

特异腐质霉角质酶-锚定肽融合蛋白的特性及在处理再生纸胶黏物中的应用

李光耀^{1,2,3}, 刘展志^{1,2,3}, 张颖^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 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

3 江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

李光耀, 刘展志, 张颖, 吴敬. 特异腐质霉角质酶-锚定肽融合蛋白的特性及在处理再生纸胶黏物中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(1): 207-216.

LI GY, LIU ZZ, ZHANG Y, WU J. Characterization of *Humicola insolens* cutinase-tachystatin A2 fusion protein and its application in treatment of recycled paper stickies. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 207-216.

摘要: 随着森林木材资源的减少, 废纸回收利用越来越受到人们的重视。然而, 废纸回收利用过程中产生的胶黏物会对再生纸的生产造成严重影响。生物法控制胶黏物主要是通过酶断裂胶黏物组分之间的酯键, 防止胶黏物的絮凝, 具有高效、专一、无污染等优势。角质酶是一种丝氨酸酯酶, 可降解胶黏物中的部分成分。相关研究表明, 锚定肽 tachystatin A2 (TA2) 具有结合聚氨酯的能力。本研究选取特异性腐质霉 *Humicola insolens* 来源的角质酶 HiC, 通过大引物全质粒扩增法成功构建了融合蛋白 HiC-TA2, 并研究了酶学性质以及对胶黏物模式底物聚丙烯酸乙酯 (PEA) 的降解效率。结果表明, HiC-TA2 对 PEA 的降解效率是 HiC 的 1.5 倍, 其 PEA 粒径减小值是 HiC 的 6.8 倍, 产物乙醇的生成量是 HiC 的 1.4 倍。证明 TA2 有助于提高 HiC 对 PEA 的降解效率。本研究可为生物法控制再生纸生产过程中产生的胶黏物提供有益的参考。

关键词: 胶黏物; 角质酶; 锚定肽; 聚丙烯酸乙酯

Received: January 11, 2021; **Accepted:** March 29, 2021; **Published online:** April 15, 2021

Supported by: National Key R&D Program of China (2019YFA0706900); Jiangsu Provincial Science and Technology Department Policy Guidance Program-International Cooperation Projects-Innovation Cooperation Project of "B&R" (BZ2020010)

Corresponding author: WU Jing. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0706900); 江苏省科技厅政策引导类计划 (国际科技合作/港澳台科技合作)——“一带一路”创新合作项目 (BZ2020010)

Characterization of *Humicola insolens* cutinase-tachystatin A2 fusion protein and its application in treatment of recycled paper stickies

LI Guangyao^{1,2,3}, LIU Zhanzhi^{1,2,3}, ZHANG Ying^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety by the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: With the decrease of forest timber resources, the recycling of waste paper has received increasing attention. However, the stickies produced in the process of waste paper recycling may negatively affect the production of recycled paper. The biological decomposition of stickies, which has the advantages of high efficiency, high specificity and pollution-free, is achieved mainly through the enzymatic cleavage of the ester bond in the stickies components to prevent flocculation. Cutinase is a serine esterase that can degrade some components of the stickies. Previous research indicated that the anchor peptide tachystatin A2 (TA2) is able to bind polyurethane. In this study, the cutinase HiC derived from *Humicola insolens* was used to construct a fusion protein HiC-TA2 by megaprimer PCR of the whole plasmid (MEGAWHOP). The enzymatic properties and the degradation efficiency of the fusion protein on poly(ethyl acrylate) (PEA), a model substrate of stickies component, were determined. The results showed that the degradation efficiency, the size decrease of PEA particle, and the amount of ethanol produced by HiC-TA2 were 1.5 times, 6.8 times, and 1.4 times of that by HiC, respectively. These results demonstrated that TA2 improved the degradation efficiency of HiC on PEA. This study provides a useful reference for biological decomposition of stickies produced in the process of recycled paper production.

Keywords: stickies; cutinase; anchor peptide; poly(ethyl acrylate)

造纸工业是拉动国民经济增长和促进社会发展的重要基础原材料支柱产业之一。近几年,中国已成为全球最大的纸产品生产国和废纸回收国^[1]。与此同时,随着森林资源保护力度的加大,以及森林原木砍伐的减少,废纸回收利用越来越受到人们的重视。废纸回收再利用主要是将废纸进行回收后得到的二次纤维经过一系列加工以生产再生纸,此过程不仅可以节约大量植物原料、能源,降低成本,而且有利于环境保护^[2]。

随着废纸回收利用率的不断提高以及制浆

造纸白水循环系统封闭程度的不断增加,废纸回收过程中的胶黏物问题日趋严重,对再生纸的实际生产造成了严重影响^[3]。胶黏物通常是指二次纤维回收过程中产生的各种各样的沉积物^[4]。胶黏物的沉积会导致再生纸质量和生产效率的降低。控制纸浆中胶黏物的方法主要有机械法^[5]、化学法^[6]和生物法^[7]。目前,胶黏物的处理还是以传统的化学法为主,主要是通过化学吸附、改性、分散、固定和表面钝化等作用来达到控制胶黏物的目的,但成本过高,且

存在二次污染等问题。因此,具有高效、专一、无污染等优势的生物酶法在胶黏物控制中的应用逐渐受到国内外造纸行业的重视。

生物酶法主要是通过酶解胶黏物组分中的酯键,降低胶黏物黏性,减少胶黏物粒径,进而防止胶黏物的絮凝。在处理胶黏物的诸多生物酶中,酯酶的效果最为显著,且应用最为广泛^[8]。角质酶属于丝氨酸酯酶,是一种可以降解角质的水解酶^[9],后续研究发现角质酶对于可溶性酯、不溶性甘油三酯及各类聚酯都具有降解作用,是一种多功能酶^[10]。Hong 等^[11]研究发现,角质酶对胶黏物的主要成分聚丙烯酸酯有一定的降解作用,可以通过水解聚丙烯酸酯的酯键,防止聚酯絮集。

胶黏物在水相环境中主要以固体形式存在,而角质酶的催化活性中心与固体长链聚酯的结合能力有限。锚定肽能有效提高目的蛋白对特定底物的结合能力,且不会引起反应体系理化条件的变化^[12]。Rübsam 等^[13]发现锚定肽 LCI 对聚丙烯酸酯有很强的结合能力。Islam 等^[14]将锚定肽 Tachystatin A2 (TA2) 与角质酶 Tcur1278 构建成融合蛋白,对聚氨酯纳米颗粒的降解效率是 Tcur1278 野生型的 6.6 倍。因此,将角质酶和能与胶黏物聚酯结合的锚定肽连接,有助于提高角质酶对胶黏物的结合效率,从而提高降解效率。

本研究将特异性腐质霉 (*Humicola insolens*) 来源的角质酶 HiC 和锚定肽 TA2 构建融合蛋白 HiC-TA2,经过毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 发酵表达后表征 HiC-TA2 的酶学性质,并将 HiC-TA2 对胶黏物的模式底物聚丙烯酸乙酯 (PEA) 的降解效果进行了表征。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM 109 和毕赤

酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 为本实验室前期保藏,重组质粒 pPIC9K-HiC 由本实验室前期构建并保藏^[15],TA2 锚定肽和连接肽基因由上海天霖生物科技有限公司合成并拼接在 pET-20b 表达载体上。

1.2 材料与仪器

酵母粉、蛋白胨购自英国 Oxoid 公司;对硝基苯丁酸酯 (pNPB)、PEA 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,其中 PEA 的分子量在 17 000 Da 左右;2×Phanta Max Master Mix、蛋白 marker、DNA marker 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒购于碧云天生物科技有限公司;质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司;其他国产分析纯试剂均购自国药集团。

PTC-200 型核酸扩增仪购于美国 MJ Research 公司;DYY-6C 型核酸电泳仪购于北京六一电泳仪厂;蛋白电泳仪、凝胶成像仪购于美国 Bio-Rad 公司;恒温振荡培养箱购于上海知楚仪器;紫外可见分光光度计购于日本 Shimadzu 公司;GC-2030AF 型气相色谱仪购自日本岛津公司;纳米粒度及 ZETA 电位分析仪购于英国马尔文仪器有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 固体培养基另添加琼脂粉 15.0。

YPD 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 20.0。

MD 固体培养基 (g/L): 琼脂粉 15.0, 葡萄糖 20.0, 生物素 4.0×10^{-4} , YNB 13.4。

BMMY 培养基 (g/L): 酵母提取物 10.0, YNB 13.4, 生物素 4.0×10^{-4} , 胰蛋白胨 20.0。

BMGY 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 20.0, YNB 13.4, 酵母提取物 10.0, 生物素 4.0×10^{-4} , 甘油 10.0。

1.4 PCR 扩增目的基因及重组质粒的构建

实验涉及的引物如表 1 所示。利用 PCR 扩增 TA2 和连接肽基因。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix (25 μ L), TA2 和连接肽基因 (1 μ L), 引物 *HiC-TA2-F* (10 μ mol/L, 0.5 μ L), 引物 *HiC-TA2-R* (10 μ mol/L, 0.5 μ L), ddH₂O (23 μ L)。PCR 扩增条件为: 预变性: 94 $^{\circ}$ C, 4 min; 变性: 98 $^{\circ}$ C, 10 s; 退火: 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 充分延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 保存。其中变性-退火-延伸重复 30 个循环。

对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收, 随后以胶回收的 DNA 片段作为 Mega primer, 用大引物全质粒扩增法 (Megaprimer PCR of whole plasmids, MEGAWHOP)^[16] 构建重组质粒 pPIC9K-*HiC-TA2*。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Master Mix (25 μ L), Mega primer (2 μ L), 质粒 DNA 模板 pPIC9K-*HiC* (0.5 μ L), ddH₂O (22.5 μ L)。PCR 扩增条件为: 预热: 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 预变性: 98 $^{\circ}$ C, 2 min; 变性: 98 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火: 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 6 min; 充分延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 保存。其中变性-退火-延伸重复 25 个循环。37 $^{\circ}$ C 下, 将上述 PCR 产物用 *Dpn* I 处理 2 h, 随后经热激转化至 *E. coli* JM109, 挑取单菌落测序。

1.5 重组质粒的转化及毕赤酵母转化子的筛选与摇瓶发酵

将测序成功的重组质粒 pPIC9K-*HiC-TA2* 进行线性化处理。线性化的体系为 (10 μ L): 10 \times L 缓冲液 (1 μ L), 质粒 (7 μ L), ddH₂O (1 μ L),

Sac I (1 μ L)。将上述体系加入到 1.5 mL EP 管中, 放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中酶切 2 h, 将处理后的质粒经电击转化导入到毕赤酵母 KM71 的感受态细胞中, 1 mol/L 山梨醇复苏 1.5 h 后涂布在 MD 固体平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d。

将已在 MD 平板上长成单菌落的毕赤酵母用灭菌枪头挑取到浓度不同的 G418 YPD 平板上进行筛选, 点种完成后置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。挑取在高浓度 G418 板仍然生长的 20 株单菌落到 10 mL 的 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 d。之后从各个 YPD 培养基中取 2.5 mL 菌液接种到 50 mL 的 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 d, 同时保种到甘油管。之后在超净台中将 50 mL 培养液全部倒入已经灭菌好的离心管中, 封口, 5 000 r/min, 离心 5 min。去掉上清, 将菌体通过吹吸的方式转移进 25 mL 的 BMMY 培养基中, 并加入 375 μ L 甲醇。30 $^{\circ}$ C 培养, 每隔 24 h 补加 250 μ L 的甲醇, 共培养 4 d。之后测定上清液酶活, 上清液即为重组酶的酶液, 酶活高的即为毕赤酵母的高拷贝转化子。

1.6 角质酶的酶活测定

采用连续分光光度法测定角质酶的酶活^[17]。反应总体系为 1.5 mL, 其中包括 30 μ L 角质酶的酶液 (蛋白浓度在 5-10 mg/L 之间) 和 1 470 μ L 含 50 mmol/L 硫磺脱氧胆酸钠与 10 mmol/L pNPB 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0); 将反应体系于 37 $^{\circ}$ C 下进行反应, 反应过程中, 通过紫外分光光度计检测反应液在波长 405 nm 处的吸光度, 以记录对硝基酚的生成速率。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>HiC-TA2-F</i>	CTTCGTGATCGTATTCGTGCTGCTGAGGCAGCAGCG	30
<i>HiC-TA2-R</i>	CTCGAGTGCGCCGCAAGCTTTTAATAGCGTTGGCAACG	33

角质酶酶活的定义为：在 37 °C 下，每分钟催化 *p*NPB 水解生成 1 μmol 对硝基酚的酶量即为一个酶活力单位 (1 U)。

1.7 蛋白纯化方法

(1) 透析：将装有发酵液的透析袋置于缓冲液中透析过夜。将透析完后的酶液用孔径为 0.22 μm 的无机相滤膜过滤。

(2) 阴离子交换柱 MonoQ 纯化：阴离子交换柱 MonoQ 先用去离子水冲洗 5 个柱体积，再用缓冲液 A (50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液，pH 8.5) 平衡。将样品完全吸入阴离子交换柱后，使用缓冲液 A 冲洗 3–5 个柱体积来洗去未结合的蛋白；用缓冲液 B (缓冲液 A+1 mol/L NaCl) 进行梯度洗脱，流速为 1 mL/min。在波长 280 nm 下利用紫外进行检测，收集蛋白浓度>50 个单位的蛋白峰洗脱液。对收集到的蛋白样品用 SDS-PAGE 进行分析。

(3) 纯化完成后，依次用去离子水、0.5 mol/L 的 NaOH、去离子水对阴离子交换柱进行冲洗，最后保存于 20%乙醇中。

1.8 酶学性质研究

1.8.1 最适 pH 和 pH 稳定性的测定

最适 pH：分别在不同 pH 条件下 (pH 6.0–9.0) 测定角质酶的酶活，定义最高点酶活为 100%，其余点的酶活与之按百分比计算其相对酶活。缓冲体系为：Tris-HCl 缓冲体系 (pH 7.0–9.0)、磷酸钾缓冲体系 (6.0–7.0)。

pH 稳定性：37 °C 下，将一定量的重组酶的酶液分别于 pH 5.0–10.0 的缓冲液中孵育 72 h 后测定酶活。将孵育前酶活设为 100%，后续时间点的酶活与之按百分比计算其相对酶活。所用缓冲液的体系为：磷酸钾缓冲液 (pH 5.0–6.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0–8.0) 和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0–10.0)。

1.8.2 最适温度和温度稳定性的测定

最适温度：在最适 pH 下，分别测定等量酶液在不同温度条件下 (30–90 °C) 的酶活，定义最高酶活为 100%，计算不同温度条件下的相对酶活。

温度稳定性：将酶液放置于 30 °C 和 50 °C 中，定时取样测其酶活。定义 0 h 的酶活为 100%，剩余酶液酶活与之按百分比计算其相对酶活。

1.9 水解 PEA 的性能表征

1.9.1 PEA 浊液经水解后的浊度测定

(1) PEA 溶液的配制：取 1 g PEA 至丙酮中，用丙酮定容至 100 mL，摇匀得到浓度为 1% 的溶液，备用。

(2) 取 1 mL 浓度为 1% 的 PEA 溶液于 15 mL 旋盖玻璃瓶中，再加入用 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0) 稀释过的融合蛋白溶液，使终体积为 10 mL，实验组和对照组加入的蛋白含量均为 2.5 nmol。在 50 °C、150 r/min 的水浴摇床中反应 6 h，利用分光光度计测定波长 600 nm 处的反应体系的浊度变化。定义初始反应时的浊度为 100%，反应时各时间点的浊度与之按百分比计算其相对浊度。空白对照组不加酶，实验组为 HiC 酶液处理组和 HiC-TA2 融合蛋白酶液处理组，每个实验组做 3 个平行对照。

(3) 绘制反应体系的相对浊度变化图，判断 PEA 的处理效果。

1.9.2 PEA 浊液经水解后的粒径测定

将上述反应结束的反应液进行煮沸灭酶，冷却后取 1 mL 反应液进行离心，并使用 0.22 μm 孔径大小的水相滤头对上清液进行过滤。过滤后的反应液使用纳米粒度及 ZETA 电位分析仪来检测体系的粒径，每个实验组做 3 个平行对照。

1.9.3 水解产物的测定

将上述反应结束后的反应液使用顶空气相色谱法分析乙醇含量。色谱柱:DB-WAX (30 m×0.32 m×0.25 μm), 柱温箱最高温度为 180 °C, 分流比为 5:1, 柱温为 40 °C, 柱流量为 1.2 mL/min, FID 检测器温度为 260 °C, 空气、氢气、尾吹气的流量比分别为 400 mL/min、40 mL/min、30 mL/min。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pPIC9K-HiC-TA2 的构建

利用 MEGAWHOP 构建重组质粒 pPIC9K-HiC-TA2 的过程如图 1 所示。

2.2 工程菌 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-HiC-TA2 的转化子筛选与摇瓶发酵

经过平板筛选和摇瓶筛选, 最终筛选到的对 pNPB 的酶活最高的转化子的酶活为 21 U/mL。通过超滤管离心来浓缩 HiC-TA2 酶液并进行阴离子交换柱纯化, 并对纯化后的 HiC-TA2 进行 SDS-PAGE 分析和比酶活测定, 结果如图 2 所示。HiC 的蛋白大小约为 20 kDa, 符合之前文献报道的结果。融合蛋白 HiC-TA2 的蛋白大小约为 30 kDa, 符合预测结果, 比酶活为 1 900 U/mg。

2.3 HiC-TA2 的酶学性质测定

2.3.1 最适温度和温度稳定性的测定

按 1.7 中所述方法测定 HiC-TA2 和 HiC 的最适温度和温度稳定性。结果如图 3-4 所示, 在 30-80 °C 的范围内, HiC-TA2 的酶活随着温度的升高而升高, 80 °C 时到达最高值, 90 °C 时就有了明显下降, 因此 HiC-TA2 的最适温度为 80 °C, 与 HiC 相似。

在温度稳定性方面, HiC-TA2 和 HiC 在 50 °C 放置 48 h 之内均出现了酶活提高的现象, 与之前报道过的热激活现象相符^[18]。随后, 在

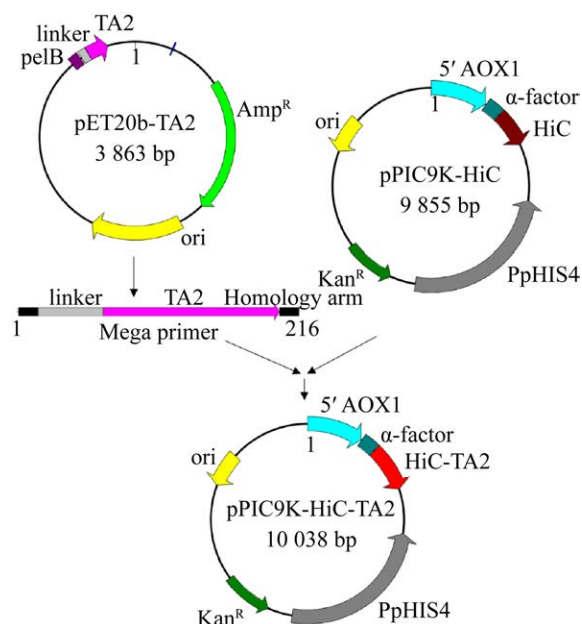


图 1 重组质粒 pPIC9K-HiC-TA2 构建流程 利用 PCR 扩增在质粒 pET20b-TA2 上的 TA2 和连接肽基因, 再以扩增下来的 DNA 片段作为 Mega primer, 通过 MEGAWHOP 连接至质粒 pPIC9K-HiC 上, 构建重组质粒 pPIC9K-HiC-TA2

Figure 1 Construction of the recombinant plasmid pPIC9K-HiC-TA2. The TA2 and linker peptide genes on pET20b-TA2 were amplified by PCR, then the amplified DNA fragment was used as the Mega primer and linked to the plasmid pPIC9K-HiC by MEGAWHOP to construct the recombinant plasmid pPIC9K-HiC-TA2.

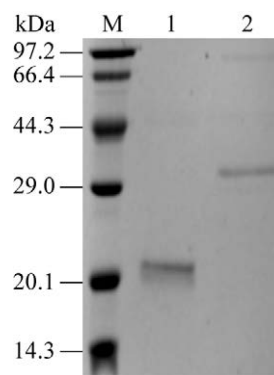


图 2 HiC-TA2 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of HiC-TA2. M: standard molecular weight protein; 1: HiC; 2: HiC-TA2.

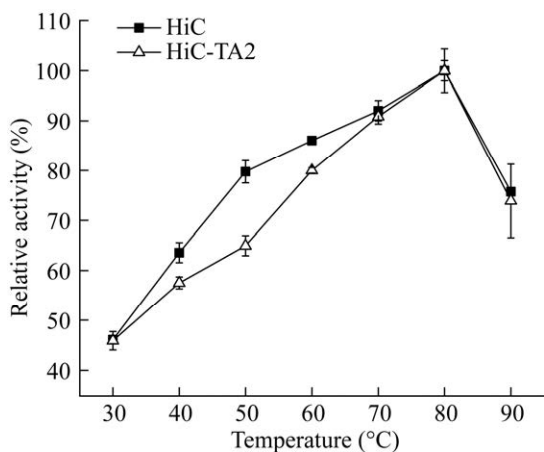


图3 HiC和HiC-TA2的最适温度
Figure 3 Optimum temperature of HiC and HiC-TA2.

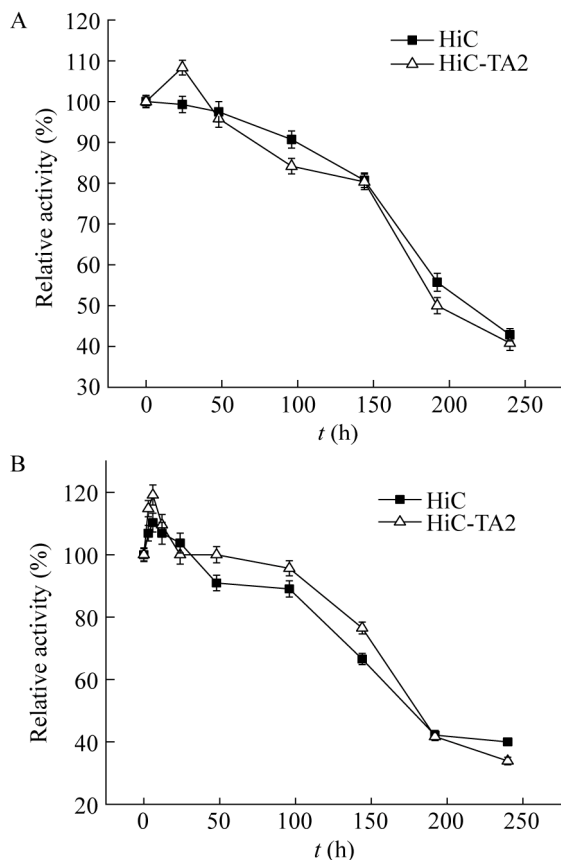


图4 HiC和HiC-TA2在30°C (A)和50°C (B)下的温度稳定性
Figure 4 Temperature stability of HiC and HiC-TA2 at 30°C (A) and 50°C (B).

30°C和50°C的环境下, HiC-TA2的酶活随着时间的延长而降低, 到达240h左右已低于50%, 与HiC的相对酶活变化相似。由此可见, TA2的融合对HiC-TA2的最适温度和温度稳定性均没有明显的影响。

2.3.2 最适pH和pH稳定性的测定

按1.8中所述方法测定HiC-TA2和HiC的最适pH和pH稳定性。结果如图5-6所示, 在pH 6.0-8.5的范围内, HiC-TA2的酶活随着pH

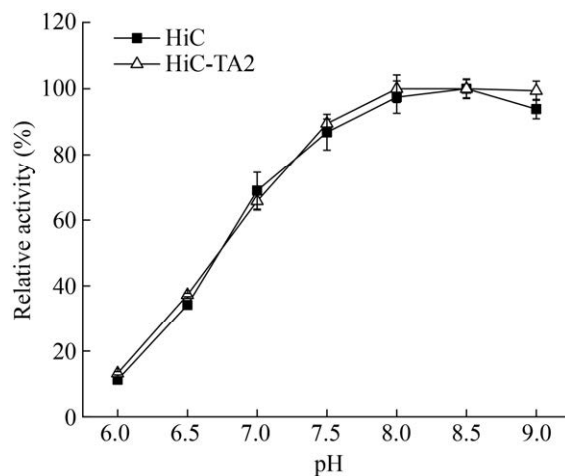


图5 HiC和HiC-TA2的最适pH
Figure 5 Optimal pH of HiC and HiC-TA2.

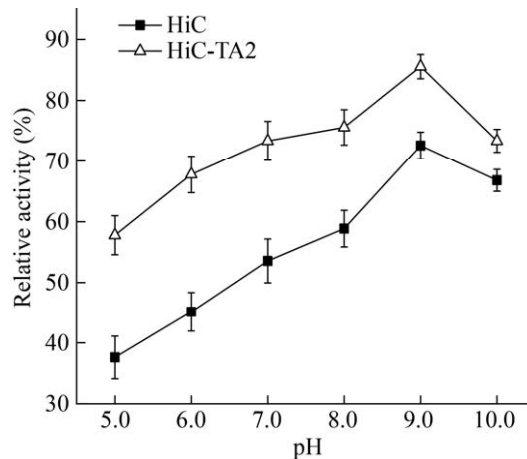


图6 HiC和HiC-TA2的pH稳定性
Figure 6 pH stability of HiC and HiC-TA2.

的升高而升高, 在 pH 8.0–8.5 时到达最高值, 在 pH 9.0 时会略有下降, 与 HiC 相同。由此可见 HiC-TA2 与 HiC 相同, 为弱碱性角质酶, 最适 pH 范围为 8.0–8.5。

在 pH 稳定性方面, HiC-TA2 和 HiC 都是在 pH 9.0 时有最好的稳定性。而 HiC-TA2 在各 pH 下的相对酶活始终高于 HiC, 证明 HiC-TA2 的 pH 稳定性高于 HiC。

2.4 PEA 的降解性能表征

2.4.1 PEA 浊液经水解后的浊度变化

如图 7 所示, 空白对照组的浊度随时间变化一直在缓慢下降, 最终在 6 h 后降为 71%。这是因为 PEA 不溶于水, 因此当底物丙酮溶液加入水相反应体系后, PEA 会析出, 导致反应体系变浑浊。在反应过程中一部分底物会沉淀, 导致浊度下降。HiC 组的浊度在反应 0.5 h 后趋于稳定, 最终体系的相对浊度稳定在 31%。这是因为当底物被酶降解时产物为聚丙烯和乙醇, 都是溶于水的有机物, 且不会和其他物质发生聚集, 因此反应体系的浊度也会下降。浊度下降的越明显, 证明酶解效果越好。HiC-TA2 组在

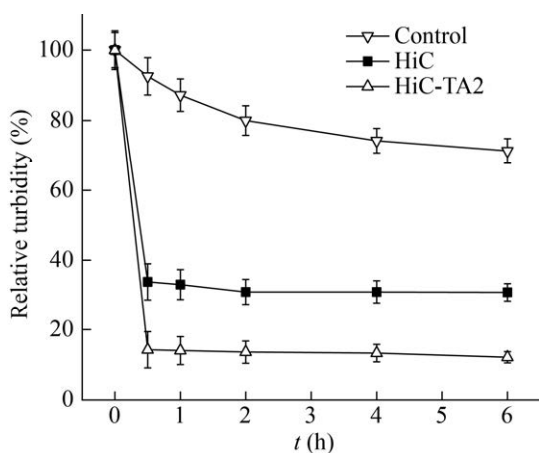


图 7 PEA 浊液相对浊度的变化

Figure 7 The change of relative turbidity of PEA.

0.5 h 后趋于稳定, 由于底物被降解, 最终体系的相对浊度稳定在 12%, 是 HiC 组的降解效率的 1.5 倍。图 8 为反应后的实物图片, 浊度越低反应体系的透光度越高。从图片上能明显看出, 在透光度上, HiC-TA2>HiC>空白对照。

2.4.2 PEA 浊液经过水解后的粒径变化

除了通过浊度变化来体现 PEA 水解前后聚合物的沉积情况以外, 粒径大小也是体现聚合物沉积趋势的方式之一。如表 2 所示, 空白对照组的粒径较初始相比降低了 7.6 nm, HiC 处理后体系的粒径减小了 50.6 nm, 而 HiC-TA2 处理后体系的粒径减小了 299.1 nm。这是因为随着水解的进行, 粒子团逐渐变小, PEA 相互作用力减弱, 粒子团聚能力变弱。因此, 粒

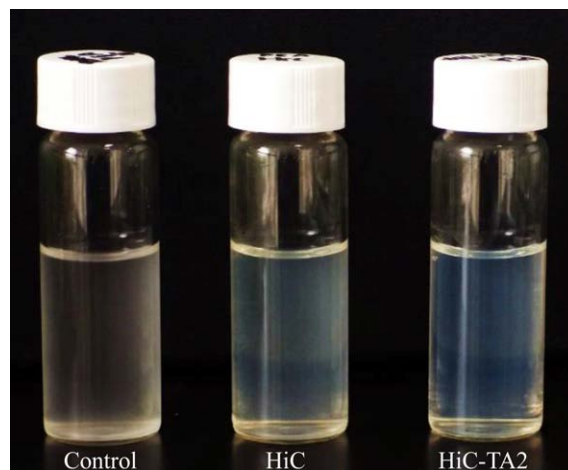


图 8 HiC 和 HiC-TA2 降解 PEA 反应后的照片
Figure 8 Degradation of PEA by HiC and HiC-TA2.

表 2 PEA 的粒径测定

Table 2 The size of PEA particle

Item	Particle size (nm)	Change in particle size (nm)
Initial value	485.6±2.6	/
Control	478.0±3.0	-7.6
HiC	435.0±6.8	-50.6
HiC-TA2	186.5±1.1	-299.1

径越小证明水解效果越好。HiC-TA2 处理后体系的粒径减小值是 HiC 的 6.8 倍。由此可见, TA2 有助于增强 HiC 对 PEA 的水解。

2.4.3 PEA 浊液水解后的产物测定

PEA 的酯键被酶水解后, 分解产物为聚丙烯和乙醇。因此, 检测反应体系中的乙醇含量也能作为评估反应进行程度的标准之一。顶空气相色谱法检测乙醇含量的结果如表 3 所示。空白对照组也含有微量的乙醇, 可能是由于在终止反应的煮沸过程中 PEA 的部分酯键被高温破坏导致断裂, 从而生成乙醇。HiC 组的乙醇含量略高于空白对照组, 可以证明酯解反应确实在进行。HiC-TA2 组的乙醇含量最高, 是 HiC 组的 1.4 倍, 证明 HiC-TA2 组的 PEA 酯解程度比 HiC 组更彻底。由此可见, TA2 有助于增强 HiC 对 PEA 的水解。

3 结论

生物酶法在胶黏物控制中的应用越来越受到国内外造纸行业的重视, 而角质酶对酯键的高效催化能力使其在胶黏物控制方向具有很大的潜力。本实验将 HiC 的基因与 TA2 的基因通过 MEGAWHOP 技术拼接在表达载体 pPIC9K 上, 并转化进毕赤酵母 KM71 中进行发酵表达, 最终得到了融合蛋白 HiC-TA2。HiC-TA2 的最适温度、温度稳定性和最适 pH 与 HiC 相似, pH 稳定性略有提高。HiC-TA2 对 PEA 浊液的降解效率是 HiC 的 1.5 倍, 反应体系的粒径减小值

是 HiC 的 6.8 倍, 产物乙醇的生成量是 HiC 的 1.4 倍。本研究表明 TA2 有助于提高 HiC 对 PEA 的水解效率, 对于生物法降解再生纸胶黏物的研究具有重要的理论和实践意义。

REFERENCES

- [1] 王钦池. 2017 年全球纸业发展报告. 中华纸业, 2018, 39(23): 31-37, 5.
Wang QC. Global paper development report 2017. China Pulp Pap Ind, 2018, 39(23): 31-37, 5 (in Chinese).
- [2] 中国造纸协会. 中国造纸协会关于造纸工业“十三五”发展的意见. 中华纸业, 2017, 38(13): 16-23, 6.
Proposals on the thirteenth five-year plan of China paper industry by China Paper Association. China Pulp Pap Ind, 2017, 38(13): 16-23, 6 (in Chinese).
- [3] Fogarty TJ. Cost-effective, common sense approach to stickies control. Japan Tappi J, 1993, 76(3): 161.
- [4] LeRoux R, Pruszynski P, Armstrong J, et al. Control of stickies contaminants in newsprint applications-review, mechanisms and novel approach. Pulp Pap Can Ont, 1997, 98(9): 54-61.
- [5] 王旭, 詹怀宇, 陈港. 废纸回用中胶粘物的工艺控制技术. 中国造纸学报, 2002, 17(1): 116-121.
Wang X, Zhan HY, Chen G. Process/mechanical control technologies of stickies in the use of recycled fibres. Trans China Pulp Pap, 2002, 17(1): 116-121 (in Chinese).
- [6] 陈嘉翔. 国际上对废纸回用时发生胶粘物问题的研究成果和目前的研究方向. 造纸化学品, 2004, 16(1): 1-4, 12.
Chen JX. Research results and direction of stickies problems during paper recycling in the world. Pap Chem, 2004, 16(1): 1-4, 12 (in Chinese).
- [7] 巨云利, 刘书良, 王庆梅, 等. 胶粘物在再生新闻纸生产中的控制. 中华纸业, 2007, 28(1): 41-44.
Ju YL, Liu SL, Wang QM, et al. The control of stickies in the production of reproduced newsprint. China Pulp Pap Ind, 2007, 28(1): 41-44 (in Chinese).
- [8] 张菊先, 吕建明. 用酯类酶控制废纸浆中的胶粘物. 国际造纸, 2003, 22(4): 10-13.
Zhang JX, Lü JM. Esterase-type enzymes offer recycled mill an alternative approach to stickles control. World Pulp Pap, 2003, 22(4): 10-13 (in Chinese).
- [9] Kolattukudy PE, Purdy RE, Maiti IB. Cutinases from fungi and pollen. Methods Enzymol, 1981: 652-664.

表 3 PEA 水解后生成的乙酸量

Table 3 The amount of ethanol produced after PEA hydrolysis

Item	The amount of ethanol (mmol/L)
Control	0.8±0.1
HiC	1.1±0.1
HiC-TA2	1.5±0.1

- [10] Chen S, Tong X, Woodard RW, et al. Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem*, 2008, 283(38): 25854-25862.
- [11] Hong RY, Su LQ, Wu J. Cutinases catalyze polyacrylate hydrolysis and prevent their aggregation. *Polym Degrad Stab*, 2019, 159: 23-30.
- [12] Liu Z, Ma S, Duan S, et al. Modification of titanium substrates with chimeric peptides comprising antimicrobial and titanium-binding motifs connected by linkers to inhibit biofilm formation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(8): 5124-5136.
- [13] RübSam K, Stomps B, Böker A, et al. Anchor peptides: a green and versatile method for polypropylene functionalization. *Polymer*, 2017, 116: 124-132.
- [14] Islam S, Apitius L, Jakob F, et al. Targeting microplastic particles in the void of diluted suspensions. *Environ Int*, 2019, 123: 428-435.
- [15] 洪若宇. 角质酶处理造纸胶粘物的性能表征、高效制备和功能优化[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- Hong RY. Characterization of cutinase in paper stickies treatment, its high-efficient fermentation and functional optimization[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [16] Miyazaki K. MEGAWHOP cloning: a method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids. *Methods Enzymol*, 2011, 498: 399-406.
- [17] Su L, Woodard RW, Chen J, et al. Extracellular location of *Thermobifida fusca* cutinase expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) without mediation of a signal peptide. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(14): 4192-4198.
- [18] 陈晟. 嗜热单孢菌角质酶的基因鉴定、高效表达及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- Chen S. Gene identification, high-efficient expression and molecular modification of *Thermobifida fusca* cutinase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)