzymes with natural antioxidant function are green, safe and reliable, and have attracted wide interest as green and multifunctional food additives. Hexose oxidase (HOX), a D-hexose:O₂ 1-oxidoreductase, and has the functions of deoxygenation, acidification and improving protein crosslinking. In order to optimize the expression strategies of hexose oxidase in *Pichia pastoris*, different genotype host strains, different gene expression modes and different gene copy number in transformants were systematically compared. The transformants with different genotypes were obtained by the newly established three-step screening method, and their enzyme activities by fermentation were

compared. The results showed that Mut^s host with slow methanol metabolism generated higher HOX activity; inducible expression by methanol was better than constitutive expression by GAP promoter; higher gene copy number of *HOX* gene generated higher enzyme activity. Although these factors related to gene expression in *P. pastoris* had been optimized, the HOX activity was still in a low level, and the maximum activity produced by KCX56 strain was 4.92×10^{-2} U/mL, which contained six gene copy number. The purification of recombinant HOX showed that there were three recombinant proteins with the molecular weight of 62, 40 ku and 29 ku, respectively. They should be protoenzyme of hexose oxidase and two subunits formed by proteolytic cleavage. Among them, the proportion of protoenzyme with low activity was much higher than other two, which may be one of the reasons for the low fermentation activity by these recombinant strains. The study of enzymatic characteristics showed that the optimum conditions for the recombinant HOX were 50–60 °C and pH 4.0, and it can maintain 50% activity at room temperature (20 °C). Under low temperature (20–60 °C) and acidic conditions (pH 3.0–6.0), HOX activity can be stably maintained, so it is an antioxidant enzyme with good acid resistance, meaning that HOX is suitable for the preservation and antioxidant application for acidic foods.

Keywords hexose oxidase; *Pichia pastoris*; food enzymes; natural antioxidant