

# 葡萄糖氧化酶的高效表达及热稳定性研究

小组：G05

组长：闫亚茹

组员：张亚朵、王铤

# 目录

1/研究背景

3/研究策略

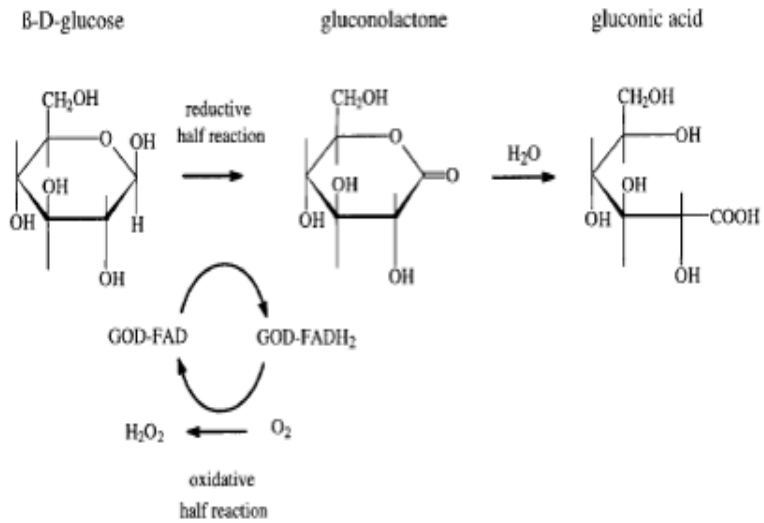
2/研究目的 及意义

4/研究结果

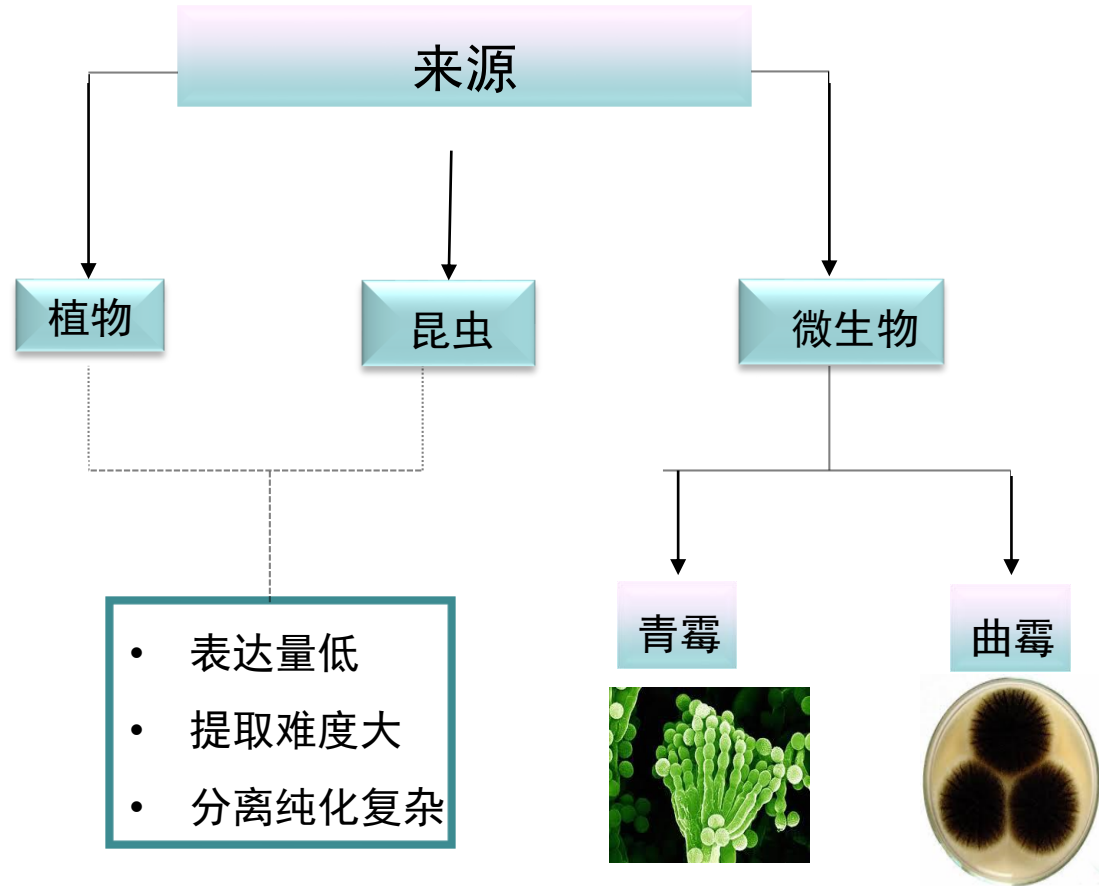
5/后续研究计划

# 1/研究背景

## • 催化机制



## • 葡萄糖氧化酶的来源



# 1/研究背景

## 葡萄糖氧化酶应用

### Food industry

- 替代溴酸钾等有毒添加剂
- 防止美拉德反应
- 杀菌作用，延长货架期
- 改善果蔬汁浊度



### Feed industry

- 消除病原菌，调节肠道菌群平衡
- 解除霉菌毒素中毒，提高饲料品质
- 可替代部分抗生素



应用

### Textile industry

- 棉织物漂白、稳定剂



### Pharmaceuticals industry

- 血糖、尿糖检测生物传感器
- 口腔护理抗微生物剂
- 葡萄糖酸钙、锌口服液



# 1/研究背景

## GOD产业化应用的限制因素

热稳定性差  
不能耐高温

非理性设计：  
突变体库  
有效筛选  
盲目性  
工作量大

理性设计：  
了解结构功能和催化机制；同源序列比对、二硫键、Pro、 $\Delta\Delta G_u$ ，定点突变，效率高

产量低  
添加成本高

毕赤酵母表达系统，  
码子优化，发酵条件优化，信号肽优化，折叠酶、分子伴侣过表达

## 2/研究目的与意义

### 目的

运用微生物基因工程与分子生物学手段改造探索GOD<sub>p</sub>高效表达策略；

通过计算机理性设计解析GOD<sub>p</sub>中与热稳定性相关的关键氨基酸，并获得热稳定性提高的突变蛋白。

### 意义

开发一种耐热、低成本生产的新型葡萄糖氧化酶制剂，将大力推动该酶在饲料添加剂等领域的应用。

### 3/研究策略-高效表达

选择毕赤酵母  
GS115做表达宿主

密码子优化

GOD高效表达  
-辅因子共表达策略

gene	Gene ID	function
GCN4	856709	responsible for the activation of more than 30 genes required for amino acid
SEC53	850499	protein targeting to ER
SEC61	8196437	protein transport
KIN2	850785	exocytosis
BMH2	851676	regulation of ubiquitin protein ligase activity
HAC1	8196642	DNA-binding transcription factor activity
PDI	11372507	Protein disulfide isomerase
ERO1	854909	oxidizes proteins in the endoplasmic reticulum to produce disulfide bonds
COF	13000443	hydrolase

选取转录、折叠、转运分泌  
相关途径辅因子

构建辅因子共表达重组载体

构建辅因子共表达酵母工程菌株

重组菌株GOD表达量评估

### 3/研究策略-提高热稳定性

计算机辅助理性设计

基于POPMusic进行理性设计

基于分子动力学模拟进行设计

PoPMusic在线服务器：预测单点突变对蛋白质**解折叠自由能**的影响。在1分钟之内预测出所有氨基酸突变点的自由能变化，并给出突变氨基酸自由能变化的列表。选择去折叠自由能变化显著的氨基酸作为备选突变位点，再除去**保守位点**和**活性中心5埃**以内的点。

去折叠自由能变化显著的氨基酸作为备选突变位点

多序列比对除去保守位点和活性中心5埃以内的点

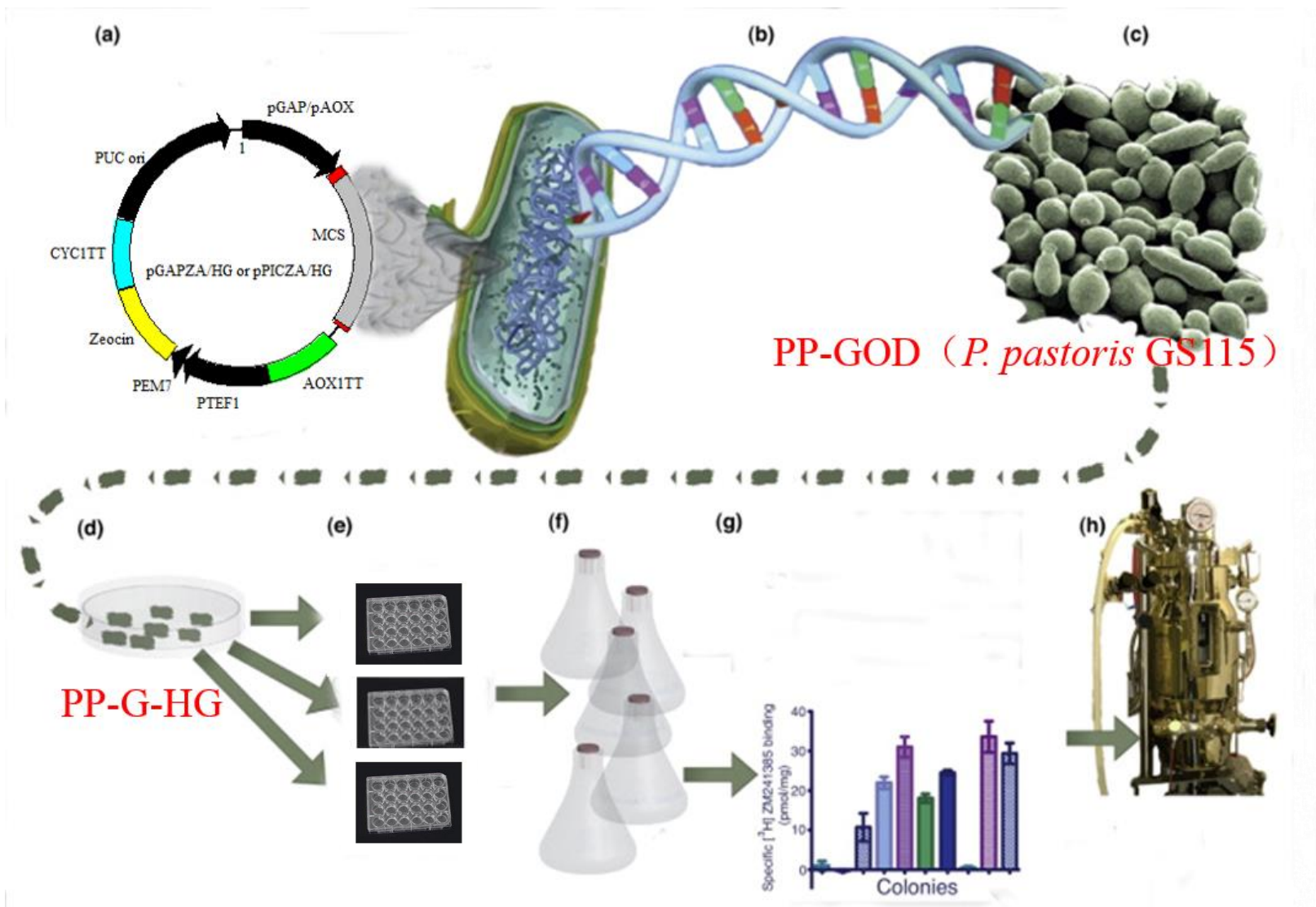
构建毕赤酵母突变体

筛选突变体中热稳定性提高突变株

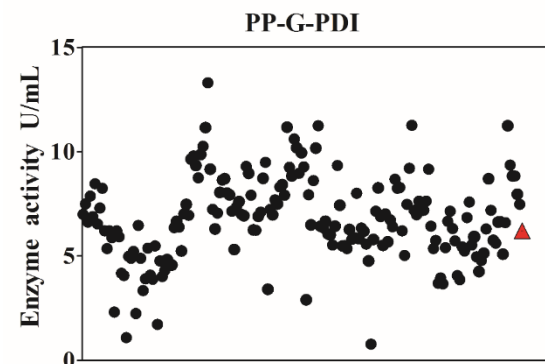
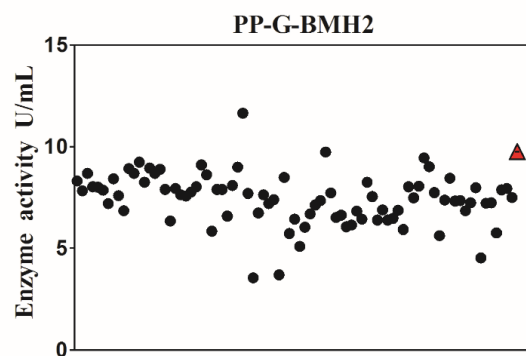
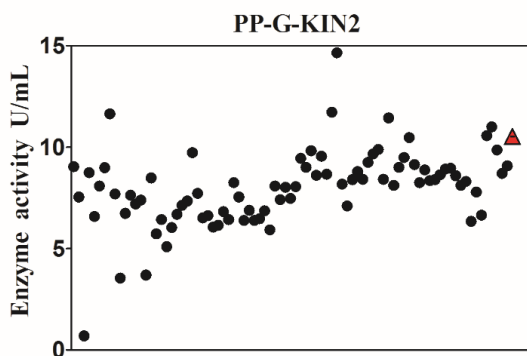
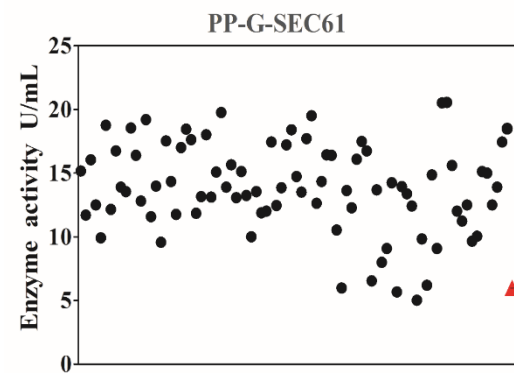
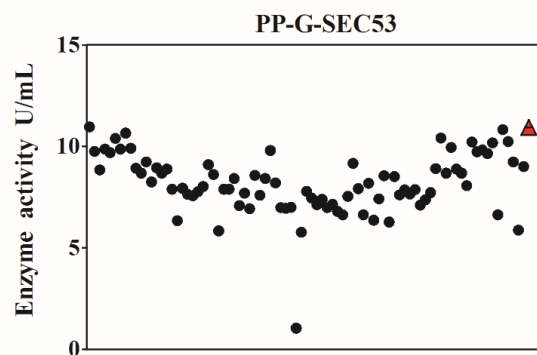
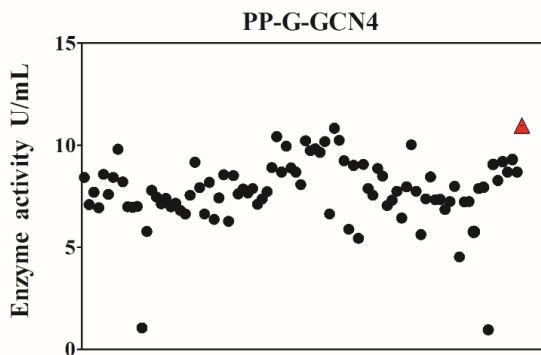
PoPMusic只用了野生酶的晶体结构，而晶体结构只是蛋白质的一种特殊构象，无法反应酶在水溶液中的构象。分子动力学模拟就是通过计算机对原子核和电子所构成的的微观粒子之间的相互作用和运动进行模拟，是一个动态变化的过程。去除保守位点，活性中心5埃以内的点。



### 3/研究策略-实验流程

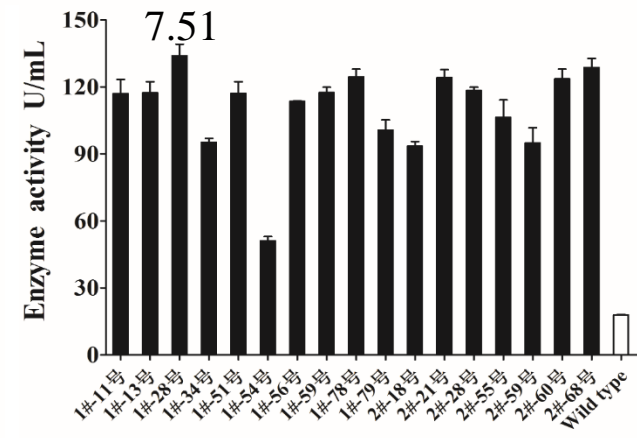
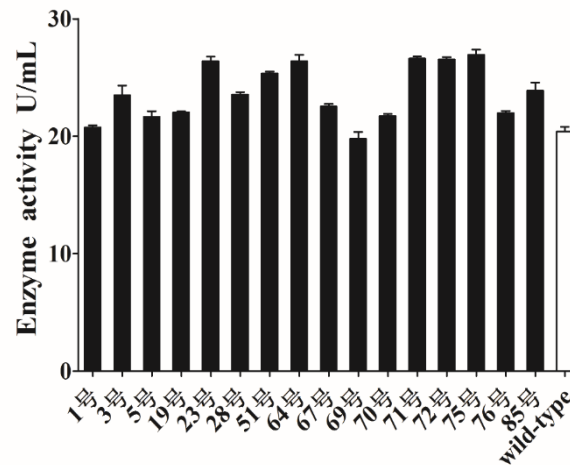
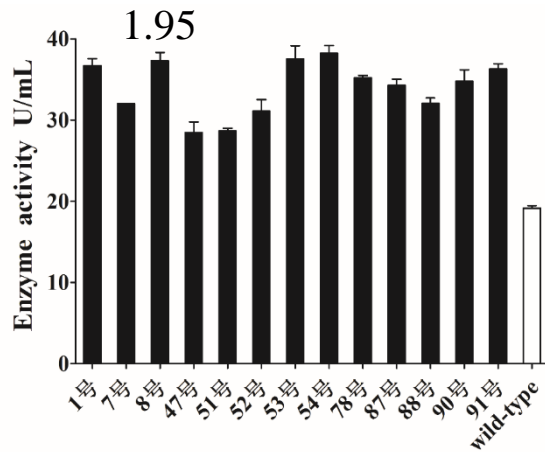
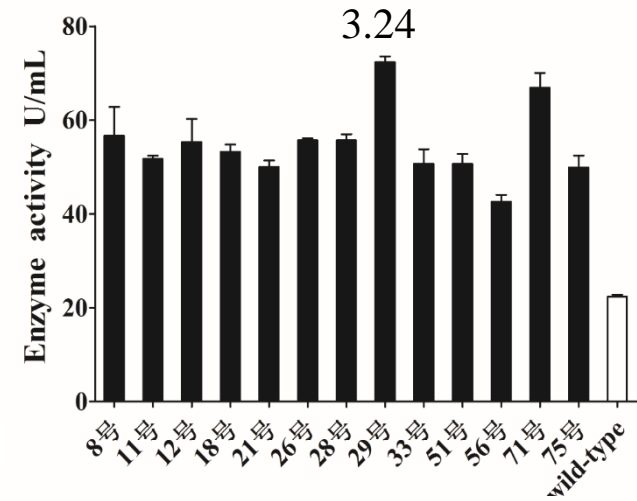
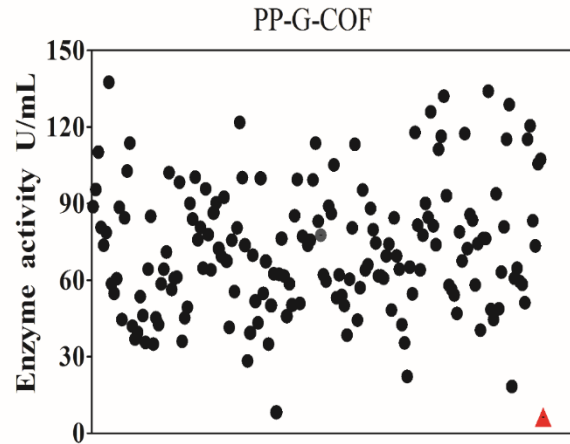
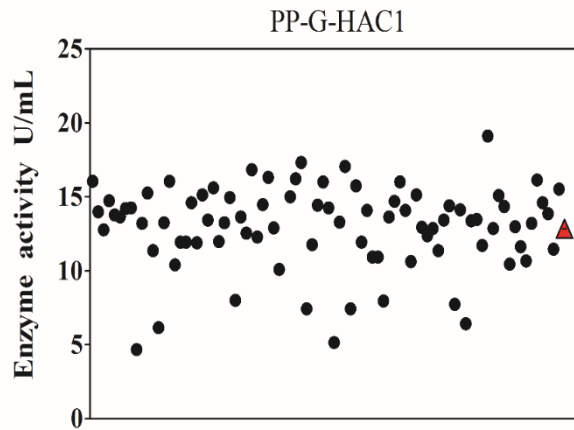


# 4/研究结果-共表达辅因子对GOD表达的影响



▲代表wild type; ●代表重组菌株

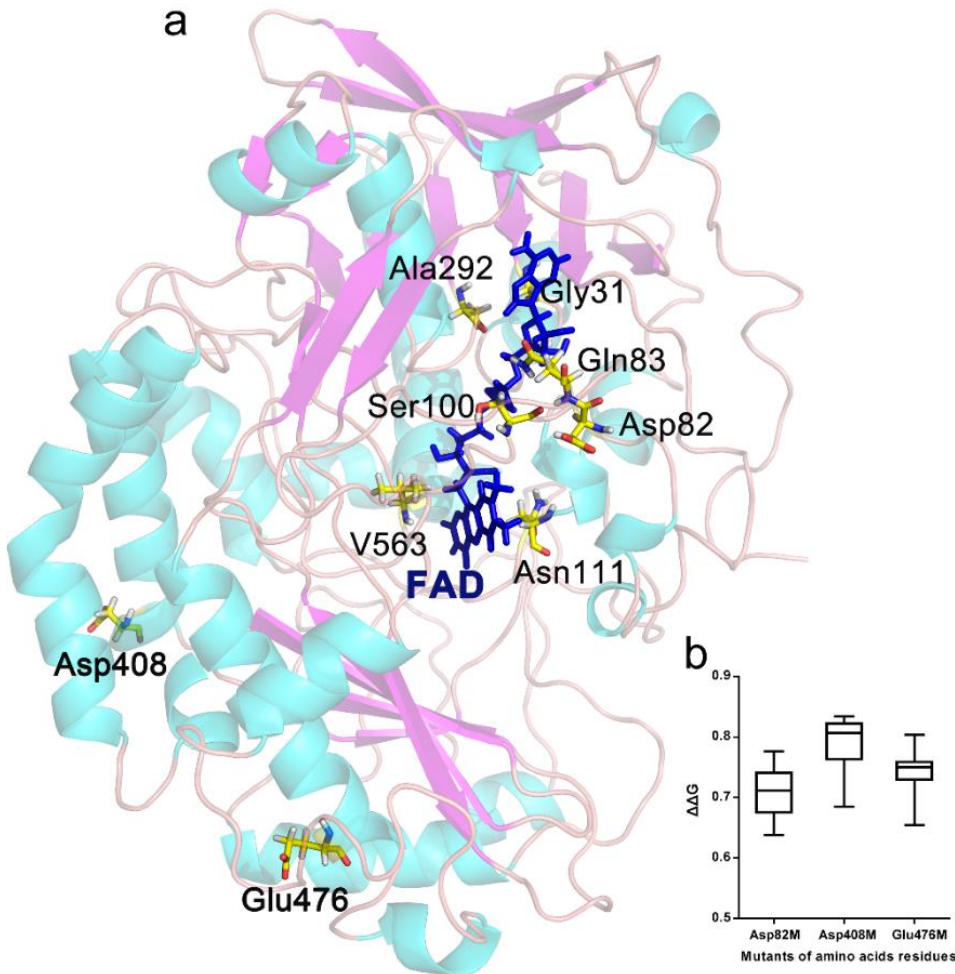
# 4/研究结果-共表达辅因子对GOD表达的影响



## 4/研究结果-共表达辅因子对GOD表达的影响

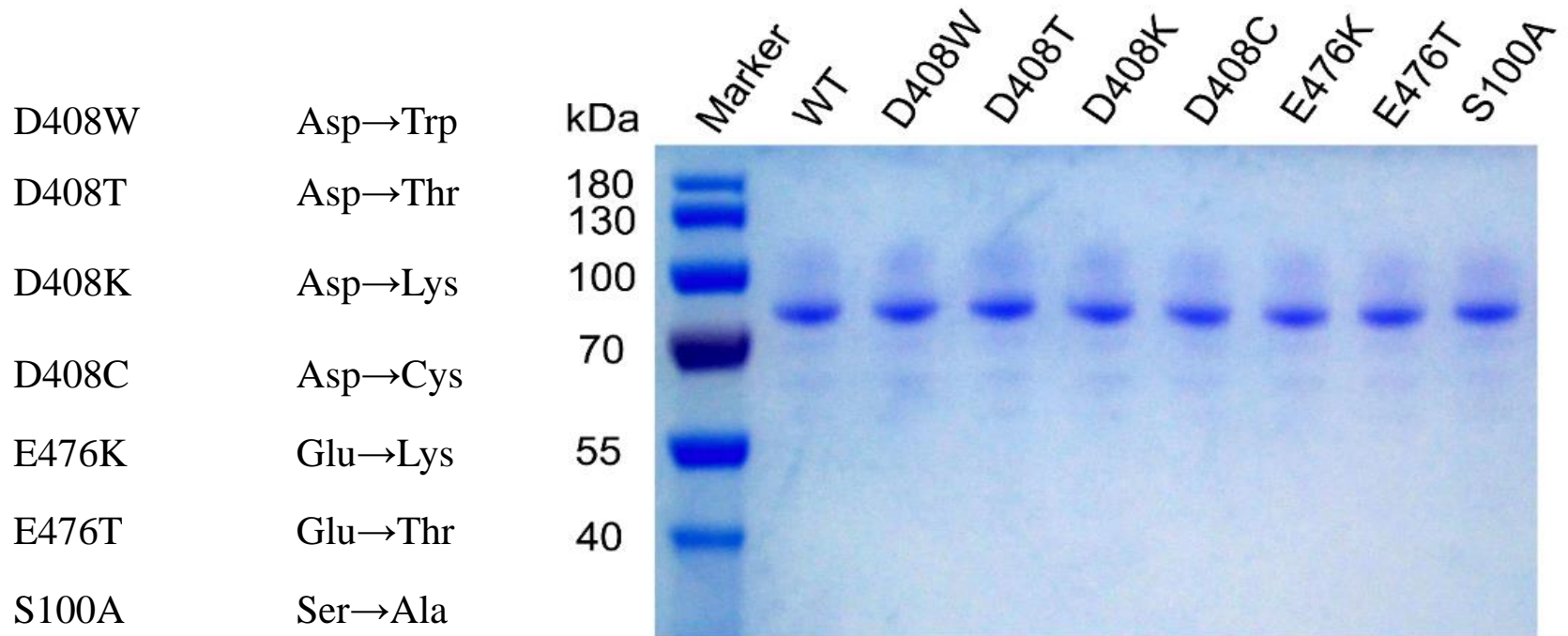
辅因子	与WT相比GOD酶活提高幅度
GCN4、SEC53、 KIN2、BMH2	-
SEC61	发酵罐小试，是WT的4.11倍
PDI	摇瓶水平发酵，是WT的1.95倍
ERO1	摇瓶水平发酵，是WT的1.32倍
COF	发酵罐小试，是WT的8.6倍
HAC1	摇瓶水平发酵，是WT的1.38倍

# 4/研究结果-理性设计提高GOD热稳定性



突变位点设计方式	突变位点
解折叠自由能变化预测	Asp82
	Asp408
	Glu476
与FAD结合可引入额外分子作用力氨基酸	Gly31
	Gln83
	Ser100
	Asn111
	Ala292
	Val563

## 4/研究结果-理性设计提高GOD热稳定性



SDS-PAGE检测，突变体GOD蛋白野生型GOD蛋白大小保持一致。

统一蛋白浓度，进行热稳定性的测定。





## 4/研究结果-理性设计提高GOD热稳定性

### 半衰期及 $T_m$ 测定

Mutant	$t_{1/2}$ (min)	$T_m$ (° C)
WT	75.3	60.7
D408W	407.7	61.9
D408T	315.1	61.7
D408K	239.0	61.6
D408C	57.3	60.1
E476T	110.0	60.9
E476K	216.6	62.0
S100A	462.1	65.1



## 5/后续研究计划

### 葡萄糖脱氢酶

底物专一性较差：木糖、2-脱氢-D-葡萄糖、麦芽糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖、半乳糖等

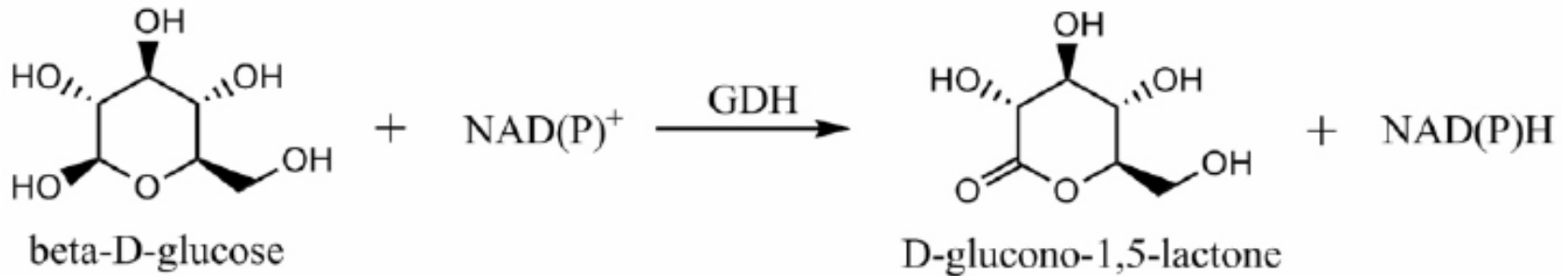
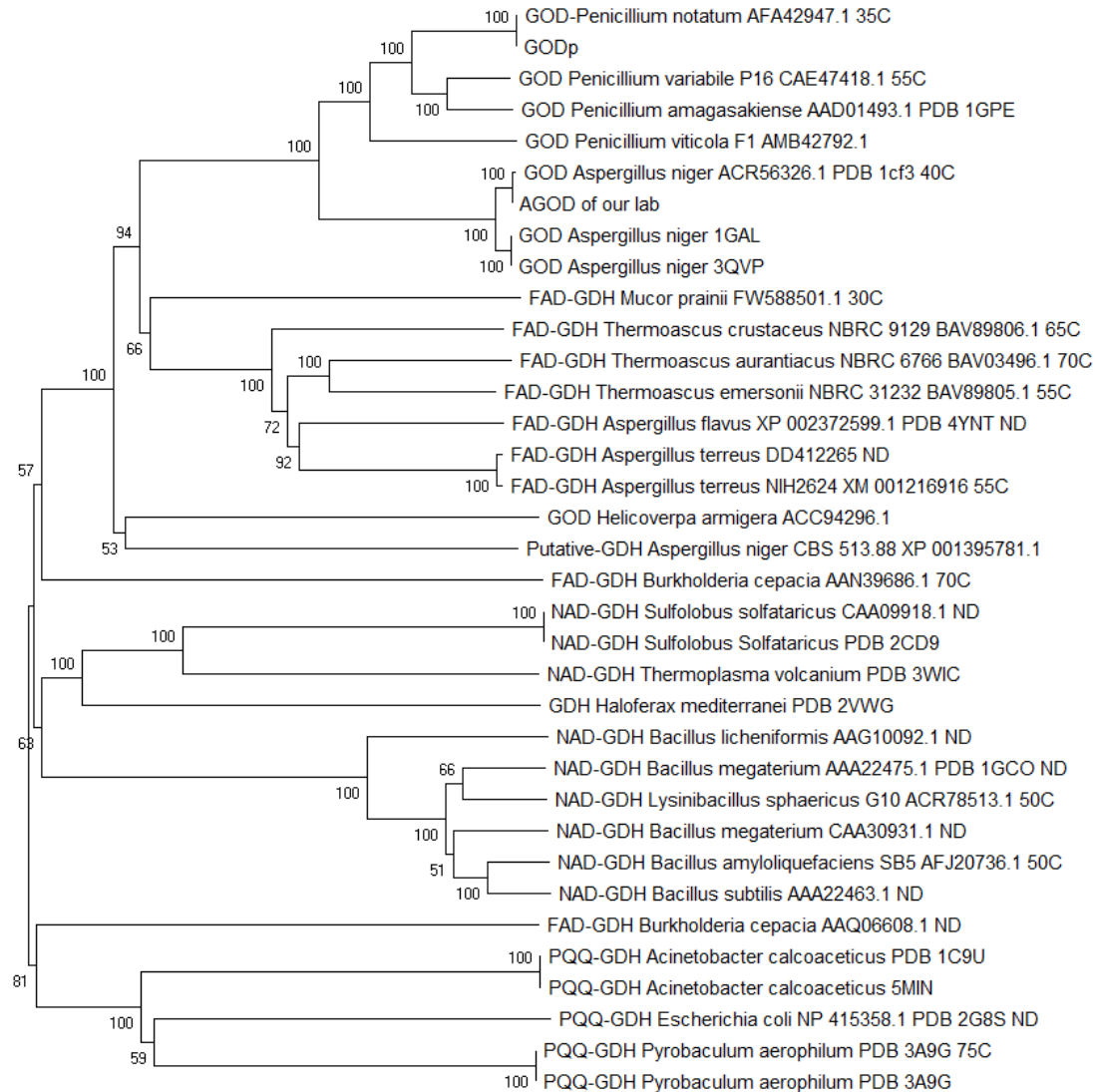


图 1.1 葡萄糖脱氢酶反应机制

# 5/后续研究计划



---

Thanks for your attention!