

裂解多糖单加氧酶活性检测方法的研究进展

沈洁如¹ 王素英^{*1} 张宏宇^{*1} 姜婷婷² 乔晨曦¹

¹(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

²(天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘 要 裂解多糖单加氧酶(Lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)是一类催化纤维素和几丁质等结晶多糖氧化裂解的铜离子依赖型的单加氧酶,可通过氧化断裂结晶区域的糖苷键提高糖苷水解酶对多糖的催化效率,在工业生物质转化过程中具有极强的应用潜力。LPMOs 活性检测方法在 LPMOs 的新酶开发、工程化改造和产业化应用等领域中具有重要意义。本文基于 LPMOs 的催化机理及其氧化裂解产物的多样性,对目前 LPMOs 活性常用检测方法进行了概述和比较,重点阐述了色谱-质谱联用法、比色法和荧光探针标记等方法的相关原理及其最新的应用研究进展,总结了不同方法的优缺点及应用范围,并对 LPMOs 活性检测方法的未来发展方向进行了展望。

关键词 生物质; 氧化裂解; 结晶多糖; 裂解多糖单加氧酶; 酶活性; 检测; 评述

纤维素和几丁质是自然界中储量居第一位和第二位的生物质资源,分别以葡萄糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)为单体,通过 β -1,4 糖苷键连接而成的直链高聚物^[1-3]。一直以来,这类结晶态多糖的降解和利用是实验室和工业领域研究的热点和难点^[4-6]。因纤维素和几丁质的分子内部及分子间存在氢键,可形成高度有序的结晶态结构,限制了糖苷水解酶的可及性^[7-8],阻碍多糖结晶区域的有效降解^[9]。然而,具有氧化裂解纤维素和几丁质等结晶区域特性的裂解多糖单加氧酶(Lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)的发现,为顽固多糖降解提供了新的方向^[10-14],在生物质转化和生物燃料工业等方面具有广阔的应用前景^[15-16]。

在碳水化合物活性酶数据库(www.cazy.org)中, LPMOs 归为辅助活性家族(Auxiliary activity family, AA),目前已有 AA9~11 和 AA13~16 共 7 个家族,其中, AA9 和 AA10 家族的 LPMOs 研究比较深入^[17-20]。AA9 家族的 LPMOs 主要源于真菌,作用于纤维素^[21-22]、可溶性纤维寡糖^[23]、木聚糖^[24]、半纤维素^[25]和淀粉^[26]等底物。AA10 家族的 LPMOs 主要源于细菌,具有纤维素、几丁质、木聚糖以及甘露聚糖降解活性^[10,14,27-28]。为探索各家族 LPMOs 的酶学特性及其催化机理,对 LPMOs 活性的检测至关重要。目前, LPMOs 活性的检测方法逐渐多样化,主要包括色谱-质谱法、比色法和荧光探针标记法等。其中,色谱-质谱法因其灵敏度高、可对反应产物进行定性和定量分析等特点,为解析 LPMOs 催化机制提供了重要手段^[21,29-31]; 比色法通过测定底物或产物的浓度,与酶活力建立量效关系,进而表征 LPMOs 活性,常应用于突变体的快速高通量筛选^[3]; 荧光探针标记法利用荧光探针对多糖底物进行标记,通过测定荧光值表征 LPMOs 活性^[32]。以上方法虽存在一定的局限性,但都有其适用范围,而各方法的有机结合可为 LPMOs 的新酶开发、催化机制研究及酶工程中突变体的快速筛选等提供有力的技术支撑,从而实现 LPMOs 在工业化生物质转化中的应用。

有关 LPMOs 活性检测的综述报道有许多^[3-4,33],但重点集中在 LPMOs 结构、催化机制、家族分类和底物特异性等方面的总结与评述,对检测方法的论述较少。本文评述了近 5 年 LPMOs 活性检测方法的研究进展,重点对色谱-质谱联用法、比色法和荧光探针标记法等的基本原理及其在 LPMOs 活性检测中的

2022-07-08 收稿; 2022-12-06 接受

天津市科技支撑重点项目(No. 20YFZCSN00630)、2021年天津市研究生科研创新项目(No. 2021YJSS297)和大学生创新创业训练计划项目(No. 202210069236)资助。

* E-mail: wsying@tjcu.edu.cn; zhanghongyu@tjcu.edu.cn

应用进行了梳理,总结了 LPMOs 活性检测方法的优缺点及适用范围,并对其未来发展趋势进行了展望。

1 基于色谱-质谱联用法检测 LPMOs 氧化产物

色谱-质谱联用法是基于样品的保留时间、碎片离子和峰面积分析其种类并计算含量,从而达到测定酶活力的目的^[34]。不同催化活性的 LPMOs 借助 O_2 (或 H_2O_2) 和电子,从多糖链 C1 或 C4 位置获取氢原子使之羟基化,导致糖苷键断裂和多糖链端氧化^[23,35],产生不同类型的氧化产物。如具有纤维素活性的 LPMOs 可以催化 C1 或 C4 位,也可以同时氧化二者^[32,36]产生 C1 位的醛糖酸和 C4 位的 4-醛基酮糖^[3,10,22],几丁质活性的 LPMOs 氧化 C1 位生成醛糖酸内酯,并水合形成醛糖酸^[10,36-37](图 1)。对不同类型的产物进行识别和量化所用的色谱-质谱法不同。目前,常用于检测 LPMOs 活性的色谱-质谱联用法主要包括高效阴离子交换色谱-脉冲电流检测法(High-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)、亲水作用液相色谱-质谱法(Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry, HILIC-MS)、多孔石墨化碳色谱-质谱法(Porous graphitized carbon chromatography-mass spectrometry, PGC-MS)和超高效液相色谱-质谱法(Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS)等,各检测方法可测定产物的分子量范围及优缺点见表 1。

1.1 HPAEC-PAD 方法

HPAEC 主要用于纤维素氧化产物糖醛酸的分析^[10,29],其中,在检测低聚合度产物时 PAD 的灵敏度高于 CAD^[29]。通过 HPAEC-PAD 分离纤维素降解产物,最先被分离出的是非氧化产物,其次是 C1 和 C4 氧化产物,最后是 C1/C4 双氧化产物^[46](图 2)。在碱性条件下, C1 氧化产物因带负电而被分离和检测^[40]。Westereng 等^[40]通过 HPAEC-PAD 耦合 ESI-MS 检测了 ScLPMO10C 的 C1 氧化产物,由于 C4 氧化产物在碱性条件下易发生化学修饰和互变异构^[23,47],使质谱无法检测到相应的分子质量。在可溶性产物的检测中,HPAEC-PAD 测定氧化寡糖的检出限(Limit of detection, LOD)可达 0.09~0.40 ng/injection,寡糖的 LOD 值为 0.34~0.66 ng/injection^[29]。因检测不溶性产物存在局限性,使测得的 LPMOs 整体活性低于真实值^[3]。

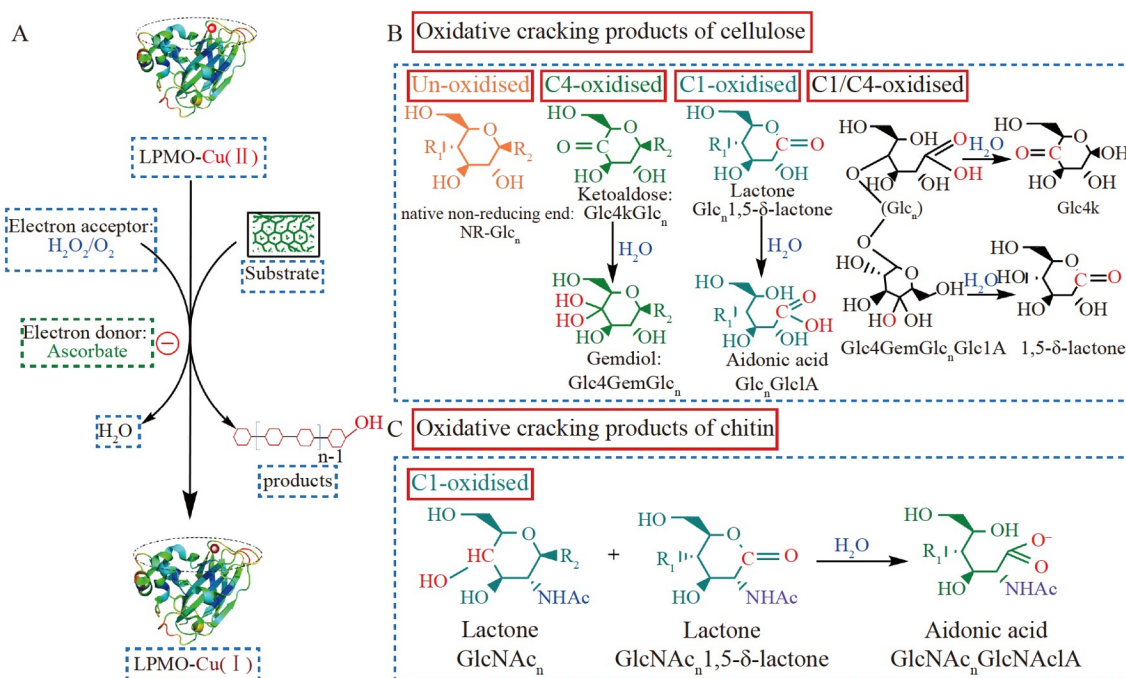


图1 裂解多糖单加氧酶(LPMOs)氧化裂解纤维素和几丁质的机理及其产物的形成: (A) LPMOs 催化机理^[30]; (B)纤维素氧化裂解产物^[32]; (C)几丁质氧化裂解产物^[10,37]

Fig.1 Mechanism of oxidative cracking of cellulose and chitin by lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) and the products: (A) Catalytic mechanism of LPMOs^[30]; (B) Products of cellulose oxidated^[32]; (C) Products of chitin oxidated^[10,37]

表1 色谱-质谱联用法在LPMOs活性检测中的应用

Table1 Application of chromatography-mass spectrometry in detection of LPMOs activities

检测方法 Detection method	酶名称 Enzyme name	底物 Substrate	氧化位点 Oxidation position	优势 Advantage	不足 Limitation	文献 Ref.
HPAEC-PAD	CelS2 (or LPMO10C); <i>Pa</i> LPMO9H; AA10; AA9	纤维素 Cellulose	C1	高分离度、高灵敏度 High separation and sensitivity 分离聚合度高产物 Separating species with high degree of polymerization 运行时间短(10 min) Short running time(10 min)	仅限于可溶性产物分析 Only for solubilized products 缺乏标准品 Lack of standard	[3,38-39]
HILIC-MS	CBP21(or LPMO10A) AA10	几丁质 Chitin	C1	高分离度、高灵敏度 High resolution and sensitivity	运行时间长(25 min) Long running time(25 min) 限于中性寡糖分析 Limitation to neutral oligosaccharides	[29]
PGC-LC-MS	<i>Nc</i> LPMO9C AA9	纤维素 Cellulose	C1/C4	可进行动力学分析 Available kinetic studies	运行时间长(41 min) Long running time(41 min)	[29,40]
UHPLC-MS	<i>Sc</i> LPMO10C AA10	几丁质 Chitin	C1	高分离度、高灵敏度 High resolution and sensitivity	运行时间长 35 min; Long running time(35 min)	[37]
RP-UHPLC-ESI-MS	<i>Mt</i> LPMO9C AA9	纤维素 Cellulose	C4	分析寡糖和 C4 氧化寡糖 Improve the analysis of native and C4-oxidized	还原标记困难 Challenging in reductive labeling	[41]
UHPLC-HILIC-MALDI-TOF MS	TrAA9A AA9	纤维素 Cellulose	C1/C4	分析 C4 氧化产物 Analysis of C4-oxidized	/	[31]
MALDI-TOF MS	CBP21; <i>Fg</i> LPMO9A AA10; AA9	几丁质 Chitin; 半纤维素 Hemicellulose; 淀粉 Starch	C1	灵敏度较高 Higher sensitivity	仅定性分析 Only for qualitative analysis	[3,42-45]

注(Note): HPAEC-PAD,高效阴离子交换色谱-脉冲电流检测法(High performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detector); HILIC-MS,亲水作用液相色谱-质谱法(Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry); PGC-LC-MS,多孔石墨化碳色谱-质谱法(Porous graphitized carbon chromatography- mass spectrometry); UHPLC-MS,超高效液相色谱-质谱法(Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry); RP-UHPLC-ESI-MS,反相高效液相色谱-电喷雾质谱(Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectroscopy); MALDI-TOF MS,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)。

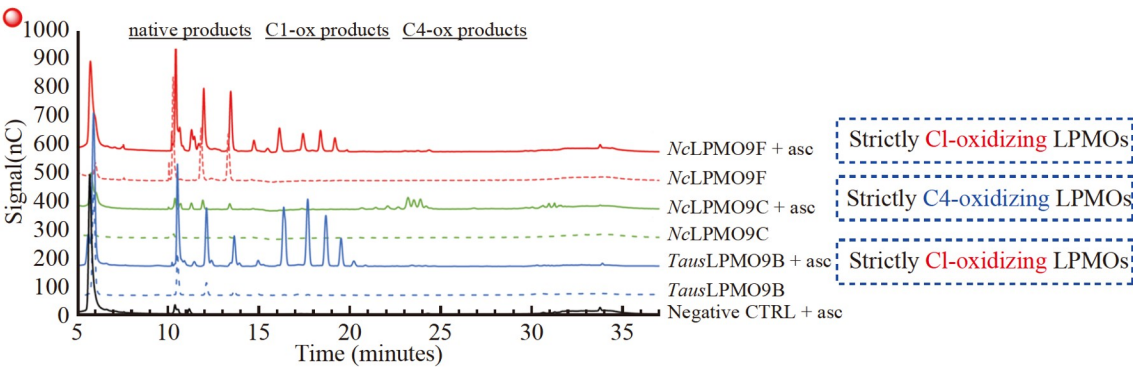


图2 不同来源的 LPMOs 作用于纤维素的氧化裂解产物^[46]

Fig.2 Oxidative cracking products of cellulose by LPMOs from different sources^[46]

Cannella 等^[48]通过水解酶处理 LPMOs 催化反应后的产物,测定葡萄糖和葡糖酸的含量,并计算被氧化纤维素的总量,间接测定不溶性产物的含量。Frommhagen 等^[24]采用相同的方法测定不溶物含量,得出在反应初期不溶性物所含的氧化寡糖的量高于可溶性部分。然而,通过此方式水解不溶性产物再进行分析时,

耗时较长且标准品不易获得,影响 LPMOs 活性检测的准确性。因此,该方法仅限于可溶性产物的分析。

1.2 HILIC-MS方法

HILIC 常作为中性寡糖的分析方法,如几丁质降解产物^[29,49]。Vaaje-Kolstad 等^[10]通过 HILIC 和 MALDI-TOF-MS 联用分析了源于粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的 CBP21 催化几丁质的反应产物壳寡糖,并解析了 CBP21 的催化机理。依据壳寡糖与几丁-醛酸 pH 值的不同,前者在中性流动相(乙腈-水)中保持稳定,后者因带电荷,可通过增加离子强度调节洗脱液的 pH 值实现壳寡糖和几丁-醛酸的分离^[50]。Westereng 等^[29]通过碱性条件电离醛酸以及高强度离子洗脱液平衡电荷消除互斥效应,并在 70% 乙腈条件下,用 HILIC 法检测氧化寡糖的 LOD 值范围为 33~113 ng/injection。由于 PAD 的准确性易受乙腈影响,因此 CAD 常与 HILIC-MS 结合检测。然而,该方法在分析聚合度大于 4 的寡糖和氧化寡糖时,其解析效果较差^[29],可通过升高柱温来提高 HILIC 色谱的分离效果以及改善峰形,并且能防止寡糖发生异构分离现象。

1.3 PGC-MS方法

鉴于上述 C4 氧化产物检测的局限性, Westereng 等^[40]结合 HILIC(WAX 柱)和 PGC 分离出 C1 和 C4 氧化产物,根据样品的极性特征,利用石墨色谱柱实现了纤维寡糖和氧化寡糖的分离^[51]。因醛糖酸和非氧化产物的电离常数(pK_a)值不同,在 PGC 色谱分离过程中,弱碱性条件(pH 8)的流动相使醛糖酸带负电(纤维二糖酸 $pK_a = 3.51$ ^[40]和 D-葡萄糖酸 $pK_a = 3.7$)^[3,29]。基于此, Westereng 等^[29]成功获得了醛糖酸的分离条件以及相同聚合度的裂解产物的分离,如 4-乙二醇醛糖和醛糖酸。对有相同保留时间的非氧化产物、C4 纤维糊精或醛酸及双氧化产物,可通过质谱分析或者 β -葡萄糖苷酶水解产物再次检测^[40]。PGC-MS 和 CAD 可直接兼容,并在低离子浓度的洗脱液下对 C4-纤维寡糖进行定量分析,其 LOD 可低至 45~66 ng/injection,满足动力学研究的要求^[40]。然而,该方法存在一定的局限性,由于 PGC 固定相对长链寡糖有强亲和力,即使在高洗脱强度下,聚合度 > 5 的中性纤维低聚糖也不能被洗脱^[29],因此 PGC 色谱只能分析聚合度 ≤ 5 的寡糖。

1.4 UHPLC-MS方法

Silva 等^[31]将 UHPLC(HILIC 柱)与 ESI-MS 联用检测聚合度为 1~5 的寡糖,结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进一步分析了聚合度在 3~10 之间的寡糖^[42],获得了完整的产物谱。然而,在质谱分析中, LPMOs 反应产物中氧化寡糖和寡糖的质量差为 m/z 16,与钠和钾加合物的质量差一致,而钠和钾加合物在大多数实验条件下存在,从而在质谱分析中会产生 m/z 值重叠,而 MALDI-TOF MS 的分辨率可达 40000,可以区分具有重叠 m/z 值的化合物^[50]。因此, MALDI-TOF MS 常作为一种定性评估 LPMOs 氧化产物的分析方法^[10,21,38,42-45,50],目前已成功分析了具有几丁质活性^[10,52-53]、半纤维素活性^[25,54]和淀粉活性^[26]的 LPMOs。此外, MALDI-TOF 还可以间接评估 LPMOs 的底物特异性。Jensen 等^[37]在探究底物特异性时将具有几丁质活性的 ScLPMO10C 突变为具有纤维素活性的 LPMOs,借助 UHPLC 和 MALDI-TOF MS 测定了可溶性壳寡糖的含量,以表征 ScLPMO10C 突变前后的氧化活性。

1.5 RP-UHPLC-MS方法

RP-UHPLC 分析 LPMOs 氧化产物的应用较少。Frommhagen 等^[41]利用还原性的标记物 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)与 C4 氧化寡糖标记,结合 RP-UHPLC 成功分离了 C4 寡糖。然而,寡糖的还原端与荧光团-胺复合物反应过程中形成的中间体不稳定,因此 Frommhagen 等^[41]在不添加还原剂的情况下,采用非缓冲洗脱液成功鉴定了寡糖和 C4 氧化寡糖。该方法补充了 C4 氧化产物的分析方法,相对于 PGC 方法,其优点是改进了对纤维寡糖和 C4 氧化寡糖的分析和鉴定^[3],并因使用了非缓冲洗脱液,对质谱灵敏度的影响较小。

在色谱-质谱联用法中, HPAEC-PAD 是 LPMOs 活性检测方法中灵敏度最高的方法,可以分析聚合度较高的氧化产物,但不能与质谱法直接兼容。与 HPAEC-PAD 相比, HILIC 和 PGC-LC 可与质谱法直接兼容从而实现高灵敏度分析。可以利用 HPAEC-PAD 结合 ESI-MS 分析 C1 氧化产物^[10,29]以及 PGC 和 CAD 分离解析 C4 氧化产物^[40],两者结合可以获得纤维素产物谱信息。几丁质氧化产物常以 HILIC 结合 MALDI-TOF MS 进行分析,从而表征 LPMOs 活性^[42]。在新酶挖掘及酶学特性的研究中,色谱-质谱联用

法仍是可靠的分析方法。

2 基于比色法的LPMOs活性的快速测定

色谱-质谱联用法虽具有高灵敏度的特点,但其仪器设备昂贵,使用范围受限。因此,开发快速、简便的LPMOs活性检测方法引起了更多的关注。随着LPMOs研究的不断深入,建立灵敏、快速的酶活检测方法在LPMOs的工程化改造过程中具有重要意义。因此,基于LPMOs催化反应特性的比色法得到了快速发展,传统的二硝基水杨酸法、高灵敏度的比色法如镍/邻苯二酚紫分析法、*D*-葡萄糖酸/*D*-葡萄糖酸- δ -内酯分析法以及基于 H_2O_2 产量的比色法等,被用于快速稳定地检测LPMOs活性。本节以氧化产物的类型为主线,结合方法应用和LPMOs活性检测的时间先后顺序,分别基于生成的还原糖产物、C1氧化产物以及 H_2O_2 等对基于比色法的LPMOs活性检测方法进行阐述。

2.1 二硝基水杨酸法

二硝基水杨酸法(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS)最初用于测定还原糖,通过还原糖与二硝基水杨酸在碱性条件下发生氧化还原反应,并在540 nm处测定反应产物的吸光度确定还原糖的含量^[55]。该方法早期用于LPMOs的活性测定,通过比较单一水解酶活性和经LPMOs协同作用的酶活性的差值判定LPMOs活性。Kim等^[56]结合高效液相色谱法和DNS法测定了葡萄糖和纤维二糖的含量,从而表征了CgAA9和纤维素酶的协同作用。该方法操作简单,但表征LPMOs活性的灵敏度较低。Deshavath等^[55]发现在呋喃糖存在的条件下,测得的还原糖含量远高于实际值,并且未检测到非还原性寡糖。因此,该方法适用于探究LPMOs的协同作用,而局限于混合产物中单糖的定量分析。

2.2 镍/邻苯二酚紫分析法

Wang等^[57]基于丙烯酸定量检测法开发了镍/邻苯二酚紫分析法用于LPMOs活性检测。该方法结合C1氧化产物醛糖酸呈负电荷的特点,并基于邻苯二酚紫(Pyrocatechol violet, PV)与金属阳离子如 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 等螯合形成金属离子-PV复合物在特定波长下有特征吸收,通过测定 Ni^{2+} -PV在650 nm处的吸光值,达到快速测定LPMOs活性的目的。该方法还可根据离子吸附/解吸附原理,收集产物与 Ni^{2+} 共孵育并加入PV,测定上清液中游离的 Ni^{2+} 含量,从而计算多糖表面产生羧酸根的量。Ni等^[58]应用 Ni^{2+} -PV法检测PcLPMO9D酶活性时发现高浓度的LPMOs对纤维素酶有影响。然而,该方法也存在局限性,在检测羧酸根含量时, Ni^{2+} -羧酸不遵循1:2的比例结合^[57],从而不能精准定量检测醛糖酸。因此,该方法适用于不同家族中LPMOs活性的比较,以及LPMO底物特异性的研究。

2.3 *D*-葡萄糖酸/*D*-葡萄糖酸- δ -内酯分析法

鉴于LPMOs催化反应底物形式的单一性,Keller等^[59]开发了一种快速测定微晶纤维素和预处理麦秸中葡萄糖酸的方法。利用糖苷水解酶处理*Ti*LPMO9E酶解产物,通过*D*-葡萄糖酸/*D*-葡萄糖酸- δ -内酯分析试剂盒(*D*-Gluconic acid/*D*-Glucono- δ -lactone assay)测定反应产物葡萄糖酸。利用葡萄糖酸激酶、NADP和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化将葡萄糖酸转化为核酮糖-5-磷酸和NADPH,通过测定NADPH在340 nm处的吸光值测定LPMOs活性。该方法测定葡萄糖酸的LOD值可低至0.27 mg/L,与HPAEC-PAD相比,其灵敏度可以实现对LPMOs反应产物的定量分析^[3,59]。然而,该方法在更改条件时需进行校准,以排除潜在的干扰。

2.4 基于 H_2O_2 的量间接检测LPMOs活性

上述检测方法均需借助氧化产物对LPMOs活性进行定量分析,而根据LPMOs的催化机理^[2],还可通过 H_2O_2 的量表征其活性。LPMOs活性中心的 Cu(II) 被还原成 Cu(I) ,与 O_2 结合形成活化的铜-氧复合物,使底物被氧化,进而使糖苷键断裂^[10,60],产生氧化产物和水(图3-b)。研究表明, H_2O_2 也作为LPMOs的动力学相关共底物^[61],即 Cu(I) 从底物中获取氢原子并使之羟基化^[61-62],进而实现糖苷键断裂(图3-c)。图3中b和c两种催化反应途径是以多糖为底物,其产生的氧化产物通过上述方法可以进行检测^[10,61];图3中的途径a是在没有多糖底物的条件下, Cu(I) 与 O_2 反应产生 H_2O_2 ^[2]。目前,通过测定 H_2O_2 的量表征LPMOs活性的方法有传统的Amplex red过氧化物酶偶联分析法、灵敏的2,6-二甲基苯酚比色法和准确度较高的还原酚酞分析法。

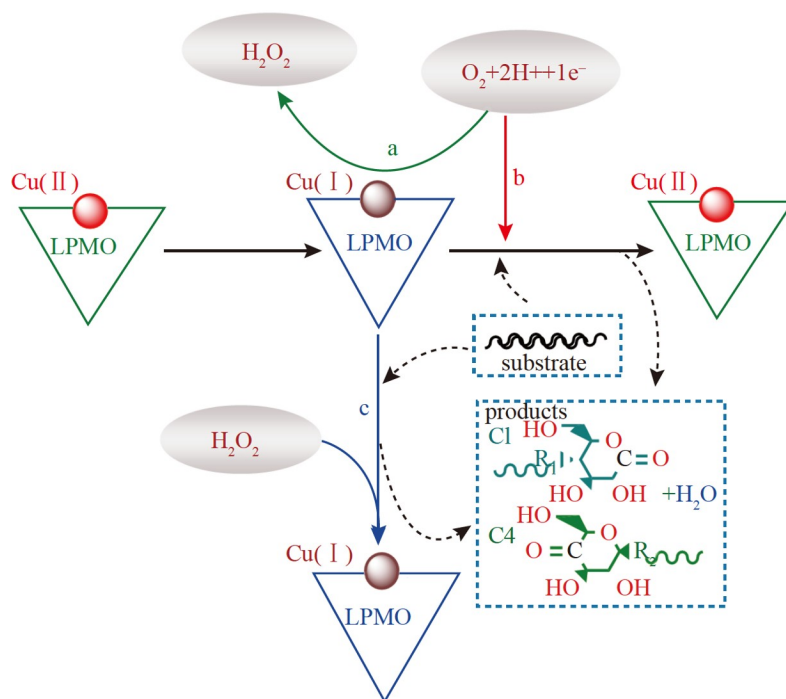


图3 LPMOs的催化机理: (a) 没有底物的催化反应^[2]; (b) O_2 为共底物^[10]; (c) H_2O_2 为共底物^[61]

Fig.3 Catalytic mechanism of LPMOs: (a) No substrate^[2]; (b) O_2 as co-substrate^[10]; (c) H_2O_2 as co-substrate^[61]

2.4.1 Amplex red过氧化物酶偶联分析法

Amplex red 过氧化物酶偶联分析法是经典的测定过氧化物及 H_2O_2 的分析方法,在过氧化物酶(HRP)催化下, H_2O_2 与 Amplex red 按 1:1 的比例生成红色高荧光的试卤灵(Resorufin)(图4)^[63]。通过分光光度法($\epsilon_{571}=58000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$)或荧光法($\lambda_{\text{Ex/Em}}=569/585 \text{ nm}$)测定其荧光强度^[63],间接测定 LPMOs 活性。该方法操作快速,已被广泛用于 LPMOs 活性评估和高通量筛选^[64]。Mutahir 等^[42]利用该方法通过检测 H_2O_2 的产率表征了 LPMOs 活性。Limsakul 等^[28]通过 Amplex®Red 过氧化氢/过氧化物酶检测试剂盒测定了 LPMOs 活性, H_2O_2 的浓度在 $0.1\sim 2 \mu\text{mol/L}$ 范围内与荧光信号响应呈线性关系,并且当 LPMOs 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时,曲线拟合较好($R^2=0.99$)^[63]。然而,该方法只能精准测定浓度在 $20\sim 574 \text{ mg/L}$ 范围内的 LPMOs^[65],并且其检测环境需要避免金属离子的干扰,如游离 Cu^{2+} 的存在可能导致假阳性结果^[54]。

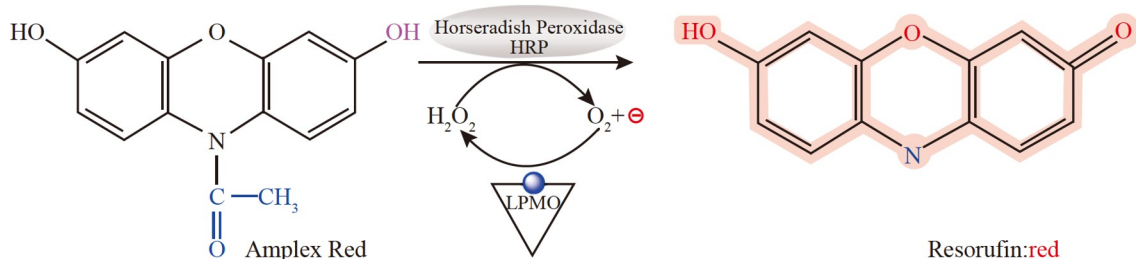
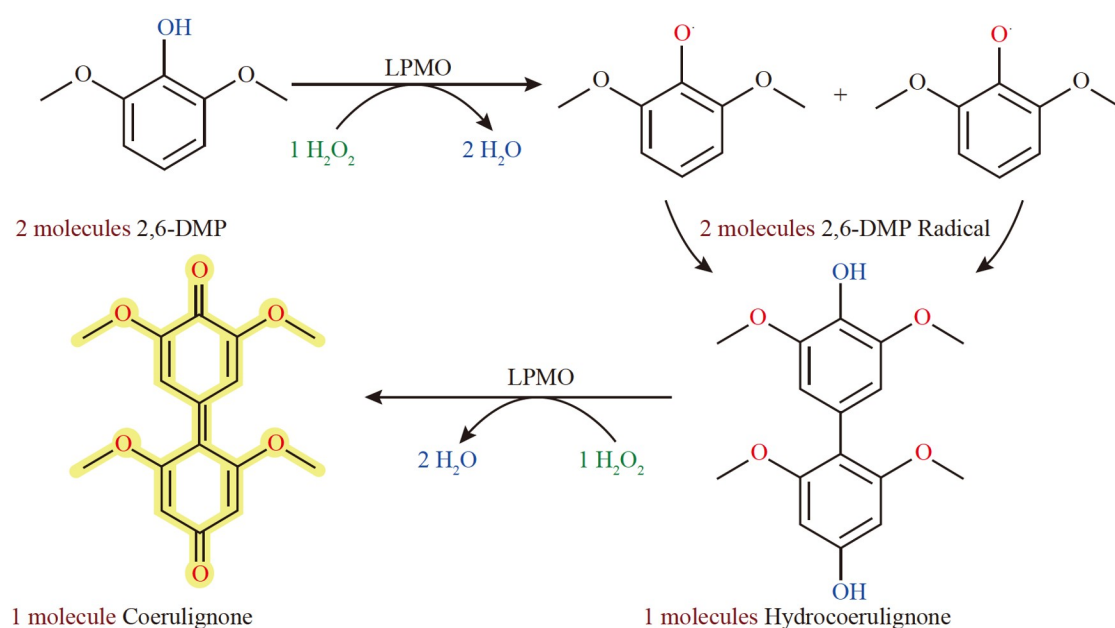


图4 Amplex red 过氧化物酶偶联法的原理^[63]

Fig.4 Principle of Amplex red peroxidase-coupled assay^[63]

2.4.2 2,6-二甲基苯酚比色法

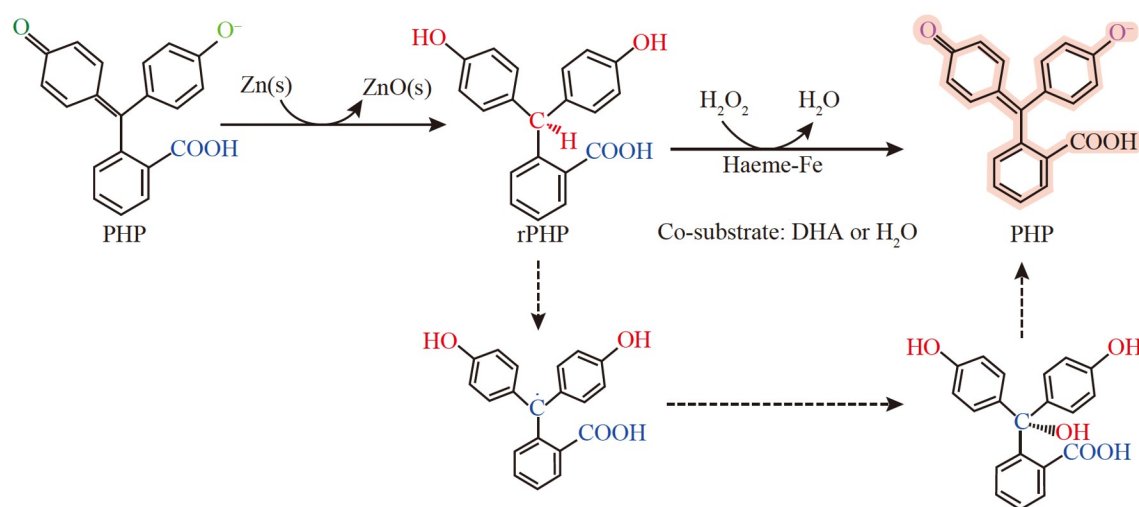
Breslmayer 等^[65,66]开发了 2,6-二甲基苯酚(2,6-Dimethoxyphenol, 2,6-DMP)比色法,并用于快速评估 LPMOs 活性。LPMOs 将两分子的 2,6-DMP 氧化为两分子的 2,6-DMP 自由基,因自由基不稳定而自发聚合生成氯化木酚酮(Hydrocoerulignone),最后经 LPMOs 氧化形成显色产物木质素(Coerulignone),根据木质素在 469 nm 处的特征吸收峰表征 LPMOs 活性(图5)^[65]。该方法快速、简便,已被用于裂解纤维素和几

图5 2,6-二甲氧基苯酚(2,6-DMP)比色法的原理^[65]Fig.5 Principle of 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) assay^[65]

丁质的 LPMOs 活性测定,以及 LPMOs 表达和纯化过程中结合常数或热稳定性的测定^[34,67-69]。2,6-DMP 比色法定量 LPMOs 的浓度可达 0.5~50 mg/L^[65],与 Amplex red 过氧化物酶偶联分析法相比,其灵敏度更高。然而,在酸性缓冲液中,该方法的灵敏度受限。因此, Breslmayr 等^[66]在此基础上进行了改进,以氢化木酚酮为底物测定 LPMOs 活性。改进后的方法适用于 pH 4~8 的缓冲液环境,并且可以进行准确测定。

2.4.3 还原酚酞分析法

Brander 等^[70]基于 Kastle-Meyer 实验原理开发了还原酚酞分析法,并用于 LPMOs 活性的快速检测。以 H_2O_2 为共底物,通过 LPMOs 氧化将无色的还原酚酞(Reduced phenolphthalein, rPHP)氧化成酚酞(PHP)(图 6),通过测定 PHP 在 552 nm 处的吸光值间接测定 LPMOs 的活性,以 TaAA9A 为例,其活性检测的 LOD 低至 15 nmol/L^[70]。Brander 等^[70]还发现,以脱氢抗坏血酸(DHA)为还原剂时,PHP 更容易定量。然而,抗坏血酸作为还原剂时不能促进 rPHP 氧化,反而会引起反应中酶的降解。因此,该分析方法仅限于 DHA 的反应中 LPMOs 活性评估^[70]。与上述两种比色法相比,该方法因 rPHP 的高稳定性和耐受

图6 还原酚酞分析法的原理^[70]Fig.6 Principle of reduced phenolphthalein assay^[70]

性使得 LPMOs 活性测定更准确。

2.5 偶氮木葡聚糖分析

偶氮木葡聚糖分析法(Azo-Xyloglucan Assay)最初应用于纤维素酶中内切葡聚糖酶^[71]的活性检测及木聚糖特异性评估^[72]。将可溶性显色底物偶氮木聚糖与染料雷马氏亮蓝(Remazol brilliant blue R, RBBR)混合,利用纤维素酶水解产生染色寡糖,测定染色寡糖在 590 nm 处的吸光值表征内切葡聚糖酶的酶活性^[72]。基于此,Calderaro 等^[3]利用 LPMOs 反应中还原剂的作用,通过测定还原剂添加前后上清液颜色变化定量分析 LPMOs 的活性。该方法由于缺乏相应的实验数据,尚无法评估其优缺点,因此还未得到广泛应用。

上述比色法均可表征 LPMOs 活性,各种比色法灵敏度虽有差异,但在相应的应用范围中能够实现精准测定。如 DNS 法的灵敏度虽低但可粗略计算酶活性,广泛用于 LPMOs 与水解酶协同作用的活性检测,镍/邻苯二酚紫分析法及 D-葡萄糖酸/D-葡萄糖酸- δ -内酯分析法与之相比灵敏度有所提升。在 H₂O₂ 分析方法中,以 Amplex red 过氧化物酶偶联分析法应用范围最广,而 2,6-DMP 比色法灵敏度较高。在酶工程改造研究中,比色法可为突变体快速且稳定的筛选提供技术支撑。

3 基于荧光探针标记的LPMOs活性检测

除上述色谱-质谱联用法和比色法之外,还有特异性强的荧光探针标记法,通过测定荧光值表征 LPMOs 活性,目前用于 LPMOs 活性测定的探针标记主要有以下 3 种。

3.1 SYTO-62探针标记

SYTO-62 探针标记法最初是测定聚合物表面的羧基,经 Eibinger 等^[12]调整改造后,用荧光探针 SYTO-62 标记纤维素后与 LPMOs 共孵育,借助激光共聚焦显微镜连续监测纤维素结晶区域表面的氧化位点,确定反应产生羧基的量表征 LPMOs 活性,最后证明源于粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 的 NcLPMO9F 在催化纤维素裂解时产生了多个氧化位点。

3.2 EDAC荧光标记

EDAC 荧光标记是基于 1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(EDAC)将醛酸活化,再由胺基荧光团 7-氨基-1,3-萘二磺酸(ANDA)胺化,形成的共轭产物在 450 nm 处具有荧光吸收^[73]。Vuong 等^[32]通过将水溶性荧光团共价连接到纤维素氧化部位,再与 LPMOs 共孵育,测定荧光吸收值反映 PcLPMO9D 活性。该方法常用于评估 C1 位氧化 LPMOs 活性,并与 HPAEC 色谱法结合可以获得有关 LPMOs 氧化产物的更详细信息。

3.3 ANTS荧光标记

ANTS 荧光标记法是一种基于荧光团 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)将反应产物胺化而产生还原端,再经聚丙烯酰胺凝胶电泳获得多糖结构的分析方法,即碳水化合物凝胶电泳(PAGE)分析法。该方法通过测定探针标记氧化产物的荧光值表征 LPMOs 活性,如 Quinlan 等^[21]利用 ANTS 荧光标记并结合 MALDI-TOF-MS 分析了源于 *Thermoascus aurantiacus* 的 TaGH61A 降解纤维素产物,并比较 Cu²⁺对 TaGH61A 催化活性的影响。Frandsen 等^[74]应用该方法测定了源于 *Lentinus similis* 的氧化产物纤维二糖和纤维三糖,表征了 LsLPMO9 活性,并测定了酶催化反应的动力学参数。

4 其它方法

除此之外,结合 LPMOs 催化反应中电子受体如氧气的消耗量、电子供体如抗坏血酸的消耗量均可间接测定 LPMOs 的催化活性。Gusakov 等^[75]基于耗氧率测量的方法,使用带有高灵敏度荧光传感器的 Seahorse XFp 分析仪,监测了 3 种真菌 LPMOs 对无定形区域纤维素的氧化活性。Yu 等^[76]利用 LPMOs 外部电子供体的抗坏血酸的消耗量表征源于 *Bacillus atrophaeus* 的 BatLPMO10 的活性。此外,根据磷酸溶胀纤维素(PASC)不透明的特征, LPMOs 裂解氧化 PASC 使之溶解,通过检测其光密度变化表征 LPMOs 活性, Hansson 等^[77]利用该特性测定 H_jLPMO9A 与之突变体氧化裂解纤维素活性,得出 H_jLPMO9A 突变体对纤维素裂解活性下降 50%。

5 结论与展望

LPMOs 氧化裂解产物的组成各异, 针对可溶性产物, 色谱-质谱法及比色法均可实现精准测定, 但在分析不溶性产物时存在局限性。荧光标记法更适于不溶性产物的分析, 从而可以实现 LPMO 整体活性的检测。随着 LPMOs 研究的不断深入, 自然界中越来越多的 LPMOs 被发现, 因此需要发展精确且快速的酶活性测定方法, 为其酶学特性的研究提供关键支持。随着计算机辅助设计技术的高速发展, 蛋白质工程对 LPMOs 的改造将成为研究热点, 高通量的 LPMOs 活性筛选方法不但可以加速突变体筛选效率, 也为 LPMOs 的产业化进程奠定了坚实的基础。因此, LPMOs 酶活性的测定方法需要不断地开发和創新, 以期研发适用性更广、操作更快速、精度更高的检测方法, 为解决当前方法的局限性提供新思路和新途径。

References

- [1] KAUR S, DHILLON G S. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2015, 35(1): 44-61.
- [2] TANDRUP T, FRANDSEN K E H, JOHANSEN K S, BERRIN J G, LO LEGGIO L. *Biochem. Soc. Trans.*, 2018, 46(6): 1431-1447.
- [3] CALDERARO F, BEVERS L E, VAN DEN BERG M A. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1098.
- [4] SUN Xiao-Bao, WAN Jia-Xin, CAO Jia-Wen, SI Yue-Xiu, WANG Qian. *Chin. J. Biotechnol.*, 2018, 34(2): 177-187.
孙小宝, 万嘉欣, 曹佳雯, 斯越秀, 王谦. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 177-187.
- [5] LI J, SOLHI L, GODDARD-BORGER E D, MATHIEU Y, WAKARCHUK W W, WITHERS S G, BRUMER H. *Biotechnol. Biofuels*, 2021, 14(1): 29.
- [6] ELIEH ALI KOMI D, SHARMA L, DELA CRUZ C S. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2018, 54(2): 213-223.
- [7] HIMMEL M E, DING S Y, JOHNSON D K, ADNEY W S, NIMLOS M R, BRADY J W, FOUST T D. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807.
- [8] MADLAND E, FORSBERG Z, WANG Y, LINDORFF-LARSEN K, NIEBISCH A, MODREGGER J, EIJSINK V G H, AACHMANN F L, COURTADE G. *J. Biol. Chem.*, 2021, 297(4): 101084.
- [9] FENG Yu-He, SUN Xiao-Bao, CHEN Shu-Xin, ZHANG Hui-En, WANG Qian. *Acta Microbiol. Sin.*, 2020, 60(1): 183-199.
冯玉和, 孙小宝, 陈书昕, 张慧恩, 王谦. *微生物学报*, 2020, 60(1): 183-199.
- [10] VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, HORN S J, LIU Z, ZHAI H, SØRLIE M, EIJSINK V G H. *Science*, 2010, 330(6001): 219-222.
- [11] VERMAAS J V, CROWLEY M F, BECKHAM G T, PAYNE C M. *J. Phys. Chem. B*, 2015, 119(20): 6129-6143.
- [12] EIBINGER M, GANNER T, BUBNER P, ROŠKER S, KRACHER D, HALTRICH D, LUDWIG R, PLANK H, NIDETZKY B. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289(52): 35929-35938.
- [13] HORN S J, VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, EIJSINK V G. *Biotechnol. Biofuels*, 2012, 5(1): 45.
- [14] FORSBERG Z, VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, BUNAES A C, STENSTRØM Y, MACKENZIE A, SØRLIE M, HORN S J, EIJSINK V G H. *Protein Sci.*, 2011, 20(9): 1479-1483.
- [15] JOHANSEN K S. *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, 44(1): 143-149.
- [16] MÜLLER G, CHYLENSKI P, BISSARO B, EIJSINK V G H, HORN S J. *Biotechnol. Biofuels*, 2018, 11(1): 209.
- [17] LEVASSEUR A, DRULA E, LOMBARD V, COUTINHO P M, HENRISSAT B. *Biotechnol. Biofuels*, 2013, 6(1): 41.
- [18] VU V V, BEESON W T, SPAN E A, FARQUHAR E R, MARLETTA M A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, 111(38): 13822-13827.
- [19] FILIATRAULT-CHASTEL C, NAVARRO D, HAON M, GRISEL S, HERPOEL-GIMBERT I, CHEVRET D, FANUEL M, HENRISSAT B, HEISS-BLANQUET S, MARGEOT A, BERRIN J G. *Biotechnol. Biofuels*, 2019, 12(1): 55.
- [20] COUTURIER M, LADEVÈZE S, SULZENBACHER G, CIANO L, FANUEL M. *Nat. Chem. Biol.*, 2018 14(3): 306-310.
- [21] QUINLAN R J, SWEENEY M D, LO LEGGIO L, OTTEN H, POULSEN J C N, JOHANSEN K S, KROGH K B R M, JØRGENSEN C I, TOVBORG M, ANTHONSEN A, TRYFONA T, WALTER C P, DUPREE P, XU F, DAVIES G J, WALTON P H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108(37): 15079-15084.
- [22] BEESON W T, PHILLIPS C M, CATE J H D, MARLETTA M A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(2): 890-892.
- [23] ISAKSEN T, WESTERENG B, AACHMANN F L, AGGER J W, KRACHER D, KITTL R, LUDWIG R, HALTRICH D, EIJSINK V G H, HORN S J. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289(5): 2632-2642.
- [24] FROMMHAGEN M, SFORZA S, WESTPHAL A H, VISSER J, HINZ S W A, KOETSIER M J, VAN BERKEL W J H, GRUPPEN H, KABEL M A. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8(1): 101.

- [25] AGGER J W, ISAKSEN T, VÁRNAI A, VIDAL-MELGOSA S, WILLATS W G T, LUDWIG R, HORN S J, EIJSINK V G H, WESTERENG B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, 111(17): 6287-6292.
- [26] LO LEGGIO L, SIMMONS T J, POULSEN J C N, FRANDSEN K E H, HEMSWORTH G R, STRINGER M A, VON FREIESLEBEN P, TOVBORG M, JOHANSEN K S, DE MARIA L, HARRIS P V, SOONG C L, DUPREE P, TRYFONA T, LENFANT N, HENRISSAT B, DAVIES G J, WALTON P H. *Nat. Commun.*, 2015, 6(1): 5961.
- [27] CORRÊA T L R, JÚNIOR A T, WOLF L D, BUCKERIDGE M S, DOS SANTOS L V, MURAKAMI M T. *Biotechnol. Biofuels*, 2019, 12(1): 117.
- [28] LIMSAKUL P, PHITSUWAN P, WAEONUKUL R, PASON P, TACHAAPAUKOON C, POOMPUTSA K, KOSUGI A, SAKKA M, SAKKA K, RATANAKHANOKCHAI K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, 104(17): 7533-7550.
- [29] WESTERENG B, AGGER J W, HORN S J, VAAJE-KOLSTAD G, AACHMANN F L, STENSTRØM Y H, EIJSINK V G H. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1271(1): 144-152.
- [30] COURTADE G, CIANO L, PARADISI A, LINDLEY P J, FORSBERG Z, SØRLIE M, WIMMER R, DAVIES G J, EIJSINK V G H, WALTON P H, AACHMANN F L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, 117(32): 19178-19189.
- [31] SILVA C O G, TEIXEIRA T S, RODRIGUES K B, SOUZA A A, MONCLARO A V, MENDES T D, RIBEIRO J A A, GONÇALVES DE SIQUEIRA F, FÁVARO L C L, ABDELNUR P V. *Anal. Methods*, 2020, 12(2): 149-161.
- [32] VUONG T V, LIU B, SANDGREN M, MASTER E R. *Biomacromolecules*, 2017, 18(2): 610-616.
- [33] GUO Xiao, AN Ya-Jing, CHAI Cheng-Cheng, JIANG Lu-Ying, LU Fu-Ping, LIU Fu-Feng, DAI Yu-Jie. *Microbiol. China*, 2020, 47(7): 2309-2320.
郭宵, 安亚静, 柴成程, 蒋露莹, 路福平, 刘夫锋, 戴玉杰. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2309-2320.
- [34] YU Xiao-Nan, LIU Lin, QU Ming-Bo, YANG Qing. *Acta Microbiol. Sin.*, 2022, 62(1): 189-199.
于晓男, 刘霖, 屈明博, 杨青. *微生物学报*, 2022, 62(1): 189-199.
- [35] PHILLIPS C M, BEESON IV W T, CATE J H, MARLETTA M A. *ACS Chem. Biol.*, 2011, 6(12): 1399-1406.
- [36] CHRISTENSEN I A, EIJSINK V G H, AACHMANN F L, COURTADE G. *Biomol. NMR Assignments*, 2021, 15(1): 79-84.
- [37] JENSEN M S, KLINKENBERG G, BISSARO B, CHYLENSKI P, VAAJE-KOLSTAD G, KVITVANG H F, NÆRDAL G K, SLETTA H, FORSBERG Z, EIJSINK V G H. *J. Biol. Chem.*, 2019, 294(50): 19349-19364.
- [38] WESTERENG B, LOOSE J S M, VAAJE-KOLSTAD G, AACHMANN F L, SØRLIE M H, EIJSINK V G H. *Methods Mol. Biol.*, 2018, 1796: 219-246.
- [39] FANUEL M, GARAJOVA S, ROPARTZ D, MCGREGOR N, BRUMER H, ROGNIAUX H, BERRIN J G. *Biotechnol. Biofuels*, 2017, 10(1): 63.
- [40] WESTERENG B, ARNTZEN M Ø, AACHMANN F L, VÁRNAI A, EIJSINK V G H, AGGER J W. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1445: 46-54.
- [41] FROMMHAGEN M, VAN ERVEN G, SANDERS M, VAN BERKEL W J H, KABEL M A, GRUPPEN H. *Carbohydr. Res.*, 2017, 448: 191-199.
- [42] MUTAHIR Z, MEKASHA S, LOOSE J S M, ABBAS F, VAAJE - KOLSTAD G, EIJSINK V G H, FORSBERG Z. *FEBS Lett.*, 2018, 592(15): 2562-2571.
- [43] RIEDER L, PETROVIĆ D, VÄLJAMÄE P, EIJSINK V G H, SØRLIE M. *ACS Catal.*, 2021, 11(18): 11685-11695.
- [44] NEKIUNAITE L, PETROVIĆ D M, WESTERENG B, VAAJE-KOLSTAD G, HACHEM M A, VÁRNAI A, EIJSINK V G H. *FEBS Lett.*, 2016, 590(19): 3346-3356.
- [45] PASPALIARI D K, LOOSE J S M, LARSEN M H, VAAJE-KOLSTAD G. *FEBS J.*, 2015, 282(5): 921-936.
- [46] CALDERARO F, KESER M, AKEROYD M, BEVERS L E, EIJSINK V G H, VÁRNAI A, VAN DEN BERG M A. *Biotechnol. Biofuels*, 2020, 13(1): 195.
- [47] MÜLLER G, VÁRNAI A, JOHANSEN K S, EIJSINK V G H, HORN S J. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8(1): 187.
- [48] CANNELLA D, MÖLLERS K B, FRIGAARD N U, JENSEN P E, BJERRUM M J, JOHANSEN K S, FELBY C. *Nat. Commun.*, 2016, 7(1): 11134.
- [49] BUSZEWSKI B, NOGA S. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402(1): 231-247.
- [50] WESTERENG B, ARNTZEN M Ø, AGGER J W, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK V G H. *Methods Mol. Biol.*, 2017, 1588: 71-92.
- [51] PEREIRA L. J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2010, 31(11-12): 1687-1731.
- [52] FORSBERG Z, RØHR Å K, MEKASHA S, ANDERSSON K K, EIJSINK V G H, VAAJE-KOLSTAD G, SØRLIE M. *Biochemistry*, 2014, 53(10): 1647-1656.
- [53] LOOSE J S M, FORSBERG Z, FRAAIJE M W, EIJSINK V G H, VAAJE-KOLSTAD G. *FEBS Lett.*, 2014, 588(18): 3435-3440.
- [54] PETROVIĆ D M, VÁRNAI A, DIMAROGONA M, MATHIESEN G, SANDGREN M, WESTERENG B, EIJSINK V G H. *J. Biol. Chem.*, 2019, 294(41): 15068-15081.

- [55] DESHAVATH N N, MUKHERJEE G, GOUD V V, VEERANKI V D, SASTRI C V. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 156: 180-185.
- [56] KIM I J, NAM K H, YUN E J, KIM S, YOUN H J, LEE H J, CHOI I G, KIM K H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99(20): 8537-8547.
- [57] WANG D, LI J, WONG A C Y, AACHMANN F L, HSIEH Y S Y. *Biotechnol. Biofuels*, 2018, 11(1): 215.
- [58] NI H, LI M, LI F, WANG L, XIE S, ZHANG X, YU H. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 161: 308-314.
- [59] KELLER M B, FELBY C, LABATE C A, PELLEGRINI V O A, HIGASI P, SINGH R K, POLIKARPOV I, BLOSSOM B M. *Biotechnol. Lett.*, 2020, 42(1): 93-102.
- [60] WALTON P H, DAVIES G J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2016, 31: 195-207.
- [61] BISSARO B, RØHR Å K, MÜLLER G, CHYLENSKI P, SKAUGEN M, FORSBERG Z, HORN S J, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK V G H. *Nat. Chem. Biol.*, 2017, 13(10): 1123-1128.
- [62] KUUSK S, BISSARO B, KUUSK P, FORSBERG Z, EIJSINK V G H, SØRLIE M, VÄLJAMÄE P. *J. Biol. Chem.*, 2018, 293(2): 523-531.
- [63] KITTL R, KRACHER D, BURGSTALLER D, HALTRICH D, LUDWIG R. *Biotechnol. Biofuels*, 2012, 5(1): 79.
- [64] CROUCH L I, LABOUREL A, WALTON P H, DAVIES G J, GILBERT H J. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(14): 7439-7449.
- [65] BRESLMAYR E, HANŽEK M, HANRAHAN A, LEITNER C, KITTL R, ŠANTEK B, OOSTENBRINK C, LUDWIG R. *Biotechnol. Biofuels*, 2018, 11(1): 79.
- [66] BRESLMAYR E, DALY S, POŽGAJČIĆ A, CHANG H, REZIĆ T, OOSTENBRINK C, LUDWIG R. *Biotechnol. Biofuels*, 2019, 12(1): 283.
- [67] AGRAWAL D, BASOTRA N, BALAN V, TSANG A, CHADHA B S. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2020, 191(2): 463-481.
- [68] ZHANG R, LIU Y, ZHANG Y, FENG D, HOU S, GUO W, NIU K, JIANG Y, HAN L, SINDHU L, FANG X. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(14): 5739-5750.
- [69] FRITSCHÉ S, HOPSON C, GORMAN J, GABRIEL R, SINGER S W. *Biotechnol. Lett.*, 2020, 42(10): 1897-1905.
- [70] BRANDER S, LAUSTEN S, IPSEN J Ø, FALKENBERG K B, BERTELSEN A B, NØRHOLM M H H, ØSTERGAARD L H, JOHANSEN K S. *Biotechnol. Biofuels*, 2021, 14(1): 51.
- [71] VIANNA B A, KIMIE Y D, AKIRA U S, MAGNANI D T. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(9): 2261.
- [72] BAI S, DONG C, ZHU J, ZHANG Y, DAI H. *Plant Sci.*, 2015, 231: 11-19.
- [73] COURTADE G, L AACHMANN F. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, 1142: 115-129.
- [74] FRANDSEN K E H, SIMMONS T J, DUPREE P, POULSEN J C N, HEMSWORTH G R, CIANO L, JOHNSTON E M, TOVBORG M, JOHANSEN K S, VON FREIESLEBEN P, MARMUSE L, FORT S, COTTAZ S, DRIGUEZ H, HENRISSAT B, LENFANT N, TUNA F, BALDANSUREN A, DAVIES G J, LO LEGGIO L, WALTON P H. *Nat. Chem. Biol.*, 2016, 12(4): 298-303.
- [75] GUSAKOV A V, BULAKHOV A G, DEMIN I N, SINITSYN A P. *Carbohydr. Res.*, 2017, 452: 156-161.
- [76] YU M J, YOON S H, KIM Y W. *Enzyme Microb. Technol.*, 2016, 93-94: 150-156.
- [77] HANSSON H, KARKEHABADI S, MIKKELSEN N, DOUGLAS N R, KIM S, LAM A, KAPER T, KELEMEN B, MEIER K K, JONES S M, SOLOMON E I, SANDGREN M. *J. Biol. Chem.*, 2017, 292(46): 19099-19109.

Research Progress on Detection Methods of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Activities

SHEN Jie-Ru¹, WANG Su-Ying^{*1}, ZHANG Hong-Yu^{*1}, LOU Ting-Ting², QIAO Chen-Xi¹

¹(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

²(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Customs, Tianjin 300461, China)

Abstract Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are a class of copper ion-dependent monooxygenase, as a sort of industrial enzymes known for their catalytic degradation of recalcitrant polysaccharides, such as cellulose and chitin. LPMOs can improve the accessibility and hydrolysis efficiency of glycoside hydrolases to polysaccharide substrates by oxidizing and breaking the glycoside bonds in the crystalline region, showing strong application potential in the conversion of industrial biomass. The detection methods of LPMOs activities with high

