

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-027

过氧化物酶的重组表达和应用研究进展

李庚, 申晓林, 孙新晓, 王佳, 袁其朋

(北京化工大学生命科学与技术学院, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029)

摘要: 过氧化物酶作为一类自然界中广泛分布的酶, 参与了生物体的先天免疫防疫、植物微生物抗氧化应激、真菌木质素降解、植物细胞壁代谢及伤口愈合等重要生命过程。随着测序、基因编辑、重组蛋白表达和高通量筛选技术的飞速发展, 越来越多的过氧化物酶被发现、表征和重组表达。这些种类丰富、数量庞大及催化性能卓越的过氧化物酶, 在众多领域的应用研究中受到广泛关注。近年来过氧化物酶在重组表达上取得了显著进展, 进一步促进了其在应用研究领域的开发。本文从系统进化分类及功能角度对过氧化物酶进行了简要概述, 对近年来过氧化物酶在大肠杆菌、酵母和丝状真菌中重组表达研究进展及其在环境修复、化合物检测的应用研究成果进行系统综述, 重点介绍了过氧化物酶应用于生物合成高附加值化合物方面的最新研究进展, 并对其目前在应用领域应用中存在的底物和产物非专一性问题及辅因子 H_2O_2 细胞毒性问题进行讨论。过氧化物酶在医学检测、环境保护和生物合成等领域中的应用潜力巨大。然而, 当前的技术和应用仍面临一些挑战, 比如过氧化物酶在复杂环境中的稳定性和活性差、酶制剂生产成本高及专一性差问题。未来, 通过结合蛋白质工程、合成生物学和固定化技术等多学科的最新进展, 可以有效解决这些挑战, 推动过氧化物酶在各个领域的广泛应用。

关键词: 过氧化物酶; 蛋白重组表达; 污染物降解; 化合物检测; 生物合成

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Research progress in recombinant expression and application of peroxidases

LI Geng, SHEN Xiaolin, SUN Xinxiao, WANG Jia, YUAN Qipeng

(State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, College of Life Science and Biotechnology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: As a class of enzymes widely distributed in nature, peroxidases are involved in important life processes such as innate immunity and epidemic prevention of organisms, anti-oxidative stress of plant microorganisms, fungal lignin degradation, plant cell wall metabolism and wound healing. With the rapid development of DNA sequencing, gene editing, recombinant protein expression and high-throughput screening technologies, more and more peroxidases

收稿日期: 2024-03-21 修回日期: 2024-06-28

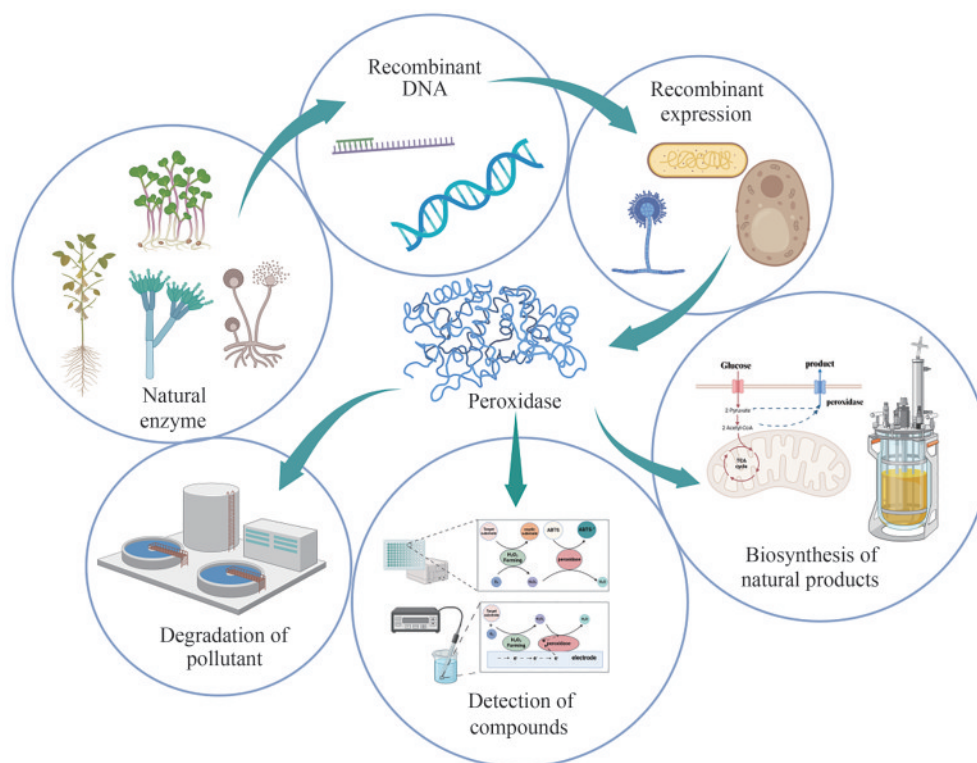
基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2106100); 国家自然科学基金 (22378016)

引用本文: 李庚, 申晓林, 孙新晓, 王佳, 袁其朋. 过氧化物酶的重组表达和应用研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(6): 1498-1517

Citation: LI Geng, SHEN Xiaolin, SUN Xinxiao, WANG Jia, YUAN Qipeng. Research progress in recombinant expression and application of peroxidases[J].

Synthetic Biology Journal, 2024, 5(6): 1498-1517

have been discovered, characterized and recombinantly expressed. These peroxidases, characterized by their species diversity, abundant quantity, and excellent catalytic performance, have attracted extensive attention in many fields of application research. In recent years, remarkable progress has been made in the recombinant expression of peroxidases, further promoting their development in the field of applied research. Additionally, as we deepen our understanding of the catalytic properties of peroxidases, new opportunities have emerged for their application in the field of biosynthesis. Their high catalytic activity allows for rapid oxidation reactions under mild conditions and enables the construction of multi-enzyme cascade systems in conjunction with other enzymes, thereby facilitating the efficient synthesis of complex compounds. This paper provides a brief overview of peroxidases from the perspective of systematic evolutionary classification and function. It systematically reviews recent progress in the recombinant expression of peroxidases in *Escherichia coli*, yeast, and fungi, as well as their application achievements in environmental remediation and compound detection. The focus is on the latest research advances in the application of peroxidases for the biosynthesis of high-value-added compounds. The paper also discusses the current issues in this field, such as substrate and product non-specificity and the cytotoxicity of the cofactor H_2O_2 . Peroxidases have enormous potential for applications in medical diagnostics, environmental protection, and biosynthesis. However, current technologies and applications still face several challenges, such as the stability and activity of peroxidases in complex environments, high production costs of enzyme preparations, and poor specificity. In the future, by integrating the latest advances in protein engineering, synthetic biology, and immobilization technology, these challenges can be effectively solved, promoting the widespread application of peroxidases across various fields.



Keywords: peroxidase; protein recombinant expression; degradation of pollutants; detection of compounds; biological synthesis

1 过氧化物酶概述

过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是能够以 H_2O_2 或其他过氧化物 (ROOH) 为电子受体催化底物发生氧化反应的一类酶。POD 在生物界中的分布极为广泛, 自其在 19 世纪被发现和命名之后的 200 年里, 人们在动物、植物和真菌中陆续发现了种类和数量极为丰富的 POD。据数据库 RedoxiBase

统计, 目前已在近 3 000 种生物中发现了 16 000 余种 POD^[1]。按照数据库中的系统进化分类, POD 根据有无血红素辅基分为血红素 POD 和非血红素 POD 两大类, 其中血红素 POD 数量占据了总数的 84.8% (图 1)。血红素 POD 进一步分为过氧化物酶-环氧化酶超家族、非动物 POD 和其他血红素 POD, 而其中 88.9% 属于非动物 POD。过氧化物酶-环氧化酶超家族最初的成员仅包括乳过氧化物

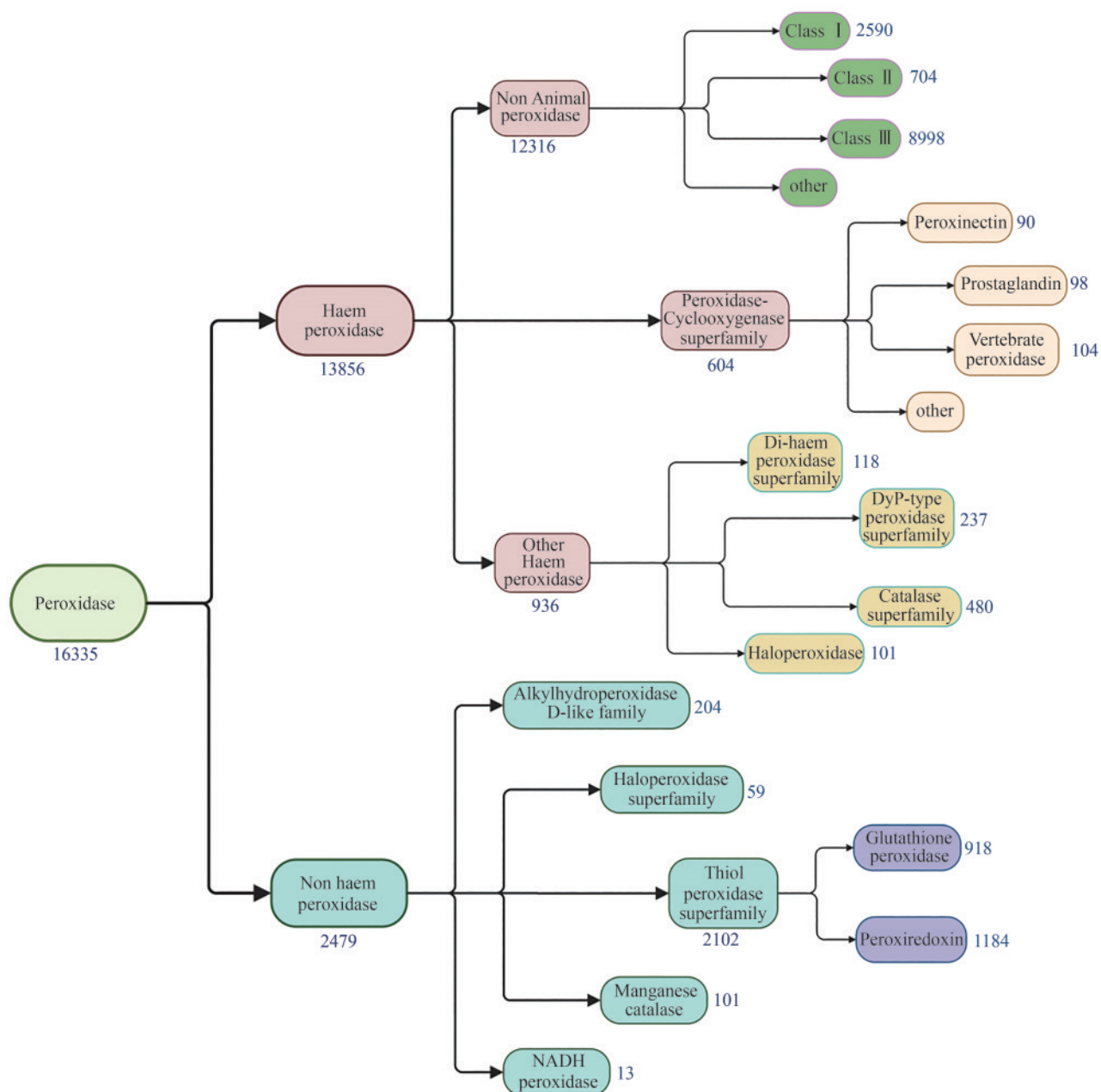


图 1 RedoxiBase 数据库中统计的 POD 系统进化分类和数量分布

Fig. 1 Phylogenetic classification and quantitative distribution of POD counted in the RedoxiBase database

酶、髓过氧化物酶、脊椎动物过氧化物酶和甲状腺过氧化物酶，所以在之前一度被归类于动物POD家族，但随着测序技术发展，发现了许多非动物来源的序列相似蛋白（如细胞黏附蛋白、过氧蛋白和环氧化酶等），这些酶被划分到一个更大的超家族。根据酶的系统进化分析，过氧化物酶-环氧化酶超家族成员是生物体先天免疫防御系统的基础，这些酶在生物体形成获得性免疫之前通过反应生成抗菌物质以抵抗病原体入侵^[2]。

非动物POD作为占据血红素POD绝大部分的家族还可以分为三个重要的类别，即I类、II类和III类POD。I类POD存在于包括植物、真菌和细菌的所有非动物生物体，包括抗坏血酸过氧化物酶（APx）、过氧化氢酶（CP）、细胞色素C过氧化物酶（CcP）和抗坏血酸-细胞色素C过氧化物酶（APx-CcP），这些酶在生物体抗氧化应激过程中发挥重要作用。例如，APx在高等真核生物中（如植物叶绿体），能够以抗坏血酸为还原等价物将 H_2O_2 进行清除^[3]。主要存在于细菌中的CP具备过氧化物酶和过氧化氢酶混合活性，不仅可以降解高浓度的 H_2O_2 ，还可以减轻生物体由于自由基或活性氧（ROS）的形成而表现出的氧化应激^[4]。另外，CcP不仅可以以细胞色素为还原等价物清除 H_2O_2 ，还能够充当线粒体信号蛋白和过氧化物传感器，引导细胞对 H_2O_2 浓度进一步的严密调控^[5]。II类

过氧化物酶是真菌所特有的过氧化物酶，包括木质素过氧化物酶（LiP）、锰过氧化物酶（MnP）和多功能过氧化物酶（VP），这些过氧化物酶在真菌降解木质素的过程中发挥主要作用^[6-7]。III类POD是植物特有的POD，包括辣根过氧化物酶（HRP）、花生过氧化物酶（PNP）、大豆过氧化物酶（SBP）都属于该类别。III类POD数量极为丰富，截至目前，在数据库RedoxiBase中收录的III类POD多达8998个，数量约占非动物POD总数的75%。III类过氧化物酶在植物生命周期中起着至关重要的作用，参与了广泛的生理过程，如细胞壁代谢、木质化、亚木质化、生长素代谢、伤口愈合、ROS和活性氮（RNS）代谢、果实生长和成熟等^[8-16]。

虽然POD在系统进化上分为很多个类别，但它们在分解过氧化物的过程中普遍都有相似的催化机制。例如，血红素POD催化反应大致分为三个过程，首先是过氧化物与血红素中的铁发生配位，然后迅速脱去1分子水生成半稳定中间体Compound I，中间体Compound I能够使一分子底物失去一个电子并形成自由基和Compound II，Compound II随后吸收1分子底物的电子而还原成静息状态（图2）。整个过程是一个具有三个不同步骤的双电子氧化还原反应，最终POD还原了1分子过氧化物并使2分子底物失去电子形成自

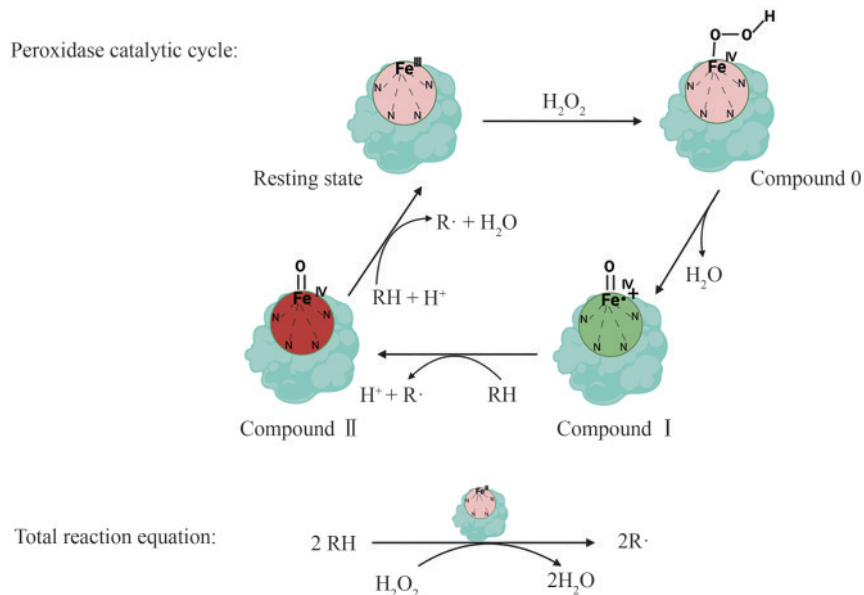


图2 POD催化机制

Fig. 2 The catalytic mechanism of POD

由基^[17]。

目前最广泛应用的过氧化物酶主要是Ⅱ类POD(如MnP、LiP)和Ⅲ类POD(如HRP、SBP),这些POD具备广泛的底物特异性和较高的稳定性,使其在有机污染物降解和化合物检测及生物合成中具备应用潜力。近年来,POD的重组表达及其应用取得了较大的进展,但目前缺乏系统的总结和归纳。本文从POD在大肠杆菌、酵母、丝状真菌等宿主中的重组表达,POD应用于有机物降解和检测,POD应用于生物合成高附加值化合物等角度概述了最新研究进展,重点讨论了将POD应用于环境保护和绿色生物制造等领域的未来发展前景和目前面临的挑战。

2 重组过氧化物酶的表达

POD虽然在很多领域中都有广泛应用,但其在商业酶市场中的主要来源仍然是天然酶提取。天然来源的POD通常包含不同同工酶的混合物,其产量难以提高,给进一步应用开发造成阻碍。随着DNA重组技术和大规模生物发酵技术的成熟及重组蛋白的分离、纯化和胞外输出技术方面的发展,重组POD展示出广阔的商业应用前景。目前,大肠杆菌、酵母和丝状真菌是研究重组POD异源表达最常使用的宿主。表1整理和总结了近年来部分关键的POD重组表达研究进展。

2.1 在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌因其生长速度快、重组蛋白表达速率高、生产成本低且菌株易于转化和筛选等诸多优点,成为目前最常用的重组蛋白表达宿主。蛋白质数据库(PDB)里已解析三维结构的蛋白质中,大约有80%可在大肠杆菌表达系统中表达^[33]。此外,POD通常选择在大肠杆菌中表达,主要因为其在大肠杆菌中的表达不会像在其他表达宿主(如酵母)中那样产生高糖基化现象。正因如此,许多新发现的POD得以通过大肠杆菌表达系统被成功鉴定和表征。例如,Wang等^[34]在南极嗜冷细菌假互变单胞菌中发现的谷胱甘肽过氧化物酶(PsGPx),Liao等^[35]在青岛文昌鱼中发现的硫氧

还蛋白过氧化物酶(Bbt-TPx1),Khan等^[36]在造纸厂制浆车间分离的一株芽孢杆菌中发现的DyP型过氧化物酶(DyPBL5)、Chen等^[37]在腐烂的木屑堆分离的一株白腐真菌(*lacteus* F17)中发现的锰过氧化物酶(II-MnP),Fattahian等^[38]在群心菜中发现的群心菜过氧化物酶(LDP),等等。

辣根过氧化物酶(HRP)以其广泛的底物选择性、高催化活性和高稳定性在植物界中脱颖而出,成为分析生物化学和生物技术领域中的关键标记酶,广泛应用于抗体、DNA和低分子量化合物的免疫化学检测^[39]。然而,尽管大肠杆菌表达系统具备诸多优势,其原核特性导致无法对蛋白质进行二硫键形成、磷酸化、糖基化和脂肪酸酰化等翻译后修饰,这些修饰对于蛋白质高级结构的形成至关重要^[40]。因此,HRP这种具有4个二硫键和9个糖基化位点的蛋白质,在大肠杆菌中往往以无活性、不溶性的包涵体形式表达。为解决这一问题,研究者们曾尝试通过定向进化方法,如随机突变和基因重组,以期获得能够在大肠杆菌中活性表达HRP的突变体。尽管这种方法在一定程度上改善了HRP的蛋白质折叠,但获得具有工业应用潜力的突变体仍然极具挑战性。经过定向进化筛选出的最佳突变体产量仅为110 μg/L^[18],远不能满足实际应用需求。随后,研究者们转向了体外重折叠复性技术,这是一种通过改变体外条件使大肠杆菌中表达的包涵体重新折叠成活性蛋白质的方法。Asad等^[19]通过响应面分析法优化了HRP包涵体的重折叠条件,发现在特定条件下(0.35 mmol/L GSSG, 0.044 mmol/L DTT, 7%甘油, 1.7 mol/L 尿素, 2 mmol/L CaCl₂和 20 mmol/L pH 8.5的 Tris 溶液),重折叠复性的HRP能够达到10 U/mg的比酶活。然而,这种方法仍然面临着重折叠率低和蛋白稳定性差的问题,需要进一步的优化和改进。另一种策略是尝试在大肠杆菌的周质空间中表达活性的HRP。这通常通过将HRP的N末端与DsbA蛋白融合,并利用信号识别颗粒(SRP)途径将融合蛋白转运至周质中来实现。然而,这种方法的效果并不理想,与体外重折叠方法相比,周质中表达的HRP的产量和比酶活更低^[20]。在最新的研究中,研究者们提出了一种新的方法。他们通过将HRP与大肠杆菌的磷酸甘油

表1 重组过氧化物酶表达研究进展

Table 1 Research progress of recombinant peroxidase expression

表达宿主	过氧化物酶	表达方式和策略	表达效果	参考文献
大肠杆菌	HRP	周质表达,通过定向进化提高酶表达活力	表达量 110 mg/L 酶活力 140 U/L	[18]
大肠杆菌	HRP	胞内表达,纯化的包涵体通过体外重折叠复性	比酶活 10 U/mg	[19]
大肠杆菌	HRP	胞内表达,纯化的包涵体通过体外重折叠复性	表达量 1000 mg/L 比酶活 62.5 U/mg	[20]
大肠杆菌	HRP	周质表达,通过将 HRP 的 N 末端与 DsbA 蛋白融合,利用 SRP 途径将融合蛋白转运至周质	表达量 48 mg/L 比酶活 12.7 U/mg	[20]
大肠杆菌	HRP	胞内表达,通过与甘油酸激酶(PGK)融合表达实现可溶性过量表达,重组蛋白与钙离子、氯化血红素和氧化型谷胱甘肽一起简单孵育后激活活性	酶回收量 72 mg/L 比酶活为商业酶的 60%	[21]
大肠杆菌	MnP	胞内表达,纯化的包涵体通过体外重折叠复性	酶活力 345 U/L 比酶活 3.63 U/mg	[22]
大肠杆菌	MnP	胞内表达,通过在细胞培养物中加入化学物质(0.25% Triton X-100、0.25% Tween-80、0.5% 甘油和 1% 乙醇)改善蛋白溶解度	酶活力 310 U/L 比酶活 0.441 U/mg	[22]
大肠杆菌	MnP	胞内表达,通过密码子优化、冷休克启动子的控制表达、培养过程中连续添加血红素及共表达伴侣蛋白改善蛋白溶解度	表达量 30 mg/L $k_{cat}/K_m=406 \text{ L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$	[23]
大肠杆菌	MnP	胞内表达,通过共表达二硫键异构酶 DsbC 改善 MnP 的溶解度	比酶活 445 U/mg	[24]
毕赤酵母	MnP	周质表达,与 α 因子前导序列的融合表达	酶活力 48 U/L 比酶活 42 U/mg	[25]
酿酒酵母	HRP	周质表达,通过定向进化提高酶表达活力	酶活力 1080 U/L	[26]
毕赤酵母	HRP	周质表达,通过定向进化提高酶表达活力	表达量 6 mg/L 比酶活 980 U/mg	[27]
毕赤酵母	HRP	周质表达,通过敲除 α -1,6-甘露糖基转移酶(OCH1 编码)改善 HRP 高糖基化问题,通过发酵优化提高表达水平	表达量 101 mg/L 比酶活 278.1 U/mg	[28]
毕赤酵母	HRP	周质表达,通过与链球菌蛋白 G(SpG)融合表达提高表达量和比酶活	表达量 113 mg/L 比酶活 1624 U/mg	[29]
毕赤酵母	HRP	周质表达,OCH1 缺陷的毕赤酵母菌株中表达了通过定向进化得到的突变体 HRP 13A7-N175S	表达量 132 mg/L 比酶活 2008 U/mg	[30]
黑曲霉	MnP	周质表达,共表达钙连蛋白,培养基添加血红素	表达量 70 mg/L	[31]
米曲霉	MnP	周质表达,在 Taka 淀粉酶启动子下表达融合了分泌信号的 MnP	表达效率 0.33 U/(min·L) $k_{cat}=132 \text{ s}^{-1}$	[32]

酸激酶 (PGK) 融合, 实现了 HRP 的可溶性过量表达。这种融合蛋白在表达后, 只需与钙离子、氯化血红素和氧化型谷胱甘肽一起简单孵育, 即可激活 HRP 的活性。这种方法不仅避免了复杂的重折叠步骤, 而且得到的重组 HRP 比植物来源的 HRP 具有更高的摩尔比活性^[21]。这一创新为在大肠杆菌中高效表达活性 HRP 提供了新的可能性, 有望推动 HRP 在生物技术领域的更广泛应用。

锰过氧化物酶 (MnP) 作为白腐菌黄孢原毛平革菌等木质素降解担子菌的关键酶, 因其在染料脱色、木质素降解和生物修复方面具备应用潜力而被广泛研究^[41]。MnP 具有复杂的结构, 包括血

红素辅基、锰结合位点以及稳定其蛋白结构的 4 个或 5 个二硫键。然而, 在大肠杆菌表达系统中, MnP 通常以不溶性和无活性的包涵体形式存在, 这限制了其直接应用。尽管研究者们尝试通过包涵体体外重折叠的方法使 MnP 复性, 但这种方法面临着重折叠率低和蛋白稳定性差的问题^[22]。因此, 实现 MnP 在大肠杆菌中的可溶性表达成为了研究的热点。Lin 等^[23] 通过一系列策略, 包括密码子优化、冷休克启动子的控制表达、培养过程中连续添加血红素及共表达伴侣蛋白等, 成功实现了 MnP 在大肠杆菌中的可溶性表达。这种方法相比重折叠从包涵体中获得的 MnP, 产量提高了约 20 倍。

然而, 获得的 MnP 活性并不理想, 其 k_{cat}/K_m 值是重折叠 MnP 的 1/10 左右。为了进一步提高 MnP 的溶解度和比酶活, Alfi 等^[24] 进行了更深入的研究。他们发现, 共表达二硫键异构酶 DsbC 能够显著改善 MnP 的溶解度和比酶活。在组成型表达 DsbC 的大肠杆菌中, 通过共表达伴侣蛋白 (DnaK、DnaJ 和 GrpE), MnP 得以可溶性表达。随后, 通过与氯化血红素、ATP 和 ATP 再生系统的孵育, 获得的 MnP 活性与商业 MnP 相当。

2.2 在酵母中的表达

酵母作为一种单细胞真核生物, 在生物技术领域的应用日益广泛。除了培养简单、生长迅速且成本低廉等优点外, 酵母与高等真核生物在分子、遗传和生物化学特征上存在着诸多相似之处。这使得酵母表达系统能够实现蛋白功能至关重要的所有翻译后修饰, 包括二硫键形成、磷酸化、糖基化和脂肪酸酰化等^[40]。因此, 酵母成为了表达真核来源 POD 的理想选择。例如, Gu 等^[25] 成功通过 α 因子前导序列的融合表达, 在毕赤酵母中实现了黄孢原毛平革菌来源的 MnP 的活性表达。这种表达的纯化酶在动力学特征、pH 稳定性和温度稳定性等方面均与天然酶相近, 充分展示了酵母表达系统在保留酶活性和稳定性方面的优势。此外, 来源于灵芝的锰过氧化物酶 GluMnP1 也通过类似的方式在毕赤酵母中成功表达, 并且重组酵母菌株中该酶的表达量与天然菌株相比提高近 20 倍, 表达总活力最高达 524.61 U/L。这进一步证明了酵母表达系统在表达不同来源的 POD 方面的通用性和有效性^[42]。Wang 等^[43] 则通过多拷贝基因整合的策略, 首次实现了黄孢原毛平革菌来源的木质素过氧化物酶 LiPH2 在毕赤酵母中的活性表达。这一突破不仅拓展了酵母表达系统的应用范围, 也为木质素降解等相关领域的研究提供了新的工具和方法。另外, 通过 α 因子前导序列的融合表达及基因组整合, 来源于灰盖鬼伞的过氧化物酶 CiP 也在毕赤酵母中实现了活性表达^[44]。

HRP 作为一种重要的酶类, 在生物技术领域具有广泛的应用价值。尽管酵母表达系统具有诸多优点, 但 HRP 在酵母中的表达却面临着高糖基化的问题, 酵母中表达的重组 HRP 往往是不均一

的高糖基化修饰蛋白, 这导致重组 HRP 的比酶活和总活性较差^[45]。为了改善这一状况, 研究人员进行了多方面的尝试和努力。首先, 利用定向进化策略来改善 HRP 在酵母中的表达。例如, Morawski 等通过三轮随机点突变和筛选得到了表达总活性达 220 U/L 的突变体, 较野生型提升 40 倍, 但温度稳定性显著变差^[26]。随后在该突变体的基础上又进行了后续几轮突变和筛选, 得到了总活性和温度稳定性较野生型均得到提升的突变体 HRP 13A7-N175S^[27], 但表达的重组 HRP 仍然是不均一的高糖基化蛋白。HRP 在酵母中的不均一高糖基化修饰可能是蛋白质在酵母高尔基体中不同程度的甘露糖苷化导致的, 在敲除了催化甘露糖苷化第一步反应的 α -1, 6-甘露糖基转移酶 (*OCHI* 基因编码) 的毕赤酵母中表达 HRP, 发现重组 HRP 的表面聚糖更为均一, 且糖链更短^[46]。但重组 HRP 的动力学特性及温度稳定性并没有明显改善, 而且 *OCHI* 缺陷菌株也存在严重的生理损伤问题。后续的研究中通过培养条件优化改善了菌株的生长, 并在培养基中添加血红素使表达酶的总活力和比酶活进一步提升^[28], 比酶活 278.1 U/mg, 总活力提升至 28 088 U/L, 但相较苛刻的发酵条件及昂贵血红素的添加也显著增加了生产成本。除了添加血红素, 将 HRP 和亲和力较高的链球菌蛋白 G (SpG) 融合表达也可显著提高重组蛋白的总活性和比酶活, Krainer 等^[29] 通过把构建的 HRP-SpG 的重组质粒转入毕赤酵母中表达, 得到了 113 mg/L 的 HRP-SpG 融合蛋白, 比活性为 1 624 U/mg \pm 175 U/mg。在此基础上, Krainer 等^[30] 在 *OCHI* 缺陷的毕赤酵母菌株中表达了通过定向进化得到的突变体 HRP 13A7-N175S, 在新型双向启动子 PHTX1 的控制下, 重组 HRP 总活力达到 266 300 U/L, 是目前酵母表达系统的最高水平。通过定向进化、表达系统优化及培养条件优化使 HRP 在酵母中表达的总活力和比酶活得到了很大的提高, 但仍然存在高糖基化的问题, 影响了酶的动力学特性和稳定性。

2.3 在真菌中的表达

真核表达宿主相较于原核表达宿主具备各种翻译后修饰的能力, 能够使重组蛋白进行正确的折叠以实现其功能。丝状真菌是除酵母外另一类

用于重组蛋白商业化生产的真核宿主, 其中, 黑曲霉和米曲霉是应用最为广泛的丝状真菌表达系统。黑曲霉和米曲霉具备向细胞外介质中分泌大量蛋白质的能力, 这使得它们成为大量生产蛋白质的理想选择, 同时也避免了烦琐且昂贵的细胞破碎过程^[47]。此外, 这两种丝状真菌的安全性得到了广泛认可, 被食品药品监督管理局批准为 GRAS 微生物, 因此在食品和医药等领域具有广阔的应用前景。Conesa 等^[31, 48-49]的研究揭示了丝状真菌高效生产真菌 POD 的限制因素, 研究了黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶 (LiPA)、锰过氧化物酶 (MnP) 和烟曲霉氯过氧化物酶 (CPO) 基因在黑曲霉中的表达。结果表明, 黑曲霉重组表达 MnP 和 CPO 时, 能够以活性酶的形式分泌至培养基中, 重组酶的比酶活与天然酶相当, 而且当 MnP 与钙连蛋白一同过表达时可以使酶表达量增加 4~5 倍。但黑曲霉在培养基中分泌的重组 LiPA 没有活性, 这可能与分泌酶的不正确加工有关。米曲霉作为另一种成熟的丝状真菌表达系统, 也表现出了作为真菌过氧化物酶优良异源表达宿主的潜力。Stewart 等^[32]通过质粒 PSR 3 (16) 将融合了米曲霉 Taka 淀粉酶启动子和分泌信号的 MnP 编码基因导入到米曲霉中, 成功实现了 MnP 的胞外分泌和活性表达, 表达的重组 MnP 具备与天然蛋白相似的动力学特性。此外, 黑腐菌 (Dec1) 来源的染料脱色型过氧化物酶 (DyP) 也通过类似的方法实现了其在米曲霉中的活性表达, 且粗酶经过简单过滤后便可直接应用于染料脱色^[50]。

尽管黑曲霉和米曲霉表达重组蛋白具备诸多优点, 但在实际操作中, 仍需关注不同物种之间代谢和蛋白质修饰模式的差异。这些差异可能会导致异源表达的酶在催化活性和动力学特性上受到影响, 因此, 真菌特有的 II 类过氧化物酶 (如锰过氧化物酶 MnP) 的同源性表达成为了一个备受关注的研究方向。例如, Mayfield 等^[51]在黄孢原毛平革菌中成功实现了锰过氧化物酶 MnP 的同源性表达。他们利用 *gpd* 启动子驱动编码 MnP 同工酶 1 的基因 *mnpJ*, 得到了与野生酶动力学特性几乎一致的重组 MnP。Irie 等^[52]则通过羧甲素抗性载体质粒 pTM1, 将来源于平菇的 MnP3 编码基因导入野生型菌株中, 实现了在平菇 *sdi1* 表达信号控

制下的同源性表达。RT-PCR 实验进一步证实了重组 MnP3 是转化菌株中的主要转录产物。此外, 从红树林中分离的一株耐盐白腐真菌 MG-60 中鉴定得到了 3 种锰过氧化物酶 (MGMnP1、MGMnP2 和 MGMnP3), 通过同源性表达得以纯化和表征, 与黄孢原毛平革菌来源 MnP 相比, 这些 MGMnP 表现出对 NaCl 的高耐受性^[53]。

3 过氧化物酶的应用

3.1 有机污染物降解

随着科技进步带来的消费增长, 人类活动和工业生产不可避免地产生了大量污染物。这些污染物的排放对生态环境和人类健康产生了严重威胁。例如, 石化精炼和造纸业产生的酚类污染物和纺织业大量排放的合成染料污水, 这些污染物释放到土壤和水源中不但难以降解, 而且具有生理毒性、致畸性和致癌性^[54-55]。除了这些常规的有机污染物, 人类在环境中释放的、被视为新兴污染物 (EC) 的药物活性化合物 (PhAC) 也对生态健康造成极大危害, PhAC 在极低浓度下也可能导致水生致病微生物产生耐药性、遗传毒性和内分泌干扰^[56]。面对这些污染物, 传统的污水处理方法如物理吸附、萃取和化学氧化等往往存在低效率、高成本、工艺不稳定或生成新的有毒化合物等缺陷^[57]。近年来发展的酶处理法, 在处理各种有机污染物方面的优势非常显著。具体来说, 酶作为生物催化剂, 具有高效和高度选择性的特点, 能够在较低的浓度下催化特定的反应。另外, 酶催化过程可以在比较温和的 pH 和温度下进行, 这不仅降低了能耗, 还减少了对处理设施的腐蚀和损耗。此外, 酶法处理过程中无需添加大量化学试剂, 反应生成的副产物大多为无害的简单分子, 避免了二次污染的问题。POD 作为一种具有广泛底物选择性的酶类, 能够催化底物生成自由基, 进而引发一系列的氧化、聚合和解聚反应, 使污染物降解或显著降低其毒性。这一特性使得 POD 在有机污染物降解中展现出了巨大的潜力^[58], 表 2 显示了近年来一些与 POD 降解有机污染物相关的研究。

表2 过氧化物酶降解有机污染物的相关研究

Table 2 Studies on the degradation of organic pollutants by peroxidases

污染物类型	降解底物	过氧化物酶	研究成果	参考文献
酚类污染物	苯酚	芜菁过氧化物酶(TP)	采用海藻酸盐包埋分离于芜菁根的TP,在最佳条件下对苯酚的平均脱除率达93%	[59-60]
	苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	采用一步包埋法将HRP酶固定在半透性海藻酸盐膜,在重复使用5次时酶活下降至50%	[61]
	苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	在改性丙烯腈共聚物膜上共价固定HRP,对100 mg/L的苯酚溶液脱除率达95.4%,具备高稳定性,在酶操作的20天后酶活下降至50%	[62]
	苯酚、对甲酚	黑萝卜过氧化物酶(RSVNP)	以交联酶聚集体形式固定化的RSVNP-CLEA具备高稳定性,储存60天后保持100%的活性,最佳条件下显示出对苯酚和对甲酚92%和98%的高消除率	[63]
	苯酚、对氯苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	HRP通过戊二醛偶联共价固定在磁珠上,固定化HRP保留了79%游离酶活性,在磁稳定流化床反应器中能够消除100%的苯酚和92%对氯苯酚	[64]
	苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	物理固定在改性还原氧化石墨烯纳米颗粒(NP)的HRP显示出对高浓度苯酚(2.5 g/L)100%的去除率,重复使用10次后仍能保留60%的初始酶活性	[65]
	对溴苯酚	苦瓜过氧化物酶(BGP)	Con A层状藻酸钙纤维素珠为载体固定的BGP在填充床反应器中能够清除96%的对溴苯酚,而且连续运行30天后仍能保持75%的清除率	[66]
	苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	通过戊二醛交联剂固定在生物碳上的HRP具备高稳定性,重复使用10次后仍保持70%的酶活性	[67]
	苯酚、对氯苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	固定在阳离子微孔淀粉的HRP显示出较游离酶更强的苯酚和对氯苯酚的去除能力,重复使用10次后仍保留66%的初始活性	[68]
	苯酚	辣根过氧化物酶(HRP)	以氧化海藻酸酯胺微珠为载体固定的HRP在最佳条件下能够去除96%的苯酚,重复使用4次后仍保留61%的初始活性	[69]
合成染料	甲基橙	辣根过氧化物酶(HRP)	采用聚丙烯酰胺凝胶包埋提取于新鲜辣根的HRP,在填充床生物反应器中能够降解90%的甲基橙	[70]
	酚红	辣根过氧化物酶(HRP)	采用了包埋和共价键合组合方法将HRP固定在海藻酸钙-淀粉杂化小球上,固定化HRP对酚红的去除率为55.87%,是游离HRP的11.5倍	[71]
	黑色CKF、蓝色GWF、红色C4BLN	来自裂褶菌IBL-06的木质素过氧化物酶(LiP)	以戊二醛为交联剂将LiP固定化得到的交联酶聚集体能够有效降解黑色CKF、蓝色GWF和红色C4BLN三种活性染料,处理6h后的降解率分别为89.6%、81.46%和79.6%	[72]
	晶状丽春红6R(CP6R)	大豆过氧化物酶(SBP)	40 mg/L的CP6R染料溶液可以在1 min内被SBP完全降解,进一步研究结果表明偶氮染料通过对称和不对称偶氮键断裂两种途径降解	[73]
	结晶紫	来源于解淀粉芽孢杆菌MN-13的过氧化物酶(BaDyP)	BaDyP处理结晶紫(50 mg/L)72 h后,降解率为63.0%	[74]
	偶氮染料DY106	西葫芦过氧化物酶(CP)	最佳条件下,海藻酸钙包埋的CP能够在2 min内使87%以上的染料DY106(50 mg/L)脱色	[75]
	刚果红、甲基橙、铬黑T、台盼蓝	来源于白腐真菌 <i>Phanerochaete</i> sp. HSD的锰过氧化物酶(MnP)	菌液中提取的MnP粗酶能有效降解刚果红、甲基橙和铬黑三种偶氮染料,在数小时内能够将浓度200 mg/L以上的染料降解90%以上	[76]
		大豆过氧化物酶(SBP)	聚丙烯酰胺(PA)包埋的SBP具备更好的稳定性和可重复使用性,在30 min内能够使台盼蓝(40 mg/L)降解约80%	[77]

续表

污染物类型	降解底物	过氧化物酶	研究成果	参考文献
	偶氮染料直红23和直蓝15	来源于天蓝色链霉菌SPR7的过氧化物酶POX	在添加10 mmol/L木质素的条件下,POX经过20 h能够使偶氮染料直红23和直蓝15脱色75.4%和90%	[78]
	酸性蓝158(AB)	黑曲霉CTM10002来源的锰过氧化物酶MnP AN30	在反应24 h后,纯化的MnP AN30对染料AB的脱色率达到98%	[79]
	绿松石蓝133G、Drim Red CL4BN	花椰菜过氧化物酶(CFP)	提取自新鲜花椰菜叶的CFP在最佳条件下能够使染料绿松石蓝133G(25 mg/L)和Drim Red CL4BN(50 mg/L)降解85%和92%	[80]
药物活性化合物	17 β -雌激素(E2)	辣根过氧化物酶(HRP)	以磁性Fe ₃ O ₄ 为载体固定的HRP在最佳条件下能够使E2(1000 mg/L)降解80%	[81]
	双酚a(BPA)、三氯生(TCS)、雌酮(E1)、17 β 雌二醇(E2)和17 α 炔雌醇(E2)	黑管菌来源的多功能过氧化物酶(VP)	分离于黑管菌的VP能够高效去除5种污染物,去除速率达到[2.5~5.0 mg/(L·min)]	[82]
	三氯生(TCS)、磺胺甲噁唑(SMX)、雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)和17 α -炔雌醇(E2)	大豆过氧化物酶(SBP)	在优化的条件下,SBP对浓度各10 μ mol/L的药物污染物废水降解率在95%以上	[83]
	磺胺甲噁唑(SMX)	大豆过氧化物酶(SBP)	在78 nmol/L SBP和56 μ mol/L H ₂ O ₂ 的条件下反应3 h,浓度为500 mg/L的SMX能够降解78%	[84]
	双氯芬酸、卡马西平和扑热息痛	辣根过氧化物酶(HRP)和木质素过氧化物酶(LiP)	溶胶-凝胶包封的HRP和LiP酶复合物都能够改善酶在酸性介质中的稳定性,而且在反应3天后可以完全降解双氯芬酸、卡马西平和扑热息痛	[85]
	四环素(TC)和土霉素(OTC)	来源于黄孢原毛平革菌的过氧化物酶(MnP)	添加40 U/L的MnP时,50 mg/L的TC和OTC能够在4 h内降解72.5%和84.3%	[86]
	磺胺甲噁唑(SMX)和卡马西平(CBZ)	辣根过氧化物酶(HRP)	由聚氯乙烯电纺纤维封装固定化的HRP显著提升了其稳定性和重复使用性,而且能够在24 h内降解80%以上10 mg/L的SMZ和CBZ	[87]
	磺胺甲噁唑、萘普生、四环素、雌二醇、酮康唑、酮咯酸和双氯芬酸	来源于烟曲霉的氯过氧化物酶(CPO)	CPO能够氧化磺胺甲噁唑、萘普生、四环素、雌二醇、酮康唑、酮咯酸和双氯芬酸,反应10 min后,所有底物均能转化80%以上	[88]

近年来越来越多的研究表明,POD能够有效降解污水中的有机污染物,尤其是其中危害较大的酚类污染物、合成染料及PhAC污染物。但POD在实际应用中,也面临着经济和技术上的挑战。首先,POD的生产和纯化成本较高,特别是对于处理量大的工业污水,酶的经济性仍需进一步提升。其次是POD的稳定性问题,酶在应用过程中容易受到环境因素的影响,如温度、pH和有机溶剂的存在,可能导致酶活性下降甚至失活。此外,如何有效回收和再利用POD也是一个挑战。虽然目前常用的固定化酶技术在能够使POD在一定程

度上重复使用,但在实际应用中仍面临技术和经济上的瓶颈。未来,随着酶工程技术的发展和生产成本的降低,POD有望在有机污染物降解方面发挥更大的作用。

3.2 化合物检测

POD作为一种广泛应用的酶,目前在多种检测方法中发挥着关键作用,其中最为常见的是比色法和电化学传感器法。比色法是通过POD催化一些特定的化合物(如ABTS)发生显色反应而直接检测体系中H₂O₂的生成,而H₂O₂是伴随着待测

底物与其特定的氧化酶氧化而生成的，待测底物浓度与 H_2O_2 生成量符合化学计量关系 [图3(a)]。电化学传感器法是通过固定在电极表面的POD与电极发生电子转移而检测体系中 H_2O_2 的生成。固定在电极上的POD首先被 H_2O_2 氧化，然后通过电极中电子转移而还原，导致电极中电流的产生，测量的电流与 H_2O_2 浓度成比例^[89] [图3(b)]。此外，POD电极还能通过与被POD催化生成的自由基发生直接的电子转移而产生电流，测量的电流直接与底物浓度成比例^[90]。表3列举了部分POD在化合物检测中的相关研究。

POD应用于化合物检测的显著优势在于其高灵敏性，POD高效的催化活性使其能够灵敏地检测出体系中微量的 H_2O_2 的生成，进而实现对极低浓度化合物的检测。其次POD具备优秀的稳定性

(如HRP)，使其能够便于运输和储存，并制成能够快速检测的检测仪或试纸。尽管如此，POD在实际的化合物检测应用中也存在一些问题。例如，POD对于复杂的样品检测（如血液），可能会存在一些干扰物影响酶的活性（如酶抑制剂）或者产生干扰信号，进而影响检测结果的准确性。此外，高纯度POD的生产和纯化成本较高，在大批量样品检测过程中，POD的成本也是其大规模应用的限制因素。

3.3 天然产物的生物合成

自然界以其纷繁多样的代谢模式孕育了无数结构各异的天然产物，是人类挖掘潜在生理活性物质、研发新药的重要宝库。据统计，从1940年至2014年，FDA批准的175种小分子药物中超过

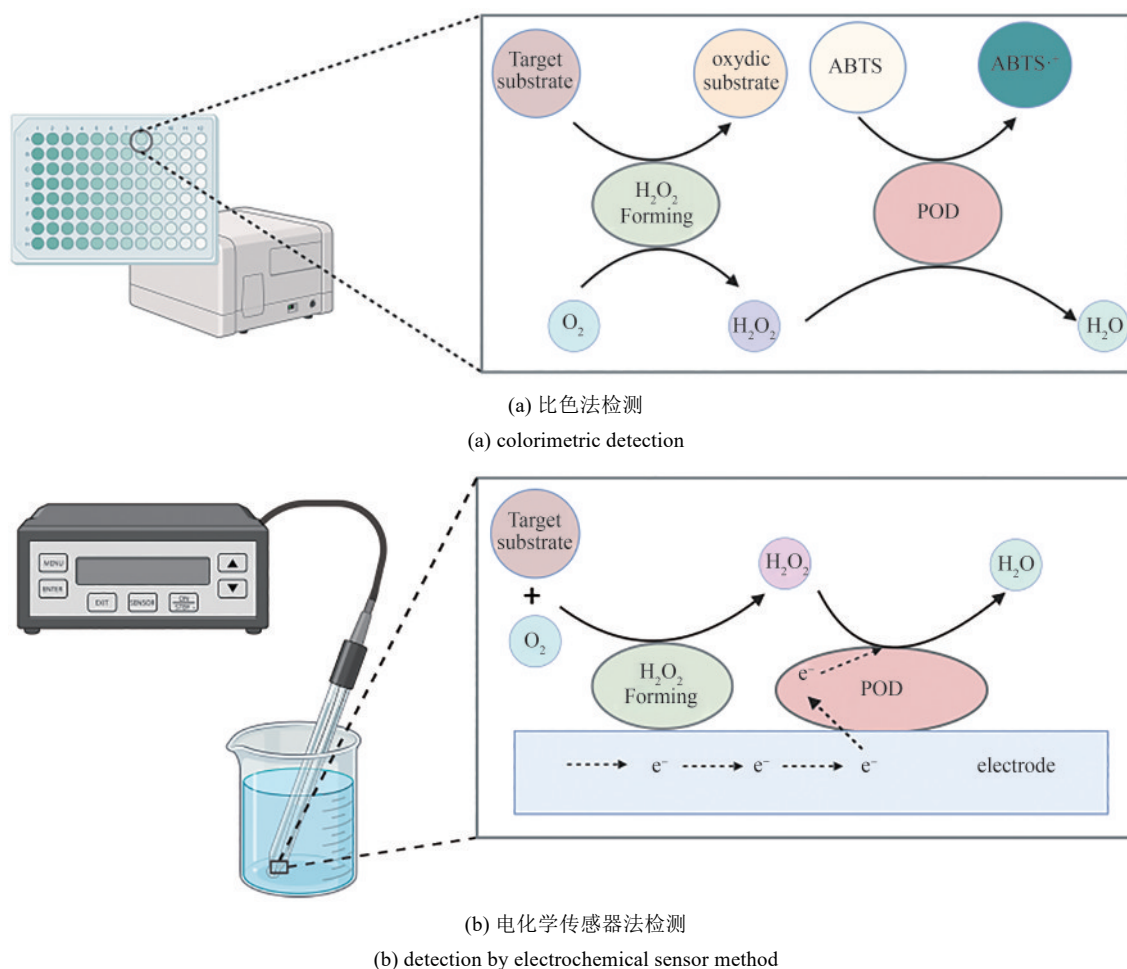


图3 基于POD的化合物检测方法

Fig. 3 POD-based methods for the detection of compounds

表3 基于POD的化合物检测方法

Table 3 POD-based methods for the detection of compounds

检测目标物	H ₂ O ₂ 生成酶	检测原理	参考文献
乳糖	β -半乳糖苷酶+半乳糖氧化酶	表面共固定 β -半乳糖苷酶、半乳糖氧化酶和POD的石墨电极电流传感器	[91]
乳糖	β -半乳糖苷酶+葡萄糖氧化酶	POD催化ABTS显色	[92]
尿酸	尿酸氧化酶	POD催化TMB显色	[93]
尿酸	尿酸氧化酶	表面固定HRP的聚四氟乙烯膜电流传感器	[94]
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	HRP刻蚀金纳米棒(AuNR)显色	[95]
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	表面固定HRP的碳纤维电流传感器	[96]
甘油三酯	脂肪酶+甘油激酶+3-磷酸甘油氧化酶	HRP催化3,5-二氯-2-羟基苯甲酸和4-氨基苯乙酮聚合显色	[97]
甘油三酯	脂肪酶+甘油激酶+3-磷酸甘油氧化酶	表面固定功能化酶聚集体的多晶金电极电流传感器	[98]
胆固醇	胆固醇氧化酶	HRP催化ABTS显色	[99]
胆固醇	胆固醇氧化酶+胆固醇酯酶	表面共固定胆固醇氧化酶、胆固醇酯酶和POD的聚苯胺膜电流传感器	[100]
酚类化合物	H ₂ O ₂ 直接添加	表面固定POD的石墨电极电流传感器	[90]

四分之三属于天然产物及其衍生物^[101]。随着合成生物学的发展,通过构建细胞工厂利用可再生资源合成天然产物的生产模式已成为备受关注的研究方向。例如,抗疟疾药青蒿素和抗癌药紫杉醇,其前体青蒿酸和紫杉二烯通过合成生物学的手段已在微生物中实现了高效的生物合成^[102-103]。但由于天然合成途径尚未解析,途径关键酶缺乏,目前能够通过微生物发酵合成的天然产物仍只占非常小的部分。

POD具有广泛的底物选择性、高效催化活性,早在20世纪就已有大量POD应用于合成领域的研究。例如,HRP能够催化苯酚及其衍生物发生聚合反应,可以在非常温和的条件下实现聚苯酚类材料的合成^[104-107]。类似于HRP催化的苯酚类物质的聚合反应,酪氨酸也能在HRP的催化下发生偶联,生成二聚化的酪氨酸^[108]。除了苯酚类物质的聚合反应,POD还能催化对羟基肉桂酸衍生物的偶联反应。Saliu等^[109]的研究中,3种对羟基肉桂酸衍生物(咖啡酸甲酯、阿魏酸甲酯和芥子酸甲酯)在HRP的催化下发生了偶联反应,成功合成了3种不同的非天然二氢苯并呋喃木脂素和其他2类结构不同的二聚产物。对羟基肉桂酸结构中同时存在酚羟基和碳碳双键结构,这使得这种结构的底物被HRP催化脱氢后能够形成两种稳定的自由基形式,所以反应偶联的形式也是多样的,最终会形成3种结构不同的偶联产物。白藜芦醇具备与对羟基肉桂酸类似的结构特点,其在HRP的催化下同样会发生多样的偶联模式。在Li等^[110]的研

究中,在HRP的催化下,白藜芦醇可以在不同pH环境下发生5种不同偶联反应,最终生成5种不同的白藜芦醇二聚体。POD催化反应的普遍特点是能够使底物脱氢生成自由基,这些自由基通过偶联反应生成二聚产物或其他多聚物。在自然界中,存在众多多聚体形式的活性物质,POD的这种催化特性显示出其在天然产物生物合成中的巨大潜力。

POD在天然产物生物合成领域的应用,尽管尚处于初级阶段,但已经展现出令人瞩目的潜力。Ricklefs等^[111]通过两步酶级联的方式,成功将茴香酶来源的香草醇氧化酶PsVAO与HRP结合,实现了从丁香酚到松脂素的转化[图4(a)]。这一过程中,PsVAO将丁香酚氧化生成的松柏醇,在HRP的催化下进一步二聚化生成松脂素,不仅展示了POD在天然产物合成中的潜力,而且其中产生的H₂O₂能够直接用于后续反应,无需额外添加辅因子,大大提高了反应的效率和经济性。随后,Lü等^[112]将PsVAO-POD酶级联反应应用到大肠杆菌生物合成松脂素。他们成功将PsVAO-POD酶级联反应引入大肠杆菌生物合成系统,利用大肠杆菌内源酶Prx02替代难以重组表达的HRP,再通过PsVAO与HRP的酶融合表达促进辅因子H₂O₂的高效利用,同时避免H₂O₂累积对细胞的损伤,最终在大肠杆菌分批补料发酵中,合成了11.23 g/L松脂素,摩尔碳收率达到52.77%,实现了从丁香酚到松脂素的高效生物转化。

水飞蓟宾和异水飞蓟宾是水飞蓟种子提取物

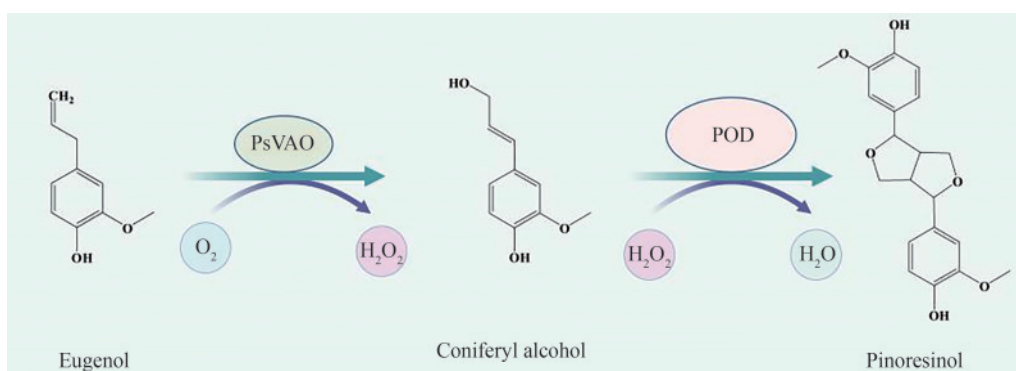
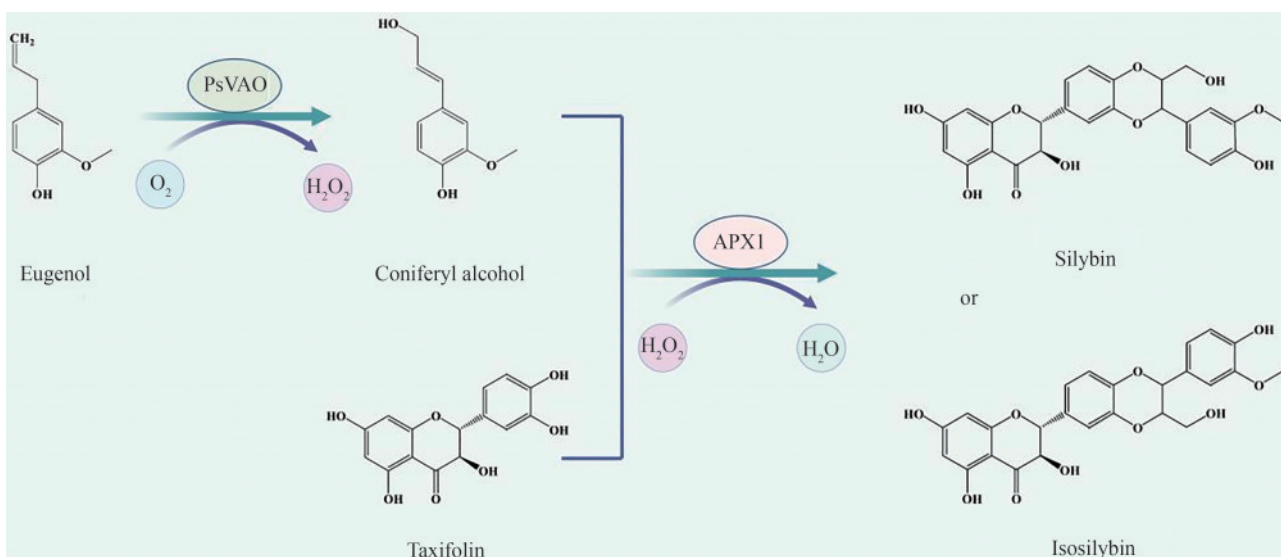
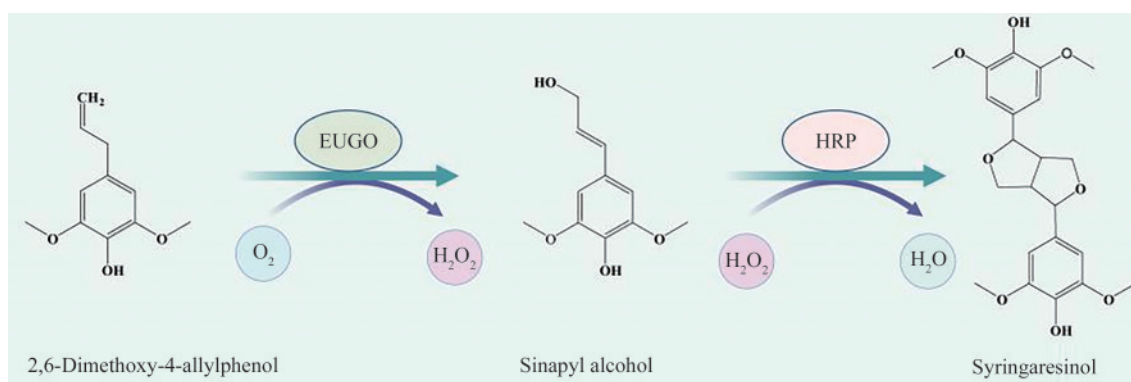
(a) Synthesis of pinoresinin by PsVAO-POD enzyme cascade ^[111-112](b) Synthesis of silibinin and isosilibinin by the PsVAO-APX1 enzyme cascade ^[114](c) Synthesis of syringarin by EUGO-HRP enzyme cascade ^[118]

图4 利用 POD 合成天然产物

Fig. 4 Synthesis of natural products using POD

中具有保肝作用的主要活性成分 ^[113]。Lü 等 ^[114] 应用 PsVAO-POD 级联反应在大肠杆菌中将丁香酚和

花旗松素转化为水飞蓟宾和异水飞蓟宾。这一过程中，丁香酚同样也是先被 PsVAO 氧化为松柏醇，

不同的是花旗松素替代了另一分子的松柏醇, 通过 POD 的催化与松柏醇发生聚合 [图4(b)]。他们进一步扩大 POD 筛选范围, 发现了水飞蓟来源的抗坏血酸过氧化物酶 APX1 具有最高的转化效率, 随后通过过表达血红素辅基合成基因 *hemA* 和 *hemL* 及发酵优化, 在分批补料发酵中合成了 2.58 g/L 的水飞蓟宾和异水飞蓟宾, 摩尔产率为 76.7%。在此基础上, Yang 等^[115] 通过过表达 7 种异源酶和 5 种天然酶分别构建了两株能够从头生物合成 336.8 mg/L 花旗松素和 201.1 mg/L 松柏醇的酿酒酵母工程菌, 随后使两株菌发酵液中分离得到的花旗松素和松柏醇在 APX1 催化下发生聚合反应, 在 500 mL 反应体系中生成了 104.85 mg/L 的水飞蓟宾和 196.26 mg/L 的异水飞蓟宾。在另一项研究中, Li 等^[116] 通过构建稳定且可自调节的 3 菌株共培养体系实现了水飞蓟宾和异水飞蓟宾的一锅法从头生物合成。他们分别在三株大肠杆菌中构建咖啡酸从头合成菌株、松柏醇合成菌株和花旗松素合成菌株, 共培养过程中咖啡酸合成并转运至其他两株菌中并进一步转化为花旗松素和松柏醇, 后两者再通过 APX1 的催化聚合生成水飞蓟宾和异水飞蓟宾。三种菌株通过氨基酸合成代谢和能量代谢来建立密切的相关性, 使菌株实现稳定的共培养, 再通过中间体咖啡酸响应的生物传感器控制氨基酸合成代谢使微生物共培养种群能够自动平衡, 在摇瓶中最高累积了 2.02 mg/L 的水飞蓟宾和异水飞蓟宾。Park 等^[117] 也探索了利用过氧化物酶 APX1 实现水飞蓟宾和异水飞蓟宾从头生物合成。首先, 他们分别构建了能够从头合成 187.7 mg/L 松柏醇和 239.4 mg/L 花旗松素的大肠杆菌, 验证了这两条路径的可行性, 随后将合成松柏醇和花旗松素的必需基因及过氧化物酶 APX1 在大肠杆菌中表达, 实现了水飞蓟宾和异水飞蓟宾的单菌从头生物合成。但 Park 等仅检测出 0.04 μg/L 水飞蓟宾和 1.29 μg/L 异水飞蓟宾, 产量低的原因除了过多基因共表达造成的代谢负担外, 很可能与辅因子 H₂O₂ 的供应不足有关。

丁香酚氧化酶 EUGO 与 POD 构成的酶级联反应在天然产物生物合成领域同样展现出了巨大的应用潜力。2018 年, Habib 等^[118] 通过 EUGO 的工程设计提高了该酶的催化效率, 成功将 1 g 2,6-二甲氧基-4-烯丙基苯酚通过串联的 EUGO-HRP 酶级

联催化得到了 870 mg 丁香脂素 [图4(c)], 摩尔转化率为 81%。Guo 等^[119] 进一步改进了这一反应, 底物由木质素解聚产物二氢芥子醇替代了来源相对不丰富的 2,6-二甲氧基-4-烯丙基苯酚, 首先通过 EUGO 催化氧化底物二氢芥子醇生成芥子醇, 随后进一步通过 HRP 的催化聚合成丁香脂素。通过设计 EUGO 突变体提高了其对二氢芥子醇的催化效率, 在最优条件下实现了 68% 的丁香树脂产率。尽管目前尚未有关于 EUGO-POD 酶级联在生物合成中的直接报道, 但鉴于其高催化活性和转化率, 该反应具有巨大的生物合成潜力。

松脂素、水飞蓟宾和异水飞蓟在生物合成中的成功显示出 POD 在天然产物生物合成中的潜力。但由于 POD 催化的泛杂性, 在从头生物合成路径中引入 POD 很可能会严重干扰合成路径, 使合成路径里的中间产物提前被 POD 氧化消耗, 产生副产物。另外, POD 催化所需的辅因子 H₂O₂ 在细胞中的供应平衡也是影响生物合成效率的关键。H₂O₂ 供应不足会使聚合反应停滞, 而 H₂O₂ 供应过多则会导致细胞损伤。因此, 在利用 POD 进行生物合成时, 必须确保 H₂O₂ 的供应处于合适的水平。

4 总结和展望

POD 自发现以来, 其广泛分布于自然界中的特性以及卓越的催化性能, 使它成为很多研究领域的焦点。得益于测序、基因编辑、重组蛋白表达和高通量筛选技术的飞速发展, 现在能够更高效地从自然界中挖掘并研究 POD。越来越多的 POD 被发现、表征并成功实现重组表达, 这极大拓宽了 POD 的应用范围。POD 展现的广泛底物催化活性和稳定性使其在众多领域中展现出巨大的应用价值。在环境修复领域, POD 作为一种绿色生物催化剂, 能够催化底物生成自由基, 进而引发裂解、聚合或氧化反应。这些反应有助于将难以降解的有毒物质高效转化为无毒或易降解的化合物, 对于环境保护具有重要意义。在化合物检测领域, POD 以 H₂O₂ 为媒介, 通过电信号或颜色反应间接指示目标化合物的浓度, 为化合物的定量检测提供了一种有效手段。这种方法在药物研发、食品安全和环境监测等领域具有广泛的应用

前景。在生物合成领域，POD催化的反应是许多复杂天然产物生物合成的关键步骤。POD丰富的数量、广泛的底物选择性和高催化活性也使得其成为天然产物人工合成途径构建中极具潜力的候选酶。然而，POD催化底物氧化的过程中往往会发生底物自由基生成和偶联的过程，这使得其在合成领域应用中面临一些挑战，如反应专一性差、摩尔转化率低下以及可能生成难以分离的异构体或副产物等。此外，POD催化所需的辅因子 H_2O_2 的细胞毒性问题也带来诸多挑战。尽管如此，随着越来越多天然产物的生物合成途径被解析以及POD新功能的发现，有理由相信，POD在合成生物学领域中的潜力将得到进一步发挥。未来，通过优化反应条件、改进酶的专一性、设计更高效的酶级联反应以及实现反应区室化等策略，将能够克服POD在应用过程中遇到的挑战，进一步拓展其在各个领域的应用范围。此外，还可以通过计算生物学和蛋白质工程的方法设计出更高效、稳定且具特异性的POD变体。这些策略不仅能提升POD的应用效率，还能扩大其在工业生产、医药开发和环境治理中的应用潜力。通过这些综合措施，POD作为一种重要的生物催化剂，将在科学研究和实际应用中发挥更加重要的作用。

参 考 文 献

- [1] SAVELLI B, LI Q, WEBBER M, et al. RedoxiBase: a database for ROS homeostasis regulated proteins[J]. *Redox Biology*, 2019, 26: 101247.
- [2] ZAMOCKY M, JAKOPITSCH C, FURTMÜLLER P G, et al. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2008, 72(2): 589-605.
- [3] KANGASJÄRVI S, LEPISTÖ A, HÄNNIKÄINEN K, et al. Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses[J]. *The Biochemical Journal*, 2008, 412(2): 275-285.
- [4] PREETHI P S, PATHY M R. Recombinant peroxidase: production and its prospective applications-a review[J]. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2018, 11(7): 3186-3196.
- [5] MARTINS D, KATHIRESAN M, ENGLISH A M. Cytochrome c peroxidase is a mitochondrial heme-based H_2O_2 sensor that modulates antioxidant defense[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65: 541-551.
- [6] HIGUCHI T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase[J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2004, 80(5): 204-214.
- [7] SIGOILLOT J C, BERRIN J G, BEY M, et al. Fungal strategies for lignin degradation[M/OL]//Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering. Amsterdam: Elsevier, 2012: 263-308. (2012-06-08) [2024-03-01]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00008-2>.
- [8] COSIO C, DUNAND C. Specific functions of individual class III peroxidase genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 391-408.
- [9] PASSARDI F, PENEL C, DUNAND C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(11): 534-540.
- [10] BARCELÓ A R, POMAR F. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1105-1113.
- [11] BERNARDS M A, FLEMING W D, LLEWELLYN D B, et al. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(1): 135-146.
- [12] GAZARYAN I G, LAGRIMINI L M, ASHBY G A, et al. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases[J]. *The Biochemical Journal*, 1996, 313(3): 841-847.
- [13] ALLISON S D, SCHULTZ J C. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30(7): 1363-1379.
- [14] LISZKAY A, KENK B, SCHOPFER P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth[J]. *Planta*, 2003, 217(4): 658-667.
- [15] MCINNIS S M, DESIKAN R, HANCOCK J T, et al. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? [J]. *The New Phytologist*, 2006, 172(2): 221-228.
- [16] HUANG R H, XIA R X, HU L M, et al. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 113(2): 166-172.
- [17] PANDEY V P, AWASTHI M, SINGH S, et al. A

- comprehensive review on function and application of plant peroxidases[J]. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2017, 6(1): 308.
- [18] LIN Z L, THORSEN T, ARNOLD F H. Functional expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(3): 467-471.
- [19] ASAD S, DABIRMANESH B, GHAEMI N, et al. Studies on the refolding process of recombinant horseradish peroxidase [J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 54(2): 484-492.
- [20] GUNDINGER T, SPADIUT O. A comparative approach to recombinantly produce the plant enzyme horseradish peroxidase in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 248: 15-24.
- [21] CHAUHAN S, KANG T J. Soluble expression of horseradish peroxidase in *Escherichia coli* and its facile activation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(4): 431-435.
- [22] WANG N, REN K, JIA R, et al. Expression of a fungal manganese peroxidase in *Escherichia coli*: a comparison between the soluble and refolded enzymes[J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 87.
- [23] LIN M I, NAGATA T, KATAHIRA M. High yield production of fungal manganese peroxidases by *E. coli* through soluble expression, and examination of the activities[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 145: 45-52.
- [24] ALFI A, ZHU B, DAMNJANOVIĆ J, et al. Production of active manganese peroxidase in *Escherichia coli* by co-expression of chaperones and *in vitro* maturation by ATP-dependent chaperone release[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(3): 290-295.
- [25] GU L N, LAJOIE C, KELLY C. Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(5): 1403-1409.
- [26] MORAWSKI B, LIN Z L, CIRINO P, et al. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. *Protein Engineering*, 2000, 13(5): 377-384.
- [27] MORAWSKI B, QUAN S, ARNOLD F H. Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 76(2): 99-107.
- [28] GMEINER C, SPADIUT O. Effects of different media supplements on the production of an active recombinant plant peroxidase in a *Pichia pastoris* Δ och1 strain[J]. *Bioengineered*, 2015, 6(3): 175-178.
- [29] KRAINER F W, DARNHOFER B, BIRNER-GRUENBERGER R, et al. Recombinant production of a peroxidase-protein G fusion protein in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 219: 24-27.
- [30] KRAINER F W, GERSTMANN M A, DARNHOFER B, et al. Biotechnological advances towards an enhanced peroxidase production in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 233: 181-189.
- [31] CONESA A, JEENES D, ARCHER D B, et al. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 846-851.
- [32] STEWART P, WHITWAM R E, KERSTEN P J, et al. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(3): 860-864.
- [33] KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 803-822.
- [34] WANG Y T, HAN H, CUI B Q, et al. A glutathione peroxidase from Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. ANT506: cloning and heterologous expression of the gene and characterization of recombinant enzyme[J]. *Bioengineered*, 2017, 8(6): 742-749.
- [35] LIAO J, WANG K Y, YAO W R, et al. Cloning, expression and antioxidant activity of a thioredoxin peroxidase from *Branchiostoma belcheri tsingtaunense*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175162.
- [36] KHAN S I, ZADA N S, SAHINKAYA M, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of lignin-degrading DyP-type peroxidase from *Bacillus* sp. Strain BL5 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 151: 109917.
- [37] CHEN W T, ZHENG L L, JIA R, et al. Cloning and expression of a new manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17 and its application in decolorization of reactive black 5[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(11): 1748-1759.
- [38] FATTAHIAN Y, RIAHI-MADVAR A, MIRZAEI R, et al. Heterologous expression, purification and characterization of a peroxidase isolated from *Lepidium draba*[J]. *The Protein Journal*, 2017, 36(6): 461-471.
- [39] GRIGORENKO V G, ANDREEVA I P, RUBTSOVA M Y, et al. Recombinant horseradish peroxidase: production and analytical applications[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(4): 408-416.
- [40] YIN J C, LI G X, REN X F, et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes[J].

- Journal of Biotechnology, 2007, 127(3): 335-347.
- [41] PECH-CANUL A C, CARRILLO-CAMPOS J, BALLINAS-CASARRUBIAS M L, et al. Functional expression and one-step protein purification of manganese peroxidase 1 (rMnP1) from *Phanerochaete chrysosporium* using the *E. coli*-expression system[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(2): 416.
- [42] XU H, GUO M Y, GAO Y H, et al. Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the degradation of four dyes and phenol[J]. BMC Biotechnology, 2017, 17(1): 19.
- [43] WANG W, WEN X H. Expression of lignin peroxidase H₂ from *Phanerochaete chrysosporium* by multi-copy recombinant *Pichia* strain[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(2): 218-222.
- [44] KIM S J, LEE J A, WON K, et al. Functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris*[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 731-735.
- [45] VLAMIS-GARDIKAS A, SMITH A T, CLEMENTS J M, et al. Expression of active horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Society Transactions, 1992, 20(2): 111S.
- [46] KRAINER F W, GMEINER C, NEUTSCH L, et al. Knockout of an endogenous mannosyltransferase increases the homogeneity of glycoproteins produced in *Pichia pastoris*[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3279.
- [47] SU X Y, SCHMITZ G, ZHANG M L, et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi[J]. Advances in Applied Microbiology, 2012, 81: 1-61.
- [48] 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): 3016-3023.
- [49] CONESA A, VAN DE VELDE F, VAN RANTWIJK F, et al. Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(21): 17635-17640.
- [50] SHAKERI M, SUGANO Y, SHODA M. Stable repeated-batch production of recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(6): 683-686.
- [51] MAYFIELD M B, KISHI K, ALIC M, et al. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(12): 4303-4309.
- [52] IRIE T, HONDA Y, WATANABE T, et al. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(5): 566-570.
- [53] KAMEI I, TOMITAKA N, MOTODA T, et al. Selective homologous expression of recombinant manganese peroxidase isozyme of salt-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60, and its salt-tolerance and thermostability[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 32(2): 248-255.
- [54] SALEHI S, ABDOLLAHI K, PANAHI R, et al. Applications of biocatalysts for sustainable oxidation of phenolic pollutants: a review[J]. Sustainability, 2021, 13(15): 8620.
- [55] CHATHA S A S, ASGHER M, IQBAL H M N. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation-a review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(16): 14005-14018.
- [56] COUTO C F, LANGE L C, AMARAL M C S. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants — a review[J]. Journal of Water Process Engineering, 2019, 32: 100927.
- [57] SELLAMI K, COUVERT A, NASRALLAH N, et al. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: a review[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 806(Pt 2): 150500.
- [58] BILAL M, RASHEED T, IQBAL H M N, et al. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes[J]. Science of the Total Environment, 2018, 644: 1-13.
- [59] AZIZI A, ABOUSEOUD M, AHMEDI A. Phenol removal by soluble and alginate entrapped turnip peroxidase[J]. Journal of Biochemical Technology, 2014, 5: 795-800.
- [60] AZIZI A, ABOUSEOUD M, AMRANE A. Phenol removal by a sequential combined Fenton-enzymatic process[J]. Nature Environment & Pollution Technology, 2017, 16(1): 321-330.
- [61] ALEMZADEH I, NEJATI S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 166(2/3): 1082-1086.
- [62] VASILEVA N, GODJEVARGOVA T, IVANOVA D, et al. Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44(2): 190-194.
- [63] SELLAMI K, COUVERT A, NASRALLAH N, et al. Bio-based and cost-effective method for phenolic compounds removal using cross-linked enzyme aggregates[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 403: 124021.

- [64] BAYRAMOĞLU G, ARICA M Y. Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 156(1-3): 148-155.
- [65] BESHARATI VINEH M, SABOURY A A, POOSTCHI A A, et al. Physical adsorption of horseradish peroxidase on reduced graphene oxide nanosheets functionalized by amine: a good system for biodegradation of high phenol concentration in wastewater[J]. *International Journal of Environmental Research*, 2018, 12(1): 45-57.
- [66] ASHRAF H, HUSAIN Q. Application of immobilized peroxidase for the removal of *p*-bromophenol from polluted water in batch and continuous processes[J]. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2011, 1(1): 52-60.
- [67] PETRONIJEVIĆ M, PANIĆ S, SAVIĆ S, et al. Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2021, 208: 112038.
- [68] EL-NAGGAR M E, ABDEL-ATY A M, WASSEL A R, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on cationic microporous starch: physico-bio-chemical characterization and removal of phenolic compounds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 181: 734-742.
- [69] PANTIĆ N, PRODANOVIĆ R, ĐURĐIĆ K I, et al. Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21: 101211.
- [70] BILAL M, RASHEED T, IQBAL H M N, et al. Horseradish peroxidase immobilization by copolymerization into cross-linked polyacrylamide gel and its dye degradation and detoxification potential[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 983-990.
- [71] WEBER A C, DA SILVA B E, CORDEIRO S G, et al. Immobilization of commercial horseradish peroxidase in calcium alginate-starch hybrid support and its application in the biodegradation of phenol red dye[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 246: 125723.
- [72] PARVEEN S, ASGHER M, BILAL M. Lignin peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates (LiP-CLEAs) as robust biocatalytic materials for mitigation of textile dyes-contaminated aqueous solution[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21: 101226.
- [73] ALI L, ALGAITHI R, HABIB H M, et al. Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye-a detailed mechanistic study[J]. *BMC Biochemistry*, 2013, 14: 35.
- [74] ZHANG Y R, REN J, WANG Q, et al. Oxidation characteristics and degradation potential of a dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus amyloliquefaciens* for crystal violet dye[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 168: 107930.
- [75] BOUCHERIT N, ABOUSEOUD M, ADOUR L. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(6): 1235-1244.
- [76] WANG H L, LI P, PANG M, et al. Rapid decolorization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 46(3): 327-333.
- [77] KALSOOM U, ASHRAF S S, MEETANI M A, et al. Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase[J]. *Chemistry Central Journal*, 2013, 7(1): 93.
- [78] PREETHI P S, VICKRAM S, DAS R, et al. Bioprospecting of novel peroxidase from *Streptomyces coelicolor* strain SPR7 for carcinogenic azo dyes decolorization[J]. *Chemosphere*, 2023, 310: 136836.
- [79] HAMDI S, ALLALA F, MECHRI S, et al. Biochemical and molecular characterization of a new heme peroxidase from *Aspergillus niger* CTM10002, and its application in textile reactive dye decolorization[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 121: 619-634.
- [80] KALSOOM U, BHATTI H N, AFTAB K, et al. Biocatalytic potential of *Brassica oleracea* L. var. botrytis leaves peroxidase for efficient degradation of textile dyes in aqueous medium[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2023, 46(3): 453-465.
- [81] AI J, ZHANG W J, LIAO G Y, et al. $\text{NH}_2\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ supported peroxidase catalyzed H_2O_2 for degradation of endocrine disrupter from aqueous solution: roles of active radicals and NOMs[J]. *Chemosphere*, 2017, 186: 733-742.
- [82] TABOADA-PUIG R, EIBES G, LLORET L, et al. Fostering the action of versatile peroxidase as a highly efficient biocatalyst for the removal of endocrine disrupting compounds [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(1): 187-195.
- [83] MASHHADI N, TAYLOR K E, JIMENEZ N, et al. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products from wastewater using soybean peroxidase[J]. *Environmental Management*, 2019, 63(3): 408-415.
- [84] AL-MAQDI K A, HISAINDEE S, RAUF M A, et al. Detoxification and degradation of sulfamethoxazole by soybean peroxidase and UV+ H_2O_2 remediation approaches[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352: 450-458.
- [85] PYLYPCHUK I V, DANIEL G, KESSLER V G, et al. Removal of diclofenac, paracetamol, and carbamazepine from model aqueous solutions by magnetic sol-gel encapsulated horseradish peroxidase and lignin peroxidase composites[J].

- Nanomaterials, 2020, 10(2): 282.
- [86] WEN X H, JIA Y N, LI J X. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 177(1-3): 924-928.
- [87] ZDARTA J, DEGÓRSKA O, JANKOWSKA K, et al. Removal of persistent sulfamethoxazole and carbamazepine from water by horseradish peroxidase encapsulated into poly (vinyl chloride) electrospun fibers[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 23(1): 272.
- [88] GARCÍA-ZAMORA J L, LEÓN-AGUIRRE K, QUIROZ-MORALES R, et al. Chloroperoxidase-mediated halogenation of selected pharmaceutical micropollutants[J]. Catalysts, 2018, 8(1): 32.
- [89] HAMID M, KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1177-1186.
- [90] LINDGREN A, EMNÉUS J, RUZGAS T, et al. Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes[J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 347(1-2): 51-62.
- [91] TKÁC J, STURDÍK E, GEMEINER P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised β -galactosidase[J]. The Analyst, 2000, 125(7): 1285-1289.
- [92] GILLE D, WALTHER B, BADERTSCHER R, et al. Detection of lactose in products with low lactose content[J]. International Dairy Journal, 2018, 83: 17-19.
- [93] LIANG X, CHEN Y X, WEN K, et al. Urate oxidase loaded in PCN-222(Fe) with peroxidase-like activity for colorimetric detection of uric acid[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(34): 6811-6817.
- [94] AKYILMAZ E, SEZGINTÜRK M K, DINÇKAYA E. A biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine[J]. Talanta, 2003, 61(2): 73-79.
- [95] SAA L, CORONADO-PUCHAU M, PAVLOV V, et al. Enzymatic etching of gold nanorods by horseradish peroxidase and application to blood glucose detection[J]. Nanoscale, 2014, 6(13): 7405-7409.
- [96] CSÖREGI E, GORTON L, MARKO-VARGA G. Amperometric microbiosensors for detection of hydrogen peroxide and glucose based on peroxidase-modified carbon fibers[J]. Electroanalysis, 1994, 6(11-12): 925-933.
- [97] FOSSATI P, PRENCIPE L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide[J]. Clinical Chemistry, 1982, 28(10): 2077-2080.
- [98] PUNDIR C S, AGGARWAL V. Amperometric triglyceride biosensor based on nanoparticles of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 517: 56-63.
- [99] ZHAO M Y, LI Y, MA X J, et al. Adsorption of cholesterol oxidase and entrapment of horseradish peroxidase in metal-organic frameworks for the colorimetric biosensing of cholesterol[J]. Talanta, 2019, 200: 293-299.
- [100] SINGH S, SOLANKI P R, PANDEY M K, et al. Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 115(1): 534-541.
- [101] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(3): 629-661.
- [102] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [103] AJIKUMAR P K, XIAO W H, TYO K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74.
- [104] OGUCHI T, TAWAKI S I, UYAMA H, et al. Soluble polyphenol[J]. Macromolecular rapid communications, 1999, 20(7): 401-403.
- [105] UYAMA H, KURIOKA H, SUGIHARA J, et al. Enzymatic synthesis and thermal properties of a new class of polyphenol[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1996, 69(1): 189-193.
- [106] TONAMI H, UYAMA H, KOBAYASHI S, et al. Peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of *m*-substituted phenol derivatives[J]. Macromolecular Chemistry and Physics, 1999, 200(10): 2365-2371.
- [107] DUBEY S, SINGH D, MISRA R A. Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23(7-8): 432-437.
- [108] TANG B, WANG Y, LIANG H L, et al. Studies on the oxidation reaction of tyrosine (Tyr) with H₂O₂ catalyzed by horseradish peroxidase (HRP) in alcohol-water medium by spectrofluorimetry and differential spectrophotometry[J]. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2006, 63(3): 609-613.
- [109] SALIU F, TOLPPA E L, ZOIA L, et al. Horseradish peroxidase catalyzed oxidative cross-coupling reactions: the synthesis of 'unnatural' dihydrobenzofuran lignans[J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52(30): 3856-3860.
- [110] LI C, LU J, XU X F, et al. pH-switched HRP-catalyzed dimerization of resveratrol: a selective biomimetic synthesis[J]. Green Chemistry, 2012, 14(12): 3281-3284.
- [111] RICKLEFS E, GIRHARD M, KOSCHORRECK K, et al. Two-step one-pot synthesis of pinoresinol from eugenol in an

- enzymatic cascade[J]. *ChemCatChem*, 2015, 7(12): 1857-1864.
- [112] LÜ Y K, CHENG X Z, DU G C, et al. Engineering of an H₂O₂ auto-scavenging *in vivo* cascade for pinoresinol production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(9): 2066-2074.
- [113] ABENAVOLI L, CAPASSO R, MILIC N, et al. Milk thistle in liver diseases: past, present, future[J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(10): 1423-1432.
- [114] LÜ Y K, XU S, LYU Y B, et al. Engineering enzymatic cascades for the efficient biotransformation of eugenol and taxifolin to silybin and isosilybin[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(7): 1660-1667.
- [115] YANG J Z, LIANG J C, SHAO L, et al. Green production of silybin and isosilybin by merging metabolic engineering approaches and enzymatic catalysis[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 44-52.
- [116] LI X L, ZHOU Z, LI W N, et al. Design of stable and self-regulated microbial consortia for chemical synthesis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1554.
- [117] PARK S Y, YANG D, HA S H, et al. Production of phenylpropanoids and flavonolignans from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(3): 946-962.
- [118] HABIB M, TRAJKOVIC M, FRAAIJE M W. The biocatalytic synthesis of syringaresinol from 2,6-dimethoxy-4-allylphenol in one-pot using a tailored oxidase/peroxidase system[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(6): 5549-5552.
- [119] GUO Y M, ALVIGINI L, SAIFUDDIN M, et al. One-pot

biocatalytic synthesis of *rac*-syringaresinol from a lignin-derived phenol[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(22): 14639-14649.



通讯作者: 袁其朋(1969—),男,博士,教授。研究方向为生物化工,代谢工程及微生物合成生物学。

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn



通讯作者: 王佳(1989—),女,博士,教授。研究方向为代谢工程及合成生物学。

E-mail: wangjia@mail.buct.edu.cn



第一作者: 李庚(1998—),男,硕士研究生。研究方向为代谢工程及合成生物学。

E-mail: 1602975489@qq.com