

嗜热毛壳菌多糖单加氧酶的氧化特性及协同作用

夏东慧, 刘宁, 郭秀娜, 李多川*

山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018

摘要: 以嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* 多糖单加氧酶 CtPMO1 为研究对象, 利用薄层层析色谱法(TLC)、高效液相色谱-示差折光检测法(HPLC-RID)和飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测 CtPMO1 的酶活性, 并根据定点突变的原理, 将 CtPMO1 第 1 位的组氨酸(His1)和第 166 位的谷氨酰胺(Gln166)突变为 H1A、Q166A 和 Q166E, 研究两个突变位点是否参与 CtPMO1 的氧化作用; 另外, 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法检测 CtPMO1 与纤维素酶(EG II、BGL I 和 CBH I)的协同效应。研究发现 CtPMO1 在温度为 50 °C、pH 为 5.0 的条件下降解磷酸膨胀纤维素(PASC), 其酶解产物中不仅存在纤维二糖至纤维五糖, 还存在 C1 氧化寡糖和 C4 氧化寡糖; 此外, 发现突变酶 H1A 完全丧失了酶活, Q166A 丧失了 C1 和 C4 氧化活性, 而 Q166E 保留了部分 C1 氧化活性; 通过对 CtPMO1 与纤维素酶协同作用的探究, 发现利用 CtPMO1 预处理磷酸膨胀纤维素(PASC), 分别添加 EG II、BGL I 和 CBH I, 使还原糖产量分别提高 2.10 倍、2.08 倍和 2.16 倍, 协同度分别是 1.022、0.799 和 0.875。研究结果表明 CtPMO1 对底物具有 C1 和 C4 氧化的功能, 其反应的最适温度为 50 °C、最适 pH 为 5.0; CtPMO1 活性中心氨基酸 His1 和平坦表面氨基酸 Gln166 均是关键性位点; CtPMO1 预处理 PASC, 使纤维素酶的降解效率发生不同程度的提高。

关键词: 多糖单加氧酶; 纤维素酶; C1/C4 位氧化; 定点突变

[引用本文] 夏东慧, 刘宁, 郭秀娜, 李多川, 2022. 嗜热毛壳菌多糖单加氧酶的氧化特性及协同作用. 菌物学报, 41(7): 1068-1079
Xia DH, Liu N, Guo XN, Li DC, 2022. The oxidation properties and synergism of polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*. Mycosystema, 41(7): 1068-1079

The oxidation properties and synergism of polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*

XIA Donghui, LIU Ning, GUO Xiuna, LI Duochuan*

College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: The enzyme activity of polysaccharide monooxygenase CtPMO1 from *Chaetomium*

基金项目: 国家科技支撑计划(2015BAD15B05); 国家自然科学基金(31571949); 国家高技术研究发展计划(2012AA10180402)
Supported by the Key Technologies Research and Development Program of China (2015BAD15B05), the National Natural Science Foundation of China (31571949), and National High Technology Research and Development Program of China (2012AA10180402).

*Corresponding author. E-mail: lidc20@sdau.edu.cn

Received: 2021-09-03, accepted: 2021-09-30

thermophilum was detected by a series of methods like thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography-refractive index detector (HPLC-RID) and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Two residues (His1 and Gln166) of wild-type *CtPMO1* enzyme (WT) were mutated by site-directed mutagenesis to form three mutated enzymes (H1A, Q166A and Q166E), and whether the three mutants of *CtPMO1* are involved in catalytic activity of C1 and C4 oxidation was clarified. The synergism of *CtPMO1* with cellulase (*EG* II, *BGL* I and *CBH* I) was detected by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). It was found that treatment of phosphoric acid-swollen cellulase (PASC) with *CtPMO1* at 50 °C and pH 5.0 mainly produced cello-oligosaccharides with a degree of polymerization (DP) from DP2 to DP5, and C1- and C4-oxidized oligosaccharides in the enzymatic hydrolysis products. It was also found that H1A completely lost its activity, Q166A completely lost activity of C1 and C4 oxidation, and Q166E retained partial activity of C1 oxidation. According to the results of the synergism, the reducing sugar yield increased by 2.10, 2.08 and 2.16 times, respectively, when PASC was catalyzed by *CtPMO1* and added *EG* II, *BGL* I and *CBH* I. The corresponding synergism degrees were 1.022, 0.799 and 0.875, respectively. We concluded that *CtPMO1* could oxidized C1 and C4 position on cellulose, and when *CtPMO1* was incubated with insoluble substrate phosphoric acid-swollen cellulase (PASC), the highest activity was exhibited at optimal reaction conditions of 50 °C and pH 5.0. *CtPMO1* active center amino acid His1 and flat surface amino acid Gln166 are key sites. After *CtPMO1* pretreated PASC, the degradation efficiency of cellulase was improved in different degrees.

Keywords: polysaccharide monooxygenases; cellulase; C1 and C4 oxidation; site-directed mutagenesis

纤维素是地球上最为丰富的可再生能源之一(Ragauskas *et al.* 2006),具有顽固的晶体结构和易被酶解的无定形区,研究表明,采用物理方法(如:蒸汽爆破、研磨和辐射等)和化学方法(如:溶解、酸碱和氧化等)可以增加无定形区的含量,使纤维素资源得到充分的利用(Dhepe & Fukuoka 2008)。但是,这类方法仍存在很多弊端,带来环境污染和资源浪费等问题,所以国内外学者越来越关注生物法对纤维素降解的研究(Quinlan *et al.* 2011; van Dyk & Pletschke 2012)。生物法降解的关键就是将纤维素转化为单糖,目前,对纤维素的糖化过程研究较多的是酶水解法,即利用纤维素酶水解纤维素产生葡萄糖(Quirk *et al.* 2010)。纤维素酶是指能水解纤维素分子中的 β -1,4-糖苷键,使纤维素变成纤维二糖和葡萄糖的一种多组分酶系,尽管这类酶系是通过协同作用来完成对纤维

素的降解,但是纤维素分子链内部及链间存在复杂的氢键网络,严重影响了纤维素酶的水解效率(孟凡辉等 2015),后来人们试图寻找辅助酶类,发现了 CBM33 和 GH61 家族,随着对这两个家族的深入研究,发现二者都是通过氧化还原反应高效裂解结晶物质的糖苷键。基于这种特殊的催化反应,人们将这类酶统称为裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs),又称为多糖单加氧酶(PMOs) (Horn *et al.* 2012; Medie *et al.* 2012)。PMOs 的发现提高了生物质的降解效率,为农业和工业的可持续发展做出了突出的贡献。

PMOs 是一类铜离子依赖酶,在 O_2 和还原型电子供体存在时,与底物发生氧化反应,使结晶底物的结构趋向于松散,而这种催化氧化方式有待一步研究,最早提出的是 C1 氧化和 C4 氧化模式(Hemsworth *et al.* 2015)。Chen *et al.*

(2018)则证实了C6氧化的观点,即在C6位氧化生成C6-己二醛,进一步氧化为含有纤维低聚糖的葡萄糖醛酸。真菌中对PMOs的研究主要集中于AA9家族(Monclaro & Filho 2017),针对PMOs的辅助功能,越来越多的研究者关注其与纤维素酶的协同作用。例如,Du *et al.* (2018)研究发现来自黑曲霉 *Aspergillus niger* 的AnLPMO 15g与纤维素酶共同催化微晶纤维素和秸秆,还原糖产量是纤维素酶单独作用的1.93倍和2.31倍,马立娟等(2019)进一步研究AnLPMO15g的N-糖基化修饰对协同效应的影响,发现N-151和N-385位点的糖基化修饰明显提高了与纤维素酶协同降解的活性;朱敏等(2019)研究发现PMO7651对内切纤维素酶(EG I)、外切纤维素酶(CBH I)和 β -葡萄糖苷酶(BGL I)的降解效率分别提高了约1.03、0.42和0.18倍。事实证明,PMOs的添加确实可以提高纤维素酶的降解速率,但是混合酶的比例会影响协同程度,有时混合酶之间只是发生简单的叠加作用,有时甚至出现抑制作用(Zhou *et al.* 2019)。因此,对于AA9家族PMOs与纤维素酶的协同作用有待更加深入的研究,以期达到更好的降解效果,为生物法降解纤维素提供更新的研究基础。

本文选择来自嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* La Touche AA9家族的CtPMO1为研究对象,CtPMO1在毕赤酵母GS115中的表达量很高,主要降解底物是纤维素,但目前对CtPMO1氧化特性和辅助活性的研究还不够深入,所以本文采用不同的分析方法探究CtPMO1的酶活,以证明该酶对底物具有C1和C4氧化功能;同时将CtPMO1活性中心的氨基酸His1和平坦表面的氨基酸Gln166进行定点突变,并探究突变酶的酶活;另外,选用磷酸膨胀纤维素(PASC)作为底物,采用DNS法检测CtPMO1与纤维素酶(EG II、BGL I和CBH I)的协同效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞T1购自北京全式金生物科技有限公司;毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115和质粒pPICZaA购自Invitrogen;CtPMO1 (GenBank: XM_006695508.1,来自嗜热毛壳菌)、EG II (GenBank: X76046.1,来自嗜热革节孢 *Scytalidium thermophilum*)和BGL I (GenBank: EF648280,来自嗜热毛壳菌)全部由本实验室保存的酵母工程菌发酵纯化得来;商品化CBH I购自Megazyme。

1.1.2 仪器和试剂

微量核酸蛋白分析仪购于Implen公司;pH计购于上海仪电智能科技有限公司;His-tag蛋白纯化镍柱购于通用电器公司;氮吹仪、冷冻干燥机购于日本东京理化器械株式会社;薄层层析硅胶板购于Merck公司;液相色谱仪购自安捷伦科技有限公司;Aminex HPX-87H色谱柱购自Bio-Rad公司。PCR试剂盒、定点突变试剂盒购于北京全式金生物科技有限公司;SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;FDTMBCA蛋白定量试剂盒购于杭州弗德生物科技有限公司。碘甲烷购于上海梯希爱化成工业发展有限公司;二甲亚砜购于北京索莱宝科技有限公司;1% (质量体积分数)的磷酸膨胀纤维素由本实验室制备,存于4℃。

1.2 CtPMO1的诱导表达和分离纯化

将CtPMO1酵母工程菌在YPD培养基上培养3d,接种至BMGY培养基上,培养24h后,转接至BMMY培养基(含0.1 mmol/L Cu²⁺)中,连续甲醇诱导培养7d,离心去除菌体,在收集的上清液中缓慢地加入50%烘干的硫酸铵使蛋白沉淀析出。利用镍柱亲和层析法分离出目的蛋白,取适量的酶液用于SDS-PAGE检测蛋白分子量大小和纯化情况,再根据FDTMBCA

蛋白定量试剂盒测定蛋白的浓度，其余酶液存放于-80℃，备用。

1.3 C₁PMO1 酶活性及可溶性产物分析

1.3.1 薄层层析色谱法(TLC)分析温度和 pH 对 C₁PMO1 酶活性的影响

以 1% (质量体积分数)的磷酸膨胀纤维素为底物，加入 5 μmol/L 酶液和 1 mmol/L 的电子供体维生素 C，用 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 5.0)补足，将反应体系分别置于 40、50、60 和 70℃的水浴摇床(200 r/min)中反应 48 h。各吸取 10 μL 反应产物分多次点于硅胶板上，通过 TLC 初步观察不同温度对 C₁PMO1 酶解产物的影响。同理，分别利用 50 mmol/L pH 3.0、4.0、5.0 和 6.0 的醋酸铵缓冲液和 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液制备反应体系，在 50℃条件下反应 48 h，通过 TLC 分析不同 pH 对 C₁PMO1 酶解产物的影响。

1.3.2 高效液相色谱-示差折光检测(HPLC-RID)分析温度和 pH 对 C₁ 氧化产物的影响

分别取 400 μL 不同温度和不同 pH 的反应产物于 10 mL 玻璃管中，加入 70.6 μL 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)，密封，121℃反应 80 min，氮气吹干。加入 200 μL 异丙醇，氮气吹干，重复 3 次。最后加入 400 μL ddH₂O 溶解产物，使用 0.22 μm 滤膜过滤产物，通过 HPLC-RID 检测是否含有 C₁ 氧化产物(葡萄糖酸)。色谱条件：流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄ 溶液，柱温 35℃，流速 0.3 mL/min，进样量 10 μL。选用 Aminex HPX-87H 色谱柱和示差折光检测器进行检测，以 0.1 mg/mL D-葡萄糖、

D-葡萄糖酸和 D-山梨醇和 D-半乳糖作为标准品，根据峰图判断产物组成。

1.3.3 还原法分析 C₁PMO1 的酶解产物

在最适温度和最适 pH 的反应条件下制备产物，根据 Beeson *et al.* (2012)的方法，取 100 μL 酶解产物进行硼氢化钠(NaBH₄)还原反应，再经 TFA 水解，得到的还原产物过 0.22 μm 滤膜除菌，通过 HPLC-RID 检测是否含有 C₄ 氧化产物(半乳糖)。

1.3.4 C₁PMO1 的甲基化

取 500 μL 反应产物冷冻干燥(温度：-40℃，压强：4 Pa) 3-5 h，在氮气的条件下加入 100 μL 的二甲亚砷，并迅速加入 30 mg 的 NaOH 固体(研成粉末)，超声 25 min。在氮气条件下加入 100 μL 的碘甲烷(CH₃I)，避光静置 30 min，加入 100 μL 的 CH₃I，超声 10 min，避光静置 30 min。最后加入 1 mL 的 ddH₂O 终止反应，氯仿抽提 3 次，氮气吹干，通过飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测。

1.3.5 活性中心氨基酸 His1 和平坦表面氨基酸 Gln166 在 C₁PMO1 酶活性中的作用

使用 Swiss-Model (<http://www.swissmodel.expasy.org>)对 C₁PMO1 进行同源建模。通过分析 C₁PMO1 的三维结构，将其活性中心的 His1 位点突变为 Ala (H1A)；平坦表面的 Gln166 位点突变为 Ala (Q166A)和 Glu (Q166E)。根据快速点突变试剂盒(全式金)设计引物(表 1)所示。定点突变的 PCR 程序：94℃ 5 min；94℃ 20 s，55℃ 20 s，72℃ 30 s，共 25 个循环；72℃

表 1 C₁PMO1 定点突变的引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis of C₁PMO1

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')
H1A-F	GGGTATCTCTCGAGAAAAGAGCTGCCATCTTTCAG
H1A-R	CTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTCTTCTTTAGCA
Q166A-F	CTGGCAACTACCGCGGAGCGGCGTTCTACCAGTCA
Q166A-R	GCCGCTCCGCGGTAGTTGCCAGCCGAGTGAAGAG
Q166E-F	CTGGCAACTACCGCGGAGCGGAGTTCTACCAGTCA
Q166E-R	CCGCTCCGCGGTAGTTGCCAGCCGAGTGAAGAGT

10 min, 16 ℃保存。扩增得到的产物经电泳检测并转入大肠杆菌感受态, 经过博来霉素筛选并测序, 鉴定结果正确后, 选用限制性内切酶 *Sac* I 酶切突变质粒, 并电转至毕赤酵母 GS115, 电转成功后采用镍柱亲和层析法纯化得到突变的蛋白。按照酶解反应体系制备产物, 通过 TLC 和 HPLC-RID 检测突变酶的酶活。

1.4 *Ct*PMO1 与纤维素酶协同作用的初步测定

以 1% (质量体积分数)的磷酸膨胀纤维素为底物, 分别设置两组反应体系, 一组加入 *Ct*PMO1, 另一组加入等量 pH 5.0 的醋酸铵缓冲液, 分别加入 1 mmol/L 的电子供体维生素 C, 200 r/min、50 ℃水浴振荡 48 h。从两组反应体系中各取 350 μL 反应物分别加入 50 μL 纤维素酶(*EG* II、*BGL* I 和 *CBH* I), 对照组加入 50 μL 醋酸铵缓冲液(pH 5.0), 所有反应体系继续在 50 ℃的条件下水浴 30 min, 每组反应 3 次重复, 采用 DNS 法测定 *OD*₅₄₀ 的吸光值, 以计算酶活和协同度(DS)。协同度的计算公式如下:

$$DS = \frac{M_{cx}}{M_c + M_x}$$

其中, *M*_{cx} 代表 *Ct*PMO1 和纤维素酶

(*EG* II、*BGL* I 和 *CBH* I)共同产生的还原糖的产量; *M*_x 代表纤维素酶(*EG* II、*BGL* I 和 *CBH* I)单独作用产生的还原糖的产量; *M*_c 代表 *Ct*PMO1 单独作用产生的还原糖的产量 (Andersen *et al.* 2008)。

2 结果与分析

2.1 *Ct*PMO1 和突变酶的分离纯化

酵母工程菌 *Ct*PMO1 和电转成功的 3 种突变菌株活化后, 经过分离纯化, 采用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况(图 1), *Ct*PMO1 和突变酶的分子量均在 26 kDa 处, 与理论分子量大小相同, 并采用 BCA 法测得 *Ct*PMO1、H1A、Q166A 和 Q166E 蛋白浓度为 2.458、1.615、0.816 和 1.992 mg/mL。

2.2 不同温度对 *Ct*PMO1 可溶性酶解产物的影响

将反应体系置于一系列温度(40、50、60 和 70 ℃)条件下降解 PASC, 从 TLC 的结果(图 2A)中可以看出, 40 ℃的产物主要由单糖和纤维二糖构成; 50 ℃的产物基本构成明显(纤维二糖至纤维五糖); 60 ℃的产物中只检测到单糖;

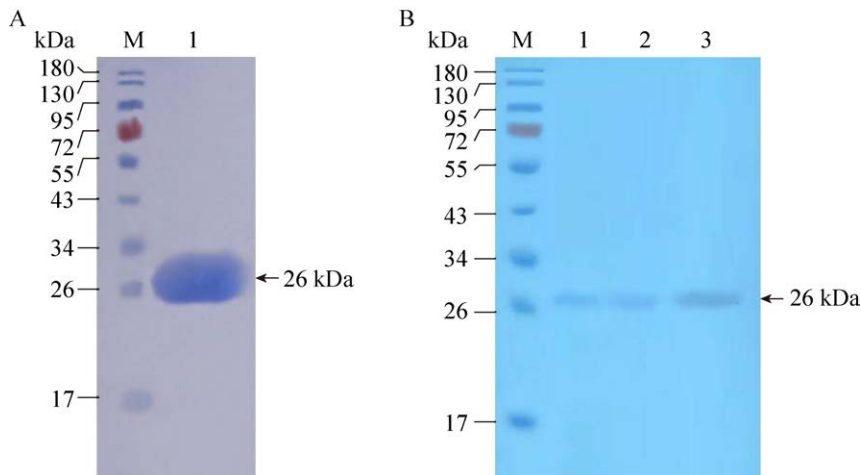


图 1 嗜热毛壳菌 AA9 家族 *Ct*PMO1 及其突变酶的蛋白电泳图 A: M: Marker; 1: *Ct*PMO1; B: M: Marker; 1: H1A; 2: Q166A; 3: Q166E

Fig. 1 The SDS-PAGE of purified AA9 family *Ct*PMO1 and mutant enzyme from *Chaetomium thermophilum*. A: M: Marker; 1: *Ct*PMO1; B: M: Marker; 1: H1A; 2: Q166A; 3: Q166E.

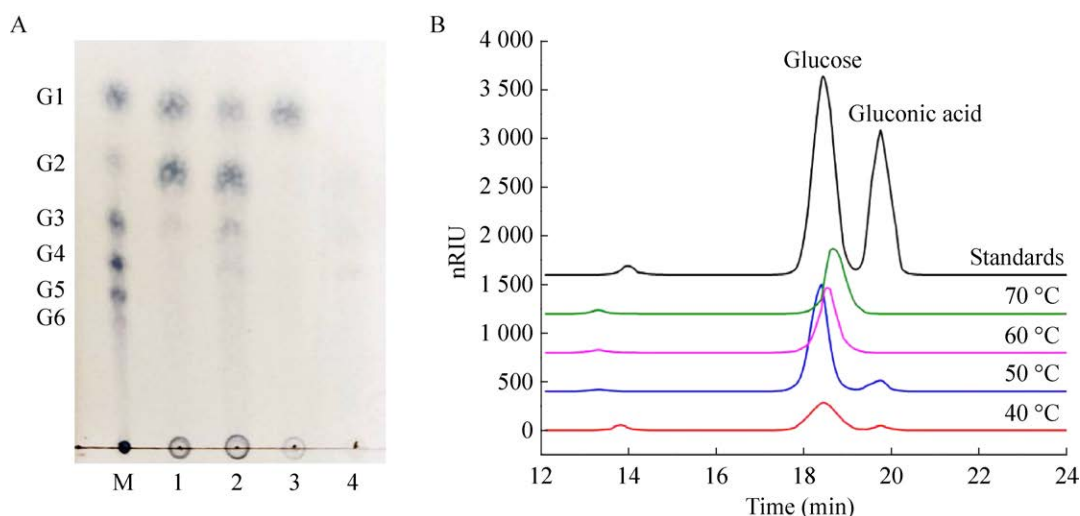


图2 不同温度对 *CtPMO1* 可溶性酶解产物的影响 A: *CtPMO1* 不同反应温度酶解产物的 TLC 分析; G1–G6: 纤维寡糖标准品; M: Marker; 1: 40 °C; 2: 50 °C; 3: 60 °C; 4: 70 °C; B: TFA 水解 *CtPMO1* 不同反应温度酶解产物的 HPLC-RID 分析

Fig. 2 Temperature course of soluble reaction products of *CtPMO1* in the hydrolysis of cellulose. A: Analysis of *CtPMO1* soluble reaction products in different reaction temperature using TLC. G1–G6: Standard cellulose-oligosaccharides; M: Marker; 1: 40 °C; 2: 50 °C; 3: 60 °C; 4: 70 °C; B: Analysis of *CtPMO1* soluble reaction products hydrolyzed by TFA in different reaction temperatures using HPLC-RID.

70 °C 没有观察到任何非氧化型寡糖。为分析不同反应温度对 C1 氧化产物的影响, 通过 HPLC-RID 检测 TFA 水解产物中葡萄糖酸的含量 (图 2B), 发现产物中均含有葡萄糖, 但 40 °C 产物中存在微量的葡萄糖酸, 50 °C 产物中葡萄糖酸的含量明显增加, 在 60 °C 和 70 °C 的产物中未检测到葡萄糖酸。结果表明, *CtPMO1* 的酶活受温度影响较大, 50 °C 为最适反应温度。

2.3 不同 pH 对 *CtPMO1* 可溶性酶解产物的影响

为观察不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0) 对 *CtPMO1* 可溶性酶解产物的影响, 通过 TLC 分析酶解产物 (图 3A), 在 pH 3.0、4.0 和 6.0 的条件下, 产物的基本构成为单糖和纤维二糖; 在 pH 5.0 的产物中可以检测到纤维二糖至纤维五糖; 由于钠离子对 TLC 结果的影响, 在 pH 7.0 的产物中未能检测到纤维寡糖。从 HPLC-RID 检测的结果 (图 3B) 中, 发现 pH 3.0–7.0 的酶解产物中均存在葡萄糖和葡萄糖酸, pH 5.0 的酶

解产物中葡萄糖酸含量最多。结果表明, *CtPMO1* 的氧化作用不易受到 pH 的影响, 最适反应 pH 为 5.0。

2.4 *CtPMO1* 氧化产物的还原法分析

根据上述 TLC 和 HPLC-RID 的结果显示 *CtPMO1* 在 50 °C、pH 为 5.0 的条件下与 PASC 反应, 其酶解产物中存在纤维二糖至纤维五糖, 并且 TFA 水解的产物中存在葡萄糖酸, 证明 *CtPMO1* 对 PASC 具有 C1 氧化功能。为进一步鉴定 *CtPMO1* 是否具有 C4 氧化功能, 通过 HPLC-RID 检测还原产物中半乳糖的含量 (图 4), 与标准品相比, 在硼氢化钠还原和 TFA 水解的产物中检测到了葡萄糖、半乳糖和山梨醇, 说明 *CtPMO1* 存在 C4 氧化活性。

2.5 *CtPMO1* 可溶性酶解产物的 MALDI-TOF-MS 检测

为了进一步确定 *CtPMO1* 酶解产物的组成成分, 取反应上清液进行甲基化反应, 经 MALDI-TOF-MS 分析, 在 *CtPMO1* 酶解产物中

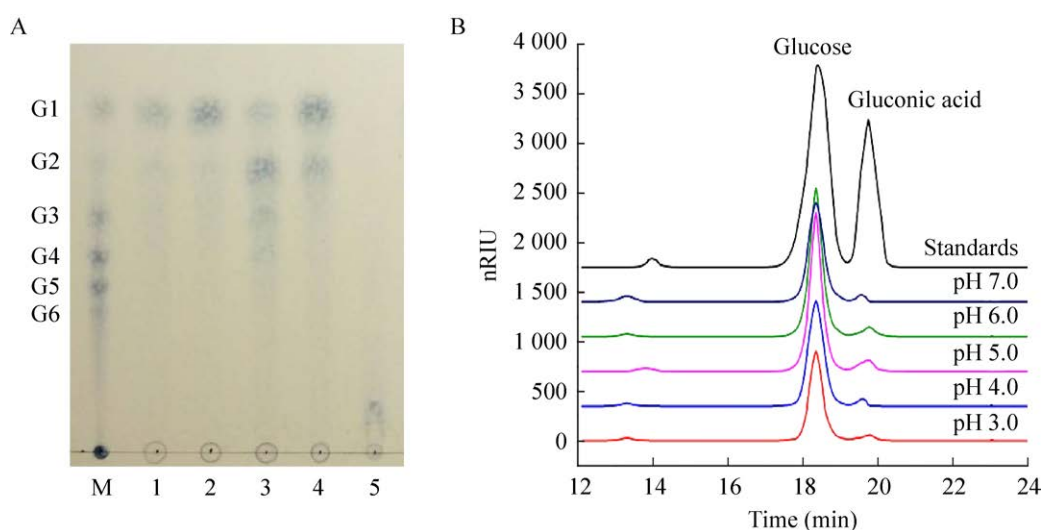


图3 不同pH对CtPMO1酶解产物的影响 A: CtPMO1不同反应pH酶解产物的TLC分析; G1-G6: 纤维寡糖标准品; M: Marker; 1: pH 3.0; 2: pH 4.0; 3: pH 5.0; 4: pH 6.0; 5: pH 7.0; B: TFA水解CtPMO1不同反应pH酶解产物的HPLC-RID分析

Fig. 3 pH course of soluble reaction products of CtPMO1 in the hydrolysis of cellulose. A: Analysis of CtPMO1 soluble reaction products in different reaction pH using TLC. G1-G6: Standard cellulo-oligosaccharides; M: Marker; 1: pH 3.0; 2: pH 4.0; 3: pH 5.0; 4: pH 6.0; 5: pH 7.0; B: Analysis of CtPMO1 soluble reaction products hydrolyzed by TFA in different reaction pH using HPLC-RID.

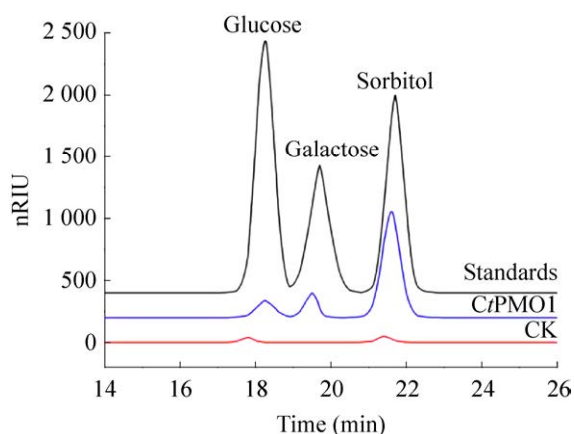


图4 NaBH₄还原CtPMO1可溶性酶解产物的HPLC-RID分析

Fig. 4 Analysis of CtPMO1 soluble reaction products reduced by NaBH₄ using HPLC-RID.

检测到一系列非氧化型的寡糖,同时检测到氧化型的寡糖(图5)。其中峰值507.1980、711.3043、915.3969和1119.4713分别与发生甲基化的纤维二糖、纤维三糖、纤维四糖和纤维五糖C1氧化寡糖($m/z+30$)加钠离子的分子量相

对应;峰值665.2777、869.3842和1073.4444分别与纤维三糖、纤维四糖和纤维五糖C4氧化寡糖($m/z-16$)甲基化后加钠离子的分子量相对应。结果再次确认CtPMO1对底物具有C1和C4氧化功能。

2.6 CtPMO1的三维结构模型

根据已有PMOs的三维结构对CtPMO1进行同源建模,显示出CtPMO1与来自粗糙脉孢菌*Neurospora crassa*的NcLPMO9C(PDB ID: 4D7U, Borisova *et al.* 2015)有很高的相似性(64.76%),因此选用NcLPMO9C作为模板对CtPMO1进行同源建模(图6A),3个高度保守的氨基酸残基His1、His83、Tyr168和铜离子组成了酶的活性中心,4个芳香族氨基酸Tyr27、His64、His157和Tyr206位于底物结合平坦表面上;另发现Gln166位点距离活性中心较近(图6B)。His1的N末端氨基和N δ ,以及His83的N ϵ 与铜离子结合构成三氮配体“组氨酸支

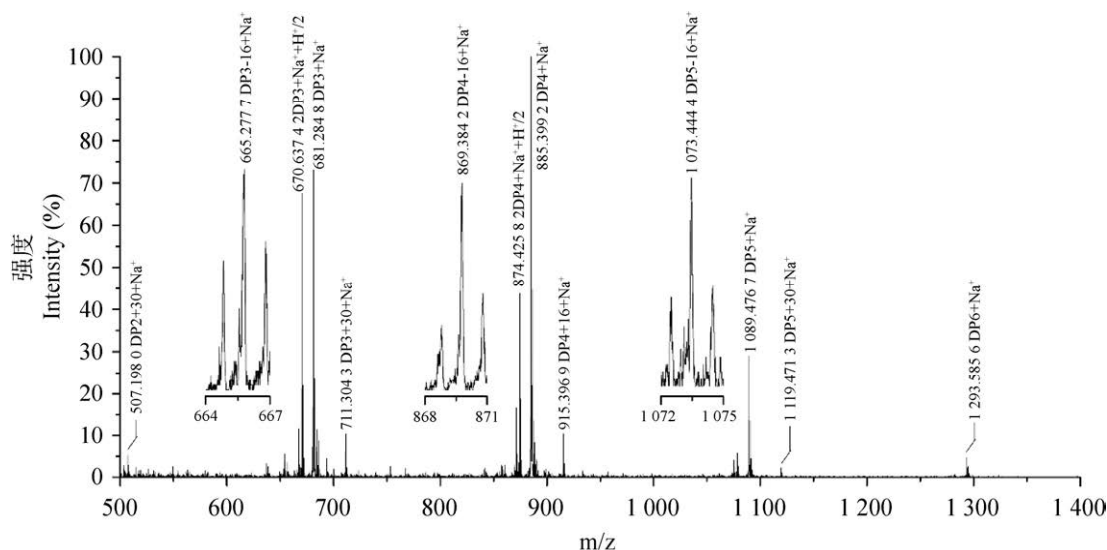


图 5 *CtPMO1* 可溶性酶解产物的 MALDI-TOF-MS 检测

Fig. 5 Identification of *CtPMO1* soluble reaction products with PASC as substrate using MALDI-TOF-MS.

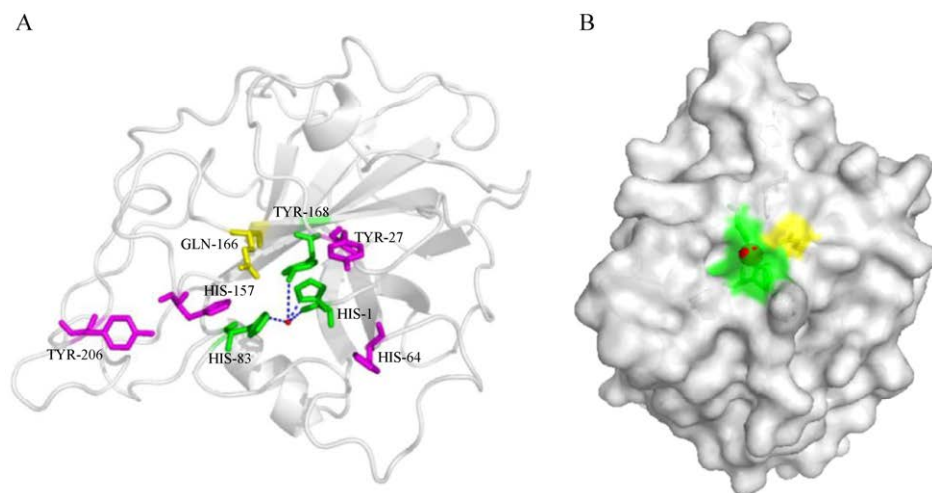


图 6 三维结构模型 A: *CtPMO1* 同源建模模型; 绿色: 活性中心氨基酸; 紫色: 平坦表面芳香族氨基酸; 黄色: 平坦表面上的 Gln166 位点; 红色圆球: 铜离子. B: *CtPMO1* 同源建模结果中 Gln166 位点; 绿色: 活性中心氨基酸; 黄色: Gln166 位点; 红色圆球: 铜离子

Fig. 6 The 3D structure model. A: Homology model of *CtPMO1*; Green: Residues around active site; Purple: Aromatic residues on flat surface; Yellow: Gln166 on flat surface; Red sphere: Cu^{2+} . B: The position of Gln166 in *CtPMO1* using homology modeling; Green: Residues around active site; Yellow: Gln166 on flat surface; Red sphere: Cu^{2+} .

架”, 另外高度保守氨基酸 Tyr168 位于蛋白内部, 其酚羟基上的 O 与铜离子组成配位键(Li *et al.* 2012; Borisova *et al.* 2015)。已有研究表明, *CtPMO1* 的 4 个芳香族氨基酸对酶活有不同程度的影响(Chen *et al.* 2018), 但活性中心

的氨基酸和 Gln166 位点对酶活的影响有待进一步研究。

2.7 突变酶可溶性酶解产物的 TLC 分析

选择活性中心氨基酸 His1 和平坦表面氨基酸 Gln166 进行定点突变, 研究其对 *CtPMO1* 酶活

的作用,经 TLC 分析(图 7),在 H1A 和 Q166A 产物中均未检测到纤维寡糖,而 Q166E 的可溶性产物中可以检测到单糖和纤维二糖。该结果初步说明,将两个位点突变为 Ala 后酶活丧失;将 Gln166 突变为结构相似的 Glu 后仍保留酶活,但是产物的基本构成发生了明显的变化。

2.8 突变酶可溶性解产物的 HPLC-RID 分析

通过 HPLC-RID 分析 TFA 水解产物(图 8),与对照相比,在 H1A 可溶性产物中未检测到葡萄糖和葡萄糖酸;在 Q166A 产物中检测到少量的葡萄糖,未检测到葡萄糖酸;在 Q166E 产物中检测到大量的葡萄糖和微量的葡萄糖酸(图 8A)。通过 NaBH_4 还原法检测酶解产物中半乳糖的含量,在 H1A、Q166A 和 Q166E 产物中均未检测到半乳糖(图 8B)。综上所述, H1A 的酶活全部丧失, Q166A 丧失了氧化能力,而 Q166E 保留了部分 C1 氧化活性。结果表明,不仅活性中心氨基酸 His1 是关键性位点,而且 Gln166 位点也参与断键反应并具有可替代性。

2.9 *CtPMO1* 与纤维素酶协同作用的初步分析

利用 *CtPMO1* 预处理 PASC,再选取

EG II、*BGL* I 和 *CBH* I 继续处理酶解产物。通过 TLC 分析产物的基本构成(图 9A),可以直观地看出纤维素酶(*EG* II、*BGL* I 和 *CBH* I)与 *CtPMO1* 降解 PASC 的效果;再通过 DNS 法检测葡萄糖产量,利用 *CtPMO1* 预先处理底物

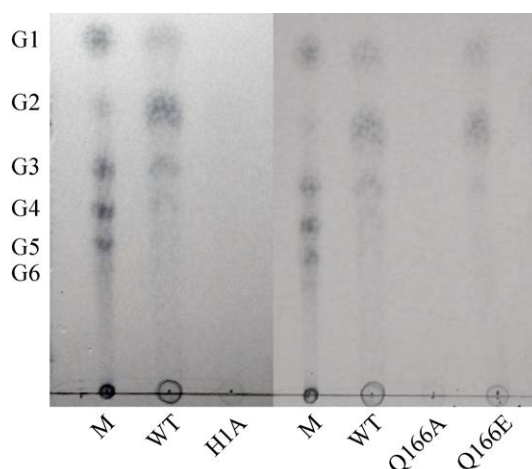


图 7 *CtPMO1* 突变酶可溶性酶解产物的 TLC 分析
G1–G6: 纤维寡糖标准品; M: Marker; WT: *CtPMO1*; H1A, Q116A, Q166E: Mutated enzymes
Fig. 7 Analysis of mutated *CtPMO1* soluble reaction products with PASC as substrate using TLC. G1–G6: Standard cellulo-oligosaccharides; M: Marker; WT: *CtPMO1*; H1A, Q116A, Q166E: Mutated enzymes.

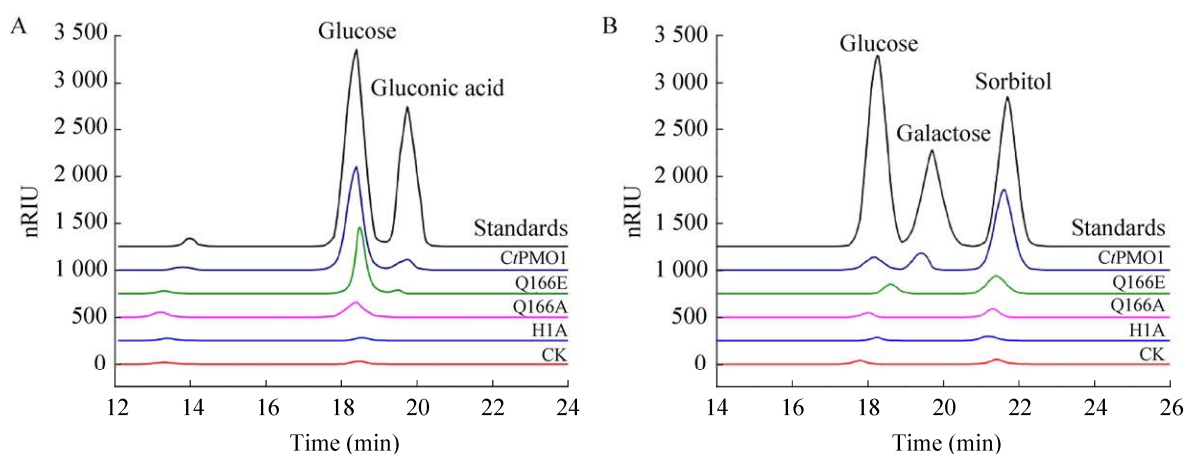


图 8 突变酶产物的 HPLC-RID 检测 A: 突变酶可溶性酶解产物经 TFA 水解后的 HPLC-RID 分析; B: 突变酶可溶性酶解产物经 NaBH_4 还原后的 HPLC-RID 分析

Fig. 8 Analysis of mutant enzyme products using HPLC-RID. A: Analysis of mutant enzyme soluble reaction products hydrolyzed by TFA using HPLC-RID; B: Analysis of mutant enzyme soluble reaction products reduced by NaBH_4 using HPLC-RID.

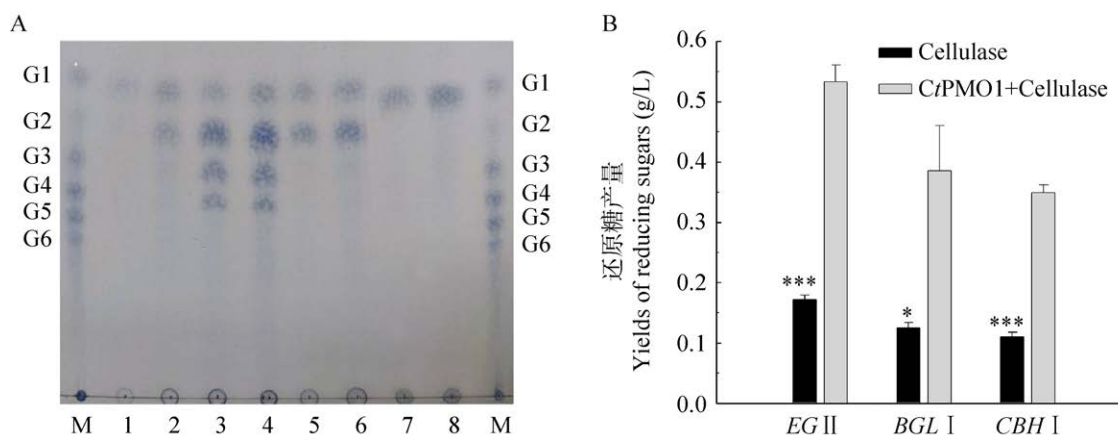


图 9 *CtPMO1* 与纤维素酶的协同效应分析 A: *CtPMO1* 与纤维素酶降解底物磷酸膨胀纤维素产生的可溶性酶解产物的 TLC 分析. G1–G6: 纤维寡糖标准品; M: Marker; 1: CK; 2: *CtPMO1*; 3: *EG II*; 4: *CtPMO1+EG II*; 5: *CBH I*; 6: *CtPMO1+CBH I*; 7: *BGL I*; 8: *CtPMO1+BGL I*. B: *CtPMO1* 与纤维素酶作用于底物磷酸膨胀纤维素的 DNS 法检测. 数值为平均值 \pm 标准误. ***, * 分别表示每种纤维素酶与混合酶的降解效果间显著性差异 $P < 0.001$, $P < 0.05$

Fig. 9 Synergism of *CtPMO1* and cellulase in the hydrolysis of cellulose. A: Analysis of soluble reaction products by *CtPMO1* and cellulase with PASC as substrate using TLC. G1–G6: Standard cellulooligosaccharides; M: Marker; 1: CK; 2: *CtPMO1*; 3: *EG II*; 4: *CtPMO1+EG II*; 5: *CBH I*; 6: *CtPMO1+CBH I*; 7: *BGL I*; 8: *CtPMO1+BGL I*. B: Analysis of cellulase activity enhancement improved by *CtPMO1* with PASC as substrate using DNS. All values are mean \pm standard error. *** and * indicate the significant difference between each cellulase and the mixed enzyme about the degradation effect $P < 0.001$ and $P < 0.05$ respectively.

后, 使还原糖产量分别提高 2.10 倍、2.08 倍和 2.16 倍, *CtPMO1* 与 3 种纤维素酶的协同度分别是 1.022、0.799 和 0.875 (图 9B)。总体而言, 比较 *EG II*、*BGL I* 和 *CBH I* 与 *CtPMO1* 作用于底物 PASC 的结果, 发现 *CtPMO1* 与 *EG II* 协同效果明显, 协同度大于 1, 说明两者并不是简单的叠加作用, 而是相互促进的作用。

3 讨论

大量研究表明 PMOs 的酶活受温度和 pH 的限制, 不同 PMOs 的最适反应条件不尽相同。例如, Zhang *et al.* (2019) 研究发现 *TrTaAA9A* 在 45 °C 活性最高, 而在 50 °C 反应 8 h 剩余酶活几乎为零; 来自嗜热毁丝菌 *Myceliophthora thermophila* 的 *MtC1LPMO* 在 85 °C 活性达到最高, 最佳 pH 值为 7.5, 并且在酸性条件下会降低 *MtC1LPMO* 的活性 (Guo *et al.* 2020)。因此,

寻找合适的温度和 pH 对 PMOs 酶活的研究至关重要, 本研究发现在反应温度为 50 °C、pH 为 5.0 时 *CtPMO1* 降解纤维素的效果最佳。另外, 本研究选用 TLC 法、HPLC-RID 法和 MALDI-TOF-MS 检测 *CtPMO1* 的酶活, 发现该酶具有 C1 和 C4 氧化活性。由于 PMOs 降解纤维素时产生的还原性末端的效率不高, 难以选用测定纤维素酶活性的方法分析其酶活, 所以目前主要通过质谱法和色谱法检测产物中的非氧化型寡糖和氧化型寡糖, 如 Chen *et al.* (2018) 利用 MALDI-TOF-MS 和高效液相离子色谱 (HPLC) 检测到了 C6 氧化产物; 黄天晨等 (2021) 利用 HPLC-RID 检测葡萄糖的含量。因此, 这类研究方法具有可行性。

此外, Quinlan *et al.* (2011) 研究报道了 PMOs 的催化位点是由一个与铜离子配位的 His 对 (His1 和 His83) 组成, 这个三 N 配体 “His 支

架”对铜离子具有很高的亲和力,因此对酶的催化活性至关重要(Aachmann *et al.* 2012; Borisova *et al.* 2015),所以本研究将活性中心的氨基酸 His1 进行定点突变,结果发现 H1A 突变酶完全丧失了酶活性,与之前的报道一致。除此之外,已有研究表明在 PMOs 平面上有多个芳香族氨基酸,它们可能形成保守的二级结构,这些二级结构也会影响 PMOs 催化中心相对于糖苷键的方向,从而影响酶与底物的结合能力(Borisova *et al.* 2015)。但目前对于 PMOs 底物结合平面上其他氨基酸的研究甚少,而这些氨基酸也可能影响酶活,所以本文选择位置与 CtPMO1 活性中心较近的 Gln166 进行突变,发现将其突变为 Ala 后,酶活基本丧失;但突变为结构相似的 Glu 后保留部分活性,将 Gln166 突变为 Glu166 可能恰好形成了类似纤维素酶活性中心的结构(Li *et al.* 2011),使产物组成发生了变化。因此,该结果表明 Gln166 位点是参与催化反应的关键位点,还具有可替代性,为进一步探究 PMOs 底物结合平面的氨基酸增添了新方向。

由于 PMOs 的出现,人们对纤维素降解的理论有了新的见解,Beeson *et al.* (2015)提出真菌的纤维素降解模型后,研究者们也纷纷提出在纤维素酶发生水解反应的基础上,PMOs 通过氧化的方式在结晶纤维素链的内部区域产生新的链端,增加纤维素酶系对纤维素的可及性。根据上述理论,本文探究了 CtPMO1 与纤维素酶(EG II、BGL I 和 CBH I)的协同作用,利用 CtPMO1 预先处理底物后,使还原糖产量分别提高 2.10 倍、2.08 倍和 2.16 倍,其中 CtPMO1 与 EG II 协同效果明显,协同度大于 1,说明两者并不是简单的叠加作用,而是相互促进的作用。本研究进一步完善了 AA9 家族 PMOs 的协同作用体系,在工业生产中利用 PMOs 预处理结晶纤维素,既能减少纤维素酶的消耗量,还能提高纤维素酶的水解活性。

[REFERENCES]

- Aachmann FL, Sørli M, Skjåk-Bræk G, Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G, 2012. NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions—NMR structure of CBP21—NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46): 18779-18784
- Andersen N, Johansen KS, Michelsen M, Stenby EH, Krogh KBRM, Olsson L, 2008. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4): 362-370
- Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA, 2012. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2): 890-892
- Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA, 2015. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, 84: 923-946
- Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnal A, Røhr ÅK, Payne CM, Sørli M, Sandgren M, Eijsink VGH, 2015. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 290: 22955-22969
- Chen C, Chen JY, Geng ZG, Wang MX, Liu N, Li DC, 2018. Regioselectivity of oxidation by a polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1): 1-16
- Dhepe P, Fukuda A, 2008. Cellulose conversion under heterogeneous catalysis. *ChemSusChem*, 1(12): 969-975
- Du LP, Ma LJ, Ma Q, Guo GJ, Han XX, Xiao DG, 2018. Hydrolytic boosting of lignocellulosic biomass by a fungal lytic polysaccharide monooxygenase, AnLPMO15g from *Aspergillus niger*. *Industrial Crops and Products*, 126: 309-315
- van Dyk JS, Pletschke BI, 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6): 1458-1480
- Guo X, Sang JC, Chai CC, An YJ, Wei ZF, Zhang HT, Ma LJ, Dai YJ, Lu FP, Liu FF, 2020. A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* C1 and its characterization in cleavage of glycosidic chain of

- cellulose. *Biochemical Engineering Journal*, 162: 107712
- Hemsworth GR, Johnston EM, Davies GJ, Walton PH, 2015. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. *Trends in Biotechnology*, 33(12): 747-761
- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VG, 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1): 45-58
- Huang TC, Yang JH, Tang ZJ, Gao L, Zhang DY, Hou Y, Zhu LL, 2021. Expression of lytic polysaccharide monooxygenases *HcLPMO* and its synergy with cellulose. *Acta Microbiologica Sinica*, 61(7): 1971-1982 (in Chinese)
- Li DC, Li AN, Papageorgiou AC, 2011. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. *Enzyme Research*. doi:10.4061/2011/308730
- Li X, Beeson WT, Phillips CM, Marletta MA, Cate JHD, 2012. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. *Structure*, 20(6): 1051-1061
- Ma LJ, Tong WZ, Du LP, Cui XY, Ma Q, Xiao DG, 2019. Effects of N-glycosylation on synergism of *AnLPMO15g* from *Aspergillus niger* and cellulase. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 33(5): 1148-1155 (in Chinese)
- Medie FM, Davies GJ, Drancourt M, Drancourt M, Henrissat B, 2012. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3): 227-234
- Meng FH, Jiang XK, Liu L, Zhang HQ, Gao PJ, Wang LS, 2015. The visual representation for cellulase degradation velocity and the analysis for limiting factor. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 42(3): 201-210 (in Chinese)
- Monclaro AV, Filho EXF, 2017. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: recent developments and application in lignocellulose breakdown. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 771-778
- 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, 2011. 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*, 108(37): 15079-15084
- Quirk A, Lipkowski J, Vandenende C, Cockburn D, Clarke AJ, Dutcher JR, Roscoe SG, 2010. Direct visualization of the enzymatic digestion of a single fiber of native cellulose in an aqueous environment by atomic force microscopy. *Langmuir*, 26(7): 5007-5013
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T, 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311(5760): 484-489
- Zhang RQ, Liu YC, Zhang Y, Feng D, Hou SL, Guo W, Niu KL, Jiang Y, Han LJ, Sindhu L, Fang X, 2019. Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monooxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14): 5739-5750
- Zhou HC, Li T, Yu ZC, Ju J, Zhang HY, Tan HD, Li KK, Yin H, 2019. A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139: 570-576
- Zhu M, Chen JY, Liu N, Guo XN, Li DC, 2019. Oxidation mode of polysaccharide monooxygenases from *Scytalidium thermophilum*. *Mycosystema*, 38(3): 362-371 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 黄天晨, 杨建花, 唐梓静, 高乐, 张东远, 侯颖, 朱蕾, 2021. 裂解性多糖单加氧酶 *HcLPMO* 与纤维素酶的协同降解纤维素研究. *微生物学报*, 61(7): 1971-1982
- 马立娟, 佟文哲, 杜丽平, 崔馨予, 马清, 肖冬光, 2019. N-糖基化对黑曲霉 *AnLPMO15g* 与纤维素酶协同作用的影响. *高校化学工程学报*, 33(5): 1148-1155
- 孟凡辉, 蒋绪恺, 刘琳, 张怀强, 高培基, 王禄山, 2015. 纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析. *生物化学与生物物理进展*, 42(3): 201-210
- 朱敏, 陈进银, 刘宁, 郭秀娜, 李多川, 2019. 嗜热革节孢多糖单加氧酶氧化方式. *菌物学报*, 38(3): 362-371