

· 工业生物技术 ·

## 宏基因组来源新过水解酶的分子克隆与酶学特性

董冰雪<sup>1,2,3</sup>, 押玉柯<sup>1</sup>, 张伟<sup>4</sup>, 张英君<sup>3</sup>, 李彩彩<sup>1</sup>, 徐安乐<sup>1</sup>, 李会庭<sup>1</sup>, 毛润乾<sup>2</sup>

1 南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061

2 广东省生物资源应用研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260

3 河南省菌类食品工程技术研究中心, 河南 南阳 473061

4 南阳师范院校医院, 河南 南阳 473061

董冰雪, 押玉柯, 张伟, 等. 宏基因组来源新过水解酶的分子克隆与酶学特性. 生物工程学报, 2020, 36(2): 276–286.

Dong BX, Ya YK, Zhang W, et al. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived bacterial perhydrolase. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 276–286.

**摘要:** 旨在获得具有氯化功能的过水解酶, 拓展过水解酶资源, 为其工业应用奠定基础。以唐河某造纸厂污泥为材料构建宏基因组文库, 通过活性筛选获得一个细菌过水解酶 Per822。使用大肠杆菌异源表达 Per822, 研究纯化后的重组蛋白酶学性质并检测了生成过乙酸的能力。测序结果显示 *per822* 编码一个含 273 个氨基酸的蛋白。Per822 是典型的多功能酶代表, 分别具有过氧化物酶、卤代酶和酯酶的活性。Per822 过水解氯化单氯二甲酮的最适反应 pH 为 4.5, 在 pH 3.5–8.0 范围内酶活性稳定。最适反应温度是 55 °C, 在 70 °C 以下酶活性稳定且氯化活性能够被 Fe<sup>2+</sup> 激活。以乙酸乙酯为共底物 Per822 显示出较强的产过乙酸能力。重组 Per822 的高可溶性表达、催化多功能性、较强的产过乙酸能力使得 Per822 在有机合成、废水处理、杀菌、生物质预处理等方面有着潜在的应用价值。

**关键词:** 过水解酶, 过乙酸, 催化多功能性, Fe<sup>2+</sup> 激活

**Received:** May 25, 2019; **Accepted:** August 16, 2019

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFF0210204), Key Grant of Science and Technology Department of Henan Province (No. 182102311044), the Open Project Program of Henan Engineering Technology Research Center for Mushroom-based Foods (No. 2019HM0010), GDAS Special Project of Science and Technology Development (Nos. 2019GDASYL-0302007, 2019GDASYL-0501006, 2017GDASCX-0107, 2018GDASCX-0107), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (Nos. 2017B020202005, 2015B090906011, 2016B090923009, 2016B090923005).

**Corresponding author:** Runqian Mao. Tel: +86-20-34454321; E-mail: maorun@giabr.gd.cn

国家重点研发计划 (No. 2017YFF0210204), 河南省科技厅科技攻关项目 (No. 182102311044), 河南省菌类食品工程技术研究中心开放课题 (No. 2019HM0010), 广东省科学院科技发展专项 (Nos. 2019GDASYL-0302007, 2019GDASYL-0501006, 2017GDASCX-0107, 2018GDASCX-0107), 广东省科技计划项目 (Nos. 2017B020202005, 2015B090906011, 2016B090923009, 2016B090923005) 资助。

网络出版时间: 2019-09-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190909.0959.003.html>

# Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived bacterial perhydrolase

Bingxue Dong<sup>1,2,3</sup>, Yuke Ya<sup>1</sup>, Wei Zhang<sup>4</sup>, Yingjun Zhang<sup>3</sup>, Caicai Li<sup>1</sup>, Anle Xu<sup>1</sup>, Huiting Li<sup>1</sup>, and Runqian Mao<sup>2</sup>

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

2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, Guangdong, China

3 Henan Engineering Technology Research Center for Mushroom-based Foods, Nanyang 473061, Henan, China

4 School Infirmary, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China

**Abstract:** The aim of this study is to obtain bacterial perhydrolases with chlorination activity, expands the resources of perhydrolases, and lays a foundation for its industrial applications. We constructed a metagenomic library using environmental DNA isolated from sludge samples of a paper mill of Tanghe county, and identified a *per822* gene encoding a bacteria perhydrolase via activity-based functional screening. Then, we overexpressed Per822 heterologously in *Escherichia coli*, and characterized the recombinant enzyme after purification. Finally, we further investigated the ability of Per822 to produce peracetic acid (PAA). Sequence analysis revealed that *per822* encoded a protein of 273 amino acids. The recombinant Per822 had the activity of peroxidase, esterase and halogenase respectively, and thus was regarded as a typical representative of multifunctional enzymes. The purified Per822 exhibited maximal chlorination activity (hyperhydrolysis) at 55 °C and pH 4.5 with monochlorodimedone as substrate, and the enzyme was stable in the pH range of 3.5–8.0 and below 70 °C. Also, the chlorination activity of this enzyme could be activated by Fe<sup>2+</sup>. In addition, the enzyme displayed high ability to generate PAA using ethyl acetate as cosubstrate. The highly soluble expression, catalytic versatility and good PAA production capacity of Per822 make it a potential candidate in organic synthesis, wastewater treatment, disinfection and biomass pretreatment, etc.

**Keywords:** perhydrolase, peracetic acid, catalytic versatility, Fe<sup>2+</sup> activation

过水解酶 (Perhydrolase), 先前称作细菌无辅基卤过氧化物酶或者非血红素卤过氧化物酶<sup>[1]</sup>, 是一类能够可逆地催化羧酸 (羧酸酯) 和过氧化氢生成过羧酸的酶<sup>[2-4]</sup>。该类酶属于 $\alpha/\beta$  水解酶超家族, 活性中心具有 Ser-His-Asp 催化三体, 在进化上和酯酶 (脂肪酶) 具有相同起源<sup>[5-6]</sup>。和血红素氯过氧化物酶类似, 过水解酶具有催化多功能性, 在体外能够进行卤代反应、酯水解反应<sup>[7]</sup>、C-C 键水解反应<sup>[5]</sup>和特殊的氧化反应如硫化物氧化<sup>[8]</sup>、转化芳香胺为硝基<sup>[9]</sup>、环氧化 (Prileshajev 反应) 和 Baeyer-Villiger 反应<sup>[10]</sup>等, 是一类具有广阔应用前景的生物催化剂。

过水解酶能够过水解羧酸 (羧酸酯) 生成过羧酸。过羧酸, 比如过乙酸 (Peracetic acid, PAA), 是应用广泛的强氧化剂<sup>[11]</sup>, 主要用于纺织业漂白<sup>[12]</sup>、染料脱色<sup>[13-14]</sup>、废水处理<sup>[15]</sup>、纸浆漂白、

生物质预处理<sup>[16]</sup>、生产环氧衍生物<sup>[17]</sup>和 $\epsilon$ -己内酯<sup>[3]</sup>等, 另外, 还可以用于农业、食品业、医疗器械等消毒杀菌<sup>[18]</sup>。传统的过乙酸生产工艺以硫酸为催化剂, 反应条件严苛<sup>[19]</sup>、成本高、效率低且造成环境污染。同时, PAA 是快速氧化剂, 浓度大于 70% 容易发生爆炸, 使得它储存困难、运输成本高<sup>[2]</sup>。而羧酸的过水解可逆并且热动力可控制, 最适合连续生产低浓度稳态的过羧酸。

随着人们环保意识的提高, 绿色安全生产意识的增强, 对过水解酶的需求量大增。遗憾的是到目前为止仅分离出了几种过水解酶并进行了酶学性质的研究<sup>[1,8,20-24]</sup>。这些酶具有高的特殊活性、耐热、耐有机溶剂和 pH 变化等特点, 美中不足的是这些酶大多只能发生溴代, 无过氧化氢酶活性, 只在溴离子或碘离子存在时才具有过氧化物酶活性<sup>[20,24]</sup>, 限制了其在生产中的应用。宏基因

组技术为我们寻找新酶基因提供了有力的技术手段,目前已经成功地使用该技术从不同生境中分离出新的酯酶、固氮酶、苯酚降解酶系、纤维素酶、淀粉酶、漆酶等基因<sup>[25-30]</sup>,而用宏基因组方法分离过水解酶尚未见报道。本文以富含氯的唐河造纸厂污泥为样品构建宏基因组文库以期分离出新型具有氯化活性的过水解酶基因,拓展过水解酶资源,为工业应用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) pLysS 为本实验室保存;表达载体 pET-32a 由本实验室保存,克隆载体 pp C118 BamH I /BAP 购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、连接酶和 PCR 用高保真酶 (PrimeSTAR Max Premix) 购自 TaKaRa 公司;蛋白提取试剂购自 Novagen 公司;土壤基因组快速提取试剂盒购自 MP Biomedicals 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;蛋白纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]、对硝基苯酯系列 (碳链长度 2-16, C2-C16)、单氯二甲酮 (Monochlorodi-medone, MCD)、丙二醇二乙酸酯 (Propylene glycol diacetate, PGD)、乙酸乙酯 (Ethyl acetate, EA) 购自 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 土壤样品 DNA 提取

取唐河某造纸厂多处污泥样品,参照商家提供的说明书进行基因组 DNA 提取。

### 1.3 宏基因组文库的构建及过水解酶基因筛选

宏基因组文库构建参考前期工作<sup>[30]</sup>:使用 BamH I 部分酶切基因组 DNA,回收长度为 2.0-8.5 kb 的 DNA 片段,连至 pp C118 BamH I /BAP 载体,

电击转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 构建造纸厂污泥宏基因组文库。接种文库到含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素 (Amp)、1.0 mmol/L IPTG 和 1% 三丁酸甘油酯的 LB 平板上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,同时复制文库到每孔含 500  $\mu\text{L}$  LB 培养基 (添加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp、0.25 mmol/L IPTG) 的深孔 96 孔板 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。参照说明书裂解细胞提取蛋白。加入 0.1 mol/L NaAC (pH 4.5) 缓冲液 100  $\mu\text{L}$ 、以 0.5 mmol/L 的 ABTS 和 1  $\mu\text{L}$  30% 双氧水为底物筛选。挑取三丁酸甘油酯平板上产生透明圈并且 ABTS 反应变蓝绿色的克隆检测并送 Invitrogen 公司测序。

### 1.4 过水解酶序列分析及系统发育树构建

过水解酶 ORF 的确定、序列分析及系统树构建参考前期工作<sup>[30]</sup>。根据 ORF 的大小将该基因命名为 *per822*, 所编码蛋白命名为 Per822, 所在质粒命名为 pp C118-*per822*。

### 1.5 过水解酶基因的克隆及原核表达条件优化

以 pp C118-*per822* 为模板,设计如下引物进行 PCR 扩增:*per822F* (5'-CCGGAA TTCATGAAG ACGTTGACAGTT-3') 和 *per822R* (5'-CCCAAGC TTTTAGGAGTTGATGAATTTGAGGATG-3')。反应体系 (15  $\mu\text{L}$ ): 模板 1 ng, 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 7.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 10 pmol, 无菌超纯水补至总体积 15  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。将 PCR 产物用 *EcoR* I /*Xba* I 双酶切并回收连接至 pET-32a, 电击转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS。挑阳性克隆命名为 *per822/BL21*。蛋白表达条件优化参考前期工作<sup>[30]</sup>: 接种 *per822/BL21* 到 LB 液体培养基培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 添加终浓度为 0.1-4.0 mmol/L 的 IPTG 分别在 20、25、30、37  $^{\circ}\text{C}$  下 200 r/min 诱导 8 h。

### 1.6 重组过水解酶纯化、分子量估算及浓度测定

在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 取细胞超声波破碎,使用蛋白纯化试剂盒对重组蛋白进行

纯化。

SDS-PAGE 检测酶的纯度并估算分子量。酶浓度使用 NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计测定 [ $\epsilon=4.1370\times 10^4$  L/(mol·cm)]。

## 1.7 酶活性的测定

### 1.7.1 过水解活性检测

过水解活性检测使用 MCD 法<sup>[31]</sup>, 略作修改: 以 0.1 mol/L pH 4.5 的 NaAC 为缓冲液, 200  $\mu$ L 反应体系含 MCD 44 mmol/L, KCL 80 mmol/L, 双氧水 7.2 mmol/L, 55  $^{\circ}$ C 预热数分钟, 加入适量的酶起始反应, 以失活的酶为对照, 290 nm 下测量吸光值的下降, 酶活定义为 1 min 内氯化 1  $\mu$ mol MCD 的酶量为一个单位 [ $\epsilon=1.99\times 10^4$  L/(mol·cm)]。

### 1.7.2 酯酶活性检测

酯酶活性测定使用对硝基苯酯方法<sup>[25]</sup>: 以 pH 8.5 的 Britton-Robinson 缓冲液为缓冲体系, 100  $\mu$ L 反应体系含对硝基苯酯 (碳链长度从 2 到 16, C2-C16) 0.5 mmol/L, 40  $^{\circ}$ C 保温数分钟, 加入适量的酶起始反应, 5 min 后加入 50  $\mu$ L 20% SDS 终止反应, 全波段酶标仪 405 nm 下测吸光值的增加, 用不含酶的体系作为对照, 以 1 min 内水解 1  $\mu$ mol 对硝基苯酯所需要的酶量定义为一个单位 [ $\epsilon=1.6\times 10^4$  L/(mol·cm)]。

### 1.7.3 过氧化物酶活性检测

过氧化物酶活性测定使用 ABTS 法<sup>[32]</sup>: 45  $^{\circ}$ C 预热含 0.5 mmol/L ABTS 的缓冲液 (pH 4.5 的 1.0 mol/L NaAC), 加入适量的酶和双氧水启动反应。420 nm 下测光吸收值变化, 以 1 min 内生成 1  $\mu$ mol ABTS 阳离子所需要的酶量定义为一个单位 (p) [ $\epsilon=3.6\times 10^4$  L/(mol·cm)]。

## 1.8 酶学特性研究

### 1.8.1 pH 对过水解酶反应的影响

最适反应 pH 测定采用 0.1 mol/L NaAC 缓冲液 (pH 3.5-6.0) 和 Britton-Robinson 缓冲液 (pH 6.5-8.0), 200  $\mu$ L 反应体系含 260 ng 纯化的 Per822, 其他条件同 1.7.1。pH 稳定性测定则是将

纯化后的 Per822 加入上述缓冲液内 4  $^{\circ}$ C 保温 2 h, 再调 pH 至最适, 55  $^{\circ}$ C 测定剩余酶活, 每个反应至少 3 个重复。

### 1.8.2 温度对酶反应的影响

最适反应温度测定时每 5  $^{\circ}$ C 为一个梯度, 范围从 30  $^{\circ}$ C 至 80  $^{\circ}$ C。以 0.1 mol/L 醋酸钠 (pH 4.5) 作为缓冲液, 其他条件同最适 pH 测定。温度稳定性测定时将纯化后的 Per822 在上述温度下保温 2 h, 冷却后按最适条件测定剩余酶活, 每个反应至少 3 个重复。

### 1.8.3 动力学参数的测定

以不同浓度的 MCD 为底物, 以 pH 4.5 的 0.1 mol/L NaAC 为缓冲液, 加入 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 80 mmol/L KCl, 反应温度设为 55  $^{\circ}$ C; 全波段酶标仪 290 nm 下测量吸光值的下降, 计算不同浓度下的酶活, 每个实验 3 个重复。采用 Graphpad prism 6 软件中的米氏方程对动力学参数 ( $K_m$  和  $k_{cat}$ ) 进行计算、拟合。

### 1.8.4 金属离子对酶反应的影响

将适量的酶和不同浓度的各金属离子加入 pH 4.5 的 NaAc 缓冲液中冰上预处理 15 min, 加入 44 mmol/L MCD, 80 mmol/L KCl, 7.2 mmol/L 双氧水起始反应, 在最适条件下测酶活, 以未加金属离子的反应作为对照, 每个反应至少 3 个重复。

## 1.9 过乙酸生成能力检测

### 1.9.1 共底物对过乙酸产生的影响

过乙酸的浓度检测使用 ABTS 法<sup>[14,16]</sup>, 以 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸 (50 mmol/L pH 7.1 的磷酸钾) 为缓冲液, 标准反应体系 (1 mL): 含 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mmol/L PGD (100 mmol/L NaAC 或者 500 mmol/L 的 EA) 和终浓度 2.0  $\mu$ g/mL 的 Per822。混合物在 45  $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡 20 min。PAA 浓度检测: 用去离子水将反应液 25  $\mu$ L 稀释 100 倍, 接下来, 将 25  $\mu$ L 的稀释液加 75  $\mu$ L 去离子水、0.9 mL 检测试剂 (检测试剂配制: 向 5 mL 柠檬酸钾缓冲液 (125 mmol/L, pH 5.0) 中加入

100 mmol/L 的 ABTS 水溶液 50  $\mu$ L、25 mmol/L KI 水溶液 10  $\mu$ L) 混匀, 混合物在室温孵育 3 min, 420 nm 下测吸光值。

PAA 浓度计算:  $[PAA] (\text{mmol/L}) = A_{420} \times 0.242 \times 400$  (400 为稀释倍数)。

### 1.9.2 高浓度底物和酶量对过乙酸产生的影响

以柠檬酸-磷酸 (pH 4.5) 为缓冲液, 反应体系 (5 mL) 含 1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、1 mol/L (0.5 mol/L) 的 EA 和终浓度 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 Per822, 45  $^\circ\text{C}$  下 200 r/min 振荡孵育, 分别在反应的 10 min、20 min、40 min、60 min 和 80 min 取样, PAA 生成量的计算参考 1.9.1, 评价高浓度底物和酶量对 PAA 生成的影响。

### 1.9.3 Per822 对过乙酸的耐受性

以 pH 4.5 的柠檬酸-磷酸为缓冲液, 1 mL 标准体系中含 500 mmol/L EA 和 2.0  $\mu\text{g/mL}$  的 Per822。在反应体系中分别加入 1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、25 mmol/L 和 50 mmol/L PAA, 冰上放置不同时间 (0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h), 加入 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 45  $^\circ\text{C}$  下反应 40 min, 以未加酶的体系作对照, 测经过不同浓度 PAA 处理后 Per822 生产 PAA 的能力。以未经处理的 Per822 在 40 min 生产 PAA 量为 100%, 计算 Per822 对过乙酸的耐受能力。

### 1.10 核酸序列登录号

所报道序列已经提交至 GenBank (登录号 MK614259)。

## 2 结果与分析

### 2.1 宏基因组文库的构建和过水解酶基因的筛选

构建的唐河造纸厂宏基因组文库约含 10 200 个克隆。随机选取 20 个克隆进行检测, 酶切结果显示片段插入率为 100%、大小范围 2.5–7.0 kb、平均大小为 5.2 kb, 插入片段高度多样化; 包含约 53 Mb 的污泥微生物 DNA 信息。经过初筛和复筛从文库中得到 1 个具有过水解酶活性的克隆。

### 2.2 Per822 序列分析

序列分析显示 6.2 kb 的外源片段中存在 1 个 822 bp 的完整过水解酶 ORF, 所编码的蛋白属于含  $\alpha/\beta$  水解酶家族, 命名为 per822。NCBI 数据库序列比对显示该蛋白与来自玉米古字状菌 *Runella zea* 和土地杆菌 *Pedobacter tournemirensis* 的  $\alpha/\beta$  水解酶 (氯过氧化物酶) 同源性最高 (88%); 与土生嗜冷菌 *Algoriphagus terrigena* 和 *Confluentibacter lentus* 的  $\alpha/\beta$  水解酶次之 (87%); 与来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和来自蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的无辅基氯过氧化物酶有 60% 同源性。系统发育树构建结果显示, Per822 不与其他来源的过水解酶聚于一个分支 (图 1)。

### 2.3 重组 Per822 的表达、纯化和活性检测

经优化 Per822 最佳表达条件为: IPTG 浓度 0.2 mmol/L, 诱导温度为 25  $^\circ\text{C}$ , 此条件下重组蛋白以可溶性表达为主。SDS-PAGE 结果显示纯化后得到了电泳纯单一条带, 分子量约为 45 kDa (图 2), 大小和软件推测值加上 6 $\times$ His 标签之和相符。重组蛋白具有催化多功能性: Per822 具有过氧化物酶活性, 以 ABTS 为底物测得酶活为 124.74 p/mg, 且该反应不依赖  $\text{Br}^-$  和  $\text{I}^-$  的存在; 具有酯酶活性, 可以水解碳链长度从 2 到 16 的对硝基苯酯系列底物, 最适底物为对硝基苯乙酯 (C2), 碳链长度大于 16 基本测不到酶活性 (图 3); 具有卤代功能, 氯化 MCD 活性为 3.72 p/mg。本实验首次发现过水解酶可以氯化 MCD 且具有不依赖  $\text{Br}^-$  和  $\text{I}^-$  的过氧化物酶活性。这些结果说明 Per822 是一个具有新酶学性质的过水解酶。

### 2.4 重组过水解酶的酶学特性研究

#### 2.4.1 pH 对重组过水解酶的催化活性和稳定性的影响

重组 Per822 氯化 MCD 的最适 pH 为 4.5, 偏离该 pH, 活性迅速下降, 在 pH 6.5 及以上活性几乎归零。此外, 酶在 pH 3.5–8.0 范围内活性稳定, 处理 2 h 后残余酶活仍在 68% 以上 (图 4)。可

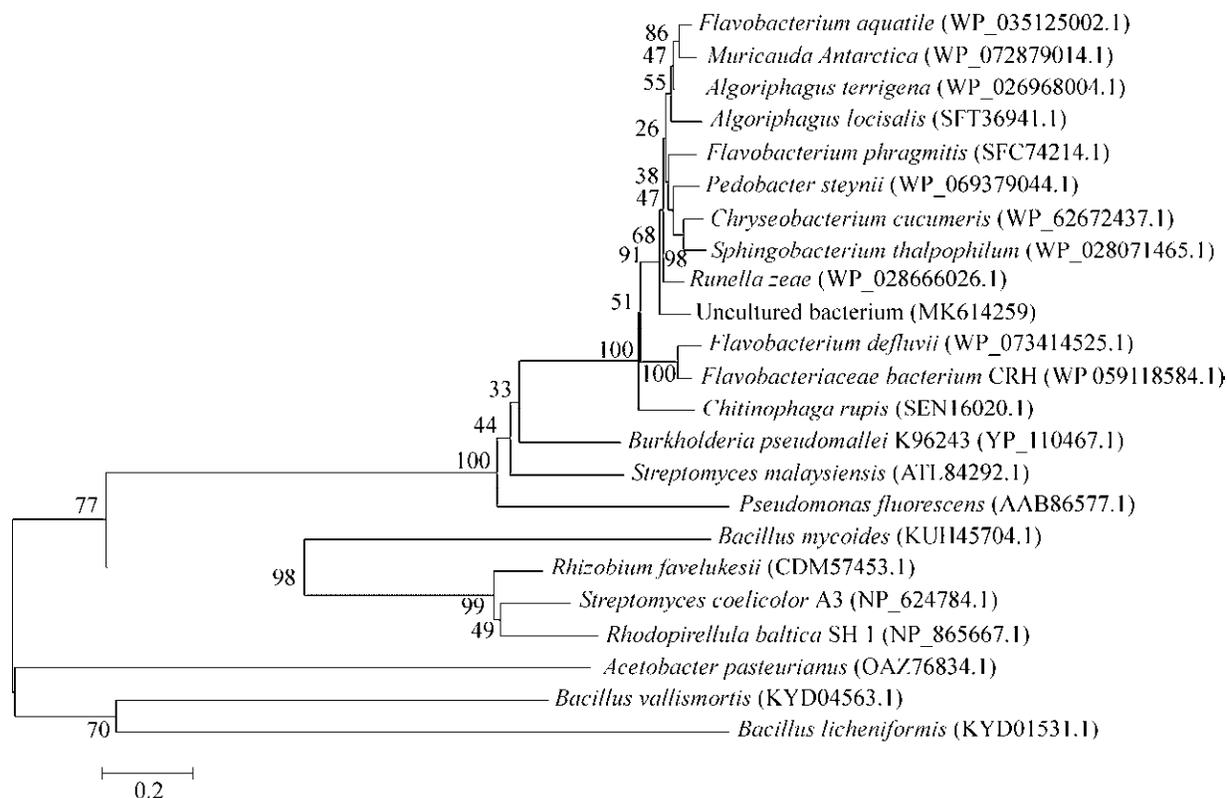


图1 Per822 (uncultured bacterium MK614259) 和近似相关蛋白系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of Per822 (uncultured bacterium MK614259) and closely related proteins. The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; numbers in parentheses are GenBank accession numbers; the scale bar represents sequence divergence.

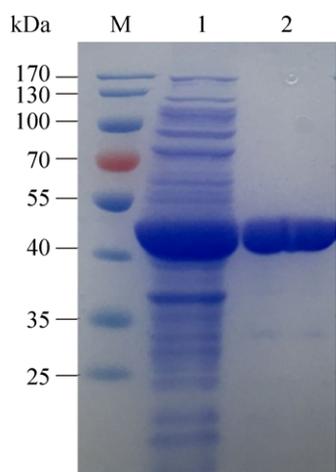


图2 纯化后重组 Per822 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified recombinant Per822. M: standard protein molecular mass markers (sizes in kilodaltons are indicated on the left); 1: recombinant Per822 from supernatant of *E. coli* BL21(DE3) pLysS cell lysates; 2: recombinant Per822 purified by Ni-NTA Spin column.

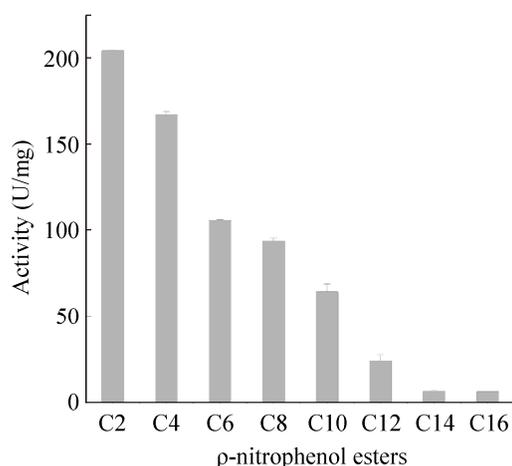


图3 Per822 对不同链长对硝基苯酯底物特异性

Fig. 3 Substrate specificity of Per822 towards p-nitrophenol esters with different chain lengths. p-NP-acetate (C2), p-NP-butyrate (C4), p-NP-hexanoate (C6), p-NP-caprylate (C8), p-NP-decanoate (C10), p-NP-laurate (C12), p-NP-myristate (C14), p-NP-palmitate (C16).

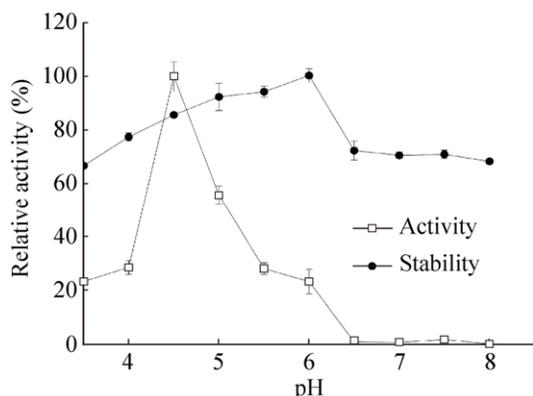


图4 pH对Per822活性和稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on activity and stability of Per822 using MCD as substrate.

可以看出Per822催化MCD氯化时是一种酸性酶,对各pH都稳定,耐pH变化。

#### 2.4.2 温度对重组过水解酶的催化活性和稳定性的影响

以MCD为底物,重组Per822的最适氯化反应温度为55℃,45–55℃之间保持较高活性(80%以上)。在70℃以下处理2h余70%以上活性,80℃处理2h仍剩余酶活58%(图5)。可见该酶是一个耐热的过水解酶。

#### 2.4.3 过水解酶的动力学参数

以MCD为底物,Per822进行氯化反应的 $K_m$ 和 $k_{cat}$ 值分别为6.088 mmol/L和 $2.646\text{ s}^{-1}$ ,催化效率( $k_{cat}/K_m$ )为 $0.432\text{ L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$ 。

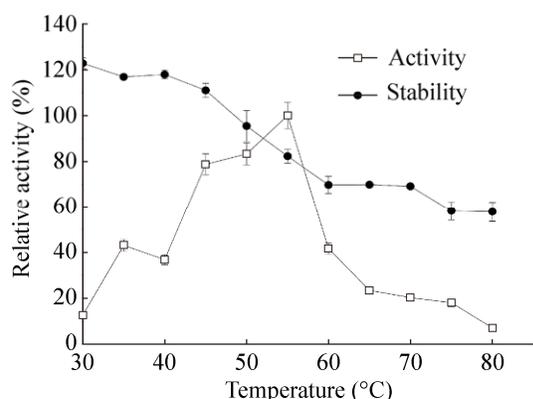


图5 温度对Per822活性和稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activity and stability of Per822 using MCD as substrate.

#### 2.4.4 金属离子对酶活的影响

使用不同金属离子处理过水解酶,以MCD为底物低浓度(1 mmol/L)的 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 和 $\text{NH}_4^+$ 对氯化有激活作用;10 mmol/L时仅有 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{2+}$ 对MCD的氯化起激活作用,其他离子起抑制作用; $\text{Fe}^{2+}$ 在100 mmol/L时仍能促进酶的活性(图6)。虽然Per822氯化MCD的活性不依赖于 $\text{Fe}^{2+}$ 的存在,但 $\text{Fe}^{2+}$ 可以提高酶活到原来的8.3倍,可见Per822是一个 $\text{Fe}^{2+}$ 激活的新过水解酶。

#### 2.5 过乙酸生产能力检测

##### 2.5.1 共底物的影响

分别使用PGD、EA和NaAC为共底物检测Per822产PAA的能力,结果显示EA为最适的底物,产PAA最适pH为4.5;NaAC产PAA能力相对较弱,在pH 7.1的磷酸钾缓冲液中酶活性低到难以检测(表1)。

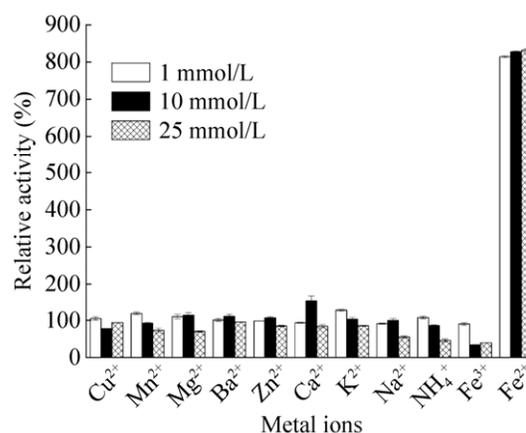


图6 金属离子对Per822过水解活性影响

Fig. 6 Effect of metal ions on perhydrolysis of Per822 using MCD as substrate.

表1 共底物和缓冲液对生产过乙酸的影响

Table 1 Effect of co-substrates and buffer on PAA generation

Substrate	Total PAA generated (mmol/L)	
	pH 7.1	pH 4.5
PGD	16.456±0.349	12.326±0.202
EA	59.209±1.299	70.696±0.915
NaAC	1.247±0.352	15.215±1.058

PGD: propylene glycol diacetate; EA: ethyl acetate; NaAC, sodium acetate.

### 2.5.2 高浓度底物和酶量对 PAA 生产的影响

最适 PAA 生产条件是以 1 mol/L 的 EA 和 1 mol/L 的  $H_2O_2$  为底物, 加入 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Per822, 反应 60 min, 此时能产生 98.83 mmol/L 的 PAA。在酶量相同的情况下, 1 mol/L 的 EA 产 PAA 量略高于 0.5 mol/L 的 EA, 底物浓度相同时高酶量 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 并不能产生更高浓度的 PAA。1 mol/L 的 EA 和 1 mol/L 的  $H_2O_2$  为底物, 加入 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Per822 反应速度最快, 40 min 即可达到反应平衡, 产生 96.80 mmol/L 的 PAA, 而其他几个反应需要 1 h 才达到最大 PAA 生产量, 此后 PAA 浓度会降低 (图 7), 可能是被 Per822 水解所致。

### 2.5.3 Per822 对 PAA 的耐受性

Per822 对 PAA 具有较高的耐受性, 体系内含初始浓度不超过 25 mmol/L PAA 冰上处理不同时间后, 反应主要往正方向进行, 以生成 PAA 为主。加入 25 mmol/L PAA 时冰上放置 1.5 h, 反应 40 min 新生成 PAA 能力达未处理酶的 88.15%, 处理 2 h 反应后新生成 PAA 仍达未处理酶的 79.33%。Per822 经 PAA 初始浓度 50 mmol/L 处理后在反应的前 20 min 基本测不到新 PAA 生成, 40 min 以后有微量的 PAA 开始生成 (图 8)。高浓度的 PAA

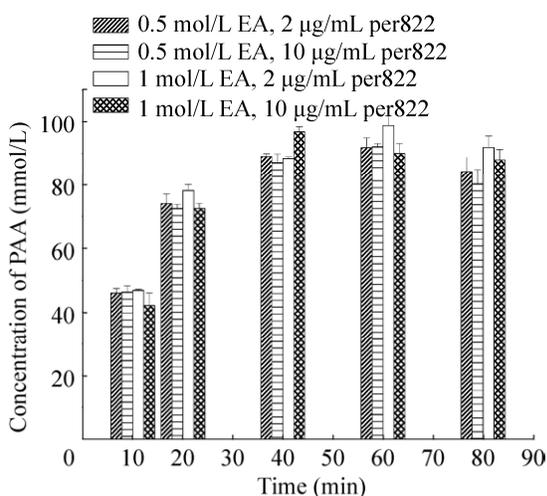


图 7 底物浓度和酶量对生成过乙酸的影响

Fig. 7 Effect of substrate and enzyme on PAA production.

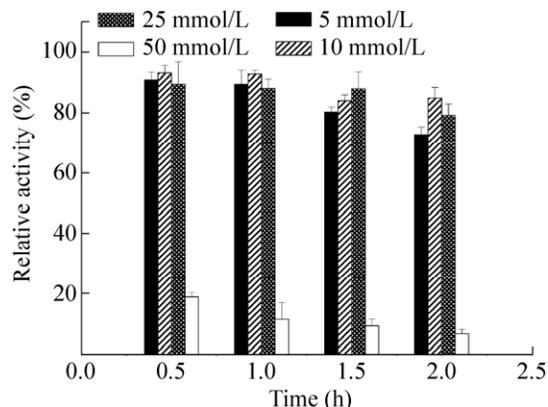


图 8 Per822 对 PAA 的耐受性

Fig. 8 The tolerance of Per822 to PAA.

会使反应往逆方向进行, 主要发生 PAA 的水解反应, 水解过乙酸生成乙酸和  $H_2O_2$ 。

## 3 讨论

一种酶能够催化多种不同类型反应的现象称为酶催化的多功能性 (Catalytic promiscuity), 这种性能拓宽了酶的应用范围<sup>[33]</sup>。过水解酶是具有催化多功能性的一个典型例子, 在生物催化和工业上有着极其重要的用途<sup>[6,10]</sup>。在过水解酶催化的众多反应中卤代反应是一类非常重要的反应, 它在生成 C-C 键、改变功能基团时用于制备中间体。氯化反应是合成化学中的重要工具, 在有机合成、无机合成和采矿业都有着重要用途, 但氯化反应难控制、毒副产物多、有爆炸危险<sup>[34]</sup>, 酶法进行氯化反应是一种环境友好的替代方案。目前分离出的过水解酶以 MCD 为底物时大都只有溴代功能, 氯化能力差。本实验以富含氯的造纸厂污泥为材料构建宏基因组文库, 筛选出了一个能够氯化 MCD 的过水解酶 Per822。Bongs 和 van Pée 报道来源于吡咯菌素假单胞菌 *Pseudomonas pyrrocinia* 和金色链霉菌 *Streptomyces aureofaciens* 的无辅基氯过氧化物酶 (过水解酶) 以 MCD 为底物溴化活性分别是氯化活性的 1 500 倍和 2 000 倍<sup>[35]</sup>, 而 Per822 溴化活性是氯化活性的 2 倍, 和来源于海洋真菌 *Caldariomyces fumago* 的氯过氧化物酶

溴氯化能力比相当<sup>[36]</sup>。Per822 溴化 MCD 活性为 7.45 p/mg, 和已报道的文献相比仅低于来自恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* IF-3 的溴过氧化物酶-酯酶 (11.7 p/mg)<sup>[22]</sup>, 说明 Per822 是一种高酶活且氯化能力大大增强的过水解酶。包括来自链霉菌 *Streptomyces griseus* Tit6 和吡咯菌素假单胞菌 *P. pyrrocinia* 在内的多种过水解酶都不具有过氧化物酶和过氧化氢酶活性<sup>[20,24,37-38]</sup>。Per822 却具有过氧化物酶活性, 且该活性不依赖溴离子和碘离子的存在, Per822 相比其他的过水解酶具有较强的氧化性, 有在合成化学中应用的前景。

Per822 同酯酶 (脂肪酶) 也有较高同源性, 推测其可能具有酯酶 (脂肪酶) 活性。从实验结果看重重组 Per822 能够水解碳链长度为 2-16 的对硝基苯酯 (C2-C16) 系列底物, 而来源于 *S. aureofaciens* 的 BPO-A2 对短链脂肪酸比如硝基苯乙酯 (C2) 有着非选择性的酯酶活性<sup>[39]</sup>, 来自红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* 的过水解酶 ThcF 除特异性水解乙酰基硫醇异丁酸甲酯外只对 C4 以下的对硝基苯酯有活性<sup>[23]</sup>。虽然过水解和酯水解活性中心都是 Ser-Asp-His 催化三体, 但反应的最适 pH 并不同, Per822 过水解反应 (氯代) 的最适 pH 为 4.5, pH>6.5 活性几乎归零; 酯水解反应在 pH>7.0 时才能检测到, 最适的反应 pH 为 8.5。de Mot 等报道 ThcF 也存在过水解和酯类水解反应 pH 差别较大的现象<sup>[23]</sup>。Bugg 推测出现这种差异的原因是过水解酶活性中心的 His 在 pH 5.5 左右发生了质子化, 不能作为碱参与酯水解反应<sup>[40]</sup>。

生产过乙酸的能力是评价过水解酶工业应用潜力的重要依据。2.0 μg/mL 重组 Per822 在 20 min 内能产生 70.696 mmol/L 的过乙酸, 酶量不变, 提高 EA 和双氧水浓度并延长反应时间能够生成更高浓度的 PAA。Dinu 报道过水解酶 S54V (AcT) 结合到纳米膜载量 0.01 wt% 时 20 min 内可产生 11 mmol/L 的 PAA<sup>[41]</sup>; Grover 等报道过水解酶 AcT 以 PGD 为共底物时能产生 30 mmol/L 的 PAA<sup>[18]</sup>; Yin 等报

道荧光假单胞菌酯酶 (*Pseudomonas fluorescens* esterase, PFE) 突变体 Phe162Leu PFE 浓度 0.5 mg/mL 时在 10 min 内可以产生 115 mmol/L PAA<sup>[16]</sup>; 相比其他过水解酶, Per822 有着更强的产生过乙酸能力, 且对 PAA 有较高的耐受性。共底物检测发现 Per822 生产 PAA 的最适底物为 EA, 而 Grover 等报道的 AcT 的最适底物为 PGD, 以 EA 为底物产量低到难以检测<sup>[18]</sup>。在生产过乙酸时, 目前报道的 PAA 生产都是以 pH 7.1 的磷酸钾为缓冲液, 本实验却发现以 EA 和 NaAC 为底物时 Per822 生产过乙酸的最适 pH 为 4.5, 以 PGD 为底物时在 pH 7.1 的磷酸钾活性缓冲液中反应活性略高于柠檬酸-磷酸缓冲液 (pH 4.5), 说明 Per822 和 AcT、Phe162Leu PFE 明显属于不同的过水解酶。过水解酶不含有金属离子, 其活性不依赖于金属离子的存在。目前仅有 Kawanami 等报道了一个由 Co<sup>2+</sup> 激活的多功能溴过氧化物酶-酯酶 (过水解酶)<sup>[22]</sup>, 其他金属离子激活过水解酶尚未见报道。Per822 的过水解活性能被 Fe<sup>2+</sup> 激活, 可见 Per822 是一个新的过水解酶。

重组 Per822 在大肠杆菌中的过量可溶性表达、氯化能力增强、强的氧化能力、不依赖 Br<sup>-</sup> 和 I<sup>-</sup> 的过氧化物酶活性、广谱的酯酶活性使得 Per822 在氯化、洗涤、废水处理、杀菌、生物质预处理、生产环氧衍生物等方面有着广阔的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Song JK, Ahn HJ, Kim HS, et al. Molecular cloning and expression of perhydrolase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(12): 849-856.
- [2] Yin DL, Kazlauskas RJ. Revised molecular basis of the promiscuous carboxylic acid perhydrolase activity in serine hydrolases. *Chem Eur J*, 2012, 18(26): 8130-8139.
- [3] Chávez G, Rasmussen JA, Janssen M, et al. Baeyer-Villiger oxidation of cyclohexanone in aqueous

- medium with in situ generation of peracid catalyzed by perhydrolase CLEA. *Top Catal*, 2014, 57(5): 349–355.
- [4] China H, Okada Y, Ogino H. Production mechanism of active species on the oxidative bromination following perhydrolase activity. *J Phys Org Chem*, 2016, 29(2): 84–91.
- [5] Li C, Hassler M, Bugg TDH. Catalytic promiscuity in the  $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily: hydroxamic acid formation, C-C bond formation, ester and thioester hydrolysis in the C-C hydrolase family. *ChemBioChem*, 2008, 9(1): 71–76.
- [6] Lee W, Vojcic L, Despotovic D, et al. Rationalizing perhydrolase activity of aryl-esterase and subtilisin Carlsberg mutants by molecular dynamics simulations of the second tetrahedral intermediate state. *Theor Chem Acc*, 2010, 125(3/6): 375–386.
- [7] Honda K, Kataoka M, Sakuradani E, et al. Role of *Acinetobacter calcoaceticus* 3,4-dihydrocoumarin hydrolase in oxidative stress defence against peroxyacids. *Eur J Biochem*, 2003, 270(3): 486–494.
- [8] Picard M, Gross J, Lübbert E, et al. Metal-free bacterial haloperoxidases as unusual hydrolases: activation of  $H_2O_2$  by the formation of peracetic acid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1997, 36(11): 1196–1199.
- [9] Preobrazhenskaya YV, Voskoboev AI, Burd VN. Phosphatase activity of non-heme chloroperoxidase from the bacterium *Serratia marcescens*. *FEBS Lett*, 2003, 536(1/3): 41–44.
- [10] Carboni-Oerlemans C, De María PD, Tuin B, et al. Hydrolase-catalysed synthesis of peroxy-carboxylic acids: Biocatalytic promiscuity for practical applications. *J Biotechnol*, 2006, 126(2): 140–151.
- [11] Despotovic D, Vojcic L, Prodanovic R, et al. Fluorescent assay for directed evolution of perhydrolases. *J Biomol Screen*, 2012, 17(6): 796–805.
- [12] Hickman WS. Peracetic acid and its use in fibre bleaching. *Rev Prog Color*, 2002, 32(1): 13–27.
- [13] Wu HL, Shu ZY, Lin H, et al. Decolorization of remazol brilliant blue KN-R by the *in-situ* enzymatically generated peracetic acid. *Acta Sci Circumst*, 2015, 35(8): 2400–2406 (in Chinese).  
武海龙, 舒正玉, 林红, 等. 酶法原位制备过氧乙酸对活性艳蓝 KN-R 氧化脱色的工艺. *环境科学学报*, 2015, 35(8): 2400–2406.
- [14] Shu ZY, Wu HL, Lin H, et al. Decolorization of remazol brilliant blue R using a novel acyltransferase-ISCO (*in situ* chemical oxidation) coupled system. *Biochem Eng J*, 2016, 115: 56–63.
- [15] Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environ Int*, 2004, 30(1): 47–55.
- [16] Yin DL, Jing Q, AlDajani WW, et al. Improved pretreatment of lignocellulosic biomass using enzymatically-generated peracetic acid. *Bioresour Technol*, 2011, 102(8): 5183–5192.
- [17] Zhao XB, Wu RC, Liu DH. Production of Pulp, Ethanol and lignin from sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid delignification. *Biomass Bioenergy*, 2011, 35(7): 2874–2882.
- [18] Grover N, Douaisi MP, Borkar IV, et al. Perhydrolase-nanotube paint composites with sporicidal and antiviral activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(19): 8813–8821.
- [19] Wu XM, Li M. Production and application research progress on peracetic acid. *Fine Specialty Chem*, 2017, 25(4): 25–28 (in Chinese).  
伍小明, 李明. 过氧乙酸的生产和应用研究进展. *精细与专用化学品*, 2017, 25(4): 25–28.
- [20] Weng M, Pfeifer O, Krauss S, et al. Purification, characterization and comparison of two non-haem bromoperoxidases from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(11): 2539–2546.
- [21] Cheeseman JD, Tocilj A, Park S, et al. Structure of an aryl esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallogr Sect. D Biol Crystallogr*, 2004, 60(7): 1237–1243.
- [22] Kawanami T, Miyakoshi M, Dairi T, et al. Reaction mechanism of the  $Co^{2+}$ -activated multifunctional bromoperoxidase-esterase from *Pseudomonas putida* IF-3. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 398(1): 94–100.
- [23] de Mot R, de Schrijver A, Schoofs G, et al. The thiocarbamate-inducible *Rhodococcus* enzyme TheF as a member of the family of  $\alpha/\beta$  hydrolases with haloperoxidative side activity. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 224(2): 197–203.
- [24] Burd VN, Bantleon R, van Pée KH. Oxidation of indole and indole derivatives catalyzed by nonheme chloroperoxidases. *Appl Biochem Micro*, 2001, 37(3): 248–250.
- [25] Jia ML, Zhong XL, Lin ZW, et al. Expression and

- characterization of an esterase belonging to a new family via isolation from a metagenomic library of paper mill sludge. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 1192–1200.
- [26] Dai ZM, Guo X, Yin HQ, et al. Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e87976.
- [27] Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, et al. Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61811.
- [28] Song YH, Lee KT, Baek JY, et al. Isolation and characterization of a novel endo- $\beta$ -1,4-glucanase from a metagenomic library of the black-goat rumen. *Braz J Microbiol*, 2017, 48(4): 801–808.
- [29] Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 717–727.
- [30] Dong BX, Xia M, Cai XQ, et al. Molecular cloning and enzyme characterization of a metagenome derived bacterial laccase with  $Mn^{2+}$  tolerance and thermostability. *Microbiol China*, 2018, 45(6): 1190–1199 (in Chinese).  
董冰雪, 夏敏, 蔡心清, 等. 宏基因组来源耐  $Mn^{2+}$ 、热稳定细菌漆酶的分子克隆及酶学特性. *微生物学通报*, 2018, 45(6): 1190–1199.
- [31] Lee CW, Kwon S, Park SH, et al. Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *Exiguobacterium antarcticum*. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0169540.
- [32] Rai GP, Zong Q, Hager LP. Isolation of directed evolution mutants of chloroperoxidase resistant to suicide inactivation by primary olefins. *Isr J Chem*, 2000, 40(1): 63–70.
- [33] Bornscheuer p T, Kazlauskas RJ. Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43(45): 6032–6040.
- [34] He HB, Yao RS, Deng SS. Organic chlorination reaction and its control. *Fine Chem Termed*, 2006, 36(2): 11–13 (in Chinese).  
何洪波, 姚日生, 邓胜松. 有机氯化反应及其控制. *精细化工中间体*, 2006, 36(2): 11–13.
- [35] Bongs G, van Pée KH. Enzymatic chlorination using bacterial nonheme haloperoxidases. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(1): 53–60.
- [36] Hager LP, Morris DR, Brown FS, et al. Chloroperoxidase. II. utilization of halogen anions. *J Biol Chem*, 1966, 241(8): 1769–1777.
- [37] Zeiner R, van Pée KH, Lingens F. Purification and partial characterization of multiple bromoperoxidases from *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol*, 1988, 134(12): 3141–3149.
- [38] Wiesner W, van Pée KH, Lingens F. Purification and characterization of a novel bacterial Non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinii*. *J Biol Chem*, 1988, 263(27): 13725–13732.
- [39] Chen B, Cai Z, Wu W, et al. Morphing activity between structurally similar enzymes: from heme-free bromoperoxidase to lipase. *Biochemistry*, 2009, 48(48): 11496–11504.
- [40] Bugg TDH. Diverse catalytic activities in the  $\alpha\beta$ -hydrolase family of enzymes: activation of  $H_2O$ , HCN,  $H_2O_2$ , and  $O_2$ . *Bioorg Chem*, 2004, 32(5): 367–375.
- [41] Dinu CZ, Zhu GY, Bale SS, et al. Enzyme-based nanoscale composites for use as active decontamination surfaces. *Adv Funct Mater*, 2010, 20(3): 392–398.

(本文责编 郝丽芳)