



# 一种几丁质裂解性多糖单加氧酶的活性评价及稳定性研究

于晓男, 刘霖, 屈明博\*, 杨青

大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024

于晓男, 刘霖, 屈明博, 杨青. 一种几丁质裂解性多糖单加氧酶的活性评价及稳定性研究. 微生物学报, 2022, 62(1): 189–199.

Yu Xiaonan, Liu Lin, Qu Mingbo, Yang Qing. The activity and stability analyses of chitin-activity lytic polysaccharide monoxygenase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 189–199.

**摘要:**【目的】裂解性多糖单加氧酶(LPMO)是一类铜离子依赖型的单加氧酶, 能够通过氧化的方式断裂糖苷键, 进而显著提高多糖的降解效率, 受到广泛的关注。但是 LPMO 单加氧酶的性质使其容易被自身氧化而失活, 且底物的聚合性质和释放产物的多样性使得对 LPMO 催化过程活性的评估变得十分困难。【方法】本研究以 2,6-二甲氧基苯酚(2,6-DMP)和  $H_2O_2$  为底物, 建立了测定几丁质裂解性多糖单加氧酶(*Bt*LPMO10A)活性的评价体系, 并研究该酶在降解几丁质底物过程中的稳定性。【结果】研究发现, 在测定 *Bt*LPMO10A 活性的过程中, 较高的酶浓度, 过氧化氢浓度和 2,6-DMP 浓度均使得反应过程脱离了线性范围, 而抗坏血酸的加入能够提高灵敏度, 但是对活性测定过程有较大影响。*Bt*LPMO10A 对 2,6-DMP 和  $H_2O_2$  的  $K_m$  分别为 0.53 mmol/L 和 5.31 mmol/L, 亲和性高于纤维素裂解活性的 *Nc*LPMO9C。*Bt*LPMO10A 在还原剂抗坏血酸存在的条件下容易失活, 但底物几丁质的加入能够一定程度上稳定 LPMO 的活性, 但是其在降解几丁质过程中活性依然会下降。【结论】本研究以 2,6-二甲氧基苯酚为底物检测 *Bt*LPMO10A 对底物的亲和力, 并研究 *Bt*LPMO10A 的稳定性, 为深入评价具有几丁质氧化裂解活性的 LPMO 的稳定性及其在几丁质降解过程中的应用提供了重要信息。

**关键词:** LPMO; 2,6-二甲氧基苯酚; 稳定性; 几丁质;  $H_2O_2$

**基金项目:** 国家自然科学基金(31872972)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872972)

\*Corresponding author. +86-411-84707245; E-mail: mingboqu@dlut.edu.cn

Received: 19 March 2021; Revised: 17 May 2021; Published online: 27 May 2021

# The activity and stability analyses of chitin-activity lytic polysaccharide monoxygenase

YU Xiaonan, LIU Lin, QU Mingbo\*, YANG Qing

School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

**Abstract:** [Objective] Lytic polysaccharide monoxygenase (LPMO) is a recently discovered copper ion-dependent oxidase, which can break glycosidic bonds by oxidation, thus significantly improving the efficiency of polysaccharides degradation. However, it is easy to be inactivated and difficult to evaluate the activity of LPMO due to the properties of its substrates and the diversity of its released products. [Methods] In this study, we established a spectrophotometric activity assay to detect the chitin-active LPMO (*Bt*LPMO10A) using 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates, and to evaluate the stability of LPMO during chitin degradation. [Results] The results suggested that high concentration of enzyme, 2,6-DMP or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would deviate the reaction from linear range. The  $K_m$  of *Bt*LPMO10A toward 2,6-DMP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined to be 0.53 mmol/L and 5.31 mmol/L respectively. It suggested *Bt*LPMO10A possessed a higher affinity toward 2,6-DMP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than *Nc*LPMO9C. *Bt*LPMO10A was easy to be inactivated in the presence of reducing agent ascorbic acid. The substrate chitin could stabilize the enzyme, but the activity still decreased during the degradation of chitin. [Conclusion] This work evaluated the factors that impacted on the assay for detecting the activity of *Bt*LPMO10A using 2,6-DMP as substrate, and estimated the stability of *Bt*LPMO10A during chitin degradation. It will provide important information for the investigation of chitin-active LPMOs.

**Keywords:** LPMO; 2,6-dimethoxyphenol; stability; chitin; hydrogen peroxide

几丁质是一种由N-乙酰葡萄糖胺结构单元通过 $\beta$ -1,4糖苷键连接而成的直链高聚物,是自然界中除纤维素外的第二大物质资源,主要存在于节肢动物外骨骼、真菌和海洋藻类中<sup>[1]</sup>。根据几丁质微纤维中几丁质链排布方式不同,可将其分为3种晶体形态: $\alpha$ -几丁质、 $\beta$ -几丁质和 $\gamma$ -几丁质。其结构通过几丁质糖链间的乙酰基和氨基之间形成的氢键作用来稳定。 $\alpha$ -几丁质在自然界中含量最多且结构最致密,其糖链以反向平行的方式排布,因此刚性较强,主要存在于蟹壳、虾、昆虫等节肢动物的甲壳中。 $\beta$ -几丁质的糖链以平行的方式排布,主要存在于鱿鱼软骨组织以及藻类植物中。 $\gamma$ -几丁质的糖链以平行和反平行混合的方式排布,主要存

在于鱿鱼的胃黏膜中。 $\beta$ -几丁质和 $\gamma$ -几丁质相较于 $\alpha$ -几丁质缺乏链间氢键,因此结构较为松散,有一定柔性<sup>[2]</sup>。

几丁质是自然界中广泛存在的最重要、最难降解的多糖之一。如何实现几丁质的高效降解是实现几丁质物质资源利用的关键。自然界中,几丁质的降解过程由多种酶参与,包括几丁质酶、 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶以及裂解性多糖单加氧酶(LPMO)<sup>[3]</sup>。几丁质酶可以在几丁质内部水解几丁质,形成几丁寡糖。 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶催化几丁寡糖或二糖水解生成N-乙酰葡萄糖胺<sup>[4]</sup>。LPMO是最近研究发现的一类铜离子依赖型的单加氧酶,能够通过氧化机制催化多糖糖苷键的断裂,产生一系列氧化产物。

目前 LPMO 在碳水化合物活性酶数据库 (www.cazy.org) 中被系统地归类为多个家族, 包括辅助活性家族 AA9-11 以及 AA14-16 家族<sup>[5]</sup>。LPMOs 活性位点具有 1 个 N 端高度保守的组氨酸基团, 以及另 1 个位于中部的保守的组氨酸。这 2 个组氨酸的侧链与 N 端组氨酸的氨基形成一个 T 型结构, 能够螯合一个铜离子, 对其氧化活性至关重要<sup>[6]</sup>。除此之外, LPMO 需要电子供体。它们可以是自然界存在的天然电子供体(例如植物细胞壁中的多酚木质素)或者是一些外源还原剂(例如抗坏血酸、没食子酸等)。纤维素二糖脱氢酶也可以作为电子供体。通过外源补充抗坏血酸或还原型谷胱甘肽等化合物可以有效地提高 LPMO 的活性。但是研究发现, LPMO 在还原剂存在的条件下能够将自身氧化而失活, 降低了其在降解多聚底物过程中的活性。如何更好地评价 LPMO 失活的过程进而避免其失活是应用 LPMO 用于降解多聚底物需要解决的问题。

裂解性多糖单加氧酶可催化多种多糖的氧化解聚, 如纤维素、半纤维素、几丁质和淀粉。但是这些底物的聚合性质和释放产物的多样性使得 LPMO 活性的评估变得困难。目前已经有多种方法能够实现 LPMO 活性的测定, 比如质谱法、色谱法、碳水化合物凝胶电泳(PACE)、FRET 淬灭法、7-氨基-1,3-萘二磺酸(ANDA)荧光标记法、Amplex red 偶联酶测定法等。MALDI-TOF 质谱法(MS)是通过检测酶在还原剂存在下作用于底物产生的氧化低聚糖的分子量来监测酶活性<sup>[7]</sup>, 优点是准确性高, 而且适合多种酶检测, 但缺点是需要避免 LPMO 受到糖苷水解酶(如纤维素酶)的污染以及只能进行定性分析。色谱法是 LPMO 与其底物多糖在特定的条件下充分反应后, 通过测定样品中氧化寡糖产物的保留时间和峰面积, 得出酶促反应生成物的种类和含量, 从而换算出酶活力的数

值。该方法的优点是可以定量测定酶的活性大小, 缺点是这种方法很耗时且对反应产物的检测仅限于较低分子量裂解产物。碳水化合物凝胶电泳(PACE)法是通过检测 LPMO 分解 PASC 的产物纤维二糖和纤维三糖来测定酶活性<sup>[8]</sup>, 优点是适用于天然底物和多种酶活性测定, 并给出半定量结果, 缺点是制备和测量的工作量要大得多。FRET 淬灭法是用荧光标记寡糖底物, 从而测定具有 C4 氧化活性的 LPMO 的活性, 进而得到动力学常数<sup>[9]</sup>。优点是可以定量反应产物, 缺点是只能检测对可溶底物有活性的 LPMO。7-氨基-1,3-萘二磺酸荧光标记法是通过荧光标记 LPMO 催化产生的不溶性 C1 氧化产物来测定酶的活性<sup>[10]</sup>。优点是精确度高, 缺点是操作复杂繁琐且并不太常使用。Amplex red 偶联酶测定法<sup>[11]</sup>是利用 LPMO 在氧化还原剂如抗坏血酸或纤维二糖脱氢酶(CDH)存在下形成过氧化氢的副反应, 通过辣根过氧化物酶检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生来检测酶的活性。优点是适用于快速活性测量, 以量化蛋白质纯化过程中的 LPMO 活性。缺点是解偶联反应缓慢、灵敏度低, 并且该测定需要高 LPMO 浓度以进行可靠的测量。

最近人们建立了一种简单、快速、灵敏测酶活性的方法<sup>[12]</sup>。它是基于 LPMO 新发现的过氧化物酶活性, 反应依赖于酶活性位点的铜离子。如图 1 所示, 在共底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在的条件下, LPMO 能够催化底物 2,6-二甲氧基苯酚(2,6-DMP)转化为 2,6-DMP 自由基。两个形成的 2,6-DMP 自由基迅速二聚成氢芥酸木酚酮, 再被 LPMO 氧化成显色产物木酚酮。该方法已被应用于具有纤维素氧化裂解活性 LPMO 活性的测定过程, 可以应用于 LPMO 生产和纯化过程中活性的测定。但是该方法同样受到多种条件的影响, 目前仅在测定具有纤维素裂解活性的

LPMO 的过程中进行了系统的评价, 对于其在测定具有几丁质裂解活性 LPMO 过程中的影响因素尚不清楚。

本文以微生物来源的具有几丁质氧化裂解活性的 *BtLPMO10A* 为研究对象, 考察了以 2,6-DMP 为底物测定 *BtLPMO10A* 对 2,6-DMP、 $H_2O_2$  的亲合性, 并利用该底物考察 *BtLPMO10A* 在几丁质降解过程中的稳定性, 为进一步应用具有几丁质裂解活性的 LPMO 用于几丁质降解提供重要信息。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)、BCA Protein Assay Kit 购自 TaKaRa(北京)公司; 低分子量蛋白质 Marker 购自北京索莱宝科技有限公司;  $\alpha$ -几丁质、 $\beta$ -几丁质、卡尔科弗卢尔荧光增白剂(Calcofluor White M2R, CFW)、二乙酰壳二糖购自 Sigma-Aldrich 公司;  $H_2O_2$ 、抗坏血酸、2,6-DMP 均购自 Aladdin 公司。

### 1.2 *BtLPMO10A* 的诱导表达

从平板挑取表达重组 *BtLPMO10A* 的大肠杆菌 BL21 单菌落接种于 10 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37 °C 摇床中 200 r/min 活化过夜。再将活化后的菌液按 1 : 100 的比例

接种于 1 L 培养基中, 37 °C、200 r/min 扩大培养至  $OD_{620}$  值约为 0.35。加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 37 °C、200 r/min 条件下诱导 5 h。诱导后将菌液在 4 °C、17 000×g 条件下离心 5 min 收集细胞, 弃上清。

### 1.3 *BtLPMO10A* 的分离纯化

将上述收集的细胞重悬于裂解缓冲液 buffer A (20 mmol/L 磷酸二氢钠, 500 mmol/L 氯化钠, pH 7.4), 添加 1% 的溶菌酶后通过高压匀浆破碎细胞。17 000×g 离心 30 min 分离得到上清液, 与  $\beta$ -几丁质在 4 °C 冰箱旋转孵育 1 h。然后用缓冲液 CBD (500 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.05% TritonX-100, pH 8.0) 清洗几丁质 3 次, 最后用 20 mmol/L 乙酸洗脱目的蛋白。目的蛋白通过 BCA Protein Assay 试剂盒定量。通过 15% SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

### 1.4 *BtLPMO10A* 的活性测定

以固体  $\beta$ -几丁质为底物, 采用 300  $\mu$ L 的反应体系, 包括: 2 mg/mL  $\beta$ -几丁质, 1  $\mu$ mol/L *BtLPMO10A*, 20 mmol/L 叠氮化钠, 1 mmol/L 抗坏血酸, 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.0), 30 °C、200 r/min 条件下孵育 24 h。反应结束后, 14 000×g 离心 10 min, 收集上清液进行 MALDI-TOF MS 分析。对照组中不加 *BtLPMO10A*, 其他条件相同。

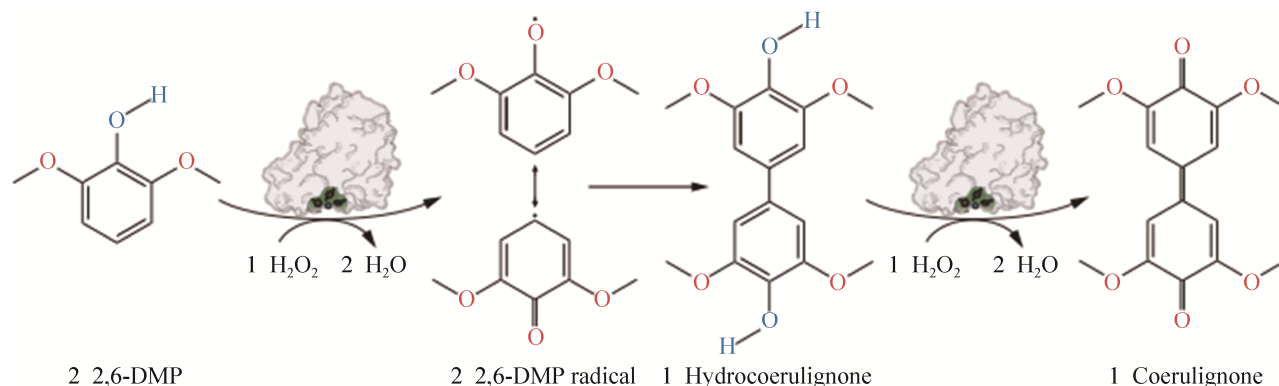


图 1 2,6-DMP 的氧化过程<sup>[12]</sup>

Figure 1 2,6-DMP oxidation process<sup>[12]</sup>.

## 1.5 以 2,6-DMP 为底物的活性测定方法评价

### 1.5.1 酶浓度对 *BtLPMO10A* 活性测定的影响

采用 200  $\mu\text{L}$  的反应体系: 设置不同浓度的 *BtLPMO10A* (1  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ ), 5 mmol/L 2,6-DMP, 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 30  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 测 469 nm 下吸光度(A)随时间的变化, 每组实验设置 3 个重复。根据资料显示, 该方法测得的显色产物的摩尔吸光系数  $\varepsilon_{469}=53\ 200\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$  (pH 6.0)<sup>[12]</sup>, 产物浓度 ( $\text{mol/L}$ )= $A/(\varepsilon\times d)$ , 其中  $d$  为比色皿宽度 0.56 cm。通过换算绘制产物浓度随时间增加的曲线, 计算斜率得出酶活性。并进一步得出 *BtLPMO10A* 活性与浓度关系图。

### 1.5.2 2,6-DMP 浓度对 *BtLPMO10A* 活性测定的影响

采用 200  $\mu\text{L}$  的反应体系, 5  $\mu\text{mol/L}$  *BtLPMO10A*, 设置不同浓度的 2,6-DMP (1、2、5、10、15 mmol/L), 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 30  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 测 469 nm 下吸光度随时间的变化, 每组实验设置 3 个重复。通过换算绘制产物浓度随时间增加的曲线, 分析合适的底物浓度用于后续酶活性的测定, 计算斜率得出酶活性。再通过双倒数作图法 ( $1/V=K_m/V_{\max}\times 1/[S]+1/V_{\max}$ ) 测定 *BtLPMO10A* 对 2,6-DMP 的  $K_m$  值。

### 1.5.3 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度对 *BtLPMO10A* 活性测定的影响

采用 200  $\mu\text{L}$  的反应体系, 5  $\mu\text{mol/L}$  *BtLPMO10A*, 5 mmol/L 2,6-DMP, 设置不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、30  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ ), 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 30  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 测 469 nm 下吸光度随时间的变化。每组实验设置 3 个重复,

通过换算绘制产物浓度随时间增加的曲线, 计算斜率得出酶活性。再通过双倒数作图法 ( $1/V=K_m/V_{\max}\times 1/[S]+1/V_{\max}$ ) 测定 *BtLPMO10A* 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的  $K_m$  值。

### 1.5.4 抗坏血酸浓度对 *BtLPMO10A* 活性测定的影响

体系 1: 采用 200  $\mu\text{L}$  的反应体系, 5  $\mu\text{mol/L}$  *BtLPMO10A*, 5 mmol/L 2,6-DMP, 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 添加不同浓度的抗坏血酸(0、0.5、1、2、5 mmol/L), 30  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 测 469 nm 下吸光度随时间的变化。每组实验设置 3 个重复, 绘制吸光度随时间增加的曲线, 通过斜率得出酶活性。体系 2: 采用 200  $\mu\text{L}$  的反应体系, 在不含  $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下, 5  $\mu\text{mol/L}$  *BtLPMO10A*, 5 mmol/L, 2,6-DMP, 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 设置不同浓度的抗坏血酸(0、0.5、1 mmol/L), 30  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 测 469 nm 下吸光度随时间的变化。每组实验设置 3 个重复, 通过换算绘制产物浓度随时间增加的曲线, 计算斜率得出酶活性, 得出抗坏血酸浓度对 *BtLPMO10A* 活性的影响。

## 1.6 *BtLPMO10A* 的稳定性

采用 2,6-DMP 法表征 *BtLPMO10A* 的稳定性。300  $\mu\text{L}$  的反应体系: 5 mg/mL  $\beta$ -几丁质, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0), 1 mmol/L 抗坏血酸/不加抗坏血酸, 5  $\mu\text{mol/L}$  *BtLPMO10A*, 20 mmol/L 叠氮化钠, 30  $^\circ\text{C}$  孵育 0、3、6、9、12、24、48 h。离心取上清 100  $\mu\text{L}$ , 用考马斯亮蓝法测上清中蛋白浓度即为未结合蛋白质浓度, 总蛋白浓度去除未结合蛋白质浓度为结合蛋白质浓度。采用 2,6-DMP 法测上清液中酶的残留活性, 再通过计算比活性(酶活性曲线斜率/蛋白浓度)来表征酶的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BtLPMO10A* 的制备及活性测定

#### 2.1.1 *BtLPMO10A* 的制备

将接种 *BtLPMO10A* 单菌落的 *E. coli* BL21(DE3) 宿主细胞用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 采用固体  $\beta$ -几丁质填料吸附纯化目的蛋白, 结果如图 2 所示。发现 *BtLPMO10A* 在上清液中实现可溶表达。目的蛋白在 20 mmol/L 乙酸洗脱液中富集, 其中 8、9 组分中蛋白质条带较为单一, 满足后续实验的要求。纯化得到的蛋白质在 SDS-PAGE 条带位置与预测蛋白位置(22 kDa)一致。收集目的蛋白, 并用 BCA 法测蛋白浓度, 得到蛋白产量约为 12 mg/L。

#### 2.1.2 *BtLPMO10A* 的活性鉴定

以  $\beta$ -几丁质为底物, *BtLPMO10A* 在有抗坏血酸的存在下的产物质谱图中有明显的区别于对照组(图 3A)的质谱峰, 其质荷比依次为 1 097.3、1 297.4、1 500.6、1 703.6、1 907.7  $m/z$  (图 3B)。根据之前的文献报道<sup>[9]</sup>, 这些质谱峰正是溶解性多糖单加氧酶氧化几丁质的产物特征

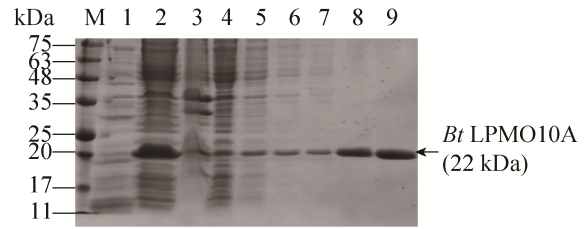


图 2 *BtLPMO10A* 分离纯化 SDS-PAGE 电泳图  
Figure 2 SDS-PAGE analysis of *BtLPMO10A*. M: protein marker; lane 1: the supernatant of cell lysate from cells containing empty vector pET22b; lane 2: supernatant of cell lysate from cells expressing *BtLPMO10A*; lane 3: precipitation of cell lysate from cells expressing *BtLPMO10A*; lane 4: flow through; lane 5, 6, lane 7: CBD buffer washing components; lane 8, 9: 20 mmol/L acetic acid eluent components.

峰, 分别对应几丁五糖酸、几丁六糖酸、几丁七糖酸、几丁八糖酸和几丁九糖酸。说明表达获得的 *BtLPMO10A* 是具有活性的。

### 2.2 建立 2,6-DMP 法测 *BtLPMO10A* 的活性体系

#### 2.2.1 不同浓度 *BtLPMO10A* 活性测定

首先考察不同浓度 *BtLPMO10A* 催化底物 2,6-DMP 产生有色氧化物质的活性。如图 4A

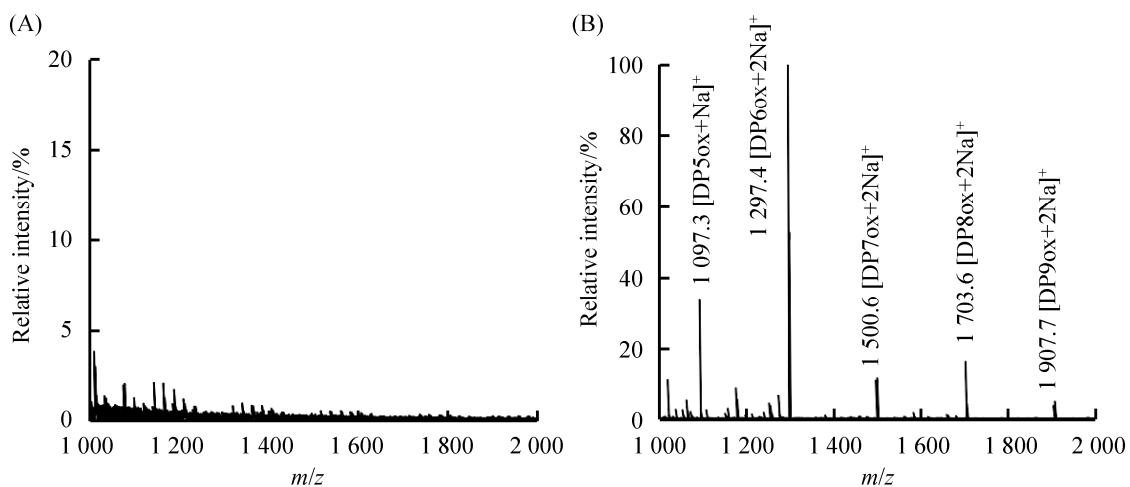


图 3 *BtLPMO10A* 作用于  $\beta$ -几丁质的产物质谱图

Figure 3 Mass spectrum analysis of the product of *BtLPMO10A* acting on  $\beta$ -chitin. A: Control group, no *BtLPMO10A*; B: Experimental group, 1  $\mu$ mol/L *BtLPMO10A*.

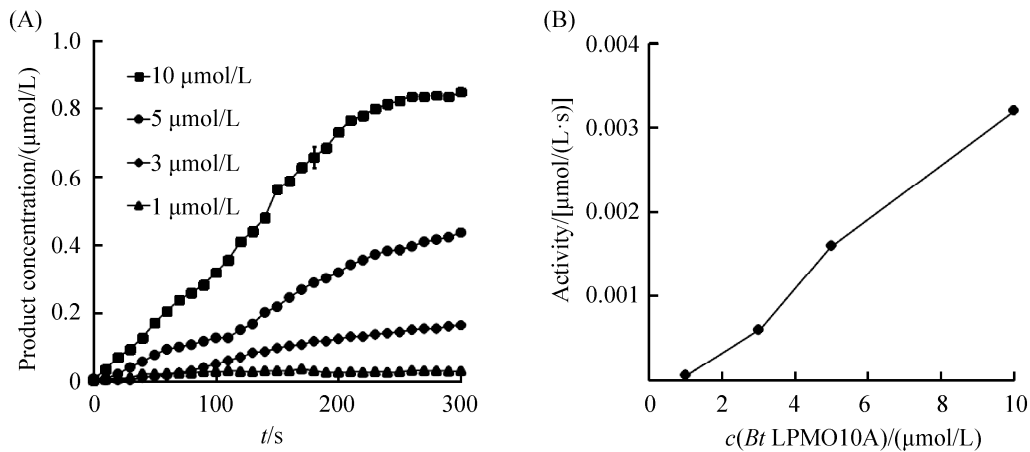


图 4 不同浓度 *BtLPMO10A* 的活性测定

Figure 4 Activity determination of *BtLPMO10A* at different concentrations. A: the time-dependent changes of products generated by different concentrations of *BtLPMO10A*; B: the relationship between the activity and concentration of *BtLPMO10A*.

所示, 当体系中存在 1 μmol/L 的酶时, 产物生成并不明显。随着酶浓度的提高, 产物的生成量随着酶浓度的增加而增加。在前 200 s 内, 产物浓度随着时间呈线性增加, 但当超过 200 s 之后, 高浓度的酶催化底物产生产物开始进入平台期。综合考虑酶活性的显著性以及是否容易进入平台期, 选取 5 μmol/L 酶用于后续活性的分析。取前 200 s 的反应过程, 通过斜率计算酶的活性,

绘制酶的活性与浓度的关系。如图 4B 所示, 酶浓度与活性呈线性关系, 表明该方法在一定范围内能够很好地体现酶的活性。

### 2.2.2 不同浓度 2,6-DMP 对 *BtLPMO10A* 活性影响

进一步考察不同底物浓度 2,6-DMP 对 5 μmol/L *BtLPMO10A* 活性测定的影响, 结果如图 5A 所示。结果表明, 随着 2,6-DMP 浓度增加, 产物也随之增加, 且反应初始阶段产物增

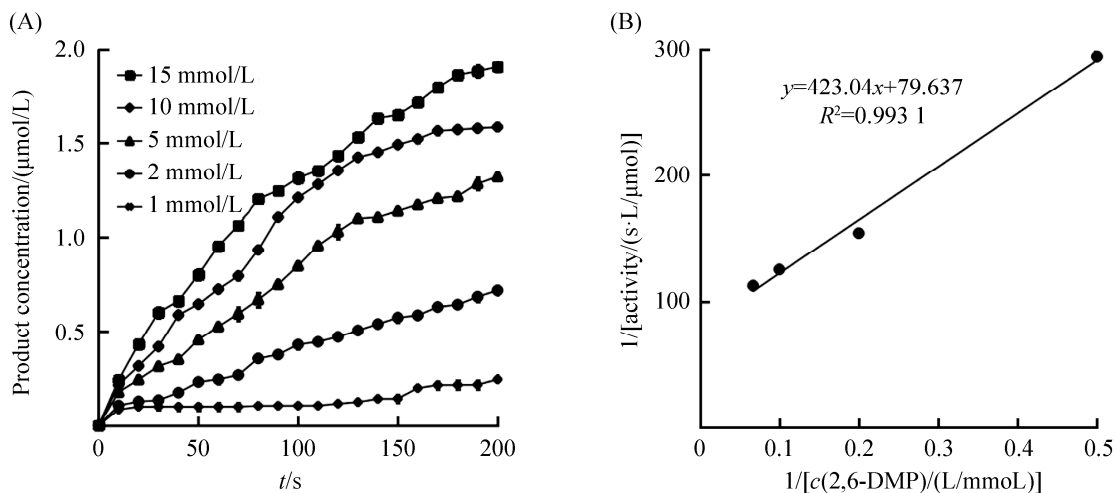


图 5 2,6-DMP 对 *BtLPMO10A* 活性的影响

Figure 5 Effect of 2,6-DMP on the activity of *BtLPMO10A*. A: the activity of *BtLPMO10A* was measured with different concentrations of 2,6-DMP; B:  $K_m$  value of *BtLPMO10A* to 2,6-DMP.

加与时间呈线性关系。但是当 2,6-DMP 浓度大于 10 mmol/L 后, 产物的增加在反应时间超过 100 s 之后趋于缓慢。考虑测定酶活性的显著性以及反应过程是否容易进入平台期而影响精确的测定, 选取 5 mmol/L 的 2,6-DMP 为底物用于后续动力学参数的分析。以底物 2,6-DMP 浓度倒数为横坐标, 反应初始阶段得到的速率倒数为纵坐标, 通过双倒数作图( $1/V=K_m/V_{\max} \times 1/[S]+1/V_{\max}$ ), 结果如图 5B 所示。求得 *BtLPMO10A* 对 2,6-DMP 的  $K_m$  值约为 5.31 mmol/L。

### 2.2.3 不同浓度 $H_2O_2$ 对 *BtLPMO10A* 活性的影响

$H_2O_2$  作为 LPMO 的共底物, 影响 LPMO 活性的测定, 因此进一步考察不同浓度  $H_2O_2$  对 *BtLPMO10A* 活性的影响。结果如图 6A 所示, 在不加  $H_2O_2$  的情况下, 并不能检测到产物的生成。在加入  $H_2O_2$  的情况下, 随着  $H_2O_2$  浓度增加, *BtLPMO10A* 活性增强, 且前 200 s 产物浓度随时间的增加呈线性关系。随着  $H_2O_2$  浓度的增高, 进一步延长反应时间后, 反应更容易到达平台期。以  $H_2O_2$  浓度倒数为横坐标, 反应速

率倒数为纵坐标, 通过双倒数作图( $1/V=K_m/V_{\max} \times 1/[S]+1/V_{\max}$ ), 结果如图 6B 所示, 根据与横坐标截距绝对值为  $1/K_m$ , 求得 *BtLPMO10A* 对  $H_2O_2$  的  $K_m$  值约为 0.53 mmol/L。

### 2.2.4 不同浓度抗坏血酸对 *BtLPMO10A* 活性影响

由于在抗坏血酸存在条件下, LPMO 能够产生  $H_2O_2$ , 因此考察抗坏血酸对于活性测定的影响。首先在 100  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  存在条件下, 在前 50 s 时, 随着抗坏血酸浓度增加, 产物浓度也逐渐增加, 这表明抗坏血酸能够促进酶的催化反应。但是当反应时间大于 50 s 时, 随着抗坏血酸浓度增加(大于 2 mmol/L), 产物浓度增加变缓慢, 而且不再呈线性关系。当抗坏血酸浓度大于 2 mmol/L, 反应时间为 200 s 时, 产物浓度反而小于添加低浓度的抗坏血酸(图 7A)。当体系中不含有  $H_2O_2$  时, 用抗坏血酸代替  $H_2O_2$  时, 抗坏血酸的存在同样能够使 *BtLPMO10A* 催化 2,6-DMP 产生相应的产物, 结果如图 7B 所示。且产物随着抗坏血酸浓度增加而增加, 但是产生产物的量以及线性关系不如  $H_2O_2$ 。

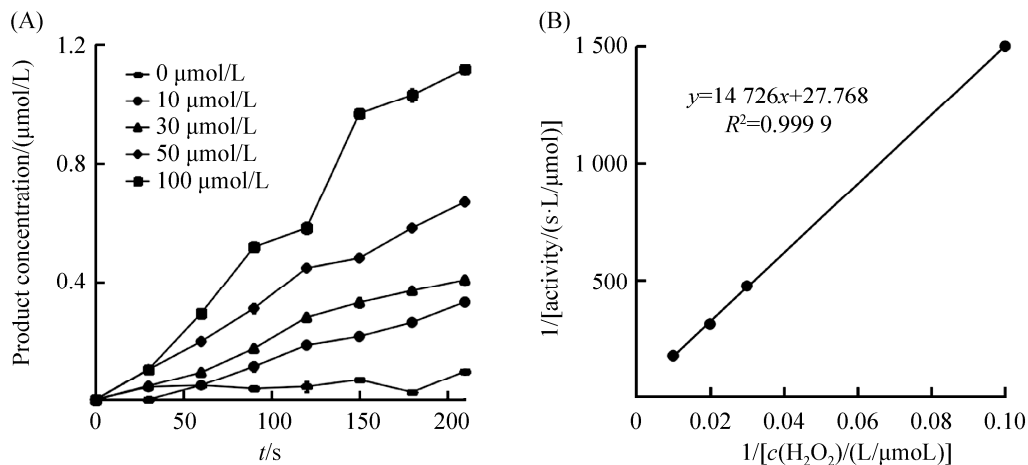


图 6  $H_2O_2$  对 *BtLPMO10A* 活性影响

Figure 6 Effect of  $H_2O_2$  on the activity of *BtLPMO10A*. A: determination of *BtLPMO10A* activity with different concentrations of  $H_2O_2$ ; B:  $K_m$  value of *BtLPMO10A* toward  $H_2O_2$ .



### 2.3 *BtLPMO10A* 与底物的结合及稳定性

LPMO 的稳定性是其催化几丁质降解过程的重要因素。本研究进一步采用 2,6-DMP 测定 LPMO 活性的方法, 结合测定上清中蛋白质浓度进而得到酶的比活性。通过比活性分析 *BtLPMO10A* 在只结合几丁质(无抗坏血酸)以及催化几丁质(有抗坏血酸)过程中的稳定性。首先

通过考马斯亮蓝法测定上清液中未结合蛋白质的浓度, 通过计算得到未结合酶的百分比, 结果如图 8 所示。在无抗坏血酸存在的情况下, 上清液中酶浓度随时间下降较少, 说明仅有少部分酶能够结合在几丁质上。在有抗坏血酸存在的情况下, 上清液中酶浓度下降较多, 特别是在前 12 h 下降速度极快, 说明有较多的酶结合在几丁质上。

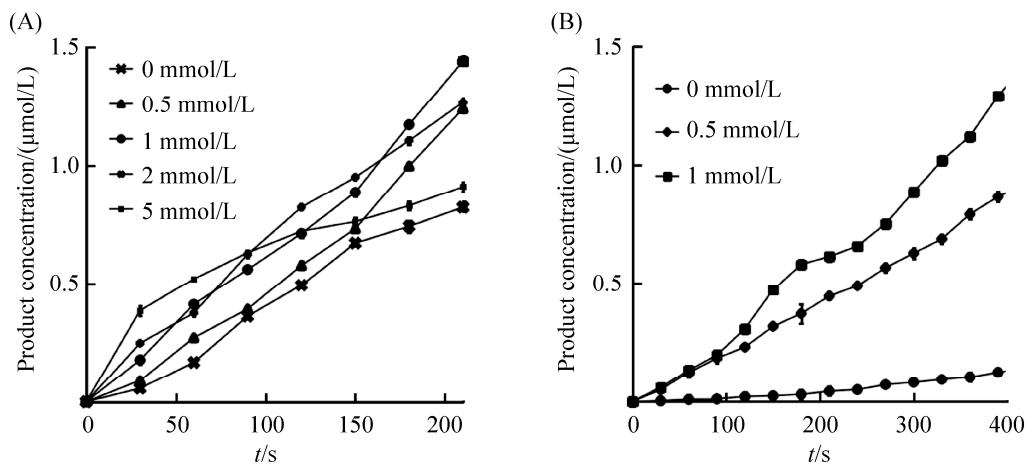


图 7 不同浓度抗坏血酸对 *BtLPMO10A* 活性的影响

Figure 7 Effects of different concentrations of ascorbic acid on the activity of *BtLPMO10A*. A: reaction system containing 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: reaction system containing no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

在上述实验基础上, 采用 2,6-DMP 法测定在不同时间条件下上清液中 *BtLPMO10A* 的活性, 并根据蛋白质浓度计算得到比活性。将初始条件下的比活性记为 100%, 根据比活性变化分析酶的稳定性。结果如图 9A、9C 所示, 在有抗坏血酸存在条件下, 随着时间的增长, 测得上清液中的残留活性一直降低, 但是降低的幅度没有无抗坏血酸时快。在 48 h 依然具有一定的活性。如图 9B、9D 所示, 在无抗坏血酸存在的条件下, 随着时间的增长, 测得上清中的残留活性迅速降低, 其比活力在前 24 h 逐渐下降, 最后活性消失, 在 24 h 后基本失活。

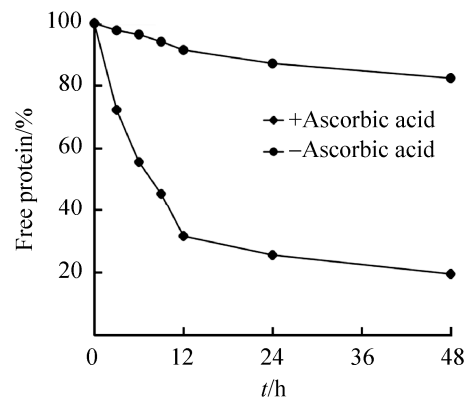


图 8 *BtLPMO10A* 在上清中蛋白质浓度随催化时间的变化

Figure 8 Percentage of *BtLPMO10A* in supernatant during hydrolysis.

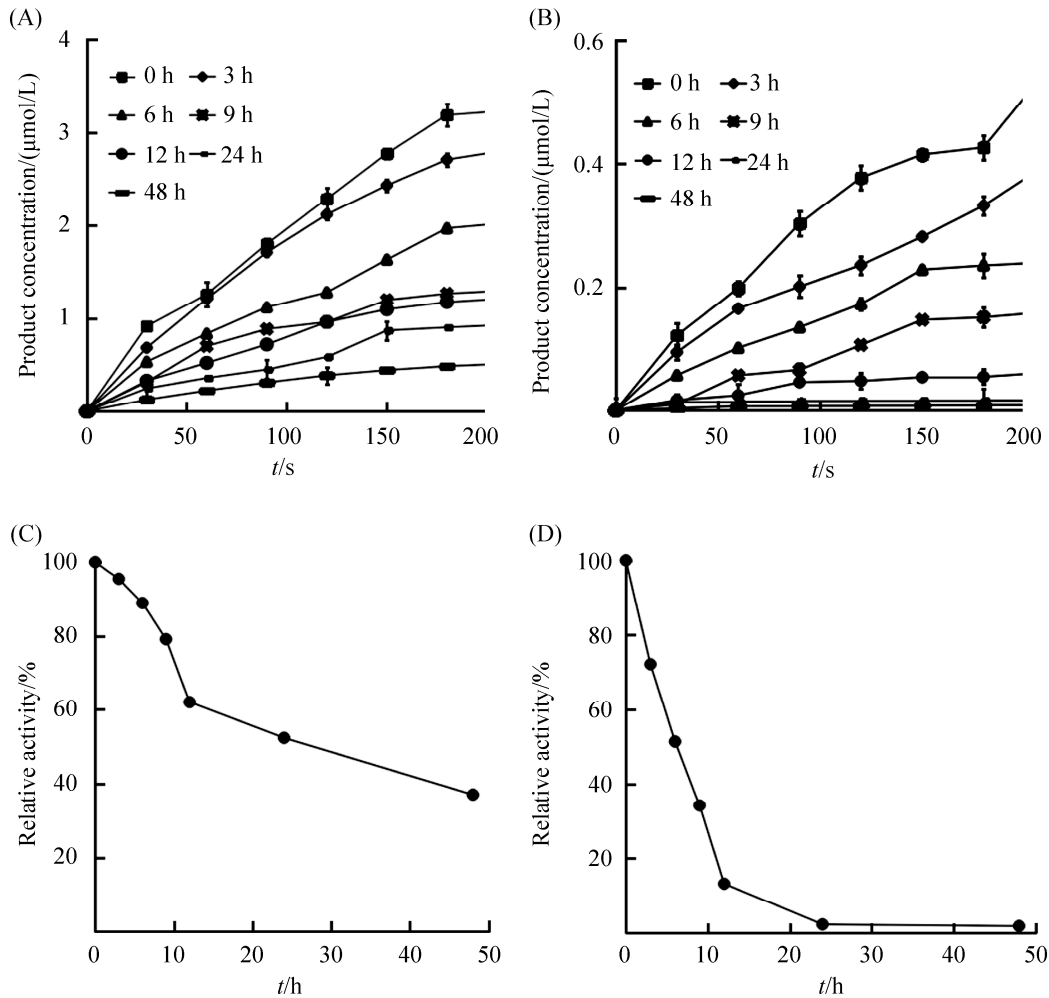


图9 *BtLPMO10A* 在几丁质存在条件下的稳定性分析

Figure 9 Analysis of the stability of *BtLPMO10A* in the presence of chitin. A and C: with ascorbic acid; B and D: without ascorbic acid.

### 3 讨论

LPMO 是最近发现的一类铜离子依赖型的氧化酶，由于其能够通过氧化的方式断裂几丁质，显著提高多糖的水解效率，因而受到人们的广泛关注。但是 LPMO 底物的聚合性质和释放产物的多样性使得 LPMO 活性的评估变得困难，且在降解多糖底物过程中容易失活。本研究考察了以 2,6-DMP、 $H_2O_2$  为底物，测定具有几丁质裂解活性的 LPMO 的方法。结果发现较高的酶浓度，2,6-DMP 浓度和过氧化氢浓度，在反应超过一定时间时均使得反应过程脱离了

线性范围，容易到达平台期(图 4–6)。说明使用此方法比较容易受到酶浓度、底物浓度的影响，需要在合适的范围内进行测定，本研究经过优化选取 5 μmol/L 酶、5 mmol/L 底物 2,6-DMP 的条件用于进一步研究过氧化氢、抗坏血酸对于 LPMO 催化过程的影响。考虑到不同的 LPMO 活性存在差异，在比较 LPMO 活性的过程中，采用此方法时需要评价反应产物随时间的变化，找出反应发生的线性范围，通过斜率体现酶的活性。不能够简单地采用终点法进行比较，否则结果并不准确，比如图 7 中 200 s 时的情况。

由于 LPMO 在抗坏血酸存在的条件下能够

生成  $H_2O_2$ , 而  $H_2O_2$  在此方法中是作为共底物参与催化反应。因此抗坏血酸的加入能够促进产物的生成, 但是其促进作用仅在较短的时间内(50 s)随抗坏血酸浓度增加, 斜率升高。随后反应很快到达平台期(图 7A)。当体系中用抗坏血酸代替  $H_2O_2$  时, 产物并不能很好地随抗坏血酸的浓度增加而成线性增加(图 7B), 说明抗坏血酸并不能作为共底物代替  $H_2O_2$  进行活性测定, 且当体系中存在抗坏血酸时, 酶容易失活, 不能够简单地采用终点法对 LPMO 的活性进行检测。

通过 2,6-DMP 法能够测定 *Bt*LPMO10A 对  $H_2O_2$  的  $K_m$  为 0.53 mmol/L, 对 2,6-DMP 的  $K_m$  为 5.31 mmol/L。其对  $H_2O_2$  和 2,6-DMP 的亲合力均高于具有纤维素裂解活性的 *Nc*LPMO9C<sup>[12]</sup>。尽管 2,6-DMP 并不是 LPMO 的真正底物, 但此种方法可以用于比较不同种类 LPMO 性质的差别。应用该方法实现了对 *Bt*LPMO10A 稳定性的评价, 发现在抗坏血酸存在的条件下, *Bt*LPMO10A 能够更好地与底物结合, 说明其活性中心铜离子的还原与酶跟底物的结合紧密相关, 与文献报道的一致。此时酶随时间的稳定性高于无抗坏血酸的情况, 可能原因在于酶与底物的结合能够提高酶的稳定性, 减少酶分子被氧化而失活的可能性。

## 4 结论

本研究考察了通过 2,6-DMP 检测几丁质裂解性多糖单加氧酶活性的影响因素, 并应用该方法考察 LPMO 对底物亲和力及稳定性的分析, 为进一步应用几丁质氧化裂解活性的 LPMO 用于几丁质的降解提供了重要信息。

## 参考文献

- [1] 邓晓瑞. 昆虫裂解性多糖单加氧酶的性质表征与功能分析. 大连理工大学学位论文. 2018.  
[2] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New

insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology*, 2009, 54: 285–302.

- [3] Singh AK, Chhatpar HS. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp. D1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164(1): 77–88.  
[4] 姜竹峪, 陈羽, 魏锦兴, 陈珊, 徐威. 几丁质酶的研究进展. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(5): 414–418.  
Jiang ZY, Chen Y, Wei JX, Chen S, Xu W. Recent advances in research on chitinase. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2016, 33(5): 414–418. (in Chinese)  
[5] 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(1): 41.  
[6] Pal I, Mishra N, Herrera AI, Dubey A, Arthanari H, Geisbrecht BV, Prakash O.  $^1H$ ,  $^{15}N$ , and  $^{13}C$  backbone resonance assignments of the C4b-binding region from the *S. aureus* extracellular adherence protein. *Biomolecular NMR Assignments*, 2021, 15(1): 183–186.  
[7] Zhang HY, Zhao Y, Cao HL, Mou GQ, Yin H. Expression and characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79: 72–75.  
[8] Horn SJ, Sikorski P, Cederkvist JB, Vaaje-Kolstad G, Sørli M, Synstad B, Vriend G, Vårum KM, Eijsink VGH. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(48): 18089–18094.  
[9] Frandsen KEH, Simmons TJ, Dupree P, Poulsen JCN, Hemsworth GR, Ciano L, Johnston EM, Tovborg M, Johansen KS, von Freiesleben P, Marmuse L, Fort S, Cottaz S, Driguez H, Henrissat B, Lenfant N, Tuna F, Baldansuren A, Davies GJ, Leggio LL, Walton PH. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 298–303.  
[10] Vuong TV, Liu B, Sandgren M, Master ER. Microplate-based detection of lytic polysaccharide monooxygenase activity by fluorescence-labeling of insoluble oxidized products. *Biomacromolecules*, 2017, 18(2): 610–616.  
[11] Kittl R, Kracher D, Burgstaller D, Haltrich D, Ludwig R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 79.  
[12] Breslmayr E, Hanžek M, Hanrahan A, Leitner C, Kittl R, Šantek B, Oostenbrink C, Ludwig R. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 79.

(本文责编 张晓丽)