



## 裂解性多糖单加氧酶 *HcLPMO* 与纤维素酶协同降解纤维素

黄天晨<sup>1,2</sup>, 杨建花<sup>2,3</sup>, 唐梓静<sup>2,3</sup>, 高乐<sup>2,3</sup>, 张东远<sup>2,3</sup>, 侯颖<sup>1\*</sup>, 朱蕾蕾<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023

<sup>2</sup> 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

<sup>3</sup> 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

**摘要:**【目的】为研究 *HcLPMO* 的活性测定方法及其与纤维素酶的协同降解特性。【方法】利用大肠杆菌表达系统进行 *HcLPMO* 异源表达, 研究以 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 为荧光底物的 LPMOs 活性检测条件; 研究 *HcLPMO* 与纤维素酶最优配比协同降解微晶纤维素及其他多种生物质底物的能力。【结果】表达条件确定最适装液量为 20%, 最适诱导温度为 20 °C。活性测定研究表明 *HcLPMO* 需先与铜离子结合才具有活性, 电子供体抗坏血酸钠(ASC)最适浓度为 10<sup>-4</sup> mol/L, 并发现 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 浓度以及辣根过氧化物酶浓度对酶活的检测影响较小。*HcLPMO* 与纤维素酶协同降解微晶纤维素研究确定 *HcLPMO* 与纤维素酶最优配比为 2:3, 葡萄糖产量相较纤维素酶单独作用提高了 99.48%。此外, 针对多种生物质底物, 发现该酶与纤维素酶的复配体系对汽爆玉米秸秆和微晶纤维素的协同降解效果较好, 相较于单独用纤维素水解酶, 葡萄糖产量分别提高了 63.81%和 59.43%, 而对碱处理玉米芯和木薯渣降解效果次之, 葡萄糖产量仅分别提高 35.41%和 11.06%。【结论】*HcLPMO* 与纤维素酶复配能够有效提高酶法降解纤维素效率; 而底物前处理如蒸汽爆破或碱处理对于 *HcLPMO* 与纤维素酶协同降解木质纤维素影响较大。

**关键词:** 裂解性多糖单加氧酶, 纤维素酶, 纤维素, 活性检测, 协同降解

纤维素是地球上重要的可再生资源, 可被降解为可溶性可发酵糖, 但其复杂的晶体结构阻碍了纤维素酶促水解的效率<sup>[1]</sup>。传统纤维素酶法降解对于底物结晶区域的降解效率低, 需要对多糖底

物进行预处理以提高糖苷水解酶的降解效率<sup>[2]</sup>。2010年 Vaaje-Kolstad 研究组首次发现裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)是一类可以作用于多糖的氧化酶, 能够通

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0902200); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-KJGG-006); 国家自然科学基金(31901066); 天津市科技支撑计划(18ZXYENC00150)

\*通信作者。侯颖, Tel: +86-379-64282342, E-mail: houying76@126.com; 朱蕾蕾, Tel: +86-22-24828796, E-mail: zhu\_ll@tib.cas.cn

收稿日期: 2020-07-10; 修回日期: 2020-10-20; 网络出版日期: 2020-11-05

过氧化作用来断裂纤维素的糖苷键,使得结晶底物的结构趋于松散,为后续水解酶的进一步降解作用提供更多作用位点<sup>[3]</sup>。

LPMOs 是一类铜依赖性加氧酶<sup>[4]</sup>,在氧和外部电子供体存在下催化多糖中糖苷键的氧化裂解<sup>[5-6]</sup>。LPMOs 主要通过位于保守的末端酪氨酸残基轴线上的关键残基和铜离子与相邻的两条纤维素链的相互作用,稳定地结合在纤维素的平坦疏水表面上<sup>[7-8]</sup>。迄今为止共发现约 68 种 LPMOs, CAZy 数据库基于序列相似性将 LPMOs 归类为辅助酶类家族<sup>[9]</sup> (auxiliary activity, AA), 包括 AA9、AA10、AA11、AA13<sup>[10-12]</sup>、AA14、AA15<sup>[13-14]</sup>及 AA16<sup>[15]</sup>家族,主要作用于几丁质、淀粉和纤维素,能够有效协助几丁质酶、淀粉酶或纤维素酶对几丁质、淀粉和纤维素的降解<sup>[16]</sup>。

近年来,国内外对于 LPMOs 的应用研究着重于对预处理尤其是蒸汽爆破底物的协同降解。如 Filiatrault-Chastel 等发现 *Aspergillus japonicus* BRFM 1487 和 1490 在木质纤维素底物(蒸汽爆破麦秸和芒草)上产生的分泌蛋白组将葡萄糖产量提高了 9%至 16%<sup>[15]</sup>。Zhu 等发现 *Schizophyllum commune*(1 种 LPMO 与纤维素酶混合酶)可以从预处理的生物质中获得更高的木聚糖水解效率。水解 72 h 后,此混合酶在预处理的柳枝中木聚糖转化率为 75.9%,而市售来自于 *Trichoderma longibrachiatum* 的酶制剂在相同底物中仅水解 19.1%的木聚糖<sup>[7]</sup>; Petrovi 等使用含 LPMO 的纤维素酶混合物 Cellic® CTec2 在抗坏血酸存在下比 85% Novozym188 (C/N188)和 15% BSA 的混合物处理蒸汽爆破桦树 96 h 葡萄糖产率增加 25%<sup>[17]</sup>。

HcLPMO 是 1 种来源于 *Hahella chejuensis* 的 LPMO<sup>[18]</sup>,其具有 1662bp 的开放阅读框,编码 554

个氨基酸。HcLPMO 蛋白具有 3 个不同的模块,AA10(最初被划分到碳水化合物结合域 33 家族 carbohydrate-binding module family 33, CBM33; 203 个残基)和 CBM2 (106 个残基),由 222 个未知功能残基的区域连接。HcLPMO 主要作用于纤维素,对于羧甲基纤维素和纤维低聚糖类具有弱内葡聚糖酶活性。HcLPMO 在大肠杆菌中的表达量比较高,热稳定性较好,最适反应温度为 45 °C<sup>[18]</sup>,是一个比较好的研究对象,可以用作纤维素酶的协同增效剂,以有效地降解纤维素晶体。本研究测定了其与纤维素酶协同降解微晶纤维素、碱处理玉米芯、汽爆玉米秸秆和木薯渣等不同多糖底物的降解效率,并研究了 HcLPMO 与纤维素酶降解微晶纤维素的最优配比。本研究为应用 LPMOs 与纤维素酶协同降解多糖物质提供了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 大肠杆菌 *E. coli* BL21 Gold (DE3)、pET-28a 空载质粒及 pET-28a-HcLPMO 质粒均来自于课题组保存。HcLPMO 的 GenBank Accession No. ABC27701。

**1.1.2 培养基和主要试剂:** (1) LB 培养基: Yeast Extract, 5 g/L; Tryptone, 10 g/L; NaCl, 10 g/L。(2) LB 固体培养基: 在上述培养基中加入 18 g/L 的琼脂粉。(3) 主要试剂: 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪 (Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red) 购自美国 Life Technologies 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)购自上海艾研生物科技有限公司; 纤维素酶(绿色木霉)购于绿源生物有限公司; 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)购于 Sigma 公司; 质粒提取试剂盒购于天根生化科技有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂

盒购于 Sangon biotech, Ni Sepharose 6 Fast Flow His 标签蛋白纯化填料购于瑞典 GE 公司。超滤管购于德国 Merck KGaA darmstadt; 微晶纤维素 (avicel) 购于国药集团化学试剂有限公司, 碱处理玉米芯、木薯渣和汽爆玉米秸秆(40–60 目)均由中科院天津工业生物技术研究所工业生物系统工程研究组赠予。

## 1.2 *HcLPMO* 的诱导表达和分离纯化

首先将 pET28a-*HcLPMO* 重组质粒转化到表达宿主 *E. coli* BL21 Gold (DE3) 中, 利用质粒提取试剂盒提取表达菌株的质粒并测序验证后, 挑选阳性重组菌单菌落至含 LB (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan) 试管中过夜培养后, 接种 1% 到 400 mL LB 培养基 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan) 的 2 L 锥形瓶中培养 (37  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min) 培养至  $OD_{600}$  值为 0.6 左右, 加入 IPTG (终浓度为 0.4 mmol/L) 进行诱导表达 (20  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min, 24 h)。6000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 并将菌体重悬于 20 mmol/L, pH 6.0 磷酸钠缓冲液中。冰浴条件下超声破碎细胞, 12000 r/min 离心 30 min, 收集上清液并于 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤。使用 Ni Sepharose 6 Fast Flow His 标签蛋白纯化填料自填装镍柱纯化 *HcLPMO* 蛋白, 用 15 倍柱体积含有 20 mmol/L 咪唑的 washing buffer 进行洗脱以除去杂蛋白, 再用 10 倍柱体积

250 mmol/L 咪唑浓度洗脱液 elution buffer 洗脱得到 *HcLPMO* 纯酶。然后利用 30 kDa 超滤管除去咪唑后, 用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

## 1.3 *HcLPMO* 活性检测

由于 LPMOs 酶活性检测复杂, Kittl 等发现了一种新的检测方法, 基于 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 试剂为底物的荧光检测法<sup>[19]</sup>。Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 是一种过氧化物酶荧光底物, 通常用作  $\text{H}_2\text{O}_2$  探针, 具有高灵敏度和稳定性。溶解性多糖单加氧酶能与电子供体在氧气存在的条件下反应生成过氧化氢, 过氧化氢在辣根过氧化物酶的作用下, 能够与 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 反应生成具有荧光效应的试卤灵。试卤灵在激发波长 560 nm, 发射波长 590 nm 的条件下能够被检测, 通过连续测定, 以斜率 (slope, RFU/s) 反映 LPMOs 的相关氧化性质 (图 1)。

*HcLPMO* 氧化活性测定体系: *HcLPMO* 1 mg/mL, HRP 7.5 U/mL, 抗坏血酸钠 (ASC) 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

检测条件: 激发波长 560 nm, 发射波长 590 nm, 通过连续测定, 以斜率 (slope, RFU/s) 反映 *HcLPMO* 氧化活性, 检测温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

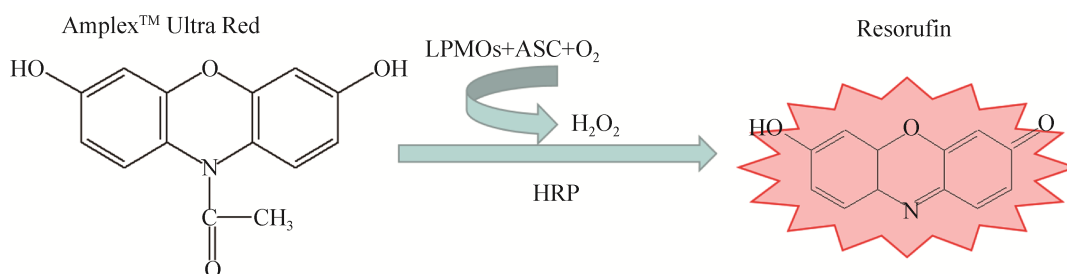


图 1. LPMOs 荧光分光光度法活性测定原理

Figure 1. Principle of LPMO activity determination based on Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red. HRP: horseradish peroxidase; ASC: ascorbic acid sodium salt.

## 1.4 *HcLPMO* 诱导条件优化

**1.4.1 装载量条件优化:** 100 mL 锥形瓶分别装载为 10–50 mL LB 液体培养基(Kan 50  $\mu\text{g/mL}$ ), 接种 1%新鲜的 pET-28a-*HcLPMO* 培养液; 培养 1.5–2.0 h 后, 测  $OD_{600}$ , 接近 0.6 后向其中加入终浓度 0.4 mmol/L IPTG, 置于 20  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min 诱导 24 h; 诱导完毕后, 测量  $OD_{600}$ , 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测目的蛋白诱导表达量。

**1.4.2 诱导表达温度条件优化:** 100 mL 锥形瓶确定相关装载 20 mL LB 液体培养基(50  $\mu\text{g/mL}$  Kan), 接种 1%新鲜的 pET-28a-*HcLPMO* 培养液, 培养 1.5–2.0 h 后, 测  $OD_{600}$ , 接近 0.6 后向其中加入终浓度 0.4 mmol/L IPTG, 分别置于 10、20、30  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min 诱导 24 h; 诱导完毕后, 测量  $OD_{600}$ , 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测目的蛋白诱导表达量。

## 1.5 *HcLPMO* 活性检测条件优化

**1.5.1 铜离子对 *HcLPMO* 活性测定的影响:** 镍柱纯化后, 用 pH 8.0 的 Tris-HCL 缓冲液溶解目标蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 按 1:5 比例加入  $\text{CuSO}_4$ , 在室温下放置 30 min 后, 再除去游离  $\text{Cu}^{2+}$ , 用 pH 6.0 的磷酸钠缓冲液置换 2–3 遍后测定活性, 与未加  $\text{Cu}^{2+}$  比较<sup>[20]</sup>, 空白对照为 pH 6.0 磷酸钠缓冲液添加同量  $\text{Cu}^{2+}$ , 再通过超滤管除去游离  $\text{Cu}^{2+}$  样品, 其他条件与 1.3 中测定体系一致。

**1.5.2 抗坏血酸盐对 *HcLPMO* 活性测定的影响:** 用已结合铜离子的 *HcLPMO* 为样品测定, 终浓度为 1 mg/mL; 其中抗坏血酸盐终浓度选定  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  mol/L; 空白对照为 pH 6.0 磷酸钠缓冲液添加同量  $\text{Cu}^{2+}$ , 再通过超滤管除去游离  $\text{Cu}^{2+}$  样品, 其他条件与 1.3 中测定体系一致。

**1.5.3 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 浓度对 *HcLPMO* 活性测定的影响:** 用已结合铜离子的 *HcLPMO* 为样品测定; 其中 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 终浓度选定为 0.250、0.050、0.005 mmol/L; 空白对照为 pH 6.0 磷酸钠缓冲液添加同量  $\text{Cu}^{2+}$ , 再通过超滤管除去游离  $\text{Cu}^{2+}$  样品, 其他条件与 1.3 中测定体系一致。

**1.5.4 辣根过氧化物酶浓度对 *HcLPMO* 活性测定的影响:** 用已结合铜离子的 *HcLPMO* 纯酶为样品测定; 其中辣根过氧化物酶 HRP 终浓度选定为 75.00、37.50、7.50、3.75 U/mL; 空白对照为 pH 6.0 磷酸钠缓冲液添加同量  $\text{Cu}^{2+}$ , 再通过超滤管除去游离  $\text{Cu}^{2+}$  样品, 其他条件与 1.3 中测定体系一致。

## 1.6 *HcLPMO* 与纤维素酶协同降解微晶纤维素最优组合比例测定

**1.6.1 反应体系:** 微晶纤维素 4% (W/V), 抗坏血酸钠 2 mmol/L, 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 总体积 10 mL。反应温度 45  $^{\circ}\text{C}$ , 220 r/min 振荡反应 72 h。取样 2 mL, 12000 r/min 离心 15 min, 收取上清, 上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜除菌, 液相测定葡萄糖含量。设定 *HcLPMO* 和纤维素酶总蛋白量 0.5 mg/mL, 共 5 组平行实验, 其中 *HcLPMO* 和纤维素酶比值分别为 0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0。

**1.6.2 色谱条件:** 在柱温 35  $^{\circ}\text{C}$  下使用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱。流动相为 5 mmol/L 硫酸溶液, 流速为 0.6 mL/min, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。通过折光指数检测器(refractive index detector, RID)又称示差折光检测器恒温 35 $^{\circ}\text{C}$  检测样品。

**1.7 *HcLPMO* 与纤维素酶对不同底物的协同降解**  
为探究 *HcLPMO* 与纤维素酶对不同多糖底物的协同降解效果, 分别选用碱处理玉米芯、木薯渣、汽爆玉米秸秆和微晶纤维素作为底物, 反应

体系: 底物 4% (*W/V*), *HcLPMO* 0.1 mg/mL, 纤维素酶 0.4 mg/mL, ASC 2 mmol/L,  $\text{Cu}^{2+}$  0.1 mmol/L 用 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)补足至 10 mL, 空白对照组不加 *HcLPMO*、ASC 和  $\text{Cu}^{2+}$ , 纤维素酶浓度为 0.5 mg/mL, 其他条件一致。45 °C, 220 r/min 振荡反应 72 h。反应结束后, 取适量反应液, 12000 r/min 离心 15 min, 收取上清, 上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜除菌, 液相检测葡萄糖产量。

## 2 结果和分析

### 2.1 *HcLPMO* 的表达和纯化

对含 pET28a-*HcLPMO* 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 细胞用终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 然后利用 SDS-PAGE 检测 *HcLPMO* 表达情况。结

果如图 2-A 所示, 由图 2-A 可以看出, *HcLPMO* 经 IPTG 诱导后, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中能够大量地表达; 蛋白质实际分子量约为 68 kDa。采用镍柱亲和层析纯化 *HcLPMO* 蛋白, 其 SDS-PAGE 结果如图 2-B 所示, 证明在目的基因后添加的组氨酸标签起到亲和层析的作用, 保证目的蛋白能够通过镍柱进行纯化。

### 2.2 *HcAA10-2* 氧化活性测定

测定 *HcLPMO* 的氧化活性表明: 诱导表达的 *HcLPMO* 的大肠杆菌细胞破碎液的荧光强度明显高于含空载 pET-28a 的大肠杆菌细胞破碎液的荧光强度(图 3-A)。将 *HcLPMO* 进行纯化后, 纯酶表现出较高的 LPMO 酶氧化活性(图 3-B), 验证了 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 试剂为荧光底物的荧光检测法测定 *HcLPMO* 活性的可行性。

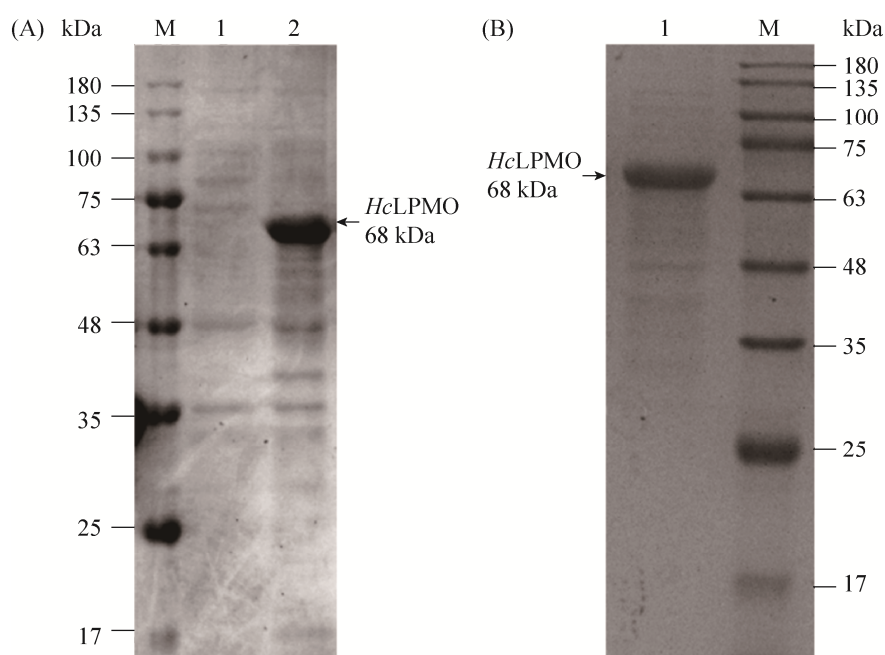


图 2. 诱导表达及纯化后 *HcLPMO* SDS-PAGE

Figure 2. SDS-PAGE of *HcLPMO* after induced expression and purification. A: SDS-PAGE of *HcLPMO* after induced expression. M: protein marker; lane 1: uninduced *HcLPMO*; lane 2: induced *HcLPMO*. B: SDS-PAGE of purified *HcLPMO*. M: protein marker; lane 1: purified *HcLPMO*.

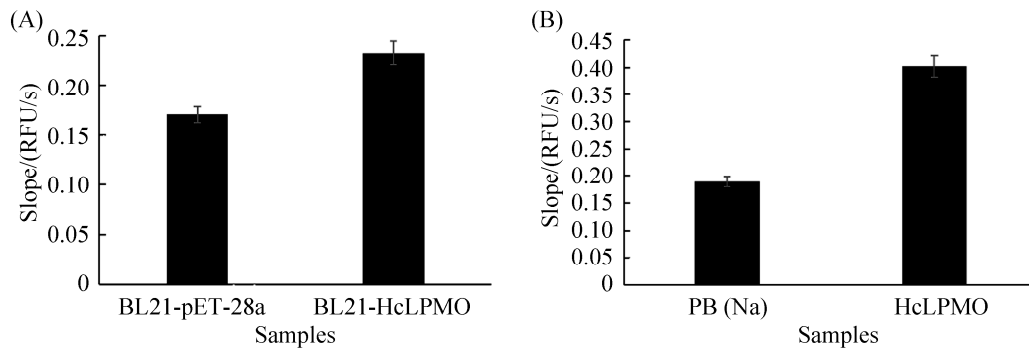


图 3. 全细胞及纯酶 *HcLPMO* 氧化活性测定

Figure 3. Activity determination of *HcLPMO* in whole cell and purified *HcLPMO*. A: activity determination of *HcLPMO* in whole cell; B: activity determination of purified *HcLPMO*. PB(Na): pH 6.0 sodium phosphate buffer. Data were represented as mean $\pm$ SD ( $n=2$ ).

### 2.3 *HcLPMO* 诱导条件优化

**2.3.1 装液量条件优化:** 结合图 4 可得知: 在不同装液量条件下, 宿主细胞大肠杆菌生长  $OD_{600}$  相差不大, 但在 20% 装液量时所产 *HcLPMO* 活性较高, 因此较优装液量为 20%。

**2.3.2 诱导温度条件优化:** 结合图 5-A 可得知, 在 10 °C 诱导温度下大肠杆菌  $OD_{600}$  明显偏低, 生长缓慢, 20 °C、30 °C 诱导温度下  $OD_{600}$  相差不大, 但从图 5-B 中可以看到 20 °C 诱导温度下所产 *HcLPMO* 活性较高, 因此较优诱导温度为 20 °C。

### 2.4 *HcLPMO* 活性检测条件优化

基于 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 试剂为荧光底物的荧光检测法测定 *HcLPMO* 活性时, 探究抗坏血酸盐、环境温度、铜离子、Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 浓度以及辣根过氧化物酶浓度等条件对活性测定产生的影响, 结果如图 6, 发现 *HcLPMO* 与铜离子结合以及 ASC 浓度对于 *HcLPMO* 的活性影响较大; 在 *HcLPMO* 与铜离子结合后, 活性测定时提高较多(图 6-A); *HcLPMO* 活性测定时, 在高 ASC 浓度情况下, *HcLPMO* 活性测定较高, 但此为 ASC

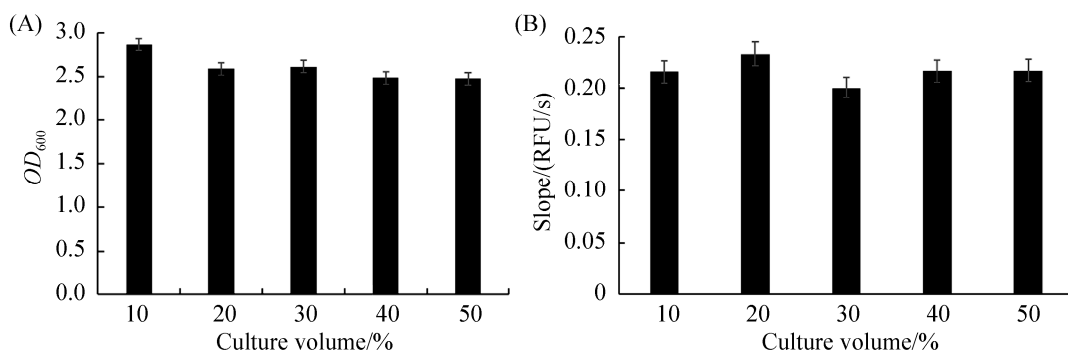


图 4. 不同装液量菌体  $OD_{600}$  及全细胞活性

Figure 4.  $OD_{600}$  and activity of whole cell at different culture volumes. A:  $OD_{600}$  at different culture volumes; B: activity of whole cell at different culture volumes. Data were represented as mean $\pm$ SD ( $n=2$ ).

本身带来的背景, 空白对照在相同条件下测出来相当高的值, 而当 ASC 浓度降低到  $10^{-4}$  mol/L 时, 活性测定的背景趋于稳定为 0.17 左右, ASC 浓度再降低时, 无法为 *HcLPMO* 活性测定提供足够的电子, 因此最终选择 ASC 终浓度为  $10^{-4}$  mol/L (图

6-B); Amplex™ Ultra Red 浓度以及辣根过氧化物酶浓度对活性测定影响较小, 考虑到经济性与操作性, 故 Amplex™ Ultra Red 终浓度为 0.05 mmol/L (图 6-C); 辣根过氧化物酶终浓度为 7.5 U/mL (图 6-D)。

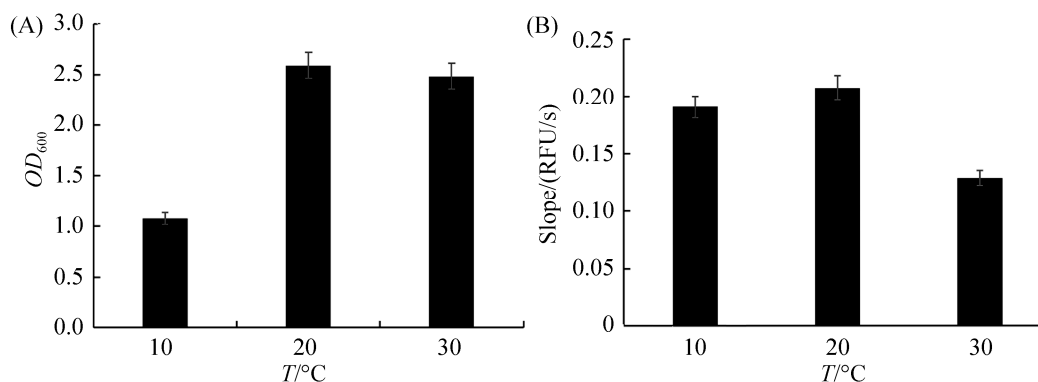


图 5. 不同诱导温度条件下菌体  $OD_{600}$  及全细胞活性

Figure 5.  $OD_{600}$  and activity of whole cell at different induction temperature. A:  $OD_{600}$  at different induction temperature; B: activity of whole cell at different induction temperature. Data were represented as mean±SD ( $n=2$ ).

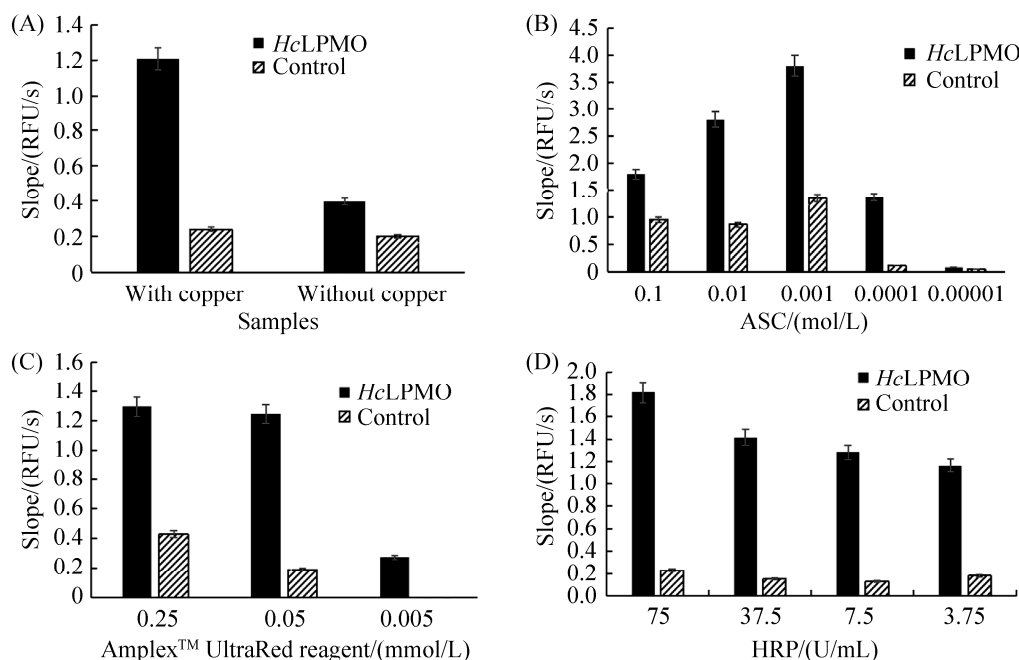


图 6. 不同因素对 *HcLPMO* 活性测定的影响

Figure 6. Effect of different factors on the determination of *HcLPMO* activity. A: effect of copper ions on the determination of *HcLPMO* activity; B: determination of *HcLPMO* enzyme activity under different ascorbate concentrations; C: determination of *HcLPMO* activity at different Amplex™ Ultra Red concentrations; D: determination of *HcLPMO* activity at different horseradish peroxidase concentrations. Data were represented as mean±SD ( $n=2$ ).

## 2.5 *HcLPMO* 与纤维素酶协同降解微晶纤维素的最优组合比例

本研究在酶蛋白总载量为 0.5 mg/mL 条件下, 将 *HcLPMO* 与纤维素酶按不同比例组合协同降解微晶纤维素, 结果如图 7 所示。在纤维素酶用量为 0 mg/mL 时, 即单独使用 0.5 mg/mL 的 *HcLPMO* 纯酶处理微晶纤维素时, 无葡萄糖产生, 证明 *HcLPMO* 无纤维素酶活性。随着纤维素酶含量逐步增加, 即 *HcLPMO* 与纤维素酶比例的降低, 葡萄糖的产量也逐步增加。当 *HcLPMO* 与纤维素酶比例为 2:3 时, 水解反应 72 h 后, 若排除抗坏血酸和  $\text{Cu}^{2+}$  对纤维素酶的影响, 与 0.5 mg/mL 纯纤维素酶降解效率相比, 葡萄糖产量从 0.76 g/L 提升到 1.52 g/L, 即微晶纤维素的降解率提高了 99.38%; 若不排除抗坏血酸和  $\text{Cu}^{2+}$  对纤维素酶的影响, 微晶纤维素的降解效率更高。当纤维素酶用量为 0.4 mg/mL 时, 即 *HcLPMO* 与纤维素酶比例为 1:4 时, 与单独使用 0.5 mg/mL 纤维素酶处理微晶纤维素相比, 其葡萄糖产生率仅提高了 34.29%, 与最优比例下葡萄糖产量差距明显。

## 2.6 *HcLPMO* 与纤维素酶对不同底物的协同降解

本研究用 *HcLPMO* 与纤维素酶协同处理不同

底物如微晶纤维素、汽爆玉米秸秆、碱处理玉米芯和木薯渣时发现, 针对前处理过如蒸汽爆破或碱处理的底物, *LPMO* 与纤维素酶协同效果更好, 其中汽爆玉米秸秆的降解效果提升最为明显, 相比于 0.5 mg/mL 纤维素酶单独处理, 用 *HcLPMO* 替换其中 20% 蛋白时, 葡萄糖产量提高了 63.81%; 微晶纤维素的葡萄糖产量相对提高了 59.43%; 相同条件下, 碱处理玉米芯葡萄糖产量提高了 35.41%; 而未经前处理的木薯渣仅提高了 11.06% (图 8)。Sanhueza 等用 *GtLPMO* 取代 Celluclast 1.5 L (一种商业纤维素酶) 10% 情况下水解用碱处理的小麦秸秆时, 还原糖产量提高 35%<sup>[8]</sup>, 与本研究用 *HcLPMO* 替代纤维素酶处理碱处理的玉米芯效果相近。

## 3 讨论

本研究利用大肠杆菌成功实现了 *HcLPMO* 的异源表达, 优化诱导表达条件, 确定较优诱导装液量为 20%, 较优诱导温度为 20 °C, 并利用镍柱获得了 *HcLPMO* 的纯酶。实验发现, 离子结合以及 ASC 浓度对 *HcLPMO* 的活性影响较大, 应注

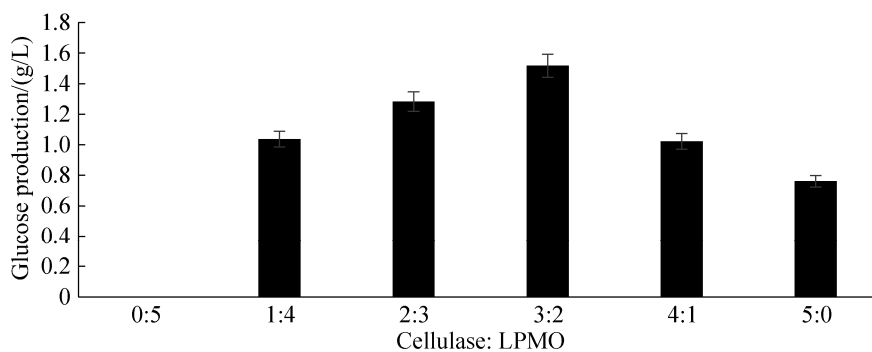


图 7. 不同比例 *HcLPMO* 与纤维素酶组合对微晶纤维素协同降解

Figure 7. Synergistic degradation of avicel by *HcLPMO* and cellulase with different proportions. Data were represented as mean±SD ( $n=2$ ).



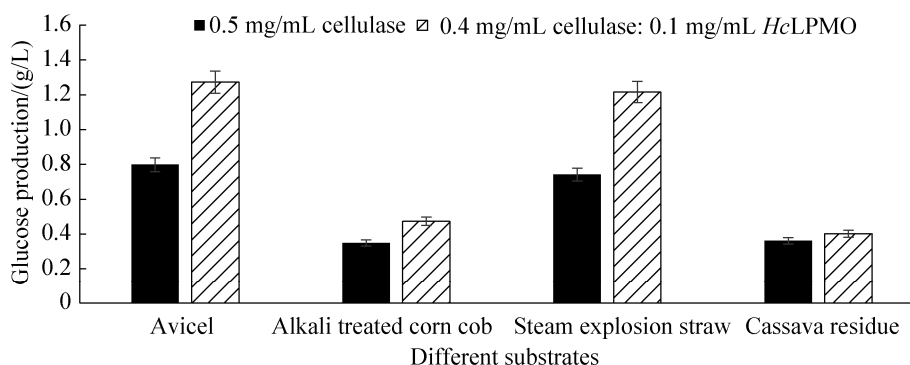


图 8. *HcLPMO* 与纤维素酶协同降解不同底物

Figure 8. Synergistic degradation of different substrates by *HcLPMO* and cellulase. Data were represented as mean $\pm$ SD ( $n=2$ ).

意比例。采用 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 试剂为底物的荧光光度法检测到该酶的氧化活性，并优化了此检测方法的条件，发现此检测方法中的各组分应合理配比，减小背景荧光，从而反映 *HcLPMO* 真实活性。本研究 *HcLPMO* 活性测定条件的优化为使用 Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red 为荧光底物使用荧光分光光度法进行稳定有效的 LPMOs 活性检测奠定了基础。

本研究对 LPMOs 与纤维素酶协同降解微晶纤维素的组合比例进行了优化，结果表明 LPMOs 与纤维素酶比例不同，协同降解效果也不相同。在相同酶载量情况下，*HcLPMO* 与纤维素酶比例对其降解微晶纤维素的效果有显著影响，当 *HcLPMO* 与纤维素酶组合比例为 2:3 时，其降解微晶纤维素的效果最好，葡萄糖产量比 0.5 mg/mL 纤维素酶单独处理微晶纤维素时提高了 99.38%。Du 等研究纤维素酶和 *AnLPMO*15g 不同用量协同作用时，最高能提高 93%，与本研究提高效率相近<sup>[4]</sup>；Zhang 等研究重组 PMO9A\_MALCI 和纤维素酶制剂 CellicCtec2 以 9:1 的比例相对于 8:2 比例作用于酸、碱处理的稻草和桦树的水解水平都有

所提高<sup>[21]</sup>，与本研究中最优比例不同，原因可能是不同种类 LPMOs 作用于不同底物时具有不同的合适配比。但这进一步证明合适的 LPMOs 与纤维素酶比例或许是帮助酶法降解纤维素实际应用过程中提高效率不可或缺的一方面。

针对不同底物，LPMOs 与纤维素酶降解效率也都不相同。本研究用 *HcLPMO* 与纤维素酶协同作用处理 4 种不可溶多糖底物，即用 20% *HcLPMO* 代替纤维素酶，发现 4 种多糖的降解效率均有所提升；但经过前处理的底物汽爆玉米秸秆、微晶纤维素和碱处理玉米芯的降解效率提升明显，葡萄糖产量分别提升了 63.81%、59.43% 和 35.41%；而未经前处理的木薯渣葡萄糖产量仅提高了 11.06%。Du 等研究发现来源于 *Aspergillus niger* 的 *AnLPMO*15g 和纤维素酶对不同底物水解过程中的协同活性也有很大区别，预处理过的秸秆协同度(1.27)相比于微晶纤维素(1.182)、羧甲基纤维素(0.993)效果都有所提升<sup>[4]</sup>。而本研究进一步验证了底物前处理对于木质纤维素降解应用的帮助，也为 LPMOs 应用效率的提高提供了参考。

## 参考文献

- [1] Li YH, Zhao FK. Advances in cellulase research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005, 17(5): 392–397. (in Chinese)  
李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展. *生命科学*, 2005, 17(5): 392–397.
- [2] Shi XW, Zhang WT, Zhang XF, Yang GY, Feng Y. The heterologous expression and characterization of lytic polysaccharide monoxygenase from *Actinosynnema mirum* DSM 43827. *China Biotechnology*, 2014, 34(7): 17–23. (in Chinese)  
施贤卫, 张伟涛, 张小飞, 杨广宇, 冯雁. *Actinosynnema mirum* DSM43827 溶解性多糖单加氧酶的异源表达和酶学性质表征. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(7): 17–23.
- [3] Hemsworth GR, Davies GJ, Walton PH. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(5): 660–668.
- [4] Du LP, Ma LJ, Ma Q, Guo GJ, Han XX, Xiao DG. Hydrolytic boosting of lignocellulosic biomass by a fungal lytic polysaccharide monoxygenase, AnLPMO15g from *Aspergillus niger*. *Industrial Crops and Products*, 2018(126): 309–315.
- [5] Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørli M, Bissaro B, Eijsink VGH, Väljamäe P. Kinetic insights into the role of the reductant in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 294(5): 1516–1528.
- [6] Wu M, Beckham GT, Larsson AM, Ishida T, Kim S, Payne CM, Himmel ME, Crowley MF, Horn SJ, Westereng B, Igarashi K, Samejima M, Ståhlberg J, Eijsink VGH, Sandgren M. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monoxygenase GH61D from the basidiomycota fungus *phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(18): 12828–12839.
- [7] Zhu N, Liu J, Yang J, Lin Y, Yang Y, Ji L, Li M, Yuan H. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*, 2016(9): 42.
- [8] Sanhueza C, Carvajal G, Soto-Aguilar J, Lienqueo ME, Salazar O. The effect of a lytic polysaccharide monoxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017(113): 75–82.
- [9] 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.
- [10] 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 monoxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition. *The FEBS Journal*, 2018, 285(12): 2225–2242.
- [11] 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.
- [12] Lombard V, Ramulu GH, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 2013(42): D490–D495.
- [13] 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.
- [14] Tandrup T, Frandsen KEH, Johansen KS, Berrin JG, Lo

- Leggio L. Recent insights into lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(6): 1431–1447.
- [15] Filiatrault-Chastel C, Navarro D, Haon M, Grisel S, Herpoël-Gimbert I, Chevret D, Fanuel M, Henrissat B, Heiss-Blanquet S, Margeot A, Berrin JG. AA16, a new lytic polysaccharide monoxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnology for Biofuels*, 2019(12): 55.
- [16] Forsberg Z, Sørlie M, Petrović D, Courtade G, Aachmann FL, Vaaje-Kolstad G, Bissaro B, Røhr ÅK, Eijsink VGH. Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2019(59): 54–64.
- [17] Petrović DM, Bissaro B, Chylenski P, Skaugen M, Sørlie M, Jensen MS, Aachmann FL, Courtade G, Várnai A, Eijsink VGH. Methylation of the N - terminal histidine protects a lytic polysaccharide monoxygenase from auto - oxidative inactivation. *Protein Science*, 2018, 27(9): 1636–1650.
- [18] Ghatge SS, Telke AA, Waghmode TR, Lee Y, Lee KW, Oh DB, Shin HD, Kim SW. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3041–3055.
- [19] Kittl R, Kracher D, Burgstaller D, Haltrich D, Ludwig R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 79.
- [20] Loose JSM, Forsberg Z, Fraaije MW, Eijsink VGH, Vaaje-Kolstad G. A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. *FEBS Letters*, 2014, 588(18): 3435–3440.
- [21] Zhang RQ, Liu YC, Zhang Y, Feng D, Hou SL, Guo W, Niu KL, Jiang Y, Han LJ, Sindhu L, Fang X. Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monoxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(14): 5739–5750.

# Synergistic degradation of cellulose by lytic polysaccharides monooxygenase *HcLPMO* and cellulase

Tianchen Huang<sup>1,2</sup>, Jianhua Yang<sup>2,3</sup>, Zijing Tang<sup>2,3</sup>, Le Gao<sup>2,3</sup>, Dongyuan Zhang<sup>2,3</sup>, Ying Hou<sup>1\*</sup>, Leilei Zhu<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan Province, China

<sup>2</sup> Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>3</sup> National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

**Abstract:** [Objective] To study the synergistic degradation of cellulose by lytic polysaccharide monooxygenase *HcLPMO* and cellulase. [Methods] We used *E. coli* for heterologous expression of *HcLPMO* and studied the influences of various conditions on the activity detection of LPMOs with Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red as fluorogenic substrate. Subsequently, we studied the synergistic degradation of avicel and other biomass substrates with different proportion of *HcLPMO* and cellulase. [Results] We found the optimal filling liquid volume was 20% and the optimal induction temperature was 20 °C for *HcLPMO* expression. The results of activity determination show that *HcLPMO* had activity only when it was combined with copper ions. The optimal concentration of sodium ascorbate was 10<sup>-4</sup> mol/L. We also found that the concentration of Amplex<sup>TM</sup> Ultra Red and horseradish peroxidase had little effect on the detection of enzyme activity. For the synergistic degradation of avicel by *HcLPMO* and cellulase, we found the optimal ratio of *HcLPMO* to cellulase was 2:3, and the yield of glucose increased by 99.48% compared with cellulase alone. In addition, for a variety of biomass substrates, *HcLPMO* and cellulase had better synergistic degradation efficiency on steam exploded straw and microcrystalline cellulose from which the yield of glucose increased by 63.81% and 59.43%, respectively, compared with using cellulase alone. For alkali treated corn cob and cassava residue, the yield of glucose only increased by 35.41% and 11.06%, respectively. [Conclusion] The appropriate ratio of *HcLPMO* and cellulase can effectively improve the efficiency of enzymatic degradation of cellulose, and substrate pretreatment is very helpful for the synergistic degradation of lignocellulose by *HcLPMO* and cellulase.

**Keywords:** lytic polysaccharide monooxygenases, cellulase, cellulose, activity detection, cooperative degradation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902200), by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-006), by the National Natural Science Foundation of China (31901066) and by the Tianjin Science and Technology Support Program (18ZXYENC00150)

\*Corresponding authors. Ying Hou, Tel: +86-379-64282342, E-mail: houying76@126.com; Leilei Zhu, Tel: +86-22-24828796; E-mail: zhu\_ll@tib.cas.cn

Received: 10 July 2020; Revised: 20 October 2020; Published online: 5 November 2020