



米曲霉裂解性多糖单加氧酶的异源表达与性质分析

冯玉和[#], 孙小宝[#], 陈书昕, 张慧恩, 施鑫磊, 周叶波, 钱国英, 尹尚军*, 王谦*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

摘要:【目的】裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)是一类以氧化方式断裂多聚糖糖苷键的新型木质纤维素降解酶, 本文旨在挖掘新型 LPMOs 并研究其性质。【方法】从米曲霉中克隆 LPMO 基因, 利用毕赤酵母表达系统进行异源表达, 研究其酶学性质和还原剂对其活性的影响, 进一步探讨 LPMO 与糖苷水解酶协同作用时的底物结合现象。【结果】AoLPMO2 和 AoLPMO5 序列分析显示, 两种蛋白都为辅助酶类 9 家族的 LPMOs; 电击转化至真核毕赤酵母 GS115 中, 获得双拷贝转化子 GS/AO5-4, 经 1%甲醇诱导 4 d 后, 上清液蛋白表达量为 0.19 ± 0.01 g/L。重组蛋白分子量约 34 kDa, 高于理论分子量, 推测可能存在翻译后修饰。酶学性质分析表明, AoLPMO5 对刺槐豆胶的最适反应温度和 pH 分别为 60 °C 和 5.0, K_m 和 V_{max} 分别为 8.72 ± 1.99 mg/mL 和 109.4 ± 12.8 $\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 。0.1 mmol/L Cu^{2+} 促进酶活性提高 $(7.10 \pm 1.32)\%$ ($P < 0.05$), 0.5、2.0 和 2.5 mmol/L H_2O_2 分别促进酶活性提高 $(21.11 \pm 6.17)\%$ ($P < 0.01$)、 $(20.22 \pm 1.13)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(18.40 \pm 2.86)\%$ ($P < 0.01$), 而没食子酸和维生素 C 对活性无明显作用。在反应前期, AoLPMO5 与刺槐豆胶底物结合从而影响甘露聚糖酶 BsMAN3 的降解作用。而在反应后期, AoLPMO5 与 BsMAN3 则表现出协同增效作用。【结论】AoLPMO5 是一种全新的生物质降解酶, 阐明其酶学性质和底物作用方式, 将为天然木质纤维素类底物的高效转化与生物炼制, 如第二代生物乙醇、功能性低聚寡糖等生产建立基础。

关键词: 米曲霉, 裂解性多糖单加氧酶, 氧化, 毕赤酵母, 酶学性质, 底物结合

木质纤维素是地球上储藏量最丰富的生物高分子聚合物, 年生成量约为 8×10^{10} t^[1], 主要以纤维素、半纤维素和木质素等形式存在于植物细胞壁。然而, 目前对于这类可再生生物资源的降解

利用却受限于木质纤维素的一个重要性质——具有复杂且稳定的交联结构。长期以来, 如何高效地降解进而利用木质纤维素已成为生物炼制领域的重要研究课题^[2]。研究显示, 仅凭化学法和物理

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ19C050001); 浙江省“生物工程”一流学科学生创新项目(CX2017021); 浙江万里学院科研发展基金

[#]并列第一作者。

*通信作者。王谦, Tel: +86-574-88222391, E-mail: wangq@zww.edu.cn; 尹尚军, E-mail: yinshangjun@163.com

收稿日期: 2019-03-26; 修回日期: 2019-04-19; 网络出版日期: 2019-05-13

法都难以将其完全降解^[3-4], 酶解法因其反应条件温和、能耗低、环境友好等优点^[5-6], 逐渐成为研究人员关注的焦点。

糖苷水解酶(Glycoside hydrolases, GHs)是一类能够高效降解多聚糖的酶类, 能够水解糖分子之间的糖苷键, 从而形成聚合度不同的低聚寡糖。根据底物特异性, 糖苷水解酶主要分为纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、果胶酶、阿拉伯糖苷酶等^[7]。GHs 对于结构较为松散的多聚糖底物降解作用较为明显, 而对于结晶度高、结构致密的天然底物的效果则较有限^[8]。最新研究表明, 裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)是一类全新的木质纤维素降解酶^[9-11]。它不同于 GHs 的水解作用, 以氧化方式断裂结晶多糖的糖苷键^[12], 从而促进糖苷水解酶彻底水解木质纤维素, 使之降解成寡糖甚至单糖。

由于其特殊的降解方式, 碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-activity enzymes database, CAZy)将 LPMOs 重新归类为辅助酶类家族(Auxiliary activity, AA), 包括 AA9、AA10、AA11、AA13^[13-15]、AA14 及 AA15 家族^[16-17]。其中, AA9、AA11、AA13 和 AA14 家族的 LPMOs 基因主要在真菌中发现, 且不同家族的 LPMOs 对底物的选择性也不同。例如, AA9 家族中来自粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)的 LPMO9D^[18]、AA11 家族中来自太瑞斯梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*)的 LPMO11^[19]、AA13 家族中来自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 AnAA13^[20-21]和 AA14 家族中来自血红密孔菌(*Pycnoporus coccineus*)的 PcAA14A/PcAA14B^[16]分别能够降解纤维素、几丁质、淀粉和木聚糖。AA10 家族的 LPMOs 主要来源于细菌^[1], 也有少数来源于真核生物或病毒^[22]。近期, 在昆虫小灶衣鱼(*Thermobia domestica*)体内发现超过

20 种能够催化微晶纤维素和几丁质的 LPMOs, 被归类为 AA15 家族^[23]。

LPMOs 的发现进一步丰富了多聚糖底物的降解模式, 以氧化方式与 GHs 的水解方式产生协同增效作用, 大大提升了木质纤维素的降解效率^[24-25]。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)兼具生长速度快和抗污染等优点, 且包含丰富酶系, 如蛋白酶、淀粉酶及纤维素酶等。同时, 米曲霉作为酱油发酵的主要菌株, 安全性较好, 可用于食品与饲料加工等行业^[26-27]。为进一步拓展 LPMOs 的来源并探究其对于不同多聚糖底物的降解方式, 本文从米曲霉中扩增 LPMO 基因, 利用毕赤酵母表达系统进行异源表达, 分析重组蛋白的酶学性质和还原剂对其活性的影响, 进一步探讨 LPMO 与 GHs 协同降解时的底物竞争性结合现象, 为高效降解木质纤维素类植物生物质转化和生物炼制建立基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

菌株米曲霉(*A. oryzae*, CICC2001)购于 CICC 菌种保藏中心; 克隆菌株 *Escherichia coli* TOP 10F' 本实验室保存; 表达载体 pET-30a(+)购于 Novagen 公司; 穿梭载体 pPIC9K 和表达宿主 *Pichia pastoris* GS115 (*his4*)购自 Invitrogen 公司。

RNA 提取、反转录试剂盒、TransTaq[®] DNA 聚合酶(HiFi)和 T4 DNA 连接酶购自北京全式金公司; 限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司。真菌 RNA 提取试剂盒、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan); Ni-NTA agarose 和 40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(29:1)溶液(分子生物学级)购自上海生工; 其余试剂为国产分析纯;

质粒提取试剂盒购自 AidLab 公司; PCR 产物纯化试剂盒、割胶回收试剂盒购自 Axygen; 刺槐豆胶底物购自 Sigma 公司; 山毛榉木聚糖底物购自 Megazyme。

1.2 培养基

LB (Luria-Bertani) 培养基: 酵母膏 (yeast extract) 5 g, 胰蛋白胨(tryptone) 10 g, NaCl 10 g, 加 ddH₂O 定容 1000 mL, 121 °C, 20 min 灭菌。固体培养基是在液体基础上加入 2%琼脂。用于转化子筛选时加入 50 µg/mL Amp 或 Kan; YPD (yeast extract peptone dextrose)培养基: 将 10 g 酵母膏和 20 g 蛋白胨加 ddH₂O 溶解至 900 mL, 121 °C, 20 min 灭菌。冷却后, 加入 100 mL 10×D。固体培养基是在液体基础上加入 2%琼脂; BMGY 培养基: 1%酵母膏, 2%蛋白胨, 0.00004%生物素, 1%甘油(V/V), pH 自然。定容至 900 mL, 121 °C, 20 min 灭菌。待冷却后, 加入 100 mL 1.34% YNB;

BMMY 培养基: 除以 0.5%甲醇代替甘油外, 其余成份同 BMGY, pH 自然, 定容至 1000 mL, 121 °C, 20 min 灭菌。

1.3 LPMO 基因克隆与序列分析

提取米曲霉总 RNA, 反转录获得 cDNA。根据 NCBI 数据库报道的米曲霉 GH61 家族 DNA 序列(GenBank No. AP007154.1 和 AP007157)设计引物(表 1)。以 cDNA 为模板, 分别利用 LPMO2-*EcoR* I /LPMO2-*Hind* III 和 LPMO5-*EcoR* I / LPMO5-*Xho* I 进行 PCR 扩增获得 *AoLPMO2* 和 *AoLPMO5* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)序列。扩增产物纯化后进行双酶切, pET-30a(+)载体用相同方式进行酶切, 经 T4 连接酶连接后转化 TOP 10F'感受态。采用菌落 PCR 法筛选阳性转化子。提取阳性重组质粒 pET30a(+)/*AoLPMO2* 和 pET30a(+)/*AoLPMO5*, 送上海生工公司测序验证。

表 1. 本研究所用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3') ^a	Product length/bp	Purpose
LPMO2- <i>EcoR</i> I	<u>CGAATTC</u> ATGTCTATCGCTAAGATTGCTGG	1053	Amplification of <i>AoLPMO2</i>
LPMO2- <i>Hind</i> III	CAAGCTTGGCAGAGATGTCACGAGCGT		
LPMO5- <i>EcoR</i> I	<u>CGAATTC</u> ATGGCTATGTCCAAGATCGTG	750	Full length amplification of <i>AoLPMO5</i>
LPMO5- <i>Xho</i> I	CCTCGAGAGCGCTGAAAACCTCAGGG		
mLPMO5- <i>EcoR</i> I	<u>CGAATTC</u> CACGGTTATGTGTCTGGAGT	705	Amplification of <i>AoLPMO5</i> mature peptide
mLPMO5- <i>Not</i> I	<u>CGCGGCCGC</u> GTGATGATGATGATGATGAGCGCTGAAAACCTCAGG		
α-factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	877	Validation of yeast transformants
3'AOX	GCAAAATGGCATTCTGACATCC		
qAO5-F	CACGGCCCTGTCCTCAATTA	197	qPCR of <i>AoLPMO5</i>
qAO5-R	CCCTCTTGGATGGATGTCGG		
qAOX-F	TCCCCAAATGGCCAAAACCT	236	qPCR of <i>AOX1</i> promoter
qAOX-R	CGGGGTTTCAGAAGCGATAGA		
qGAPDH-F	GGGTAGTGAAGGCTGCTGCTG	114	qPCR of <i>GAPDH</i>
qGAPDH-R	CCGCATCAAAGGTGGAGGAAT		

^a: restriction sites were underlined and 6×His tag was boxed.

采用 DNAStar Lasergene 7、MEGA 7.0 软件和在线工具 ClusterW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)、ESPrnt 3.0 (<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/cgi-bin/ESPrnt.cgi>)、WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 进行氨基酸比对和进化树分析, 利用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) 分析蛋白结构域, 利用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, 利用 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分析蛋白 N-和 O-糖基化。

1.4 LPMO 真核表达及拷贝数鉴定

利用 mLPMO5-*EcoR* I 和 mLPMO5-*Not* I 引物扩增 pET30a(+)/*AoLPMO5* 获得 *AoLPMO5* 成熟肽序列, 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 连接至 pPIC9K 中, 亚克隆及鉴定方法同上。利用 *Sac* I 对重组质粒 pPIC9K/*AoLPMO5* 进行线性化, 电击(1800 V, 4.5 ms)转化毕赤酵母 GS115。采用氯化苄法提取酵母基因组, 分别利用 α -factor/3'AOX 和 mLPMO5-*EcoR* I /mLPMO5-*Not* I 引物验证酵母转化子。为进一步鉴定酵母重组子中 *AoLPMO5* 基因拷贝数, 提取酵母总 RNA 并反转录成 cDNA。以 *GAPDH* 作为内参基因, 利用荧光定量 PCR 法, 检测 *pAOXI* 启动子和 *AoLPMO5* 基因的表达量。按照 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达量, 其中 $\Delta C_t = C_{t_{GAPDH}} - C_{t_{目的基因}}$ 。

1.5 重组酵母诱导表达 LPMO

将阳性菌株接种于 5 mL 含 25 μ g/mL Amp 的 YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 2 d 后。取 1 mL 接种至 200 mL BMGY 培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养 2–3 d ($OD_{600}=2-5$), 4 °C、5000 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 50 mL BMMY 培养基重悬

菌体, 30 °C、200 r/min 诱导培养, 表达期间每 24 h 补加 1% 甲醇, 同时取 1 mL 样品测定蛋白浓度和 SDS-PAGE 分析。

1.6 蛋白纯化与酶谱分析

将诱导后的菌液于 4 °C 下, 10000 r/min 离心 15 min。取上清用于 HisTrapTM FF 柱(GE Health. Bio-Sciences)进行亲和层析, 20–500 mmol/L 咪唑梯度洗脱目标蛋白。之后, 利用 Millipore Amicon[®] Ultra 超滤除去咪唑, 纯化的蛋白用于后续实验。

酶谱分析是在 SDS-PAGE 凝胶中加入终浓度为 0.5% 的底物(刺槐豆胶、羧甲基纤维素、微晶纤维素、几丁质)。样品中加入上样缓冲液后不加热, 直接进行 SDS-PAGE。电泳结束后取出凝胶, 在 25% 异丙醇中复性 2 次, 每次 20 min。复性后, 将凝胶在 4 °C 下, 于 1×PBS 缓冲液中漂洗过夜。之后经 1% 刚果红染色 20 min, 利用 1 mol/L NaCl 脱色至出现透明条带。

1.7 LPMO 酶学性质分析

(1) 活性测定: 以刺槐豆胶为底物, 采用 DNS 法^[28]测定 LPMO 活性。反应体系包含 15 μ L 酶液(2.2 μ g, 下同)和 60 μ L 0.5% 刺槐豆胶, 28 °C 反应 12 h 后, 加入 75 μ L DNS 试剂, 立即置于 99 °C 保温 10 min。待冷却至室温后, 测定 OD_{540} 的吸光值。同时, 以 99 °C 加热失活的酶蛋白为空白对照。将在最适反应条件下, 每小时降解刺槐豆胶生成 1 μ mol 还原糖所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[29]。

(2) 最适 pH: 分别用 pH 2.2–8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 0.5% 刺槐豆胶底物, 按上述反应体系在最适反应温度下反应 12 h 后, 测定 LPMO 活性, 设 4 组平行试验。以最适 pH 下的活

性为 100%，计算各 pH 条件下的相对活性。

(3) 最适温度：将最适反应 pH 配制的底物与酶蛋白混合，按上述反应体系分别置于 30–80 °C 下反应 12 h 后，测定 LPMO 活性，设 4 组平行试验。以最适温度下的活性为 100%，计算不同温度下的相对活性。

(4) 动力学参数：分别配制不同浓度(1 mg/mL–10 mg/mL)刺槐豆胶底物，在最适反应条件下进行酶促反应，反应时间为 19 h，设 4 组平行试验。利用 GraphPad Prism 7 计算 K_m 及 V_{max} 。

1.8 Cu^{2+} 、 H_2O_2 及还原剂对 AoLPMO5 活力的影响

分析不同浓度的 Cu^{2+} (0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、5.0 和 10.0 mmol/L)、GA (0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 和 2.0 mmol/L)、 H_2O_2 (0.5、2.0、2.5、5.0、10.0 和 25.0 mmol/L) 或 Vc (0.001、0.5、1 和 10 mmol/L) 对 LPMO 活性的影响。以未添加外源试剂的反应体系为 100% 对照，计算实验组的相对活性，设 4 组平行试验。

1.9 AoLPMO5 与糖苷水解酶协同催化分析

(1) 荧光光谱测定：将 0.03 μ g 纯酶与 0.1% 刺槐豆胶底物混合，利用荧光分光光度计 (RF-5301PC，岛津，日本)，激发光谱为 295 nm，发射光谱的检测范围为 300–500 nm，测定不同时间(0、30、60、90、120 min)和不同浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL)的刺槐豆胶下，蛋白的荧光强度以及最大吸收波长。同时，设置木聚糖底物为对照。

(2) 底物结合分析：以 1% 刺槐豆胶为底物，将稀释不同浓度的 AoLPMO5 (0.150、0.075、0.030、0.015 mg/mL) 和 0.33 mg/mL 甘露聚糖酶 BsMAN3 与底物进行 1 : 1 : 1 混合，冰上结合 1 h

(对照组混合后不结合)。将反应液在 12000 r/min、4 °C 离心 15 min，收集上清液进行 SDS-PAGE。利用 Image Lab v.5.2.1 软件(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 进行光密度分析，以最高浓度的 AoLPMO5 的光密度为 100%，分析上清中蛋白残余量来判断 BsMAN3 与底物的结合情况。

以 0.5% 刺槐豆胶为底物，将 60 μ L 底物和 7.5 μ L LPMO 纯化酶液混合，28 °C 下反应 1、2、4、8 和 16 h 取样。每个时间点分别取 2 份酶解液，其中一份立即置于 99 °C 中保温 10 min 灭活 LPMO 后加入 7.5 μ L BsMAN3，混匀并在 37 °C 下反应 10 min 后，加入 75 μ L DNS 试剂，99 °C 保温 10 min；另一份加入 7.5 μ L BsMAN3，混匀并在 37 °C 下反应 10 min 后，加入 75 μ L DNS 试剂，99 °C 保温 10 min。以加热灭活的体系为对照，测定 OD_{540} 吸光值，所有反应设 4 组平行试验。

(3) 协同催化作用：以刺槐豆胶为底物，进行 3 组试验。第一组加入 60 μ L 0.5% 刺槐豆胶底物、7.5 μ L 纯化酶液(1.1 μ g) 和 7.5 μ L BsMAN3 (0.17 μ g)；第二组加入 60 μ L 0.5% 刺槐豆胶底物、7.5 μ L 纯化酶液和 7.5 μ L 无菌水；第三组加入 60 μ L 0.5% 刺槐豆胶底物、7.5 μ L BsMAN3 和 7.5 μ L 无菌水；同时设空白对照组，进行 4 组平行试验。4 组均于 28 °C，分别反应 24 h 后，加入 75 μ L DNS 试剂，99 °C 保温 10 min。待冷却至室温后，测定 OD_{540} 的吸光值。

2 结果和分析

2.1 LPMOs 基因克隆与序列分析

以米曲霉 RNA 为模板，经反转录和 PCR 扩增后，获得长度为 1110 bp 的 AoLPMO2 和 750 bp 的 AoLPMO5 基因，SignalP 4.1 预测显示，

AoLPMO2 包含一段 19 个氨基酸的信号肽, AoLPMO5 包含一段 21 个氨基酸的信号肽。利用 Pfam 工具预测功能结构域发现两个蛋白都属于糖苷水解酶 GH61 家族, 即辅助酶类 AA9 家族。系统发育树分析表明, AoLPMO2 和 AoLPMO5 与其他 AA9 家族的 LPMOs 归类成一簇(图 1)。

氨基酸序列比对显示, 所有 LPMO 成熟肽序列第一个氨基酸均为完全保守的组氨酸(图 2-A), 这是 LPMO 蛋白的典型特征^[30]。且在第二个组氨酸支架(histidine brace)区域有着相似的规律, 即 H-X₈-Q/E-X-Y (图 2-B), 符合 AA9 家族 LPMOs 的特点^[31]。

2.2 重组毕赤酵母的构建与拷贝数鉴定

采用电击转化法获得 15 个包含 *AoLPMO5* 的重组酵母转化子, 命名为 GS115/pPIC9K/*AoLPMO5*。利用 qPCR 技术检测目的基因表达量, 发现 4 号转化子(GS/AO5-4)的醇氧化酶启动子 *pAOXI* 和 *AoLPMO5* 基因的表达量分别是 *GAPDH* 的 4.00 ± 0.54 和 1.85 ± 0.25 倍, 约为 GS/AO5-3 的 2 倍(图 3-A 和 3-B)。进一步检测重组酵母的蛋白表达量, 经 1% 甲醇诱导 2–4 d 后, GS/AO5-4 发酵上清液中蛋白表达量明显高于 GS/AO5-3 (图 3-C), 提示 GS/AO5-4 可能为双拷贝转化子(图 3-D)。

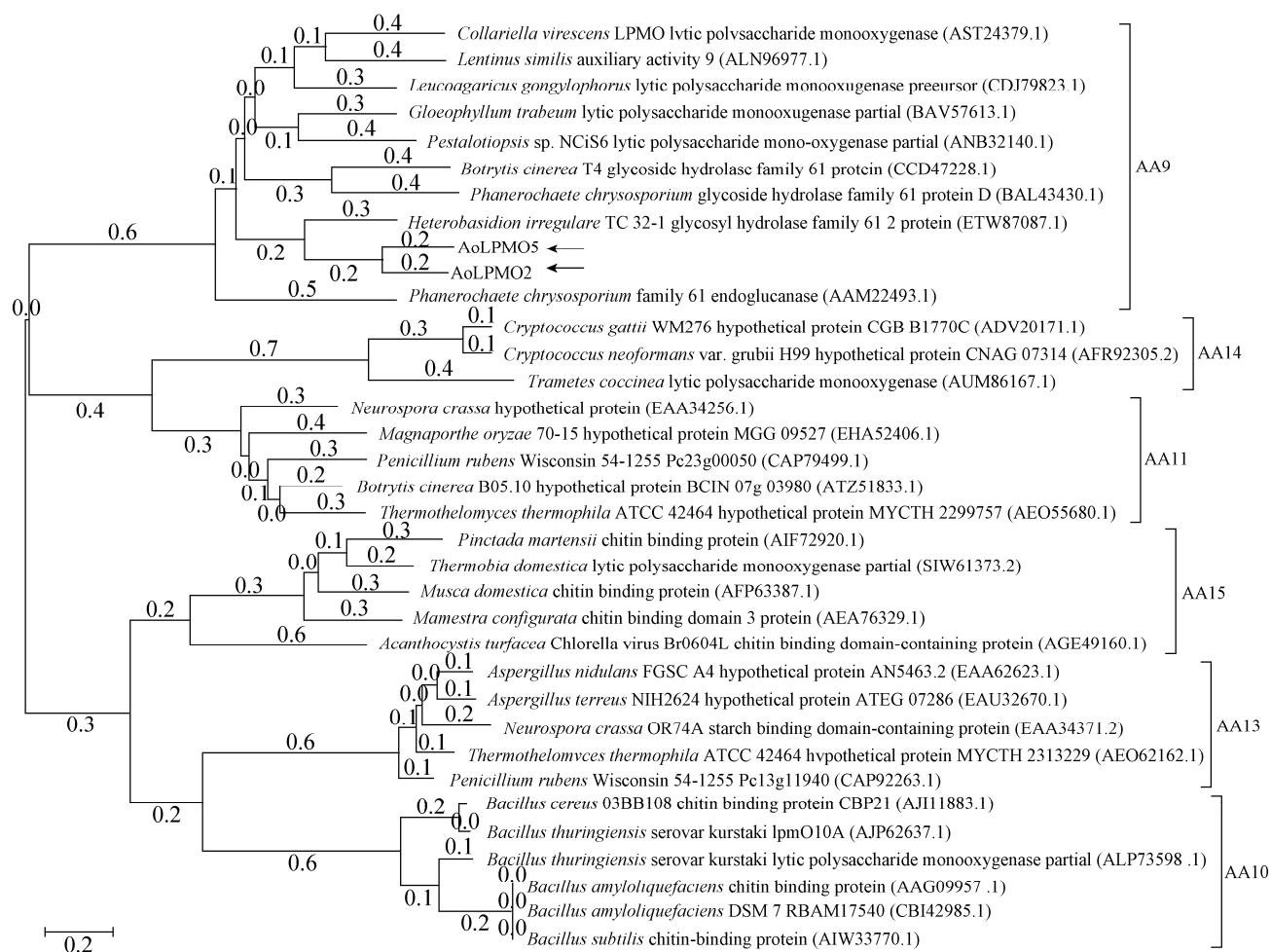


图 1. LPMOs 系统发育树分析

Figure 1. Phylogenetic tree analysis of LPMOs. LPMOs determined in this study were labeled with arrows.

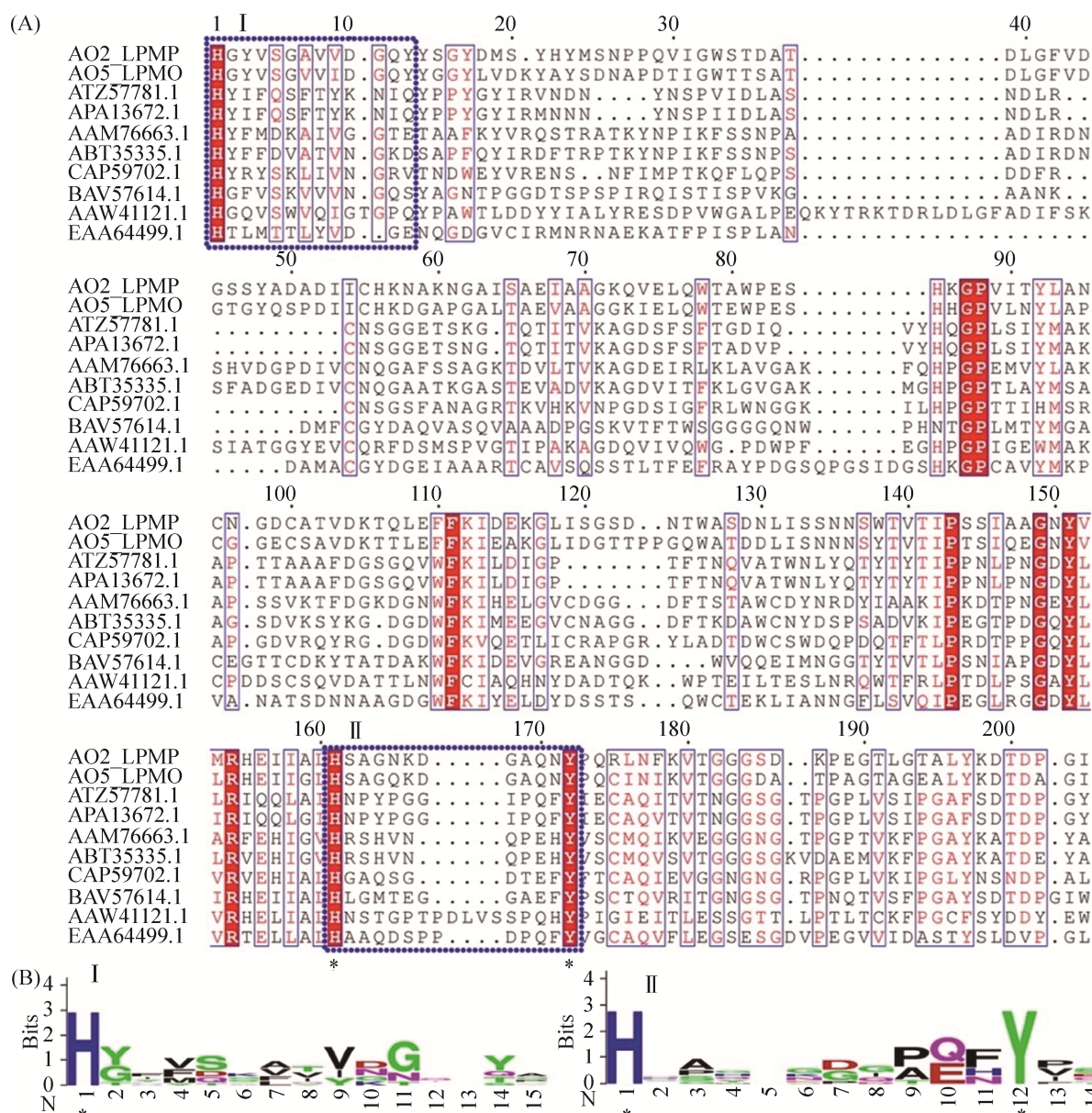


图 2. LPMO 序列分析

Figure 2. LPMO sequence analysis. A: Amino acid sequence alignment. Conserved histidine brace sites are highlighted with blue boxes. B: WebLogo analysis of peptides I and II.

2.3 AoLPMO5 诱导表达与性质分析

将双拷贝转化子 GS/AO5-4 用于 LPMO 蛋白表达, 蛋白表达量随甲醇诱导时间增加而提高(图 4-A)。经 1% 甲醇诱导 4 d 后表达量最高, 上清液中蛋白含量为 0.19 ± 0.01 g/L。GS/AO5-4 分泌的

AoLPMO5 重组蛋白为单一条带, 分子量约为 34 kDa。较之理论分子量 25.2 kDa 有所增加, 推测酵母表达的蛋白发生翻译后修饰所致。在线工具分析显示, Asn159 符合 N-糖基化位点(N-X-S/T)特征, 可能发生 N-糖基化修饰, Thr56、Thr57、Ser58、

Thr60 和 Ser249 位点可能发生 *O*-糖基化修饰。经 PNGase 处理后, 蛋白分子量降低至约 28 kDa (图 4-B), 表明该蛋白存在 *N*-糖基化。酶谱实验表明,

AoLPMO5 对刺槐豆胶具有降解活性(图 4-C), 而对羧甲基纤维素、微晶纤维素、几丁质则没有明显作用。

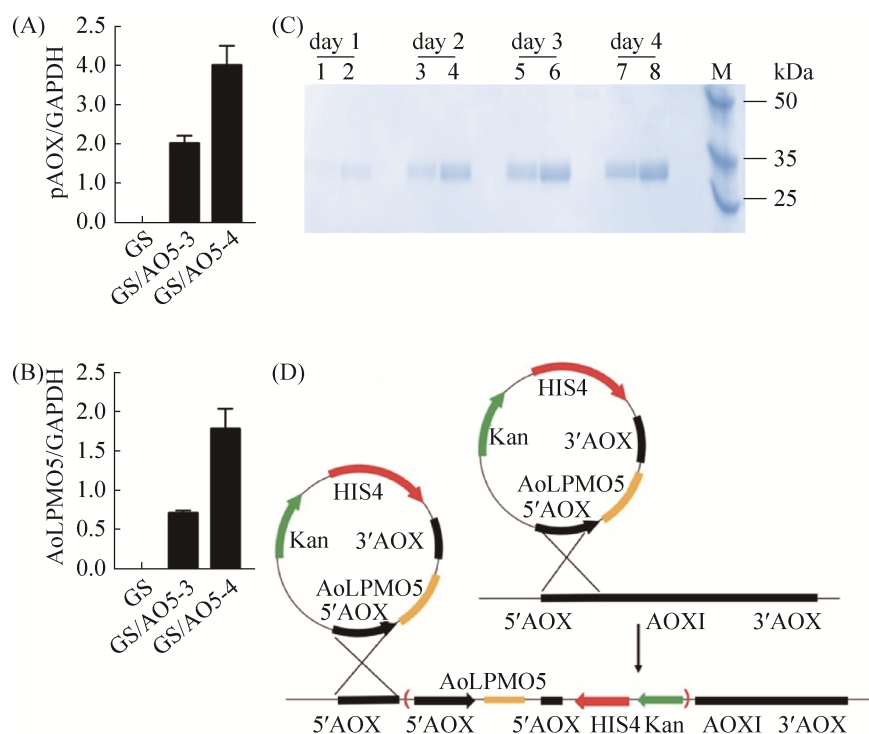


图 3. 重组酵母拷贝数鉴定与蛋白表达分析

Figure 3. Gene copy number determination and protein expression of recombinant yeasts. Transcript levels of *AOX* promoter (A) and *AoLPMO5* (B). Data were represented as mean \pm SD ($n=4$). C: secreted proteins of recombinant yeasts. 1, 3, 5, 7: GS/AO5-3; 2, 4, 6, 8: GS/AO5-4. D: schema of multiple insertion into yeast genome.

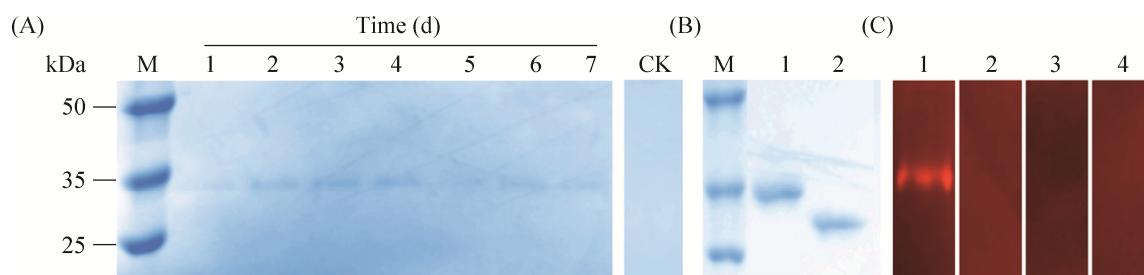


图 4. 酵母重组子表达上清液 SDS-PAGE、去糖基化及酶谱分析

Figure 4. SDS-PAGE, deglycosylation and zymogram analysis of supernatant secreted from recombinant yeast. A: SDS-PAGE of supernatant. M: marker; 1–7: 1% methanol induction for 1 to 7 d; CK: control. B: Deglycosylation. M: marker; 1: AoLPMO5; 2: deglycosylated AoLPMO5. C: zymogram analysis using gel supplemented with various substrates. 1: locust bean gum; 2: carboxymethylcellulose; 3: avicel; 4: chitin.

对 AoLPMO5 的酶学性质进行分析, 发现 AoLPMO5 的最适反应 pH 和温度分别为 5.0 和 60 °C。在 pH 5.0–7.0 或 50–70 °C 范围内活性较高 (图 5), 是一种中温、弱酸性酶。AoLPMO5 催化刺槐豆胶底物的 K_m 和 V_{max} 分别为 8.72 ± 1.99 mg/mL 和 109.4 ± 12.8 $\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ (表 2)。

2.4 Cu^{2+} 、 H_2O_2 及还原剂对 AoLPMO5 活力的影响

分析 Cu^{2+} 、 H_2O_2 及不同还原剂对 AoLPMO5 酶活的影响, 结果显示: 0.1 mmol/L 的 Cu^{2+} 能够促进 AoLPMO5 的催化作用, 使其活性提高 $(7.10 \pm 1.32)\%$ ($P < 0.05$), 当 Cu^{2+} 浓度升高至 0.4 mmol/L 以上时, 则表现出抑制作用 ($P < 0.01$) (图 6-A); 0.5、2 和 2.5 mmol/L 的 H_2O_2 均能促进 AoLPMO5 的催化作用, 使其活性分别提高 $(21.11 \pm 6.17)\%$, $(20.22 \pm 1.13)\%$, $(18.40 \pm 2.86)\%$ ($P < 0.01$), 当浓度继续升高至 5 mmol/L 以上, 则表现出抑制作用

($P < 0.01$) (图 6-B); 没食子酸和 Vc 对 AoLPMO5 活性无明显影响 (图 6-C 和 6-D)。

2.5 AoLPMO5 与糖苷水解酶协同催化分析

采用荧光光谱法分析 BsMAN3 和 AoLPMO5 与底物的结合能力, 结果显示随着酶与刺槐豆胶结合时间 (图 7-A 和 7-D) 或底物浓度 (图 7-B 和 7-E) 的增加, 酶荧光强度逐渐降低。其中, BsMAN3 的最大吸收波长从 342 nm 红移至 365 nm, AoLPMO5 最大吸收波长从 383 nm 红移至 384 nm, 提示酶活性中心附近的色氨酸残基与刺槐豆胶底物结合引起蛋白荧光强度改变, 并导致最大吸收波长红移^[32–33]。进一步以木聚糖为底物进行荧光光谱测定, 发现 BsMAN3 光谱基本保持不变, 表明 BsMAN3 不与木聚糖底物结合 (图 7-C)。而 AoLPMO5 的荧光强度随底物浓度的增加而逐渐降低, 提示 AoLPMO5 能够结合木聚糖底物 (图 7-F)。

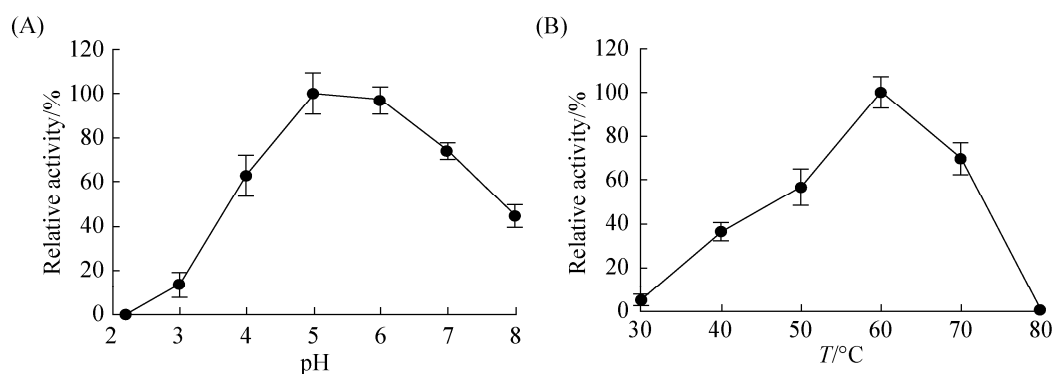


图 5. LPMO 最适反应 pH(A)和最适反应温度(B)

Figure 5. LPMO optimum pH (A) and optimum temperature (B). Data were represented as mean \pm SD ($n=4$).

表 2. LPMO 动力学常数

Table 2. Kinetic constants of LPMO^a

$K_m/(\text{mg}/\text{mL})$	$V_{max}/[\mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{mg}) \text{ protein}]$	$k_{cat}/(1/\text{s})$	$k_{cat}/K_m/[\text{mL}/(\text{mg} \cdot \text{s})]$
8.72 ± 1.99	109.4 ± 12.8	1.06 ± 0.12	0.122 ± 0.063

^a. Data were represented as mean \pm SD ($n=4$).

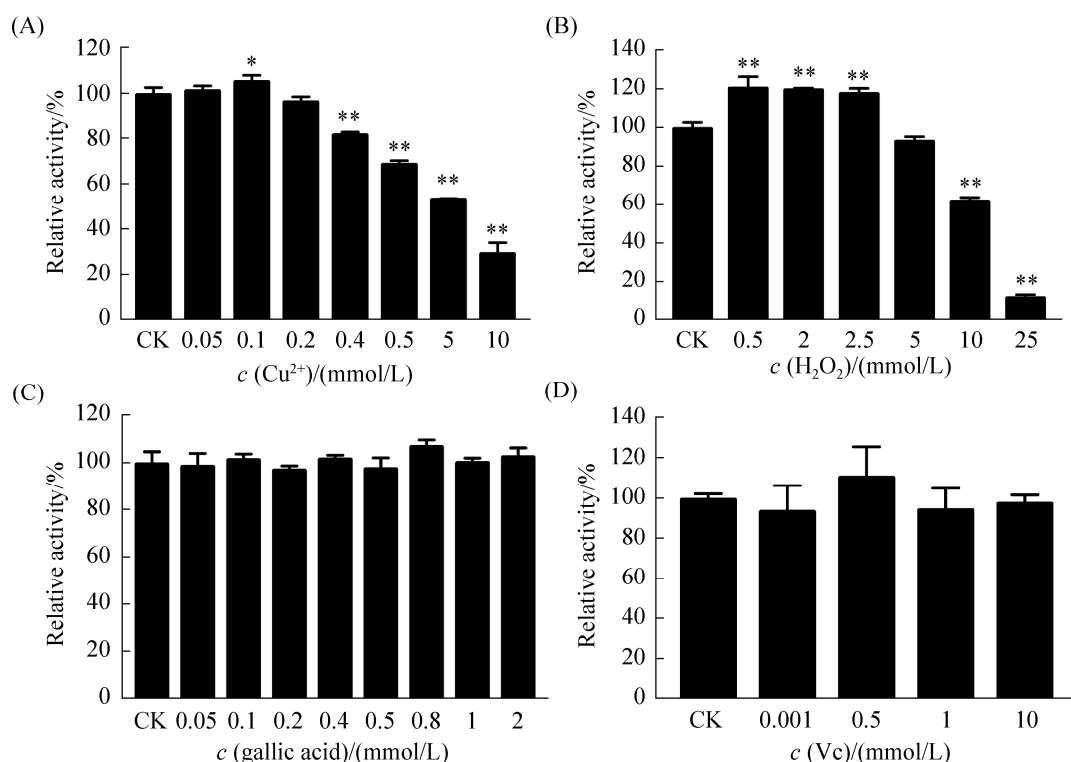


图 6. Cu^{2+} 、 H_2O_2 及还原剂对 LPMO 活性的影响

Figure 6. Effects of Cu^{2+} , H_2O_2 and reducing agents on LPMO activity. A: Cu^{2+} ; B: H_2O_2 ; C: Gallic acid; D: Vc. Data were represented as mean \pm SD ($n=4$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

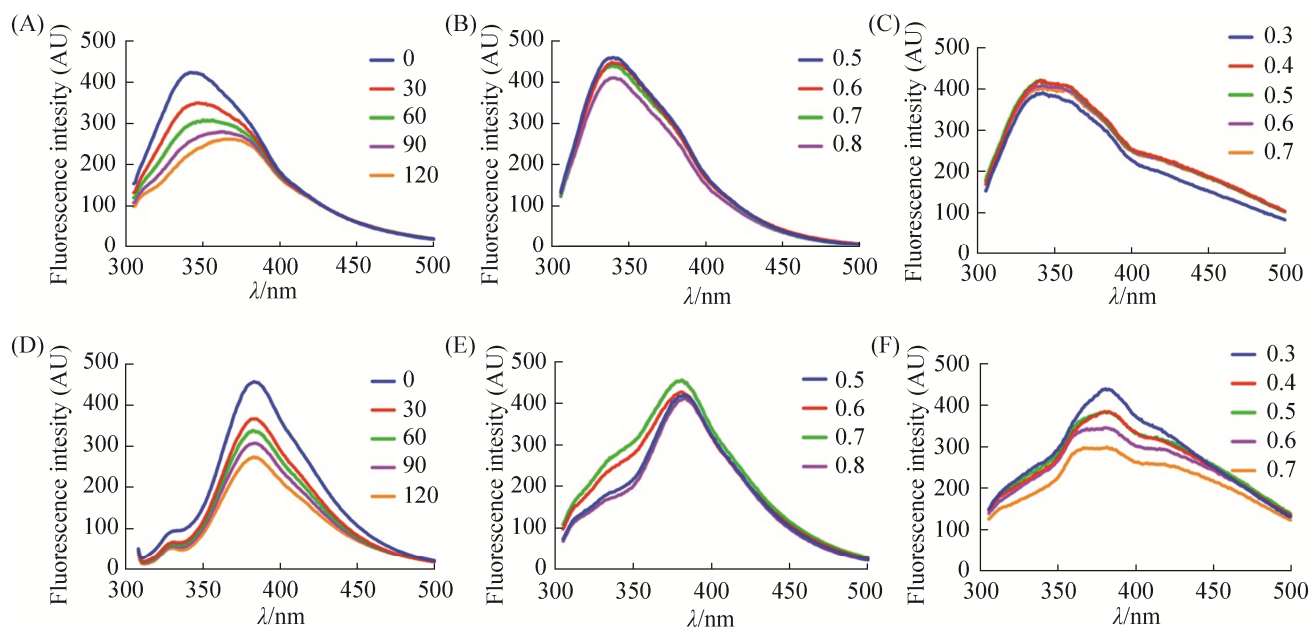


图 7. BsMAN3 与 AoLPMO5 荧光光谱分析

Figure 7. The fluorescence spectra of BsMAN3 (A–C) and AoLPMO5 (D–F). The fluorescence spectra of different time intervals (min) (A and D), various concentrations of LBG (mg/mL) (B and E), or various concentrations of xylan (mg/mL) (C and F).

上述荧光光谱实验表明, BsMAN3 和 AoLPMO5 均能与刺槐豆胶底物进行结合。因此, 本研究进一步采用离心法分析酶与底物的结合能力^[1]。随着 AoLPMO5 蛋白浓度的降低, 上清中 BsMAN3 蛋白残余量降低, 提示 AoLPMO5 与底物结合作用减弱, 同时 BsMAN3 蛋白与刺槐豆胶底物结合作用增强(图 8-A)。残余蛋白光密度分析与电泳结果相一致(图 8-B), 当 AoLPMO5 蛋白浓度为 0.015 mg/mL 时, 上清中 BsMAN3 残余量降低至(79.0±3.0)% ($P<0.01$)。

进一步设计试验研究顺序处理(AoLPMO5-灭

活 AoLPMO5-BsMAN3)和同时处理(AoLPMO5-AoLPMO5/BsMAN3)两种方式对底物降解的影响。结果显示, 顺序处理在反应前期(1–4 h)还原糖的释放量显著高于同时处理, 在 AoLPMO5 反应 1、2 和 4 h 后, 顺序处理的还原糖的释放量分别为 452.3、448.4 和 436.9 $\mu\text{mol/L}$, 是同时处理的 2.37 倍、2.67 倍和 2.10 倍($P<0.01$)。提示在协同反应前期, AoLPMO5 的氧化反应并未结束, 部分 AoLPMO5 仍结合在底物上, 影响了 BsMAN3 与底物的结合, 而在反应后期(8–16 h)两种处理方式对于底物降解效率及还原糖的释放量无显著差异

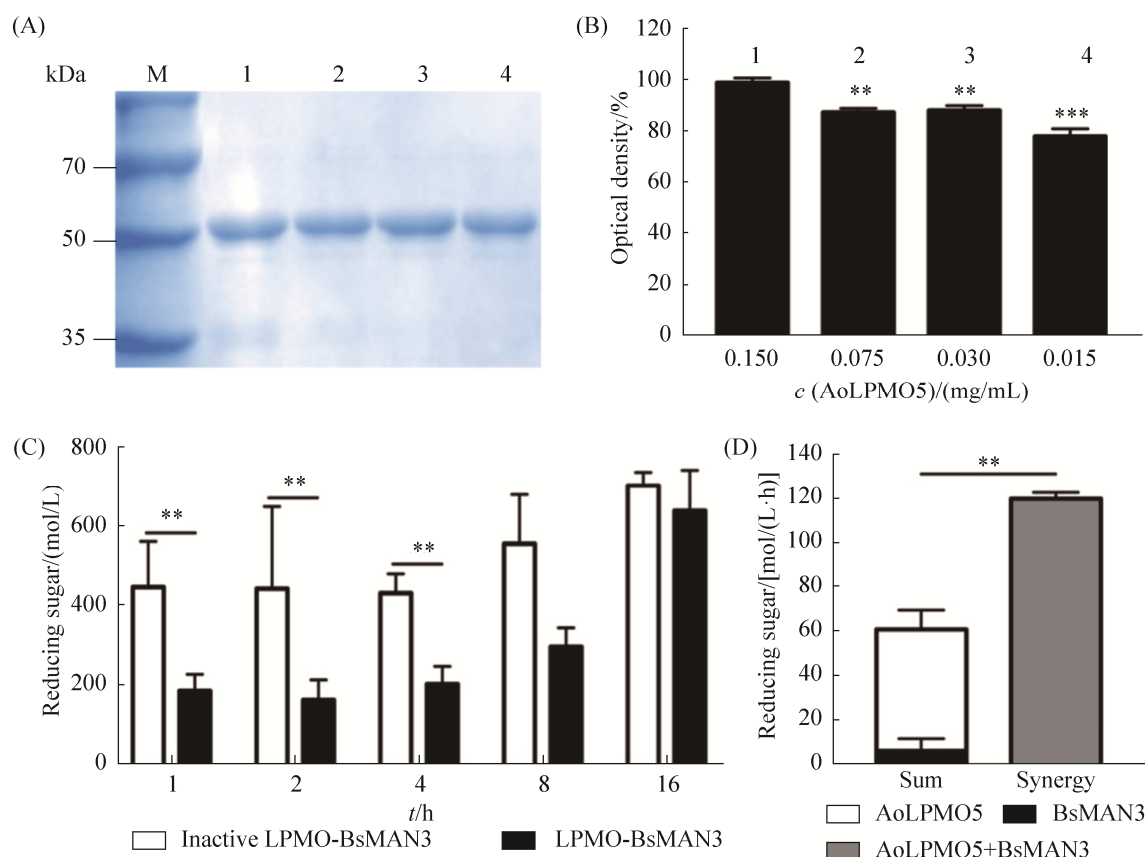


图 8. AoLPMO5 与 BsMAN3 对刺槐豆胶的作用分析

Figure 8. Effects of AoLPMO5 and BsMAN3 on locust bean gum (LBG) degradation. A: Competitive binding of AoLPMO5 and BsMAN3 (0.33 mg/mL) on LBG substrate. M: marker; lane 1: 0.150 mg/mL; lane 2: 0.075 mg/mL; lane 3: 0.030 mg/mL; lane 4: 0.015 mg/mL AoLPMO5. B: Optical density analysis of (A). C: AoLPMO5 and BsMAN3 show competitive binding to LBG substrate. D: Synergistic effects of AoLPMO5 and BsMAN3 on LBG degradation. Data were represented as mean \pm SD ($n=4$). **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

(图 8-C)。为分析 AoLPMO5 与糖苷水解酶的协同降解作用, 将 AoLPMO5、甘露聚糖酶 BsMAN3 分别降解底物, 或将 AoLPMO5 与 BsMAN3 协同降解底物。结果显示, AoLPMO5 与 BsMAN3 协同降解底物时, 还原糖的释放量为 $120.68 \pm 2.95 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$, 显著高于两种酶单独作用之和 $64.73 \pm 0.88 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ($P < 0.01$), 催化效率提高 86.44% (图 8-D)。

3 讨论

LPMOs 是一类以氧化方式打断多聚糖糖苷键的新型木质纤维素降解酶。最初, 研究人员并不清楚 LPMOs 是一种氧化酶, 因此将其划分为糖苷水解酶 61 家族(GH61), 并且认为这种酶的催化活性很低^[34]。进一步研究发现, GH61 和碳水化合物结合域 33 家族(carbohydrate-binding module family 33, CBM33)的一些成员具有氧化酶的活性^[35]。这一重大发现改变了对于 LPMOs 的分类和研究方向, LPMOs 迅速成为木质纤维素类生物转化的研究热点。由于 LPMOs 降解底物是通过氧化作用, 较之传统的 GHs 活性较低, 且 LPMOs 氧化后产生的末端可进一步被 GHs 水解, 因此被划为辅助酶类家族。

本文从米曲霉 cDNA 中克隆得到 AoLPMO2 和 AoLPMO5 基因, 两者均属于 AA9 家族成员(图 1), 且具有典型组氨酸支架结构, 符合 H-X₈-Q/E-X-Y 序列特征^[34](图 2)。值得注意的是, 第二个保守组氨酸的上游存在一个保守的 P-X₄-G-X-Y-V/L-X-R 肽段, 其功能暂不清楚, 需要后续进一步研究。目前已报道的 LPMOs 主要来源于真菌(AA9、AA11、AA13、AA14)^[34]、细菌(AA10)^[1]、病毒(AA10)^[22]、昆虫(AA15)^[23], 是否能从植物、动物甚至人类等高等生物中发现新型

LPMOs, 进一步拓宽 LPMOs 的来源, 可能成为今后的研究方向。本研究将 AoLPMO5 电击插入毕赤酵母 GS115 的基因组, 重组蛋白 AoLPMO5 的分子量较之理论值增加约 9 kDa, 经 PNGase 处理后, AoLPMO5 的分子量降低, 表明蛋白存在 N-糖基化(图 4-B)。酶谱分析显示, AoLPMO5 具备刺槐豆胶底物催化活性(图 4-C)。本研究获得了双拷贝重组酵母 GS/AO5-4, 其蛋白分泌量显著高于单拷贝转化子(图 3-C), 表明基因拷贝数是提高外源蛋白表达量的有效手段^[36]。

AoLPMO5 的动力学参数分析表明, 与传统 GHs 相比其催化活性较低(表 2), 这与其他报道相一致^[37-39], 提示它作为辅助酶参与木质纤维素降解。研究显示, Cu²⁺或 Vc 等还原剂能促进 LPMOs 的催化活性。例如, 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) CBP21 是一种依赖 Cu²⁺的氧化酶, 在 Cu²⁺的作用下, CBP21 降解晶体几丁质释放出偶数聚合度(degree of polymerization)的寡糖^[39]。Quinlan 等^[18]通过分析嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*)TaGH61 降解产物和酶分子中的金属离子, 也证明了 GH61 家族成员为 Cu²⁺依赖性的氧化酶。本研究在反应体系中加入 0.1 mmol/L Cu²⁺可以使 AoLPMO5 的活性提高(7.10 ± 1.32)% ($P < 0.01$)(图 6-A)。随着 Cu²⁺浓度的进一步提高, 则表现出抑制作用, 这与酶的基本生化性质相符合。通常情况下, 金属离子可能通过静电作用改变了解离常数, 或以配位键与蛋白的功能基团相结合, 改变酶的结构或电荷从而影响酶活性^[40]。由于 LPMO 是一种氧化酶, 在反应体系中存在 O₂ 时, 以氧化方式降解木质纤维素底物^[24]。然而, 最新研究显示, 当反应体系中包含 H₂O₂ 为共同底物时, 能够更有效地驱动 LPMO 的氧化作

用^[41]。本研究在反应体系中添加 0.5–2.5 mmol/L H_2O_2 可以显著提升 AoLPMO5 的催化活性 ($P<0.01$)。随着 H_2O_2 浓度进一步提高, 活性反而受到抑制 ($P<0.01$) (图 6-B), 推测高浓度 H_2O_2 造成酶蛋白自身被氧化, 导致酶活力降低。另一方面, Vc、没食子酸等还原剂作为电子供体也能促进 LPMO 的氧化活性^[42]。在 Vc 的作用下, BtLPMO10A 能有效降解胶体几丁质, 使其生成聚合度为 3–8 的糖醛酸^[43]。Kuusk 等^[42]通过 ^{14}C 标记结晶 α -几丁质纳米晶须(^{14}C -labeled crystalline α -chitin nanowhiskers, CNWs)为底物, 在 SmLPMO10A 反应体系中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ –1000 $\mu\text{mol/L}$ 没食子酸, 产物的生成速率随没食子酸浓度增加而提高, 表明没食子酸促进 SmLPMO10A 对底物 CNWs 的降解。然而, 本研究中没食子酸和 Vc 对 AoLPMO5 催化活性无明显影响 (图 6-C 和 6-D)。Muraleedharan 等^[44]利用傅里叶变换交流循环伏安法测定了木质素的氧化还原电位, 并与 LPMO 活性中心 Cu(II)的电位进行比较。反应介质中存在的低分子量木质素衍生化合物可以为 LPMO 提供电子, 从而促进 LPMO 的氧化活性。该研究解释了在没有电子供体的反应体系中, LPMO 发挥其木质纤维素协同降解的机制作用。

本研究采用荧光光谱法对底物结合进行分析, 发现随着结合时间及底物浓度的增加, BsMAN3 和 AoLPMO5 荧光强度发生淬灭现象, 且最大吸收波长分别红移了 23 nm 和 1 nm (图 7-A 和 7-D)。推测酶可以与刺槐豆胶底物发生结合, 从而引起色氨酸残基所处的微环境改变, 使蛋白构象发生变化, 色氨酸残基逐渐从疏水环境暴露到亲水环境中, 从而导致荧光淬灭^[33]。值得注意的是, 与木聚糖底物作用时, BsMAN3 的荧光光谱基本保持不变, 而 AoLPMO5 荧光强度明显淬

灭(图 7-F), 表明 AoLPMO5 具有结合木聚糖底物的作用。我们推测 AoLPMO5 可能是具有多底物活性的氧化酶, 这与 Fanuel 等实验结果相似^[45], 为后续充分研究 LPMO 的催化功能提供理论基础。进一步分析 AoLPMO5/BsMAN3 顺序处理和同时处理刺槐豆胶的底物降解效率, 发现在反应前期(1–4 h)顺序处理的还原糖释放量显著高于同时处理 ($P<0.01$) (图 8-C), 推测 AoLPMO5 与底物发生结合, 影响了糖苷水解酶的催化效率。Song 等^[46]采用原子力显微镜(atomic force microscopy)观察 LPMO 降解底物的动态过程, 发现 LPMO 先与底物结合, 对底物进行氧化后释放出作用位点, 便于纤维素酶 TlCel7A 结合该位点进一步实施催化作用。在反应后期(8–16 h) AoLPMO5 释放出部分催化位点, 有助于糖苷水解酶的结合, 从而发挥其降解作用, 因此顺序处理和同时处理对于底物降解效率及还原糖的最终释放量无显著差异 (图 8-C)。与此同时, AoLPMO 与 BsMAN3 还存在协同作用, 当 AoLPMO 与 BsMAN3 进行协同降解底物时, 还原糖的释放量显著高于两种酶单独作用之和 ($P<0.01$) (图 8-D), 这与其他报道相符合^[25]。

综上所述, LPMOs 是一种全新的甘露聚糖降解酶, 阐明其氧化作用机制及与 GHs 的协同增效作用机制, 将为木质纤维素类可再生生物物质的高效转化与生物炼制, 如第二代生物乙醇、功能性低聚寡糖等高附加值产品的生产建立基础。

参考文献

- [1] 施贤卫. AA10 家族溶解性多糖单加氧酶的克隆表达和性质研究. 上海交通大学硕士学位论文, 2014.
- [2] Schwarz WH. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

- 2001, 56(5/6): 634–649.
- [3] Ehara K, Saka S. Decomposition behavior of cellulose in supercritical water, subcritical water, and their combined treatments. *Journal of Wood Science*, 2005, 51(2): 148–153.
- [4] Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 41.
- [5] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51(1): 133–142.
- [6] Sun XB, Wan JX, Cao JW, Si YX, Wang Q. Progress in lytic polysaccharide monooxygenase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(2): 177–187. (in Chinese)
孙小宝, 万嘉欣, 曹佳雯, 斯越秀, 王谦. 溶解性多糖单加氧酶的研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 177–187.
- [7] Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 2005, 40(11): 3519–3525.
- [8] 姚强. 木霉纤维膨胀因子基因克隆表达及其与纤维素内切酶 CelA 催化功能机制的研究. 山东大学博士学位论文, 2007.
- [9] Hemsworth GR, Johnston EM, Davies GJ, Walton PH. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(12): 747–761.
- [10] Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding HS, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 2010, 49(15): 3305–3316.
- [11] Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 923–946.
- [12] Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 45.
- [13] Liu B, Kognole AA, Wu M, Westereng B, Crowley MF, Kim S, Dimarogona M, Payne CM, Sandgren M. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition. *The FEBS Journal*, 2018, 285(12): 2225–2242.
- [14] Hemsworth GR, Taylor EJ, Kim RQ, Gregory RC, Lewis SJ, Turkenburg JP, Parkin A, Davies GJ, Walton PH. The copper active site of CBM33 polysaccharide oxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(16): 6069–6077.
- [15] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(D1): D490–D495.
- [16] Couturier M, Ladevèze S, Sulzenbacher G, Ciano L, Fanuel M, Moreau C, Villares A, Cathala B, Chaspoul F, Frandsen KE, Labourel A, Herpoël-Gimbert I, Grisel S, Haon M, Lenfant N, Rogniaux H, Ropartz D, Davies GJ, Rosso MN, Walton PH, Henrissat B, Berrin JG. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(3): 306–310.
- [17] Tandrup T, Frandsen KEH, Johansen KS, Berrin JG, Lo Leggio L. Recent insights into lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(6): 1431–1447.
- [18] Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, Krogh KBRM, Jørgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(37): 15079–15084.
- [19] Berka RM, Grigoriev IV, Otillar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, Ishmael N, John T, Darmond C, Moisan MC, Henrissat B, Coutinho PM, Lombard V, Natvig DO, Lindquist E, Schmutz J, Lucas S, Harris P, Powlowski J, Bellemare A, Taylor D, Butler G, de Vries RP, Allijn IE, van den Brink J, Ushinsky S, Storms R, Powell AJ, Paulsen IT, Elbourne LDH, Baker SE, Magnuson J, Laboissiere S, Clutterbuck AJ, Martinez D, Wogulis M, de Leon AL, Rey MW, Tsang A. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(10): 922–927.

- [20] Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglu S, Lee SI, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scacciocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MÁ, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmari SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1105–1115.
- [21] Nekiunaite L, Arntzen MØ, Svensson B, Vaaje-Kolstad G, Abou Hachem M. Lytic polysaccharide monooxygenases and other oxidative enzymes are abundantly secreted by *Aspergillus nidulans* grown on different starches. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 187.
- [22] Chiu E, Hijnen M, Bunker RD, Boudes M, Rajendran C, Aizel K, Oliéric V, Schulze-Briese C, Mitsuhashi W, Young V, Ward VK, Bergoin M, Metcalf P, Coulibaly F. Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their *in vivo* crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(13): 3973–3978.
- [23] Sabbadin F, Hemsworth GR, Ciano L, Henrissat B, Dupree P, Tryfona T, Marques RDS, Sweeney ST, Besser K, Elias L, Pesante G, Li Y, Dowle AA, Bates R, Gomez LD, Simister R, Davies GJ, Walton PH, Bruce NC, McQueen-Mason SJ. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 756.
- [24] Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(2): 562–565.
- [25] Forsberg Z, Mackenzie AK, Sørle M, Røhr ÅK, Helland R, Arvai AS, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(23): 8446–8451.
- [26] Bennett JW. *Aspergillus* and *koji*: history, practice and molecular biology. *SIM News*, 2001, 51: 65–71.
- [27] Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi PR, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(3): 646–670.
- [28] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [29] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [30] Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnai A, Røhr ÅK, Payne CM, Sørle M, Sandgren M, Eijsink VGH. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(38): 22955–22969.
- [31] Span EA, Marletta MA. The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 35: 93–99.
- [32] Shi XY, Zhang LL, Wu F, Fu YY, Yin SJ, Si YX, Park YD. Kinetics for Cu^{2+} induced *Sepia pharaonis* arginine kinase inactivation and aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 926–933.
- [33] Huang JH, Xu YF, Qian XH. A red-shift colorimetric and fluorescent sensor for Cu^{2+} in aqueous solution: unsymmetrical 4,5-diaminonaphthalimide with N-H deprotonation induced by metal ions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(7): 1299–1303.
- [34] Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(24): 6498–6507.
- [35] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D233–D238.

- [36] Zhu W, Hu YJ, Xie LP. Related strategies and research progress of efficient expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2018, 49(4): 417–425. (in Chinese)
朱文, 胡又佳, 谢丽萍. 毕赤酵母高效表达外源蛋白的相关策略及研究进展. *中国医药工业杂志*, 2018, 49(4): 417–425.
- [37] Crouch LI, Labourel A, Walton PH, Davies GJ, Gilbert HJ. The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(14): 7439–7449.
- [38] Lo Leggio L, Simmons TJ, Poulsen JCN, Frandsen KEH, Hemsworth GR, Stringer MA, von Freiesleben P, Tovborg M, Johansen KS, de Maria L, Harris PV, Soong CL, Dupree P, Tryfona T, Lenfant N, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nature Communications*, 2015, 6: 5961.
- [39] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu ZL, Zhai H, Sørle M, Eijsink VGH. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 2010, 330(6001): 219–222.
- [40] 朱运平. 海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)产耐高温木聚糖酶 B 的固定化及应用. 中国农业大学硕士学位论文, 2005.
- [41] Bissaro B, Røhr ÅK, Müller G, Chylenski P, Skaugen M, Forsberg Z, Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(10): 1123–1128.
- [42] Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørle M, Bissaro B, Eijsink VGH, Våljamäe P. Kinetic insights into the role of the reductant in H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(5): 1516–1528.
- [43] 张卉妍. 一种新型多糖裂解单加氧酶的克隆表达及其性质研究. 大连工业大学硕士学位论文, 2015.
- [44] Muraleedharan MN, Zouraris D, Karantonis A, Topakas E, Sandgren M, Rova U, Christakopoulos P, Karnaouri A. Effect of lignin fractions isolated from different biomass sources on cellulose oxidation by fungal lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 296.
- [45] Fanuel M, Garajova S, Ropartz D, McGregor N, Brumer H, Rogniaux H, Berrin JG. The *Podospora anserina* lytic polysaccharide monooxygenase PaLPMO9H catalyzes oxidative cleavage of diverse plant cell wall matrix glycans. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 63.
- [46] Song B, Li BY, Wang XY, Shen W, Park S, Collings C, Feng A, Smith SJ, Walton JD, Ding SY. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 41.

Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* lytic polysaccharide monooxygenases

Yuhe Feng[#], Xiaobao Sun[#], Shuxin Chen, Huien Zhang, Xinlei Shi, Yebo Zhou, Guoying Qian, Shangjun Yin^{*}, Qian Wang^{*}

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are new lignocellulose-degrading enzymes that break glycosidic bonds of polysaccharides via oxidation. This study aims to explore and characterize novel LPMOs. **[Methods]** LPMO genes were cloned from *Aspergillus oryzae* and expressed in *Pichia pastoris*. **[Results]** Sequence analysis indicated that both AoLPMO2 and AoLPMO5 belong to auxiliary activity 9 family. AoLPMO5 was transformed into *P. pastoris* GS115 to obtain a 2-copy insertion yeast GS/AO5-4. After induction by 1% methanol for 4 d, protein yield in culture supernatant reached 0.19±0.01 g/L. The molecular mass of recombinant protein was approximate 34 kDa, which was higher than the theoretical calculation, indicating probably post-translation modification proceeded in yeast host. The optimal temperature and pH of AoLPMO5 to catalyze locust bean gum were 60 °C and 5.0. Its K_m and V_{max} were 8.72±1.99 mg/mL and 109.4±12.8 μmol/(s·mg), respectively. Addition of 0.1 mmol/L Cu²⁺, 0.5, 2.0 and 2.5 mmol/L H₂O₂ enhanced its catalytic activity by (7.10±1.32)% ($P<0.05$), (21.11±6.17)% ($P<0.01$), (20.22±1.13)% ($P<0.01$) and (18.40±2.86)% ($P<0.01$), respectively, while gallic acid or vitamin C did not show promotion. The AoLPMO5 was found to bind with locust bean gum substrate at the early stage of reaction, resulting in temporary inhibition of mannanase (BsMAN3) activity. However, these two enzymes showed synergic effects on substrate deconstruction at the later period. **[Conclusion]** AoLPMO5 is a novel biomass-degrading enzyme. Insights into its enzymatic properties and substrate-degrading patterns will contribute to natural lignocellulosic biomass conversion and biorefinery, especially second-generation bioethanol and functional oligosaccharides production.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, lytic polysaccharide monooxygenases, oxidation, *Pichia pastoris*, enzymatic properties, substrate binding

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LQ19C050001), by the Zhejiang Provincial Top Key Discipline (CX2017021) and by the Zhejiang Wanli University Research & Development Funding

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. Qian Wang, Tel: +86-574-88222391, E-mail: wangq@zww.edu.cn; Shangjun Yin, E-mail: yinshangjun@163.com

Received: 26 March 2019; Revised: 19 April 2019; Published online: 13 May 2019