

# 双孢蘑菇来源非特异性过氧合酶在毕赤酵母中的表达及生化表征

庞能威<sup>1</sup>, 杨博<sup>1</sup>, 王永华<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究以来源于 (*Agaricus bisporus* var. *bisporus*, *Abvb*) 的非特异性过氧合酶 *Abvb* UPO 为目标蛋白, 实现了其在毕赤酵母 GS115 中的异源分泌表达。Western blot 检测结果表明重组 *Abvb*UPO 分子量为 35 ku。酶生化表征研究发现, 非特异性过氧合酶 *Abvb*UPO 的最适反应温度和 pH 分别为 35 °C 和 3.0。通过过氧化氢耐受性实验, 发现 2 mM 以上的过氧化氢会导致 *Abvb*UPO 钝化。为保持 *Abvb*UPO 在反应过程中的活力, 原位生成过氧化氢的 *Abvb*UPO 酶级联催化反应被应用于其催化能力的鉴定。以乙基苯为底物的 *Abvb*UPO 酶级联催化反应, 经过 4 h 的反应后, 产物  $\beta$ -苯乙醇的得率可达 14.40%。上述研究表明, *Abvb*UPO 是一种不耐受高温和高浓度过氧化氢的中温酶, 但在原位生成过氧化氢的级联反应中 *Abvb*UPO 可保持良好的催化性能。本研究为非特异性过氧合酶的异源表达和生物催化应用提供了一个良好的借鉴。

**关键词:** 双孢蘑菇; 非特异性过氧合酶; 异源表达; 羟基化

文章编号: 1673-9078(2021)01-31-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0270

## Expression and Biochemical Characteristics of Unspecific Peroxygenase

### Derived from *Agaricus bisporus* var. *bisporus* in *Pichia pastoris*

PANG Neng-wei<sup>1</sup>, YANG Bo<sup>1</sup>, WANG Yong-hua<sup>2</sup>

(1.School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, an unspecific peroxygenase *Abvb*UPO derived from *Agaricus bisporus* var. *bisporus* was used as the target protein to achieve heterologous expression in *Pichia pastoris* GS115. Western blot results showed that the molecular mass of *Abvb*UPO was 35 ku. Biochemical characterization of the enzyme revealed that the optimal reaction temperature and pH of the unspecific peroxygenase *Abvb*UPO were 35 °C and 3.0, respectively. Hydrogen peroxide tolerance experiments revealed that hydrogen peroxide above 2.0 mM deactivated *Abvb*UPO. In order to maintain the activity of *Abvb*UPO in the reaction process, the insitu production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> occurring in the *Abvb*UPO enzyme cascade catalytic reaction was used for the identification of its catalytic ability. After the 4 h *Abvb*UPO enzyme cascade catalytic reaction with ethylbenzene as the substrate, the yield of the product  $\beta$ -phenylethanol reached 14.40%. The above research results show that *Abvb*UPO was a mesophilic enzyme that could not tolerate high temperature and high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but can maintain good catalytic performance in the cascade reaction of insitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. This study provides a reference for the heterologous expression and biocatalytic application of unspecific peroxygenase.

**Key words:** *Agaricus bisporus* var. *bisporus*; unspecific peroxygenase; heterologous expression; hydroxylation

引文格式:

庞能威,杨博,王永华.双孢蘑菇来源非特异性过氧合酶在毕赤酵母中的表达及生化表征[J].现代食品科技,2021,37(1): 31-37

PANG Neng-wei, YANG Bo, WANG Yong-hua. Expression and biochemical characteristics of unspecific peroxygenase derived from *Agaricus bisporus* var. *bisporus* in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 31-37

收稿日期: 2020-03-22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31930084); 国家自然科学基金杰出青年科学基金项目 (31725022); 广东省 MEPP 基金项目 (GD. GD0E [2019] A20)

作者简介: 庞能威 (1994-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 酶工程

通讯作者: 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶工程

非特异性过氧合酶 (Unspecific peroxygenase, UPO, EC 1.11.2.1) 属于血红素氧化酶超家族的一员<sup>[1]</sup>, 与单加氧酶 P450 的催化功能相似, 它能对一系列底物进行氧化并表现产物的出位置选择性和立体选择性。P450 的催化反应需要利用 O<sub>2</sub> 分子作为供氧剂, 同时依赖 NAD(P)H 辅助催化氧化过程的发生。而 UPO 可直接催化转移 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中的氧分子到底物中, 无需额外的辅因子参与, 所以 UPO 具有更高的工业应用价值。除了催化有机化合物的非活性 C-H 键之外, UPO 还可以实现卤代芳香化合物的氧化<sup>[2]</sup>、含有 C=C 键化合物的环氧化<sup>[3]</sup>和硫化物的氧化<sup>[4]</sup>等, 因此其在食品原料加工<sup>[5]</sup>、医药行业<sup>[6]</sup>和环境治理<sup>[7]</sup>等领域有巨大的应用潜力。

研究发现, UPO 主要存在于双核菌亚界(Dikarya) 和高等真菌界的子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota) 中<sup>[1]</sup>。由于真菌孢子难以实现高密度发酵, 从而导致大规模获得野生型 UPO 十分困难, 目前只有少数 UPO 被表达和鉴定。因此异源宿主重组表达是获得 UPO 重要的途径之一, 然而异源宿主重组表达具有活力的非特异性过氧合酶一直是巨大的挑战<sup>[8,9]</sup>, 目前报道的十余种 UPO, 仅有六种 UPO 实现了异源表达。随着高通量基因组测序技术的发展, 大量微生物基因组信息被储存在公共生物数据中。利用生物信息学方法从海量数据中获得假定的酶基因序列, 是获得有价值酶制剂的重要途径之一。

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 是自然界中的一种常见食用菌, 它具有较强降解腐殖质的能力, 因此能更好地适应复杂的营养环境。但是, 目前尚不完全了解双孢蘑菇利用各种养分资源的机制。此前 Emmanuelle Morina 等<sup>[10]</sup>提出假说: 双孢蘑菇可能已经进化出了其特有的代谢策略和生态适应性, 这都源于它具有的独特的底物转化酶, 而 UPO 正是该类物种特有的酶之一。本研究实现了来自 *Agaricus bisporus var. bisporus* 的非特异性过氧合酶 (*AbvbUPO*) 基因在毕赤酵母 GS115 进行异源分泌表达并初步研究了其催化特性, 为继续探究其底物特异性揭示其环境适应性的可能原因打下基础, 以期获得生物化工和食品化工领域应用的 UPO 酶制剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

毕赤酵母表达菌株 GS115, 质粒 pPIC9K 均为本实验室保存, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自唯地生

物科技有限公司。

#### 1.1.2 生化试剂

限制性内切酶 BamHI, 高保真 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 大连生物工程公司; 无缝克隆试剂盒购自中美泰和生物技术(北京)有限公司; 质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Westernblot 的一抗为小鼠抗 His-tag 单克隆抗体, 二抗为山羊抗小鼠 IgG (H&L) 二抗 (HRP 标记), 均购自金瑞斯生物科技有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器设备

EDG-810 型 PCR 仪, 东胜创新生物技术科技有限公司; 生化培养箱, 重庆市永生试验仪器厂; DYY-8C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; SKY2102C 型摇床, SUKUN; 全自动凝胶成像仪, BIO-RAD; 7000D 型 GC-TQ/MS, 安捷伦科技有限公司; HP-INNOWax 色谱柱, 安捷伦科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 序列的合成和分析

*AbvbUPO* 基因序列 (XP\_006457061.1) 委托上海生工生物工程股份有限公司合成。使用 DNAMAN 软件进行序列的对比, 使用 ESPript<sup>[11]</sup> (网站) 呈现同源比对结果。

### 1.2.2 非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 的基因克隆

利用 PCR 扩增技术获得目的基因片段 (上游引物: 5'-GAGGCTGAAGCTTACGTAGAATCACCAGG TGCTCCTCCTGGA-3'; 下游引物: 5'-TTAATGATGATGATGATGATGGGATCCTTAATTGTCATTCGCCATA GGG-3'), 扩增条件如下: 98 °C 5 min, 98 °C 15 s、55 °C 15 s、72 °C 1 min 共 30 个循环, 循环结束后 72 °C 保持 5 min。将 BamHI 单酶切后的 pPIC9K 载体与扩增得到的目的基因进行连接, 转至 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中并涂布至含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的固体 LB 平板。次日, 提取重组质粒并送往上海生工公司测序。

### 1.2.3 重组蛋白 *AbvbUPO* 的表达

(1) 重组酵母的摇瓶发酵: 将重组质粒 pPIC9K-*AbvbUPO* 电转化至 *P. pastoris* GS115 中, 种子液按 10% 接种量接种至 100 mL 的 BMGY 液体培养基中 30 °C、200 r/min 培养。24 h 后将发酵液低温离心, 去除上清液后加入 100 mL 的 BMMY 培养基进行诱导表达, 每隔 24 h 补加 0.5 mL 的甲醇。甲醇诱导 72 h 后停止培养, 将发酵液进行低温离心, 收集上清

液, 利用 10 ku 截留超滤管进行浓缩, 浓缩后用 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot 检测 *AbvbUPO* 在 *P. pastoris* GS115 中的表达情况。

(2) 重组酵母的发酵罐发酵: 二级种子液按 10% 接种量接种, 30 °C、200 r/min 培养 24 h。将培养至对数生长期的二级种子液按 10% (V/V) 接种到经过高压灭菌的 5 L 发酵罐中 (含 3 L 基础盐培养基: 26.7 mL/L 的 85% 磷酸, 0.93 g/L 的  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 14.9 g/L 的  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 18.2 g/L 的  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 7.13 g/L 的 KOH, 40 g/L 的甘油, 灭菌后加入 PTM1 微量元素至 12 mL/L), 30 °C、800 r/min 培养。当基础盐培养基的甘油被消耗完时, 用 50% (V/V) 的甘油进行补料 (含 12 mL/L 的 PTM1 微量元素), 流速根据溶氧 (DO) 调整, 使溶解氧浓度保持在 40% 左右。当湿重达到 160 g/L 时停止补料并饥饿培养 1 h, 饥饿培养结束后, 将温度设为 22 °C, pH 控制在 6.0 左右。流加甲醇进行低温诱导使其溶氧控制在 40% 左右至 132 h。酶液用 10 ku 切向流超滤膜包进行浓缩后检测重组蛋白的表达情况和酶活力。

#### 1.2.4 UPO 活力检测

本实验用 2,2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 作为底物检测 *AbvbUPO* 的酶活<sup>[12]</sup>。1 个酶活力单位定义为: 在 25 °C 和 pH 4.0 条件下, 每分钟水解 1  $\mu\text{mol}$  底物 (ABTS) 生成对应产物 (ABTS 自由基) 所需的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

#### 1.2.5 SDS-PAGE 和 Western blot 检验

SDS-PAGE: 将蛋白质样品用 5% 的浓缩胶浓缩, 并通过 10% 的分离凝胶进行不同分子量蛋白质的分离, 最后将分离凝胶用考马斯蓝 R250 染色。

Western blot: 将装有 SDS-PAGE 凝胶和 0.2  $\mu\text{m}$  聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 的电转印夹放入电泳槽中低温转印。转印结束后, PVDF 膜用 5% (m/V, TBST 溶解) 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后与小鼠抗 His 标签抗体 (Genscript, 中国上海) 一起低温过夜孵育, 孵育结束后用 TBST 缓冲液清洗, 随后用山羊抗小鼠 IgG (H&L) 二抗 (HRP 标记) 孵育, 最后用 DAB 显色液 (Solarbio, 中国上海) 显色以验证重组 His-tag-*AbvbUPO* 蛋白。

#### 1.2.6 *AbvbUPO* 的酶学性质表征

##### 1.2.6.1 粗酶液的缓冲液置换

为了避免酶发酵液中离子成分对酶活力造成影响, 进行酶活性评估前需对原有的缓冲液进行置换。利用 10 ku 孔径截留的超滤管置换缓冲液, 按照粗酶液与 20 mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 的比例为 1:10 添加磷酸盐缓冲液, 置换缓冲液多次至发酵罐缓冲液

成分为微量为止。

##### 1.2.6.2 最适反应温度和热稳定性

最适反应温度: 按照方法 1.2.4 的活性检测方法, 检测 25~42 °C 范围内 *AbvbUPO* 酶液催化 ABTS 的活性变化。缓冲体系为 100 mM 的磷酸钠缓冲液 (pH 4.0), 反应时间为 10 min。热稳定性: 测定 *AbvbUPO* 酶液在 30、35 和 40 °C 下孵育 10~120 min 下的残余酶活力。

##### 1.2.6.3 最适反应 pH

以 ABTS 为底物, 在 pH 范围为 3.0~7.0 的缓冲液下测酶活性的变化, 其他条件保持不变。其中 pH 3.0~5.0 范围所使用缓冲液为 100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 6.0~7.0 的范围所使用缓冲液为 100 mM 磷酸盐缓冲液。

##### 1.2.6.4 过氧化氢耐受性

将 *AbvbUPO* 酶液与不同浓度 (2、5、10、20 mM) 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  进行等体积孵育, 孵育 5 min 后按照反应体系内  $\text{H}_2\text{O}_2$  等量的原则调整加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  的量进行残余活力测定。

##### 1.2.6.5 酶级联催化反应及产物检测

向 5 mL 旋盖玻璃瓶中依次添加 400  $\mu\text{L}$  的 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)、100  $\mu\text{L}$  的 1 M 氯化胆碱溶液, 充氧后, 加入 50  $\mu\text{L}$  的 100  $\mu\text{M}$  胆碱氧化酶 (*AnChOx*) 酶液, 400  $\mu\text{L}$  的 *AbvbUPO* 酶液, 5 mM 乙基苯, 最后用 50 mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 补足 1 mL。玻璃瓶放置于恒温油浴锅, 于反应温度为 30 °C、搅拌速度为 500 r/min 条件下反应, 反应结束后用乙酸乙酯萃取, 离心后取上层有机层进行 GC-MS 检测分析。

GC-MS 检测升温条件: 以 10 °C/min 的升温速率从最初的 50 °C 升温至 190 °C, 保持 3 min, 以 5 °C/min 的升温速率从 190 °C 升温至 230 °C, 然后保持 6 min。

产物浓度的计算: 精确称取  $\beta$ -苯乙醇, 配置成 1、2、3、4、5 mM 的  $\beta$ -苯乙醇溶液, 通过对标准品进行 GC-MS 检测, 根据气相色谱图的吸收峰绘制  $\beta$ -苯乙醇的浓度标准曲线。将萃取物中保留时间与产物相对应的吸收峰代入标准曲线即得产物浓度, 苯乙酮的含量仅为相对定量。

##### 1.2.7 数据处理

用 Origin 8.5 软件作图并用 SPSS 9.0 进行统计学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 序列比对分

析

对目前报道的 UPO 酶基因进行分析, 发现 UPO 催化保守序列为 Pro-Cys-Pro (PCP)、Glu-Gly-Asp (EGD) 和酸碱催化剂对 Arg-Glu (R-E), 其中 Arg 和 Glu 充当酸碱对在过氧化物酶催化活性中间体的形成起着重要的稳定作用<sup>[8]</sup>。AbvbUPO 成熟肽基因的分子量为 984 bp, 编码 328 个氨基酸, 蛋白分子量理论

值大小为 35 ku, DNAMAN 软件序列比对分析发现 AbvbUPO 与 *Agrocybe aegerita* UPO (AaeUPO)、*Coprinus radians* UPO 和 *Coprinopsis cinerea* UPO 中氨基酸序列存在 38.64%~62.93%的相似性。同源序列对比如图 1 所示, AbvbUPO 具有 UPO 的催化保守序列, 即 Pro81-Cys82-Pro83, Glu168-Gly169-Asp170 和 Arg235-Glu242, 提示 AbvbUPO 可能具有 UPO 的催化特性。

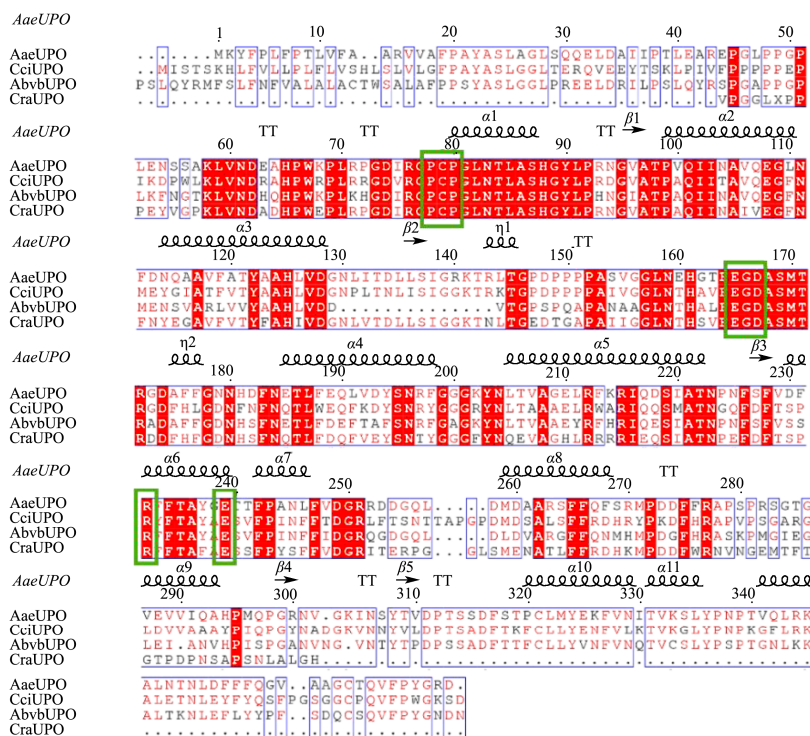


图 1 AbvbUPO 的序列比对及同源性分析

Fig.1 Multiple sequence alignment of AbvbUPO and its homologs

注: 上方序号代表氨基酸的位置; 绿色框划线代表催化活性中心。

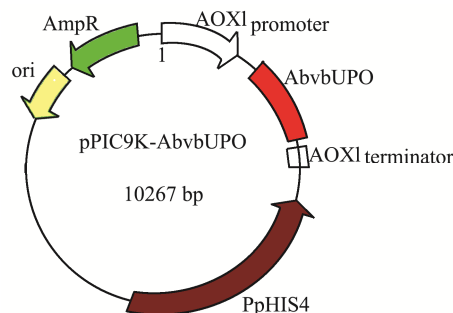
## 2.2 非特异性过氧合酶 AbvbUPO 基因克隆及

表达

质粒谱图如图 2 所示, 基因片段与带有组氨酸标签的 pPIC9K 载体连接后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中。菌落 PCR 呈阳性的转化子送往测序中心测序, 进一步确认 AbvbUPO 成功克隆到 pPIC9K 载体上。

真核表达系统具有完善的翻译后修饰功能, 可有效提升异源表达的蛋白可溶性及活性, 因此选用了毕赤酵母 GS115 作为表达宿主。然而毕赤酵母重组菌在摇瓶发酵中, 没有检测出目的蛋白条带及酶活, 故将毕赤酵母重组菌在 5 L 发酵罐中进行高密度发酵, Western blot 结果显示 AbvbUPO 在毕赤酵母 GS115 中表达的分子量为 35 ku (图 3)。浓缩酶液具有氧化 ABTS 底物的酶活力, 其 132 h 发酵单位活力为

45399.26 U/L。实验结果与 Miguel Alcalde 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致, 克隆至毕赤酵母 X33 的野生型 AaeUPO 在小型发酵中, 表达量几乎无法达到检测限, 提示野生型 UPO 的表达量低, 小型发酵无法达到 UPO 的蛋白质及酶活的检测水平。目前, 仅有 AaeUPO 在酵母中得以表征, Miguel Alcalde 等<sup>[13]</sup>在毕赤酵母中, 利用发酵罐高密度发酵 AaeUPO 定向进化后的突变体 PaDa-I, 培养 6 d 酶活可达 232000 U/L。



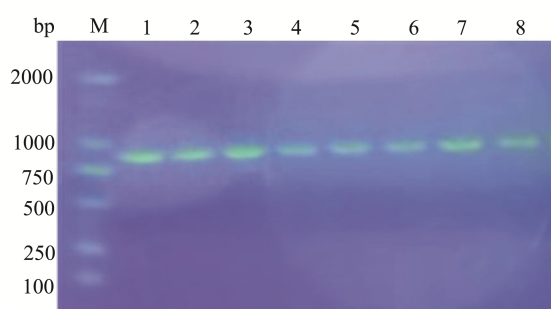


图2 质粒谱图和琼脂糖凝胶电泳检测菌落 PCR

Fig.2 Plasmid and agarose gel electrophoresis of colony PCR

注：上图为质粒谱图，下图为菌落 PCR 结果；M: DNA marker; 1-8: 同一平板的不同单克隆。

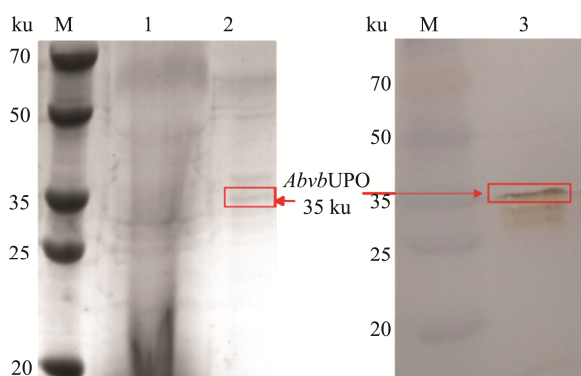


图3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测重组蛋白在 *P. pastoris* GS115 中表达

Fig.3 SDS-PAGE and western blot analysis of the expression of the recombinant protein in *P. pastoris* GS115

注：M: 蛋白 Marker; 1: 粗酶液浓缩 180 倍; 2: 粗酶液浓缩 60 倍; 3: 粗酶液浓缩 60 倍。

### 2.3 *AbvbUPO* 的酶学性质表征

#### 2.3.1 温度对 *AbvbUPO* 活力的影响

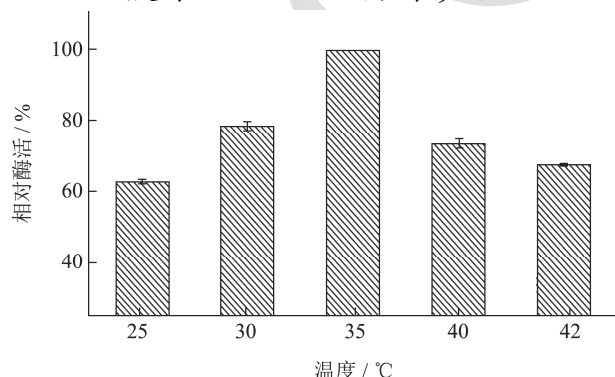


图4 非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 最适反应温度

Fig.4 Optimum temperature of *AbvbUPO*

本实验针对酶反应时的最适温度和热稳定性进行考察。如图4所示, *AbvbUPO* 酶液的最适反应温度为 35 °C、30 °C 和 40 °C 可保持最大活力的 73.39~78.40% (图4)。目前被研究最透彻的 *AaeUPO* 的最适

反应温度为 30 °C<sup>[14,15]</sup>, 其余关于 *UPO* 催化研究的报道, 但研究设计温度普遍设置在 23~40 °C 之间<sup>[3,16,17]</sup>, 提示 *UPO* 无法在高温下实现高效催化反应, *AbvbUPO* 亦然。

酶的热稳定性实验显示, *AbvbUPO* 在不同温度孵育 10 min 后, 酶活性急剧降低, 40 °C 下孵育 10 min 之后, 仅呈现 52.97% 的活性 (图 5), 这表明该酶蛋白解折叠所需要的能量较低, 推测是 *UPO* 的普遍特征。Diana 等<sup>[18]</sup>对 *AaeUPO* 的热孵育实验也表明 *UPO* 的热不稳定性, 在 63 °C 孵育 5 min 后, *AaeUPO* 的活力下降超过 80%。提高 *UPO* 的最适反应温度和热稳定性, 对于 *UPO* 的研究有着重大意义。

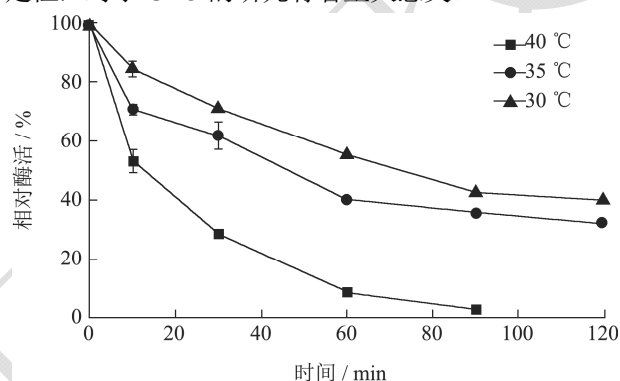


图5 非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 热稳定性

Fig.5 Thermostability of *AbvbUPO*

#### 2.3.2 溶液 pH 对 *AbvbUPO* 活力影响

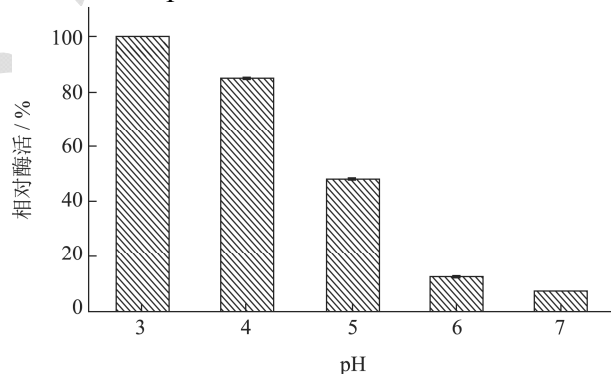


图6 *AbvbUPO* 催化 ABTS 底物的最适 pH

Fig.6 Optimum pH of *AbvbUPO* catalyzing ABTS

酶活检测体系不变, 仅对缓冲液的 pH 进行调整, 由于 pH 小于 3.0 时, 反应体系内会出现蛋白质析出现象, 故仅对 pH 大于 3.0 的缓冲液进行比较 (图 6)。结果显示, *AbvbUPO* 催化 ABTS 的最适 pH 为 3.0~4.0, 与 *AaeUPO*<sup>[9]</sup>和 *Marasmius rotula UPO* (*MroUPO*)<sup>[19]</sup> 的最适 pH 一致, 表明该酶为酸性条件下催化 ABTS 活性更佳。

#### 2.3.3 *AbvbUPO* 过氧化氢耐受性

*UPO* 是血红素氧化物酶 (HTP), 需要  $H_2O_2$  作为共底物, 然而氨基酸可能会被  $H_2O_2$  氧化, 从而影响

酶的活性<sup>[20]</sup>，此外，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可能将血红素氧化为 $\alpha$ -内消旋-羟基-血红素，导致HTP的不可逆失活<sup>[21]</sup>。所以利用UPO作为生物催化剂时往往需要探索适当的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度以降低酶活力的损失。结果表明，*AbvbUPO*不适宜在高浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的环境下长时间进行生物催化，*AbvbUPO*被5 mM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育5 min后，酶活力仅为初始活力的54.98%（图7）。据报道<sup>[8]</sup>，在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与*AaeUPO*共底物的催化实验中，当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度大于2.5 mM时，产物的生成率会随着过氧化氢浓度的升高而降低，Karich Alexander等<sup>[22]</sup>提出，UPO的活性的降低与血红素的丢失有关，推断是由于反应中的羟基自由基使血红素形成绿色素和胆绿素进而终止催化反应。为了更真实地反映其底物选择性和催化潜力，需要建立一种降低反应体系中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的办法来降低其在催化过程中的酶活损失。

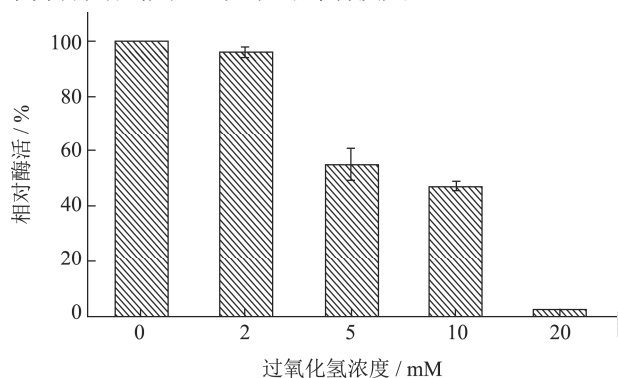


图7 *AbvbUPO* 过氧化氢耐受性

Fig.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerance of *AbvbUPO*

## 2.4 *AbvbUPO* 参与的级联催化反应体系建立

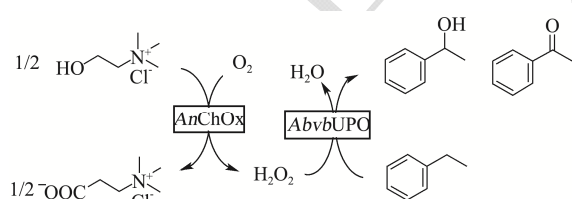


图8 *AbvbUPO* 酶级联反应示意图

Fig.8 Figure of *AbvbUPO* enzymatic cascade reaction

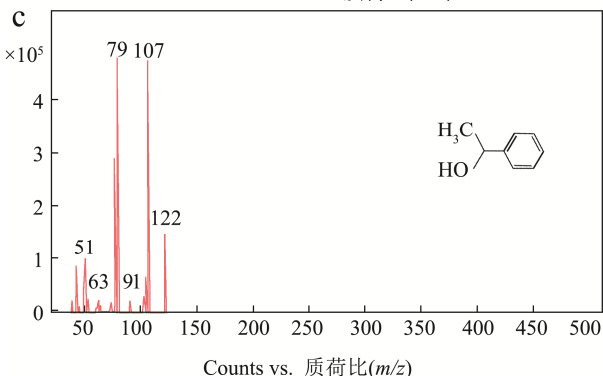
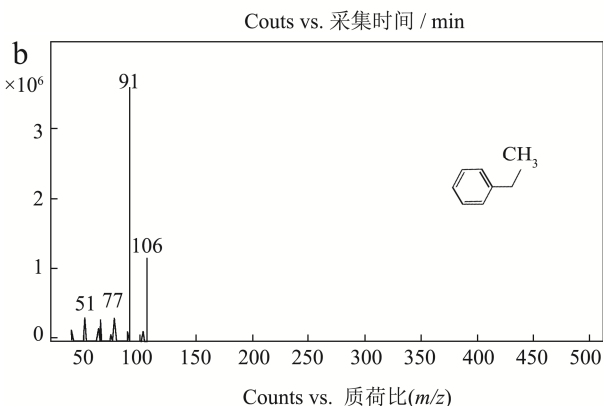
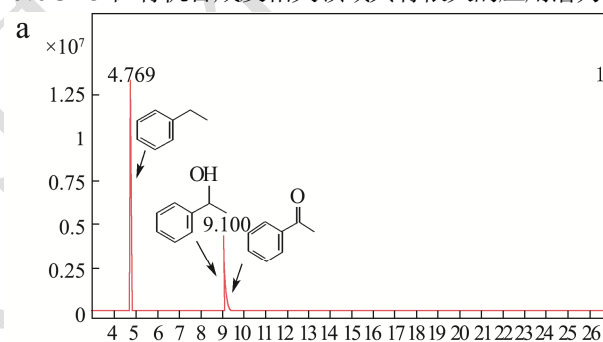
表1 *AbvbUPO* 酶级联反应产物得率表

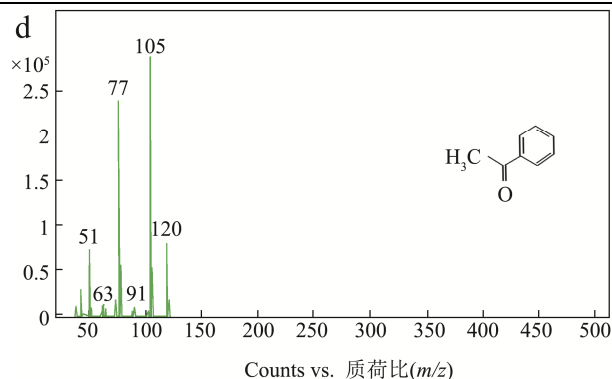
Table 1 Product yield of *AbvbUPO* enzymatic cascade reaction

产物	$\beta$ -苯乙醇	苯乙酮
初始浓度/mM	0	0
反应4 h 浓度/mM	0.72	0.34
得率/%	14.40	6.80

如上文所述，*AbvbUPO* 不耐受高浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，因此采用原位生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的酶级联反应代替一次性加入过量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为共底物<sup>[14,23]</sup>。本实验原位生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>方法（图8）是使用氯化胆碱作为电子供体，通过来

自烟草节杆菌来源的胆碱氧化酶还原分子氧来产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。 $\beta$ -苯乙醇是一种重要的食用香精香料，被广泛地应用在食品风味提升工艺之中<sup>[24]</sup>，而它的底物乙基苯也是UPO的常用底物<sup>[14]</sup>，因此利用该催化反应验证*AbvbUPO*级联催化反应活性可行性。气质联用分析结果表明（图9），保留时间为4.74 min、9.07 min和9.15 min的产物分别为乙基苯、 $\beta$ -苯乙醇及苯乙酮。*AbvbUPO*能够氧化乙基苯为 $\beta$ -苯乙醇，且4 h内转化率可达14.40%，但随后转化率逐渐降低，推测是该酶热稳定性弱，长时间30℃孵育会造成酶活力的损失，同时产物中伴有副产物苯乙酮，因为反应过程中苯乙醇产物被*AbvbUPO*继续氧化，导致了苯乙酮的生成。Frank Hollmann等人<sup>[5]</sup>研究*AaeUPO*羟基化乙基苯的反应实验表明，反应前期苯乙酮会大量增加，因为苯乙醇的积累抑制了过氧化，在反应30-60 min时苯乙酮增长速率开始下降并且趋于稳定。本实验表明，*AbvbUPO*能与胆碱氧化酶实现级联催化反应，使*AbvbUPO*在有机合成及相关领域具有很大的应用潜力。



图9 GC-MS 检测 *AbvbUPO* 酶级联催化反应Fig.9 GC-MS analysis data of *AbvbUPO* enzyme cascade reaction

注: a 为反应体系的气相色谱图; b、c、d 为各个保留时间物质的质谱图。

### 3 结论

本研究将来源于 *Agaricus bisporus var. bisporus* 的非特异性过氧合酶 *AbvbUPO* 为目标蛋白, 在毕赤酵母 GS115 中成功异源表达, 并研究其催化 ABTS 的最适 pH, 最适温度和热稳定性。除此之外, 针对血红素氧化酶不耐受  $H_2O_2$  的问题进行研究, 发现 *AbvbUPO* 的  $H_2O_2$  耐受性较差, 故通过原位  $H_2O_2$  生成技术, 降低反应体系中  $H_2O_2$  的浓度, 再串联 *AbvbUPO* 催化底物的氧化。本文研究结果为非特异性过氧合酶的异源表达和进一步研究其底物选择性搭建了可行的平台。

### 参考文献

- [1] Faiza M, S F Huang, D M Lan, et al. New insights on unspecific peroxygenases: superfamily reclassification and evolution [J]. *Bmc Evolutionary Biology*, 2019, 19(76)
- [2] Anh D H, R Ullrich, D Benndorf, et al. The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(17): 5477-5485
- [3] Aranda C, R Ullrich, J Kiebish, et al. Selective synthesis of the resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene and stilbenoids modification by fungal peroxygenases [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2018, 8(9): 2394-2401
- [4] Bassanini I, E E Ferrandi, M Vanoni, et al. Peroxygenase-catalyzed enantioselective sulfoxidations [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017, 2017(47): 7186-7189
- [5] Fernandez-Fueyo E, Y Ni, A G Baraibar, et al. Towards preparative peroxygenase-catalyzed oxyfunctionalization reactions in organic media [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2016, 134: 347-352
- [6] Gomez de Santos P, M Canellas, F Tieves, et al. Selective synthesis of the human drug metabolite 5'-hydroxypropranolol by an evolved self-sufficient peroxygenase [J]. *Acs Catalysis*, 2018, 8(6): 4789-4799
- [7] Karich A, R Ullrich, K Scheibner, et al. Fungal unspecific peroxygenases oxidize the majority of organic EPA priority pollutants [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1463
- [8] Wang Xiaoshi. A Novel Heme-Thiolate Peroxygenase *AaeAPO* and Its Implications for C-H Activation Chemistry [M]. *Dissertation & Theses - Gradworks*, 2013
- [9] Molina-Espeja P, E Garcia-Ruiz, D Gonzalez-Perez, et al. Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(11): 3496-3507
- [10] Emmanuelle M, K Annegret, A R Baker, et al. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17501-17506
- [11] Xavier R, G Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-324
- [12] Ulrich R, J Nuske, K Scheibner, et al. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4575-4581
- [13] Molina-Espeja P, S Ma, D M Mate, et al. Tandem-yeast expression system for engineering and producing unspecific peroxygenase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 73-74: 29-33
- [14] Ma Y J, Y R Li, S Ali, et al. Natural deep eutectic solvents as performance additives for peroxygenase catalysis [J]. *Chemcatchem*, 2019, 12(4): 989-994
- [15] Li Y, Y Ma, P Li, et al. Enantioselective sulfoxidation of thioanisole by cascading a choline oxidase and a peroxygenase in the presence of natural deep eutectic solvents [J]. *Chem Plus Chem*, 2020, 85: 254-257
- [16] Aranda C, A Olmedo, J Kiebish, et al. Selective epoxidation of fatty acids and fatty acid methyl esters by fungal peroxygenases [J]. *Chemcatchem*, 2018, 10(18): 3964-3968
- [17] Carro J, A González-Benjumea, E Fernández-Fueyo, et al. Modulating fatty acid epoxidation vs hydroxylation in a fungal peroxygenase [J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(7): 6234-6242

(下转第 23 页)