

细菌酪氨酸酶高效异源表达及其在生物染发和丝素多巴修饰中的应用

郑依琳^{1,2,3}, 胥睿睿^{1,2,3}, 王阳^{1,2}, 方承格⁴, 堵国成^{1,2}, 康振^{1,2*}

1 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

4 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122

郑依琳, 胥睿睿, 王阳, 方承格, 堵国成, 康振. 细菌酪氨酸酶高效异源表达及其在生物染发和丝素多巴修饰中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3083-3102.

ZHENG Yilin, XU Ruirui, WANG Yang, FANG Chengge, DU Guocheng, KANG Zhen. Heterologous expression of bacterial tyrosinase and its applications in biological hair dyeing and DOPA modification of hydrolyzed silk fibroin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3083-3102.

摘要: 酪氨酸酶是一种含铜的多酚氧化酶, 广泛应用于食品、日化、医药等领域。目前商品化酪氨酸酶主要依赖于真菌提取, 存在价格高、纯度低、比酶活低和稳定性差等问题。本研究旨在获得高效表达并具有工业化应用前景的细菌酪氨酸酶。通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中异源表达 5 种不同来源的细菌酪氨酸酶, 筛选获得了巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和多刺疣微菌(*Verrucomicrobium spinosum*)来源的酪氨酸酶 TyrBm 和 TyrVs, 酶活分别为(16.1±0.2) U/mL 和(48.6±0.9) U/mL。纯化后通过比较 TyrBm 与 TyrVs 的酶学性质, 证明了 TyrVs 具有更高的热稳定性和底物专一性。在表征 TyrVs 高催化性能的基础上, 建立了基于 TyrVs 催化的酶法生物染发体系, 实现了原位催化染发, 水洗色牢度实验测得模拟 14 d 清洁后的色差值 ΔE 低于 7.38±0.64。为便于催化产物与酶快速分离, 成功构建了依赖于自组装标签 CipA 的固定化酶 TyrVs-CipA 催化体系并应用于水解丝素多肽(hydrolysed silk fibroin, HSF)的多巴修饰(DOPA modification), 酶连续催化达 7 次以上, 单次多巴修饰度超过 70.00%。进一步研究表明, 多巴修饰使 HSF 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)自由基与 O₂⁻自由基清除活性分别提高了 507.80%与 78.23%。本研究为基于酪氨酸酶的绿色生物染发剂及组织工程生物材料开发提供了技术基础。

关键词: 细菌酪氨酸酶; 固定化酶; 生物染发剂; 水解丝素; 多巴修饰

资助项目: 国家自然科学基金(32370066); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP622003); 国家轻工业技术与工程一流学科项目(QGJC20230202)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32370066), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (JUSRP622003), and the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (QGJC20230202).

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918307, Fax: +86-510-85918309, E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-26; Accepted: 2024-04-19; Published online: 2024-04-24

Heterologous expression of bacterial tyrosinase and its applications in biological hair dyeing and DOPA modification of hydrolyzed silk fibroin

ZHENG Yilin^{1,2,3}, XU Ruirui^{1,2,3}, WANG Yang^{1,2}, FANG Chengge⁴, DU Guocheng^{1,2}, KANG Zhen^{1,2*}

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Tyrosinase is a copper-containing polyphenol oxidase widely applied in the food, cosmetics, pharmaceutical, and other industries. Currently, the production of commercial tyrosinase primarily relies on extraction from fungi, which has high costs, low purity, low specific activity, and poor stability. The objective of this study is to obtain highly expressed bacterial tyrosinase with potential for industrial applications. The bacterial tyrosinases from five different sources were heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and the tyrosinases TyrBm and TyrVs derived from *Bacillus megaterium* and *Verrucomicrobium spinosum* were obtained with the enzyme activities of (16.1±0.2) U/mL and (48.6±0.9) U/mL, respectively. After protein purification, we compared the enzymatic properties of TyrBm and TyrVs, which revealed that TyrVs exhibited better thermal stability and higher substrate specificity than TyrBm. On the basis of characterizing TyrVs with high catalytic performance, we established a biological hair dyeing system based on TyrVs catalysis to achieve *in-situ* catalytic hair dyeing. The color washing fastness test measured the ΔE value less than 7.38±0.64 after simulated 14-day cleaning. To facilitate the rapid separation of catalytic products and enzymes, we successfully constructed an immobilized enzyme TyrVs-CipA dependent on self-assembly label CipA and applied this enzyme in the DOPA modification of hydrolyzed silk fibroin (HSF). The immobilized enzyme continuously catalyzed HSF for more than seven cycles, resulting in a single DOPA modification degree exceeding 70.00%. Further investigations demonstrated that DOPA modification enhances the scavenging activity of HSF towards DPPH and O₂⁻ radicals by 507.80% and 78.23%, respectively. This study provides a technical foundation for the development of environmentally friendly biological hair dye based on tyrosinase and biomaterials for tissue engineering.

Keywords: bacterial tyrosinase; immobilized enzyme; biological hair dye; hydrolyzed silk fibroin; DOPA modification

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, tyrosinase, TYR)是一种含铜(II)多酚氧化酶,具有单酚酶活性和二酚酶活性,广泛存在于动物、植物和微生物中,对生物体的黑色素、酚类、木质素等物质的合成具有关键作用^[1-3],在食品^[4-5]、日化^[6-8]、医药^[9-11]、组织工程生物材料开发^[12-15]、生物传感器开发^[16-17]等领域广泛应用。

目前的商品化蘑菇酪氨酸酶(*Agaricus bisporus* tyrosinase, TyrAb)主要从真菌中提取,存在价格昂贵、纯度较低、比酶活低的问题,这极大地限制了酪氨酸酶的应用,而部分细菌酪氨酸酶具有耐受高 pH 值、高温和有机溶剂等极端条件的能力^[18]。随着合成生物学技术的发展,大肠杆菌(*Escherichia coli*)等成熟细胞工厂具有巨大的蛋白重组表达潜能,重组表达获得细菌酪氨酸酶的优势愈发突出。Zhou 等^[5]结合定向进化与高通量筛选,对巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)来源的重组酪氨酸酶进行改造,并将其应用于茶黄素的高效催化制备;崔鹏鹏等^[11]对青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)来源的酪氨酸酶进行重组表达、酶学性质分析后,将其应用于左旋多巴(L-DOPA)的高效催化制备;Zhang 等^[17]通过序列设计并异源表达不同多刺疣微菌(*Verrucomicrobium spinosum*)来源的酪氨酸酶酶原,实现了对人脂肪酶活性的偶联测定。

此外,重组酪氨酸酶应用于酶法生物染发及生物医学材料开发的研究也逐渐展开。近几年,酪氨酸酶在酶法生物染发中的应用逐渐引发关注。区别于传统的化学染发,酶法生物染发更加温和、环保。金睿明等^[7]以 L-DOPA 为底物,经全细胞催合成了多巴色素(dopachrome, DC),进一步通过化学法还原 DC 合成高价值的黑色素前体 5,6-二羟基吲哚(5,6-dihydroxyindole, DHI),实现了安全生物染发成分 DHI 的生物-化学合成;Battistella 等^[8]以聚多巴胺染发为基础

进一步深入探索,以 TyrAb 催化制备了不同底物的灰度染发剂;Shen 等^[6]使用 TyrAb 催化不同 L-酪氨酸衍生物,并结合银离子实现了基于酶与金属纳米颗粒的彩色染发。此外,基于 DOPA 黏附原理的组织工程生物材料开发研究也在不断更新,尤其是类贻贝蛋白多肽的胞外 DOPA 修饰。贻贝蛋白天然具有 DOPA 残基,即邻苯二酚结构,有助于实现多界面黏附,且其含量与抗氧化性呈相关性^[19]。Guo 等^[13]使用 TyrAb 进行类贻贝蛋白的胞外 DOPA 修饰,用于研究 DOPA 在人工设计贻贝短肽中的作用原理;Kim 等^[14]使用 TyrAb 进行重组贻贝蛋白的胞外 DOPA 修饰,成功制备了可应用于组织黏合的生物胶水。此外,丝素蛋白(silk fibroin, SF)作为的天然生物材料,具有优异的生物活性与生物相容性^[20-23]。其含有酪氨酸残基,也可以作为底物进行 DOPA 修饰,Das 等^[24]使用 TyrAb 进行 SF 与明胶的 DOPA 修饰与交联,制备骨组织工程材料。然而,游离的 TyrAb 在体外修饰过程中的可控性差,反应产物不可避免地出现氧化不完全或过度氧化的情况^[12]。

本研究对 5 种不同来源的细菌酪氨酸酶进行活性表达筛选,确定了具有较高活性的重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm。利用组氨酸亲和层析实现了 TyrVs 与 TyrBm 的纯化制备,经酶学性质分析确定了重组酪氨酸酶 TyrVs 具有热稳定性高、催化效果好的优势。进一步地,建立了 TyrVs 催化的酶法生物染发体系,该体系具有较好的染发效果与一定的水洗色牢度。此外,为实现体外 DOPA 修饰的可控催化及催化产物与酶快速分离,构建了依赖于自组装标签 CipA 的固定化酶 TyrVs-CipA 催化体系,实现了对水解丝素多肽 HSF 高效、可控、便捷的体外 DOPA 修饰,经 DOPA 修饰的 mHSF 对 DPPH 自由基与超氧阴离子自由基清除能力分别提高了

507.8%与 78.23%。本研究为基于酪氨酸酶的绿色生物染发剂及组织工程生物材料开发等领域提供了技术基础与思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本实验所有的质粒构建与表达均在 *E. coli* BL21(DE3)中进行。菌株 *E. coli* BL21(DE3)由本实验室保存;质粒 pETDuet-TyrBm、pETDuet-TyrVs、pETDuet-TyrRe、pETDuet-TyrRs、pACYCDuet-

TyrMm-CPMm 由生工生物工程(上海)股份有限公司构建。本研究所使用及构建的质粒和菌株详见表 1, 基因克隆和质粒构建所用引物详见表 2。

1.1.2 试剂

本研究中使用的 PrimeSTAR[®] HS (Premix)、PrimeSTAR[®] Max (Premix)均购自 TaKaRa 公司; Gibson 组装[®]克隆试剂盒购自 New England Biolabs 公司; Green Taq Mix、快速质粒小提试剂盒 DC211 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 酵母粉、蛋白胨均购自 OXOID 公司;

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Sources
Plasmids		
pETDuet-TyrBm	pETDuet-1 containing <i>TYR</i> gene from <i>B. megaterium</i> (GenBank: ACC86108), Amp ^R	This work
pETDuet-TyrVs	pETDuet-1 containing <i>TYR</i> gene from <i>V. spinosum</i> (GenBank: QCX19278.1), Amp ^R	This work
pETDuet-TyrRe	pETDuet-1 containing <i>TYR</i> gene from <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (GenBank: WP_011053333.1), Amp ^R	This work
pETDuet-TyrRs	pETDuet-1 containing <i>TYR</i> gene from <i>R. solanacearum</i> (GenBank: WP_011000301), Amp ^R	This work
pACYCDuet-TyrMm-CPMm	pETDuet-1 containing <i>TYR</i> gene and caddy protein from <i>Marinomonas mediterranea</i> (GenBank: AAV49996, AAV49997), Cm ^R	This work
pET28a(+)-CipA	pET28a(+) containing <i>CipA</i> gene from <i>Photorhabdus luminescens</i> , Kan ^R	Lab stock
pETDuet-6His-TyrBm	pETDuet-1 containing a N-terminal <i>6His</i> gene fused with TyrBm, Amp ^R	This work
pETDuet-6His-TyrVs	pETDuet-1 containing a N-terminal <i>6His</i> gene fused with TyrVs, Amp ^R	This work
pET28a(+)-CipA-TyrVs	pET28a(+) containing a N-terminal <i>CipA</i> gene fused with <i>TyrVs</i> gene, Kan ^R	This work
pET28a(+)-TyrVs-CipA	pET28a(+) containing <i>TyrVs</i> gene fused with a C-terminal <i>CipA</i> gene, Kan ^R	This work
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Lab stock
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Bm	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-TyrBm	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Vs	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-TyrVs	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Re	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-TyrRe	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Rs	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-TyrRs	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Mm	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-TyrMm-CPMm	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Bm-P	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-6His-TyrBm	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Vs-P	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pETDuet-6His-TyrVs	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CipA-Vs	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET28a(+)-NCipA-TyrVs	This work
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Vs-CipA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pET28a(+)-CCipA-TyrVs	This work

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
6His-TyrBm-F	<u>CACCACGGAGGAGGAGGATCCATGAGCAACAAATACCGTGTTCGTAAAAAC</u>	51
6His-TyrBm-R	<u>TCCTCCTCCGTGGTGGTGGTGGTGCATATGTATATCTCCTTCTTATACTTA</u> ACTAATATACTAAGATGGGGAA	76
6His-TyrVs-F	<u>CACCACGGAGGAGGAGGATCCATGGCGAAATACCACCGTCTGA</u>	43
6His-TyrVs-R	<u>TCCTCCTCCGTGGTGGTGGTGGTGCATATGTATATCTCCTTCTTATACTT</u> AACTAATATACTAAGATGGGGAA	76
TyrVs-N-F	<u>ATGGCGAAATACCACCGTCTGA</u>	22
TyrVs-N-R	<u>TTATTTGTTGTTTCATTTACCCGGACGAG</u>	29
N-CipA(28a)-F	<u>ATGAACAACAAATAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG</u>	37
N-CipA(28a)-R	<u>GTGGTATTTTCGCCATGGATCCTCCTCCCATAGAGATTTCTACGCAATTAA</u> TGTAATCGCAG	64
CipA-F	<u>ATGATTAATGACATGCATCCTTCTTTAATTAAGATAAAGATATAGT</u>	47
CipA-R	<u>TTACATAGAGATTTCTACGCAATTAATGTAATCGCAG</u>	37
C-CipA(28a)-F	<u>GAAATCTCTATGTAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGC</u>	38
C-CipA(28a)-R	<u>GTGGTATTTTCGCCATTATATCTCCTTCTTTCTAGAGGGGAATTGTTATCC</u>	50
TyrVs-C-F	<u>ATGGCGAAATACCACCGTCTGA</u>	22
TyrVs-C-R	<u>CATGTCATTAATCATGGATCCTCCTCCGGATCCTCCTCCTCCGGATCCTC</u> CTCCTCCTTTGTTGTTTCATTTACCCGGACGA	85

Underlined sequences represent homologous sequences.

水解蚕丝购自上海源叶生物科技有限公司; 氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 常规试剂, 如 L-酪氨酸等购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.1.3 培养基

LB (Luria-Bertani medium) (g/L)液体培养基: 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0。

LB 固体培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 琼脂粉 15.0。

LB 显色筛选培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 琼脂粉 15.0, 进行固体培养基制作前加入 10 g/L L-酪氨酸、0.2 mmol/L CuSO₄ 及 1 mmol/L IPTG 混匀后使用。

1.1.4 头发样品

本研究所用的中度受损中国人发(2次漂白), 色度约 6.5 度, 18 cm×1 g, 自由端长 16 cm, 购自上海灿钰商贸有限公司。使用时, 剪取 5 cm×0.28 g 尺寸用于染发实验。

1.2 方法

1.2.1 菌株构建

使用引物 6His-TyrBm-F 和 6His-TyrBm-R、6His-TyrVs-F 和 6His-TyrVs-R 分别与载体 pETDuet-TyrBm、pETDuet-TyrVs 经 PCR 扩增、Gibson 组装, 构建重组载体 pETDuet-6His-TyrBm 与 pETDuet-6His-TyrVs。

使用引物 TyrVs-N-F 和 TyrVs-N-R、TyrVs-C-F 和 TyrVs-C-R 分别与载体 pETDuet-TyrVs 经 PCR 扩增得到片段 TyrVs-N 与 TyrVs-C; 使用引物 N-CipA(28a)-F 和 N-CipA(28a)-R、CipA-F 和 CipA-R、C-CipA(28a)-F 和 C-CipA(28a)-R 分别与载体 pET28a(+)-CipA 经 PCR 扩增获得片段 NCipA(28a)、CipA、C-CipA(28a); 将片段 TyrVs-N 与片段 N-CipA(28a)经 Gibson 组装, 构建重组载体 pET28a(+)-CipA-TyrVs; 将片段 TyrVs-C 与片段 CipA 和片段 C-CipA(28a)经 Gibson 组装, 构建重组载体 pET28a(+)-TyrVs-CipA。

载体通过化学转化法转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 分别涂布至带有相应抗生素的 LB 平板上。挑取转化子进行 PCR 验证与测序, 测序结果与构建情况一致的重载载体构建成功, 含有相应载体的菌株则为构建成功的重组菌株。

1.2.2 重组菌株培养

种子液培养: 从甘油保菌管中挑取一环菌液, 于含有相应抗生素的 LB 平板上划线活化, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h 后取出。挑取单菌落接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养 10–12 h。

发酵培养: 将种子液按照 1% (体积分数) 接种量接种于装有 50 mL LB 含相应抗生素的 LB 液体培养基的 500 mL 平底摇瓶中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 添加终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 于 37 °C、220 r/min 条件下诱导 6 h 后结束发酵。

1.2.3 蛋白纯化

(1) 酪氨酸酶的 Ni 柱亲和纯化

重组菌株发酵结束后, 取菌液于 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 8 min, 弃上清, 留菌体。使用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 洗涤菌体 1–2 次后, 调节菌液浓度至 OD_{600} 为 10.0, 经高压匀浆破碎后, 于 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 保留上清液, 使用 0.45 μ m 滤膜过滤后备用, 即待纯化样品。

使用 AKTA 蛋白纯化系统进行 Ni 柱亲和层析。首先使用 50 mL 纯化液 A (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 平衡 Ni-His Trap FF 柱, 后进行待纯化样品上样, 最后使用适当浓度的纯化液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 进行蛋白除杂和洗脱。

(2) 基于自组装标签 CipA 的酪氨酸酶蛋白晶体聚集体 (tyrosinase protein crystalline inclusions

based on self-assembly label CipA) 固定化酶的纯化重组菌株发酵结束后, 取菌液于 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 8 min, 弃上清, 留菌体。使用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 洗涤菌体 1–2 次后, 调节菌液浓度至 OD_{600} 为 10.0, 经高压匀浆破碎后, 于 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 弃上清, 保留沉淀。

沉淀使用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 洗涤 1–2 次后离心, 获得酪氨酸酶蛋白晶体聚集体, 即固定化酪氨酸酶。

1.2.4 酪氨酸酶活性检测

(1) 酪氨酸酶平板显色

将重组菌株种子液过夜培养后, 于含有相应抗生素的 LB 显色筛选培养基上划线, 并置于 37 °C 恒温培养箱培养 40 h, 显色平板变黑则表示相应重组菌株在该培养条件下具有酪氨酸酶活性。

(2) 酶标仪 96 孔板吸光度显色检测

使用实验所需 pH 值的缓冲液配制 2 mmol/L L-酪氨酸 (含终浓度 0.2 mmol/L CuSO_4) 的反应液, 使用涡旋振荡仪振荡 1 min 以上, 提高反应液的含氧量。取 96 孔板, 单孔添加 290 μ L 反应液及 10 μ L 待测酶液, 于相应温度下反应, 使用酶标仪分别测定反应 0、5、10 min 后, 记录该孔在 475 nm 下吸光值的变化, 计算 0–10 min 内 A_{475} 的变化值的斜率, 即为相应酶液的平均酶活。以 L-酪氨酸为底物, 平均每分钟生成 1 μ mol/L 多巴色素, 即平均每分钟 A_{475} 增加 0.001 为 1 个酶活单位, 记为 1 U。

1.2.5 酪氨酸酶酶学性质分析

提前使用 1.2.3 中所用纯化液 B 调节待测纯酶的蛋白浓度至 0.1 mg/mL, 再测定以下酶学性质:

(1) pH 对酪氨酸酶活性的影响

选取 100 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (pH 3.0–5.0)、200 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$

缓冲液(pH 5.0–8.0)、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.0)及 100 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.0)为不同缓冲区间的缓冲液,于 37 °C 下持续振荡反应,测定酶活并绘制相对酶活曲线。

(2) 温度对酪氨酸酶活性的影响

分别取 TyrVs 和 TyrBm 的最适 pH 为反应的 pH 条件,分别于 25、30、35、37、40、45、50、55、60 °C 下持续振荡反应,测定酶活并绘制相对酶活曲线。

(3) 酪氨酸酶热稳定性测试

热孵育稳定性:分别将待测纯酶液于 20、30、40 °C 下保温不同时间后,以各自最适反应条件为活性测定时的反应条件,持续振荡反应,测定酶活并绘制剩余酶活曲线,定义时间零点处的相对酶活为 100%。

冰冻保存稳定性:于待测纯酶液中添加终浓度为 15% 的甘油,混合均匀后,于 -20 °C 冷冻储存数日,取出完全化冻后,以各自最适反应条件为活性测定时的反应条件,持续振荡反应,测定酶活并绘制剩余酶活曲线,定义零点处的相对酶活为 100%。

(4) 酪氨酸酶动力学参数测定

配制不同浓度的 L-酪氨酸(0.05–2.00 mmol/L)反应液,以各自最适反应条件为活性测定时的反应条件,持续振荡反应,测定酶活并使用双倒数法进行酶的动力学参数计算。

1.2.6 染发实验

取中度损伤漂白发,剪取 5 cm×0.28 g 尺寸进行实验。染发操作前,使用 5% (质量分数) SDS 浸泡 30 min 后,使用清水洗净、吹干。染发使用 pH 为 6.0 的 200 mmol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 配制 0.5 g/L 的 L-酪氨酸溶液,并添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 CuSO₄ 及 20 μg/mL 的 TyrVs 纯酶液,现配现用。染发时,首先将待染色头发置

于 0.5 g/L L-酪氨酸中,室温浸泡 5 min。随后,取出头发,完全浸没于 10 mL 染发体系中。最后,于 37 °C 恒温摇床中反应相应时间,取出,使用清水冲洗、吹干。

1.2.7 头发的测试与表征

(1) 色度测定

使用色差分析仪获得头发颜色的特征值 (L^* , a^* , b^*),并计算样品间的色差值 ΔE ,每个样品平行测定 3 次。 ΔE 计算公式如下:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

(2) 头发微观形貌

头发经过处理后,使用清水洗净、吹干,直接粘贴于导电胶上,喷金 100 s 后,使用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察头发表面毛鳞片形貌,测试电压为 3.0 kV。

(3) 水洗色牢度

为测定染发后的水洗色牢度,为模拟染色后半月的洗发过程,使用市售阿道夫茶麸洗发水模拟头发日常清洁 7 次,具体操作为:取适量洗发水搓洗头发 1 min 后,冲洗干净、吹干,记为 1 次清洗。

1.2.8 HSF 的氨基酸含量分析

参考斯梦^[25]的方法,使用 OPA/FMOC 柱前衍生反相高效液相色谱-紫外检测法测定 HSF 完全水解后的氨基酸组分,获得 HSF 的酪氨酸含量,用于计算 DOPA 修饰度。

1.2.9 HSF 体外 DOPA 修饰与修饰度检测

在 1 mL 体系中,于 4 mg/mL HSF 水溶液中添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 CuSO₄ 及 OD₆₀₀=10.0 的菌体破碎所得 TyrVs-CipA, 37 °C、220 r/min 下反应 15 min,离心后的沉淀回收备用,上清液为修饰产物,记为 1 次催化过程。采用龚梦瑶^[26]的方法,配制 0–0.8 g/L L-DOPA 溶液,依照所得数值绘制标准曲线计算得出催化产物的 DOPA 修饰度。

1.2.10 抗氧化性检测

以蒸馏水为空白对照, 维生素 C 为阳性对照, 分别配制 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL 待测样品溶液, 测定其总铁离子还原力、超氧阴离子自由基清除率与 DPPH 自由基清除率。

总铁离子还原力检测: 参考高欣妍等^[27]的方法, 以反应后的普鲁士蓝沉淀生成量确定样品对 Fe^{3+} 的还原能力。

超氧阴离子自由基清除率检测: 参考尧馨慧等^[28]的方法, 以邻苯三酚在碱性条件下自氧化的抑制效果确定样品对超氧阴离子自由基清除能力。

DPPH 自由基清除率检测: 参考尧馨慧等^[28]的方法, 测定样品对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH) 自由基清除能力。

2 结果与分析

2.1 细菌酪氨酸酶的重组表达与筛选

本研究选择了不同来源的细菌酪氨酸酶, TyrBm 为 II 型细菌酪氨酸酶, TyrRs、TyrRe、TyrVs 为 III 型酪氨酸酶, TyrMm 为 I 型或 V 型酪氨酸酶(表 3)。经序列比对发现 5 种细菌酪氨酸酶的同源性较低, 仅 TyrRs 与 TyrRe 具有 40% 的同源性, 其余细菌酪氨酸酶的同源性均不超过 35%, 但它们都具有 6 个保守的组氨酸位点,

形成了两个 Cu^{2+} 结合结构域, 与酪氨酸酶分类结果一致(图 1A、1B)。

将带有不同重组表达质粒的重组菌株进行平板显色筛选, 结果如图 1C 所示, 37 °C 恒温培养 40 h 后, 重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-Vs 与 *E. coli* BL21(DE3)-Bm 的平板上出现较大面积黑色, 其中 *E. coli* BL21(DE3)-Vs 的黑素色扩散半径更大。结合图 1D 的 SDS-PAGE 结果, 可得出重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)-Vs 与 *E. coli* BL21(DE3)-Bm 细胞破碎上清液中存在与预测的目的蛋白大小一致的表达条带, 即 TyrVs 与 TyrBm 成功表达, 而其余 3 个重组菌株的细胞破碎组分无明显的对应条带。对单位体积的重组菌株的细胞破碎液上清进行酶活测定(图 1E), 测得 *E. coli* BL21(DE3)-Vs 与 *E. coli* BL21(DE3)-Bm 的细胞破碎液上清酶活分别为 (48.6±0.9) U/mL 与 (16.1±0.2) U/mL, 其余样品则均未检测到活性, 测定结果与图 1C 的平板显色结果一致。上述结果表明, 重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm 可以在工程菌株 *E. coli* BL21(DE3) 中实现活性表达。

2.2 重组酪氨酸酶 TyrBm 与 TyrVs 的酶学性质分析与比较

为进一步测定重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm 的酶学性质, 分别在相应表达载体的酪氨酸酶编码基因 N 端融合 6His-tag 纯化标签, 经摇瓶培养、Ni 柱亲和层析纯化后, 得到相应

表 3 细菌酪氨酸酶的来源与分类

Table 3 Source and classification of bacterial tyrosinase

Name	GenBank accession number	Species	Classification	References
TyrRs	WP_011000301	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Type III	[29]
TyrRe	AAM54973.1	<i>Rhizobium etli</i> CFN42	Type III	[30]
TyrBm	ACC86108	<i>Bacillus megaterium</i>	Type II	[31]
TyrVs	QCX19278	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	Type III	[32]
TyrMm	AAV49996	<i>Marinomonas mediterranea</i>	Type I and V	[33]
CPMm	AAV49997	<i>M. mediterranea</i>		

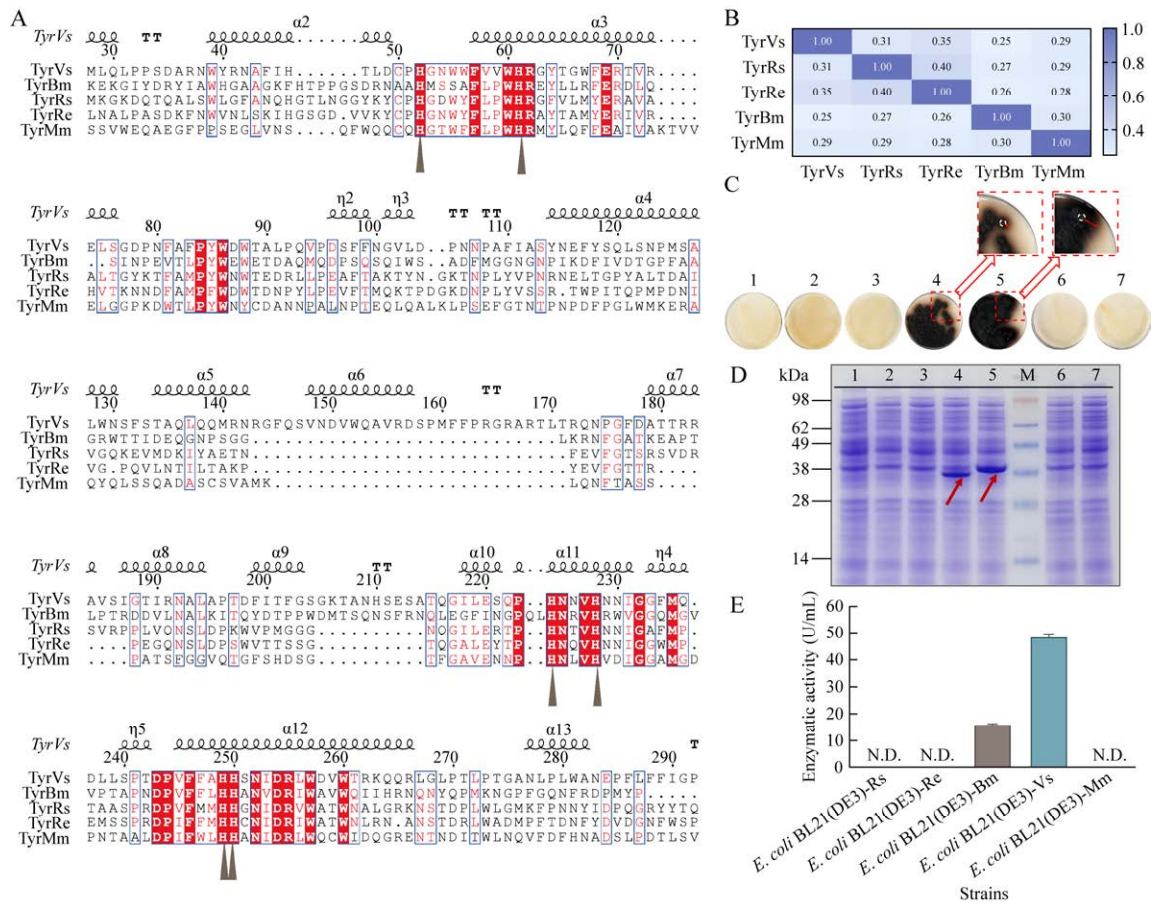


图 1 不同细菌来源酪氨酸酶的序列比对及重组酶的活性测定 A: 不同来源细菌酪氨酸酶的序列比对. B: 不同来源细菌酪氨酸酶的同源性比较. C: 显色平板及细菌菌苔的颜色变化. 1: *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet (阴性对照); 2: *E. coli* BL21(DE3)-Rs; 3: *E. coli* BL21(DE3)-Re; 4: *E. coli* BL21(DE3)-Bm; 5: *E. coli* BL21(DE3)-Vs; 6: *E. coli* BL21(DE3)-pACYCDuet (阴性对照); 7: *E. coli* BL21(DE3)-Mm. D: 重组酪氨酸酶菌株破碎液上清的 SDS-PAGE 图. M: SeeBlue™ 预染色蛋白标准品; 泳道 1: *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet 菌体破碎液上清(阴性对照); 泳道 2: *E. coli* BL21(DE3)-Rs 菌体破碎液上清; 泳道 3: *E. coli* BL21(DE3)-Re 菌体破碎液上清; 泳道 4: *E. coli* BL21(DE3)-Bm 菌体破碎液上清; 泳道 5: *E. coli* BL21(DE3)-Vs 菌体破碎液上清; 泳道 6: *E. coli* BL21(DE3)-pACYCDuet 菌体破碎液上清(阴性对照); 泳道 7: *E. coli* BL21(DE3)-Mm 菌体破碎液上清. E: 各重组菌株破碎液上清的酶活性. N.D.表示酶活性未检出

Figure 1 Sequence alignment of bacterial tyrosinase from different sources and chromogenic screening of enzyme activity. A: Sequence alignment of different bacterial tyrosinase. B: Homology analysis of different bacterial tyrosinase. C: Color changes of chromogenic plate and bacterial lawn. 1: *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet (negative control); 2: *E. coli* BL21(DE3)-Rs; 3: *E. coli* BL21(DE3)-Re; 4: *E. coli* BL21(DE3)-Bm; 5: *E. coli* BL21(DE3)-Vs; 6: *E. coli* BL21(DE3)-pACYCDuet (negative control); 7: *E. coli* BL21(DE3)-Mm. D: SDS-PAGE analysis for the soluble crude extracts. M: SeeBlue™ Pre-stained protein standard. Lane 1: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-pETDuet (negative control). Lane 2: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Rs. Lane 3: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Re. Lane 4: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Bm. Lane 5: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Vs. Lane 6: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-pACYCDuet (negative control). Lane 7: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Mm. E: Enzyme activity of each soluble crude extract. N.D.: Indicates that enzyme activity is not detected.

的蛋白纯酶液，用于测定反应 pH 与温度对酶活的影响、热稳定性及酶动力学参数。

使用不同缓冲区间的缓冲液，分别测定反应 pH 条件对 TyrVs 与 TyrBm 活性的影响。如图 2A 所示，实验测得 TyrVs 在 pH 6.0 的 200 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中具有最高的相对酶活。在相同 pH 情况下，不同的缓冲液对酶活也存在一定影响，例如在 pH 8.0 处，50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液更适合作为反应的缓冲液，相

对酶活可达 98%。而在极端 pH 条件下(pH<4.0 与 pH>9.0 时)，TyrVs 的酶活受到较大影响，相对酶活不足 25%。TyrBm 在 pH 8.0 的 200 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中具有最高的相对酶活(图 2B)。在相同 pH 情况下，50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液对于 TyrBm 的催化具有不利影响，而在 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中则有极高的相对酶活。在极端酸性条件下(pH<5.0 时)，TyrBm 的酶活受到较大影响，相对酶活不足 25%。

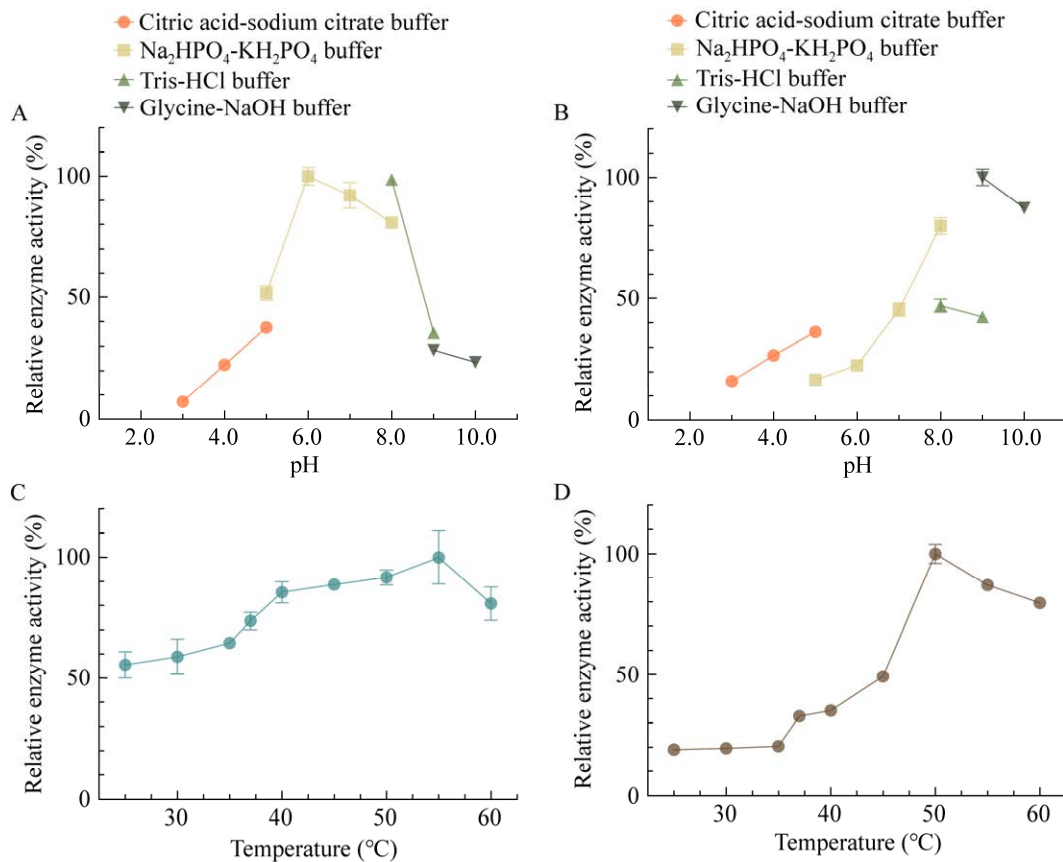


图 2 反应 pH 与温度对重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm 活性的影响 A: 反应 pH 对 TyrVs 活性的影响. B: 反应 pH 对 TyrBm 活性的影响. C: 反应温度对 TyrVs 活性的影响. D: 反应温度对 TyrBm 活性的影响

Figure 2 Effect of reaction pH and temperature on the activities of recombinant tyrosinase TyrVs and TyrBm. A: Effect of reaction pH on the enzyme activity of TyrVs. B: Effect of reaction pH on the enzyme activity of TyrBm. C: Effect of reaction temperature on the enzyme activity of TyrVs. D: Effect of reaction temperature on the enzyme activity of TyrBm.

以 TyrVs 与 TyrBm 各自的最适 pH 分别作为反应 pH, 在 25–60 °C 温度区间分别测定了温度对二者活性的影响。如图 2C 所示, 实验测得 TyrVs 在 55 °C 处有最高的相对酶活, 且在 25–60 °C 范围内, 相对酶活均高于 50%, 酶活在测定范围内的受温度影响较小。TyrBm 在 50 °C 处的相对酶活最高, 但在 25–45 °C 条件下的相对酶活均不足 50% (图 2D)。

为模拟长时间催化反应中酶活的变化, 测定二者的热孵育稳定性, 酶液经 20、30、40 °C 分别孵育不同时间后, 剩余相对酶活如图 3A、3B 所示: TyrVs 在 20、30、40 °C 下的剩余相对酶活变化较小, 在 40 °C 下保温 200 min 后相对酶活仍可达 80% 以上, 可见 TyrVs 在实验测定的温度区间内具有较好的稳定性。TyrBm 的相对酶活在 20、30、40 °C 下有不同程度的衰减, 衰减程度随孵育温度升高而加剧, 在 30 °C 孵育 120 min、40 °C 孵育 20 min 后, 相对酶活不足 50%, 可见, 在实验测定的温度区间内, TyrBm 的稳定性无法满足长时间连续催化需求, 催化反应可由短时低温加热终止。为模拟应用中酶制剂的储存活性损失, 测定二者的冰冻保存稳定性, 酶液中添加终浓度 15% 的甘油作为保护剂, 于 -20 °C 冻存数日后, 剩余相对酶活如图 3C 所示: TyrVs 与 TyrBm 的相对酶活在冰冻储存前期衰减速度较快, 在冰冻储存 15 d 的衰减幅度逐渐降低; TyrVs 冰冻储存 40 d 后, 相对酶活仍剩余 90% 以上; TyrBm 冰冻储存 40 d 后, 相对酶活剩余 75% 以上。

于各自最适 pH 条件下, 配制不同浓度的 L-酪氨酸底物溶液若干, 以最适反应条件进行酶活测定, 计算得出各自酶动力学参数。TyrVs 具有更小的 K_m 值, 意味着其对于 L-酪氨酸的底物亲和性更强, 且 TyrVs 对于底物 L-酪氨酸的催化效率 k_{cat}/K_m 更大; TyrBm 可以达到的最大

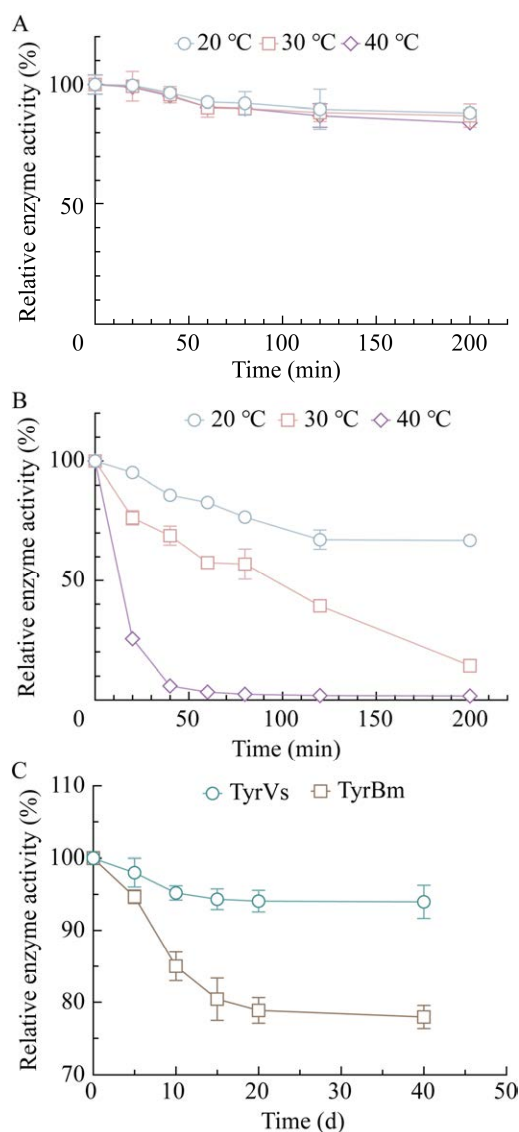


图3 重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm 的热稳定性表征 A: 热孵育对 TyrVs 酶活的影响. B: 热孵育对 TyrBm 酶活的影响. C: 冰冻保存对 TyrVs 与 TyrBm 酶活的影响

Figure 3 Thermal stability characterization of recombinant tyrosinases TyrVs and TyrBm. A: Effect of incubation on the activity of TyrVs. B: Effect of incubation on the activity of TyrBm. C: Effect of cryostorage on the activity of TyrVs and TyrBm.

理论反应速率 V_{max} 更高, 且 TyrBm 的底物催化常数更高, 但受限于 L-酪氨酸较低的溶解度, TyrBm 的实际反应速率低于 TyrVs (表 4)。

表 4 重组酪氨酸酶 TyrVs 与 TyrBm 的酶动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of recombinant tyrosinases TyrVs and TyrBm

	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)
TyrVs	300.00±0.50	75.95±0.51	29.85±0.20	99.50±0.52
TyrBm	1 604.00±68.00	129.40±2.90	46.21±1.02	28.86±0.57

由上述结果可知, TyrVs 在中性(pH 6.0–8.0)、中高温条件下对 L-酪氨酸具有较好的催化效果, 其热稳定性表现优异, 可以实现长时间的连续催化, 且对 L-酪氨酸具有更高的亲和性与催化专一性; TyrBm 在碱性(pH 8.0–10.0)、中高温条件下具有较好的催化效果, 但热稳定性较差, 不适于连续高效催化。综上, 选择具有较强热稳定性的重组酪氨酸酶 TyrVs 进行后续的催化应用研究。

2.3 重组酪氨酸酶 TyrVs 染发体系在生物染发中的应用

L-酪氨酸可在酪氨酸酶的催化下逐步形成黑色素, 与其他生物染发剂着色底物相比, L-酪氨酸具有低毒性、低成本、易储存的优点。基于重组酪氨酸酶 TyrVs 的性能优势, 构建了基于 TyrVs 的生物染发体系(图 4A)。对中度损伤漂白发进行预处理, 再在染发体系中浸染 0.5、1、2、4 h 后, 发现颜色随染发时间渐深, 由黄色逐渐变为棕绿色(图 4B)。如表 5 所示, 样品的亮度值 L^* 、色调值 a^* 与 b^* 随浸染处理时间增加逐渐减小, 即头发颜色逐渐变黑、变绿、变蓝, 因此计算所得色差值 ΔE 随浸染处理时间增加而增大, 结合颜色变化, 证明了该体系可用于染发。对染发前、染发后及水洗后的样品进行微观形貌分析可以看出, 样品 0 表面洁净, 无颗粒沉积, 存在多处毛鳞片损坏、起翘; 样品 4 表面存在明显的大小不一的颗粒沉积物, 表面大部分毛鳞片被抚平; 样品 4' 表面较大色素沉积明显减少, 毛鳞片交界处可观察到明显的细小残留颗粒, 部分毛鳞片因清洁被打开, 证明

催化染发过程中形成的色素颗粒沉积于头发表面, 实现了从外部的色素沉积染发(图 4C–4E)。经 7 次模拟清洁(模拟染发后 14 d 的洗发过程)后, 多数样品的颜色发生了颜色变化($\Delta E > 5$), 留色程度(ΔE_1)与褪色程度(ΔE_2)与染发时间呈正相关, 结合颜色可知耐水洗色牢度较好, 猜测反应产生的聚合物与头发存在共价及非共价的相互作用, 染发前的 L-酪氨酸溶液浸泡处理提高了头发表面、内部的 L-酪氨酸含量, 部分催化得到的多巴醌进入了头发内部, 经聚合后实现了部分颜色的内部固着, 多数多巴醌在头发表面发生了快速聚合并与头发产生了共价、非共价的黏附作用(表 6)。

综上, 重组酪氨酸酶 TyrVs 染发体系, 即由 200 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)、0.5 g/L L-酪氨酸、0.2 mmol/L CuSO_4 、20 $\mu\text{g/mL}$ TyrVs 纯酶液组成的染发体系, 经 0.5 g/L L-酪氨酸浸泡预处理浸泡后, 于 37 °C 条件下催化反应, 可使用高活性酶液实现以 L-酪氨酸为底物的原位催化生物染发, 达到国家药品监督管理局定义“半永久性染发剂”的染发效果。与文献报道^[8]所用蘑菇酪氨酸酶与 L-酪氨酸达到的染发效果一致, 具有开发酶染发剂的应用前景。

2.4 酪氨酸酶 TyrVs 蛋白晶体聚集体的制备

游离酶存在制备困难、产物与酶分离困难和仅可一次性使用的难题, 为实现更经济高效的催化应用, 制备固定化的酪氨酸酶 TyrVs, 可以在生物材料体外 DOPA 修饰环节中达到酶分离纯化便捷、酶与产物易分离及酶、反应可控性高及可重复使用的效果。

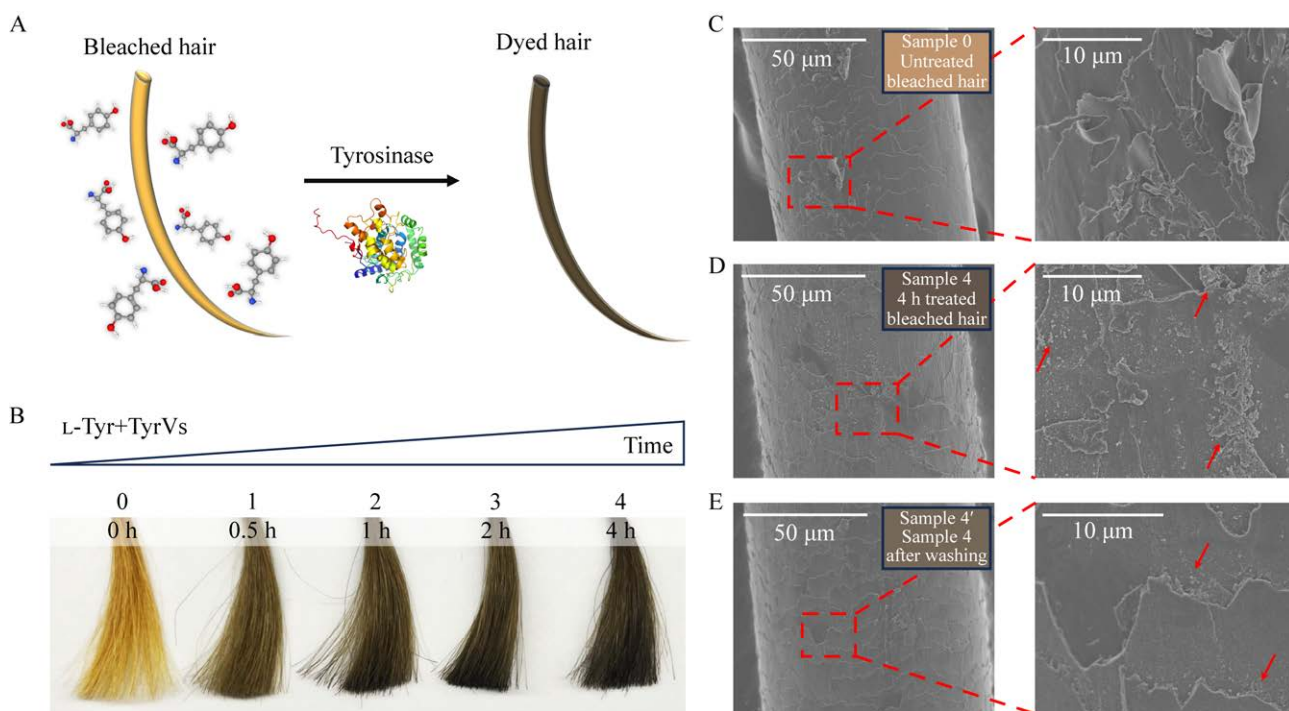







图 4 重组酪氨酸酶 TyrVs 染发体系在生物染发剂制备中的应用 A: 酪氨酸酶染发体系实现生物染发的示意图. B: 使用 0.5 g/L L-Tyr 与 20 $\mu\text{g/mL}$ TyrVs 作用不同时间后的染发效果. 样品 0: 未处理的中度漂白损伤人发样本(2 次漂白). 样品 1: 样品 0 经生物染发处理 0.5 h. 样品 2: 样品 0 经生物染发处理 1 h. 样品 3: 样品 0 经生物染发处理 2 h. 样品 4: 样品 0 经生物染发处理 4 h. C: 样品 0 的 SEM 图片. D: 样品 4 的 SEM 图片. E: 样品 4' (样品 4 经模拟清洁 7 次后得到)的 SEM 图片

Figure 4 Application of enzymatic hair dyeing system based on TyrVs in the preparation of biological hair dyeing. A: Schematic diagram of tyrosinase hair dyeing system for biological hair dyeing. B: The effect of hair coloring with 0.5 g/L L-Tyr and 20 $\mu\text{g/mL}$ TyrVs for different time. Sample 0: Untreated human hair with moderate bleaching injury (double bleached). Sample 1: Sample 0 treated with biological hair dye for 0.5 h. Sample 2: Sample 0 treated with biological hair dye for 1 h. Sample 3: Sample 0 treated with biological hair coloring for 2 h. Sample 4: Sample 0 treated with biological hair coloring for 4 h. C: SEM image of sample 0. D: SEM image of sample 4. E: SEM image of sample 4', sample 4 after simulated cleaning for 7 times.

表 5 浸染处理时间对染发效果的影响





Table 5 Effect of different treating times on hair dyeing effects

Sample	Treating time (h)	L^*	a^*	b^*	ΔE	Color
0	0	65.27 \pm 0.58 ^a	11.47 \pm 0.95 ^a	27.74 \pm 2.61 ^a	0.00	
1	0.5	50.13 \pm 1.35 ^b	6.64 \pm 0.98 ^b	15.44 \pm 0.50 ^b	20.12 \pm 1.41 ^d	
2	1	45.46 \pm 0.83 ^c	4.80 \pm 1.95 ^b	11.69 \pm 0.91 ^c	26.39 \pm 1.49 ^c	
3	2	41.11 \pm 0.54 ^d	5.86 \pm 1.65 ^b	9.00 \pm 0.88 ^{cd}	31.12 \pm 0.47 ^b	
4	4	37.36 \pm 0.77 ^e	3.82 \pm 1.62 ^b	8.42 \pm 1.60 ^d	34.84 \pm 1.11 ^a	

ΔE is the color difference between treated samples 1–4 and untreated sample 0. Different letters of a–e indicated significant difference between groups ($P < 0.05$).

表 6 模拟清洁(7次)对染发留色效果的影响

Table 6 Effect of simulated daily hair cleaning for half-month (7 times) on hair color retention

Sample	L^*	a^*	b^*	ΔE_1	ΔE_2	Color
1'	54.53±0.35	5.68±0.42	17.45±0.74	16.01±0.34	5.09±1.67	
2'	49.28±0.21	5.30±0.11	12.84±0.10	22.70±0.21	4.02±0.23	
3'	46.21±0.29	5.15±1.06	11.76±0.24	25.71±0.16	6.00±0.52	
4'	44.09±0.43	2.50±0.37	11.07±0.53	28.41±0.54	7.38±0.64	

ΔE_1 is the color difference between washed samples 1'–4' and untreated samples 0, standing for the degree of color retention; ΔE_2 is the color difference between washed samples 1'–4' and unwashed samples 1–4, standing for the degree of fading.

如图 5A 所示,基于发光杆菌(*P. luminescens*)来源的自组装标签蛋白 CipA 与目的蛋白在大肠杆菌中融合表达后,可实现基于 CipA 自组装特性的蛋白晶体聚集体活性表达,菌体经破碎、离心分离后,即可得到沉淀形式的固定化酶^[34-35]。本研究设计了 N 端、C 端融合表达的 CipA-TyrVs、TyrVs-CipA 蛋白表达框,使用 pET-28a(+)构建表达载体,在 *E. coli* BL21(DE3)中进行表达(图 5B)。蛋白表达结果经 SDS-PAGE 分析,如图 5C 所示,在相应泳道内可分别找到目的蛋白条带。其中泳道 2 的蛋白组成较泳道 4 更加复杂,可能是 CipA 标签的聚集能力太强,在 CipA-TyrVs 翻译未完全时已经出现了聚集现象,导致末端蛋白翻译不完整,出现多条带现象;而泳道 4 中的蛋白条带相对单一,表明 TyrVs-CipA 的胞内组装效果更好。经酶活测定发现 *E. coli* BL21(DE3)-CipA-TyrVs 细胞破碎液上清的活性更高,*E. coli* BL21(DE3)-TyrVs-CipA 细胞破碎液沉淀中的活性更高(图 5D)。

以上结果表明,自组装标签 CipA 经 C 端与 TyrVs 融合表达得到的 TyrVs-CipA,其在工程菌胞内的组装效果较好,得到的固定化酶活性可达(15.72±0.54) U/mL,更适合应用于生物材料的体外 DOPA 修饰。

2.5 细菌酪氨酸酶晶体聚集体 TyrVs-CipA 在水解丝素多巴修饰中的应用

丝素作为天然的生物材料,经酶水解后可

以获得水解丝素多肽混合物水解蚕丝 fibrin (hydrolyzed silk fibrin, HSF),同样适合作为组织工程研究与应用的原材料,经 DOPA 修饰后可以提升其交联能力与抗氧化能力。为提升 HSF 体外 DOPA 修饰的便捷性与高效性,使用固定化的酪氨酸酶 TyrVs-CipA 进行可控催化,即反应开始、结束可控,可以实现酶的快速制备、重复利用及便于与产物分离的效果,提高材料改性的可控性与经济性。

如图 6A 所示,HSF 经固定化酶 TyrVs-CipA 催化后颜色由浅黄色变为浅棕色,表明其 DOPA 修饰成功。经水解氨基酸分析测得 HSF 的酪氨酸残基质量百分浓度为 0.6%。HSF 经 TyrVs-CipA 单次催化 DOPA 修饰度可达 74.67%,经 7 次连续催化后,可保持每一批次的 DOPA 修饰度在 70.00% (图 6B),从实验结果可以看出,存在每批 DOPA 修饰度随催化次数波动上升的现象,可能是酶在连续催化前期较高的活性导致修饰所得 DOPA 残基氧化过度而进一步交联,检测结果低于实际结果,在固定化酶回收再利用的过程损失了部分活性,过度氧化现象减少,测得 DOPA 修饰度有所提高。进一步地,对 HSF 与 mHSF 进行抗氧化性能测定,如图 6C、6D 所示,HSF 本身存在对于 DPPH 自由基与超氧阴离子自由基的清除能力,经 DOPA 修饰后,mHSF 的抗氧化性得到显著提升,在相同作用浓度下,其对 DPPH 自由基与超氧阴离子

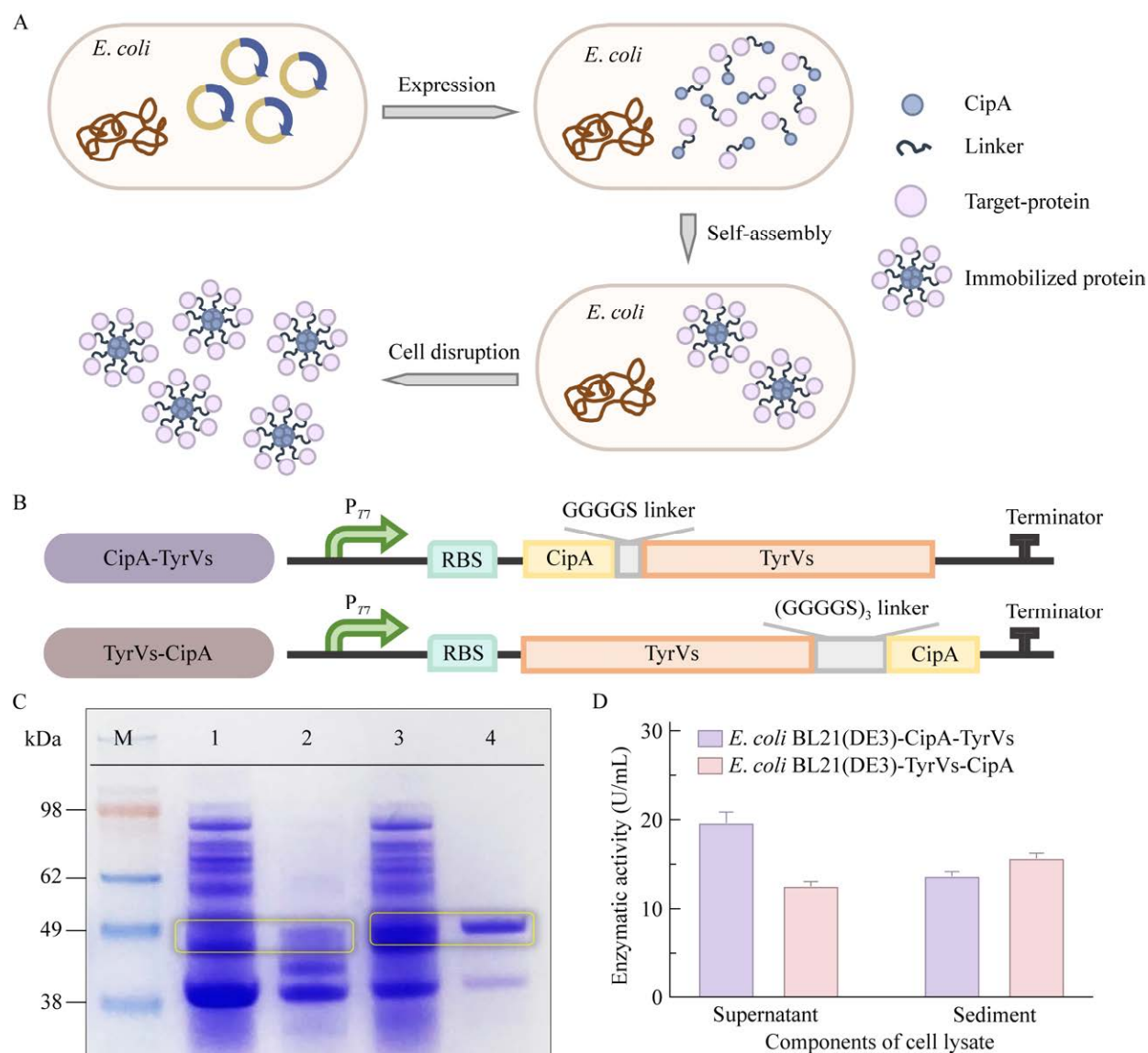


图 5 酪氨酸酶 TyrVs 蛋白晶体聚集体的构建、表达与活性测定 A: 基于 CipA 自组装标签的蛋白晶体聚集体制备示意图. B: N 端融合与 C 端融合表达固定化酪氨酸酶 TyrVs 的表达框构建示意图. C: N 端融合与 C 端融合固定化酪氨酸酶 TyrVs 表达情况 SDS-PAGE 图. M: SeeBlue™ 预染色蛋白标准品; 泳道 1、2: *E. coli* BL21(DE3)-CipA-Vs 菌体破碎液上清、沉淀; 泳道 3、4: *E. coli* BL21(DE3)-Vs-CipA 菌体破碎液上清、沉淀. D: 重组菌株破碎液上清及沉淀的活性测定

Figure 5 Construction, expression and enzyme activity of immobilized TyrVs. A: Schematic diagram of protein crystalline inclusions based on self-assembly label CipA. B: Schematic diagram of fusion expression cassette for expression of N-terminal-fusion and C-terminal-fusion immobilized TyrVs. C: SDS-PAGE analysis for the expression of immobilized TyrVs. M: SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard. Lane 1: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-CipA-Vs. Lane 2: Insoluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-CipA-Vs. Lane 3: Soluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Vs-CipA. Lane 4: Insoluble crude extract of *E. coli* BL21(DE3)-Vs-CipA. D: Enzyme activity of the supernatant and sediment of recombinant strains after cell disruption.

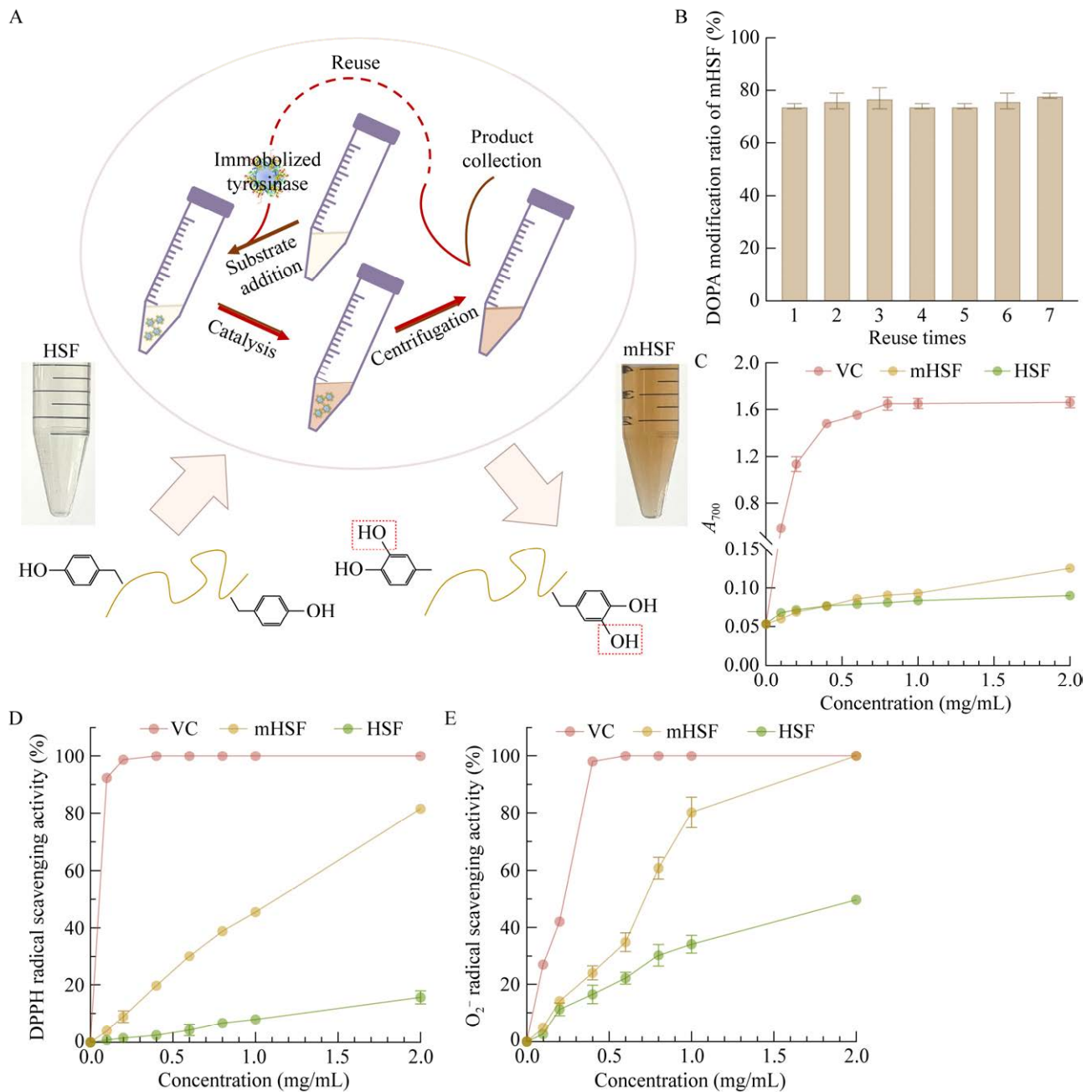


图6 固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 催化体系应用于 HSF 的 DOPA 修饰 A: 固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 催化体系用于 HSF 的 DOPA 修饰示意图及修饰前后的颜色变化. B: TyrVs-CipA 连续催化重复使用次数及相应 DOPA 修饰度. C: HSF 与 mHSF 的 Fe^{3+} 总还原力. D: HSF 与 mHSF 的 DPPH 自由基清除活性. E: HSF 与 mHSF 的超氧阴离子自由基清除活性

Figure 6 Application of immobilized tyrosinase TyrVs-CipA catalytic system in DOPA modification of HSF. A: Schematic diagram of immobilized TyrVs-CipA for DOPA modification of HSF and its color change after modification. B: TyrVs-CipA reuse time and the corresponding DOPA modification ratio. C: The total reducing power of Fe^{3+} of HSF and mHSF. D: DPPH radical scavenging activity of HSF and mHSF. E: Superoxide anion radical scavenging activity of HSF and mHSF.

自由基的清除率平均提高了 507.80%与 78.23%。然而, DOPA 修饰不足以提高其对 Fe^{3+} 的还原能力。

以上结果说明, 固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 可以实现对水解丝素多肽 HSF 的高效、可控的体外 DOPA 修饰, 酶连续催化达 7 次以上, 且在 15 min 的单个催化后, 修饰度可达 70.00% 以上。经过 DOPA 修饰后得到的 mHSF, 对 DPPH 自由基及超氧阴离子自由基的清除能力相较于未修饰的 HSF 有显著提升。引入 DOPA 结构提高了 HSF 的抗氧化能力, 有助于丝素蛋白在组织工程等领域的应用。

3 讨论与结论

酪氨酸酶在食品、环境、医药、组织工程、生物传感器等领域均有良好的应用前景, 目前商品化蘑菇酪氨酸酶依赖于真菌提取, 存在价格高、纯度低、比酶活低和稳定性差等问题, 限制了酪氨酸酶在相关领域的应用。而相较之下, 细菌酪氨酸酶具有更好的酶学性质, 因此, 获得高效表达并具有工业化应用前景的细菌酪氨酸酶具有较大研究意义。细菌酪氨酸酶在结构上可分为 5 种类型, 其中, *B. megaterium* 来源的 TyrBm 为 II 型细菌酪氨酸酶, 得益于其结构优势以及无潜在的活性抑制和限制因素, 通常具有较高异源表达活性, 近年被广泛研究并逐渐用于多种高价值化合物的催化合成^[36]。

本研究通过对包含 TyrBm 在内的 5 种不同来源的细菌酪氨酸酶进行显色平板筛选, 确定了在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中, 37 °C、220 r/min、1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的培养条件下, 具有较高活性的重组酪氨酸酶为 TyrVs 与 TyrBm。显色平板法的筛选结果与酶活性测定结果具有一致性, 因此, 此方法在酪氨酸酶的异源表达活性或酪氨酸酶抑制剂的筛选中可以

起到半定性指示作用。在此基础上, 为比较 TyrBm 与 TyrVs 的酶学性质, 将二者经蛋白纯化后, 测定、对比了 pH 与温度对二者活性的影响, 并进一步确定了二者的热稳定性与酶动力学参数。实验结果证明了 TyrVs 的热稳定性更强(40 °C 孵育 200 min 后酶活剩余 80% 以上)、对 L-酪氨酸的催化效果更好, 而 TyrBm 对 L-酪氨酸的底物亲和性与催化效率较低, 热稳定性较差, 或许更适合进行酶的定向进化, 并用于多种酚类底物的短时催化转化^[5]。

目前多数酪氨酸酶的应用仍倾向于使用商品化酪氨酸酶, 而对重组酪氨酸酶的应用多为小分子底物催化合成, 应用场景较局限。在本研究中, 基于 TyrVs 高催化效率、高稳定性的优势, 构建了基于 TyrVs 的生物染发体系, 染发后颜色有明显变黑、变蓝、变绿的现象, 其水洗色牢度较好, 经模拟 14 d 清洁后头发表面仍保留部分色素颗粒, 褪色程度较低 $[\Delta E < (7.38 \pm 0.64)]$, 达到国家药品监督管理局定义“半永久性染发剂”的染发效果。与已报道的基于 TyrAb 的酶催化染发体系^[8]相比, 本体系使用重组酶 TyrVs 可以达到相同的染发效果, 且颜色保留程度较好。

此外, 尽管游离状态的 TyrVs 可与反应底物充分接触, 但仅可催化单次反应, 在短时催化反应过程中无法展现其稳定性优势, 也可能造成催化反应不可控^[19]。进一步地, 本研究通过在 TyrVs 的 N 端与 C 端分别融合表达自组装标签蛋白 CipA, 获得了蛋白晶体聚集体 CipA-TyrVs 与 TyrVs-CipA, 即固定化的酪氨酸酶。根据固定化组分分析与酶活比较, 证明了固定化酶 Tyr-CipA 具有更好的固定化效果与催化效果。目前已报道的固定化酪氨酸酶主要采用商品化酪氨酸酶经固定化载体或交联剂固定制得, 需要对待固定纯酶液或粗酶液进行固定化操作。本研究首次实现了基于自组装标签蛋白 CipA 的

“胞内一步法”酪氨酸酶晶体聚集体的制备,大大简化了重组固定化酪氨酸酶的制备过程。与已报道的聚羟基链烷酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)-TyrVs 纳米颗粒^[37]的繁琐纯化步骤相比,本研究所得固定化酶仅需破碎细胞后进行简单的离心分离操作即可获得,进一步提高了固定化酶制备的便捷性。

最后,将固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 应用于 HSF 的 DOPA 修饰,实现了高效、可控、连续的催化反应,固定化酶经离心分离回收后可重复使用 7 次以上,单次 DOPA 修饰度高于 70.00%,修饰后的 mHSF 对 DPPH 自由基及超氧阴离子自由基的清除能力较 HSF 分别提高了 507.80%与 78.23%。本研究所得固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 有望用于含 DOPA 结构生物大分子^[38]的催化制备与应用。

综上,本研究实现了基于大肠杆菌高效异源表达的酪氨酸酶 TyrVs 与固定化酪氨酸酶 TyrVs-CipA 的便捷制备与应用,为基于酪氨酸酶的绿色生物染发剂及组织工程生物材料的开发提供技术基础与思路。在后续研究中,可对细菌酪氨酸酶的潜在催化底物进行挖掘与分析,结合酪氨酸酶的定向进化与扩大培养策略,以期进一步拓展细菌酪氨酸酶的应用场景。

REFERENCES

- [1] del MARMOL V, BEERMANN F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation[J]. FEBS Letters, 1996, 381(3): 165-168.
- [2] HALAOULI S, ASTHER M, SIGOILLOT JC, HAMDIM, LOMASCOLO A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(2): 219-232.
- [3] CLAUS H, DECKER H. Bacterial tyrosinases[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(1): 3-14.
- [4] 沈玥祺, 吴文标. 食品及其原料中的黑色素研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 405-416.
- [5] SHEN YQ, WU WB. Progress of research on melanin in foods and their materials[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 405-416 (in Chinese).
- [6] ZHOU JH, LIU CW, ZHAO SM, LIU Y, ZHANG S, ZHAO Q, WANG F, XU G, HUANG JN, LIU ZH. Improved yield of theaflavin-3,3'-digallate from *Bacillus megaterium* tyrosinase via directed evolution[J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131848.
- [7] SHEN YH, LIU JY, WANG YF, QI W, SU RX, HE ZM. Colorful pigments for hair dyeing based on enzymatic oxidation of tyrosine derivatives[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(29): 34851-34864.
- [8] 金睿明, 穆晓清, 徐岩. 生物-化学法合成黑色素前体 5,6-二羟基吲哚[J]. 高等学校化学学报, 2022, 43(8): 119-125.
- [9] JIN RM, MU XQ, XU Y. Bio-chemical synthesis of melanin precursor-5,6-dihydroxyindole (DHI)[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2022, 43(8): 119-125 (in Chinese).
- [10] BATTISTELLA C, MCCALLUM NC, VANTHOURNOUT B, FORMAN CJ, NI QZ, LA CLAIR JJ, BURKART MD, SHAWKEY MD, GIANNESCHI NC. Bioinspired chemoenzymatic route to artificial melanin for hair pigmentation[J]. Chemistry of Materials, 2020, 32(21): 9201-9210.
- [11] CHA GS, MOK JA, YUN CH, PARK CM. Production of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine using novel tyrosinases from *Bacillus megaterium*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 160: 110069.
- [12] FLEMING MC, BOWLER MM, PARK R, POPOV KI, BOWERS AA. Tyrosinase-catalyzed peptide macrocyclization for mRNA display[J]. Journal of the American Chemical Society, 2023, 145(19): 10445-10450.
- [13] 崔鹏鹏, 单瑞达, 王怡淑, 李霞, 孙登岳, 曾志雄. 新型青枯雷尔氏菌来源双核含铜酪氨酸氧化酶的异源表达及生化性质鉴定[J]. 齐鲁工业大学学报, 2023, 37(5): 41-50.
- [14] CUI PP, SHAN RD, WANG YS, LI X, SUN DY, ZENG ZX. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cyanobacteria-derived dinuclear copper-containing tyrosine oxidase[J]. Journal of Qilu University of Technology, 2023, 37(5): 41-50 (in Chinese).
- [15] AKSAMBAYEVA AS, ZHAPAROVA LR, SHAGYROVA

- ZS, ZHIYENBAY E, NURGOZHIN TS, RAMANKULOV EM, SHUSTOV AV. Recombinant tyrosinase from *Verrucomicrobium spinosum*: isolation, characteristics, and use for the production of a protein with adhesive properties[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, 54(8): 780-792.
- [13] GUO Q, ZOU GJ, QIAN XL, CHEN SJ, GAO HJ, YU J. Hydrogen-bonds mediate liquid-liquid phase separation of mussel derived adhesive peptides[J]. Nature Communications, 2022, 13: 5771.
- [14] KIM HJ, HWANG BH, LIM S, CHOI BH, KANG SH, CHA HJ. Mussel adhesion-employed water-immiscible fluid bioadhesive for urinary fistula sealing[J]. Biomaterials, 2015, 72: 104-111.
- [15] CHOI S, AHN H, KIM SH. Tyrosinase-mediated hydrogel crosslinking for tissue engineering[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2022, 139(14): 51887.
- [16] PARK S, KWAK DE, HAQUE AM J, LEE NS, YOON YH, YANG H. Phenolic tyrosinase substrate with a formal potential lower than that of phenol to obtain a sensitive electrochemical immunosensor[J]. ACS Sensors, 2022, 7(3): 790-796.
- [17] ZHANG JH, HUANG W, ZHANG LX, TANG XK, SUN GY, ZOU LH. Modifying a bacterial tyrosinase zymogen for use in protease activity assays[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(24): 8285-8294.
- [18] WANG FH, XU ZH, WANG C, GUO ZH, YUAN ZT, KANG HW, LI JW, LU FP, LIU YH. Biochemical characterization of a tyrosinase from *Bacillus aryabhatai* and its application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 176: 37-46.
- [19] 闭静秀, 何利中, 高敏. 贻贝粘蛋白氧化交联特性研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(55): 66-67, 69.
- BI JX, HE LZ, GAO M. Study on oxidative crosslinking characteristics of mussel mucin[J]. World Latest Medicine Information, 2018, 18(55): 66-67, 69 (in Chinese).
- [20] 雷彩虹, 俞林双, 朱海霖, 郑涛, 陈建勇. 不同水解方式下蚕丝丝素蛋白材料的止血性能[J]. 纺织学报, 2022, 43(4): 15-19.
- LEI CH, YU LS, ZHU HL, ZHENG T, CHEN JY. Hemostasis properties of silk fibroin materials under different types of hydrolysis[J]. Journal of Textile Research, 2022, 43(4): 15-19 (in Chinese).
- [21] 米锐, 李学军, 马淑慧, 孟楠, 李树英, 都兴范. 响应面法优化水解制备柞蚕丝素肽及其性能[J]. 日用化学工业, 2021, 51(7): 612-619.
- MI R, LI XJ, MA SH, MENG N, LI SY, DU XF. Optimization of hydrolysis preparation of tussah fibroin peptides by response surface methodology and the performance thereof[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2021, 51(7): 612-619 (in Chinese).
- [22] MIGUEL SP, SIMÕES D, MOREIRA AF, SEQUEIRA RS, CORREIA IJ. Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 524-535.
- [23] LIANG YP, LI M, YANG YT, QIAO LP, XU HR, GUO BL. pH/glucose dual responsive metformin release hydrogel dressings with adhesion and self-healing via dual-dynamic bonding for athletic diabetic foot wound healing[J]. ACS Nano, 2022, 16(2): 3194-3207.
- [24] DAS S, PATI F, CHOI YJ, RIJAL G, SHIM JH, KIM SW, RAY AR, CHO DW, GHOSH S. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs[J]. Acta Biomaterialia, 2015, 11: 233-246.
- [25] 斯梦. 核桃发酵乳的制备及其品质影响因素的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
- SI M. Study on the preparation of walnut fermented milk and influencing factors of its quality[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [26] 龚梦瑶. 基于贻贝粘附机理的粘胶蛋白虚拟挖掘与功能表征[D]. 武汉: 华中科技大学硕士学位论文, 2021.
- GONG MY. Virtual mining and functional characterization of adhesive proteins based on mussel adhesion mechanism[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [27] 高欣妍, 王海英, 刘志明. 桑叶乙醇提取物的体外抗氧化与抑菌活性[J]. 生物质化学工程, 2019, 53(2): 35-40.
- GAO XY, WANG HY, LIU ZM. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of ethanol extract from mulberry leaves[J]. Biomass Chemical Engineering, 2019, 53(2): 35-40 (in Chinese).
- [28] 尧馨慧, 张云丰, 康振, 陈坚. 人工抗氧化肽的设计、表达纯化及功能表征[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(8): 10-16.

- YAO XH, ZHANG YF, KANG Z, CHEN J. Design, expression, purification and functional characterization of artificial antioxidant peptides[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(8): 10-16 (in Chinese).
- [29] HERNÁNDEZ-ROMERO D, SANCHEZ-AMAT A, SOLANO F. A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio[J]. *The FEBS Journal*, 2006, 273(2): 257-270.
- [30] CABRERA-VALLADARES N, MARTÍNEZ A, PIÑERO S, LAGUNAS-MUÑOZ VH, TINOCO R, de ANDA R, VÁZQUEZ-DUHALT R, BOLÍVAR F, GOSSET G. Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(6): 772-779.
- [31] SHUSTER V, FISHMAN A. Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17(4): 188-200.
- [32] FAIRHEAD M, THÖNY-MEYER L. Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase[J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(9): 2083-2095.
- [33] LÓPEZ-SERRANO D, SOLANO F, SANCHEZ-AMAT A. Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*[J]. *Gene*, 2004, 342(1): 179-187.
- [34] WANG Y, HEERMANN R, JUNG K. CipA and CipB as scaffolds to organize proteins into crystalline inclusions[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(5): 826-836.
- [35] WANG PL, XU RR, ZHAO LL, WANG Y, DU GC, CHEN J, KANG Z. Construction of a protein crystalline inclusion-based enzyme immobilization system for biosynthesis of PAPS from ATP and sulfate[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(5): 1487-1496.
- [36] FAIRHEAD M, THÖNY-MEYER L. Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology[J]. *New Biotechnology*, 2012, 29(2): 183-191.
- [37] TAN D, ZHAO JP, RAN GQ, ZHU XL, DING Y, LU XY. Highly efficient biocatalytic synthesis of L-DOPA using *in situ* immobilized *Verrucocomicrobium spinosum* tyrosinase on polyhydroxyalkanoate nano-granules[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 5663-5678.
- [38] ZENG HB, HWANG DS, ISRAELACHVILI JN, WAITE JH. Strong reversible Fe³⁺-mediated bridging between dopa-containing protein films in water[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(29): 12850-12853.

(本文责编 陈宏宇)