

研究报告

定向进化提高灰盖鬼伞过氧化物酶染织废水脱色效率

张磊² 张伟^{1,3} 方金涛¹ 董冰雪^{1*} 黄林娜¹ 吴倩倩¹ 押玉柯¹
张建丰¹ 张格格¹ 郑路⁴

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院 河南 南阳 473061)

(2. 南阳理工学院土木工程学院 河南 南阳 473004)

(3. 南阳师范院校医院 河南 南阳 473061)

(4. 中山大学生命科学与技术学院 广东 广州 510275)

摘要:【目的】获得染织废水脱色能力增强的灰盖鬼伞过氧化物酶。【方法】使用基因合成及定点突变平台合成突变灰盖鬼伞过氧化物酶基因 CIPmt4 (I49S、V53A、M166F 和 M242I)，并调整密码子至毕赤酵母偏好性。以 CIPmt4 为模板进行定向进化，经过三轮易错 PCR 和高通量筛选得到一个酶学性质显著改善的突变体(CIPmt5)。通过 3D 建模和分子动力学模拟分析蛋白的结构及热稳定性，并进一步研究 CIPmt5 和野生型 CIP 对刚果红、氨基黑、甲基橙、次甲基蓝、苯胺蓝、结晶紫、溴酚蓝共 7 种染料的脱色能力。【结果】序列分析显示该突变体积累了 I49S、V53A、T121A、M166F 和 Y272F 共 5 个氨基酸突变，与野生型灰盖鬼伞过氧化物酶相比，以 ABTS 为底物酶活性是野生型的 2.01 倍(24.44 U/mg)，最适反应 pH 由 5.0 提高到 6.5，最适反应温度由 25 °C 提高到 45 °C。除次甲基蓝外对其它染料脱色的最适 pH 都往中、碱性方向偏移，脱色率普遍高于野生型。模型分析显示 CIPmt5 活性中心更开放，热稳定性增强。【结论】突变体酶 CIPmt5 能够更好地替代野生型灰盖鬼伞过氧化物酶应用于染织业染料脱色、化工废水和染织废水的生物修复。

关键词: 灰盖鬼伞过氧化物酶，定向进化，酶学特性，染料脱色

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31300669); Key Grant of Science and Technology Department of Henan Province (No. 112102210385, 142102210479); Science Foundation for the High-level Talent of Nanyang Normal University (No. zx20110007); Key Scientific Research Fund of Henan Educational Committee (No. 13A180811, 14B180003)

***Corresponding author:** E-mail: dongbingxue2004@163.com

Received: April 29, 2016; **Accepted:** November 07, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 08, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300669); 河南省科技厅科技攻关项目(No. 112102210385, 142102210479); 南阳师范学院高层次人才科研启动项目(No. zx20110007); 河南省教育厅科学技术重点研究项目(No. 13A180811, 14B180003)

***通讯作者:** E-mail: dongbingxue2004@163.com

收稿日期: 2016-04-29; **接受日期:** 2016-11-07; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-11-08

Directed evolution of *Coprinus cinereus* peroxidase to improve the decolorization of textile wastewaters

ZHANG Lei² ZHANG Wei^{1,3} FANG Jin-Tao¹ DONG Bing-Xue^{1*} HUANG Lin-Na¹
WU Qian-Qian¹ YA Yu-Ke¹ ZHANG Jian-Feng¹ ZHANG Ge-Ge¹ ZHENG Lu⁴

(1. School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

(2. School of Architecture and Construction, Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473004, China)

(3. School Infirmary, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

(4. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: [Objective] The aim of our study is to improve *Coprinus cinereus* peroxidase (CIP) for textile dyes decolorization. [Methods] We synthesized CIPmt4, a CIP gene with *Pichia pastori* codon bias and 4 amino acid substitutions (I49S, V53A, M166F and M242I), using our gene synthesis and site-specific mutagenesis platform. Then, we carried out random mutagenesis using CIPmt4 as template, after three rounds of error-prone PCR and high-throughput screening by assaying enzymatic activity toward 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ABTS), we obtained a mutant (CIPmt5) with improved enzymatic activity. Furthermore, we built the 3-dimensional model of CIPmt5 and wild type CIP using Swiss-model software, analyzed their thermostability using molecular dynamics simulation and investigated the decolorization ability of CIPmt5 and wild-type CIP for 7 textile dyes (Congo red, Amino black, Methyl orange, Methylene blue, Aniline blue, Bromophenol blue and Crystal violet) subsequently. [Results] Sequence analysis revealed that 5 amino acid substitutions (I49S, V53A, T121A, M166F and Y272F) were accumulated in CIPmt5. Compared to the wild-type enzyme, the specific activity of CIPmt5 toward ABTS was increased to 2.01-fold (24.44 U/mg), and its optimal temperature and pH were changed from 25 °C and 5.0 to 45 °C and 6.5 of the wild-type enzyme, respectively. The optimal decolorization pH of CIPmt5 shifted toward neutral to alkaline pH except for methylene blue. [Conclusion] The new variant obtained through directed evolution shows its potential in industrial application in textile dyes decolorization.

Keywords: *Coprinus cinereus* peroxidase, Directed evolution, Enzyme properties, Dyes decolorization

过氧化物酶(EC 1.11.1.7)是一类含血红素的氧化还原酶,能够以过氧化氢为电子受体氧化多种有机和无机分子^[1-3],在免疫检测、生物传感器、工业废水处理等方面有着广阔的应用前景^[4]。目前使用的大多数过氧化物酶来源于植物,其生产受地域和气候的限制,给工业应用带来不便^[5]。灰盖鬼伞过氧化物酶(*Coprinus cinereus* peroxidase, CIP)因与辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)在酶学特性和底物广谱性上十分相似而引起了人们的广泛关注,尽管二者同源性低于10%–16%^[6]。研究发现, CIP已经成功用于清除废水中的酚类物质^[7-11]、降解苯类同系物及衍生物^[12]、染料脱色^[13-16];生产功能性多聚芳香物^[17-20];用作生物传感器^[21]和清洁剂^[22];此外, CIP在纸浆造纸工业也极具应用潜力。

从商业角度看, CIP有望替代 HRP成为工业用酶,有着广阔的市场前景。

近年来酶法处理染料废水因条件温和、环境友好而发展迅速,漆酶、过氧化物酶被广泛试用于染料脱色^[23-28]。令人遗憾的是染织工业废水 pH 大多是中性甚至碱性^[29],漆酶和过氧化物酶却多为酸性酶,在中碱性条件下会快速失活^[30-32];而 CIP 的最适反应 pH 接近中性,热稳定性比 HRP 更强^[33-34],相对于其它酶 CIP 更适合用作染织业废水脱色处理。美中不足的是灰盖鬼伞属于中温菌,其产生的 CIP 在高温和碱性环境下不够稳定^[34-35]。利用分子定向进化技术进行 CIP 酶学性质的分子改良是改变最适反应 pH、提高酶的热稳定性和碱性环境耐受性的重要途径。Cherry 等利用定向进化技术得到了

一个氧化稳定性提高 100 倍、热稳定性提高 174 倍的突变 CIP^[35];Houborg 等研究了该突变体酶的晶体结构,揭示了蛋白结构改变对酶学性质的影响^[36]。但是该突变酶在高温下仍不够稳定,40 °C 处理 5 min 活性下降为 87%。目前国际上尚没有关于 CIP 的最适反应 pH 向中、碱性方向偏移,最适反应温度大幅提高且高温稳定性增强的分子定向进化研究。

Cherry 等报道 M166F 和 M242I 能够提高 CIP 的氧化稳定性,V53A 可以提高酶活性^[35];Houborg 等研究晶体结构时提出 I49S 和 V53A 会协同发生作用^[36]。本文以含有 4 个氨基酸突变(I49S、V53A、M166F 和 M242I)的 CIP 基因为模板,在保证氧化稳定性和提高酶活性的基础上进行基于易错 PCR 的定向进化,以期寻找最适反应 pH 向中、碱性方向偏移,最适反应温度升高,更适应染料脱色处理的工业用 CIP。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:巴斯德毕赤酵母 GS115、大肠杆菌 DH10B 由本实验室保存;CIP/GS115 来自于前期工作^[37],用于表达野生型 CIP,所表达蛋白标记为 CIPwt;本实验所用质粒 pPICZαA 购自 Invitrogen。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶、DNA 聚合酶和连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;易错 PCR 试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,蛋白纯化离心柱 Ni-NTA Spin Columns 购自 QIAGEN 公司,其他试剂均为进口分析纯。Heal Force Neofuge 15 离心机购自力新仪器(上海)有限公司;NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计购自 Thermo Scientific 公司;S1000 PCR 仪、iMark 酶标仪、电泳仪、凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司。

1.2 CIPmt4 基因的合成

在 GenBank 中查找 CIP 序列(登录号 X69457),翻译出氨基酸序列并替换第 49、53、166 和 242 位氨基酸。选择密码子为毕赤酵母偏好性,用实验室构建的平台合成含 4 个氨基酸突变的 CIP 基因并连

接在 pPICZαA 上,电击转化大肠杆菌 DH10B。挑取单菌落提质粒测序,确认该质粒含突变 CIP 基因(I49S、V53A、M166F 和 M242I)且密码子为毕赤酵母偏好性,将该质粒命名为 pPICZαA-CIPmt4。

1.3 易错 PCR

第一轮易错 PCR 以 pPICZαA-CIPmt4 质粒为模板,以 CIP1 (5'-GCGAATTCCAAGGTCCTGGCGGAGGTGGTAGT-3')和 CIP50 (5'-TCCCCGCGGTGGGGCTGGAGCTAAAGAAGGCAGTG-3')为引物,参照易错 PCR 试剂盒说明书进行易错 PCR 扩增。反应程序:95 °C 5 min;95 °C 45 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 5 min。第二轮易错 PCR 以第一轮得到的 1-18-E6 为模板;第三轮易错 PCR 以第二轮得到的 2-33-H4 为模板进行突变。

1.4 突变酶文库构建

回收每轮易错 PCR 产物,用 *Sac* II 和 *Eco*R I 双酶切后连接在毕赤酵母表达载体 pPICZαA 上,命名为 pPICZαA-CIPmt;电击转化大肠杆菌 DH10B。提取 pPICZαA-CIPmt 混合重组质粒线性化处理回收备用。根据毕赤酵母使用操作手册制作感受态细胞;毕赤酵母转化,阳性克隆筛选、检测方法参考前期工作^[37]。收集所有的阳性克隆构成突变酶文库。

1.5 文库筛选

接种阳性克隆到深孔 96 孔培养板(每孔含有 1.5 mL BMGY^[37]),30 °C、200 r/min 培养 24 h,3 000 r/min 离心 8 min 收集细胞,每孔加入 500 μL BMMY^[37](添加 8 g/L 的丙氨酸,0.5 g/L 的氯化血红素)重悬,29 °C、200 r/min 摇床继续培养,每 24 h 添加甲醇至终浓度 0.5%保持诱导。第 5 天离心取上清进行酶活性、中碱性 pH 活性、高温下酶活性检测,每个实验重复 3 次。经三轮筛选得到一个目的突变酶 3-43-c7,测序发现该突变体含有 5 个氨基酸突变,命名 CIPmt5,对应的工程菌命名为 CIPmt5/GS115。

1.6 酶表达与纯化

CIPmt5/GS115 和 CIP/GS115 蛋白的诱导表达参考前期工作^[37];使用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA

Spin Column, 参照蛋白纯化试剂盒说明书进行蛋白纯化。

1.7 重组 CIP 的纯度、分子量估算及浓度测定

SDS-PAGE 凝胶电泳检测酶的纯度并估算分子量。NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计 280 nm 下测定酶蛋白的浓度 $[\epsilon=1.597\times 10^4 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})]$ 。

1.8 酶活性的测定

酶活性测定采用 ABTS 法^[37], 向含有 0.5 mmol/L ABTS 的缓冲液(pH 5.0)中加入适量的酶液, 25 °C 保温数分钟, 再加入 0.1 mmol/L H_2O_2 起始反应。利用 iMark 酶标仪测量 405 nm 光吸收值, 以 1 min 内氧化 1 μmol ABTS 至蓝绿色阳离子所需要的酶量定义为一个单位(U) $[\epsilon=3.6\times 10^4 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})]$ 。

1.9 酶学特性研究

1.9.1 pH 对酶反应的影响: 最适反应 pH 测定以柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 2.0–2.5)和 Britton Robinson buffer (pH 3.0–9.0)为缓冲液, 200 μL 反应体系含 49.7 ng 纯化的 CIPwt 或者 CIPmt5 酶, 其它条件同 1.8。pH 稳定性测定取纯化后的 CIPwt 或 CIPmt5, 先置于不同 pH 的缓冲液内 4 °C 保温 2 h, 再调至最适 pH, CIPwt 选用 25 °C 测定酶活, CIPmt5 选用 45 °C 测定酶活, 以未处理的酶作对照, 每个反应至少 3 个重复。

1.9.2 温度对酶反应的影响: 最适反应温度测定设置温度范围 10–60 °C, 每 5 °C 一个梯度。CIPwt 以 pH 5.0 的醋酸钠(NaAc)作为缓冲液, CIPmt5 以 pH 6.5 的 NaAc 为缓冲液; 其它条件同最适 pH 测定。温度稳定性测定取纯化后的 CIPwt 或 CIPmt5, 先置于不同温度下保温 2 h, 冰上冷却, 再按最适条件测定酶活, 每个反应至少 3 个重复。

1.9.3 动力学参数的测定: 以不同浓度的 ABTS、2,6-DMP 和愈创木酚为底物, 以 pH 5.0 的 NaAc 为缓冲液, 反应温度设为 25 °C; 相应波长下测量吸光值的变化(2,6-DMP 和愈创木酚使用波长 450 nm), 计算出各浓度下不同底物对应的酶活, 每个反应至少 3 个重复。动力学参数(K_m 和 K_{cat})采用 Graphpad prime 5 软件中的米氏方程计算、拟合。

1.10 蛋白 3D 建模及分子动力学模拟

使用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>) 在线软件对 CIPwt 和 CIPmt5 进行结构预测。运用 GROMACS 4.5 (<http://www.gromacs.org/>)对 CIPwt 和 CIPmt5 三维结构进行分子动力学(Molecular dynamics MD)模拟, 模拟体系选用 GROMOS 96 力场, 溶质分子被 1.5 nm 的 SPC/E 水分子层包裹。MD 模拟之前, 分别对受约束和去约束的溶质分子体系进行两次能量优化, 先采用最陡下降法优化 800 步, 再采用共轭梯度法优化 1 200 步。MD 模拟过程: 首先对受约束溶质分子在 300 K 下模拟 100 ns; 然后对去约束溶质分子在 500 K 下模拟 7 ns。MD 模拟结束后, 利用 GROMACS 4.5 的 g_rms 软件计算 CIP 突变前后的根均方偏差(RMSD)值, 分析突变位点对酶蛋白耐热性的贡献。

1.11 染料脱色实验

选 pH 2.2–8.0 的柠檬酸-磷酸作缓冲液, 分别用 CIPwt 和 CIPmt5 的粗酶液对 7 种染料进行脱色能力测定。200 μL 反应体系含合适初始浓度染料(刚果红 7.18 mmol/L, 氨基黑 8.11 mmol/L, 甲基橙 15.28 mmol/L, 次甲基蓝 14.98 mmol/L, 苯胺蓝 6.78 mmol/L, 结晶紫 12.26 mmol/L, 溴酚蓝 7.46 mmol/L), 双氧水 10 mmol/L, CIPwt 组酶用量为 0.045 U/mL, CIPmt5 组酶用量为 0.042 U/mL, 室温(25 °C)下孵育 4 h, 测量脱色前后染料的浓度, 计算染料脱色率, 计算公式如下:

脱色率(%)=(脱色前吸光度–脱色后吸光度)/脱色前吸光度 $\times 100$ 。

每个实验 3 个重复, 刚果红、氨基黑和甲基橙采用 490 nm 波长, 次甲基蓝和苯胺蓝采用 405 nm 波长, 结晶紫和溴酚蓝采用 630 nm 波长, 脱色率最高的缓冲液 pH 被认定为最适 pH。

2 结果与分析

2.1 文库构建和筛选

构建工程菌 CIPmt4/GS115 并诱导表达突变体酶 CIPmt4。以 ABTS 为底物 CIPmt4 活性是野生型酶活的 1.15 倍(13.98 U/mg), 反应 pH 范围变宽; 最

适反应温度和热稳定性不变；氧化稳定性增强。以 pPICZ α A-CIPmt4 质粒为模板进行第一轮易错 PCR 扩增，转化酵母后得到 3 800 个转化子，随机挑选 10 个用高保真酶扩增，测序结果显示每个基因含有 0–3 个碱基突变。以 ABTS 为底物检测，45% 的突变体没有活性或者活性很低；超过 50% 的突变体活性和野生型相似 (12.16 U/mg)。突变体 1-18-E6 (I49S、V53A、M166F 和 Y272F) 由第一轮突变而来，其活性是 CIPwt 的 1.2 倍 (14.59 U/mg)，最适反应 pH 为 5.5，最适反应温度 35 °C。经过第二轮突变后，从 4 220 个克隆中得到一个突变体 2-33-H4 (I49S、V53A、M166F、E239G 和 Y272F)，其活性提高到野生型的 1.7 倍 (20.67 U/mg)，最适反应 pH 为 6.0，最适反应温度 45 °C。经第三轮突变后从 3 640 个转化子中得到一个突变体 3-34-c7，其活性是 CIPwt 的 2.01 倍 (24.44 U/mg)，最适反应 pH 为 6.5，最适反应温度 45 °C。测序结果显示该突变体含有 5 个氨基酸突变 (I49S、V53A、T121A、M166F 和 Y272F)，命名为 CIPmt5。与 CIPmt4 相比，丢失了 242 位的突变，同时在 121 位和 272 位两个位点引入了氨基酸突变。

2.2 蛋白表达纯化

诱导表达 CIP/GS115 和 CIPmt5/GS115，纯化后皆得到单一条带，大小在 43 kD 左右 (图 1)，符合预期大小。测得 CIPwt 的浓度为 14.916 g/L，CIPmt5 的浓度为 9.827 g/L。

2.3 酶学特性

2.3.1 pH 对酶的影响：CIPwt 的最适反应 pH 为 5.0，高活性范围窄；CIPmt5 的最适反应 pH 为 6.5，在 pH 3.5–6.5 之间活性是最适 pH 的 75% 以上 (图 2A)。CIPwt 在 pH 5.0 时最稳定，处理 2 h 酶活几乎不受影响；在 pH 4.5–6.5 范围保留有 60% 以上的活性。CIPmt5 在 pH 6.5 时最稳定，4 °C 处理 2 h 后相对酶活为 97.3%，其余各 pH 处理后残留活性均高于 CIPwt (图 2B)。说明突变体 CIPmt5 最适反应 pH 向中性 pH 偏移 1.5、高活性反应 pH 范围变宽，同时对各 pH 处理稳定性增强，更适合染料脱色等工业应用。

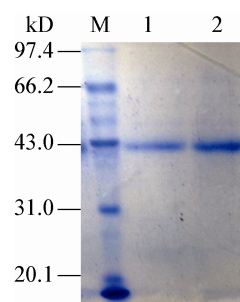


图 1 纯化后重组 CIPwt 和 CIPmt5 的 SDS-PAGE 分析
Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified recombinant CIPwt and CIPmt5

注：M：蛋白分子量标准；1：纯化后的重组 CIPmt5；2：纯化后的重组 CIPwt。

Note：M: Standard protein molecular mass marker (sizes in kilodaltons are indicated on the left); 1: Recombinant CIPmt5 purified by Ni-NTA Spin column; 2: Recombinant CIPwt purified by Ni-NTA Spin column.

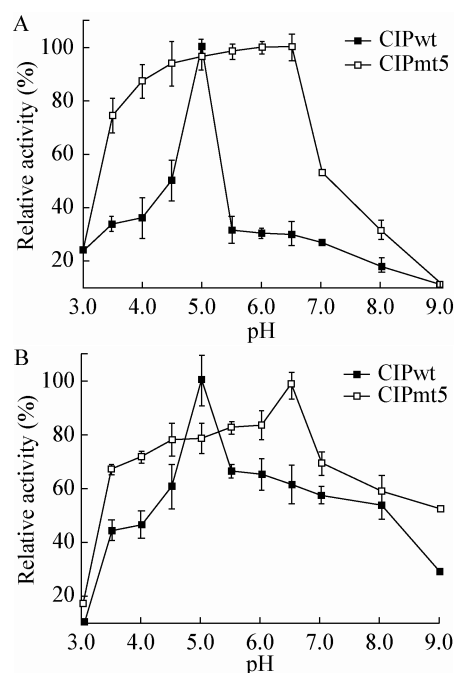


图 2 pH 对重组 CIPwt 和 CIPmt5 活性和稳定性的影响
Figure 2 Effect of pH on activity and stability of recombinant CIPwt and CIPmt5

注：A：pH 对 CIPwt 和 CIPmt5 活性的影响；B：pH 对 CIPwt 和 CIPmt5 稳定性的影响；图上的点代表 3 个测量数据的平均值，误差线代表 $\pm 1 s$ 。

Note: A: Effect of pH on activity of recombinant CIPwt and CIPmt5; B: Effect of pH on stability of recombinant CIPwt and CIPmt5; Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent $\pm 1 s$.

2.3.2 温度对酶的影响: CIPwt 的最适反应温度为 25 °C, CIPmt5 的最适反应温度为 45 °C, 比 CIPwt 提高 20 °C (图 3A)。CIPwt 在 35 °C 以下较稳定, 超过 35 °C 酶稳定性急剧下降; CIPmt5 在 45 °C 以下比较稳定, 处理 2 h 残余酶活超过 80% (图 3B)。说明高温下 CIPmt5 的稳定性高于 CIPwt, 更适于在高温下反应。

2.3.3 动力学参数: 酶的特异性一般用催化效率 (K_{cat}/K_m) 来衡量。与野生型 CIP 相比, CIPmt5 对 3 种底物的亲和力都增强(表现为 K_m 值下降), 催化效率提高(表 1)。

2.4 蛋白结构及分子动力学模型

从 3D 结构图可以看出 CIPwt 和 CIPmt5 活性中心的疏水性口袋形状和大小明显不同(图 4)。经软件预测分析, 野生型 CIP 含有两个钙离子配体、一个氰根离子配体和一个原卟啉 IX 配体, 其中氰根离

子配体和卟啉相结合。CIPmt5 因 49 位和 53 位氨基酸发生了改变, 失去了与卟啉结合的氰根离子配体; CIPmt5 活性中心更开放, 更容易与底物结合。分子动力学模拟显示随着模拟高温时间的延长, 突变酶的 RMSD 值低于野生型酶(图 5), RMSD 值越低分子越稳定^[38], 预示着突变酶在模拟高温环境中变形小于野生型酶, 具有更好的热稳定性。

2.5 染料脱色

选择不同类型的染料进行脱色, 结果显示除次甲基蓝外, CIPmt5 脱色染料的最适 pH 和野生型相比均向中、碱性方向偏移, 脱色效率普遍高于野生型。对甲基橙的脱色, 虽然和野生型相比脱色效率无显著差异, 但 CIPmt5 对甲基橙脱色的最适 pH 为 7.0, 更适合染料处理。CIPmt5 对溴酚蓝脱色的优势最明显, 脱色的最适 pH 为 8.0, 且脱色率显著提高, 是野生型的 4 倍(表 2)。

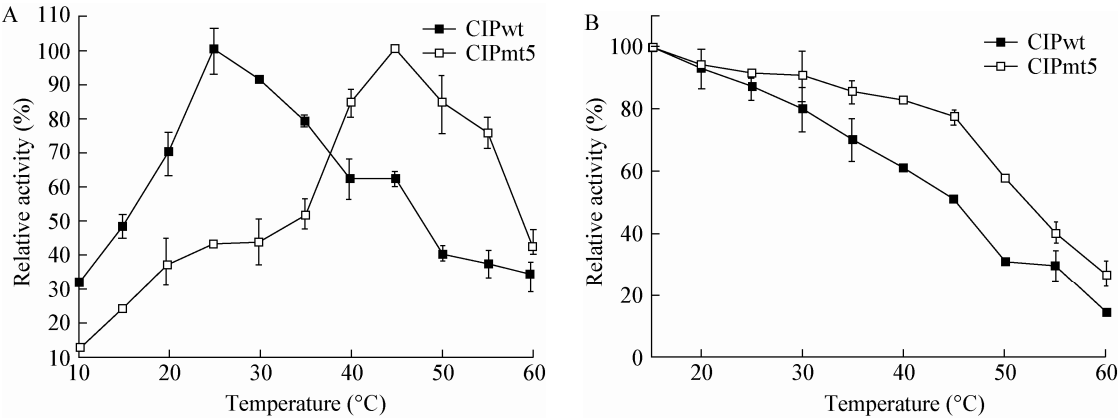


图 3 温度对重组 CIPwt 和 CIPmt5 活性和稳定性的影响

Figure 3 Effect of temperature on activity and stability of recombinant CIPwt and CIPmt5

注: A: 温度对 CIPwt 和 CIPmt5 活性的影响; B: 温度对 CIPwt 和 CIPmt5 稳定性的影响; 图上的点代表 3 个测量数据的平均值, 误差线代表 $\pm 1 s$ 。

Note: A: Effect of temperature on activity of recombinant CIPwt and CIPmt5; B: Effect of temperature on stability of recombinant CIPwt and CIPmt5; Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent $\pm 1 s$.

表 1 CIPwt 和 CIPmt5 的动力学参数						
Table 1 Kinetic parameters of CIPwt and CIPmt5						
Substrate	CIPwt			CIPmt5		
	K_m (mmol/L)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (L/(s·mmol))	K_m (mmol/L)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (L/(s·mmol))
ABTS	62.80±7.77	17.190±0.310	0.274	54.86±5.68	19.75±0.47	0.36
2,6-DMP	711.00±9.40	0.122±0.006	1.72×10 ⁻⁴	504.60±36.64	2.10±5.66	4.00×10 ⁻³
Guaiacol	150.20±3.05	0.200±0.005	0.001	117.70±15.27	2.55±2.43	0.02

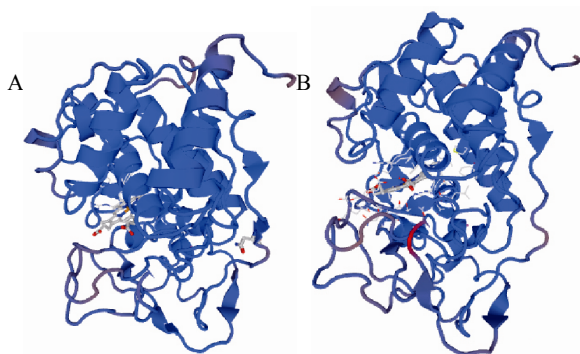


图4 Swiss-model 预测的 CIPwt (A)和 CIPmt5 (B)的结构图

Figure 4 Structural mapping of CIPwt (A) and CIPmt5 (B) predicted by swiss-model software

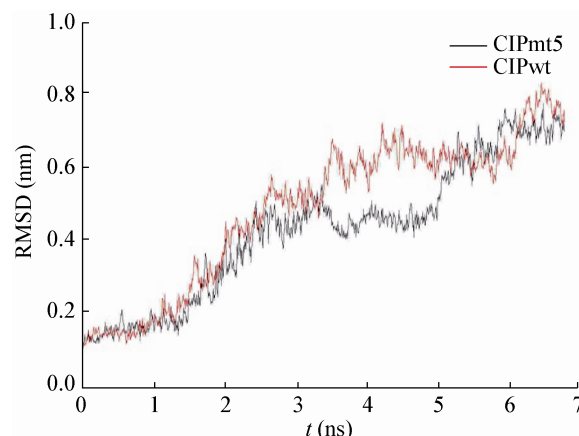


图5 CIPwt 和 CIPmt5 的 RMSD 值

Figure 5 RMSD values of CIPwt and CIPmt5

表2 CIPwt 和 CIPmt5 脱色染料的最适 pH 和脱色率
Table 2 Comparison of optimal pH and decolorization rate of CIPwt and CIPmt5 for dyes

Dyes	CIPmt5		CIPwt	
	Decolorization rate (%)	Optimal pH	Decolorization rate (%)	Optimal pH
Amino black	42.99±1.39	6.0	35.05±0.86	3.0
Methylene blue	40.34±0.02	3.6	35.08±0.99	5.0
Congo red	31.71±1.99	5.0	26.78±0.81	4.6
Methyl orange	26.84±0.16	7.0	26.31±0.26	3.0
Crystal violet	58.70±0.73	6.6	53.31±0.94	5.0
Aniline blue	68.56±0.62	6.6	65.09±1.63	6.0
Bromophenol blue	92.51±0.73	8.0	23.88±1.14	5.8

3 讨论

酵母在表达含稀有密码子的外源基因时,细胞中氨酰 tRNA 对氨基酸的正常转运可能受到限制,致使翻译提前终止。大量实验证明,密码子优化可以显著提高蛋白在酵母中的表达^[37,39]。在实验中将 CIP 密码子调整为毕赤酵母偏好性,保证了突变 CIP 能够在酵母中成功表达并完成表达后的翻译、翻译后加工、分泌等过程。根据 Cherry 等的报道向 CIP 中引入了 4 个氨基酸突变,为定向进化奠定了基础,使得到的酶有可能在最适反应 pH 向中、碱性方向偏移,最适反应温度升高的同时保持氧化稳定性。

Cherry 等对 CIP 进行定向进化时发现单个 V53A 可以提高酶活性,但不会引起稳定性的改变,而 M166F 似乎和 I49S、V53A 协同发生作用,对稳定性增强贡献最大^[35]。用 Swiss-model 建模分析发

现 I49S、V53A 导致酶蛋白缺失一个与原卟啉 IX 结合的羧根离子配体,使突变酶活性中心更开放,所以表现出 K_m 值下降,亲和力增强。第 49、53 和 121 位的 3 个疏水性氨基酸同时变成亲水性氨基酸,使蛋白侧链变小,从而增加了蛋白的稳定性。分子动力学模拟进一步验证了这一观点。Cherry 等分析 E239G 能够改善 CIP 在高 pH 时的热稳定性^[35],而本实验在定向进化中得到了一个含有 E239G 的突变 3-26-G5 (I49S、V53A、M166F、E239G、M242I 和 Y272F),最适反应 pH 为 6.5,酶活性是野生型的 1.13 倍(13.74 U/mg),最适反应温度为 40 °C,但是后期实验发现其在各 pH 和温度处理后稳定性尚不如野生型(数据未显示)。E239G 的引入并没有提高热稳定性,可能是各突变位点之间存在着复杂的相互作用,机理仍需进一步研究。

染料废水处理是环境保护领域的一大难题,理化方法成本昂贵且会形成二次污染;酶法处理染料逐渐引起人们的重视。植物来源的过氧化物酶生产周期长、成本高不适合工业化应用。而真菌来源的漆酶和过氧化物酶多为酸性酶,在中、碱性环境会快速失活。本实验用定向进化的手法得到了酶学性质显著改善的突变灰盖鬼伞过氧化物酶,并对不同类型的7种常用染织染料进行脱色检测。虽然CIPmt5可能会在较高温度时(比如37℃和45℃)具有更高的活性和高的脱色效率,但考虑到室温能耗低、利于降低处理成本,因此选择了在室温(25℃)下对染料进行处理。因酶法脱色染料反应体系和条件不同,无法与其他人的具体结果进行比较,从本实验结果来看突变后的酶取得了比野生型酶更好的脱色效果,反应条件更接近实际排放的染料工业废水状况,从方法的适应性和节约成本出发,CIPmt5更适合染料工业废水的处理应用。

参 考 文 献

- [1] Lokman BC, Joosten V, Hovenkamp J, et al. Efficient production of *Arthromyces ramosus* peroxidase by *Aspergillus awamori*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 103(2): 183-190
- [2] Kim SJ, Lee JA, Kim YH, et al. Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(9): 966-971
- [3] Kim SJ, Joo JC, Kim HS, et al. Development of the radical-stable *Coprinus cinereus* peroxidase (CiP) by blocking the radical attack[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 189: 78-85
- [4] Cerbo PD, Welinder KG, Schiødt CB. Kinetic evidence for surface residues influencing the active site of *Coprinus cinereus* peroxidase: analysis of the pH dependence of G154E, P90H and P90H-G154E substrate entrance mutants[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001, 1544(1/2): 18-27
- [5] Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(4/5): 295-300
- [6] Kjalke M, Andersen MB, Schneider P, et al. Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorrhizus* and *Arthromyces ramosus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992, 1120(3): 248-256
- [7] Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. Treatment of oil refinery wastewater using crude *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide[J]. Journal of Environmental Engineering and Science, 2003, 2(6): 463-472
- [8] Pezzotti F, Okrasa K, Therisod M. Oxidation of chlorophenols catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase with *in situ* production of hydrogen peroxide[J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(6): 1868-1871
- [9] Sakurai A, Toyoda S, Sakakibara M. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(12): 995-998
- [10] Mao XJ, Buchanan ID, Stanley SJ. Phenol removal from aqueous solution by fungal peroxidases[J]. Journal of Environmental Engineering and Science, 2006, 5(S1): S103-S109
- [11] Sarkhanpour R, Tavakoli O, Sarrafzadeh MH, et al. The comparison of *Coprinus cinereus* peroxidase enzyme and TiO₂ catalyst for phenol removal[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2013, 48(3): 300-307
- [12] Rūta IG, Juozas K. Effects of rhamnolipid biosurfactant JBR425 and synthetic surfactant surfynol465 on the peroxidase-catalyzed oxidation of 2-naphthol[J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25(7): 1431-1440
- [13] Yousefi V, Kariminia HR. Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(3): 245-252
- [14] Moutaouakkil A, Blaghen M. Decolorization of the anthraquinone dye cibacron blue 3G-A with immobilized *Coprinus cinereus* in fluidized bed bioreactor[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, 47(1): 59-65
- [15] Mansouri Majoumerd M, Kariminia HZ. Bisubstrate kinetic model for enzymatic decolorization of reactive black 5 by *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2013, 32(2): 125-134
- [16] Dong BX, Zhang L, Geng SC, et al. Optimization of degradation of congo red by mutant *Coprinus cinereus* peroxidase using response surface methodology[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(2): 421-428 (in Chinese)
董冰雪, 张磊, 耿三春, 等. 突变灰盖鬼伞过氧化物酶降解刚果红的响应面法优化分析[J]. 环境工程学报, 2014, 8(2): 421-428
- [17] Kim YH, Won K, Kwon JM, et al. Synthesis of polycardanol from a renewable resource using a fungal peroxidase from *Coprinus cinereus*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 34(1/6): 33-38
- [18] Kim YH, An ES, Park SY, et al. Polymerization of bisphenol A using *Coprinus cinereus* peroxidase (CiP) and its application as a photoresist resin[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 44(3/4): 149-154
- [19] Kim YH, An ES, Song BK. Co-polymerization of MTPC (methylene tri *p*-cresol) and *m*-cresol using CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase) to improve the dissolution characteristics of the enzyme-catalyzed polymer[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(4): 227-230
- [20] Park JC, Joo JC, An ES, et al. A combined approach of experiments and computational docking simulation to the *Coprinus cinereus* peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of alkyl phenols[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(7): 4901-4904
- [21] Savizi ISP, Kariminia HR, Ghadiri M, et al. Amperometric sulfide detection using *Coprinus cinereus* peroxidase immobilized on screen printed electrode in an enzyme inhibition based biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 35(1): 297-301
- [22] Ó'Fágáin C. Enzyme stabilization-recent experimental progress[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(2/3):

- 137-149
- [23] Li XD, Jia R, Li PS, et al. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(1): 1-6
- [24] Younes SB, Bouallagui Z, Gargoubi A, et al. Investigation of dyes degradation intermediates with *Scytalidium thermophilum* laccase[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(5): 751-758
- [25] Forootanfar H, Moezzi A, Aghaie-Khozani M, et al. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase[J]. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2012, 9(1): 27
- [26] Ahmedi A, Abouseoud M, Couvert A, et al. Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase[J]. Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences, 2012, 67(7/8): 429-436
- [27] Li XL, Zhang J, Jiang YC, et al. Highly efficient biodecolorization / degradation of congo red and alizarin yellow R by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: catalytic mechanism and degradation pathway[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013, 52(38): 13572-13579
- [28] Liu YH, Ye M, Lu Y, et al. Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(3): 667-675
- [29] Jahmeerbacus MI, Kistamah N, Ramgulam RB. Fuzzy control of dye bath pH in exhaust dyeing[J]. Coloration Technology, 2004, 120(2): 51-55
- [30] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242
- [31] Liu JZ, Wang TL, Ji LN. Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase[J]. Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic, 2006, 41(3/4): 81-86
- [32] Boucherit N, Abouseoud M, Adour L. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase[J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25(6): 1235-1244
- [33] Kim SJ, Lee JA, Joo JC, et al. The development of a thermostable CiP (*Coprinus cinereus* peroxidase) through in silico design[J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(4): 1038-1046
- [34] Ryu K, Mceldoon JP, Dordick JS. Kinetic characterization of a fungal peroxidase from *Coprinus cinereus* in aqueous and organic media[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 1995, 13(1): 53-63
- [35] Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, et al. Directed evolution of a fungal peroxidase[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(4): 379-384
- [36] Houborg K, Harris P, Poulsen JCN, et al. The structure of a mutant enzyme of *Coprinus cinereus* peroxidase provides an understanding of its increased thermostability[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2003, 59(6): 997-1003
- [37] Dong BX, Niu QH, Zhang W, et al. Expression and characterization of *Coprinus cinereus* peroxidase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(3): 321-329 (in Chinese)
董冰雪, 牛秋红, 张伟, 等. 灰盖鬼伞过氧化物酶功能表达及部分酶学特性[J]. 微生物学报, 2015, 55(3): 321-329
- [38] Liu XT, Wu MC, Yin X, et al. Effect of disulfide bridge on thermostability limprovement of the xylanase AoXyn11A[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(10): 1038-1043 (in Chinese)
刘晓彤, 邬敏辰, 殷欣, 等. 二硫键对提高木聚糖酶 AoXyn11A 热稳定性的作用[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(10): 1038-1043
- [39] Yu ZQ, Ma QS, Zhao LM, et al. Strategies for optimization expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 1035-1042 (in Chinese)
余占桥, 马青山, 赵龙妹, 等. 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1035-1042