

• 食品生物技术 •

融合表达过氧化氢酶提高多铜氧化酶稳定性及降解生物胺能力

倪秀梅^{1,2}, 方芳^{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 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

倪秀梅, 方芳. 融合表达过氧化氢酶提高多铜氧化酶稳定性及降解生物胺能力. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4382-4394.
Ni XM, Fang F. Fusion expression with catalase improves the stability of multicopper oxidase and its efficiency in degrading biogenic amines. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4382-4394.

摘要: 多铜氧化酶 (Multicopper oxidase, MCO) 家族中的某些酶可以通过氧化反应降解食品中的胺类危害物生物胺。然而酶在催化时因为持续被氧化可能会影响整个反应过程中 MCO 的活性及稳定性, 使酶的催化效率和降解生物胺的能力下降。文中成功在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中构建并表达了来源于发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* 的多铜氧化酶 (MCOF) 与枯草芽孢杆菌过氧化氢酶 (CAT) 的融合酶。8种融合酶对 H₂O₂ 的耐受性提高了 51%–68%, 融合酶 CAT&MCOF 在降解组胺的过程中稳定性比 MCOF 提高了 17.3%。以 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 为底物时, CAT&MCOF 对底物的亲和力 (K_m) 提高了 1.0 倍, 催化效率 (k_{cat}/K_m) 提高了 1.7 倍, 摩尔比酶活提高了 1.2 倍, 且在酸性 (pH 2.5–4.5) 和中高温 (35–55 °C) 条件下的稳定性都有不同程度的提高。此外, CAT&MCOF 对腐胺、尸胺和组胺的降解率分别为 31.7%、36.0%和 57.8%, 分别比 MCOF 提高了 132.5%、45.7%和 38.9%。多铜氧化酶与过氧化氢酶融合表达提高酶催化稳定性和催化效率的策略将为通过酶的分子改造提高其应用特性提供参考。

关键词: 多铜氧化酶, 生物胺, 稳定性, 融合表达, 过氧化氢酶

Received: December 17, 2020; **Accepted:** March 11, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFC1600405), National Natural Science Foundation of China (No. 31771955), National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering, China (No. LITE2018-08).

Corresponding author: Fang Fang. Tel: +86-510-85918310; Fax: +86-510-85918309; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2017YFC1600405), 国家自然科学基金 (No. 31771955), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08) 资助。

Fusion expression with catalase improves the stability of multicopper oxidase and its efficiency in degrading biogenic amines

Xiumei Ni^{1,2}, and Fang Fang^{1,2}

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

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

Abstract: Some enzymes belonging to the multicopper oxidase (MCO) family can degrade the hazardous biogenic amine (BA) present in food. However, the oxidation of MCO in the process of degrading BAs may reduce its activity and stability, resulting in decreased catalytic efficiency. In this work, an MCO from *Lactobacillus fermentum* (MCOF) was fused with a *Bacillus subtilis* catalase (CAT) using different strategies and the fusion enzymes were respectively expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The tolerance of eight fused MCOFs to H₂O₂ increased by 51%–68%, and the stability of CAT&MCOF increased by 17%, compared to the wild type MCOF. Using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as a substrate, the substrate affinity (K_m), the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) and the molar specific activity of CAT&MCOF increased by 1.0-fold, 1.7-fold and 1.2-fold than those of MCOF, respectively. The stability of CAT&MCOF under acidic conditions (pH 2.5–4.5) and moderate temperatures (35–55 °C) also improved. Moreover, the degradation rates of putrescine, cadaverine and histamine catalyzed by CAT&MCOF reached 31.7%, 36.0% and 57.8%, respectively, which increased by 132.5%, 45.7% and 38.9% compared to that of MCOF. The improvement on the stability and catalytic efficiency of MCOF by fusion expression with CAT provides a good example for improving the applicability of enzymes through molecular modifications.

Keywords: multicopper oxidase, biogenic amines, stability, fusion expression, catalase

生物胺 (Biogenic amines, BAs) 是生物体内产生的一类低分子量含氮有机化合物的总称^[1]。通过食物摄取过量生物胺则会引起头痛、胃和肠道不适以及假性过敏等不良反应, 严重时可能危及生命^[2-3]。因此, 必须对食品中生物胺的含量采取有效措施进行减控。酶法降解生物胺是最具有应用前景的减控措施, 无需调整和改变食品发酵工艺, 且对食品营养和风味的影响也较小^[4]。已经发现某些多铜氧化酶 (Multicopper oxidase, MCO) 具有生物胺降解能力, 它可以氧化生物胺生成对应的醛、氨和水^[5-6], 这类酶广泛存在于动植物和微生物中^[7-8]。例如, 来源于嗜酸乳酸足球菌 *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 和植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* J16 的多铜氧化酶具有降解酪胺的能力^[5,9]。*L. plantarum* CP3 可以合成多铜氧化酶家族的漆酶, 该菌株对鱼肉香肠中总生物胺的降解率为 77%, 对组胺的降解率达到

92%^[10]。弯曲乳杆菌 *Lactobacillus curvatus* G-1 的多铜氧化酶表现出较高的 BAs 降解活性, 对常见的 6 种生物胺的降解率均超过 40%^[11]。来源于发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* 的多铜氧化酶对生物胺的降解具有广谱性, 可以降解组胺、酪胺等 7 种生物胺^[12]。此外, 为了改善多铜氧化酶降解食品中生物胺的应用特性, 研究者通过酶分子改造提高了其催化效率和耐盐性等, 从而提高了酶对生物胺的降解能力^[13]。

MCO 用于生物胺降解目前存在的主要问题是酶的催化效率低、稳定性较差和降解率低。这是因为: 一方面, 生物胺不是 MCO 的最适底物; 另一方面, MCO 在氧化生物胺时形成了具有氧化性的中间产物 H₂O₂, H₂O₂ 可能会使 MCO 发生氧化损伤, 从而影响 MCO 的稳定性和持续催化效率^[14]。虽然生物胺不是 MCO 的最适底物, 但是 MCO 是降解多种生物胺最有效的酶^[15]。因此,

减少酶在催化反应中的氧化损伤可能是有效提高 MCO 性能的一种措施。利用过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 来分解中间产物 H_2O_2 , 可使 H_2O_2 快速被清除^[16]。通过特定的连接方式将两种功能相似或互补的酶连接起来共同表达, 是同时获得两种单功能酶各自功能较常用的一种手段, 可以达到功能叠加的良好效果^[17-21]。本研究将通过构建 MCO 与 CAT 的融合酶 (MCO&CAT), 期望提高 MCO 的催化效率和稳定性, 改善其对生物胺的降解能力, 为改善多铜氧化酶的应用特性提供思路。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1, 均为本实验

室保藏或本研究构建。

1.2 试剂与仪器

试剂: LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L。LB 固体培养基加 15% 琼脂粉; 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG); 质粒提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司); PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 (TaKaRa); 生物胺标准品 (Sigma); 其他试剂为分析纯试剂。

仪器: Gel Doc 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 超声波细胞破碎仪 (SM-150 D); 安捷伦 1260 高效液相色谱 (HPLC) (美国安捷伦公司); AKTA 蛋白纯化仪 (美国 GE 公司)。

1.3 过氧化氢对多铜氧化酶稳定性的影响

将 2 000 U/L 的多铜氧化酶纯酶或等量的多

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Descriptions	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Lab stock
MCOF	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF	This work
CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/CAT	This work
MCOF&CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF&CAT	This work
MCOF-GGGGS-CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF-GGGGS-CAT	This work
MCOF-(GGGGS) ₂ -CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF-(GGGGS) ₂ -CAT	This work
MCOF-EAAAK-CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF-EAAAK-CAT	This work
MCOF-(EAAAK) ₂ -CAT	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/MCOF-(EAAAK) ₂ -CAT	This work
CAT&MCOF	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/CAT&MCOF	This work
CAT-GGGGS-MCOF	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/CAT-GGGGS-MCOF	This work
CAT-(GGGGS) ₂ -MCOF	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a/CAT-(GGGGS) ₂ -MCOF	This work
Plasmids		
pET28a	Expression vector, <i>kan</i> ^R	Lab stock
pET28a/MCOF	Expression of <i>Lactobacillus fermentum</i> Y29 MCO	This work
pET28a/CAT	Expression of <i>Bacillus subtilis</i> WSHDZ-01 CAT	This work
pET28a/MCOF&CAT	Expression of MCOF&CAT	This work
pET28a/MCOF-GGGGS-CAT	Expression of MCOF-GGGGS-CAT	This work
pET28a/MCOF-(GGGGS) ₂ -CAT	Expression of MCOF-(GGGGS) ₂ -CAT	This work
pET28a/MCOF-EAAAK-CAT	Expression of MCOF-EAAAK-CAT	This work
pET28a/MCOF-(EAAAK) ₂ -CAT	Expression of MCOF-(EAAAK) ₂ -CAT	This work
pET28a/CAT&MCOF	Expression of CAT&MCOF	This work
pET28a/CAT-GGGGS-MCOF	Expression of CAT-GGGGS-MCOF	This work
pET28a/CAT-(GGGGS) ₂ -MCOF	Expression of CAT-(GGGGS) ₂ -MCOF	This work

铜氧化酶与过氧化氢酶纯酶 (1 000 U/L) 混合液置于含有不同浓度 H_2O_2 (0–30 mmol/L) 的磷酸盐缓冲液中, 4 °C 放置 2 h 后测定其残余酶活力并计算酶活的相对值。

1.4 多铜氧化酶和过氧化氢酶融合酶的构建

多铜氧化酶 MCOF 及其融合酶构建方法如图 1 所示。以编码多铜氧化酶(MCOF, 来源于发酵乳杆菌 Y29, 基因长度为 1 539 bp)^[22]和过氧化氢酶 (CAT, 来源于枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01, 基因长度为 1 452 bp)^[23]的基因为模板, 通过扩增将两个基因以顺序直接融合或在基因间分别插入不同的接头: GGGGS、(GGGGS)₂、EAAAK、(EAAAK)₂。扩增条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。本研究所用引物如表 2 所示。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证, 并用柱回收试剂盒 (Thermo Fisher) 纯化回收。将获得的片段与线性化载体 pET28a 按照 Gibson 组装方法进行

连接^[24], 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。将成功构建并测序正确的转化子用于后续研究。

1.5 重组菌株的培养及蛋白的表达与纯化

将表达 MCOF、CAT 和融合酶的重组大肠杆菌接种到 LB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养 12 h, 再按照 2% 的接种量转入 TB 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 和 1 mmol/L Cu^{2+} , 20 °C 下诱导表达 20 h。发酵液在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 后收集菌体, 用 20 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次后置于冰水浴上进行超声破碎。超声破碎条件: 工作 2 s, 停 3 s, 破碎时间 10 min。在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 收集上清液, 获得 MCOF、CAT 和融合酶 MCOF&CAT 的粗酶液。酶的纯化采用镍柱亲和层析法^[25], 用含 0.5 mol/L 咪唑的 PBS 溶液 (pH 7.4) 进行梯度洗脱, 收集有活性的组分脱盐后用于后续研究。

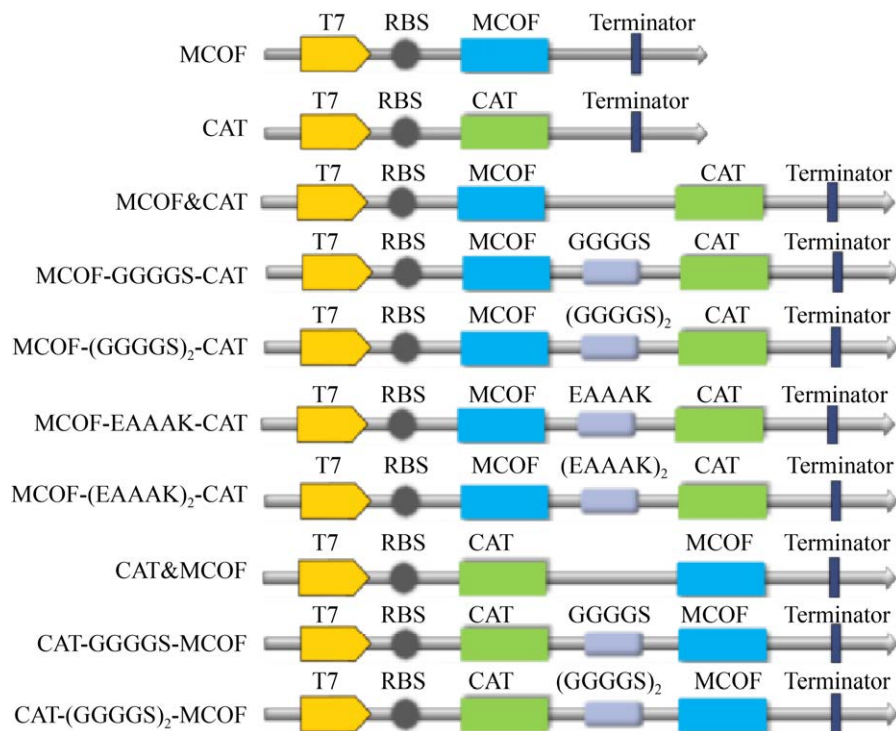


图 1 多铜氧化酶与过氧化氢酶融合表达的构建策略

Fig. 1 Strategies for fusion expression of multicopper oxidase and catalase.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Names	Primer sequences (5'-3')	Applications
P-L	<u>CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAG</u>	Amplification of pET28a
P-R	<u>GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAA</u>	
MCOF-L	<u>AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAATGAACCAGTTTTTCGATTC</u>	Amplification of MCOF
MCOF-R	<u>CTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGTGGTGGTGGTGATGATGCATGTGCATC</u> <u>CCCATCTTC</u>	
CAT-L	<u>AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAGTTCAAATAAACTGACAACA</u>	Amplification of CAT
CAT-R	<u>CTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGTGGTGGTGGTGATGATGAGAATCTTTT</u> <u>TTAATCGGC</u>	
PFA1-L	<u>CAAGAAGATGGGGATGCACATGATGAGTTCAAATAAACTGACAACATA</u>	MCOF&CAT:
PFA1-R	<u>TAGTTGTCAGTTTATTTGAACTCATCATGTGCATCCCCATCTTCTTG</u>	MCOF-L/PFA1-R, PFA1-L/CAT-R
PFA2-L	<u>CAAGAAGATGGGGATGCACATGGGTGGCGGTGGCTCTATGAGTTCAAATAA</u> <u>ACTGACAACATA</u>	MCOF-GGGGS-CAT:
PFA2-R	<u>TAGTTGTCAGTTTATTTGAACTCATAGAGCCACCGCCACCCATGTGCATCCCC</u> <u>ATCTTCTTG</u>	MCOF-L/PFA2-R, PFA2-L/CAT-R
PFA3-L	<u>CAAGAAGATGGGGATGCACATGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC</u> <u>GATGAGTTCAAATAAACTGACAACATA</u>	MCOF-(GGGGS) ₂ -CAT:
PFA3-R	<u>TAGTTGTCAGTTTATTTGAACTCATCGACCCACCGCCCGAGCCACCGCC</u> <u>ACCCATGTGCATCCCCATCTTCTTG</u>	MCOF-L/PFA3-R, PFA3-L/CAT-R
PFA4-L	<u>CAAGAAGATGGGGATGCACATGGAAGCTGCGGCAAAAATGAGTTCAAATAA</u> <u>ACTGACAACATA</u>	MCOF-EAAAK-CAT:
PFA4-R	<u>TAGTTGTCAGTTTATTTGAACTCATTTTGGCCGAGCTTCCATGTGCATCCCCA</u> <u>TCTTCTTG</u>	MCOF-L/PFA4-R, PFA4-L/CAT-R
PFA5-L	<u>CAAGAAGATGGGGATGCACATGGAAGCTGCGGCAAAAAGAAGCAGCGGCTA</u> <u>AAATGAGTTCAAATAAACTGACAACATA</u>	MCOF-(EAAAK) ₂ -CAT:
PFA5-R	<u>TAGTTGTCAGTTTATTTGAACTCATTTTAGCCGCTGCTTCTTTTGGCCGAGCT</u> <u>TCCATGTGCATCCCCATCTTCTTG</u>	MCOF-L/PFA5-R, PFA5-L/CAT-R
PFA6-L	<u>GCCGATTAATAAAGATTCTATGAATGAACCAGTTTTTCGATTC</u>	CAT&MCOF:
PFA6-R	<u>GAATCGAAAACCTGGTTCATTTCATAGAAATCTTTTTTAATCGGC</u>	CAT-L/PFA6-R, PFA6-L/MCOF-R
PFA7-L	<u>GCCGATTAATAAAGATTCTGGTGGCGGTGGCTCTATGAATGAACCAGTTTTTC</u> <u>GATTC</u>	CAT-GGGGS-MCOF:
PFA7-R	<u>GAATCGAAAACCTGGTTCATTTCATAGAGCCACCGCCACCAGAATCTTTTTTAA</u> <u>TCGGC</u>	CAT-L/PFA7-R, PFA7-L/MCOF-R
PFA8-L	<u>GCCGATTAATAAAGATTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGAT</u> <u>GAATGAACCAGTTTTTCGATTC</u>	CAT-(GGGGS) ₂ -MCOF:
PFA8-R	<u>GAATCGAAAACCTGGTTCATTTCATCGACCCACCGCCCGAGCCACCGCCA</u> <u>CCAGAATCTTTTTTAATCGGC</u>	CAT-L/PFA8-R, PFA8-L/MCOF-R

Note: the homology sequences that used for Gibson assembling are underlined.

1.6 酶活力测定

1.6.1 多铜氧化酶活力测定

采用可见光分光光度法测定多铜氧化酶活力^[26]:即以 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 为底物,通过检测 ABTS 被氧化的量来计算多铜氧化酶的酶活力。反应时间为 1 min,反应体系为 50 μL 酶液、950 μL 含 1 mmol/L ABTS

和 1 mmol/L CuCl₂ 的 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液。在 50 °C、pH 3.5 的条件下,每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

1.6.2 过氧化氢酶活力测定

采用可见光分光光度法测定过氧化氢酶活力^[27]:反应体系为 1 mL,将 50 μL 待测酶液快速加入到 0.95 mL 含 10 mmol/L H₂O₂ 的 50 mmol/L

$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中, 用 UV-2450 型紫外-可见分光光度计于 240 nm 处测定 H_2O_2 的分解。在 50 °C、pH 3.5 的条件下, 每分钟分解 1 μmol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.7 多铜氧化酶融合酶稳定性分析

将酶量为 2 000 U/L 的多铜氧化酶或融合酶纯酶置于含有 20 mmol/L H_2O_2 的磷酸盐缓冲液中 4 °C 放置 2 h, 通过测定其残余酶活力分析酶对过氧化氢的稳定性。将酶量为 4 000 U/L 的多铜氧化酶或融合酶纯酶置于含有 100 mg/L 组胺的磷酸盐缓冲液 (调节 pH 至 4.5) 中 37 °C 保温 48 h, 每隔 8 h 测定残余酶活力, 分析酶在降解组胺过程中的稳定性。

1.8 多铜氧化酶融合酶酶学性质分析

1.8.1 酶最适反应 pH 及 pH 稳定性测定

测定酶最适反应 pH 时, 将 4 000 U/L 纯酶与含有 1 mmol/L ABTS 和 1 mmol/L CuCl_2 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.5–5.0) 混合, 以测得的最高酶活力为 100%, 分别计算其他 pH 条件下的相对酶活。测定酶在不同 pH 下稳定性时, 将 4 000 U/L 纯酶置于 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.5–5.0) 中, 4 °C 放置 2 h 后测定残余酶活。

1.8.2 酶最适反应温度及温度稳定性测定

测定酶最适反应温度时, 将 4 000 U/L 多铜氧化酶或其融合酶纯酶与含有 1 mmol/L ABTS 和 1 mmol/L CuCl_2 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.5) 混合, 测定不同温度 (35–75 °C) 下的酶活力, 以测得的最高酶活力为 100%, 分别计算其他温度下的相对酶活。测定酶在不同温度下稳定性时, 将 4 000 U/L 多铜氧化酶或其融合酶纯酶置于 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.5) 中, 在不同温度 (35–75 °C) 下处理 2 h 后测定残余酶活。

1.9 酶对生物胺降解能力分析

将 2 000 U/L 多铜氧化酶或融合酶纯酶分别

与组胺、腐胺、尸胺 3 种单胺溶液 (50 mg/L, pH 4.5) 混合, 在 37 °C 反应 48 h 测定未被降解的生物胺含量。

1.10 生物胺含量测定

待测样品或生物胺标准品溶液用丹磺酰氯衍生后, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法进行定量测定^[28]。色谱条件: 流动相 A 为乙腈、流动相 B 为超纯水, 柱温为 30 °C, 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 10 μL , 紫外检测波长为 254 nm。洗脱程序: 0–7 min 内, 流动相 A 为 55%, 7–14 min 内, 流动相 A 为 65%, 然后在 70% 下保持 6 min, 最后 1 min 流动相 A 由 70% 恢复到 55%。

2 结果与分析

2.1 过氧化氢对多铜氧化酶稳定性的影响

多铜氧化酶在降解生物胺反应中生成的 H_2O_2 可能会使多铜氧化酶发生氧化损伤, 对酶的稳定性产生影响。由图 2 可知, 5 mmol/L 的 H_2O_2 即可使来源于发酵乳杆菌的多铜氧化酶 MCOF 稳定性降低; 当体系中 H_2O_2 大于 5 mmol/L 时, MCOF 的残余酶活力低于 50%。在体系中添加 CAT 则使 MCOF 的稳定性显著提高, 即使在

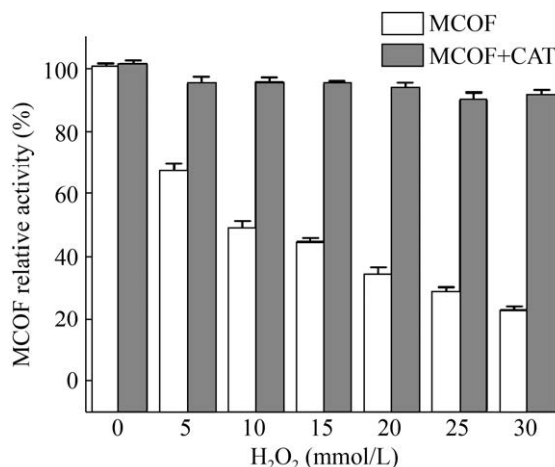


图 2 H_2O_2 及过氧化氢酶对多铜氧化酶稳定性的影响
Fig. 2 Effect of H_2O_2 and CAT on the stability of MCOF.

30 mmol/L H_2O_2 的条件下, MCOF 的残余酶活力仍在 90% 以上。这说明 H_2O_2 对 MCOF 的稳定性产生了显著影响, 而 CAT 能有效保护 MCOF 免受 H_2O_2 的损害。

2.2 多铜氧化酶融合酶的表达与纯化

为了增强多铜氧化酶抵御 H_2O_2 的能力和提提高多铜氧化酶的稳定性, 在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中成功构建并表达了重组多铜氧化酶 MCOF、重组过氧化氢酶 CAT 和 8 种不同方式连接的融合酶 MCOF&CAT (图 3)。由图 4 可知, 8 种 MCOF 融合酶均具有 MCOF 和 CAT 的酶活性, 说明融合酶表达成功, 但酶表达水平略有差异。这可能是重组酶因连接方式不同而使 MCOF 酶的活性和表达水平存在一定的差异性^[29]。因此, 几种融合酶的酶学性质还需要通过进一步的研究进行比较。

2.3 多铜氧化酶融合酶的稳定性

已有研究证实, 10 mmol/L H_2O_2 可使氧化酶发生氧化损伤甚至导致酶失活^[30-31]。为了考察 CAT 是否具有缓解 MCO 氧化损伤的作用, 比较了 20 mmol/L H_2O_2 对 MCOF 和融合酶稳定性的影响。由图 5 可知, 融合酶在 20 mmol/L H_2O_2 中的稳定性显著高于 MCOF, 残余酶活力是 MCOF 的

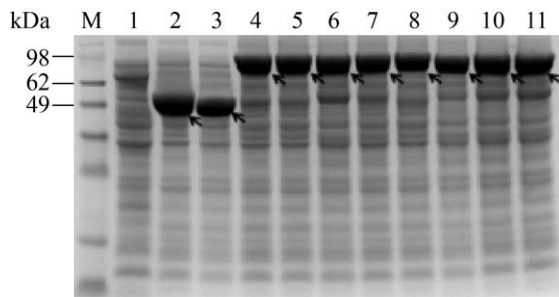


图 3 多铜氧化酶、过氧化氢酶及其融合酶的表达
Fig. 3 Expression of MCOF, CAT and their fusion proteins. Arrows indicate expressed target proteins. M: marker; 1: control; 2: MCOF; 3: CAT; 4: MCOF&CAT; 5: MCOF-GGGGS-CAT; 6: MCOF-(GGGGS)₂-CAT; 7: MCOF-EAAAK-CAT; 8: MCOF-(EAAAK)₂-CAT; 9: CAT&MCOF; 10: CAT-GGGGS-MCOF; 11: CAT-(GGGGS)₂-MCOF.

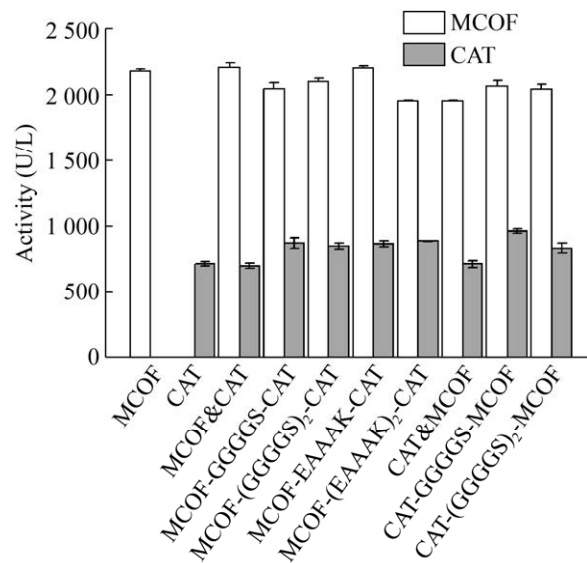


图 4 重组多铜氧化酶表达水平分析
Fig. 4 Expression levels of recombined MCOFs.

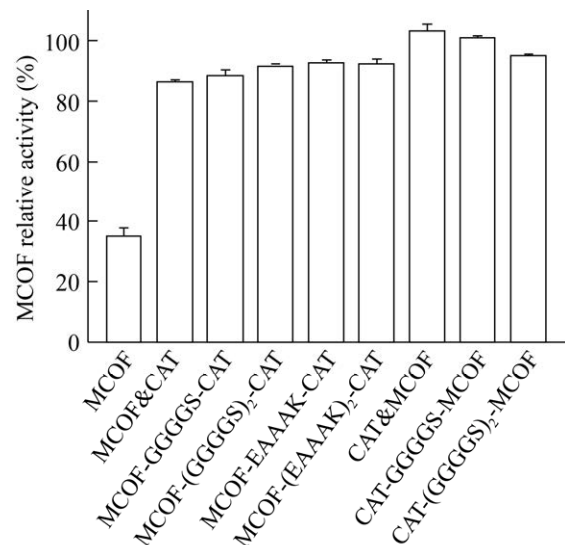


图 5 H_2O_2 对 MCOF 和其融合酶稳定性的影响
Fig. 5 Effect of H_2O_2 on the stability of MCOF and its fusion enzymes.

1.51–1.68 倍。此外, 在 MCOF 的 N 端融合 CAT 可使酶对 H_2O_2 的耐受性更强。因此, 融合酶的活性和稳定性差异可能与酶的融合顺序有关^[32-33]。

为了进一步了解多铜氧化酶在降解生物胺过程中融合 CAT 对其稳定性的影响, 考察了多铜氧化酶及其融合酶在降解组胺过程中的酶活力变

化。由图 6 可知, 在 MCOF 的 C 端融合 CAT, 24 h 后融合酶的 CAT 活性低于 20%; 而在 MCOF 的 N 端融合 CAT, 48 h 时融合酶的 CAT 活性仍有 30% 以上(图 6C-D)。除 CAT&MCOF 和 MCOF-(EAAAK)₂-CAT 外, 其他融合酶在催化过程中的稳定性均低于 MCOF (图 6A-B)。CAT&MCOF 在降解组胺过程中的稳定性最好, 残余酶活比 MCOF 高 9.48%~17.32% (图 6B)。由此说明, 融合 CAT 可以提高 MCO 在降解组胺时的稳定性。因此, 选择稳定性最好的融合酶 CAT&MCOF 用于后续酶的性质研究。另外, 在 2 个酶之间添加肽接头 (GGGGS)_n 没有提高

MCOF 在催化过程中的稳定性, 这可能是因为融合蛋白不稳定以及融合蛋白在分子空间距离上的增加使 H₂O₂ 不能有效地传递给 CAT 分解^[34]。

2.4 多铜氧化酶融合酶的酶学性质

2.4.1 融合酶的酶反应动力学参数分析

研究融合酶 CAT&MCOF 的酶学特性有助于更好地对其进行应用。通过比较酶反应动力学参数可知, 以 ABTS 为底物时, 融合酶 CAT&MCOF 对底物的亲和力 (K_m) 比 MCOF 提高了 1.00 倍, 催化效率 (k_{cat}/K_m) 提高了 1.71 倍, 摩尔比酶活提高了 1.23 倍 (表 3)。引起这种变化可能来源于两个方面的原因: 融合 CAT 后引起 MCOF 空间

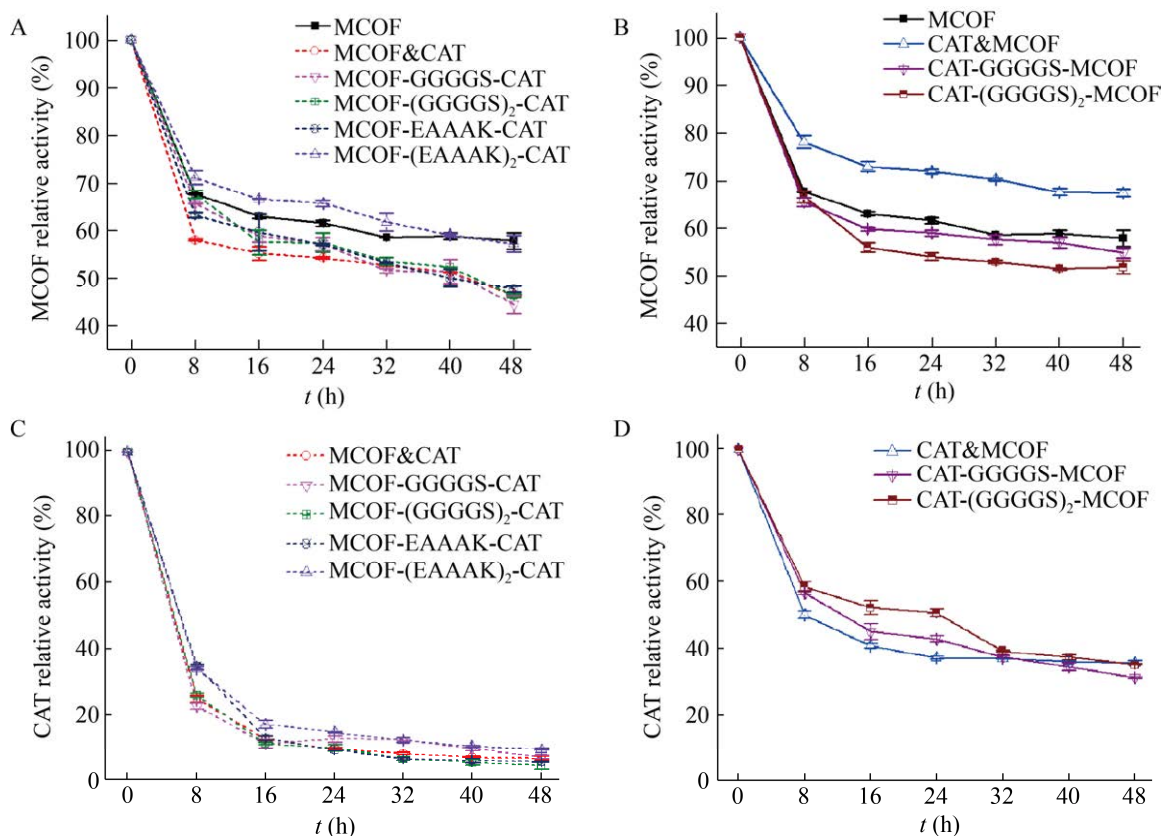


图 6 MCOF 及其融合酶在降解组胺过程中的稳定性比较

Fig. 6 The stability of MCOF and its fusion enzymes during the degradation of histamine.

表 3 MCOF 和 CAT&MCOF 的酶反应动力学参数比较

Table 3 Comparison of enzyme kinetic parameters of MCOF and CAT&MCOF

Enzymes	K_m (mmol/L)	k_{cat} (/s)	k_{cat}/K_m (L/(μ mol·s))	Specific activity (U/mg)	Specific activity (U/ μ mol)
MCOF	1.54	3.41	2.21	28.59	1 674.48
CAT&MCOF	0.77	4.59	5.99	32.25	3 731.95

结构上的变化,使底物更易与 MCOF 结合^[35-36]; CAT 及时分解产物 H_2O_2 促进了 MCOF 氧化底物时电子的传递^[37]。

CAT 提高氧化酶类催化效率的机制目前尚不完全清楚^[38]。为进一步揭示融合酶 CAT&MCOF 催化效率提高的原因,我们比较了等摩尔 MCOF、CAT、CAT&MCOF 氧化 ABTS 的速率。由图 7 可以看出,融合 CAT 能显著提高 MCOF 的催化速率,融合酶 CAT&MCOF 对 ABTS 的氧化平均速率是 MCOF 的 2.60 倍。有研究表明,通过融合 CAT 能使超氧化物歧化酶 (SOD) 对超氧阴离子($\cdot O_2^-$)

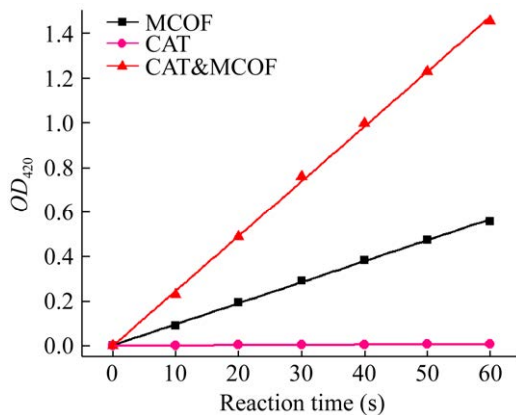


图 7 MCOF 与其融合酶对 ABTS 氧化速率的比较
Fig. 7 Comparison of the oxidation rate of ABTS by MCOF and CAT&MCOF.

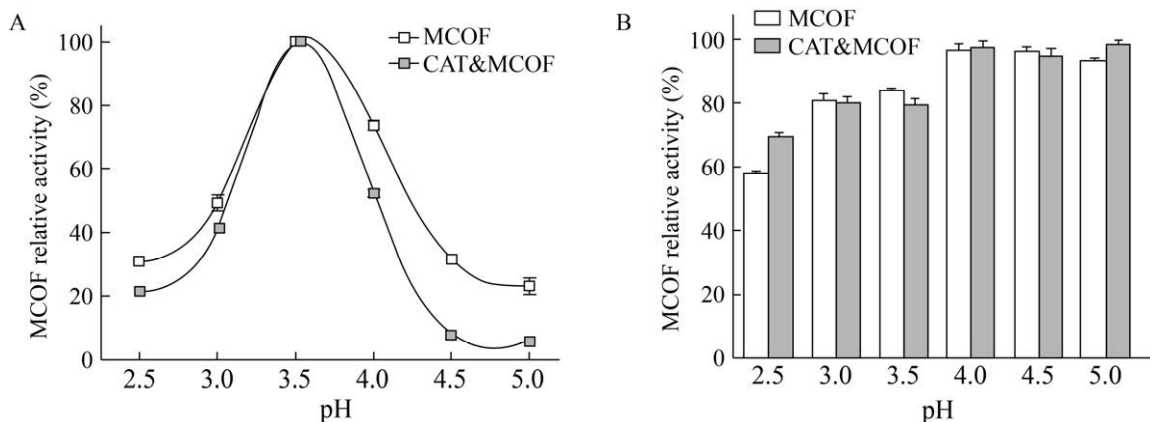


图 8 MCOF 和 CAT&MCOF 最适反应 pH 和在不同 pH 下的稳定性
Fig. 8 The optimal pH and the stability under different pH of MCOF and CAT&MCOF.

的清除能力提高 2.44 倍,且融合酶具有比 SOD 更高的稳定性^[39]。由此可见,通过融合 CAT 可有效提高某些氧化酶对氧胁迫的耐受性和稳定性。

2.4.2 pH 和温度对重组多铜氧化酶活性及稳定性的影响

pH 和温度是影响酶催化活性的重要因素,研究二者对酶活性和稳定性的影响对评估其应用特性至关重要。本研究发现,融合酶 CAT&MCOF 的最适反应 pH 和最适反应温度均未发生改变(图 8A,图 9A)。但是在酸性条件下,CAT&MCOF 的活性显著高于 MCOF 的活性。其中,CAT&MCOF 在 pH 4.5 条件下的酶活是 MCOF 的 4.02 倍。另外,在酸性 (pH 2.5–4.5) 和中高温 (35–55 °C) 条件下,CAT&MCOF 的稳定性较 MCOF 都有不同程度的提高(图 8B,图 9B)。分子改造也是常用的提高酶稳定性的技术手段之一。已有研究采用定点突变改造了来源于芽孢杆菌的 MCOB,使其在 pH 2.5–5.0 范围内的稳定性提高了约 11%–90%,但此突变体在 45–55 °C 下的稳定性却下降了约 14%–51%^[40]。由此可见,融合表达具有减弱 H_2O_2 氧化作用的 CAT,对提高氧化酶在不同 pH 范围和中高温条件下的稳定性具有一定的优势。

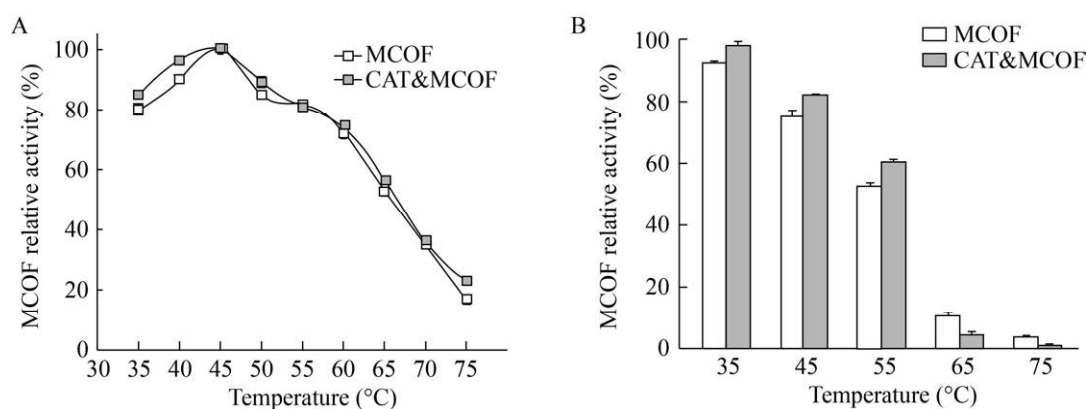


图9 MCOF和CAT&MCOF最适反应温度和在不同温度下的稳定性

Fig. 9 The optimal temperature and the stability under different temperature of MCOF and CAT&MCOF.

2.5 多铜氧化酶融合酶降解生物胺性能评价

融合酶CAT&MCOF以ABTS为底物时的催化效率和稳定性都得到了显著提高。为了进一步验证融合酶CAT&MCOF降解生物胺能力的改善,考察了CAT&MCOF和MCOF对3种单胺(组胺、腐胺、

尸胺)的降解效果。由图10可知,融合酶CAT&MCOF对3种单胺的降解能力都显著高于MCOF。其中CAT&MCOF对腐胺的降解能力提高最显著,比MCOF提高了1.33倍(图10A)。CAT&MCOF对尸胺和组胺的降解能力也有较为明

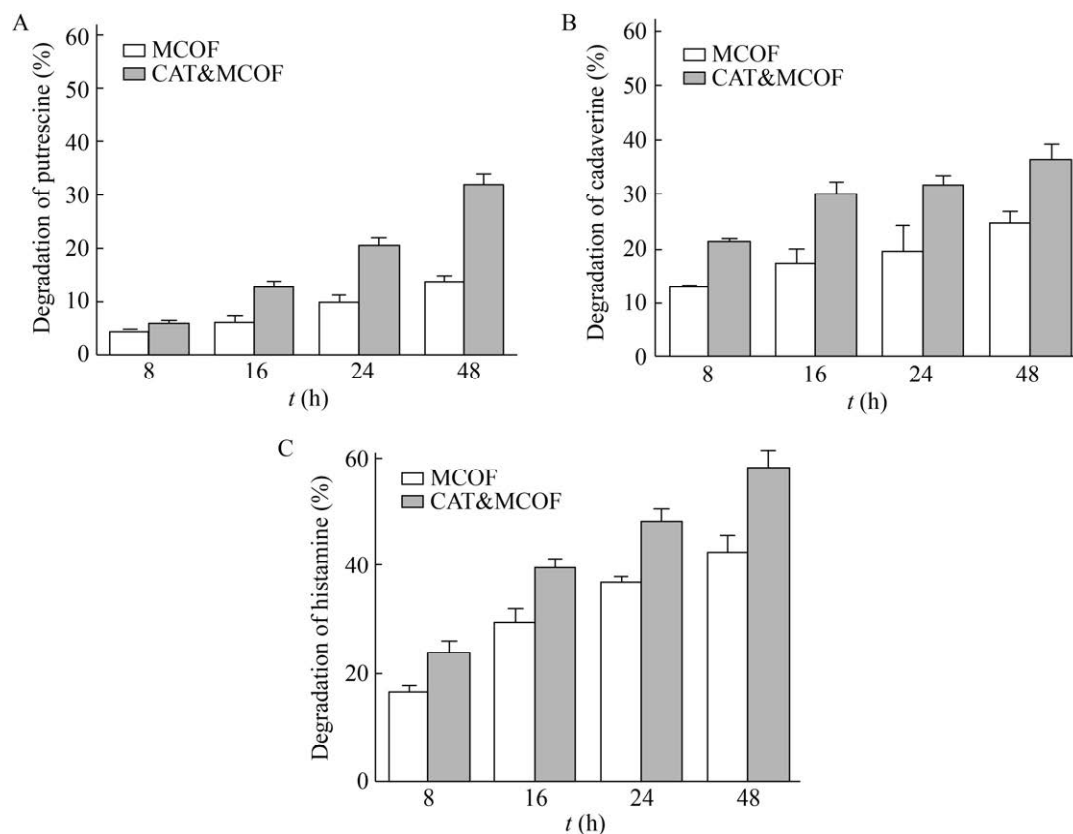


图10 MCOF和CAT&MCOF降解生物胺的能力比较

Fig. 10 Comparison of the efficiency of MCOF and CAT&MCOF in degradation of biogenic amines.

显的改善,对两者的降解率分别为 36.0%和 57.8%,比 MCOF 提高了 45.7%和 38.9% (图 10B-C)。而通过组合突变获得的催化效率和对盐的耐受性均提高的 MCOB 三突变体 T317N/L386Y/S427E 在使用与本研究相同酶量降解组胺时,其降解率略低于野生酶;只有当酶的用量高于 10 000 U/L 时,该突变体对组胺的降解率才显著高于野生酶,且只提高了 30%^[40]。由此可以看出,融合 CAT 的表达策略是改善 MCO 应用特性的有效方法。

3 讨论

利用生物酶法降解发酵食品中的生物胺是目前控制食品中生物胺含量最有前景的措施之一。MCO 作为一种广谱生物胺降解酶用于生物胺降解目前存在的主要问题是酶的催化效率低、稳定性较差和降解率低。本研究通过融合可消除 H₂O₂ 的 CAT,获得了 1 个稳定性和催化效率显著提高的融合酶 CAT&MCOF。以 ABTS 为底物时,CAT&MCOF 对底物的亲和力是 MCOF 的 2 倍,其催化效率、催化速率和在酸性与中高温条件下的稳定性较 MCOF 均得到显著提高。此外,融合酶 CAT&MCOF 对腐胺、尸胺和组胺的降解能力也有显著提高,分别比 MCOF 提高了 132.5%、45.7%和 38.9%。在本研究的基础上,今后可以通过融合酶构建策略优化、融合酶表达优化等方法进一步提高 MCO 对生物胺的降解率和降解效率,推进 MCO 用于生物胺降解的工业应用进程。

REFERENCES

- [1] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int*, 1996, 29(7): 675-690.
- [2] Miranka W, Gloria B, Claudia S, et al. The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: a randomized controlled trial. *Cortex*, 2018, 109: 181-188.
- [3] Alvarez MA, Moreno-Arribas MV. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci Technol*, 2014, 39(2): 146-155.
- [4] Guarcello R, De Angelis M, Settanni L, et al. Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(23): 6870-6880.
- [5] Callejon S, Sendra R, Ferrer S, et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(7): 3113-3124.
- [6] Callejon S, Sendra R, Ferrer S, et al. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186019.
- [7] Berni R, Piasecki E, Legay S, et al. Identification of the laccase-like multicopper oxidase gene family of sweet cherry (*Prunus avium* L.) and expression analysis in six ancient Tuscan varieties. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3557-3571.
- [8] Li L, Cai L, Zhang XX, et al. Potentially novel copper resistance genes in copper-enriched activated sludge revealed by metagenomic analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(24): 10255-10266.
- [9] Callejon S, Sendra R, Ferrer S, et al. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 185-198.
- [10] 许女, 李田田, 贾瑞娟, 等. 降解亚硝酸盐和生物胺乳杆菌筛选及其改善鱼肉香肠品质效果. *生物工程学报*, 2018, 34(15): 304-312.
Xu N, Li TT, Jia RJ, et al. Selection of nitrite and bioamine-degrading bacteria and its improvement of fish sausage quality. *Transactions CSAE*, 2018, 34(15): 304-312 (in Chinese).
- [11] Li L, Wen XX, Wen ZY, et al. Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1015-1024.
- [12] 徐洁, 方芳. 发酵乳杆菌多铜氧化酶的异源表达及酶学性质. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1286-1294.
Xu J, Fang F. Expression and characterization of a

- multicopper oxidase from *Lactobacillus fermentum*. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1286-1294 (in Chinese).
- [13] 杨涛, 陈坚, 方芳. 多铜氧化酶在大肠杆菌中的分泌表达. 过程工程学报, 2020, 20(10): 1210-1217.
Yang T, Chen J, Fang F. Secretary expression of a multicopper oxidase in *Escherichia coli*. Chin J Process Eng, 2020, 20(10): 1210-1217 (in Chinese).
- [14] Kinkar E, Kinkar A, Saleh M. The multicopper oxidase of *Mycobacterium tuberculosis* (MmcO) exhibits ferroxidase activity and scavenges reactive oxygen species in activated THP-1 cells. Int J Med Microbiol, 2019, 309(7): 151324-151330.
- [15] Komori H, Higuchi Y. Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase. J Biochem, 2015, 158(4): 293-298.
- [16] Alfonso-Prieto M, Biarnes X, Vidossich P, et al. The molecular mechanism of the catalase reaction. J Am Chem Soc, 2009, 131(33): 11751-11761.
- [17] Orita I, Sakamoto N, Kato N, et al. Bifunctional enzyme fusion of 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(2): 439-445.
- [18] Stressler T, Pfahler N, Merz M, et al. A fusion protein consisting of the exopeptidases PepN and PepX-production, characterization, and application. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(17): 7499-7515.
- [19] Hong SY, Lee JS, Cho KM, et al. Assembling a novel bifunctional cellulase-xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion. Biotechnol Lett, 2006, 28(22): 1857-1862.
- [20] 黄子亮, 张翀, 吴希, 等. 融合酶的设计和应用研究进展. 生物工程学报, 2012, 28(4): 393-409.
Huang ZL, Zhang C, Wu X, et al. Recent progress in fusion enzyme design and applications. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 393-409 (in Chinese).
- [21] Aalbers FS, Fraaije MW. Enzyme fusions in biocatalysis: coupling reactions by pairing enzymes. Chembiochem, 2019, 20(1): 20-28.
- [22] 方芳, 周朝晖, 李铁桥, 等. 一种高效降解组胺的新多铜氧化酶: 中国, 201811433209.1. 2019-03-15.
- [23] 姚海勇, 华兆哲, 堵国成, 等. 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 过氧化氢酶的分离纯化及性质. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 820-824.
Yao HY, Hua ZZ, Du GC, et al. Purification and characterization of catalase from *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. Chin J Appl Environ Biol, 2008, 14(6): 820-824.
- [24] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods, 2009, 6(5): 343-345.
- [25] Meng LJ, Liu YY, Yin XJ, et al. Effects of His-tag on catalytic activity and enantioselectivity of recombinant transaminases. Appl Biochem Biotechnol, 2020, 190(3): 880-895.
- [26] Yang S, Long Y, Yan H, et al. Gene cloning, identification, and characterization of the multicopper oxidase CumA from *Pseudomonas* sp. 593. Biotechnol Appl Biochem, 2017, 64(3): 347-355.
- [27] Xu S, Guo YQ, Du GC, et al. Self-cloning significantly enhances the production of catalase in *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. Biotechnol Appl Biochem, 2014, 173(8): 2152-2162.
- [28] Li ZJ, Wu YN, Zhang G, et al. A survey of biogenic amines in Chinese red wines. Food Chem, 2007, 105(4): 1530-1535.
- [29] Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of Tf-based fusion proteins. Pharm Res, 2009, 26(3): 523-528.
- [30] Goldstone AB, Liochev SI, Fridovich I. Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H₂O₂: mechanism of protection. Free Radic Biol Med, 2006, 41(12): 1860-1863.
- [31] Tiwari MK, Hagglund PM, Moller IM, et al. Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for enzymatic activity and antioxidant action. Redox Biol, 2019, 26: 101262-101277.
- [32] 任春慧, 张娟, 堵国成, 等. 基于融合双亲短肽提高葡萄糖氧化酶的热稳定性. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1106-1116.
Ren CH, Zhang J, Du GC, et al. Enhancing thermal stability of glucose oxidase by fusing amphiphilic short peptide. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1106-1116 (in Chinese).
- [33] Wang YF, Zhang J, Wang WW, et al. Effects of the N-terminal and C-terminal domains of *Meiothermus ruber* CBS-01 trehalose synthase on thermostability

- and activity. *Extremophiles*, 2012, 16(3): 377-385.
- [34] Kavooosi M, Creagh AL, Kilburn DG, et al. Strategy for selecting and characterizing linker peptides for CBM9-tagged fusion proteins expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 98(3): 599-610.
- [35] Doi N, Yanagawa H. Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution. *FEBS Lett*, 1999, 453(3): 305-307.
- [36] Blazyk JL, Lippard SJ. Domain engineering of the reductase component of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 5630-5640.
- [37] Takamura E, Nakamura T, Sakamoto H, et al. Effects of multicopper oxidase orientation in multiwalled carbon nanotube biocathodes on direct electron transfer. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(2): 137-141.
- [38] Peters C, Rudroff F, Mihovilovic MD, et al. Fusion proteins of an enoate reductase and a Baeyer-Villiger monooxygenase facilitate the synthesis of chiral lactones. *Biol Chem*, 2017, 398(1): 31-37.
- [39] Li R, Zhou XQ, Liu D, et al. Enhancing the activity and stability of Mn-superoxide dismutase by one-by-one ligation to catalase. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129: 138-145.
- [40] 杨涛. 分子改造提高多铜氧化酶的应用特性[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- Yang T. Improving the application characteristics of multicopper oxidase through molecular modification[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)