DOI:10.12441/spyswjs.20230404001 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0105-11

嗜热裂解性多糖单加氧酶的异源表达及其应用

谢 乐[1] 彭龙云[1] 胡 芸[1] 任洪艳[2] 孙海彦[3] 孙付保[1*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学环境与生态学院,江苏 无锡 214122; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南 海口 571101)

摘要:【目的】探究新型嗜热的裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenase,LPMO)在以木质纤维素为底物的纤维素酶高效水解中的应用。**【方法】**以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为宿主,异源表达来源于堆肥宏基因组的嗜热 LPMO(mgLPMO10),通过优化表达载体信号肽以及诱导条件(温度、IPTG 浓度、诱导时间)提高其表达量,并测定该酶的最适温度、最适 pH、温度稳定性、pH 稳定性及金属离子对其酶活力的影响;随后,评估 mgLPMO10 与 2 种嗜热内切葡聚糖酶(*Tn*CelB 和 *Dt*CelB)在不同摩尔比下,于 70 ℃对磷酸溶胀纤维素(PASC)及其他纤维素底物的协同水解效率。**【结果】**表达载体中 pelB 信号肽编码序列显著提高 mgLPMO10 的表达量,以温度 28 ℃、IPTG 浓度 0.50 mmol/L、诱导 18 h 的条件优化后,表达量达到 12.9 mg/L,较优化前提高了 90%。mgLPMO10 的最适反应温度为 70 ℃,最适 pH 为 6.0,最高酶活力为 25.5 U/g。加入 5 mmol/L Mn^{2+}后,其酶活力提升 75%。该酶与嗜热内切葡聚糖酶 *Tn*CelB 或 *Dt*CelB 协同水解磷酸溶胀纤维素时,协同度分别达到 123% 和 138%,且对其他纤维素底物也有明显促进作用。**【结论】**mgLPMO10 与嗜热内切葡聚糖酶联合作用可显著增强高温条件下的纤维素水解效率,为开发高温木质纤维素生物炼制工艺提供了重要的酶资源与理论依据。

关键词:裂解性多糖单加氧酶;嗜热;水解;木质纤维素;内切葡聚糖酶

Heterologous Expression and Application of a Thermophilic Lytic Polysaccharide Monooxygenase

XIE Le[1] *PENG Longyun*[1] *HU Yun*[1] *REN Hongyan*[2] *SUN Haiyan*[3] *SUN Fubao*[1*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Environment and Ecology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to investigate the application of a novel thermophilic lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) in the efficient cellulase-mediated hydrolysis of lignocellulosic substrates. [**Method**] The thermophilic enzyme mgLPMO10, derived from a compost metagenome, was heterologously expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). Its expression level was improved by modifying the signal peptide of the expression vector and induction conditions (temperature, IPTG concentration, and induction time). The enzyme was then characterized in terms of the optimal temperature, optimal pH, thermal stability, pH stability, and the effects of metal ions on its enzyme activity. Subsequently, the synergistic hydrolysis efficiency of mgLPMO10 with two thermophilic endoglucanases (*Tn*CelB and *Dt*CelB) at different molar ratios toward phosphoric acid-swollen cellulose (PASC) and other cellulose substrates was evaluated at 70 ℃. [**Result**] The coding sequence of the pelB signal peptide in the expression vector significantly improved the expression level of mgLPMO10. After

基金项目:财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-11-HNSHY)。

通信作者:孙付保(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事纤维素乙醇技术研究。 E-mail: fubaosun@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-04-04 **修回日期:**2023-05-18

optimization (induction with 0.50 mmol/L IPTG at 28 ℃ for 18 h), the expression level reached 12.9 mg/L, representing a 90% increase compared with the pre-optimized level. The optimal reaction conditions of mgLPMO10 were 70 ℃ and pH 6.0, and this enzyme showed the maximum enzyme activity of 25.5 U/g. After adding 5 mmol/L Mn^{2+}, its enzyme activity increased by 75%. When synergistically hydrolyzing PASC with *Tn*CelB or *Dt*CelB, the enzyme exhibits synergy degrees of 123% and 138%, respectively. Moreover, mgLPMO10 exhibited significant promoting effects on other cellulose substrates. [**Conclusion**] The combination of mgLPMO10 and thermophilic endoglucanases can significantly enhance cellulose hydrolysis efficiency under high-temperature conditions. The study provides an important enzyme and a theoretical basis for the development of high-temperature lignocellulose biorefining processes.

Keywords: lytic polysaccharide monooxygenase; thermophilic; hydrolysis; lignocellulose; endoglucanase

木质纤维素是地球上极为丰富且容易获取的可再生资源。以木质纤维素为原料生产高值生化产品的二代生物炼制技术具有巨大潜力[1-4]。木质纤维素中最重要的成分是纤维素，然而纤维素是一种晶体聚合物，纤维素链之间有高度稳定的氢键网络和相互堆叠作用[5-6]，加上木质纤维素的复合性质，导致其不易被酶解聚。因此，在过去几十年中，研究者们开发了许多新的生物质预处理方法[7-9]，以克服其难以降解的问题，大部分预处理方法都能在一定程度上破坏木质纤维素的结构。与预处理类似，通过酶水解将多糖转化为可发酵糖同样是降解木质纤维素的关键步骤，也是制约该工艺技术与经济可行性的关键因素。在传统酶水解研究中，对于纤维素酶的研究集中于糖苷水解酶，主要包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶以及*β*-葡萄糖苷酶[10-14]。与此同时，多种复合纤维素酶也被开发出来，以提升转化效率。

LPMO的发现和工业应用是开发、改良纤维素酶复配定制方法的重要一步[15]。LPMO是一类铜依赖性的氧化还原酶。自从第一个LPMO（CBP21）被发现后[16]，越来越多的LPMO被发现。它们在碳水化合物活性酶数据库（CAZy）中被归类为辅助活性蛋白质家族AA9、AA10、AA11、AA13、AA14、AA15以及AA16[17-19]。各家族酶类的作用底物不尽相同，其中AA9和AA10已被广泛研究并应用于纤维素的降解。LPMO催化纤维素的葡萄糖基单元中C-1或C-4的羟基，破坏其晶体结构，生成还原性和非还原性糖链末端[20-22]，形成无定型和松散的纤维素结构，提高纤维素酶的可及性，从而提高纤维素酶的酶解效率[16,23]。LPMO的作用机理尚未完全明确，但已知此酶的激活依赖Cu^{2+}，即需要由外源电子供体将LPMO活性中心的Cu^{2+}还原至Cu^{+}[15,24]，以O_2或H_2O_2作为共底物激活其氧化反应[25-26]，随后糖苷键断裂，并破坏结晶纤维素的结构。因此，LPMO通常用作酶混合物的一部分，可以提高结晶纤维素的降解效率，从而更易获得可发酵性糖[27-28]。此外，LPMO与各种纤维素酶协同作用可能受多种因素影响，如底物的组成结构以及纤维素酶的种类、比例等[29-30]。

在包括生物精炼在内的微生物酶水解过程中，水解酶通常需要能够承受一定的环境胁迫，其中耐高温则是被关注的一个焦点[31]。嗜热纤维素酶具有适用于多种工业化过程的潜力。与一般纤维素酶相比，它具有反应速度快、酶用量低等优势[32]。此外，高温水解条件还降低了微生物污染的可能性[33]。

有报道指出，一种来自堆肥宏基因组的嗜热LPMO（mgLPMO10）具有纤维素酶活性，能够对纤维素的C-1位置进行氧化，并且在高温条件下保持一定活性[34]。然而，现有研究主要集中于其蛋白质理化性质及其在与商业纤维素酶构成的混合体系中的初步应用效果，对于mgLPMO10在常用表达系统中的表达调控机制及其与高温内切酶协同作用方面的应用潜力仍缺乏系统研究。此外，mgLPMO10在不同类型纤维素底物下的协同增效规律尚不明确，限制了其在高温生物转化体系中的实际推广与优化。

因此，作者基于该酶的热适性特点，构建并优化mgLPMO10的大肠杆菌表达系统，系统分析其酶学性质，并进一步评估其与2种不同来源的嗜热内切葡聚糖酶（*Tn*CelB和*Dt*CelB）在高温条件下

协同水解多种典型纤维素底物的能力，旨在明确其结构辅助型酶的功能表现与底物适配性。本研究结果可为热稳定LPMO的表达调控、催化特性解析及其在高温木质纤维素水解体系中的组合应用提供基础数据和理论支持。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

基因及引物：天霖生物科技无锡有限公司；嗜热内切葡聚糖酶 *Tn*CelB（GeneBank：ACM23283.1）和 *Dt*CelB（GeneBank：ACK41916.1）：作者所在课题组；羧甲基纤维素（carboxymethyl cellulose，CMC）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；微晶纤维素（microcrystalline cellulose，MCC）：国药集团化学试剂有限公司；其余化学试剂均为分析纯。

1.2　试验方法

1.2.1　重组载体的构建

mgLPMO10的完整基因序列从联合基因组研究所IMG/M数据库中获取（https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi；IMG genome ID：2199352008）[35]。下文中以 *mgLPMO10* 表示mgLPMO10的基因。将 *mgLPMO10* 中对应信号肽的序列（即前93个核苷酸序列）去除，并使用被广泛研究的AA10家族蛋白质CBP21的天然信号肽编码序列替换[21]，构建含CBP21信号肽编码序列的 *mgLPMO10* 序列。根据大肠杆菌宿主进行密码子优化后进行基因合成。基因序列连接于载体pET-20b的 *Nde* I与 *Xho* I之间，在后续C端自动添加6×His标签用于蛋白质纯化。为了研究不同信号肽对mgLPMO10表达效果的影响，根据质粒pET-20b设计带有不同同源臂的引物，以同源重组的方式获得含CBP21信号肽编码序列的 *mgLPMO10* 重组质粒以及含pET-20b自带的pelB信号肽编码序列的 *mgLPMO10* 重组质粒。其中，pelB-F引物序列为5′-CCAGCCGGCGATGGCCCATGGAGCTGCGATGGTAC-3′，CBP21-F引物序列为5′-TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAGACCTCGCGCACTTTG-3′，mgLPMO10-R引物序列为5′-TGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCCGCGCTTGTGCATGTGG-3′。

1.2.2　表达及纯化

将构建好的pET-20b-*mgLPMO10* 质粒转化入 *E. coli* BL21 Star（DE3）中，在LB琼脂平板上于37 ℃过夜培养，挑取单菌落接入含Amp的LB试管中，37 ℃培养12 h，再以体积分数1%接种于含Amp的LB培养基中，37 ℃培养，当OD_{600}值达到0.6~0.8时，加入IPTG至终浓度为0.50 mmol/L，然后置于37 ℃发酵6 h。发酵结束后，在10 000 r/min、4 ℃条件下离心10 min收集菌体，重悬于20 mmol/L pH 7.4的Tris-HCl溶液。将重悬菌液用超声破碎仪破碎45 min，随后在12 000 r/min、4 ℃条件下离心30 min，收集上清液并使用0.22 μm滤膜过滤。将过滤后的上清液与Ni-NTA树脂进行混合孵育，用含有50 mmol/L咪唑的Tris-HCl（pH 7.4）溶液洗涤，最后用含有200、400 mmol/L咪唑的Tris-HCl（pH 7.4）溶液进行洗脱，获得纯化的mgLPMO10。纯化后，通过SDS-PAGE检测蛋白质的相对分子质量，并通过Bradford法检测蛋白质浓度，比较2个重组子的mgLPMO10表达量。

1.2.3　表达条件优化

1）IPTG诱导浓度：将含有pelB信号肽编码序列的pET-20b-*mgLPMO10* 质粒的重组子在含Amp的LB试管中于37 ℃培养12 h，获得种子液，以体积分数1%接种于含Amp的LB培养基中，37 ℃培养，当OD_{600}值达到0.8时，加入IPTG，使其终浓度分别为0、0.05、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L，于37 ℃发酵6 h，发酵结束后通过上述方法检测蛋白质表达量。

2）IPTG诱导温度及诱导时间：将上述种子液以体积分数1%接种于含Amp的LB中，于37 ℃培养，当OD_{600}值达到0.6~0.8时，加入IPTG至终浓度为0.50 mmol/L，在16、28、37 ℃这3个温度下分别进行6、12、18 h的发酵（即考察所有温度与时间的组合），发酵结束后通过上述方法检测蛋白质表达量。

1.2.4　基本酶学性质测定

1）铜饱和处理及酶活力分析方法：纯化后的mgLPMO10通过截留相对分子质量为10 000的超滤管浓缩。在使用前，将纯化浓缩后的mgLPMO10与$CuSO_4$以摩尔比1∶3在4 ℃下振荡孵育1 h，形成铜饱和的mgLPMO10，随后通过透析法去除游离于缓冲液中的多余$CuSO_4$，以保证没有Cu^{2+}干扰mgLPMO10的酶活力分析。

mgLPMO10的酶活力分析通过已报道的2，6-二甲氧基苯酚（2，6-DMP）法测定[36]，1 mL常规反

应体系包括：100 mmol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液、1 mmol/L 2，6-DMP、100 μmol/L H_2O_2 以及 1 μmol/L mgLPMO10。常规条件为：在 60 ℃下进行 5 min 的反应，测量 OD_{469} 值在反应后相较于反应前的增加量，并以 1 μmol/L 的 $CuSO_4$ 溶液为对照，计算其酶活力。一个酶活力单位（U）定义为在反应条件下每分钟形成 1 μmol 蓝藻酮所需的酶量。

2）最适温度及最适 pH：mgLPMO10 的最适温度是在 40~90 ℃的不同温度条件以及在 pH 6.0 的磷酸缓冲液中测定酶活力得出的。mgLPMO10 的最适 pH 是在 60 ℃以及 pH 4.0~9.0 的不同 pH 条件下测定酶活力得出的。结果以在最适温度或最适 pH 条件下的酶活力测定值为基准，表示为相对酶活力。

3）温度稳定性及 pH 稳定性：在 65~80 ℃的高温条件下，于 pH 6.0 的磷酸缓冲液中孵育不同时间后测定 mgLPMO10 的酶活力，确定其温度稳定性；在 60 ℃条件下，于 pH 5.0~8.0 的不同 pH 环境中孵育不同时间后测定 mgLPMO10 的酶活力，确定其 pH 稳定性。结果以未经孵育的 mgLPMO10 在相同条件下的酶活力测定值为基准，表示为相对酶活力。

4）金属离子与表面活性剂的影响：通过测定在反应液中分别加入浓度为 5 mmol/L 的 Ca^{2+}、Ba^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+} 或体积分数为 0.1% 的 Triton X-100、Tween-60、PEG-6000、SDS 后 mgLPMO10 酶活力的变化，确定金属离子和表面活性剂对其酶活力的影响。每种试剂与酶在 4 ℃下孵育 2 h 后进行酶活力检测。将不添加金属离子或表面活性剂时测得的酶活力定义为 100%。

1.2.5 与嗜热内切葡聚糖酶的高温协同效应

1）底物制备：为了制备 PASC，称取 0.40 g MCC，加 1.2 mL 水润湿，然后缓慢加入预冷磷酸（最终使磷酸体积分数达 83.2%），持续搅拌并充分混合。冰浴静置 1 h 后，加 100 mL 预冷的纯水稀释，充分搅拌，然后于 4 ℃、6 000 r/min 条件下离心 30 min，回收沉淀。沉淀经纯水洗涤 3 次后，用 2 mol/L Na_2CO_3 溶液中和残留磷酸，重悬于纯水，经反复洗涤离心直至 pH 约为 5，获得的底物样品于 4 ℃保存。

为了制备常压碱催化甘油有机溶剂预处理甘蔗渣[37]，首先用研磨机将甘蔗渣研磨至细小颗粒状，并以 60 目筛网对其进行筛选，随后置于 60 ℃烘箱烘至质量恒定。称取 10 g 烘干的甘蔗渣置于三口烧瓶中，加入 140 g 甘油和 0.3 g NaOH。将三口烧瓶置于加热套中加热至 240 ℃，同时用搅拌桨搅拌，使其混合并受热均匀，反应 30 min。反应结束后，取出三口烧瓶自然降温，以 4 500 mL 的纯水分 3 次进行抽滤洗涤以去除附着在甘蔗渣上的甘油溶液，收集固体样品即获得甘蔗渣底物。将处理好的甘蔗渣样品置于 60 ℃烘箱烘至质量恒定，干燥保存备用。

2）不同浓度 mgLPMO10 协同水解 PASC：协同反应在 1 mL 磷酸缓冲液（50 mmol/L，pH 6.0）中进行，反应液中含有 5 g/L PASC、0.3 μmol/L *Tn*CelB 或 *Dt*CelB、1 mmol/L 抗坏血酸（ascorbic acid，AscA）以及不同浓度（0、0.030、0.075、0.150、0.300、0.750、1.500 μmol/L）经 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 孵育且透析后的 mgLPMO10。将反应液置于分子杂交仪中，70 ℃垂直旋转、振荡 1 h。达到反应时间后，将反应液置于 100 ℃煮沸 10 min 终止反应，以 10 000 r/min 离心 10 min，收集上清液。通过 DNS 法测定上清液中还原糖的质量浓度，并以式（1）计算 mgLPMO10 与 *Tn*CelB 或 *Dt*CelB 的协同度。由于单独的 mgLPMO10 不具备将纤维素基质水解为还原糖的能力，因此 $R_{mgLPMO10}=0$。

$$D_S=\frac{R_{Cel+mgLPMO10}}{R_{Cel}+R_{mgLPMO10}}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

D_S——mgLPMO10 与内切葡聚糖酶的协同度，%；

$R_{Cel+mgLPMO10}$——内切葡聚糖酶和 mgLPMO10 协同水解时产生的还原糖质量浓度，mg/mL；

R_{Cel}——内切葡聚糖酶单独水解产生的还原糖质量浓度，mg/mL；

$R_{mgLPMO10}$——mgLPMO10 单独水解产生的还原糖质量浓度，mg/mL。

3）协同水解各种纤维素底物：酶反应在 1 mL 磷酸缓冲液（50 mmol/L，pH=6.0）中进行，反应液中含有 0.3 μmol/L *Tn*CelB 或 *Dt*CelB、1 mmol/L AscA、0.3 μmol/L mgLPMO10 以及 5 g/L 的不同底物（PASC、MCC、CMC、滤纸、预处理甘蔗渣）。由于大部分纤维素底物难以水解的特性，将反应液

置于分子杂交仪中，70 ℃垂直旋转、振荡 24 h。协同度计算方法见式（1）。

2　结果与讨论

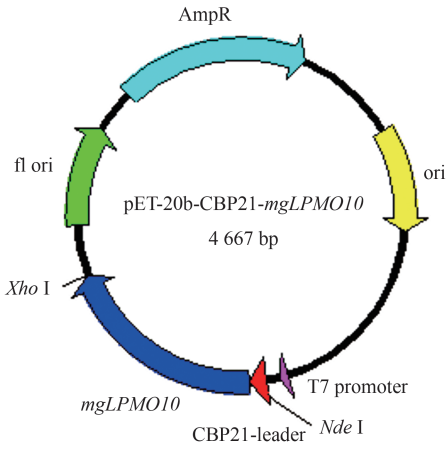
2.1　基因克隆及重组质粒构建结果

蛋白质分子的不同信号肽对其表达水平有不同影响，因此研究了 2 种不同信号肽对 mgLPMO10 表达水平的影响。将 mgLPMO10 信号肽编码序列替换为表达量较高的 AA10 家族蛋白质 CBP21 的天然信号肽编码序列[35]，插入 pET-20b 质粒中作为第一种重组质粒；将原信号肽编码序列替换为 pelB 信号肽编码序列，构建为第二种重组质粒；比较两者对 mgLPMO10 表达量的影响。上述 2 种重组质粒图谱见图 1（a）~（b）。

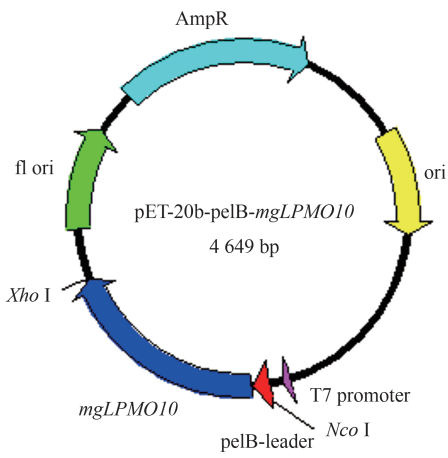
使用 mgLPMO10-R 引物分别与 pelB-F 和 CBP21-F 引物进行 PCR，获得带有不同信号肽的蛋白质所对应的基因片段，在此以 CBP21-*mgLPMO10* 和 pelB-*mgLPMO10* 表示，核酸凝胶电泳显示条带如图 1（c）所示。将基因片段与线性化载体 pET-20b 同源重组构建重组质粒（pET-20b-CBP21-*mgLPMO10* 以及 pET-20b-pelB-*mgLPMO10*），送至公司测序，证实重组质粒的构建成功。

2.2　蛋白质表达及纯化结果

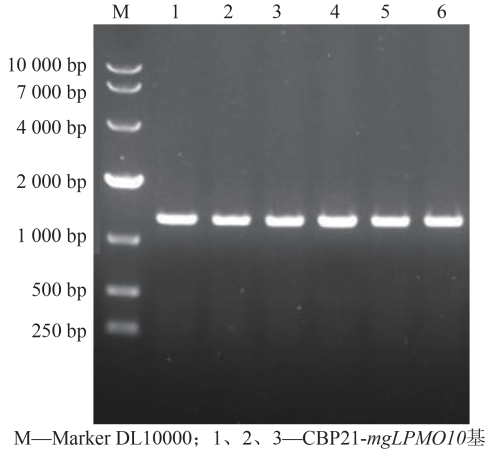
将 2 种带有不同信号肽序列的重组质粒转化入 *E. coli* BL21（DE3）后，在 37 ℃进行 IPTG 诱导表达，取发酵上清液、细胞破碎上清液以及细胞破



(a) CBP21信号肽重组质粒图谱



(b) pelB信号肽重组质粒图谱



M—Marker DL10000；1、2、3—CBP21-*mgLPMO10*基因片段；4、5、6—pelB-*mgLPMO10*基因片段。

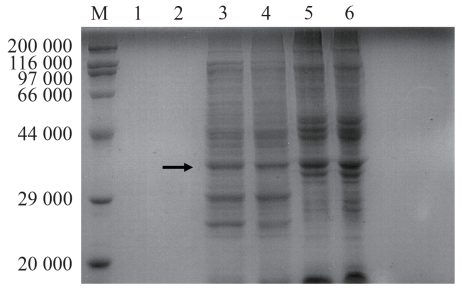
(c) PCR扩增后的琼脂糖凝胶电泳图

图 1　重组质粒图谱与 PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1　Recombinant plasmid map and agarose gel electrophoresis map after PCR amplification

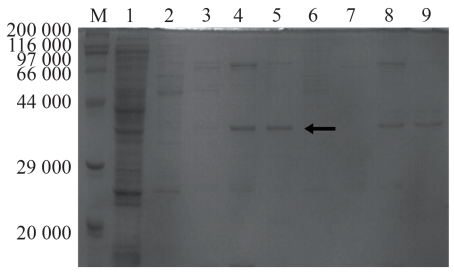
碎沉淀物进行 SDS-PAGE，检测蛋白质表达情况。结果如图 2（a）所示，2 种菌株在发酵上清液中几乎没有目标蛋白质存在，而在细胞破碎上清液以及细胞破碎沉淀物中目标蛋白质较多。这表明该蛋白质并未分泌到胞外，而且胞内蛋白质有一部分是以包涵体的形式存在。

为了获得可溶且有活性的 mgLPMO10，将细胞破碎上清液进行 Ni-NTA 树脂柱纯化，再通过 SDS-PAGE 进行检测，结果如图 2（b）所示。mgLPMO10 在咪唑浓度为 200、400 mmol/L 的 Tris-HCl（pH 7.4）溶液中被洗脱下来。通过 Bradford 法检测 2 个重组子的蛋白质表达量：CBP21 信号肽的重组子在 37 ℃下诱导 6 h 后，蛋白质表达量为 6.8 mg/L；pelB 信号肽的重组子在 37 ℃下诱导 6 h 后，蛋白质表达量为 9.5 mg/L。可见 pelB 信号肽有增加 mgLPMO10 表达量的作用，因此选择在 *E. coli* BL21（DE3）中表达的 pET-20b-pelB-*mgLPMO10* 进行后续研究。



M—Marker；1—pelB信号肽重组蛋白质（发酵上清液）；2—CBP21信号肽重组蛋白质（发酵上清液）；3—pelB信号肽重组蛋白质（细胞破碎上清液）；4—CBP21信号肽重组蛋白质（细胞破碎上清液）；5—pelB信号肽重组蛋白质（细胞破碎沉淀物）；6—CBP21信号肽重组蛋白质（细胞破碎沉淀物）。

(a) 带有不同信号肽的mgLPMO10的表达情况



M—Marker；1—细胞破碎上清液，2、3、4、5—pelB信号肽重组蛋白质分别用50、100、200、400 mmol/L咪唑洗脱的洗脱液；6、7、8、9—CBP21信号肽重组蛋白质分别用50、100、200、400 mmol/L咪唑洗脱的洗脱液。

(b) mgLPMO10的纯化

图 2　mgLPMO10 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2　SDS-PAGE results of mgLPMO10

2.3　表达条件优化结果

2.3.1　IPTG 诱导浓度对表达的影响

由于 pET-20b 的启动子是诱导型 T7 启动子，因此 IPTG 的浓度是影响重组蛋白质表达的重要条件。表达的基础条件为：当菌株生长至 OD_{600} 值为 0.8 时，添加不同浓度的 IPTG，于 37 ℃诱导 6 h。在此条件下，以 mgLPMO10 的产量为评估对象，确定最适 IPTG 浓度。不同 IPTG 浓度对 mgLPMO10 表达效果的影响如图 3 所示。结果表明，mgLPMO10 表达量呈现先增加后下降的趋势：当 IPTG 浓度在 0~0.50 mmol/L 时，mgLPMO10 的表达量随着 IPTG 浓度的增加而增加；IPTG 浓度为 0.50 mmol/L 时，mgLPMO10 表达量达到最高，为 9.5 mg/L；当 IPTG 浓度大于 0.50 mmol/L 时，mgLPMO10 表达量呈现下降趋势，可能是因为高浓度 IPTG 对菌体有较大毒害作用。因此，后续选择 0.50 mmol/L 作为 IPTG 的最适诱导浓度。

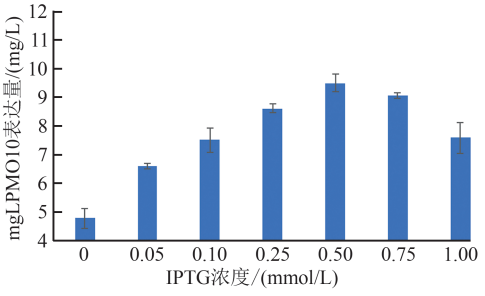


图 3　不同 IPTG 浓度下 mgLPMO10 的表达量

Fig. 3　Expression of mgLPMO10 treated with IPTG at different concentrations

2.3.2　诱导温度及诱导时间对表达的影响

当菌株生长至 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时，添加终浓度为 0.50 mmol/L 的 IPTG 进行诱导，以 mgLPMO10 表达量为评估对象，测定不同诱导温度及诱导时间对 mgLPMO10 表达效果的影响，结果如图 4 所示。在相同诱导温度下，mgLPMO10 表达量随着诱导时间的增加而增加，诱导时间在 18 h 时，

mgLPMO10表达量达到最大。不同诱导温度导致的mgLPMO10表达量差异较大，在较低或较高温度下，mgLPMO10表达量都不高，而在28 ℃诱导时，mgLPMO10表达量最高，为12.9 mg/L。因此，最终选择在28 ℃诱导18 h作为诱导条件。

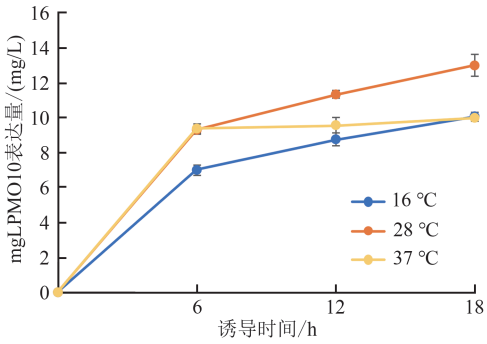


图4　不同诱导温度和时间下mgLPMO10的表达量

Fig. 4　Expression of mgLPMO10 at different induction temperatures and time points

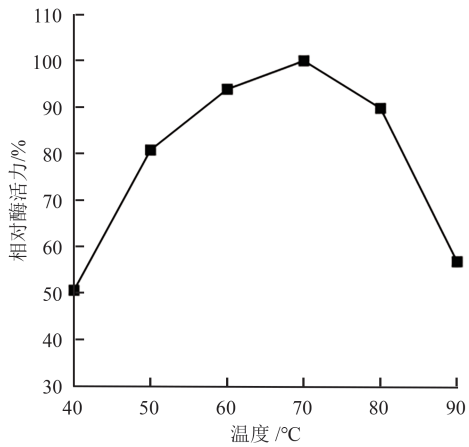
2.4　基本酶学性质

2.4.1　最适温度及温度稳定性

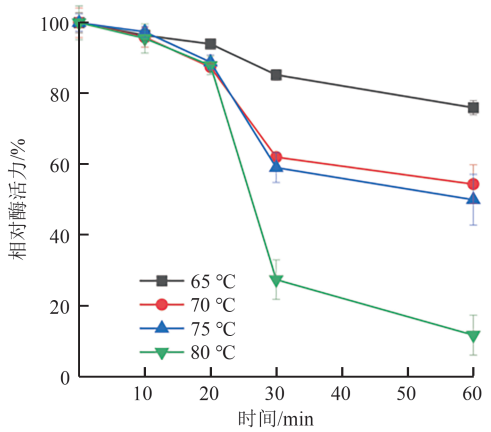
通过2,6-DMP法，在不同温度下测定mgLPMO10的相对酶活力，以确定mgLPMO10的最适反应温度。如图5(a)所示，在40~70 ℃条件下，mgLPMO10的相对酶活力随着温度上升而上升；在70 ℃时拥有最高酶活力，为25.5 U/g(图中未展现)；在80 ℃下依然有较高相对酶活力，而在90 ℃条件下，相对酶活力明显下降。将mgLPMO10分别置于65、70、75、80 ℃条件下孵育，每隔一段时间测定其残余酶活力，探究其温度稳定性。如图5(b)所示，在65~85 ℃条件下，mgLPMO10的相对酶活力都随着时间延长而降低，且温度越高，相对酶活力下降得越快。在70 ℃孵育1 h，mgLPMO10能够保持60%左右的相对酶活力；在80 ℃孵育1 h，则仅剩11%的相对酶活力。因此，后续试验选择在70 ℃条件下进行反应。

2.4.2　最适pH及pH稳定性

通过2,6-DMP法，在60 ℃、不同pH的缓冲液中测定mgLPMO10的酶活力，以确定其最适反应pH。如图6(a)所示，mgLPMO10在pH 6.0的缓冲液中相对酶活力达到最高，且如果降低pH，其相对酶活力迅速下降。将mgLPMO10置于其具有较好酶活力(即pH分别为5.0、6.0、7.0、8.0)的缓冲液中，在60 ℃孵育一定时间，探究其pH稳定性。结果如图6(b)所示，mgLPMO10在pH 6.0的缓冲液中的相对酶活力保持最好，孵育1 h后能够保持85%的相对酶活力；pH过高或过低都会导致酶活力的迅速降低。因此，后续试验选择在pH 6.0条件下进行反应。



(a) 不同温度下mgLPMO10的相对酶活力



(b) 不同温度下mgLPMO10的稳定性

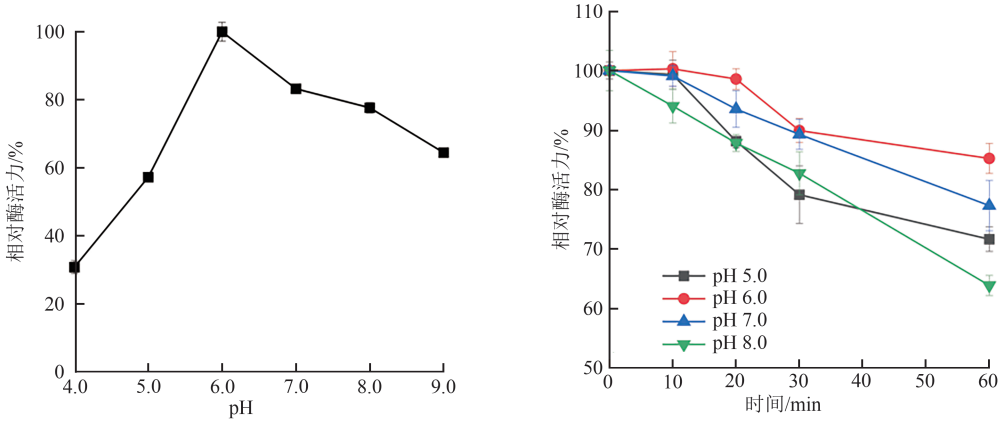
图5　mgLPMO10的最适温度及温度稳定性

Fig. 5　Optimal temperature and thermal stability of mgLPMO10

2.4.3　金属离子及表面活性剂对酶活力的影响

LPMO是一种依赖Cu^{2+}的酶，其活性中心包含单个铜离子，在与$CuSO_4$孵育后活性大幅增加[15]，在此基础上探究其他金属离子或表面活性剂对mgLPMO10酶活力的影响。将不同金属离子或表面活性剂与mgLPMO10孵育后检测其酶活力，结

果如图 7 所示。结果表明，添加了 Ba^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}孵育后，mgLPMO10 的相对酶活力均有所提升，其中 Mn^{2+}对其相对酶活力的提升最为明显，相比于对照组提升了 75%；而添加 Zn^{2+}孵育后，mgLPMO10 的相对酶活力下降，仅剩 76%。表面活性剂方面，PEG-6000 能够为 mgLPMO10 提升 22% 的相对酶活力，而加入 SDS 后，mgLPMO10 的相对酶活力迅速下降，因为在 SDS 作用下，蛋白质的氢键和疏水相互作用被破坏，导致结构不稳定[38]。综上所述，在应用 mgLPMO10 时，可将其提前与 Mn^{2+}孵育。Mn^{2+}可作为该酶的激活剂，在反应前提升其酶活力。



(a) 不同pH条件下mgLPMO10的相对酶活力　(b) 不同pH条件下mgLPMO10的稳定性

图 6　mgLPMO10 的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 6　Optimal pH and pH stability of mgLPMO10

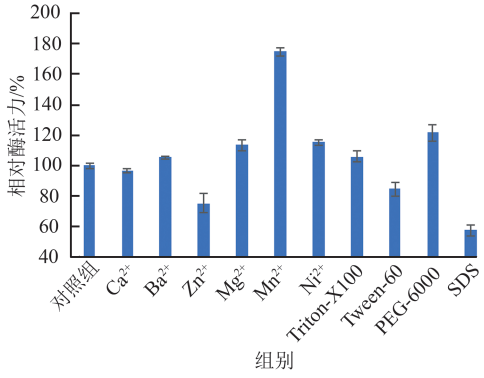


图 7　不同金属离子和表面活性剂对 mgLPMO10 酶活力的影响

Fig. 7　Effects of different metal ions and surfactants on enzyme activity of mgLPMO10

2.5　与嗜热内切葡聚糖酶高温协同水解纤维素

2.5.1　协同 *Tn*CelB 或 *Dt*CelB 水解 PASC

LPMO 是一类纤维素酶辅助酶，可协助其他纤维素酶降解木质纤维素。其主要作用是以氧化断裂糖苷键的方式降解纤维素的结晶区，使纤维素结构松散。为探究 LPMO 与嗜热内切葡聚糖酶在高温下水解木质纤维素的协同能力，以 IPTG 诱导方式分别表达嗜热内切葡聚糖酶 *Tn*CelB[39] 以及 *Dt*CelB，并对表达的酶进行纯化，用于后续的协同水解试验。

内切葡聚糖酶的水解产物为寡糖，因此用 DNS 法测定还原糖质量浓度并计算 mgLPMO10 与内切葡聚糖酶的协同作用。mgLPMO10 分别与 *Tn*CelB 和 *Dt*CelB 按不同摩尔比组合，然后与 PASC 在 70 ℃的分子杂交仪中反应 1 h，DNS 法测定结果如图 8 所示。mgLPMO10 单独与底物反应时，产生不了可被检测的还原糖（结果未展示），但当 mgLPMO10 与 *Tn*CelB 或 *Dt*CelB 按试验中各摩尔比组合后，反应产生的还原糖质量浓度都高于单独的 *Tn*CelB 或 *Dt*CelB 与底物反应产生的还原糖质量浓度。在与 *Tn*CelB 的组合中，当 mgLPMO10 的添加比例提高时，反应产生的还原糖质量浓度也增加。当 mgLPMO10 与 *Tn*CelB 摩尔比为 1∶1、5∶2、5∶1 时，还原糖质量浓度都为 1 g/L 左右，因此，mgLPMO10 与 *Tn*CelB 的摩尔比为 1∶1 是一个比较合适的比例，此时协同度为 123%。mgLPMO10 在与 *Dt*CelB 的组合中呈现出了相同的趋势，当两者摩尔比为 1∶1 时，还原糖质量浓度为 0.66 g/L，协同度达到 138%。这可能的原因是：在短时间内，*Dt*CelB 单独水解 PASC 的效率较低，mgLPMO10 辅助氧化断裂 C-4 键后，底物暴露度显著增加，为内切酶提供了更多可识别和切割的

位点，从而在添加mgLPMO10后极大提升还原糖产量。相比之下，在反应的1 h内，*Tn*CelB本身对PASC具有较高的水解活性，mgLPMO10的协同提升幅度相对有限。

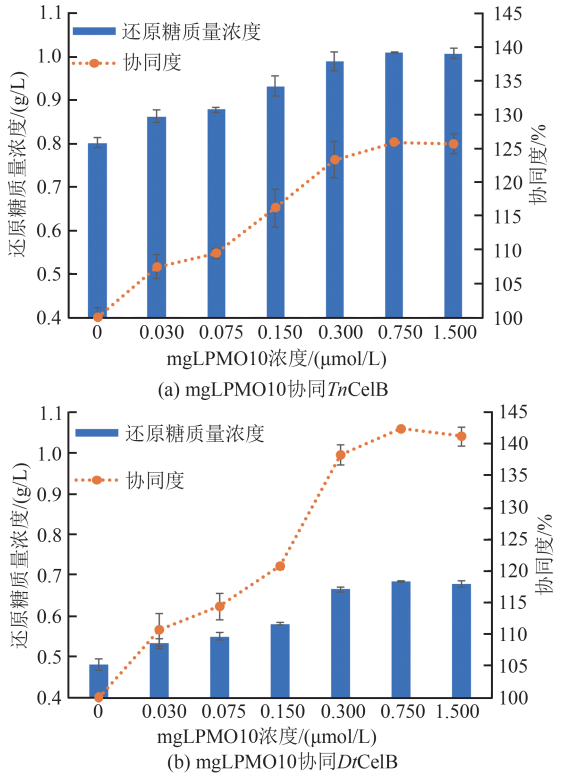


图8　不同浓度的mgLPMO10与嗜热内切葡聚糖酶的协同作用

Fig. 8　Synergistic effects of mgLPMO10 at different concentrations with thermophilic endoglucanases

2.5.2　协同*Tn*CelB或*Dt*CelB水解不同纤维素底物

mgLPMO10分别与*Tn*CelB和*Dt*CelB在70 ℃条件下协同水解PASC、MCC、CMC、滤纸以及预处理甘蔗渣24 h，通过测定还原糖质量浓度，探究添加mgLPMO10分别对*Tn*CelB和*Dt*CelB水解各种底物的影响。如图9所示，mgLPMO10与2种内切葡聚糖酶的组合对各种底物进行水解后，还原糖质量浓度都比未添加mgLPMO10的对照组要高。与不同纤维素底物反应的协同度不同，证明mgLPMO10对这些底物有着一定的底物特异性；此外，对PASC进行更长时间(24 h)的水解后，*Tn*CelB或*Dt*CelB与mgLPMO10的协同度与水解1 h的结果不一样：*Tn*CelB与mgLPMO10的协同度比*Dt*CelB高。可能的原因是：在长时间反应过程中，*Dt*CelB对PASC的催化性能有限，协同提升空间受限。而相比于*Dt*CelB，*Tn*CelB单独水解能力更强，催化效率更高，因此能够更好地响应mgLPMO10氧化修饰底物后产生的新切割点，从而实现产糖量的持续提升。综合2种内切葡聚糖酶与mgLPMO10协同水解各底物的协同度可以看出，无论针对哪一种底物，*Tn*CelB与mgLPMO10都具有更好的协同作用；尤为值得注意的是，在水解预处理甘蔗渣的试验中，2种酶表现出了较好的协同性，表明两者之间的协同效应对于真实底物具有良好的应用前景。

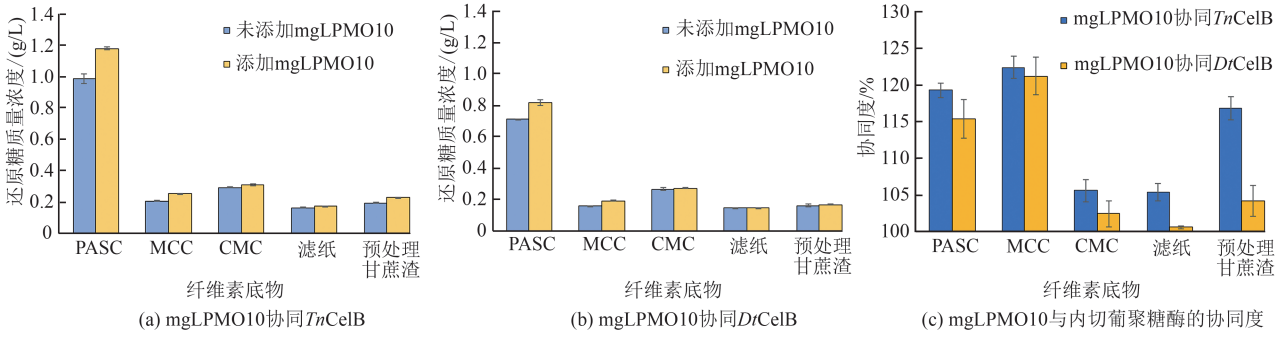


图9　mgLPMO10和内切葡聚糖酶水解不同纤维素底物的协同效应

Fig. 9　Synergistic effects of mgLPMO10 with endoglucanases for hydrolyzing different cellulose substrates

3　结论

在大肠杆菌BL21(DE3)中异源表达了来源于堆肥宏基因组的嗜热LPMO(mgLPMO10)，成功构建了分别带有2种不同信号肽的重组质粒并确定pelB信号肽更有利于mgLPMO10的表达。通过优化诱导条件，当在诱导表达时添加终浓度为0.50 mmol/L的IPTG，并在28 ℃下诱导18 h时，mgLPMO10的表达量最高，为12.9 mg/L。通过测定mgLPMO10的酶活力变化，确定其最适温度为70 ℃，最适pH为6.0，且在该条件下具有较好的稳

定性，最高酶活力为 25.5 U/g。除了 Cu^{2+} 外，对 mgLPMO10 酶活力提升最大的金属离子是 Mn^{2+}，可以提升其 75% 的酶活力；对 mgLPMO10 酶活力提升最大的表面活性剂是 PEG-6000，可以提升其 22% 的酶活力。mgLPMO10 分别与 2 种内切葡聚糖酶在 70 ℃下对纤维素底物进行协同水解时，均表现出良好的协同作用，协同度最高达到 138%，且在水解预处理甘蔗渣时，亦有一定的协同性，为高温水解木质纤维素的工业应用提供了重要的参考依据。

参考文献

[1] SOMERVILLE C，YOUNGS H，TAYLOR C，et al. Feedstocks for lignocellulosic biofuels[J]. Science，2010，329(5993)：790-792.

[2] LYND L R，LIANG X Y，BIDDY M J，et al. Cellulosic ethanol：status and innovation[J]. Current Opinion in Biotechnology，2017，45：202-211.

[3] CHANDEL A K，GARLAPATI V K，SINGH A K，et al. The path forward for lignocellulose biorefineries：bottlenecks，solutions，and perspective on commercialization[J]. Bioresource Technology，2018，264：370-381.

[4] 孙万里，陶文沂. 木质素与半纤维素对稻草秸秆酶解的影响[J]. 食品与生物技术学报，2010，29(1)：18-22.
SUN W L，TAO W Y. Effect of lignin and hemicellulose on enzymatic hydrolysis of cellulose from rice straw[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2010，29(1)：18-22.(in Chinese)

[5] BIDLACK J，MALONE M，BENSON R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants[J]. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science，1992，72：51-56.

[6] HANUS J，MAZEAU K. The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale[J]. Biopolymers，2006，82(1)：59-73.

[7] WAKARCHUK W W，BROCHU D，FOOTE S，et al. Proteomic analysis of the secretome of *Cellulomonas fimi* ATCC 484 and *Cellulomonas flavigena* ATCC 482[J]. PLoS One，2016，11(3)：e0151186.

[8] OBENG E M，ADAM S N N，BUDIMAN C，et al. Lignocellulases：a review of emerging and developing enzymes，systems，and practices[J]. Bioresources and Bioprocessing，2017，4(1)：16.

[9] MUSSATTO S I，DRAGONE G M. Biomass pretreatment，biorefineries，and potential products for a bioeconomy development[M]// MUSSATTO S I. Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery. Amsterdam：Elsevier，2016：1-22.

[10] LOPES A M，FERREIRA-FILHO E X，MOREIRA L R S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown[J]. Journal of Applied Microbiology，2018，125(3)：632-645.

[11] WARREN R A J，GERHARD B，GILKES N R，et al. A bifunctional exoglucanase-endoglucanase fusion protein[J]. Gene，1987，61(3)：421-427.

[12] O'NEILL G，GOH S H，WARREN R A J，et al. Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*[J]. Gene，1986，44(2/3)：325-330.

[13] DAMUDE H G，FERRO V，WITHERS S G，et al. Substrate specificity of endoglucanase A from *Cellulomonas fimi*：fundamental differences between endoglucanases and exoglucanases from family 6[J]. Biochemical Journal，1996，315(2)：467-472.

[14] MEINKE A，BRAUN C，GILKES N R，et al. Unusual sequence organization in CenB，an inverting endoglucanase from *Cellulomonas fimi*[J]. Journal of Bacteriology，1991，173(1)：308-314.

[15] VAAJE-KOLSTAD G，WESTERENG B，HORN S J，et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. Science，2010，330(6001)：219-222.

[16] VAAJE-KOLSTAD G，HOUSTON D R，RIEMEN A H K，et al. Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21[J]. Journal of Biological Chemistry，2005，280(12)：11313-11319.

[17] CANTAREL B L，COUTINHO P M，RANCUREL C，et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy)：an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research，2009，37：233-238.

[18] SABBADIN F，HEMSWORTH G R，CIANO L，et al. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion[J]. Nature Communications，2018，9(1)：756.

[19] COUTURIER M，LADEVÈZE S，SULZENBACHER G，et al. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation[J]. Nature Chemical Biology，2018，14(3)：306-310.

[20] QUINLAN R J，SWEENEY M D，LEGGIO L L，et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components[J]. PNAS，2011，108(37)：15079-15084.

[21] FORSBERG Z，MACKENZIE A K，SØRLIE M，et al. Structural and functional characterization of a conserved

pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases[J]. PNAS，2014，111(23)：8446-8451.

[22] ISAKSEN T，WESTERENG B，AACHMANN F L，et al. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides [J]. Journal of Biological Chemistry，2014，289(5)：2632-2642.

[23] BEESON W T，PHILLIPS C M，CATE J H D，et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases[J]. Journal of the American Chemical Society，2012，134(2)：890-892.

[24] FROMMHAGEN M，WESTPHAL A H，VAN BERKEL W J H，et al. Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monooxygenases[J]. Frontiers in Microbiology，2018，9：1080.

[25] JONES S M，TRANSUE W J，MEIER K K，et al. Kinetic analysis of amino acid radicals formed in H_2O_2-driven Cu^I LPMO reoxidation implicates dominant homolytic reactivity [J]. PNAS，2020，117(22)：11916-11922.

[26] CHALAK A，VILLARES A，MOREAU C，et al. Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates[J]. Biotechnology for Biofuels，2019，12：206.

[27] FRANDSEN K E H，LEGGIO L L. Lytic polysaccharide monooxygenases：a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes[J]. IUCrJ，2016，3(6)：448-467.

[28] CHYLENSKI P，BISSARO B，SØRLIE M，et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in enzymatic processing of lignocellulosic biomass[J]. ACS Catalysis，2019，9(6)：4970-4991.

[29] RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA U F，CANNELLA D，CAMPOS-GIORDANO R，et al. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO[J]. Green Chemistry，2015，17(5)：2896-2903.

[30] CHEN K X，ZHANG X，LONG L K，et al. Comparison of C4-oxidizing and C1/C4-oxidizing AA9 LPMOs in substrate adsorption，H_2O_2-driven activity and synergy with cellulase on celluloses of different crystallinity[J]. Carbohydrate Polymers，2021，269：118305.

[31] LI D C，LI A N，PAPAGEORGIOU A C. Cellulases from thermophilic fungi：recent insights and biotechnological potential[J]. Enzyme Research，2011，2011：308730.

[32] TURNER P，MAMO G，KARLSSON E N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining[J]. Microbial Cell Factories，2007，6：9.

[33] ABDEL-BANAT B M A，HOSHIDA H，ANO A，et al. High-temperature fermentation：how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2010，85(4)：861-867.

[34] TUVENG T R，JENSEN M S，FREDRIKSEN L，et al. A thermostable bacterial lytic polysaccharide monooxygenase with high operational stability in a wide temperature range[J]. Biotechnology for Biofuels，2020，13(1)：194.

[35] SIMMONS C W，REDDY A P，D'HAESELEER P，et al. Metatranscriptomic analysis of lignocellulolytic microbial communities involved in high-solids decomposition of rice straw[J]. Biotechnology for Biofuels，2014，7(1)：495.

[36] BRESLMAYR E，HANŽEK M，HANRAHAN A，et al. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase[J]. Biotechnology for Biofuels，2018，11：79.

[37] MUKASEKURU M R，HU J G，ZHAO X Q，et al. Enhanced high-solids fed-batch enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse with accessory enzymes and additives at low cellulase loading[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering，2018，6(10)：12787-12796.

[38] Wang K L，Huai S Y，Tan Z Q，et al. A first expression，purification and characterization of endo-β-1，3-glucanase from *Penicillium expansum*[J]. Journal of Fungi，2023，9(10)：961.

[39] BOK J D，YERNOOL D A，EVELEIGH D E. Purification，characterization，and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*[J]. Applied and Environmental Microbiology，1998，64(12)：4774-4781.

（责任编辑：周玥）