

褐色嗜热裂孢菌脱色过氧化物酶的表达及发酵条件优化

朱竹兵¹, 孙亚武², 唐蕾^{1,2*}

1 (工业生物技术教育部重点实验室(江南大学), 江苏 无锡, 214122)

2 (江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214122)

摘要 为了提高来源于褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的脱色过氧化物酶(TfuDyP)对蒽醌染料降解能力, 将含有目的基因的重组质粒 pET-28a(+) -TfuDyP, 转化至 *E. coli* BL21 进行异源表达, 并对重组 TfuDyP 的发酵条件进行优化, 分析酶活与血红素饱和度之间的关系。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测到分子质量为 46 kDa 的重组 TfuDyP 蛋白条带。TfuDyP 的最佳诱导条件为: 诱导剂(IPTG)浓度 0.3 mmol/L, 诱导时间 14 h, 诱导温度 30 ℃, 在此条件下, TfuDyP 比酶活达到 27.9 U/g。氯高铁血红素、5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)、谷氨酸(Glu)、FeCl₂、MnCl₂ 均可提高重组 TfuDyP 的催化活性, 酶活的提高与血红素饱和度之间存在一定的正相关性。实验结果可为利用外源添加物提高血红素的饱和度, 应用于染料脱色过氧化物酶的工业发酵提供理论依据。

关键词 大肠杆菌; 脱色过氧化物酶; 褐色嗜热裂孢菌; 血红素饱和度

染料脱色过氧化物酶(DyPs)是一类具有降解多种染料能力的酶类, 首次发现于真菌 *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 中^[1], 属于胞内蛋白^[2]。1999 年, 研究者将其分离纯化, 分析其特征发现, 在 407 nm 处有 1 个 Soret 吸收峰, 以及它的 Na₂S₂O₄ 还原形式在 556 nm 有 1 个吸收峰, 表明血红素组分的存在^[3]。深入研究发现, DyPs 是血红素过氧化物酶家族中区别于传统血红素过氧化物酶的新型家族, 例如, DyPs 在二级结构上具有多个 α-螺旋和 β 折叠, 其他类型血红素过氧化物酶缺少 β 折叠^[4]; DyPs 有特定结构 Fe-His-Asp, 而血红素过氧化物酶有 Fe-His-His 三联体的保守氨基酸^[5-7]。

DyPs 的特点是利用过氧化氢作为电子受体催化各种有机物, 包括蒽醌染料^[8]、酚类底物、藜芦醇^[9]、愈创木酚^[10]、木质素及木质素模型化合物^[11], 尤其对蒽醌类染料活性最高, 因而具有潜在的应用价值, 可以实现生物法对染料污水的彻底降解, 从而避免化学、物理等方法降解的 2 次污染问题。目前, 人们主要从脱色过氧化物酶的底物特异性、多样性、晶体结构、分类、定点突变、催化机理等^[5,12-15] 方面展开研

究, 不仅提高了 DyPs 的稳定性和表达效率, 而且实现了脱色过氧化物酶对底物的有效催化。但是在细菌中异源表达 DyPs 时, 重组蛋白的含量偏低, 一般在 10 mg/L 以下。最近的研究发现, TfuDyP 与修饰蛋白(SUMO)^[16] 融合表达, 大肠杆菌中重组蛋白量可增至约 200 mg/L, 然而高度过表达的 SUMO-TfuDyP 几乎没有活性。通过紫外-可见吸收光谱法和高分辨率质谱法对酶的分析表明大部分高度过表达的酶只包含有铁缺乏的血红素前体原卟啉 IX (PPIX) 而不是血红素^[17]。血红素作为脱色过氧化物酶的辅基, 其胞内合成量对 DyPs 催化活性起着至关重要的作用, 如何在提高 DyPs 表达量的同时, 提高其辅基血红素的含量尚待深入研究。

本文以来源于褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的 TfuDyP 为研究对象。以 pET28a(+) 为载体, 在大肠杆菌中异源表达 TfuDyP。一方面通过诱导剂浓度、诱导时间、诱导温度优化, 获得重组蛋白 TfuDyP 最佳表达条件。另一方面研究了外源添加剂对重组 TfuDyP 中血红素饱和度影响, 以期更好地提高辅基血红素合成, 从而提高目的蛋白的催化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

宿主菌 *E. coli* BL21 由实验室保藏, 含有目的基因的表达质粒 pET-28a(+) 购于南京金斯瑞生物科

第一作者: 硕士研究生(唐蕾教授为通讯作者, E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn)。

基金项目: 111 引智计划(111-2-06); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-27); 江苏省现代工业发酵协同创新中心资助

收稿日期: 2018-12-04, 改回日期: 2019-03-21

技术有限公司。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基:酵母提取物 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0。

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入 2% 琼脂。

1.1.3 主要试剂

SuperBradford 蛋白定量试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;活性蓝 19,上海一基实业有限公司;菌株构建所用的质粒提取试剂盒,购自 TaKaRa (大连);5-氨基乙酰丙酸,购自梯希爱化成工业发展有限公司。

1.1.4 仪器设备

冷冻离心机,日本日立公司;SM-5600 细胞超声破碎仪,美国 cole-parmer;AKTA AVANT25,美国 GE 公司;Enspire 酶标仪,美国珀金埃尔默有限公司;紫外可见分光光计,日本日立株式会社。

1.2 方法

1.2.1 TfuDyP 在大肠杆菌中的构建

利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库获得 TfuDyP (accession number Q47KB1) 全长核酸序列,合成目的基因,以已购的质粒 pET-28a(+) 为载体,将含有目的基因的质粒转化到 *E. coli* BL21 进行异源表达,重组质粒如图 1 所示。

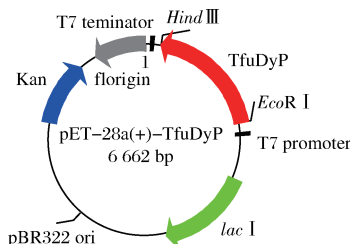


图 1 重组质粒 pET28a(+)-TfuDyP 示意图

Fig.1 Schematic representation of recombinant plasmid pET28a(+)-TfuDyP

1.2.2 重组 TfuDyP 分离纯化

将重组菌株接种到含有 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,200 r/min、37 ℃ 培养 12 h,以 4% (V/V) 接种量转接至含有 100 mL 新鲜培养基的 500 mL 摇瓶中,相同条件培养至菌体 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时。向培养基中添加终浓度为 0.5 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃苷 (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, IPTG),30 ℃ 诱导 12 h,8 000 r/min 离心 20 min 得到菌体,用 50 mmol/L 的 pH 7.4 磷酸钾缓冲

溶液重新悬浮细胞,超声破碎 30 min,10 000 r/min 离心 30 min 收集上清液,过 0.22 μm 水系滤膜得到粗酶液,通过 1 mL His Trap™ HP 亲和镍柱分离纯化,收集目的蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳以鉴定重组 TfuDyP 纯度。

1.2.3 酶活力及蛋白浓度的测定

向反应体系中依次加入 100 mmol/L 醋酸钠缓冲溶液 (pH 4.5),100 μmol/L 活性蓝 19 和适量的酶液,最后加入终浓度为 0.1 mmol/L 过氧化氢启动反应,酶促反应 10 min,然后通过加入 200 μL 2% SDS 终止反应。在室温下,于波长 595 nm 处检测吸光值变化^[17]。蛋白质浓度测定采用 BCA 法,以牛血清蛋白为标准蛋白。

TfuDyP 酶活定义:在 25 ℃,pH 4.5 条件下,每分钟氧化 1 μmol 活性蓝 19 所需的酶量为 1 U。比酶活测定如式(1):

$$\text{比酶活} = \frac{\text{酶活}}{\text{蛋白质量浓度}} \quad (1)$$

式中:比酶活单位 U/mg;酶活单位 U/mL;蛋白质量浓度,mg/mL。

1.2.4 重组 TfuDyP 的表达条件优化

表达条件优化:向培养基中添加终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L 的 IPTG,诱导时间为 8、10、12、14、16 h,诱导温度为 16、23、30、37 ℃,8 000 r/min 离心 20 min 得到菌体,用 50 mmol/L 的 pH 7.4 磷酸缓冲溶液重新悬浮细胞,超声破碎 30 min,10 000 r/min 离心 30 min 收集上清液,分离纯化,测定蛋白浓度,计算比酶活。

1.2.5 外源添加物对重组 TfuDyP 表达的影响

1.2.5.1 氨基酸与金属离子对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响

向培养基中分别添加终浓度为 100 μmol/L 的组氨酸 (His)、谷氨酸 (Glu)、FeCl₂、CoCl₂ 以及 MnCl₂;分别添加终浓度为 0、40、60、80、100、120 μmol/L 的 FeCl₂;在最佳表达条件下培养、收集菌体、破碎、离心、收集上清液过 0.22 μm 水系滤膜得到粗酶液,测定菌体生长量和计算酶活。

1.2.5.2 氯高铁血红素和 5-氨基乙酰丙酸浓度对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响

向培养基中分别添加终浓度为 0、12、16、20、24 μmol/L 的氯高铁血红素;分别添加终浓度为 0、100、150、200、300、400、500 μmol/L 的 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA)。在最佳表达条件下培养,测定菌体生长量和

计算酶活。

1.2.6 外源添加物对重组 TfuDyP 中血红素饱和度的影响

分别将 100 μmol/L 的 5-ALA、氨基酸 (Glu)、金属离子 (Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺)、氨基酸与铁组合 (Glu + Fe²⁺) 加入培养基中,最佳表达条件下培养,收集菌体离心、悬浮、破碎、离心,收集上清液过 0.22 μm 水系滤膜得到粗酶液,通过 1 mL His Trap™ HP 亲和镍柱分离纯化,用 10 个柱体积的洗脱缓冲液进行线性洗脱,对目的蛋白进行全波长扫描和比酶活的计算。

血红素饱和度定义为在 408 nm 处的吸光值与 280 nm 处之比,即 A_{408}/A_{280} 。

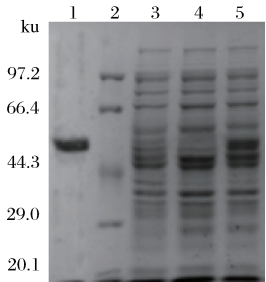
2 结果与分析

2.1 TfuDyP 在大肠杆菌中的异源表达

2.1.1 TfuDyP 的表达与纯化

将含有全长 1 293 bp 的目的基因的 pET28a (+)-TfuDyP 和空载 pET28a (+) 质粒分别转化至 E. coli BL21 中进行异源表达。收集菌体、破碎、离心、分离纯化,将粗酶液和纯化后蛋白进行 SDS-PAGE

电泳确定目的蛋白表达情况。结果如图 2,有明显的目的蛋白条带,分子质量约为 46 kDa,与理论计算值一致。将目标条带割胶回收,进行 MALDI-TOF 质谱分析^[18],检测数据库为 SwissProt 201704 (554241 sequences; 198410167 residues),与库中理论质量为 45 957 Da 的 dye-decolorizing peroxidase Tfu_3078 OS = Thermobifida fusca 匹配,匹配分数为 432 (表 1),确定重组 TfuDyP 在 E. coli BL21 成功表达。



1-纯化的 TfuDyP;2-Marker;3-空载 pET-28a;
4-不加 IPTG 诱导剂;5-IPTG 诱导表达

图 2 重组蛋白 TfuDyP 表达 SDS-PAGE 电泳分析图
Fig. 2 The SDS-PAGE electrophoresis for recombinant TfuDyP expression

表 1 重组蛋白 TfuDyP 的飞行时间质谱分析

Table 1 Time-of-flight mass spectrometry analysis of recombinant TfuDyP

query	Observed	Mr(expt)	Mr(Calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
17	1 325.674 7	1 324.667 4	1 324.688 8	-16.11	0	46	0.021	1	U	R. HEGSALFAVPPAAR. E
23	1 704.783 7	1 703.776 4	1 703.811 4	-20.57	0	55	0.002 5	1	U	R. DEEGEPLIPENAHVR. I
33	2 165.009 2	2 164.002 0	2 164.054 9	-24.46	0	64	0.000 23	1	U	R. RPDALADLPEFSTDDLHPR. W
35	2 326.039 1	2 325.031 8	2 325.080 8	-21.07	0	49	0.0071	1	U	R. NLNGQIDGTANPAQDHPLFDR. T
43	2 886.455 3	2 886.448 0	2 885.415 5	11.3	1	99	5.2e-08	1	U	R. NETDPVVLSARDEEGEPLIPENNAHVR. L
45	3 055.684 7	3 054.677 4	3 055.574 5	-293.59	0	134		1	U	R. ADATAAPQPGISGPAPAFVHVIALDLAEEAR. K

注:DYP THEFY; MASS:45957; Score:432; Matches:6(5); Sequences:6(6) Dye-decolorizing peroxidase Tfu_3078 OS = Thermobifida fusca (strain YX) GN = Tfu_3078 PE = 1 SV = 1。

2.1.2 重组 TfuDyP 诱导条件优化

在新生肽链的聚集速率高于蛋白折叠速率的情况下,容易出现不可溶性蛋白。因此,如何降低重组蛋白合成的速率就显得尤为关键,通常采用的方法为降低培养温度和使用低浓度的诱导剂。低温下重组蛋白的合成速率降低,新合成的蛋白就拥有更多的时间进行折叠。此外,降低培养温度也可以减少重组蛋白被宿主降解的量,提升重组蛋白的稳定性^[19]。因此,本实验对影响酶表达水平的关键因素即诱导剂浓度、诱导时间和诱导温度进行了研究。

结果表明,当 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时,重组 TfuDyP 的比酶活达到最大值 21.3 U/g,随着诱导剂

浓度增加,比酶活缓慢下降(图 3-a)。在诱导时间为 14 h 时,比酶活达到最高值 24 U/g,而在低于 14 h 的情况下,比酶活随着诱导时间的增加明显升高,诱导时间高于 14 h 时,比酶活反而下降(图 3-b)。当诱导温度为 30 ℃ 时,比酶活最高值 27.9 U/g,接近 16 ℃ 时的 2 倍,可以看出温度对酶活影响较大(图 3-c)。温度较低(16 ℃)时,菌体的繁殖受阻,活性蛋白合成量低,酶活较低。温度过高(37 ℃),重组 TfuDyP 的表达水平提高,但是高温时重组 TfuDyP 的合成速率高于蛋白的折叠速率,容易形成不可溶性蛋白,导致酶活降低。综上所述最佳表达条件为 IPTG 浓度 0.3 mmol/L,诱导时间 14 h,诱导温度 30 ℃。

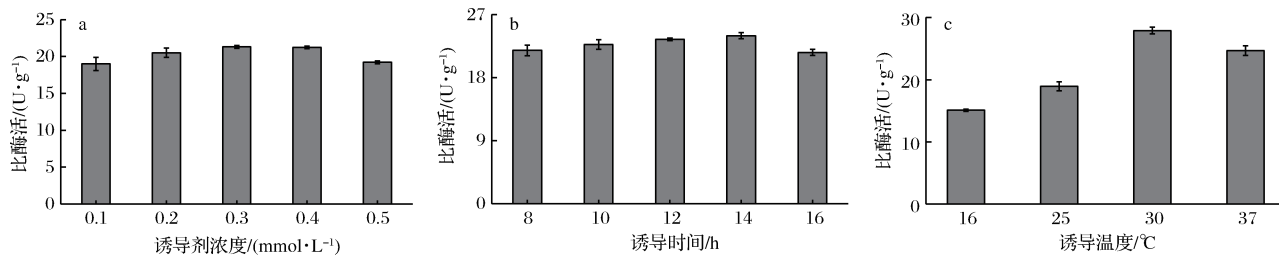


图3 重组蛋白 TfuDyP 表达条件优化

Fig. 3 Optimization of expression conditions of recombinant TfuDyP

2.2 外源添加物对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响

DyPs 是血红素过氧化物酶家族中的一种,重组 TfuDyP 必须与辅基血红素结合,才能实现对底物的催化活性。环境因素对重组 TfuDyP 表达和血红素合成起着关键作用,例如,Fe²⁺、血红素前体 5-ALA 以及氯高铁血红素通常作为添加物以促进血红素合成^[20-22];谷氨酸参与 TfuDyP 的组成和提供血红素合成的前体^[23];Mn²⁺ 是代谢途径中许多酶类的激活剂。本实验选取几种外源添加剂 (Glu、His、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、氯高铁血红素、5-ALA),在上述最佳表达条件下,研究其对重组 TfuDyP 酶活的影响。

2.2.1 氨基酸与金属离子对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响

向培养基中分别添加终浓度为 100 μmol/L 的 His、Glu 以及 FeCl₂、CoCl₂、MnCl₂,其中不添加任何添加剂为对照组,考察氨基酸和金属离子对重组 TfuDyP 酶活和菌体生长的影响。结果如图 4-a 所示,CoCl₂ 对重组 TfuDyP 酶活有一定抑制作用,添加 His 对重组 TfuDyP 酶活和菌体的生长基本保持不变,外源添加 FeCl₂、MnCl₂ 和 Glu 都能提高重组 TfuDyP 酶活和菌体生长量。从中可以看出 FeCl₂ 对酶活影响最明显,因此,进一步探究了 FeCl₂ 浓度对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响。结果表明随着 FeCl₂ 浓度增加,酶活和菌体量呈现增长趋势,提高浓度为 80 μmol/L 时,酶活达到最大值 31.31 U/L,较空白对照提高近 67.6% (图 4-b)。然而当 Fe²⁺ 浓度高于 60 μmol/L,菌体量逐渐下降。

2.2.2 氯高铁血红素和 5-ALA 浓度对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响

实验结果显示,当氯高铁血红素浓度达到 16 μmol/L 和 18 μmol/L 时,重组 TfuDyP 酶活和菌体湿重分别达到最大值 44.95 U/L 和 6.05 g/L,低浓度的氯高铁血红素对重组 TfuDyP 酶活和菌体量具有明显

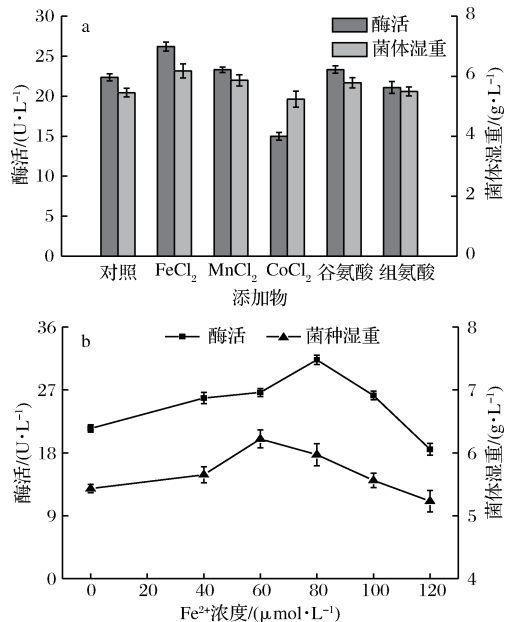


图4 金属离子和氨基酸对重组 TfuDyP 酶活和菌体生长影响

Fig. 4 Effect of metal ions and amino acids on recombinant TfuDyP activity and cell growth

的促进作用。当氯高铁血红素浓度大于 18 μmol/L 时,对菌体生长有明显的抑制作用 (图 5-a)。

图 5-b 为 5-ALA 浓度对重组 TfuDyP 酶活和菌体生长的影响。当外源添加的 5-ALA 浓度低于 400 μmol/L 时,酶活与其添加量呈现出高度线性正相关,当浓度为 400 μmol/L 酶活达到最大值 65 U/L,大约是对照组的 3 倍。当 5-ALA 浓度达低于 200 μmol/L 时,菌体量与 5-ALA 浓度呈线性增长。

本实验在最佳表达条件下,研究了添加剂种类和浓度对重组 TfuDyP 表达及酶活性的影响。适量浓度的 Glu、Fe²⁺、Mn²⁺、氯高铁血红素和 5-ALA,一方面提高了菌体生长量,另一方面促进了重组 TfuDyP 催化活性。而钴离子抑制了重组 TfuDyP 酶活。实验结果表明,添加剂对重组 TfuDyP 酶活性影响存在差异: 5-ALA > 氯高铁血红素 > Fe²⁺ > Glu > Mn²⁺ > 对照

组 > Co^{2+} 。

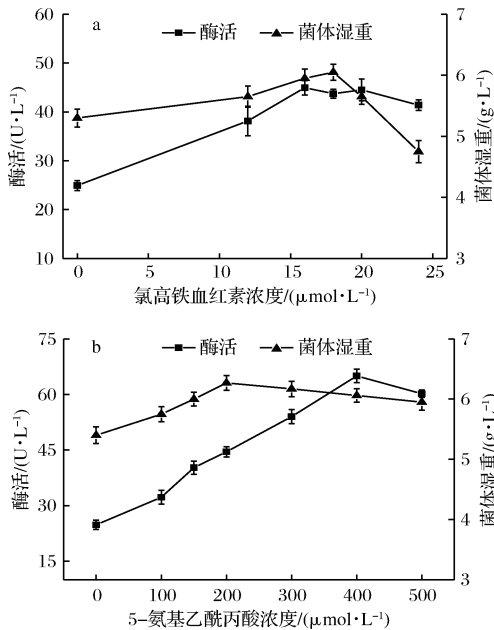


图5 氯高铁血红素和 5-ALA 对重组 TfudYP 酶活和菌体生长影响

Fig. 5 Effect of hemin and 5-ALA on recombinant TfudYP activity and cell growth

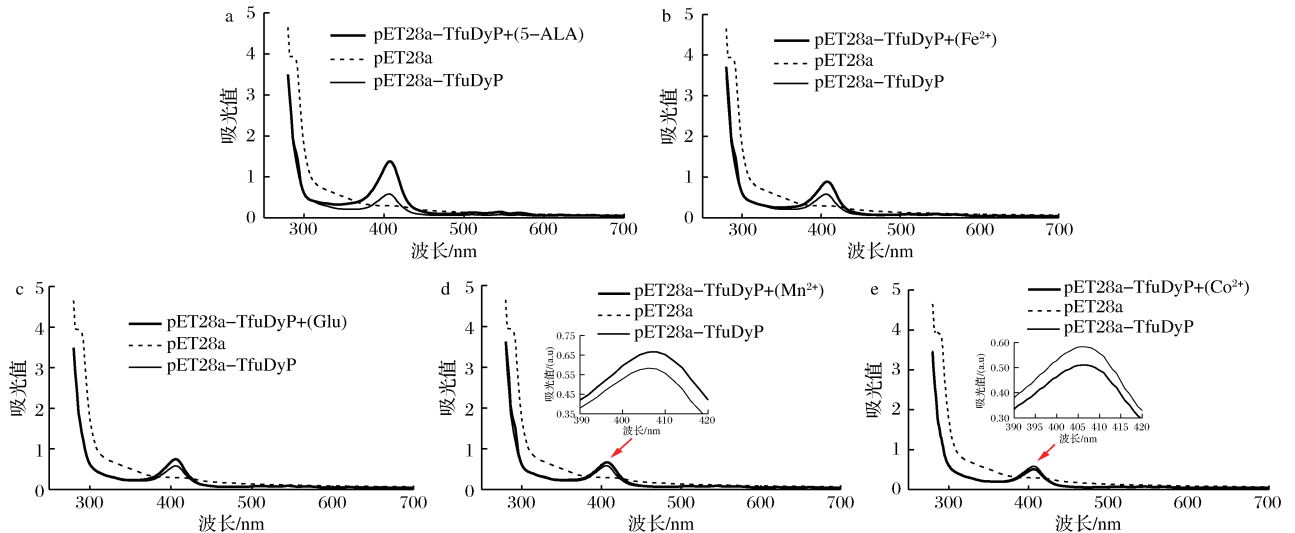


图6 添加剂对重组 TfudYP 中血红素饱和度的影响

Fig. 6 Effect of different amino acids on heme saturation in recombinant TfudYP

综上所述,重组 TfudYP 在波长 408 nm 处的吸收值: $5\text{-ALA} > \text{Fe}^{2+} > \text{Glu} > \text{Mn}^{2+} > \text{对照组} > \text{Co}^{2+}$,与添加剂对重组 TfudYP 酶活的影响结果是一致的。氨基酸与 Fe^{2+} 的组合能够进一步促进血红素合成,但远不及 5-ALA 的添加,氨基酸与 Fe^{2+} 的添加不是简单的叠加效应,对血红素合成可能是复杂的协同作用。

2.3.2 重组 TfudYP 中血红素饱和度和酶活的关系

2.3 外源添加物对重组 TfudYP 中血红素饱和度和酶活性的影响

从 2.2 研究结果中可以看出,5-ALA 等外源添加剂对重组 TfudYP 催化活性产生一定影响,为了探究外源添加剂对重组 TfudYP 酶活的影响与血红素的关系,向培养基中分别添加终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-ALA、 Glu 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+} + \text{Glu}$,其中不添加任何添加剂为对照组,在最佳表达条件下诱导表达,对纯化目的蛋白进行全波长扫描。

2.3.1 外源添加剂对重组 TfudYP 中血红素饱和度的影响

波长 408 nm 为血红素的特征吸收,全波长扫描显示添加了 5-ALA、 Fe^{2+} 、 Glu 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 的 408 nm 处的吸收值分别为 1.378、0.89、0.741、0.579、0.51 (图 6)。结果表明,除了 Co^{2+} ,添加剂(5-ALA、 Fe^{2+} 、 Glu 、 Mn^{2+})明显高于对照组。

添加 $\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$ 、 Fe^{2+} 、 Glu 和对照组在波长 408 nm 处的吸收值分别为 1.027、0.89、0.741、0.579 (图 7),表明氨基酸与 Fe^{2+} 的组合可进一步提高重组 TfudYP 中血红素的含量。

为了探究重组 TfudYP 酶活和血红素饱和度两者之间的关系,将各种添加剂以终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 添加到培养基中,在最佳表达条件下诱导表达,对纯化的目的蛋白进行全波长扫描和比酶活的计算。

实验结果表明, Glu 、5-ALA、 Fe^{2+} 、 $\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$ 能够提高重组 TfudYP 中血红素饱和度, Co^{2+} 对 Heme 饱和度具有抑制作用(表 2)。选取几种外源添加剂

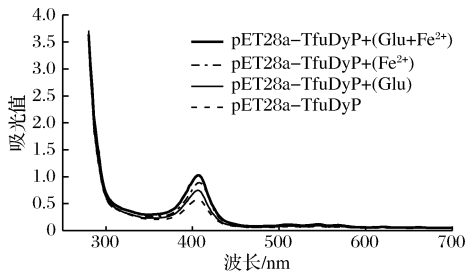


图7 铁离子和氨基酸对重组 TfuDyP 中的血红素饱和度的影响

Fig.7 Effect of iron ions and amino acids on heme saturation in recombinant TfuDyP

(Co^{2+} 、 $\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$ 、5-ALA),考察重组 TfuDyP 中血红素饱和度与比酶活关系。实验结果显示,添加剂对重组 TfuDyP 中血红素饱和度的影响和比酶活的影响呈正相关性(图8)。

表2 不同外源添加剂对重组 TfuDyP 中 Heme 饱和度的影响

样品	A_{408}/A_{280}
B	0.203 7
Glu	0.212 5
5-ALA	0.471 6
$\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$	0.252 6
CoCl_2	0.180 1
MnCl_2	0.204 1
FeCl_2	0.248 2

注:B-不加任何添加剂的对照组;其他外源添加剂最终浓度 0.1 mmol/L。

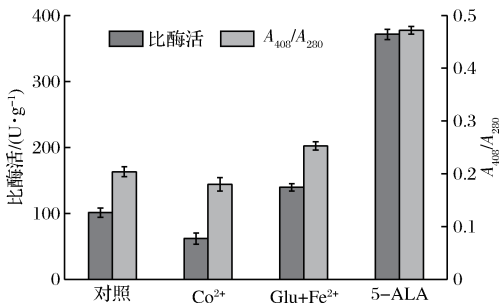


图8 添加剂对酶活与 heme 饱和度影响关系图

Fig.8 Effect of different additives on enzyme activity and heme saturation

血红素辅基掺入脱辅基重组蛋白被认为对于全蛋白的可溶性和活性至关重要,提高血红素及其前体物质 5-ALA 的水平是目前使用的最主要策略^[24], KERY 等^[25]发现 5-ALA 的添加提高了在大肠杆菌中

表达的人源胱硫醚 β -合成酶的血红素饱和度和产率,与本文一致;但是也有报道指出,5-ALA 的添加对目标重组血红素过氧化物酶的活性没有显著影响^[19,28],与本研究的结果不同。而 Co^{2+} 、 $\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$ 对血红素饱和度及 TfuDyP 的比酶活关系的影响未见报道。

3 结论

脱色过氧化物酶是血红素过氧化物酶家族中的新家族,以血红素为辅基,过氧化氢为电子受体,催化各种有机物。本课题以来源于 *T. fusca* 的 DyP 型过氧化物酶(TfuDyP)为研究对象,以 pET28a(+)为载体,在大肠杆菌中异源表达脱色过氧化物酶 TfuDyP,一方面优化重组 TfuDyP 表达条件(诱导剂浓度、诱导时间和诱导温度),另一方面研究了添加剂对重组 TfuDyP 酶活和血红素饱和度影响,得出如下结论:

诱导剂浓度为 0.3 mmol/L,诱导时间为 14 h,诱导温度 30 ℃,胞内比酶活达到 27.9 U/g,是重组蛋白 TfuDyP 最佳表达条件。优化培养基成分,发现氯高铁血红素、5-ALA、 Glu 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 能提高重组 TfuDyP 催化活性,尤其是氯高铁血红素、5-ALA、 Fe^{2+} 。在研究外源添加剂对血红素饱和度影响过程中发现,在血红素最大吸收波长 408 nm 处的吸收值:5-ALA > $\text{Glu} + \text{Fe}^{2+}$ > Fe^{2+} > Glu > Mn^{2+} > 对照组 > Co^{2+} ,与添加剂(5-ALA、氯高铁血红素、 Glu 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+})对重组 TfuDyP 酶活影响结果是一致的,即添加剂是通过影响血红素合成来影响重组 TfuDyP 催化活性,添加剂对血红素饱和度影响与对比酶活影响成正相关性。DyPs 作为一种新型过氧化物酶,在染料降解等领域具有潜在价值,如何提高重组 DyPs 的活性和产率成为其是否能实现工业应用的关键。通常采用的血红素前体添加物如 5-ALA 价格较贵^[19],而且不总是能够达到提高酶活的效果^[13, 21]。本文通过研究外源添加物对血红素饱和度和酶活性的关系,寻找最佳的添加剂量和廉价的添加物如谷氨酸复合铁,可为工业发酵提供理论基础。

参 考 文 献

[1] KIMS J, ISHIKAWA K, HIRAI M, et al. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 79(6): 601 – 607.

[2] SUGANO Y, ISHII Y, SHODA M. Role of H164 in a u-

- nique dye-decolorizing heme peroxidase DyP [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 322(1): 126 – 132.
- [3] DUNFORD H B. Heme Peroxidases [M]. Wiley-Ych, 1999.
 - [4] SUGANO Y, MURAMATSU R, ICHIVANAGI A, et al. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(50): 36 652 – 36 658.
 - [5] SATO T, HARA S, MATSUI T, et al. A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1; heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004, 60(1): 149 – 152.
 - [6] ZUBIETA C, KRISHNA S S, KAPOOR M, et al. Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a β -barrel fold with a conserved heme-binding motif [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2007, 69(2): 223 – 233.
 - [7] FARACO V, PISCITELLI A, SANNIA G, et al. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(6): 889 – 893.
 - [8] LAUBER C, SCHWARZ T, NGUYEN Q K, et al. Identification, heterologous expression and characterization of a dye-decolorizing peroxidase of *Pleurotus sapidus* [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 164.
 - [9] LIERS C, BOBETH C, PECVNA M, et al. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1 869 – 1 879.
 - [10] DOERGED R, DIVI R L, CHURCHWELL M I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 250(1): 10 – 17.
 - [11] RAHMANPOUR R, REA D, JAMSHIDI S, et al. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards kraft lignin and lignin model compounds [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 594: 54 – 60.
 - [12] LONCAR N, COLPA D I, FRAAIJE M W. Exploring the biocatalytic potential of a DyP-type peroxidase by profiling the substrate acceptance of *Thermobifida fusca* DyP peroxidase[J]. Tetrahedron, 2016, 72(46): 7 276 – 7 281.
 - [13] YOSHIDA T, SUGANO Y. A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 574: 49 – 55.
 - [14] AHMAD M, ROBERTS J N, HARDIMAN E M, et al. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase [J]. Biochemistry, 2011, 50(23): 5 096 – 5 107.
 - [15] MENDES S, CATARINO T, SILVEIRA C, et al. The catalytic mechanism of A-type dye-decolourising peroxidase BsDyP: neither aspartate nor arginine is individually essential for peroxidase activity [J]. Catalysis Science & Technology, 2015, 5(12): 5 196 – 5 207.
 - [16] HENDRIKS I A, VERTEGAAL A C O. A comprehensive compilation of SUMO proteomics [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016, 17(9): 581.
 - [17] COLPA D I, FRAAIJE M W. High overexpression of dye decolorizing peroxidase TfuDyP leads to the incorporation of heme *Precursor protoporphyrin IX* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 134: 372 – 377.
 - [18] 贺娟妮. 彩绘蛋白胶结材料 MALDI-TOF-MS 分析及表征研究 [D]. 西安:西北大学, 2015.
 - [19] 余波, 程安春, 汪铭书. 大肠杆菌中重组蛋白可溶性表达的研究进展及展望 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(10): 19 – 21.
 - [20] CONESA A, VAN DEN HONDEL C A, PUNT P J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 3 016 – 3 023.
 - [21] SEGURA M M, LEVIN G, MRANDA M V, et al. High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 795 – 800.
 - [22] MORAWSKI B, LIN Z, CIRINO P, et al. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* [J]. Protein Engineering, 2000, 13(5): 377 – 384.
 - [23] 张俊丽. 代谢工程改造大肠杆菌血红素合成途径生产 5-氨基乙酰丙酸 [D]. 无锡:江南大学, 2016.
 - [24] VARNADO C L, GOODWIN D C. System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 35(1): 76 – 83.
 - [25] KERY V, ELLEDER D, KRAUS J. δ -Aminolevulinate increases heme saturation and yield of human cystathionine β -synthase expressed in *Escherichia coli* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 316(1): 24 – 29.
 - [26] KRAINER F W, CAPONE S, JAGER M, et al. Optimi-

zing cofactor availability for the production of recombinant
heme peroxidase in *Pichia pastoris* [J]. Microbial Cell

Factories, 2015, 14:4.

Expression and fermentation optimization of dye-decolorizing peroxidase from *Thermobifida fusca*

ZHU Zhubing¹, SUN Yawu², TANG Lei^{1,2*}

1 (Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education (Jiangnan University), Wuxi 214122, China)

2 (School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT This study aimed to improve the catalytic ability of *Thermobifida fusca* dye-decolorizing peroxidase (TfuDyP) to degrade anthraquinone dyes. The recombinant plasmid pET-28a(+)-*TfuDyP* was transformed into *Escherichia coli* BL 21 for heterologous expression, and the fermentation conditions of recombinant TfuDyP was optimized. Additionally, the relationship between enzyme activity and heme saturation was analyzed. SDS-PAGE showed that the molecular weight of recombinant TfuDyP was 46 kDa. Moreover, induction with 0.3 mmol/L IPTG at 30 °C for 14 h was determined to be the optimal fermentation condition. Under this condition, the specific activity of TfuDyP was 27.9 U/g. Furthermore, hemin, 5-aminolevulinic acid (5-ALA), glutamic acid (Glu), FeCl₂ and MnCl₂ promoted the enzyme activity. There was a positive correlation between the increase in enzyme activity and heme saturation. Therefore, this study provides a theoretical basis for improving heme saturation by adding exogenous promoters and applying this in industrial fermentation of dye-decolorizing peroxidase.

Key words *Escherichia coli*; dye-decolorizing peroxidase; *Thermobifida fusca*; heme saturation