

基于定向进化提高漆酶的催化活性及其在造纸制浆中的应用

倪红^{1,2}, 杨凡^{1,2}, 王磊³, 李变霞^{1,2}, 李华南^{1,2}, 刘家书^{1,2}, 江正兵^{1,2}, 程万里^{1,2*}

1 湖北大学 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 湖北大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430062

3 湖北工业大学 材料与化学工程学院, 湖北 武汉 430072

倪红, 杨凡, 王磊, 李变霞, 李华南, 刘家书, 江正兵, 程万里. 基于定向进化提高漆酶的催化活性及其在造纸制浆中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 308-320.

NI Hong, YANG Fan, WANG Lei, LI Bianxia, LI Huanan, LIU Jiashu, JIANG Zhengbing, CHENG Wanli. Directed evolution improves the catalytic activity of laccase in papermaking[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 308-320.

摘要: 在造纸工业中, 漆酶作为一种生物催化剂, 已经被广泛研究和应用。然而, 天然漆酶在工业应用中存在着催化效率低、稳定性差等问题, 限制了其在制浆工艺中的应用。为了进一步开发出酶活性高, 耐受性强的漆酶, 本研究对短小芽孢杆菌属来源漆酶进行定向进化改造, 利用高通量筛选方法从随机突变体文库中筛选得到突变体 F282L/F306L、Q275P, 其比酶活分别为 280.87 U/mg、453.94 U/mg, 是野生型漆酶的 1.42 倍、2.30 倍; 突变体 Q275P 的温度稳定性有明显提升, 其在 40、50、70 °C 孵育 4 h 后的剩余酶活与野生型漆酶相比均提高了 20% 以上; 突变体 F282L/F306L 和 Q275P 相较野生型漆酶对多种金属离子和有机溶剂的耐受性增强。野生型漆酶的 K_m 值为 374.97 $\mu\text{mol/L}$, 突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的 K_m 值分别减小至 318.96 $\mu\text{mol/L}$ 和 360.71 $\mu\text{mol/L}$, 底物亲和性有所提高; F282L/F306L 和 Q275P 对底物 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]的 k_{cat} 值分别为 574.00 s^{-1} 、898.03 s^{-1} , 分别是野生型漆酶的 1.1 倍和 1.7 倍, 催化效率较高。在处理纸浆应用中, 突变体 Q275P 处理纸浆效果最好, 相比于野生型漆酶, 卡伯值降低了 0.82, 白度提高了 2.00% ISO, 抗张指数和裂断长分别提高 7.8% 和 7.2%。本研究为漆酶更好地适应造纸工业环境奠定了基础。

关键词: 漆酶; 生物漂白; 定向进化; 酶学特性; 纸浆

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0908400); 国家自然科学基金(22308093); 湖北省农业科技成果转化资金(2023BBB156)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908400), the National Natural Science Foundation of China (22308093), and the Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund of Hubei Province (2023BBB156).

*Corresponding author. E-mail: chengwl@hubu.edu.cn

Received: 2024-05-11; Accepted: 2024-07-08; Published online: 2024-07-10

Directed evolution improves the catalytic activity of laccase in papermaking

NI Hong^{1,2}, YANG Fan^{1,2}, WANG Lei³, LI Bianxia^{1,2}, LI Huanan^{1,2}, LIU Jiashu^{1,2},
JIANG Zhengbing^{1,2}, CHENG Wanli^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 School of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

3 School of Material Science and Chemical Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: As a biocatalyst, laccase has been widely studied and applied in the papermaking industry. However, the low catalytic efficiency and poor stability of natural laccase limit its application in the pulping process. To develop the laccase with high activity and strong tolerance, we carried out directed evolution for modification of the laccase derived from *Bacillus pumilus* and screened out the mutants F282L/F306L and Q275P from the random mutant library by high-throughput screening. The specific activities of F282L/F306L and Q275P were 280.87 U/mg and 453.94 U/mg, respectively, which were 1.42 times and 2.30 times that of the wild-type laccase. Q275P demonstrated significantly improved thermal stability, with the relative activity 20% higher than that of the wild-type laccase after incubation at 40 °C, 50 °C, and 70 °C for 4 h. F282L/F306L and Q275P showed greater tolerance to metal ions and organic solvents than the wild-type laccase. The K_m value of the wild-type laccase was 374.97 $\mu\text{mol/L}$, and those of F282L/F306L and Q275P were reduced to 318.96 $\mu\text{mol/L}$ and 360.71 $\mu\text{mol/L}$, respectively, which suggested that the substrate affinity of laccase was improved after mutation. The k_{cat} values of F282L/F306L and Q275P for the substrate ABTS were 574.00 s^{-1} and 898.03 s^{-1} , respectively, which were 1.1 times and 1.7 times that of the wild-type laccase, indicating the improved catalytic efficiency. Q275P demonstrated better performance than the wild-type laccase in pulping, as manifested by the reduction of 0.82 in the Kappa number and the increases of 2.00% ISO, 7.8%, and 7.2% in whiteness, tensile index, and breaking length, respectively. This work lays a foundation for improving the adaptation of laccase to the environment of the papermaking industry.

Keywords: laccase; biobleaching; directed evolution; enzymatic characteristics; paper pulp

在造纸应用研究中,漆酶单独或与其他酶联合作用能将木质素碎裂成较小分子量的可溶性化合物和亚基,因此被广泛地应用于制浆和造纸工业^[1]。传统的制浆工艺有机械法和化学法,前者耗能较高且不能去除木质素;后者虽耗能减少、纤维量降低,但对环境不友好。相较之下,生物制浆具有清洁、温和的特性^[2]。

漆酶催化不同类型底物的氧化反应机理主要表现为底物自由基中间体的生成,分子氧在漆酶对底物进行催化作用的同时,又被还原为水。在这个过程中,漆酶会从被氧化的底物分子中提取 1 个电子,在聚合和解聚之前产生一种不稳定的自由基^[3]。当有氧时,氧被漆酶还原成水。这一催化氧化过程只需要空气中的氧气,

反应副产物只有水,对纤维没有损伤,同时对环境也不会产生二次污染^[4]。因此,漆酶在制浆^[5]、漂白^[6]、脱墨^[7]、废水处理、纤维改性^[8]等方面的应用越来越多,在造纸业具有很好的发展前景^[9]。

现有的天然漆酶普遍存在催化效率低、稳定性差等问题,限制了其在制浆工艺中的应用。通过酶分子的定向进化技术可以较好地解决这一问题,酶分子的定向进化属于蛋白质的非理性设计^[10],不需要了解酶蛋白的结构、活性位点和催化机制等信息^[11],而是通过在体外模拟自然进化机制(随机突变、基因重组、自然选择),使基因发生突变,并通过特异的方法筛选得到具有某些预期特征的突变酶。2009年,Koschorreck等^[12]为了提高地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) CotA 漆酶在大肠杆菌中的活性表达水平,对其采用了随机和定点突变相结合的改造方法,利用易错 PCR 技术构建突变体文库并筛选了 6 000 个突变体,发现突变体 K316N 和 D500N 相较于野生型,对 2,2'-联氨-双二胺盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]的催化活性均提高了 2 倍以上;构建的突变体 D500G 相较于野生型对底物 ABTS 的催化活性提高了 5.4 倍;随后将 K316N 和 D500G 组合形成双突变体 K316N/D500G,发现双突变体 K316N/D500G 的表达水平比野生型高 11.4 倍,显著提高了其在阿魏酸的转换和工业染料的脱色方面的效率。2010年,Gupta 等^[13]采用定向进化的方法提高枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CotA 漆酶对底物 ABTS 的专一性,最终获得的突变体 CotA-ABTS-SD1 对 ABTS 的专一性是野生型的 120 倍。

本研究通过易错 PCR 方法构建了短小芽孢杆菌属来源漆酶的突变体文库,筛选得到突变体 F282L/F306L 和 Q275P,与野生型漆酶相比,

其催化活性、底物亲和性和温度稳定性更好,对多种金属离子和有机溶剂的耐受性更高,对纸浆处理后其脱木素能力更强,在制浆工艺应用方面具有很好的应用前景。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒和试剂

短小芽孢杆菌属来源漆酶的表达载体重组质粒 pET28a(+)-lac 为本实验室构建并保存^[14](GenBank 登录号:MW373470)、毕赤酵母表达菌株 X33 为本实验室保存。无缝克隆试剂盒和 DNA 聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。SteadyPure 质粒提取试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。GeneMorph II Random Mutagenesis Kit 购自安捷伦科技有限公司。酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)、LB 培养基、复合诱导培养基(buffered methanol-complex medium, BMMY)参照宝生物工程(大连)有限公司操作手册配制。本研究所用的化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

底物筛选平板(100 mL): 1 g 酵母提取物, 2 g 蛋白胨, 1.34 g YNB, 1.5 g 琼脂, ABTS 终浓度为 1 mmol/L。

1.2 易错 PCR

以重组质粒 pET28a(+)-lac 为模板,设计 N 端含有 EcoR I 酶切位点的上游引物 Lac-F (5'→3'): GCTGAATTCATGAACCTAGAAAAATTTG; 设计 C 端带有 Xba I 酶切位点的下游引物 Lac-R (5'→3'): GTTCTAGAGAAATAATATCCATCGGCCG。易错 PCR 反应体系(50 μL): 41.5 μL 双蒸水, 5 μL 10×Mutazyme II Reaction Buffer, 1 μL 40 mmol/L dNTP Mix, 0.25 μL 上游引物和 0.25 μL 下游引物(浓度均为 250 ng/μL), 1 μL 模板 DNA

(浓度为 172 ng/ μ L), 1 μ L Mutazyme II DNA polymerase。易错 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 突变体文库构建与筛选

易错 PCR 结束后, 取 3 μ L 的 PCR 产物于 0.7%琼脂糖凝胶进行电泳验证, 将条带大小正确的样品进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 使用 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。使用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xba* I 对空载质粒 pPICZ α A 在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行双酶切 3 h, 并进行目的条带回收, 使用 ClonExpress II 试剂盒将易错 PCR 产物与空载 pPICZ α A 双酶切产物进行连接。将连接产物通过热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含博来霉素抗性(25 μ g/mL)的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜至单菌落长出。挑选平板上长出的所有单菌落于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 12 h 后提取质粒, 使用 *Sac* I 线性化后进行胶回收, 取 5 μ L 回收产物电转至 100 μ L 毕赤酵母 X33 感受态中, 涂布于含博来霉素抗性的 YPD 平板, 可以重复电转, 平板上长出的菌落即为突变菌株文库。使用灭菌后的牙签将电转后平板上长出的单菌落挑至 YPD 平板保菌, 同时将牙签上剩余的菌落挑至底物筛选平板, 加 20 μ L 甲醇于倒置后平板的底部, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 在每个筛选平板上加上野生型漆酶菌落。在漆酶的作用下, ABTS 会被氧化生成 ABTS 自由基阳离子, 在碱性环境下, 颜色为紫色, 根据平板上菌落显色情况挑选出阳性菌落。将初筛结果中的阳性转化子继续挑至底物筛选平板, 复筛后显色的突变体接至 YPD 液体培养基, 然后在 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 12 h 左右, 测 OD_{600} 数值, 用无菌水调至相同的 OD_{600} 数值, 吸取 2 μ L 菌液于底物筛选平板, 倒置后加 20 μ L 甲醇于平

板的底部, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 1 d 左右, 用尺子测量显色圈直径的大小, 挑选出比野生型漆酶显色圈大的转化子进行小体系培养, 0.5%甲醇诱导 5 d 后, 取上清进行蛋白纯化, 检测其酶活性, 选择活性高于野生型漆酶的转化子提取酵母基因组 DNA 并测序。

1.4 目的蛋白的纯化

将诱导表达后的菌液离心收集上清即为粗酶液, 用镍离子亲和层柱得到纯酶, 纯化后的目的蛋白用 SDS-PAGE 进行蛋白纯度的检测。

1.5 漆酶活性和蛋白含量测定

25 $^{\circ}$ C 条件下, 反应体系为 1 mL, pH 5.0, 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 底物浓度的 ABTS [$\epsilon=36\ 000\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$], 稀释后的纯化蛋白酶液 5 μ L, 通过 OD_{420} 处的吸光度数值变化判断其漆酶活性, 每组重复 3 次。

酶活力单位定义: 在相同条件下, 每分钟氧化 1 μ mol ABTS 所需要的酶量。

蛋白含量测定: 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 使用 Bradford 方法测定目的蛋白的浓度。

1.6 漆酶性质测定

酶动力学参数: 在 25 $^{\circ}$ C、pH 5.0, 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液条件下, 以不同浓度梯度的 ABTS 作为反应底物, 得到其不同底物浓度下酶的反应速率, 酶的反应动力学参数通过作双倒数 Lineweaver-Burk 图计算, 得出 K_m 和 k_{cat} 值, 计算野生型漆酶和突变体的 k_{cat}/K_m 。

最适温度: 在 30–90 $^{\circ}$ C 温度范围内, 每 10 $^{\circ}$ C 为一个梯度设 3 个平行, 将野生型漆酶和突变体与 0.5 mmol/L ABTS 反应, 测定其不同温度下的酶活, 以最高的酶活力为 100%, 从而确定野生型漆酶和突变体的最适温度。

温度稳定性: 分别将野生型漆酶和突变体在 50 mmol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液

(pH 8.0), 30–80 °C范围下进行孵育, 孵育 2 h、4 h 后分别取样测酶活, 将未孵育时 0 h 的酶活力定义为 100%, 计算在 30–80 °C范围内漆酶孵育后的相对剩余活性, 绘制曲线。

最适 pH: 在 25 °C条件下使用不同的 pH 梯度, 将野生型漆酶和突变体与 0.5 mmol/L ABTS 反应, 测定其不同 pH 下的酶活, 以最高的酶活力为 100%, 从而确定野生型漆酶和突变体的最适 pH。

pH 稳定性: 分别将野生型漆酶和突变体在 25 °C、pH 3.0–10.0 的缓冲液中进行孵育, 孵育 2 h、4 h 后分别取样在最适 pH 条件下测酶活, 将未孵育时 0 h 的酶活力定义为 100%, 计算在 pH 3.0–10.0 范围内漆酶孵育后的相对剩余活性, 绘制曲线。

金属离子对漆酶活性的影响: 共选择了 12 种金属离子, 分别为 Na⁺、Mg²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Ni²⁺、Cu²⁺和 Pb²⁺; 在 pH 5.0 条件下, 以 ABTS 为底物, 分别测定终浓度为 10 mmol/L 和 25 mmol/L 金属离子对野生型漆酶和突变体催化活性的影响, 以没有添加任何金属离子的条件下漆酶的相对活性为 100%。

有机溶剂对漆酶活性的影响: 在 pH 5.0 条件下, 以 ABTS 为底物, 分别测定二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、丁醇、异丙醇、乙腈和 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamid, DMF)共 5 种有机试剂在 20%和 40%两种浓度下对野生型漆酶和突变体催化活性的影响, 以没有添加任何有机溶剂处理的条件下漆酶的相对活性为 100%。

1.7 纸浆处理流程

将杨木纸浆加入纯水后用手分散浆料, 混合均匀, 置于 55 °C烘箱烘干水分, 称量 3 g 的浆料放入 500 mL 摇瓶中, 加入 100 mL pH 7.0 的缓冲液, 60 μg 酶用量, 酶液与浆料在摇瓶

中混匀, 放入 50 °C摇床中反应 12 h。到达反应时间后立即放入 80 °C水浴锅中灭活 5 min, 然后用自来水对处理好的浆料进行充分冲洗, 放入 55 °C烘箱烘干水分。称取酶处理好的浆料 2.88 g, 加入纯水后用纤维标准解离器进行纸浆梳理, 达到 20 000 r/min 后取出用于后续实验。利用凯塞快速纸页成型器抄造定量为 80 g/m² 的手抄纸, 取出后在 105 °C下高温高压下烘干 10 min, 抄好的纸样可用于后续测定。

1.8 纸浆性能测定

将手抄纸放入恒温恒湿实验室[温度(23±1) °C, 相对湿度(50±2)%] 24 h 后, 在实验室中按标准方法测定纸张的各项物理强度。纸浆卡伯值按照国标 GB/T 1546—2018 法测定; 撕裂指数测定依据标准 GB/T 455—2002 测定; 抗张指数和裂断长测定依据标准 GB/T 453—2002 测定。纸浆白度用白度分析仪(YQ-Z-48A)测定。

1.9 同源建模与分子对接

利用在线网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)对野生型漆酶、突变体 F282L/F306L 和 Q275P 进行同源建模, 利用软件 AutoDock 分别将野生型漆酶、突变体 F282L/F306L 和 Q275P 与底物 ABTS 对接, 利用 PyMOL 辅助查看并分析蛋白结构。

1.10 数据分析

利用 SPSS 19.0 软件对数据开展统计分析, 图表中数据显示为 mean±SD, 每个实验重复 3 次, 并使用 Origin 8.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 漆酶突变体的筛选

以含有短小芽孢杆菌属来源漆酶基因的质粒 pPICZαA-lac 为模板进行易错 PCR, 将 PCR 扩增产物和质粒 pPICZαA 酶切产物连接后, 转入毕赤酵母 X33 中。获得随机突变基因表达文

库后, 将得到的突变体库接种至底物显色筛选平板, 以野生型漆酶作为对照, 经过初筛和复筛共得到 184 个显色突变体, 将复筛的阳性转化子接至 YPD 培养基摇好后, 调至相同的 OD_{600} , 吸取 2 μL 菌液于底物筛选平板, 测量显色圈直径的大小并挑选出显色圈直径大于野生型漆酶的, 得到 47 个显色突变体, 部分筛选结果如图 1 所示。

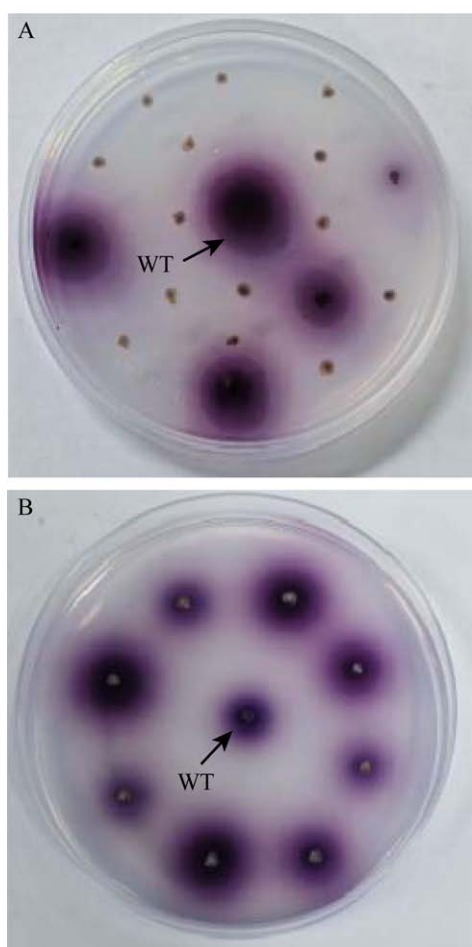


图 1 底物平板筛选图 A: 底物平板初步筛选突变体; B: 底物平板最后一轮筛选突变体。WT 表示野生型漆酶。

Figure 1 Substrate plate screening diagram. A: Substrate plate preliminary screening of mutants; B: Substrate plate final screening of mutants. WT stands for wild-type laccase.

2.2 突变体的序列分析和酶活比较

对底物筛选平板中显色圈较大的 47 个突变体, 进一步进行小体系培养和诱导表达, 收集粗酶液后利用镍柱分别对其进行纯化, 对纯化后的野生型漆酶和突变体进行酶活力的测定, 其中有 2 个漆酶突变体的酶活力要比野生型漆酶高, 其纯化后样品的 SDS-PAGE 结果如图 2 所示, 目的条带分子质量大小为 70 kDa 左右, 与理论大小一致。

为了测定酶活力较高的两个突变体的蛋白序列, 对其基因进行 PCR 扩增测序。利用 ESPrift 3.0 对突变体与野生型漆酶进行氨基酸序列比对, 结果如图 3 所示, 其中突变菌株 1 在第 282 位和第 306 位均由苯丙氨酸(F)变为亮氨酸(L), 该突变体命名为 F282L/F306L; 突变体 2 在第 275 位由谷氨酰胺(Q)变成脯氨酸(P), 该突变体命名为 Q275P。

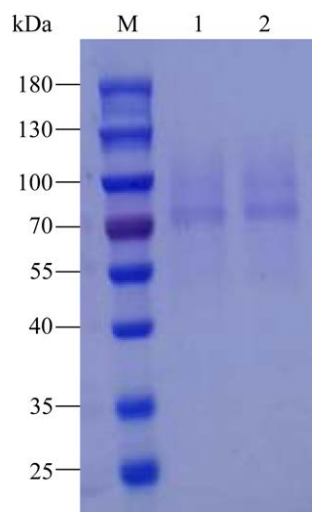


图 2 突变体在毕赤酵母 X33 中的纯化结果 泳道 M: 蛋白质分子量标准; 泳道 1: 纯化后的漆酶突变体 1; 泳道 2: 纯化后的漆酶突变体 2。

Figure 2 Purification results of laccase mutants in *Pichia pastoris* X33. Lane M: Protein molecular weight standard; Lane 1: Purified laccase mutant 1; Lane 2: Purified laccase mutant 2.

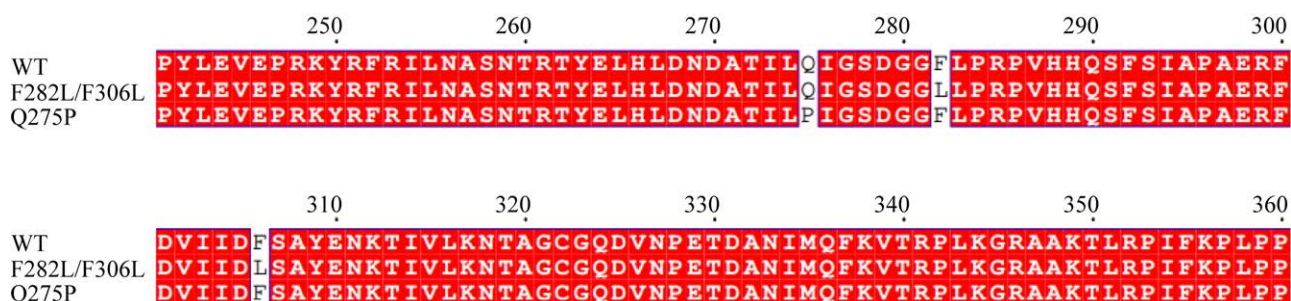


图3 野生型漆酶和突变体的氨基酸序列比对

Figure 3 Amino acid sequences comparison between wild-type laccase and mutants.

根据 Bradford 方法测定纯化后野生型漆酶和突变体的蛋白浓度,并检测其酶活。野生型漆酶和突变体的蛋白浓度和酶活如表 1 所示,野生型漆酶的比酶活为 197.58 U/mg,而突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的比酶活分别为 280.87 U/mg 和 453.94 U/mg,结果显示突变体 F282L/F306L、Q275P 的比酶活分别是野生型漆酶的 1.42 倍、2.30 倍。

2.3 最适反应温度及温度稳定性分析

如图 4 所示,在 30–70 °C 温度范围内,野生型漆酶和突变体都是随着温度升高,相对酶活也不断升高;野生型漆酶和突变体 Q275P 的最适温度为 80 °C,突变体 F282L/F306L 的最适温度为 70 °C。漆酶的温度稳定性结果如图 5 所示,野生型漆酶和突变体对高温并不耐受,在中低温条件下有较好的温度稳定性,在 30–60 °C 范围内孵育 4 h 后剩余酶活仍在 60% 以上。在 40–60 °C,突变体 Q275P 孵育 2 h 和 4 h 后的剩

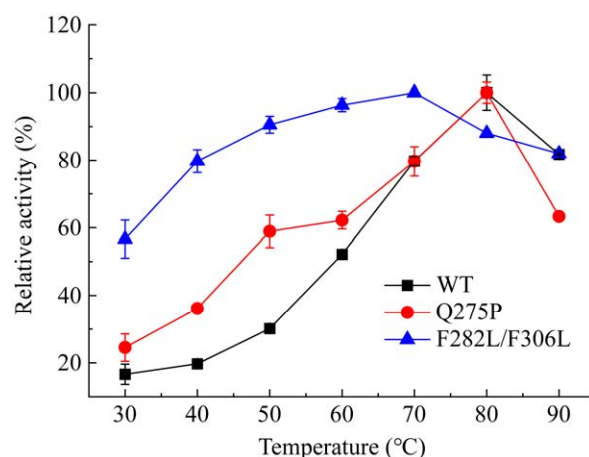


图4 突变体和野生型漆酶最适温度

Figure 4 The optimum temperature for wild-type laccase and mutants.

余酶活均比野生型漆酶有一定的提高,突变体 Q275P 在 40 °C、50 °C、70 °C 孵育 4 h 后的剩余酶活均比野生型漆酶提高了 20% 以上。

2.4 最适反应 pH 及 pH 稳定性

如图 6 所示,野生型漆酶的最适 pH 为 4.0,突变体 Q275P 的最适 pH 为 4.0,突变体 F282L/F306L 的最适 pH 为 5.0。野生型漆酶和突变体在碱性环境下的酶活较低。漆酶的 pH 稳定性结果如图 7 所示,野生型漆酶和突变体在碱性环境下比在酸性环境下更稳定,野生型漆酶和突变体在中性到碱性的 pH 值条件下均有较好的耐受力;在 pH 值 7.0–10.0 范围内孵育 2 h,其剩余酶活均在 60% 以上;在 pH 值 7.0–10.0 范围

表 1 野生型漆酶和突变体纯化后酶活比较

Table 1 Comparison of enzyme activity between wild-type laccase and mutants after purification

Protein	Enzyme activity (U/mL)	Protein content (mg/mL)	Specific activity (U/mg)
Wild-type	50.42±1.20	0.25±0.01	197.58±9.78
F282L/F306L	68.64±1.43	0.24±0.01	280.87±12.52
Q275P	97.13±1.62	0.21±0.01	453.94±13.31

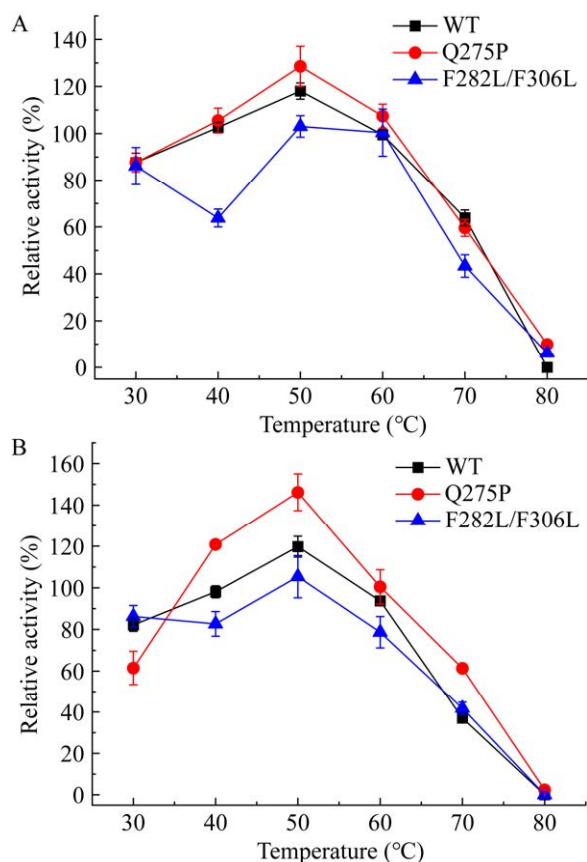


图5 突变体和野生型漆酶的温度稳定性 A: 孵育 2 h 后温度稳定性; B: 孵育 4 h 后温度稳定性。
Figure 5 Temperature stability of wild-type laccase and mutants. A: Temperature stability after 2 h incubation; B: Temperature stability after incubation for 4 h.

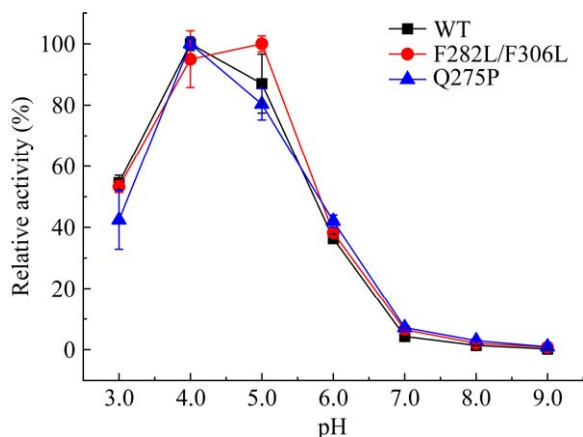


图6 突变体和野生型漆酶的最适 pH
Figure 6 The optimum pH for wild-type laccase and mutants.

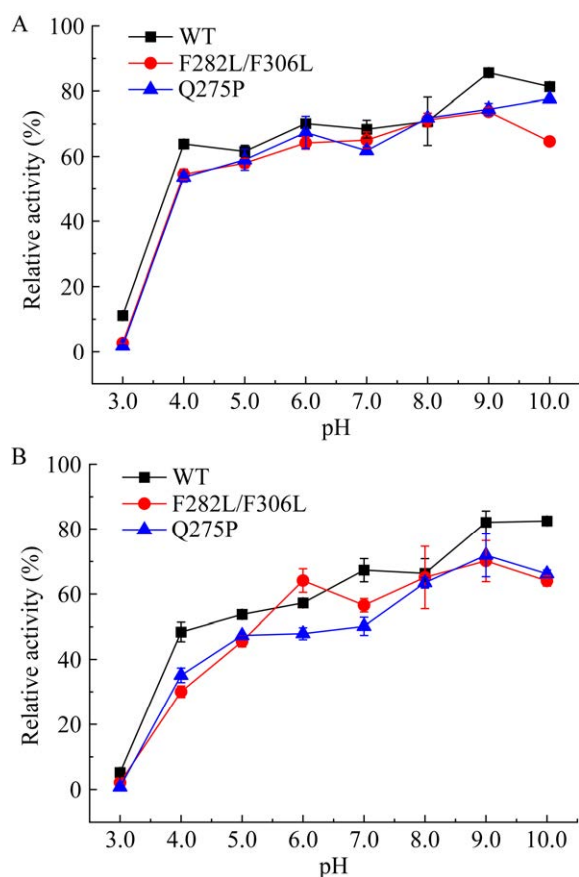


图7 突变体和野生型漆酶的 pH 稳定性 A: 孵育 2 h 后 pH 稳定性; B: 孵育 4 h 后 pH 稳定性。
Figure 7 The pH stability of wild-type laccase and mutants. A: The pH stability after 2 h incubation; B: The pH stability after incubation for 4 h.

内孵育 4 h, 其剩余酶活均在 40% 以上。野生型漆酶和突变体在不同 pH 条件下的稳定性没有明显差异。

2.5 金属离子对酶活性的影响

不同金属离子对漆酶活性的影响结果如图 8 所示, 加入 10 mmol/L Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 后, 突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的相对酶活均高于野生型漆酶; 加入 25 mmol/L Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^+ 后, 突变体 Q275P 的相对酶活均高于野生型漆酶, 野生型漆酶在 25 mmol/L

Fe^{3+} 失去活性, 突变体 F282L/F306L 和 Q275P 在 25 mmol/L Fe^{3+} 中的相对酶活为 20%左右。说明突变体相较于野生型漆酶, 对许多金属离子的耐受性有所提高。但突变体和野生型漆酶在 10 mmol/L 和 25 mmol/L Fe^{2+} 的环境下均没有活

性, 这可能是因为 Fe^{2+} 占据了底物与酶结合的位点, 改变了酶的构象。

2.6 有机溶剂对酶活性的影响

不同有机溶剂对漆酶活性的影响结果如图 9 所示, 分别添加 DMSO、丁醇、异丙醇、乙腈

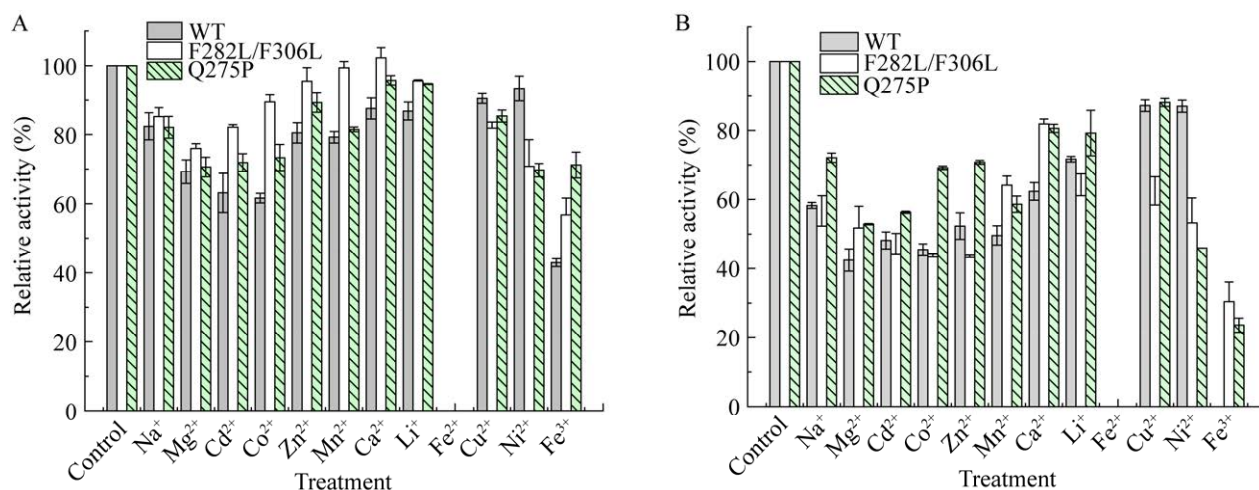


图 8 不同金属离子对野生型漆酶和突变体催化活力的影响 A: 10 mmol/L 金属离子的影响; B: 25 mmol/L 金属离子的影响。

Figure 8 Effects of different metal ions on the catalytic activity of wild-type laccase and mutants. A: The effect of 10 mmol/L metal ions; B: The effect of 25 mmol/L metal ions.

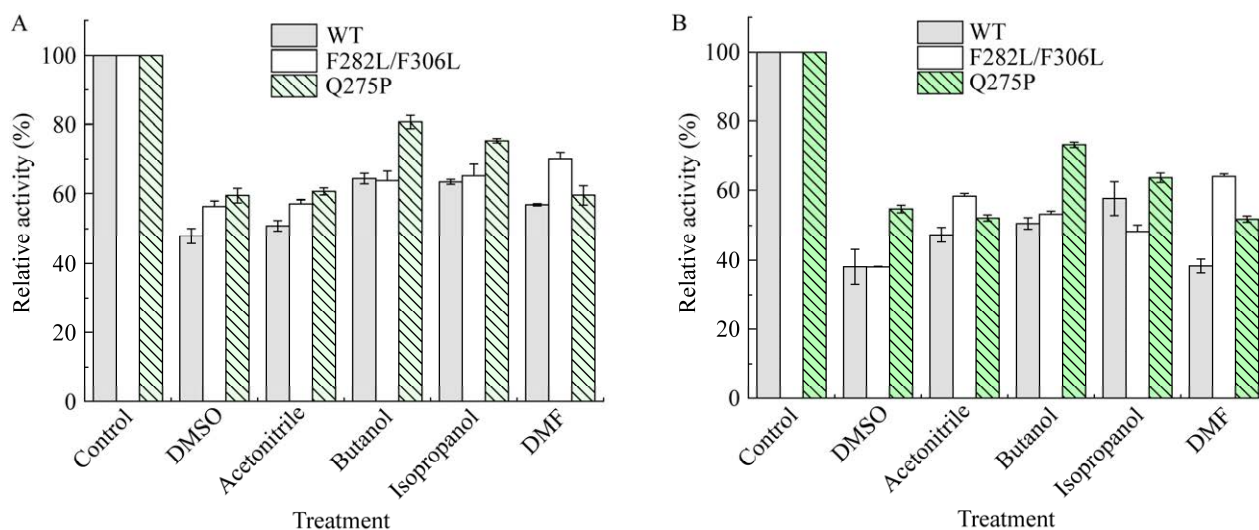


图 9 不同有机溶剂对野生型漆酶和突变体催化活力的影响 A: 20%不同有机溶剂的影响; B: 40%不同有机溶剂的影响。

Figure 9 Effects of different organic solvents on catalytic activity of wild-type laccase and mutants. A: Effects of 20% different organic solvents; B: Effects of 40% different organic solvents.

和 DMF 等有机溶剂后,野生型漆酶和突变体酶活均随着有机溶剂浓度的升高而下降,这表明这 5 种有机溶剂对于野生型漆酶和突变体的酶活有明显的抑制作用。在有机溶剂存在的条件下,突变体酶活基本都高于野生型漆酶酶活,突变体 Q275P 在 40% DMSO、丁醇存在条件下,相对酶活分别比野生型漆酶酶活高 16%、23%;突变体 F282L/F306L 在 40%DMF 存在下,相对酶活比野生型漆酶酶活高 25%。

2.7 漆酶动力学参数

突变体和野生型漆酶的酶动力学参数结果如表 2 所示,突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的 K_m 值相较于野生型漆酶小,表明这两种突变体与 ABTS 底物的亲和性更好。突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的 k_{cat} 值相较于野生型漆酶增大,表明突变体 F282L/F306L 和 Q275P 对 ABTS 底物的催化效率相较于野生型漆酶均有所提高,突变体漆酶 F282L/F306L 和 Q275P 对于底物 ABTS 的催化效率分别是野生型的 1.1 倍和 1.7 倍;突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的 k_{cat}/K_m 值相较于野生型漆酶增大,表明突变体 F282L/F306L 和 Q275P 较野生型漆酶对底物 ABTS 的专一性增强,突变体 F282L/F306L 和 Q275P 对于底物 ABTS 的专一性分别是野生型的 1.3 倍和 1.8 倍。

2.8 漆酶突变体的结构模拟分析

为了进一步分析突变体 F282L/F306L 和 Q275P 与野生型漆酶的活性差异,对野生型漆酶、突变体 F282L/F306L 和 Q275P 进行同源建

模,并与底物 ABTS 对接,结果如图 10 所示,突变体 Q275P 将第 275 位的谷氨酰胺替换为脯氨酸,氨基酸替换前后该处的分子量变小,在一定程度上减少了空间位阻,加速电子转移来提高酶的催化效率,同时增加该区域的可变化程度,促进酶与底物两者之间的结合;突变体 F282L/F306L 的第 282 位和第 306 位带有苯环结构的苯丙氨酸变为无苯环结构的亮氨酸,苯环结构的去除使得侧链变短,使得酶与底物接触的阻碍作用减少,因此底物易于进入活性口袋内。突变体 F282L/F306L、Q275P、野生型漆酶与底物 ABTS 的结合能分别为-6.24、-6.10 和 -5.72 kcal/mol,突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的结合能比野生型漆酶低,表明 F282L/F306L 和 Q275P 与底物 ABTS 的结合比野生型漆酶的稳定,而 Q275P 结合能的最低,表明它与 ABTS 的结合最稳定。突变体 F282L/F306L、Q275P 和野生型漆酶的氢键的数量分别为 3、3、2,而氨基酸残基的数量为 3、3、2。突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的氢键的数量以及氨基酸残基的数量比野生型漆酶多,表明突变体 F282L/F306L 和 Q275P 与 ABTS 结合能力比野生型漆酶更稳定,这些结果可以解释前期研究中突变体相较于野生型漆酶有更强的底物亲和力和更高的催化活性的原因。

2.9 漆酶突变体在纸浆工艺中的应用效果

不同漆酶处理纸浆效果如表 3 所示,相较于野生型漆酶,突变体 F282L/F306L 和 Q275P 单独处理纸浆后,卡伯值分别降低了 0.75、0.82,说明突变体 F282L/F306L 和 Q275P 比野生型漆酶具有更好的降解杨木纸浆木质素效果;白度分别提高了 1.49% ISO、2.00% ISO,突变体 F282L/F306L 和 Q275P 表现出比野生型漆酶更好的漂白效果。综上所述,突变体 F282L/F306L

表 2 以 ABTS 为底物的漆酶动力学参数的比较
Table 2 Comparison of kinetic parameters of laccase using ABTS as substrate

Protein	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$)
Wild-type	374.97	519.03	1.38
F282L/F306L	318.96	574.00	1.80
Q275P	360.71	898.03	2.49

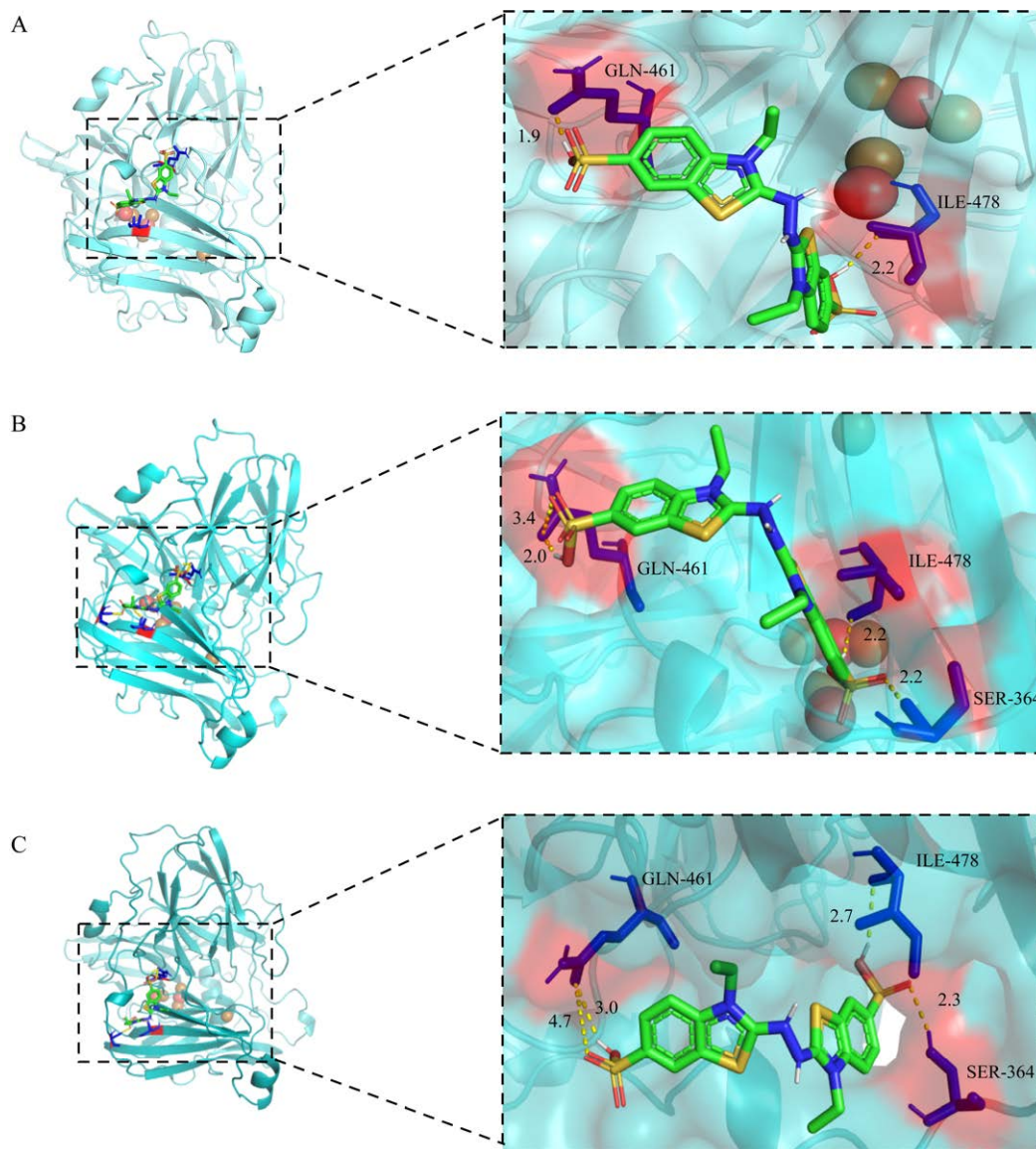


图 10 野生型漆酶和突变体与底物对接的三维结构模拟 A: 野生型漆酶的分子对接分析; B: 突变体 Q275P 的分子对接分析; C: 突变体 F282L/F306L 的分子对接分析。

Figure 10 Three-dimensional structure simulation of wild-type laccase and mutants docking with substrate. A: Molecular docking analysis of wild-type laccase; B: Molecular docking analysis of Q275P; C: Molecular docking analysis of F282L/F306L.

和 Q275P 比野生型漆酶具有更强的脱木质素能力和更好的纸浆漂白效果可能是由于突变体 F282L/F306L 和 Q275P 的比酶活比野生型漆酶高。

同时检测了不同漆酶处理对纸浆物理性质的影响, 结果如表 4 所示, 相较于野生型漆酶

作用于杨木纸浆, 突变体 F282L/F306L 处理纸浆后其撕裂指数、抗张指数和裂断长分别提高 1.5%、3.0%、3.1%, 突变体 Q275P 处理纸浆后其抗张指数和裂断长分别提高 7.8%和 7.2%, 表明与野生型漆酶相比, 突变体 F282L/F306L 和

表3 不同漆酶处理纸浆的效果

Table 3 Effect of different laccase treatment on pulp

Enzymes (systems)	Reducing sugar content (mg/mL)	Kappa number	Whiteness (% ISO)
Blank	0.010±0.016	9.57±0.48	35.24±0.36
Wild-type	0.037±0.005	8.16±0.35	37.73±0.05
F282L/F306L	0.025±0.012	7.41±0.27	39.22±0.20
Q275P	0.025±0.028	7.34±0.22	39.73±0.04

表4 不同漆酶处理对纸浆物理性质的影响

Table 4 Effect of different laccase treatments on physical properties of pulp

Enzymes (systems)	Tear index (mN/(m ² ·g))	Tensile index (N/(m·g))	Breaking length (km)
Blank	4.17±0.19	13.21±0.27	0.88±0.01
Wild-type	5.13±0.18	14.58±0.61	0.97±0.04
F282L/F306L	5.21±0.21	15.02±0.34	1.00±0.02
Q275P	4.94±0.24	15.72±0.35	1.04±0.02

Q275P 处理杨木纸浆后可以提高纸浆纤维的物理强度,可能是由于突变体作用下使更多的微细纤维暴露出来,纤维之间的结合力进一步加强。

3 讨论与结论

造纸工业作为全球范围内面临严峻环境挑战的行业之一,其生产过程中产生的污染物对环境造成了严重影响。漆酶作为一种环境友好型的生物催化剂^[15],其在制浆造纸中的应用不仅可以提高造纸过程的生产效率,同时也减少了能源消耗和环境污染^[16],为实现可持续发展和绿色生产提供了可行方案。但是现有漆酶在实际应用中存在一些缺陷:首先,漆酶的降解效率有限,仍有待提高;其次,漆酶的稳定性不足,在高温和酸碱等极端条件下的稳定性较差^[17],容易受到外界环境的影响而失去活性;这些因素限制了漆酶在造纸工业生产中的应用。通过定向进化技术对天然漆酶进行改造,使其具有优良的催化活性^[18]、温度耐受性和酸碱耐受性^[19],可以提高漆酶在纸浆应用方面的

优势^[3,10,20]。目前,关于通过定向进化手段改造天然漆酶以适应其在制浆造纸工业中的应用研究较少,具有较好的研究价值和应用意义。

本研究通过对短小芽孢杆菌属来源的漆酶进行定向进化改造,利用高通量筛选方法从随机突变体文库中成功筛选得到2个催化活性更高的漆酶突变体 F282L/F306L、Q275P。突变体 F282L/F306L、Q275P 的酶学性能有所提高,具有更好的温度稳定性和底物亲和力,对多种金属离子和有机溶剂的耐受性更大;并通过结构模拟和分子对接在结构上分析了突变体 F282L/F306L 和 Q275P 比野生型漆酶具有更好活性和耐受性的原因;同时在纸浆处理应用中,突变体 F282L/F306L、Q275P 较野生型漆酶具有更好的脱木质素能力和更好的漂白效果,并提高了纸张的物理性质,表现出很好的应用潜力。

综上,相较于天然漆酶,漆酶突变体 F282L/F306L、Q275P 的酶活力、温度稳定性、底物亲和力等酶学性质以及纸浆处理的效果均有所提高,为漆酶更好地适应工业环境奠定了基础。

REFERENCES

- [1] SINGH D, GUPTA N. Microbial laccase: a robust enzyme and its industrial applications[J]. *Biologia*, 2020, 75(8): 1183-1193.
- [2] Shradha, SHEKHER R, SEHGAL S, KAMTHANIA M, KUMAR A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications[J]. *Enzyme Research*, 2011, 2011: 217861.
- [3] JANUSZ G, PAWLIK A, ŚWIDERSKA-BUREK U, POLAK J, SULEJ J, JAROSZ-WILKOŁAZKA A, PASZCZYŃSKI A. Laccase properties, physiological functions, and evolution[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 966.
- [4] PRINS A, KLEINSMIDT L, KHAN N, KIRBY B, KUDANGA T, VOLLMER J, PLEISS J, BURTON S, Le ROES-HILL M. The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 68: 23-32.
- [5] FONSECA MI, FARIÑA JI, CASTRILLO ML, RODRÍGUEZ MD, NUÑEZ CE, VILLALBA LL,

- ZAPATA PD. Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispora* BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 90: 29-35.
- [6] SINGH G, AHUJA N, BATISH M, CAPALASH N, SHARMA P. Biobleaching of wheat straw-rich soda pulp with alkalophilic laccase from gamma-proteobacterium JB: optimization of process parameters using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16): 7472-7479.
- [7] BALDA S, SHARMA A, GUPTA N, CAPALASH N, SHARMA P. Deinking of old newsprint (ONP) pulp with an engineered laccase: a greener approach for paper recycling[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024, 14(3): 3965-3974.
- [8] CHANDRA RP, LEHTONEN LK, RAGAUSKAS AJ. Modification of high lignin content kraft pulps with laccase to improve paper strength properties. 1. laccase treatment in the presence of gallic acid[J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(1): 255-261.
- [9] SINGH G, ARYA SK. Utility of laccase in pulp and paper industry: a progressive step towards the green technology[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 1070-1084.
- [10] MATE DM, ALCALDE M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 25-40.
- [11] SEN S, VENKATA DASU V, MANDAL B. Developments in directed evolution for improving enzyme functions[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 143(3): 212-223.
- [12] KOSCHORRECK K, SCHMID RD, URLACHER VB. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis[J]. BMC Biotechnology, 2009, 9: 12.
- [13] GUPTA N, FARINAS ET. Directed evolution of *CotA* laccase for increased substrate specificity using *Bacillus subtilis* spores[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2010, 23(8): 679-682.
- [14] LIU JS, CHEN JH, ZUO KJ, LI HN, PENG F, RAN QP, WANG R, JIANG ZB, SONG HT. Chemically induced oxidative stress improved bacterial laccase-mediated degradation and detoxification of the synthetic dyes[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 226: 112823.
- [15] MAYER AM, STAPLES RC. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. ChemInform, 2002, 33(42): 256.
- [16] SU J, FU J, WANG Q, SILVA C, CAVACO-PAUL A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 294-307.
- [17] VISWANATH B, RAJESH B, JANARDHAN A, KUMAR AP, NARASIMHA G. Fungal laccases and their applications in bioremediation[J]. Enzyme Research, 2014, 2014(1): 163242.
- [18] BU TL, YANG R, ZHANG YJ, CAI YT, TANG ZZ, LI CL, WU Q, CHEN H. Improving decolorization of dyes by laccase from *Bacillus licheniformis* by random and site-directed mutagenesis[J]. PeerJ, 2020, 8: e10267.
- [19] SHENG SL, JIA H, TOPIOL S, FARINAS ET. Engineering *CotA* laccase for acidic pH stability using *Bacillus subtilis* spore display[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(3): 507-513.
- [20] FESTA G, AUTORE F, FRATERNALI F, GIARDINA P, SANNIA G. Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008, 72(1): 25-34.