

黑曲霉 GOD 基因 在枯草芽孢杆菌中的表达

于思颖 程 鹏 张静博 曹平华 李元晓 马彦博 李 旺*

河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳 471023

摘要 通过初筛和复筛, 筛选出高产 GOD 的黑曲霉菌种(*Aspergillus niger*), 提取黑曲霉的基因组 DNA, 以此为模板扩增 GOD 基因, 将目的基因密码子优化后, 插入表达载体 pT7M, 导入枯草芽孢杆菌 7024E 中, 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测表达情况, 旨在研究黑曲霉葡萄糖氧化酶(GOD)基因在枯草芽孢杆菌中的表达。试验结果显示, 成功筛选出 1 株高产 GOD 的黑曲霉菌株(P-1), 从其基因组中克隆了 GOD 基因, 该基因序列全长 1 818 bp, 编码 605 个氨基酸; 构建了表达载体并转化至宿主, 构建重组 GOD 基因枯草芽孢杆菌, 2% 木糖诱导发酵, SDS-PAGE 和 Western-blot 检测到重组枯草芽孢杆菌能够表达 GOD。表明 GOD 基因在野生型枯草芽孢杆菌中获得了成功表达。

关键词 葡萄糖氧化酶; 黑曲霉; 基因重组; 枯草芽孢杆菌

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)是一类含有黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotide, FAD)的二聚体蛋白酶, 能够特异性催化 β -D-葡萄糖被氧化成葡萄糖酸和过氧化氢^[1]。GOD 基于其安全无毒等特性广泛地应用于饲料添加剂、食品、制药和化学等领域^[2-7]。

枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)作为一种革兰氏阳性菌, 已被美国食品药品监督管理局(FDA)评为生物安全(Generally regarded as safe, GRAS)菌株^[8], 具有易于培养、繁殖速度快、遗传背景清晰等特点。与大肠杆菌相比, 其具有优异的蛋白分泌能力, 方便下游表达产物的分离; 同时, *B.subtilis* 具有良好的发酵工艺技术, 这为目的产物进一步扩大生产提供了基础。*B.subtilis* 表达系统已表达了多种产物并广泛应用于制药、食品和饲料等行业中^[9-13]。

目前, 大部分 GOD 为野生菌或诱导菌生产, 存在酶活力低且后续纯化困难等问题, 基因工程表达的 GOD 宿主多为毕赤酵母, 由于毕赤酵母的表达往

往需要甲醇诱导, 难以直接应用于饲料和养殖生产。因此, 本研究克隆了来源于黑曲霉的 GOD 基因, 以野生型动物益生菌为宿主, 以期获得高效表达 GOD 的枯草芽孢杆菌, 推动其在动物养殖中的应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 土样: 采自河南省洛阳市某葡萄园, 采用多点混合法采集 0~10 cm 的土壤。

2) 菌株、质粒和引物见表 1。

3) 主要试剂: 邻联茴香胺、辣根过氧化物酶、真菌 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker、蛋白质 Marker 购自 Takara 公司; T₄ DNA 连接酶、Not I、Nde I、Hind III 限制性内切酶购自 Sigama 公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2021-05-25

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE0129900)

*通讯作者

于思颖, 女, 1995 年生, 硕士。

表 1 本试验所用菌株、质粒和引物

菌株、质粒和引物	特征	来源
大肠杆菌 DH5α	用来构建和克隆目的基因	全式金生物
枯草芽孢杆菌 7024E	作为表达目的基因的宿主	金斯瑞生物科技有限公司提供
质粒 pGEM-T Easy	用来构建克隆载体	Promega
质粒 pT7M	用来表达目的基因	金斯瑞生物科技有限公司提供
引物(5'-3')	ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG	北京六合华大基因公司合成
	ITS4:TCCTCCGCTTATGTATGTC	
	F:ATGCAGACTCTCCTGTGAG	
	R:CACTGCATGGAAGCATAATC	

4) 培养基。

① 平板分离培养基:葡萄糖 80 g/L、蛋白胨 3 g/L、硫酸铵 0.4 g/L、磷酸二氢钾 0.19 g/L、硫酸镁 0.16 g/L、碳酸钙 3.5 g/L、可溶性淀粉 10 g/L、碘化钾 1.7 g/L、脱氧胆酸钠 0.2 g/L、加入适量链霉素(100 μg/mL)、琼脂粉 15 g/L、磷酸缓冲液 0.1 mol/L, pH 为 5.6。

② 发酵培养基:葡萄糖 80 g/L、蛋白胨 3 g/L、磷酸二氢钾 2 g/L、硫酸镁 0.7 g/L、氯化钾 0.5 g/L、硝酸钠 0.4 g/L、碳酸钙 3.5 g/L, 自然 pH。

③ PDA 培养基:马铃薯 200 g(加水 1 L, 煮沸 30 min, 纱布过滤), 葡萄糖 20 g, 补水至 1 L, 自然 pH, 配制固体培养基时加入琼脂粉 20 g/L。

④ LB 培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L; pH 7.0, 121 °C 下灭菌 20 min, 配置固体培养基时加入琼脂粉 20 g/L。抗性培养基中 Amp 的最终质量浓度是 100 μg/mL。

1.2 试验方法

1) 菌株筛选。采用 Fiedure.K.J 显色法, 称取 10 g 采集的土样置于灭菌的装有 100 mL 生理盐水且带有适量玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C, 160 r/min 振荡培养 30 min。然后用无菌水稀释上清液至 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3 个稀释度, 分别用无菌枪头吸取 100 μL 涂布于预先配制且灭菌的平板分离培养基, 28 °C 培养 3 d 后置于 4 °C 冰箱中静置, 观察蓝紫色颜色圈, 选取较大颜色圈中的菌株接种于 PDA 斜面培养基, 28 °C 培养至长出成熟孢子, 保存于 4 °C。将初筛得到的斜面培养的菌株接种于发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 5 d, 取发酵上清液及菌体测酶活。

2) 酶活力测定方法。

① 葡萄糖氧化酶酶活的定义: 在 pH 5.6, 温度为

30 °C 的条件下, 每分钟催化 1 μmol 葡萄糖转化为葡萄糖酸和过氧化氢所需的葡萄糖氧化酶的量定义为 1 个酶活力单位(U)。

② 底物体系: 吸取 1 mL 5% 葡萄糖溶液, 2 mL 0.07 g/L 邻联茴香胺溶液, 0.1 mL 60 U/mg 辣根过氧化物酶溶液于同一试管中, 30 °C 恒温水浴 10 min。

③ 酶活测定: 吸取 0.1 mL 稀释 10 倍后的粗酶液于底物中摇匀, 于波长 460 nm 处每 1 min 记录 1 次吸光度值(A_{460nm}), 共测定 5 min, 以 A_{460nm} 对时间作图, 计算最大斜率 ΔA (min), 根据下式计算酶活(X):

$$X = \Delta A * f / (11.3 * t * V_1 / V_2)$$

式中: f 为粗酶液稀释倍数; 11.3 为消光系数; t 为感应时间, min; V₁ 为粗酶液体积, mL; V₂ 为反应液总体积, mL。

3) 基因组 DNA 的提取与目的基因的克隆。

① 菌体的预处理: 采用 PDA 培养基平板活化待测菌株, 于 28 °C 培养至长出褐色孢子, 之后接种于 PDA 液体培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 2~3 d, 过滤出菌体, -80 °C 冻存。

② 基因组 DNA 的提取与鉴定: 取冻存的菌体, 在液氮中研磨, 称取 0.2 g 研磨后的菌体, 参照真菌 DNA 抽提试剂盒提取待测菌株的基因组 DNA, -20 °C 保存备用。采用真菌通用引物 ITS1 与 ITS4 对 5.8S rDNA-ITS 区序列进行 PCR 扩增(94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 运行 35 个循环, 72 °C 终延伸 10 min), PCR 反应产物送至北京六合华大基因公司测序。

③ 目的基因的克隆: 根据 NCBI GenBank 上已公布的黑曲霉 GOD 基因序列(登录号: MH593586.1), 设计克隆 GOD 基因所用的特异性引

物 F、R。以黑曲霉基因组 DNA 为模板, F、R 为引物进行 PCR 扩增(98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 运行 30 个循环), PCR 产物经纯化回收后得到 GOD 基因片段, 连接 pGEM-T Easy 载体, 并转化 *E. coli* DH5 α , 通过蓝白斑筛选, 挑取白斑单菌落经菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆子, 提取 pGEM-T-GOD 质粒双酶切验证后送测序, 保存测序正确的菌株。

4) 重组表达质粒的构建。结合枯草芽孢杆菌密码子偏好性, 对黑曲霉 GOD 编码序列进行密码子优化, 优化后的氨基酸序列及核酸序列如下, 在 N 端加上了 34 个氨基酸信号肽(绿色部分), C 端加上了 His-tag(红色部分)。在核酸序列两端添加 NdeI(黄色序列)和 Hind III(灰色序列)酶切位点, 核酸序列全长 1 902 bp, 编码 629 个氨基酸, 蛋白分子量约 68.44 ku, 序列交由公司(南京金斯瑞)合成。

氨基酸序列: MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLF-HLVLAGPAAASAE-Protein-HHHHHH.

核酸序列 pGOD: CATATGTTTGCAAAC-GATTCAAAACCTCTTTAC

TGCCGTTATTCGCTGGATTTTTATTGCTGTTTCTTTGTTCTGGCAGGACCGCGGCTGCGAGT - GCTGAA-DNAsequence-CACCACCATCATCAT - CATTAATGAAAGCTT

分别酶切目的片段 GOD 和载体质粒 pT7M, 用胶回收试剂盒将片段 GOD 的酶切产物和质粒 pT7M 的酶切产物回收纯化。在 T4 DNA 连接酶的作用下构建重组质粒 pT7M-GOD, 转化 *E. coli* DH5 α , 经 Amp(氨苄青霉素)抗性平板筛选和双酶切鉴定, 同时送至华大基因公司测序验证, 保存测序正确的菌株。

5) 枯草芽孢杆菌的转化及诱导表达。将鉴定正确的重组质粒 pT7M-GOD 通过化学转化的方式转入枯草芽孢杆菌 7024E 感受态中, 在 37 °C、200 r/min 摇床复苏培养 60 min 后涂于含有 12.5 μ g/mL 四环素的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养过夜。选取 3 株长势良好的单菌落, 分别接种于含有 12.5 μ g/mL 四环素的 4 mL LB 培养基中, 分为 3 组, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6~0.8 时, 第 1 组作为阴性对照, 不添加诱导剂; 第 2 组加入终浓度为 2% 木糖诱导表达, 25 °C 诱导培养 16 h; 第 3 组加入终浓度为 2% 木糖诱导表达, 37 °C 诱导培养 4 h。

6) 目的基因的表达。收集培养物上清与菌体沉

淀, 在沉淀中加入裂解液(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油, pH 8.0), 用超声波破碎仪破碎。分别取培养物上清, 全细胞裂解液, 破碎液上清与沉淀, 加入 5 \times loading buffer 混匀, 煮沸 10 min, 通过 SDS-PAGE 检测粗蛋白的表达情况, 通过制备单克隆抗体, 利用 Western-blot 检测目的基因的表达。

2 结果与分析

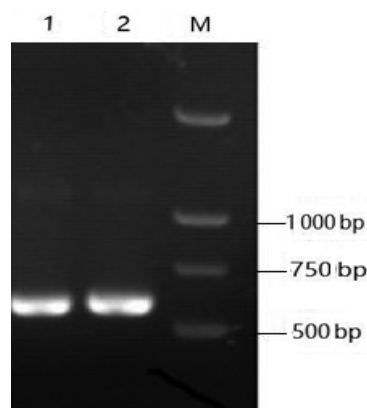
2.1 产酶菌株的筛选与鉴定

通过对采集的土样进行初筛和复筛, 得到 4 株产胞内 GOD 酶活较高的菌株, 测得酶活力如表 2 所示, 由表 2 可以看出, 菌株 P-1 产酶性能较好, 发酵 5 d 后发酵液中 GOD 酶活为 2.820 U/mL, 选定菌株 P-1 为出发菌株进行后续研究。

表 2 分离菌株产 GOD 酶活测定结果

菌株	H-1	P-1	P-2	P-3
平均酶活/(U/mL)	1.177	2.820	1.655	1.373

分析菌株 P-1 的生长及形态特征, 与曲霉鉴定手册中黑曲霉比较接近。利用真菌通用引物 ITS1/ITS4, 扩增菌株 P-1 的 ITS 区基因, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果与理论编码序列大小相符, 如图 1 所示。将测序得到的菌株 P-1 ITS 区基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 并构建系统发育树见图 2。由图 2 可知, 与 GenBank 数据库中曲霉菌相关菌株的 ITS 区基因序列的 5.8S rDNA-ITS 区序列比较分析, 发现其与曲霉属(*Aspergillus* sp.) 的黑曲霉(*Aspergillus niger*) 亲缘关系最近。综合菌株的菌落形态、生长特性及 5.8S rDNA-ITS 区序列系统进化分析, 确定菌株 P-1 为黑曲霉。



注: M, DNA 分子质量标准; 1、2: PCR 产物。

图 1 菌株 P-1 的 IST 区基因 PCR 产物

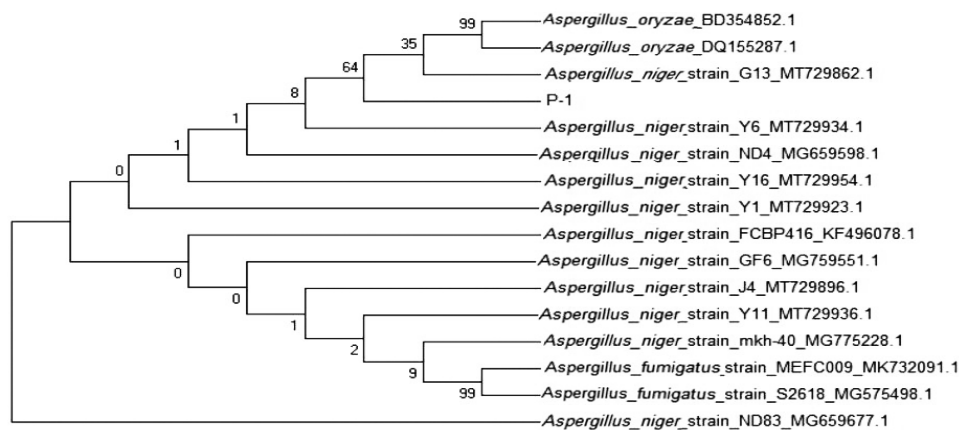
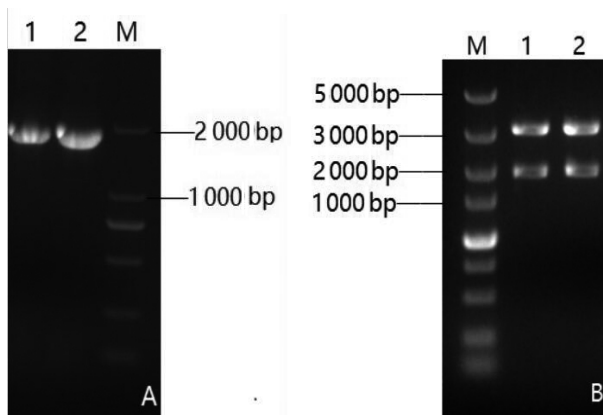


图2 菌株P-1的5.8S rDNA ITS区序列系统发育树



注:A:M, DNA 分子质量标准;1、2, pGOD 基因。B:M, DNA 分子质量标准;1、2: pGEM-T-pGOD 的酶切产物(Not I)。

图3 pGOD基因的PCR扩增(A)和pGEM-T-pGOD的酶切鉴定(B)

2.2 目的基因的克隆与鉴定

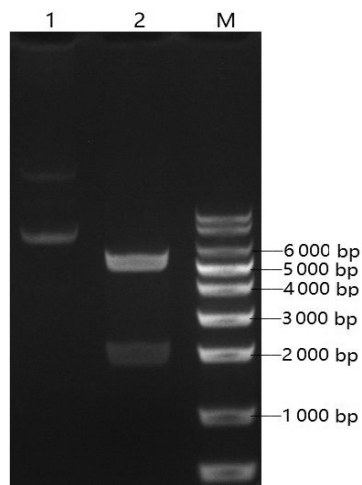
以黑曲霉P-1基因组DNA为模板,利用引物F、R进行PCR扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,结果如图3A。质粒pGEM-T-GOD经酶切,结果如图3B。测序结果显示,目的基因片段全长1 818 bp,编码605个氨基酸,将其序列与GenBank中公布的神GOD基因序列进行比对,相似度为81%~99%,证明成功扩增了黑曲霉GOD基因,命名为pGOD。

2.3 重组表达质粒的构建与鉴定

重组质粒pT7M-GOD经双酶切验证,结果显示GOD基因已经插入到表达载体pT7M中(图4)。重组质粒的测序结果显示,目的基因序列与优化后pGOD的序列完全一致,重组表达载体pT7M-pGOD构建正确。

2.4 目的基因的表达

将鉴定正确的重组质粒pT7M-pGOD转入枯草



注:M, DNA 分子质量标准;1, 质粒 pT7M-pGOD; 2, 质粒 pT7M-pGOD 的双酶切产物。

图4 pT7M-GOD 的双酶切鉴定

芽孢杆菌7024E感受态中,经2%木糖诱导发酵培养后的SDS-PAGE分析结果见图5。结果显示,1、2

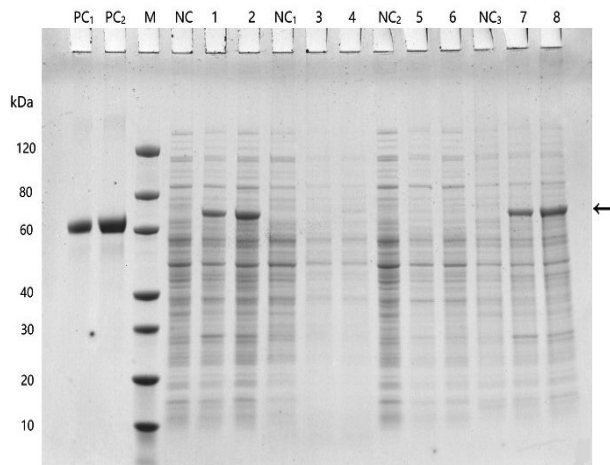
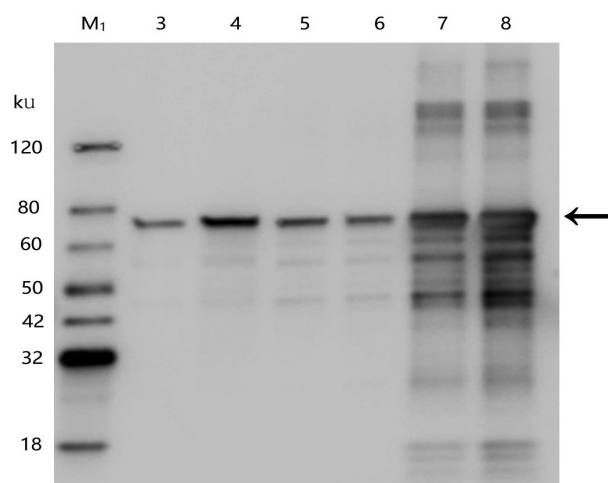


图5 pGOD蛋白表达产物的SDS-PAGE



注: M, M₁: 蛋白分子质量标准; PC1: BSA (1 μg); PC2: BSA (2 μg); NC: 未诱导的超声破碎液; 1: 诱导超声破碎液, 25 °C 培养 16 h; 2: 诱导超声破碎液, 37 °C 培养 4 h; NC₁: 未诱导培养物上清; 3: 诱导培养物上清, 25 °C 培养 16 h; 4: 诱导培养物上清, 37 °C 培养 4 h; NC₂: 未诱导超声破碎上清; 5: 诱导超声破碎上清, 25 °C 培养 16 h; 6: 诱导超声破碎上清, 37 °C 培养 4 h; NC₃: 未诱导超声破碎沉淀; 7: 诱导超声破碎沉淀, 25 °C 培养 16 h; 8: 诱导超声破碎沉淀, 37 °C 培养 4 h。

图6 表达产物 Western-blot 检验

泳道和 7, 8 泳道可见约 68 ku 大小的条带, 与理论上 pGOD 蛋白的分子质量大小一致。且 2, 8 泳道明显比 1, 7 泳道的表达量高。结果表明, pGOD 基因能够在枯草芽孢杆菌中表达, 且在 37 °C 培养 4 h 表达量较高。

制备单克隆抗体, 利用 Western-blot 对表达的粗蛋白进行检测, 结果如图 6 所示, 在样品 3, 4, 5, 6 中出现明显的目的基因产物。大小与预期 pGOD 蛋白分子质量一致, 说明该表达系统成功表达了 pGOD 基因, 属于胞内表达的可溶性蛋白。

3 讨论

GOD 作为一种新型的酶制剂, 近年来在养殖行业应用广泛, GOD 可以改善动物肠道环境, 增强肠道有益菌群, 降低霉菌毒素中毒损伤, 提高内源酶活, 提高饲料消化率。大量的文献报道表明产 GOD 的菌种主要是曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*)^[14-16], 本研究从土壤样品中筛选到产 GOD 的微生物, 经鉴定为黑曲霉, 也验证了这一结论, 说明霉菌是产 GOD 的主要微生物菌种。

但天然菌株发酵生产 GOD 的酶活性低, 且纯化工工艺复杂。因此, 构建高效表达 GOD 的重组菌株成

为主要研究方向。近十几年来, 多种来源的 GOD 基因被克隆^[17-18], 本研究所扩增的 GOD 基因片段全长 1 818 bp, 编码 605 个氨基酸, 将其序列与 GenBank 中公布的 GOD 基因序列进行比对, 相似度为 81%~99%, 部分位点的碱基出现差异, 其主要原因是不同物种的编码基因有差异。所克隆的 GOD 基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*P. pastoris*) 等宿主中成功表达^[19-22], 并且酶活性得到显著提高。如陈楠等^[23]利用具有 AOX1 强启动子的表达载体 pPICZαA, 在毕赤酵母 SMD1168 中成功表达了黑曲霉 PCTC GOD 基因, 并对重组菌进行产酶条件优化, 优化后酶活达 32 U/mL, 提高了 27 倍。然而在动物益生菌枯草芽孢杆菌中表达 GOD 基因的未见报道, *B. subtilis* 属于动物益生菌, 发酵条件简单, 目前已有许多的研究报道使用 *B. subtilis* 作为高效生产的工程菌株^[24-25]。加之为了更好地服务于养殖和饲料, 本研究将 GOD 基因在野生型枯草芽孢杆菌中进行了表达, 成功获得了表达产物。但由于是异源表达, 需对目的基因的密码子进行优化^[26-27], 通过密码子优化构建表达载体 pT7M-pGOD, 使枯草芽孢杆菌成功地表达了来源于黑曲霉的 GOD 基因, 为构建高效表达 GOD 的基因工程菌提供了新的思路。

4 结论

从土壤样品中筛选出 1 株高产葡萄糖氧化酶 (GOD) 的黑曲霉菌株, 将黑曲霉菌的 GOD 基因克隆到载体 pT7M, 重组质粒 pT7M-pGOD 转化到枯草芽孢杆菌中异源表达, 获得了产 GOD 的枯草芽孢杆菌工程菌株。

参考文献

- [1] GAO Z W, LI Z F, ZHANG Y H, et al. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon optimization[J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(3): 507-514.
- [2] DUMITRASCU L, STANCIUC N, BAHRIM G E, et al. pH and heat-dependent behaviour of glucose oxidase down to single molecule level by combined fluorescence spectroscopy and molecular modelling[J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2016, 96(6): 1906-1914.

- [3] BONET A. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: a study from macroscopic to molecular level [J]. Food chemistry, 2006, 99(2): 408-415.
- [4] DUBEY M K, ZEHR A, AAMIR M, et al. Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates[J]. Frontiers in microbiology, 2017(8): e1032.
- [5] NAKAO K, KIEFNER A, FURUMOTO K, et al. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors[J]. Chemical engineering science, 1997, 52 (21/22): 4127-4133.
- [6] SUKHACHEVA M V, DAVYDOVA M E, NETRUSOV A I. Production of penicillium funiculosum 433 Glucose oxidase and its properties[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2003, 40(1): 25-29.
- [7] AFSETH J, ROLLA G. Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase[J]. Caries research, 1983, 17(5): 472-475.
- [8] WESTERS L, WESTERS H, QUAX W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism[J]. Biochimica et biophysica acta-molecular cell research, 2004, 1694(1-3): 299-310.
- [9] DONG H, ZHANG D. Current development in genetic engineering strategies of *bacillus* species[J]. Microb cell fact, 2014, 13(1): 63.
- [10] FERREIRA L, FERREIRA R, WOLFGANG S. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors[J]. Anais da academia Brasileira de ciencias, 2005, 77: 113-124.
- [11] LIU L, LIU Y F, CHEN R R, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(14): 6113-6127.
- [12] WESTERS L, QUAX W, WESTERS H. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins[J]. International conference on consumer electronics, 2015: 2593-2596.
- [13] ZWEERS J C, BARAK I, BECHER D, et al. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes[J]. Microb Cell Fact, 2008, 7(1): 10.
- [14] QIU Z J, GUO Y F, BAO X M, et al. Expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase in yeast *Pichia pastoris* SMD1168[J]. Biotechnology & biotechnological equipment, 2016, 30(5): 998-1005.
- [15] MENG Y, ZHAO M, YANG M, et al. Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*[J]. Letters in applied microbiology, 2014, 58(4): 393-400.
- [16] KONISHI T, AOSHIMA T, MIZUHASHI F, et al. Safety evaluation of glucose oxidase from *Penicillium chrysogenum*[J]. Regulatory toxicology & pharmacology: rtp, 2013, 66(1): 13-23.
- [17] WITT S, SINGH M, KALISZ H M. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*[J]. Applied and environmental microbiology, 1998, 64(4): 1405-1411.
- [18] 吴毅兰, 薛鲜丽, 谢响明. 黑曲霉葡萄糖氧化酶在里氏木霉中的分泌表达及其对内源纤维素酶表达的影响[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(5): 42-50.
- [19] FREDERICK K R, TUNG J, EMERICK R S, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme[J]. Journal of biological chemistry, 1990, 265: 3793-3802.
- [20] BELYAD F, KARKHANEI A, RAHEB J. Expression, characterization and one step purification of heterologous glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 9029 in *Pichia pastoris*[J]. EuPA open proteom, 2018, 19: 1-5.
- [21] SHAIKH S, TRIVEDI R. Cloning & expression of glucose oxidase from *Aspergillus niger*[J]. International journal of pharmaceuticals, 2016, 265(7): 685-688.
- [22] 刘晓筱. 黑曲霉葡萄糖氧化酶在解脂耶氏酵母中的表达[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [23] 陈楠, 肖成建, 范新蕾, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母 SMD1168 中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(9): 975-981.
- [24] 毕台飞, 胡雄斌, 宋巍, 等. 枯草芽孢杆菌高效表达系统的构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(11): 71-79, 88.
- [25] 陈志, 丁可欣, 林霞琳, 等. 表达 EDA-EmIMP1 的重组枯草芽孢杆菌的制备及其免疫效果评价[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(4): 408-413.
- [26] 厉雪琪. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在里氏木霉中的重组与表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [27] 郭瑶. *Aspergillus niger* Z-25 葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母中的表达[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.

【责任编辑: 胡 敏】