

多功能过氧化物酶介导 Mn(III)络合体系对酚类化合物的氧化降解

窦明德^{1,2,3}, 姚从禹^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3}, 夏伟^{*1,2,3}, 陈晟^{*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

窦明德, 姚从禹, 吴敬, 夏伟, 陈晟. 多功能过氧化物酶介导 Mn(III)络合体系对酚类化合物的氧化降解[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3631-3643

Dou Mingde, Yao Congyu, Wu Jing, Xia Wei, Chen Sheng. Oxidative degradation of phenolic compounds by versatile peroxidase-mediated Mn(III) complex system[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3631-3643

摘要:【背景】酚类化合物是环境中主要的水体污染物之一。多功能过氧化物酶(versatile peroxidase, VP)介导的 Mn(III)-有机酸络合体系具有较高的氧化还原电势, 在酚类有机污染物降解方面具有巨大潜力。【目的】探究 VP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系降解酚类化合物的能力, 为酚类化合物的降解提供新的思路和方法。【方法】研究选取了糙皮侧耳(*Pleurotus eryngii*)来源的多功能过氧化物酶(PeVP), 采用包涵体复性的方法获得了 PeVP 活性蛋白, 并对重组 PeVP 进行酶学性质研究及 Mn(III)络合体系反应条件优化, 进而探究 Mn(III)络合体系对酚类污染物的氧化降解能力。【结果】确定了 PeVP 包涵体复性最佳条件为: pH 9.5、10%甘油、0.5 mol/L 尿素、0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽(glutathione oxidized, GSSG)、0.1 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、5 mmol/L CaCl₂、5 μmol/L 羟高铁血红素(hematin), 4 °C 静置透析 24 h, 最后 5 μmol/L hematin 孵育 12 h。通过对 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系优化, 确定了最优反应条件为: 75 mmol/L 苹果酸缓冲液(pH 4.5)、6 mmol/L Mn²⁺和 0.2 mmol/L H₂O₂。在上述条件下, 探究了络合体系对 2,2'-丁香醛连氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]、2,6-二甲氧基苯酚(2,6-dimethoxyphenol, DMP)、愈创木酚和丁香醛连氮 4 种酚类模式底物的催化活性, 发现在 pH 4.5 条件下, 络合体系对酚类模式底物的氧化活性可达到 PeVP 直接氧化活性的 1.5–7.5 倍, 并且在 16 h 的酶解过程中, 苯酚、对苯二酚、间苯二酚和对硝基苯酚的平均降解速率分别为 10.91、10.69、6.50 和 5.71 mg/(L·h), 推测 Mn(III)-有机酸络合物对酚类底物的氧化

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0706900)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900)

*Corresponding authors: E-mail: XIA Wei: weixia@jiangnan.edu.cn; CHEN Sheng: chensheng@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-01-13; Accepted: 2022-03-23; Published online: 2022-04-29

降解是通过夺取酚类底物的电子形成酚类自由基中间体, 自由基中间体经过电子重排和 C-C 键的断裂, 最终导致酚类物质的氧化降解。【结论】在弱酸(pH 4.5)条件下 PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合物对酚类污染物具备较强的氧化能力, 这为酚类有机污染物提供了新的生物解决方案。

关键词: 多功能过氧化物酶; 包涵体复性; Mn(III)-苹果酸络合物; 酚类污染物; 氧化降解

Oxidative degradation of phenolic compounds by versatile peroxidase-mediated Mn(III) complex system

DOU Mingde^{1,2,3}, YAO Congyu^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}, XIA Wei^{*1,2,3}, CHEN Sheng^{*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 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Phenolic compounds are among the main water pollutants in the environment. The Mn(III)-organic acid chelate mediated by versatile peroxidase (VP) is considered to have great potential in the degradation of phenolic organic pollutants owing to the high redox potential. [Objective] To explore the degradation of phenolic compounds by VP-mediated Mn(III)-organic acid chelate and thereby to provide a new mindset and method for the biodegradation of phenolic compounds. [Methods] The active VP from *Pleurotus eryngii* (PeVP) was obtained by renaturation of inclusion body *in vitro*. We characterized the enzymatic properties of PeVP and optimized the reaction conditions of Mn(III) chelate to explore the ability of the complex system to degrade the phenolic compounds. [Results] The optimum conditions for renaturation of PeVP were as follows: The inclusion body was refolded in pH 9.5 solution containing 0.5 mol/L urea, 0.5 mmol/L oxidized glutathione (GSSG), 0.1 mmol/L dithiothreitol (DTT), 0.1 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mmol/L CaCl₂, 10% glycerol, and 5 μmol/L hematin at 4 °C for 24 h, and then incubated with 5 μmol/L hematin for 12 h. The optimal reaction conditions of PeVP-mediated Mn(III)-organic acid chelate were 75 mmol/L malic acid buffer (pH 4.5), 6 mmol/L Mn²⁺, and 0.2 mmol/L H₂O₂. Under the above conditions, the catalytic activity of the chelate system on phenolic compounds 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), 2,6-dimethoxyphenol (DMP), guaiacol, and syringaldazine was detected, and it was found that the oxidation activity of Mn(III) chelate system at pH 4.5 was 1.5–7.5 times that of PeVP alone. Moreover, the average degradation rates of phenol, hydroquinone, resorcinol, and p-nitrophenol by Mn(III)-malic acid chelate system were 10.91, 10.69, 6.50, 5.71 mg/(L·h), respectively. Therefore, the Mn(III)-organic acid complex might capture the electrons of phenolic substrate to form phenolic free radicals and lead to the fracture of benzene ring with the decrease of bond energy, thus achieving the oxidative degradation of phenolic compounds. [Conclusion] At pH 4.5, Mn(III)-malic acid chelate system mediated by PeVP shows strong ability to oxidize phenolic substrates, which is a promising solution for the biodegradation of phenolic organic pollutants.

Keywords: versatile peroxidase; inclusion body renaturation; Mn(III)-malic acid chelate; phenolic pollutants; oxidative degradation

作为有机化学工业的基本原料, 酚类化合物在高分子材料、染料、合成纤维、药物等方面应用广泛^[1]。地表水中酚类化合物主要来自炼油、造纸、木材防腐和化工等工业废水, 而且大多数酚类化合物在水中具有相当高的溶解度, 使其成为主要的水体污染物之一^[2-3]。含有酚类有机污染物的生活及工业废水若不经处理直接排放, 将严重危害生态环境和人民生命安全^[4]。

酚类污染物的催化降解是环境化学领域的热点问题。酚类的生物降解无二次污染, 去除率较高, 安全可靠, 是国内外研究的热点^[5]。一些菌株已被鉴定为酚类物质的降解菌株, 如红球菌属、丝孢酵母菌属、克雷伯氏菌和柠檬酸杆菌等^[6]。报道称, 红球菌 B403 在苯酚降解途径中的粘酸环异构酶、乙酰辅酶 A 酰基转移酶和邻苯二酚 1,2-双加氧酶表现出上调趋势^[7]。漆酶和辣根过氧化物酶等相关酶类在酚类降解方面也取得了明显的效果, 用磁性石墨烯固定化漆酶, 催化氧化水中的双酚 A, 去除率可达到 82.14%^[8]; 此外, 参与木质素降解的木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)和多功能过氧化物酶(versatile peroxidase, VP)具有较强的催化氧化能力, 对木质素中的芳香族化合物具有一定的降解作用^[9-10]。由于酚类物质与木质素芳香族化合物具有结构上的相似性, 上述木质素过氧化物酶被推测具有引发酚类污染物中 C-C 键断裂的潜能, 与特异性强的酚类降解酶相比, 过氧化物酶具有较强的底物广谱性, 在众多污染物的降解方面展现出一定的潜能^[11]。

Mn(III)作为一种单电子转移反应的强氧化剂, 在有机污染物的废水处理和生物地球化学氧化还原转化过程中发挥着重要作用, 如反应式所示: $2\text{Mn}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{MnO}_2(\text{s}) + \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}^+$, 自

由态 Mn(III)极易发生歧化反应而失去氧化能力, 而有机酸络合剂可以通过与 Mn(III)的络合作用有效防止自由态 Mn(III)的歧化^[12]。自然界中能够催化 Mn(III)生成的酶有 MnP 和 VP, 其中 VP 是一种发现较晚的亚铁血红素过氧化物酶, 是 MnP 和 LiP 的综合体, 具有 MnP 特有的 Mn^{2+} 结合位点及 LiP 特有的色氨酸催化位点, 还有主要亚铁血红素通道中作用于低氧化还原电势底物的位点^[13-17]。在 H_2O_2 的存在下 VP 可以将结合在锰离子位点的 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{3+} , 产物 Mn^{3+} 与有机酸络合剂形成 Mn(III)-有机酸络合物, 从活性位点释放下来, Mn(III)-有机酸络合物具有较高的氧化还原电位和稳定性, 可作为酚类底物的扩散氧化剂^[18]。

糙皮侧耳(*Pleurotus eryngii*)是自然界中有效降解木质素的白腐真菌之一, 在环境污染物的生物修复方面具有较大的应用潜力, 其分泌的 VP 能够高效氧化 Mn^{2+} 、酚类和非酚类化合物, 具有较强的底物广谱性^[18-19]。因此, 本研究利用包涵体蛋白体外复性的方式获得了 *Pleurotus eryngii* 来源的多功能过氧化物酶(PeVP)的活性蛋白, 优化确定 PeVP 介导 Mn(III)-有机酸络合体系的最优反应条件, 进一步探究了 Mn(III)-有机酸络合体系对酚类污染物的氧化能力, 以期酶催化 Mn(III)-有机酸络合体系广泛应用于酚类污染物降解方面提供参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

研究所用克隆菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109, 表达菌株为 *E. coli* BL21(DE3), 均为实验室保藏菌株。*P. eryngii* 来源的多功能过氧化物酶(PeVP, NCBI 登录号为 O94753.1), 编

码基因核苷酸序列根据大肠杆菌表达系统偏好性进行密码子优化后, 由中国江苏天霖生物工程有限公司化学合成, 以 pET-24a(+)作为表达载体进行重组表达。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

TB 培养基(g/L): 蛋白胨 12.0, 酵母粉 24.0, 甘油 5.0, KH₂PO₄ 2.3, K₂HPO₄·3H₂O 16.4。

1.1.3 主要试剂和仪器

苹果酸、苹果酸钠、尿素、甘油、MnSO₄、CaCl₂、30% H₂O₂ 水溶液、愈创木酚、藜芦醇、丁香醛连氮、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、2,2-丁香醛连氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]、2,6-二甲氧基苯酚(2,6-dimethoxyphenol, DMP)、苯酚(phenol)、对苯二酚(hydroquinone)、间苯二酚(resorcinol)和对硝基苯酚(p-nitrophenol), 中国医药集团有限公司; 氧化型谷胱甘肽(GSSG), 西安雅图生物科技有限公司; 羟高铁血红素(hematin), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

紫外可见分光光度计, Shimadzu 公司; 高压匀浆破碎机和超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组 *E. coli* BL21(DE3)-pET-24a(+)-PeVP 构建及诱导表达

将 pET-24a(+)-PeVP 重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3), 选取阳性转化子接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 按照 5%的接种量转接至 50 mL TB 培养基中。待 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 分别加入 0、0.2、0.4 mmol/L 的 IPTG, 在 25 °C、200 r/min 培养 24 h, 测定菌体 OD₆₀₀ 并做 SDS-PAGE 鉴定, 观察不同 IPTG 浓度下的蛋白表达情况。在发酵培养过程中, 控制卡那霉素的工作浓度为 100 μg/mL。

1.2.2 重组酶 PeVP 包涵体变性

于 7 104×g 离心 10 min 收集菌体, 利用高压匀浆破碎机对菌体进行破壁处理并离心(8 000 r/min, 10 min)收集包涵体沉淀。将 PeVP 包涵体沉淀溶于 10 mL pH 8.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, 并加入 8 mol/L 尿素、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT 和 10% (质量体积分数)甘油, 4 °C 静置 4–5 h。利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒检测 PeVP 包涵体溶液的蛋白浓度, 适当稀释控制包涵体最终蛋白浓度在 0.3–0.4 mg/mL。

1.2.3 重组酶 PeVP 包涵体复性

如表 1 所示, 在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 0.5 mol/L 尿素、0.5 mmol/L GSSG、0.1 mmol/L DTT、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L CaCl₂、

表 1 PeVP 体外复性条件优化

Table 1 Optimization of refolding conditions of PeVP *in vitro*

No.	pH	Glycerol (%)	Hematin (μmol/L)	Urea (mol/L)	GSSG (mmol/L)	DTT (mmol/L)	CaCl ₂ (mmol/L)	EDTA (mmol/L)
1	8.5	0.0	10.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
2	8.5	0.0	5.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
3	8.5	10.0	10.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
4	8.5	10.0	5.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
5	9.5	0.0	10.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
6	9.5	0.0	5.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
7	9.5	10.0	10.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1
8	9.5	10.0	5.0	0.5	0.5	0.1	5.0	0.1

5–10 $\mu\text{mol/L}$ 的 hematin 和 0–10% (质量体积分数) 的甘油。设置正交试验优化复性体系, 探究 Tris-HCl 缓冲液 pH、甘油浓度和 hematin 浓度对复性效果的影响^[20]。取 3 mL 稀释后的 PeVP 包涵体变性溶液装入 14 kDa 的透析袋中, 按体积比 1:20 放入 60 mL 复性液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置透析 24 h。在透析后的 PeVP 酶液中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ hematin 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 7 104 \times g 离心 10 min, 取上清即可获得复性 PeVP 酶液。

1.2.4 体外复性重组酶 PeVP 酶学性质分析

以苹果酸-苹果酸钠为缓冲液(pH 2.0–8.0), 以 1 mmol/L Mn^{2+} 、1 mmol/L ABTS、10 mmol/L DMP、10 mmol/L 愈创木酚、10 mmol/L 丁香醛连氮和 20 mmol/L 藜芦醇为底物, 反应总体积为 1 mL。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 添加 0.1 mmol/L H_2O_2 启动反应, 利用紫外分光光度计动力学方法测定线性范围内(3–5 min) PeVP 作用于不同底物的 ΔOD , Mn^{2+} 、ABTS、DMP、愈创木酚、丁香醛连氮和藜芦醇的检测波长分别为 240、420、468、465、525 和 310 nm^[21]。在不同温度(20–80 $^{\circ}\text{C}$)和 pH 值(2.0–8.0)条件下进行酶活测定, 确定 PeVP 作用于不同底物的最佳温度和 pH 值。取 PeVP 原酶液分别在不同温度(30–70 $^{\circ}\text{C}$)培养 12、24、36、48、60 h, 研究 PeVP 在不同温度下的热稳定性; 取 PeVP 原酶液加入到不同 pH (2.0–7.0)的苹果酸-苹果酸钠缓冲液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别培养 24 h 和 48 h, 研究 PeVP 的 pH 值稳定性。PeVP 的温度和 pH 稳定性探究测定的均是 PeVP 的 Mn^{2+} 活性。

PeVP 的 Mn^{2+} 活性测定方法: 总反应体系为 1 mL, 包含 50 mmol/L (pH 4.5)的苹果酸缓冲液、1.0 mmol/L MnSO_2 溶液和 PeVP 酶液 50 μL 。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 加入 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 溶液启动反应, 连续观察反应最初 3 min 内 240 nm 处吸光度的变化 [$EM_{240}=6\ 500\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$],

PeVP 的 Mn^{2+} 酶活力定义为: 每分钟使 1 μmol 的 Mn^{2+} 转化为 Mn^{3+} 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.5 重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系优化

Mn(III)-有机酸络合体系的优化对于其氧化能力的提升及酚类污染物的持续降解意义重大。通过对有机酸种类(苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、草酸、酒石酸、乙酸)、有机酸浓度(10–100 mmol/L)、 Mn^{2+} 浓度(0–6 mmol/L)和 H_2O_2 浓度(0–0.6 mmol/L)进行优化, 探究了 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸最优络合体系。

1.2.6 重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系催化酚类模式底物氧化

为了比较不同 pH 条件下 PeVP 重组酶本身的低氧化还原位点及其介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对酚类底物的氧化降解能力, 选取 ABTS、DMP、愈创木酚和丁香醛连氮作为酚类污染物的模式底物, 探究不同条件下(pH 3.0、pH 4.5; 添加 Mn^{2+} 、未添加 Mn^{2+}) PeVP 对酚类模式底物的氧化性能。在未添加 Mn^{2+} 条件下[未形成 Mn(III)-有机酸络合体系], 分别测定 pH 3.0 和 pH 4.5 条件下 PeVP 本身的低氧化还原电势位点对 4 种酚类模式底物的直接氧化活性; 同时在添加 Mn^{2+} 条件下[形成 Mn(III)-有机酸络合体系], 分别测定 pH 3.0 和 pH 4.5 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对 4 种酚类模式底物的催化活性。检测方法同 1.2.4。

1.2.7 重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系催化常见酚类污染物氧化降解

选择苯酚、对苯二酚、间苯二酚和对硝基苯酚 4 种常见的酚类污染物作为 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系的降解底物。取 50 mL 锥形瓶, 加入 10 mL PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸的最优络合体系, 初始底物浓度为 500 mg/L, VP 加酶量为 0.014 mg/mL, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min

的水浴摇床反应 16 h。分别在 5、8、12 和 16 h 取样 1 mL 反应液至 EP 管中，用甲醇等体积稀释 2 倍，10 656×g 离心 2 min 后取上清液，经 0.22 μm 的有机相微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定酚类含量^[22]。

4 种酚类底物含量的测定：C18-wp (100 A, 5 μm, 4.6 mm×250 mm) 色谱柱，体积分数为 50% 的甲醇溶液为流动相，流速为 0.5 mL/min，柱温为 25 °C，进样量为 10 μL，检测波长为 270 nm。

2 结果与分析

2.1 重组酶 PeVP 的异源表达结果

重组酶 PeVP 摇瓶发酵 24 h 后，测得 OD_{600} 为 10.5，不同 IPTG 诱导浓度下的蛋白表达情况如图 1 所示，在破壁上清中(泳道 1、3 和 5)，重组酶 PeVP 有微弱的可溶性条带出现，但未

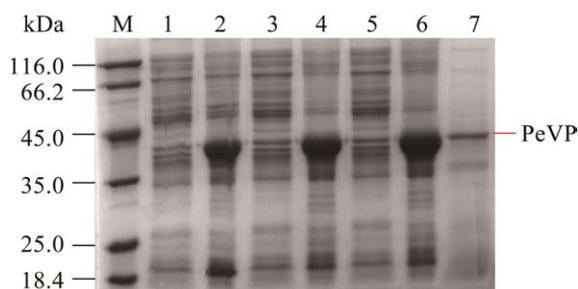


图 1 *E. coli* BL21(DE3)-PeVP 的 SDS-PAGE 图
M: 标准分子量标记; 1、3、5: 分别对应 IPTG 终浓度为 0、0.2、0.4 mmol/L 的 PeVP 细胞裂解上清液; 2、4、6: 分别对应 IPTG 终浓度为 0、0.2、0.4 mmol/L 的 PeVP 包涵体; 7: PeVP 复性溶液

Figure 1 SDS-PAGE of *E. coli* BL21(DE3)-PeVP. Lanes: M: Standard molecular weight marker; 1, 3, 5: Cell fragmentation supernatant of PeVP induced by 0, 0.2 and 0.4 mmol/L IPTG, respectively; 2, 4, 6: Inclusion body of PeVP induced by 0, 0.2 and 0.4 mmol/L IPTG, respectively; 7: Renaturation solution of PeVP.

检测到 Mn^{2+} 活性和 ABTS 活性。目标蛋白大部分是以包涵体的形式存在于破壁沉淀中(泳道 2、4 和 6)，在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 的诱导浓度下，包涵体条带最粗(泳道 6)，目标蛋白表达量最高。说明 PeVP 在 *E. coli* BL21(DE3) 中未能正确折叠。

2.2 重组酶 PeVP 的包涵体复性结果

由于结构中多对二硫键的存在及蛋白折叠的复杂性，目前 VP 的异源表达大多是以包涵体为主，需经过包涵体变性溶解后，再经过体外复性获得活性蛋白^[23-24]。实验表明，重组酶 PeVP 包涵体复性的效果受 pH、甘油浓度和 hematin 浓度影响较大。如图 2 所示，8 号为 PeVP 最佳复性条件：pH 9.5 Tris-HCl 缓冲液、0.5 mol/L 尿素、0.5 mmol/L GSSG、0.1 mmol/L DTT、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L $CaCl_2$ 、10% 甘油、5 μmol/L hematin，4 °C 静置透析 24 h，5 μmol/L hematin 孵育 12 h。复性 PeVP 出现了清晰可见的蛋白条带(图 1 第 7 泳道)。复性 PeVP 的 Mn^{2+} 催化活性为 10.14 U/mL，蛋白浓度为 0.29 mg/mL，比活为 34.97 U/mg。

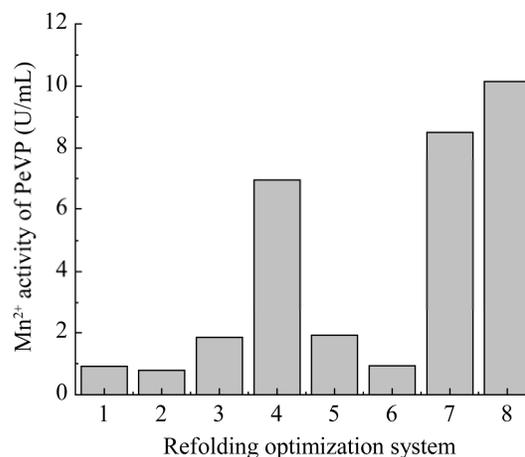


图 2 PeVP 复性条件优化 1-8: 表 1 中编号 1-8 复性体系对应的 PeVP Mn^{2+} 活性

Figure 2 Optimization of PeVP refolding conditions. 1-8: Mn^{2+} activity of PeVP corresponding to the renaturation system numbered 1-8 in Table 1.

2.3 体外复性重组酶 PeVP 的酶学性质分析结果

图 3A 和 3B 均以 PeVP 对每种底物的最高酶活定义为 100% 相对酶活, 图 3A 测定的是 PeVP 对不同底物的最适 pH, PeVP 以 Mn^{2+} 、ABTS、DMP、syringaldazine 和 guaiacol 为底物的最高酶活分别为 10.20、5.93、6.56、8.45 和 3.13 U/mL; 图 3B 测定的是 PeVP 对不同底物的最适温度, PeVP 以 Mn^{2+} 、ABTS、DMP、syringaldazine 和 guaiacol 为底物的最高酶活分别为 11.14、6.63、7.16、9.23 和 3.42 U/mL。图 3C 和图 3D 测定的是 PeVP 的 Mn^{2+} 活性, 以初始状态的酶活力定义为 100% 相对酶活, 初始酶

活均为 10.20 U/mL。

PeVP 对 Mn^{2+} 的最适 pH 值为 4.5, 对 ABTS、DMP、愈创木酚和丁香醛连氮的最适 pH 值均为 3.0。在 5 种底物的最佳 pH 条件下, 重组酶 PeVP 对 Mn^{2+} 的最适温度为 70 °C, 对 ABTS、DMP、愈创木酚和丁香醛连氮的最适温度均为 50 °C。PeVP 的 Mn^{2+} 结合位点决定了 Mn^{2+} 的催化活性, 由于 PeVP 中存在作用于低氧化还原电位底物的主要亚铁血红素通道位点, 因此对 ABTS、DMP、愈创木酚和丁香醛连氮等低氧化还原电位底物具有一定的氧化作用。复性后的 PeVP 未检测到氧化藜芦醇的活性, 怀疑复性后的 PeVP 未形成正确折叠的色氨酸催化位点。

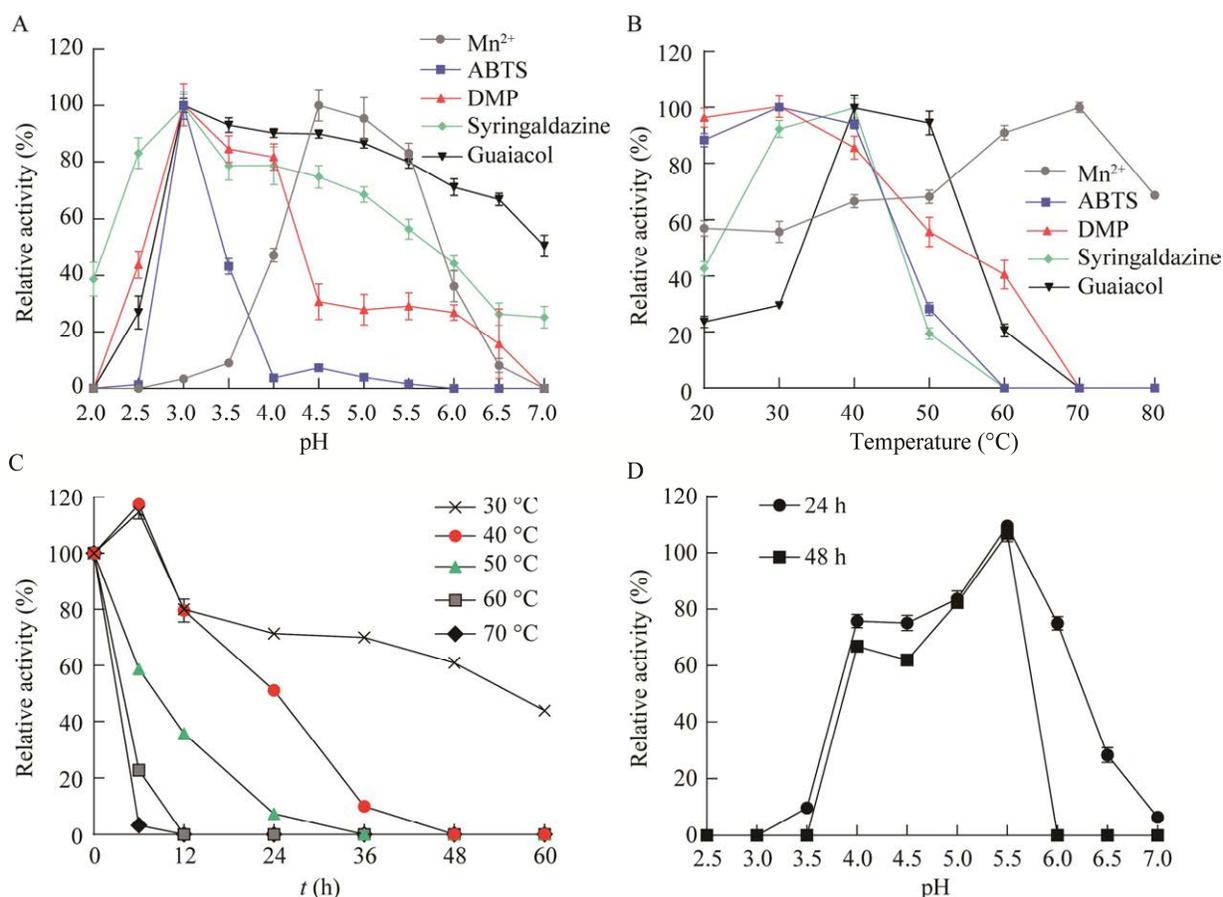


图 3 PeVP 的酶学性质 A: pH 对 PeVP 活性的影响; B: 温度对 PeVP 活性的影响; C: PeVP 热稳定性; D: PeVP pH 稳定性

Figure 3 Determination of enzymatic properties of PeVP. A: Effect of pH on the activity of PeVP; B: Effect of temperature on the activity of PeVP; C: Thermal stability of PeVP; D: pH stability of PeVP.

在 pH 4.5 条件下, PeVP 的热稳定性结果显示, PeVP 在低温条件下相对稳定, 温度越高 PeVP 的稳定性越差(图 3C)。30 °C 条件下, 24 h PeVP 的残留 Mn^{2+} 活性为 71.47%, 半衰期在 48–60 h 之间; 30 °C 和 40 °C 条件下, 重组酶 PeVP 6 h 的 Mn^{2+} 活性出现显著升高, 说明 PeVP 的 Mn^{2+} 催化位点在 30 °C 和 40 °C 条件下存在一定的热激活效应。在 30 °C 条件下, PeVP 的 pH 稳定性结果如图 3D 所示, 在 pH 5.5 时 PeVP 的稳定性最好, 相对酶活无明显下降; pH 低于 3.5 或 pH 高于 6.0 时 PeVP 的稳定性较差, 48 h 后基本丧失 Mn^{2+} 活性。

如图 4 所示, 在 Tris-HCl 缓冲液体系中, 通过全波长扫描未检测到 Mn(III) 及 Mn(III)-络合物, 生成的 Mn(III) 因不能与盐酸发生络合作用而迅速发生歧化反应; 而在苹果酸缓冲液体系中, 发现波长 275 nm 处出现明显的 Mn(III)-苹果酸络合物特征峰, 说明苹果酸可以与 PeVP 介导生成的 Mn(III) 发生络合作用, 形成 Mn(III)-苹果酸络合物, 防止 Mn(III) 的歧化并保

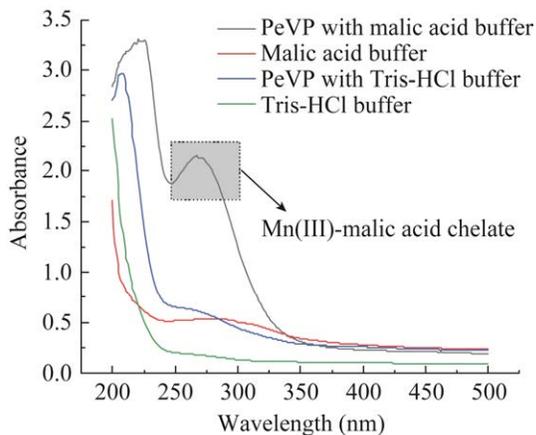


图 4 Mn(III)-有机酸络合物紫外-可见吸收光谱分析

Figure 4 Mn(III)-organic acid chelate as analyzed by UV-visible spectroscopy at the spectrums ranging from 200 to 500 nm.

留了 Mn(III) 的高氧化还原电位。因此, 苹果酸对于 PeVP 介导生成的 Mn(III) 具有重要的螯合保护作用, 有利于维持 Mn(III) 的高氧化还原电位, 在后期酚类底物的氧化降解体系中发挥着重要的作用。

2.4 体外复性重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系优化结果

Mn(III)-有机酸络合体系的氧化能力受缓冲液、 Mn^{2+} 浓度和 H_2O_2 浓度的影响。如图 5 所示, 以 PeVP 的 Mn^{2+} 最高酶活定义为 100% 相对酶活, 图 5A–5D 中的最高绝对酶活分别为 10.29、11.18、13.98 和 17.04 U/mL。通过络合体系优化, 确定了 PeVP 介导的最优的 Mn(III)-有机酸络合体系: 75 mmol/L 苹果酸缓冲液(图 5A 和图 5B)、6 mmol/L Mn^{2+} (图 5C) 和 0.2 mmol/L H_2O_2 (图 5D)。Mn(III)-有机酸络合体系的催化活性随着 Mn^{2+} 浓度的增大而升高, 并逐步趋于平缓; 在 H_2O_2 浓度为 0.2 mmol/L 时, Mn(III)-有机酸络合体系的催化活性显示最高水平, 过高的 H_2O_2 浓度会抑制 Mn(III)-有机酸络合体系的催化活性。

2.5 体外复性重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对酚类模式底物的氧化结果

研究选取 ABTS、DMP、愈创木酚和丁香醛连氮作为酚类污染物的模式底物, 比较了不同 pH 条件下 PeVP 重组酶本身的低氧化还原位点及其介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对酚类模式底物的催化能力。如图 6 所示, 以 Mn(III)-苹果酸络合体系对每种酚类底物的最高酶活定义为 100% 相对酶活, Mn(III)-苹果酸络合体系对 ABTS、DMP、guaiacol 和 syringaldazine 的最高酶活分别为 9.74、10.56、5.11 和 13.63 U/mL。在 pH 3.0、添加 Mn^{2+} 条件下, PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合体系的氧化能力略低于

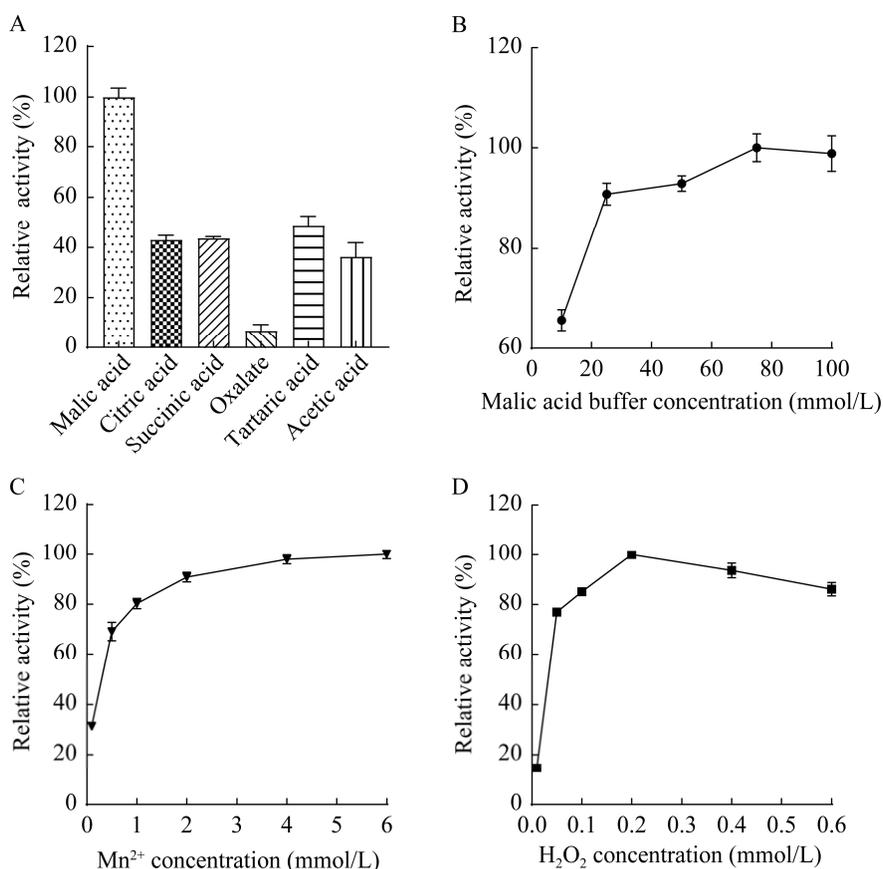


图 5 PeVP 介导 Mn(III)-有机酸络合体系优化 A: 有机酸缓冲液类型的优化; B: 有机酸缓冲液浓度的优化; C: Mn²⁺浓度优化; D: H₂O₂ 浓度优化

Figure 5 Optimization of Mn(III)-organic acid chelate system. A: Optimization of organic acid types; B: Optimization of malic acid concentration; C: Optimization of Mn²⁺ concentration; D: Optimization of H₂O₂ concentration.

PeVP 本身亚铁血红素通道对于酚类底物的氧化能力, 推测是 Mn²⁺ 的加入在一定程度上抑制了 PeVP 的亚铁血红素通道位点的活性; 而在 pH 4.5、添加 Mn²⁺ 条件下, Mn(III)-苹果酸络合体系的氧化活性可提高至 PeVP 对酚类底体系直接氧化活性的 1.5–7.5 倍, 说明弱酸环境(pH 4.5)对 Mn(III)-苹果酸络合体系氧化能力的重要性。未添加 Mn²⁺ 时, PeVP 在强酸性条件(pH 3.0)对 4 种酚类底物的直接氧化活性高于弱酸性条件, 然而

PeVP 在强酸性条件下的稳定性较差(图 3D), 24 h 已经失去了全部的催化能力, 相比之下酶在弱酸性条件下稳定性较好, 48 h 仍能保留 60% 活力以上, 展现出较高的 Mn²⁺ 催化活性。而且在水体污染物处理过程中, 弱酸性条件相比强酸性条件更易实现, 酶催化氧化可行性更高。因此, 在弱酸性条件下(pH 4.5), PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合体系相比强酸条件下(pH 3.0) PeVP 本身的低氧化还原位点对酚类污染物的降解具有更大的应用价值。

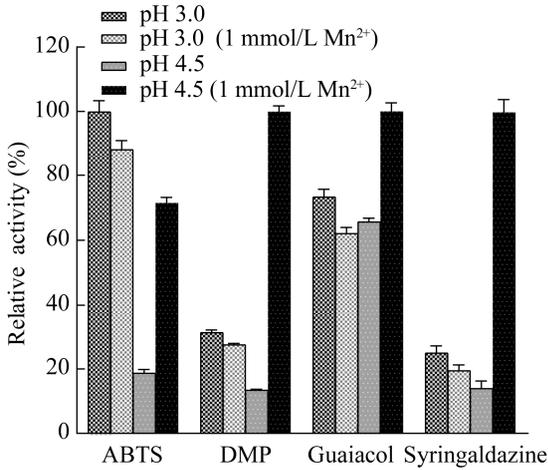


图 6 Mn(III)-苹果酸络合体系对酚类模式底物的氧化

Figure 6 Oxidation of phenolic model compounds by Mn(III)-malic acid chelate system under different pH conditions.

2.6 体外复性重组酶 PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合体系对常见酚类污染物的氧化降解结果

通过酚类模式底物的氧化探究可知,在较稳定的弱酸性环境中(pH 4.5),PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对酚类污染物的降解具有较大的潜能。为了进一步确定 PeVP 在较稳定的弱酸性环境中(pH 4.5)对常规酚类污染物的氧化降解能力,以 PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合物为氧化介质,在 pH 4.5 的弱酸条件下对苯酚、对硝基苯酚、间苯二酚、对苯二酚 4 种酚类污染物进行催化氧化。如图 7 所示,苯酚、对苯二酚、间苯二酚和对硝基苯酚的平均降解速率分别为 10.91、10.69、6.50、5.71 mg/(L·h)。0-4 h 内,酚类底物的降解速率较快,随着反应时间的延长,5-16 h 酚类污染物的降解速率逐渐变慢,16 h 之后已无明显降解现象。

3 讨论与结论

目前,酚类污染物的生物降解大部分属于

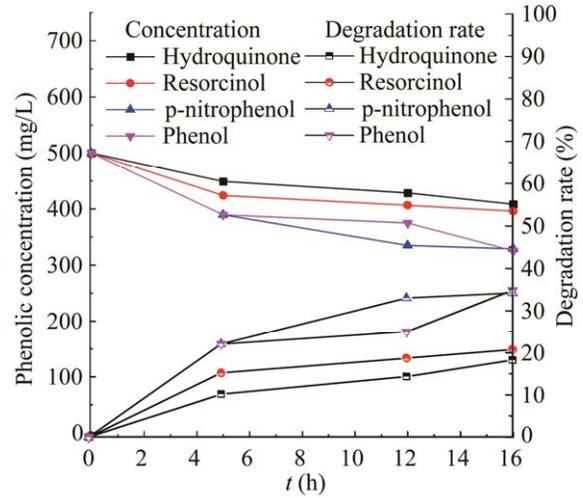


图 7 Mn(III)-苹果酸络合体系对酚类污染物的降解特性

Figure 7 Phenolic pollutants degradation characteristics of Mn(III)-malic acid chelate system.

微生物降解^[25]。利用矿质盐培养基溶液并以壬基酚为唯一碳源分离得到一株壬基酚高效降解菌 NP-1,培养 10 d 时对壬基酚的降解率是 65%,10 d 以后基本不再降解^[26];从李村河口底泥样品中分离出的两株真菌(W-1 和 W-2)培养 28 d 对壬基酚的降解率可达到 95%^[27]。尽管微生物对酚类物质的降解已取得明显效果,但微生物降解系统仍存在降解反应复杂、降解时间长、降解效率低等问题。辣根过氧化物酶和漆酶等相关酶类在酚类降解方面已取得了明显的效果^[28-29],与其他酶类降解体系相比,本研究中 PeVP 介导的 Mn(III)-苹果酸络合体系在降解率方面暂未达到漆酶、辣根过氧化物酶的水平,但随着降解体系的进一步优化(加酶量和 H₂O₂ 补加量),降解率会有所提高。Sun 等近期的研究发现,使用亚硫酸氢钠还原高锰酸钾可生成非络合态的可溶性 Mn(III),在处理有机污染物过程中表现出较高的反应活性^[30],而本研究提供了一种新的酚类污染物解决方案:由生物酶(PeVP)介导的 Mn(III)-苹果酸络合体系对酚类污染物

的降解。

本研究成功实现了在较温和的弱酸性条件 (pH 4.5) 下对酚类污染物的氧化降解。在酚类污染物的降解过程中, Mn(III)-苹果酸络合物的形成发挥着至关重要的作用, 这一过程发生于 PeVP 的 Mn^{2+} 结合催化位点^[18], 如图 8 所示, PeVP、 Mn^{2+} 、 H_2O_2 和苹果酸缓冲液组成了 PeVP 的催化循环体系, H_2O_2 可以启动反应的发生, 在 PeVP 的催化循环过程中, 二价锰离子可以作为电子供体被氧化形成三价锰离子, 三价锰离子迅速与溶液中的苹果酸形成 Mn(III)-苹果酸络合物, 该 Mn(III)-苹果酸络合物具有较高的氧化还原电位, 以实现酚类底物的氧化降解^[15,18]。

漆酶具有能传递电子的铜离子, 能将酚类化合物羟基上的电子脱去, 使其形成酚氧自由

基致使酚类化合物降解, 而本研究中 PeVP 介导生成的 Mn(III)-苹果酸络合物具有更高的氧化还原电位和更强的传递电子的能力, 因此推测 Mn(III)-苹果酸络合物同样可以夺取酚类污染物上的电子, 产生酚氧自由基和苯环碳自由基中间体, 一方面自由基中间体可以发生偶联聚合反应, 另一方面自由基中间体经过电子重排和 C-C 键的断裂, 可导致酚类物质的氧化降解, 产生短链的低分子化合物。主要预测产物包括一些酚类聚合物和酮类、酸类、醛类等小分子断裂产物, 与酚类污染物相比, 这些降解产物生物毒性大大降低, 对环境的污染较小。

如上所述, 0-16 h 内 PeVP 介导的 Mn(III)-有机酸络合体系对苯酚、对苯二酚、间苯二酚和对硝基苯酚这 4 种酚类污染物的平均降解速率分别为 10.91、10.69、6.50、5.71 mg/(L·h)。本

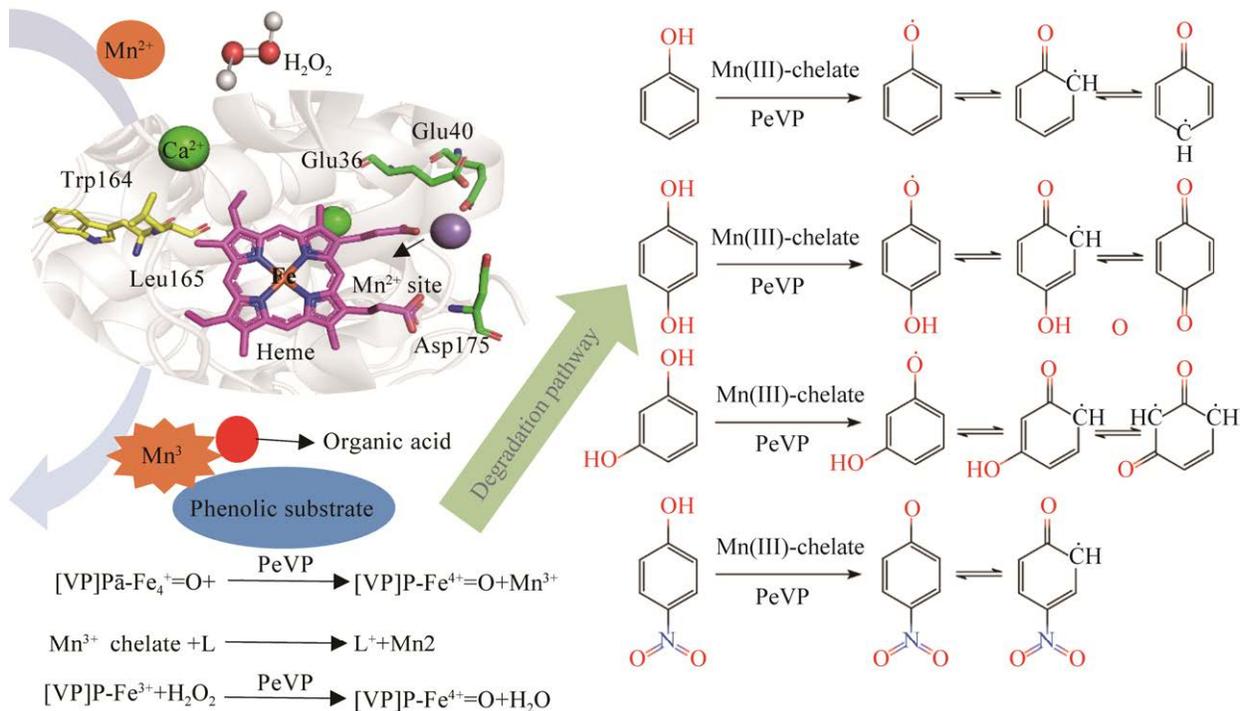


图 8 Mn(III)-有机酸络合体系酚类化合物氧化途径 P: 卟啉环; L: 酚类底物

Figure 8 The oxidation pathway of phenols by Mn(III)-organic acid chelate system. P: Porphyrin ring group; L: Phenolic substrate.

文为酚类有机污染物提供了新的生物解决方案及思路,为各种类型的VP和MnP应用于酚类污染物降解研究及筛选具有较强酚类污染物降解能力的Mn(III)-有机酸络合体系奠定基础;同时,PeVP介导的Mn(III)-苹果酸络合体系对酚类污染物的氧化降解,是由生物酶(PeVP)介导的一种催化剂[Mn(III)-苹果酸络合物]所引发的一种催化循环机制,是介于生物酶类降解和化学催化降解之间的一种方法,综合了生物法和化学法的优点,可实现酶的循环利用,同时也避免了化学催化剂降解所造成的二次污染问题。因此,在未来的酚类污染物的降解中,Mn(III)-有机酸络合体系将具有很大的应用潜力。

REFERENCES

- [1] 承海, 李杨, 邢家溧, 张书芬, 郑睿行, 应璐, 曹丽丽, 毛玲燕. 水产品中常见酚类化合物检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 449-454
Cheng H, Li Y, Xing JL, Zhang SF, Zheng RX, Ying L, Cao LL, Mao LY. Research progress on detection methods of common phenolic compounds in aquatic products[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(2): 449-454 (in Chinese)
- [2] 赵晗, 艾仕云, 丁葵英, 郝莹, 孙军, 李建军. 酚类污染物的危害及其检测技术研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2015, 25(6): 66-68
Zhao H, Ai SY, Ding KY, Hao Y, Sun J, Li JJ. Research progress on the detection of harm of phenolic compounds[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2015, 25(6): 66-68 (in Chinese)
- [3] 汤先伟, 金一和, 张颖花, 池田, 齐藤宪光. 沈阳市自来水中的烷基酚类污染物[J]. 环境与健康杂志, 2005, 22(3): 190-191
Tang XW, Jin YH, Zhang YH, Chi T, Qiteng XG. Alkyl pheols in tap water in Shenyang[J]. Journal of Environment and Health, 2005, 22(3): 190-191 (in Chinese)
- [4] 罗舜钦. 环境水中酚类有机污染物的光降解实验研究[D]. 北京: 中国地质大学(北京)硕士学位论文, 2017
Luo SQ. Experimental study on photodegradation of phenolic organic pollutants in water[D]. Beijing: Master's Thesis of China University of Geosciences, 2017 (in Chinese)
- [5] 刘太胜, 姜运林, 蒋宇霞, 邓瀚鏊, 孙凯峰. 烷基酚和双酚A的生物毒性及藻类降解研究进展[J]. 广东化工, 2021, 48(15): 146-148, 126
Liu TS, Jiang YL, Jiang YX, Deng HQ, Sun KF. Toxicity and algal biodegradation of alkylphenol and bisphenol A[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(15): 146-148, 126 (in Chinese)
- [6] 孙秋瑾, 杨亲正. 酚类污染物的生物降解研究进展[J]. 广州化工, 2013, 41(8): 47-49
Sun QJ, Yang QZ. The research progress of biodegradation of phenolic pollutants[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2013, 41(8): 47-49 (in Chinese)
- [7] Xie XH, Liu JS, Jiang ZB, Li HN, Ye M, Pan H, Zhu JW, Song HT. The conversion of the nutrient condition alter the phenol degradation pathway by *Rhodococcus biphenylivorans* B403: a comparative transcriptomic and proteomic approach[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(40): 56152-56163
- [8] 欧阳科, 谢珊, 赵雅, 王雷超, 方琪惠. 磁性 Fe₃O₄/石墨烯异质结固定漆酶特性及其对水中双酚A的降解研究[J]. 生态环境学报, 2015, 24(1): 106-112
Ouyang K, Xie S, Zhao Y, Wang LC, Fang QH. Catalytic capacity and enzymatic characteristics of immobilized laccase on magnetic Fe₃O₄/graphene hybrids for bisphenol A degradation[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2015, 24(1): 106-112 (in Chinese)
- [9] 杨静, 蒋剑春, 张宁, 徐浩, 解静聪, 赵剑. 微生物降解木质素的研究进展[J]. 生物质化学工程, 2021, 55(3): 62-70
Yang J, Jiang JC, Zhang N, Xu H, Xie JC, Zhao J. Research progress on lignin degradation by microorganism[J]. Biomass Chemical Engineering, 2021, 55(3): 62-70 (in Chinese)
- [10] Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(2/3): 125-135
- [11] Jeyakumar D, Chirsteen J, Doble M. Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 78-85
- [12] 张亚. 可溶性 Mn(III)与典型有机污染物作用机理研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2017.
Zhang Y. Reaction mechanisms of dissolved Mn(II) and typical organic contaminants [D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2017 (in Chinese)
- [13] Mohorčič M, Benčina M, Friedrich J, Jerala R.

- Expression of soluble versatile peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 851-858
- [14] Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 354(2): 385-402
- [15] Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Pérez-Boada M, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT. Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: a site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(1): 66-77
- [16] Mester T, Field JA. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(25): 15412-15417
- [17] Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 60(2): 441-452
- [18] Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 871-897
- [19] Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Pérez-Boada M, Martínez MJ, Martínez AT. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2001, 29(2): 116-122
- [20] Wang N, Ren K, Jia R, Chen WT, Sun RR. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes[J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 87
- [21] 宋倩, 邓勋, 宋瑞清. 糙皮侧耳多功能过氧化物酶基因异源表达及其对玉米秸秆木质素的降解[J]. *吉林农业大学学报*, 2022. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1100.s.20200603.0944.001.html>
- Song Q, Deng Y, Song RQ. Expression of a *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase gene in *Pichia pastoris* and its degradation of corn stover lignin [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2022. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1100.s.20200603.0944.001.html> (in Chinese)
- [22] 阮国洪. 水中苯酚、苯二酚和苯三酚的高效液相色谱分析方法的研究[J]. *环境与健康杂志*, 2002, 19(1): 64-65
- Ruan GH. Determination of phenol, benzenediol and benzenetriol in water by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Environment and Health*, 2002, 19(1): 64-65 (in Chinese)
- [23] Eggenreich B, Willim M, Wurm DJ, Herwig C, Spadiut O. Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies: a review[J]. *Biotechnology Reports*, 2016, 10: 75-83
- [24] Manavalan T, Manavalan A, Heese K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(4): 485-498
- [25] 蔡倩倩, 冉新新, 郭南南, 张心青, 田杰伟. 苯酚高效降解复合菌的构建及应用研究[J]. *当代化工*, 2021, 50(10): 2398-2402
- Cai QQ, Ran XX, Guo NN, Zhang XQ, Tian JW. Construction of a high-efficient phenol degradation bacterial consortium and its application[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2021, 50(10): 2398-2402 (in Chinese)
- [26] 李旭春, 刘桂芳, 马军, 邵晓玲. 1 株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(1): 231-236
- Li XC, Liu GF, Ma J, Shao XL. Isolation, identification and biodegradation characteristics of a bacterial strain able to degrade nonylphenol[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 231-236 (in Chinese)
- [27] 马燕燕. 李村河口底泥来源真菌对壬基酚的降解特性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- Ma YY. The study of nonylphenol biodegradation by estuary sediment derived fungi from Licun river[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 (in Chinese)
- [28] 宁甲练, 陈志莉, 汪楚依, 谢文静. 固定化漆酶降解水中酚类污染物的研究进展[J]. *水处理技术*, 2019, 45(2): 13-17
- Ning JL, Chen ZL, Wang CY, Xie WJ. Research progress of immobilized laccases for phenolic contaminants degradation in water[J]. *Technology of Water Treatment*, 2019, 45(2): 13-17 (in Chinese)
- [29] 张丽华. 辣根过氧化物酶在酚类废水中的应用[J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2012, 28(3): 35-39
- Zhang LH. Applications of horseradish peroxidase in the phenolic wastewater[J]. *Journal of Shanxi Datong University: Natural Science Edition*, 2012, 28(3): 35-39 (in Chinese)
- [30] Sun B, Guan XH, Fang JY, Tratnyek PG. Activation of manganese oxidants with bisulfite for enhanced oxidation of organic contaminants: the involvement of Mn(III)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(20): 12414-12421