



CAZy-AA3家族酶及其在生物传感器中的应用研究进展*

张振宇 公维丽** 马耀宏 朱思荣 王丙莲 韩庆晔 陈彦儒

(齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 济南 250103)

摘要 碳水化合物活性酶数据库(CAZy)中位于“辅助活性”(auxiliary activities, AA)3家族的酶属于葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶大家族。它们以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作为辅酶,通过反应产物(H_2O_2 或对苯二酚)协助其他AA家族酶发挥作用,或辅助糖苷水解酶降解木质纤维素。根据结构序列相似性,AA3家族酶进一步细分为4个亚家族,包括AA3_1(纤维二糖脱氢酶)、AA3_2(芳醇氧化酶、葡萄糖氧化还原酶)、AA3_3(醇氧化酶)、AA3_4(吡喃糖氧化还原酶)。AA3家族酶因其独特的结构、广泛的用途,近几十年来受到人们的广泛关注。本文系统综述了CAZy-AA3家族酶来源、分子结构及改造,对部分AA3家族酶在生物传感器中的最新研究进展进行了重点综述,并对未来研究方向进行了展望。

关键词 AA3家族酶, 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 亚家族, 生物传感器

中图分类号 Q5, Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0223

碳水化合物活性酶数据库(CAZy, <http://www.cazy.org/>)概括了能够合成或者分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类,即糖苷水解酶(GH)、多糖裂解酶(PL)、碳水化合物酯酶(CE)、糖基转移酶(GT)及非催化活性碳水化合物结合模块(CBM)^[1]。基于氨基酸序列相似性,CAZy酶类被归入不同蛋白质家族。近年来,随着研究的深入,研究者认为植物细胞壁多糖(如甲壳素、纤维素或淀粉)的高效降解不仅需要经典糖苷水解酶的水解作用,而且离不开部分氧化裂解酶的协同催化。

目前,在CAZy数据库中氧化裂解酶被独立划分为“辅助活性”(auxiliary activities, AA)酶家族,其中AA3家族的酶具有大量不同类型的辅助活性,在医疗、环境、食品等多个领域广泛应用。基于前人研究,本文对AA3家族酶的来源、分子结构及改造,及其部分酶在电化学生物传感器领域的应用等进行了系统的归纳、总结,以期为AA3

家族酶的后续研究和应用提供参考。

1 CAZy-AA3家族酶特征及分类

AA3家族酶属于葡萄糖-甲醇-胆碱(glucose-methanol-choline, GMC)氧化还原酶大家族,基于对114个已被表征的AA3家族酶序列系统发育分析,AA3家族被进一步细分为4个亚家族:AA3_1(包括纤维二糖脱氢酶)、AA3_2(芳醇氧化还原酶和葡萄糖1-氧化还原酶)、AA3_3(醇氧化酶)和AA3_4(吡喃糖氧化酶)(图1)。

这类酶的典型特征是具有一个黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合结构域和一个底物结合结构域^[2]。部分家族成员可能包含结构上不同的环基

* 齐鲁工业大学生物及生物化学ESI培育学科基金(ESIB-BC202010)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

收稿日期: 2021-08-04, 接受日期: 2021-10-28

至额外的域 (图2)。FAD 结合结构域高度保守, 显示典型的 Rossmann 折叠或 β 折叠或 sm 单核苷酸结合基序, 与 FAD 的 ADP 部分相互作用。但是底物结合结构域的序列和结构保守性较低, 这反映了该家族作用底物的多样性。尽管这类酶的作用底物多样, 但它们整体反应机制相似。底物氧化涉及从

底物直接转移氢负离子到 FAD 异丙噻部分的 N₁ 原子, 形成 FADH₂ (还原半反应)。FADH₂ 随后被 O₂ 或其他电子受体重新氧化 (氧化半反应), 产生 H₂O₂ 或还原态金属离子 (图2)。下面对每一亚家族进行了详细综述。

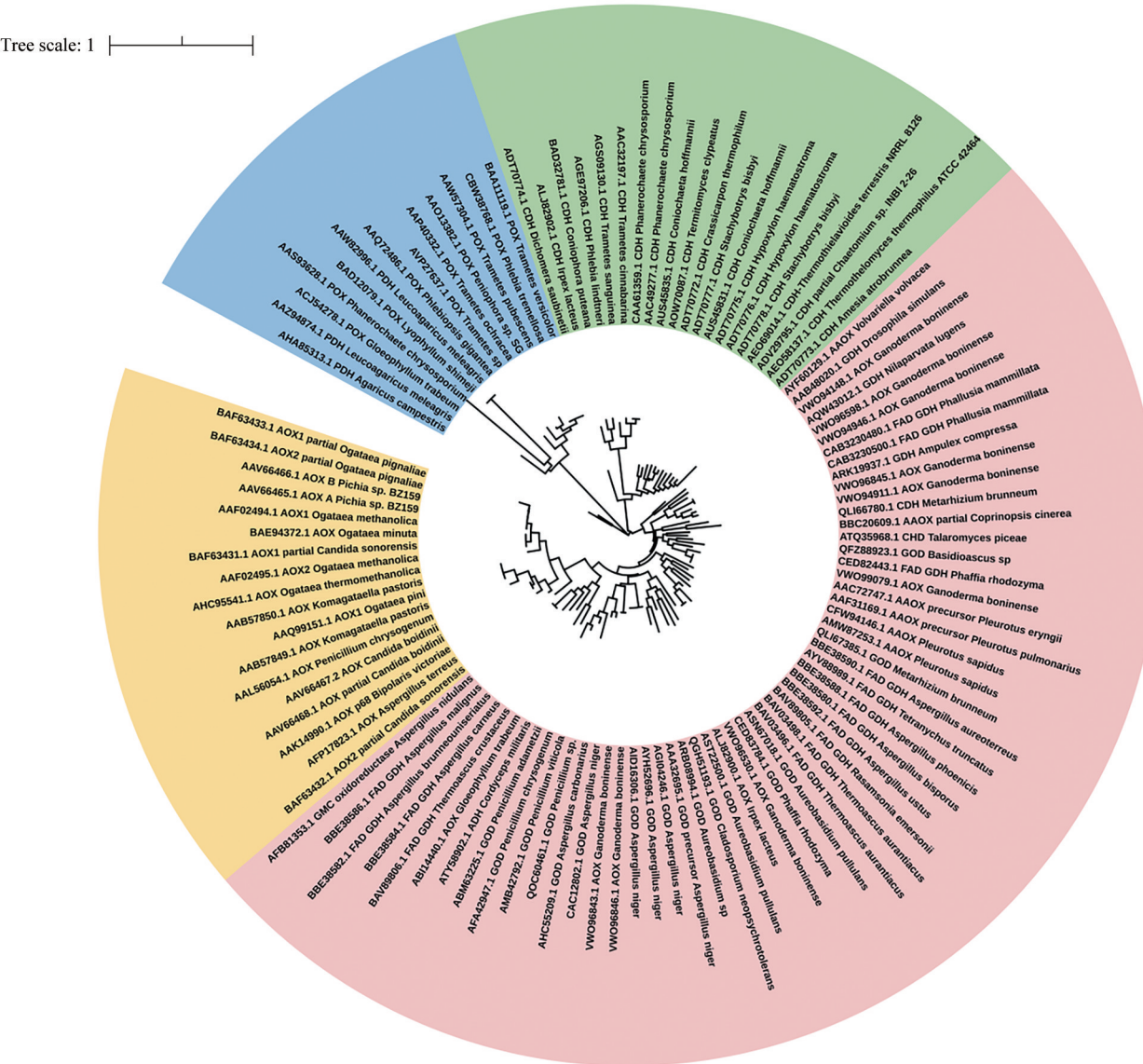


Fig. 1 CAZy-AA3 family enzyme phylogenetic tree
图1 CAZy-AA3家族酶系统发育树

红色表示AA3_1, 黄色表示AA3_2, 绿色表示AA3_3, 蓝色表示AA3_4。系统发育树表征了114个已知的AA3家族酶。序列描述包括PDB代
码、物种名称和主要来源。用UltraEdit对数据进行处理, MEGA5进行序列比对, 选择NJ法构建进化树, 利用iTOL对进化树进行美化。

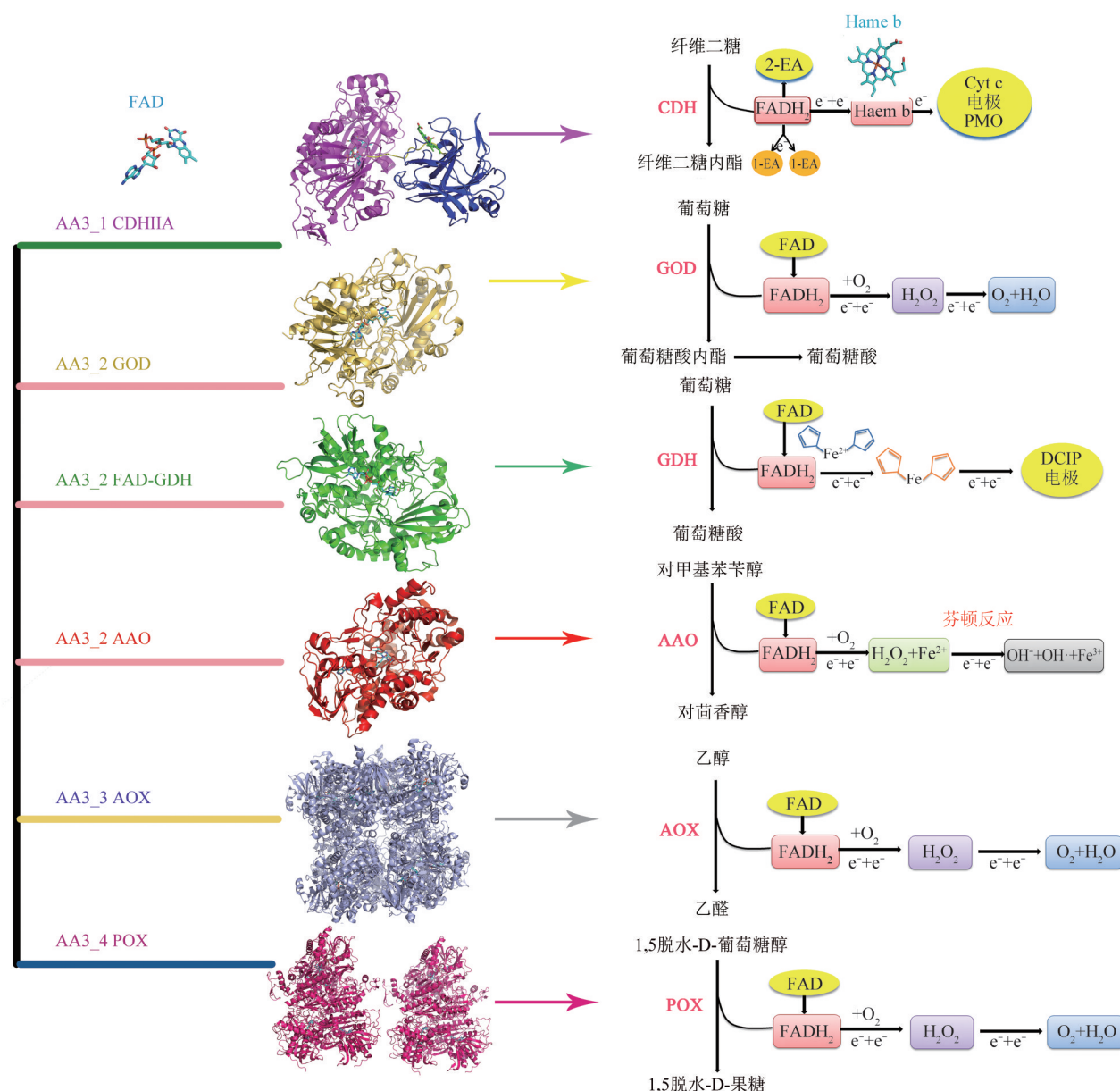


Fig. 2 The structure and reaction mechanism diagram of the four subfamily enzymes of AA3

图2 AA3 4个亚家族酶的结构及反应机理图

AA3家族代表酶的分子结构用卡通形式表示。CDH (PDB 4QI7), GOD (PDB 1CF3), FAD-GDH (PDB 4YNT), AAO (PDB 3FIM), AOX (PDB 5HSA), POX (PDB 1TZL)。EA: 电子受体; Cyt c: 细胞色素c; PMO: 裂解多糖单加氧酶; DCIP: 2,6-二氯酚靛酚; Haem b: 血红素b。

1.1 AA3_1-纤维二糖脱氢酶

1.1.1 CDH来源及分类

纤维二糖脱氢酶 (CDH, EC 1.1.99.18), 是由一些降解木质纤维素的丝状真菌分泌的胞外酶, 也是迄今为止唯一已知的胞外血黄素蛋白^[3]。CDH最早是在1974年由Westermarck和Eriksson从软腐菌 (*Sporitrichum thermophile*) 残体中提取得到的^[4]。目前, 随着基因组测序技术的发展, CDH

基因出现在许多真菌中。可产生CDH的担子菌及子囊菌列于表1。

目前已知的CDH基因, 根据酶分子结构特征和催化特性系统发育分析可分为4大类 (表1), 第I类CDH序列只在担子菌亚门中发现, 而第II类、第III类和第IV类CDH序列只在子囊菌亚门中发现。第I类CDHs对纤维素有很强的亲和力, 可通过脱氢酶结构域表面的纤维素结合位点结合。这种纤维

素结合位点在其他CDH类中不存在。在第II类CDHs中,与纤维素的结合取决于序列C端是否具有CBM,根据CBM的有无,II类CDHs又被分为A、B亚类。第I类和第II类CDHs的主要差异在于它们的底物特异性和直接电子转移的最适pH,而第III类和第IV类CDHs,目前尚未得到表达和性质测定。

Table 1 CDH classification, source and characteristics
表1 CDH分类、来源及特征

类别	来源	特征
I类	担子菌:黄孢原毛平革菌 (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Athelia rolfsii</i> ; <i>Trametes versicolor</i>)	对纤维素有很强的亲和力,通过脱氢酶结构域表面不同活性位点和纤维素结合
II类	子囊菌: A类 (<i>Thielavia terrestris</i> ; <i>Neurospora crassa</i> A; <i>Thielavia terrestris</i> ; <i>Crassiacarpon thermophilum</i> ; <i>Humicola insolens</i>) 子囊菌: B类 (<i>Neurospora crassa</i> II B; <i>Thielavia terrestris</i> ; <i>Crassiacarpon hotsonii</i>)	存在CBM结构域,可以与纤维素相结合 无CBM结构域,不能与纤维素相结合
III类	子囊菌亚门	不能与纤维素相结合
IV类	子囊菌亚门	亲缘关系最远,不具备电子转移至CYT结构域的特点

1.1.2 CDH分子结构及功能

CDH是一种单体糖蛋白,其分子质量大约为100 ku,糖基化程度可达20%。CDH有两个辅基团:细胞色素b型血红素基团和FAD基团,两个辅基团分别存在于N端细胞色素结构域(CYT_{CDH})和C端脱氢酶(DH_{CDH})结构域中,其中DH_{CDH}结构域的糖基化程度远高于CYT_{CDH}结构域,两个基团由大约20~35个氨基酸构成的柔性连接肽相连,因此CDH结构域具有显著的流动性,并导致CDH的结构具有开放和封闭两种构象^[5]。

CDHs氧化纤维二糖、纤维糊精或乳糖的C-1位还原端,生成相应的内酯^[6]。Zamocky等^[3]发现其他半纤维素和淀粉衍生的低聚糖,如木聚糖、甘露糖或麦芽寡糖等也可被一些CDHs氧化,但催化效率较低。CDHs氧化糖的动力学常数表明,其优先选择二糖或者是稍大的低聚糖。CDH氧化葡萄糖的K_{cat}值是其氧化纤维二糖的1/10,氧化葡萄糖的K_M值是氧化纤维二糖的10 000倍。对糖链长的选择特异性也是CDH的一种功能特点,比如纤维三糖和纤维四糖比纤维二糖多了葡糖残基,CDH对它们氧化的K_{cat}值与纤维二糖相比变化不大,但是K_M值明显比纤维二糖的大,这种特异性可能是由糖苷键的立体结构不同导致的。

CDHs结合纤维二糖等底物的位点位于DH_{CDH}结构域中,靠近FAD的异丙噁部分,可通过12 Å长的分子隧道到达^[7]。Tan等^[5]在2005年发现,在CDH呈现封闭式构象时这一结合位点仍可结合底物。作为还原性半反应的结果,DH_{CDH}结构域中

的两个电子随后可以转移到可同时接受两个电子的受体(例如,通常用于活性测定的2,6-二氯吡啶酚(DCIP))或一次仅接受一个电子的受体(例如,CYT_{CDH}中的血红素b基团)^[8]。在上述电子传递链下游,还原态血红素b可以依次还原终端电子受体,例如铜依赖性裂解多糖单加氧酶LPMOs^[9-10],与LPMOs协同催化结晶纤维素、半纤维素和淀粉中的糖苷键断裂^[11-13]。CDH-LPMO系统通过先前未知的机理提高纤维素结晶区的降解效率^[14-15]。

1.2 AA3_2-亚家族酶

1.2.1 AA3_2-芳醇氧化酶/脱氢酶

1988年Bourbonnais和Paice^[16]首次从不同侧耳属植物中分离到了芳香醇氧化酶(AAO; EC 1.1.3.7),AAO是由许多木材降解真菌分泌的一种单体双结构域酶,含有非共价连接的FAD。通常催化一系列芳香族和脂肪族的不饱和醇,将伯醇基团氧化为相应的醛。

*Pleurotus eryngii*来源的PeAAO(2.55 Å, PDB 3FIM)是迄今为止研究最全面的AAO酶,PeAAO具有高催化效率,与茴香醇的反应速度可达5.23×10⁶ mol⁻¹·L·s⁻¹^[17]。最近对朱砂绿脓杆菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)组学研究显示,在降解生物质过程中它可分泌4种AA3_2酶,其中一种是葡萄糖脱氢酶,另外3种与PeAAO序列同源性高达44.5%~48.7%^[18-19]。它们在氧化一系列芳香醇的还原半反应中表现出与其他AAO类似的活性,例如,催化*p*-茴香醇的效率为0.631×10³~16.9×10³ mol⁻¹·L·s⁻¹,*p*-茴香醇也是这3种酶的最适

底物。然而,它们对一些电子受体的反应性方面存在显著差异。其中一种酶对氧气没有任何活性,另外两种酶的氧反应活性与其他电子受体,如 p -对苯醌或DCIP,相比也较低,脱氢酶与氧化酶活性约为50:1^[20]。因此,这些酶不是真正的氧化酶,而是脱氢酶,它们被称为芳基醇醌氧化还原酶(AAQO)。AAO和AAQO不仅参与木质素的降解,还减少了漆酶在木质素降解过程中形成的苯氧基自由基。

1.2.2 AA3_2-葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶

在AA3_2中发现两种不同的FAD依赖性酶,葡萄糖1-氧化酶(GOD)和葡萄糖1-脱氢酶(GDH),两者在系统发育上亲缘关系较为接近。但在催化底物的方式上有所不同,GOD以 O_2 作为最终电子受体氧化 β -D-葡萄糖为D-葡萄糖内酯(D-葡萄糖酸-1,5-内酯),并将 O_2 还原为 H_2O_2 ,而FAD-GDH对 O_2 的活性很低,但可利用一系列电子媒介体作为电子受体。

a. GOD来源及结构特征

GOD最早是由Muller^[21]从黑曲霉和灰绿青霉的无细胞提取液中分离出来的,并将其命名为葡萄糖氧化酶(β -D-葡萄糖:氧1-氧化还原酶,EC 1.1.3.4)。GOD是同二聚体糖蛋白,相对分子质量在147~180 ku之间,这取决于其糖基化程度。每个单体在距酶表面~15 Å处深埋FAD或 $FADH_2$ 辅因子。FAD与GOD以非共价键进行牢固紧密结合。两个亚基之间由疏水作用力、盐桥和氢键进行连接。底物进入活性中心的口袋孔径约为10 Å×10 Å,足够容纳葡萄糖。GOD整个酶分子大小约为60 Å×52 Å×77 Å,等电点在4.3左右^[22]。

真菌表达的GOD,在催化葡萄糖的过程中,葡萄糖与周围氨基酸形成12个氢键,与邻近FAD的芳香族残基形成3个疏水键,从而稳定结合葡萄糖。在FAD结构末端将氧化葡萄糖产生的电子传递给氧,最终生成 H_2O_2 。由于 H_2O_2 能氧化GOD关键的蛋氨酸残基而使酶失活,因此GOD主要的抑制剂也是 H_2O_2 ^[23]。同时,伴随着D-葡萄糖内酯分解成葡萄糖酸导致外界pH的降低,也抑制了酶的活性^[24]。GOD的最大优势和特征是它对 β -葡萄糖的高特异性。虽然GOD也可以氧化其他种类的糖,如半乳糖、甘露糖等,但反应速度较慢^[25]。

GOD的来源广泛,目前已知的主要包括红藻、柑橘类水果、细菌、昆虫、植物、动物和真菌等(表2)。其中细菌和真菌具有产酶量高和使用各种

碳源的能力,通常被认为是工业化生产GOD的首选。但在细菌,如大肠杆菌中进行表达生产,常常形成无活性GOD的包涵体,并且在体外以较低的产率溶解,即使经复性后与天然酶性质相似,但有活性的非糖基化酶依旧无法满足高效表达的目的。由真菌自然产生的GOD会产生一种糖基化程度超过10%的胞外酶。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和多形性汉逊酵母(*Hansenula polya*)中重组表达GOD往往会导致高糖基化,并伴随酶活性的降低^[26]。目前常用甲醇营养酵母*Pichia basoris*进行目的蛋白的高效诱导表达,并被证明是表达GOD的有效宿主,虽然它产生了大量中等程度的高糖基化酶,其性质与天然酶略有不同,但仍然可以通过后期去糖基化等操作进一步提高GOD的活性。

b. FAD-GDH来源及结构特征

FAD-GDH在系统发育和结构上与GOD有着密切的关系,因此显示出与GOD相同或相似的结构域和保守的催化残基。由于FAD-GDH与GOD共享大部分活性位点,因此对葡萄糖具有较高的底物特异性。

根据已报道的FAD-GDH来源可分为3大类:细菌中的bFAD-GDHs、真菌中的fFAD-GDHs和来自昆虫的FAD-GDHs。FAD-GDHs最早的来源报告中称:在曲霉亚种中存在一种能够利用某些电子受体但不能利用氧气氧化葡萄糖的酶^[27-29]。通过对米曲霉来源的GDH进行表征,鉴定了它是FAD依赖型的GDH^[30]。利用GOD活性位点序列基序对真菌基因组数据库进行筛选,发现它们位于不同的系统发育分支。通过对GOD活性位点与fFAD-GDH活性位点结构模型比较表明,两者与葡萄糖的5个羟基中每一个相互作用的相关残基基本一致,从而阻止葡萄糖的同分异构体在活性位点结合^[31]。与GOD对葡萄糖高底物专一性不同的是,fFAD-GDH对D-木糖(XYL)也显示出显著的活性。通过对蛋白质结构的分析,fFAD-GDH对葡萄糖识别位点高度保守,fFAD-GDH识别葡萄糖的残基与GOD识别葡萄糖的残基之间没有显著差异。通过对甲壳类的fFAD-GDHs研究报道发现^[32],其催化结构中发现了独特的空腔,该空腔可能是fFAD-GDH与GOD底物特异性差异的关键。然而,fFAD-GDH缺乏D-葡萄糖酸-1,5-内酯(D-glucono-1,5-lactone, LGC)/葡萄糖第六羟基附近的残基。由于没有识别葡萄糖第六羟基的残基,并且在活性

部位存在一个显著的空腔,这可能是其对木糖具有活性的原因。

bFAD-GDH 是一种热稳定性的异寡聚酶复合物,由 FAD 催化亚基 (a-亚基)、多血红素细胞色素复合物电子转移亚基 (b-亚基) 以及分泌催化亚基所需的分子伴侣亚基 (c-亚基) 组成^[33-34]。目前报道的 bFAD-GDH 主要来源于洋葱伯克霍氏菌和嗜冷菌。源于洋葱伯克霍氏菌的 bFAD-GDH 当反应温度低于 45℃ 时,酶是由分子质量为 67 ku 和 43 ku 两种不同的肽组成的异低聚体,此时热稳定性较低。然而,在 70℃ 孵育后,异低聚物解离,生成由单个 GDH 组成的耐高温 GDH。该肽表现出比非热处理酶更高的最适温度,且显示出更好的热

稳定性。

bFAD-GDH 通过电子转移亚基促进了催化亚基辅因子和人工电子介体之间的电子转移,使该酶具有与 PQQ-GDH 相似甚至更高的催化活性。其 FAD 的主要电子受体为 3Fe-4S 簇,这一部分参与电子从 FAD 到电子转移亚基的分子内和分子间转移过程。与 fFAD-GDH 结构类似, bFAD-GDH 活性位点有一个很大的空腔支持其识别麦芽糖作为底物^[35]。因此, bFAD-GDH 具有相对广泛的底物特异性,可以催化麦芽糖等双糖,生成相应的内酯。对催化亚基活性位点的蛋白质工程研究已经成功地特异性消除了酶对双糖的活性,从而使其本质上成为对葡萄糖专一的酶。

Table 2 Main sources and characteristics of GOD and GDH
表2 GOD及GDH主要来源及特征

酶	系统名称	EC序列	辅助因子	微生物来源	结构	催化特点
葡萄糖氧化酶	β-D-葡萄糖: 1-氧化还原酶	1.1.3.4	FAD	真菌 ¹⁾	同二聚体, GMC 氧化还原酶家族	快速催化葡萄糖, 专一性高
FAD-葡萄糖脱氢酶	D-葡萄糖: 受体 1-氧化还原酶	1.1.99.10	FAD	革兰氏阴性菌 ²⁾ 真菌 ³⁾	异三聚体 (催化、分子伴侣、细胞色素亚基) 单体均聚物	催化葡萄糖、麦芽糖等双糖, 专一性较差 催化葡萄糖、木糖等, 专一性较差

¹⁾ 曲霉、青霉; ²⁾ 洋葱伯克霍尔德菌; ³⁾ 米曲霉、黑曲霉、土曲霉。

1.3 AA3_3-醇氧化酶

醇氧化酶 (AOX) 最早是由 Jassen 等^[36] 于 1965 年在担子菌 *Spongipellis unicolor* 子实体培养物中发现。它是第一种被发现的与甲醇酵母甲醇氧化途径相关的酶类,它们以氧分子作为电子受体,把小分子、低质量的醇类,如甲醇、乙醇、丙醇等短链醇,氧化成相应醛类。

AOX 是甲醇营养型酵母 (毕赤酵母、假丝酵母、汉逊酵母) 的关键酶,它位于这些酵母的过氧化物酶体中,可占这些生物体细胞总蛋白质的 30%^[37]。2016 年,来自 *Pichia pastoris* 的 AOX (*PpAOX*) 的结构已通过晶体学和 X 射线衍射以及冷冻电子显微镜解析出^[38-39]。*PpAOX* 是一种同八聚体蛋白,每个亚基携带一个非共价连接的 FAD,该 FAD 的异咯嗪部分可以通过自催化反应修饰阿拉伯酰基,这与通常的核糖醇基修饰是完全不同的。研究者认为,这种 FAD 修饰主要通过降低与甲醇的 K_M 值来提高对醇类底物的催化活性,并且 FAD 的修饰程度与菌体生长环境中甲醇浓度 (5%~95%) 呈负相关。

与酵母中的 AOX 相比,来自担子菌或植物病原真菌中的 AOX 研究较少。从褐腐真菌 *Gleophyllum trabeum* (*GtAOx*) 的培养物中分离出的胞外 AOX 与其他酵母和真菌来源的 AOX (包括 *PpAOX*) 显示出 50%~53% 的序列同源性^[40]。其 C 端与酵母 AOX 明显不同,也不含典型的 N 端真菌信号序列,但免疫荧光和 TEM 免疫标记研究表明, *GtAOX* 是胞外定位的。甲醇是 *GtAOX* 的首选底物,其催化效率约为 $6.78 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$,与 *PpAOX* 相似。由于不同来源 AOX 结构的差距,导致其在功能上表现出不同的作用。来自酵母菌的 AOX 主要在甲醇代谢和同化中起作用,而来自于其他真菌中的 AOX,则被认为是为真菌攻击木质纤维素提供 H_2O_2 。

1.4 AA3_4-吡喃糖氧化酶

吡喃糖氧化酶 (POX, EC 1.1.3.10) 是与 AA3 家族成员亲缘关系最远的一类,不具有 AA3 家族典型的高度保守基序,因此被归入 GMC 家族最晚^[41]。POX 在白腐真菌中广泛存在,特别是多孔菌目^[42]。该酶最初从担子菌中分离和表征,后来

又在许多其他木腐真菌、部分放线菌(*Arthrobacter siccitolerans*)中分离出来。晶体结构表明,POX是AA3家族中结构特征最多样化的一类,与AA3家族其他成员不同,大部分POX是同四聚体蛋白,有些POX是被糖基化的(图1)^[43]。每个双结构域亚基都包含一个与亚基的His残基共价连接的FAD辅酶活性位点。底物进入FAD活性位点受到高流动性无规则卷曲形成的环形区的限制,从而限制了酶仅对单糖的催化。此外,底物只有通过由4个亚基形成的内部空腔隧道才能进入催化活性位点,每个亚基都带有一个功能未知的延伸“头部结构域”。其功能可能参与亚基聚合或与细胞壁多糖或其他蛋白质的相互作用^[44]。

POX首选底物为D-葡萄糖,但与GOD相比(GOD的活性仅限于 α -D-葡萄糖),POX既可以利用 α -D-葡萄糖,又可利用 β -D-葡萄糖。除了其最适底物D-葡萄糖以外,D-半乳糖、D-木糖、L-山梨糖、D-葡萄糖酸-1,5-内酯等单糖的C-2位也能被其氧化,生成相应的2-酮糖,同时将 O_2 还原成 H_2O_2 ^[45]。对POX的研究表明,它是以乒乓机制催化反应,整个反应分为还原性半反应和氧化性半反应两部分。在还原性半反应中, β -D-葡萄糖C-2位被氧化,生成2-酮-D-葡萄糖,FAD辅基被还原为 $FADH_2$,底物酮糖被释放。在氧化性半反应中, O_2 被还原为 H_2O_2 ,同时黄素辅基回到氧化态。与GOD相比,在木质素降解过程中,POX才是 H_2O_2 的主要来源,目前认为,POX主要是作为白腐真菌木质素降解体系的一个组分,为过氧化物酶提供 H_2O_2 。

2 CAZy-AA3家族酶在传感器中应用

氧化还原酶在催化底物的反应中涉及电子转移,因此可以将其固定到传感器电极表面把化学信号转换为电信号,实现对底物的快速检测。随着新鉴定以及分子改造的氧化还原酶作为底物识别元件,结合新的高效酶固定化纳米导电材料的发展,氧化还原酶与电极之间电子传递效率不断提高,传感器的检测限逐渐降低至fmol/L浓度,灵敏度、特异性和稳定性也大大提高。根据氧化还原酶与电极之间电子传递方式的不同,酶生物传感器的发展主要划分为3个阶段。

第一代酶传感器称为无介质安培型生物传感器,它以自然物质如氧气作为酶与电极之间的电子通道,通过氧电极或过氧化氢电极测量氧的消耗或

过氧化氢的产生来测定底物。这种传感器的优点是制作简单、无人工介体。但由于是间接测定,检测时受溶解氧波动的影响较大,响应时间较长,易受试样中共存的氧化还原性电活性物质干扰,导致传感器的灵敏度和抗干扰能力相对较差。为克服以上问题,自20世纪70年代起,人们开始用小分子电子媒介体代替氧,通过检测媒介体电流来测定底物浓度。因此,第二代酶传感器又被称为介体安培型生物传感器。与第一代相比其检测灵敏度、实用性明显提高。随着纳米技术的发展,研究者将纳米技术与生物传感器结合,设计出了灵敏度更强、化学稳定性更高、生物相容性更好的第三代酶生物传感器-纳米生物传感器。由于第三代酶传感器缩短了酶与电极之间的传递距离,使酶和电极之间实现直接电子传递(DET),因此,这类传感器的电子转移效率更高,受到的干扰更少,准确性更高,应用前景更可观。

而AA3家族酶作为一类重要的氧化还原酶,由于其高效的表达量,高度稳定的催化能力,多样的作用底物,被广泛的应用于酶传感器中,特别是对葡萄糖、乳糖、乙醇的检测成为应用热点。

2.1 葡萄糖生物传感器

葡萄糖的定量测定在食品工业、临床医学、生化分析等领域都具有重要意义。葡萄糖传感器是生物传感器领域中研究最多、商品化最早的生物传感器。葡萄糖传感器的发展历史与葡萄糖传感所用酶的发现和工程的历史是密切相关的,因此,在数十年的发展中随着葡萄糖传感器检测用酶的设计改造及固定化材料的改进,葡萄糖传感器的检测性能得到巨大提升。

GOD是最早应用于葡萄糖生物传感器中的一类酶,自第一支葡萄糖氧化酶传感器问世以来就被应用于葡萄糖的检测。然而,利用氧作为电子受体的第一代传感器主要面临着如下几个问题:a.需氧的反应条件造成酶电极电信号与溶解氧的关系很大,极易引起信号的波动,难以对高含量的葡萄糖进行测定;b.过高的检测电位(氧电位)使其他电活性物质容易产生信号干扰;c.氧化还原产物 H_2O_2 浓度过高会使GOD失去活性等。这些问题大多归因于GOD自身的结构性质或者是反应机理。通过对GOD蛋白结构的解析,基于基因工程改造,改变活性中心的电子传递方向来改善GOD对氧的依赖性及其反应过程中电子转移效率,实现对GOD在电化学上的应用进行重新设计,成为发展

第二代、第三代葡萄糖氧化酶传感器的主要研究内容(图3)。Klinman等^[46]利用突变技术用氯化物取代天然黄素中7和8位甲基,对黑曲霉(*A. niger*)来源的GOD进行了改造并对其在氧化过程中的O₂效应反应进行了监测(图3中a1),发现改造后GOD的 K_M 比天然的高25倍。为了进一步降低GOD对O₂的竞争效应,Tremey等^[47]使用了这种黄素类似物制作了GOD生物电极,并通过将新的类似物嵌入到钨导电聚合物中制备修饰电极,结果表明,改造后的GOD对O₂的灵敏度降低了90%,当葡萄糖浓度<10 mmol/L时,在几乎不受O₂浓度影响的情况下,FADCL₂-GOD电极的电流密度比天然酶高,电子转移率提高了1.3倍,有效避免了GOD对氧气的过度依赖。Sode等^[48]在确定了参与氧化半反应中与O₂相互作用的关键氨基酸后,将参与氧化半反应的Ser96残基进行突变,降低了GOD对O₂的敏感性。但这项工作中也指出,这种突变也将影响还原半反应,并在一定程度上降低了GOD的活性。Tremey等^[49]在分析了尼崎青霉菌的X射线结构后,从黄素中发现了类似的缬氨酸,它们为O₂激活提供了正电荷。在含铁乙醇的均相溶液中进行筛选,得到了以极性丝氨酸S取代非极性氨基酸V时降低O₂敏感性的最佳突变体;动力学分析表明,与天然GOD相比,该突变体只影响氧化半反应,而未影响还原半反应(图3中a2)。他们用新的突变体和钨氧化还原水凝胶制备了修饰电极。在2 mmol/L葡萄糖和1 atm O₂条件下,突变电极的电流密度比用天然酶制成的电极高27%。由于产生的H₂O₂数量有限,改性电极比天然GOD电极稳定4.7倍。然而,25%的电子仍然丢失给了氧化还原介质。为了进一步完善系统,他们将该突变与活性位点入口袋(蓝色)附近的K424E突变结合(图3中a2)。双突变体K424E-V464S在整个葡萄糖浓度范围内不依赖于氧气。该突变体结合增强了电子转移,因为在活性位点口袋的入口处有带负电荷的谷氨酸,而在FAD附近有一个极性丝氨酸,使O₂的影响最小化^[49]。由于天然GOD的活性中心深埋在蛋白质外壳内,通过对蛋白质活性中心的表面入口处进行定点突变不仅能降低酶活性降低的风险,还能改善对氧的极性作用,电子直接转移到电极表面,降低对氧的结合。

制约第三代GOD传感器发展及应用的另一个因素是如何缩减活性中心处产生的电子转移到电极界面的距离,提高GOD和电极表面之间的电子转

移率。研究表明,酶与电极之间的距离每减少0.8 Å,电子转移速率将提高2.71倍^[50]。虽然在电极制作过程中对固定的蛋白质进行去糖基化处理,也能有效缩减活性中心到电极界面的距离,增强电子转移速率。但从酶分子表达的源头缩短酶的氧化还原中心与电极表面的距离是提高电子转移率最直接、最简单的办法。据GOD蛋白结构推测,从GOD的氧化还原位点到酶表面最短的电子转移路径存在于靠近C端的577位的天冬酰胺(Asn577)处,因此,Demin等^[51]在GOD的C端添加了一个His6序列,并将表达的蛋白质有效且定向固定在含次氨基三乙酸修饰的玻碳电极表面,使酶最大限度的保持最佳催化效率(图3中b1)。在无氧条件下测量发现,电子转移率高达350 s⁻¹,比无酶的FAD快两个数量级;在含O₂干扰的条件下,电子转移率降低至160 s⁻¹,这可能仍与氧与活性中心的His相互作用有关。为了获得更高的电子传递速率,进而引入了氧化还原介质(金纳米颗粒、钨导电聚合物)。Xiao等^[52]报道了重组FAD功能化的黑曲霉GOD在1.4 nm AuNP中的电极表面催化反应,这是首次使每个GOD特异性固定一个AuNP的例子(图3中b2)。该生物传感器的电子转移速率为5 000 s⁻¹,是原生酶与O₂反应的7倍,也是迄今为止文献报道的最高比率。Holland等^[53]在此基础上,使用了早期开发的催化性能优于天然酶的双突变体GOD(T56V/T132S),将其活性位点附近一个游离的半胱氨酸(C521)突变为缬氨酸,防止不必要的AuNPs附着,并在活性中心约13.8 Å~28.5 Å处的5个位置分别引入突变的Cys残基。结果显示,其中FAD与Cys之间距离最短的突变体(H447C)具有最大DET潜力(图3中b2)。Suraniti等^[54]使用钨导电聚合物作为GOD氧化还原介质研究发现,在钨基氧化还原聚合物中固定化的GOD比GOD在均相溶液中的动力学要差,其氧化电流降低了35%。他们将这种差异归因于GOD入口周围缺乏带负电荷的氨基酸。通过对入口处的K424、Q75、Q184和G423突变为E或D,发现所有突变体在均相溶液中都表现出相同的活性。但在氩气(Ar)条件下,K424E突变体电极的氧化电流比天然酶增加了2.4倍,在O₂条件下增加了1.4倍。通过在活性位点入口附近引入负电荷,能增加正电荷钨和酶之间的相互作用(图3中b3)。这些结果表明,通过重新设计酶的入口,可以使GOD与氧化还原介质更好的进行相互作用,从而提高电子转移的速度。

fFAD-GDH 由于对 O_2 和麦芽糖不敏感, 因此被认为是用于葡萄糖生物传感器的最佳候选酶类。它作为第二代酶传感器的主要传感元件, 电子介体的选择尤为重要, 氯化六氨合钌(III) 具有较低的氧化还原电位和较高的贮存稳定性, 是一种非常理想的酶介质。然而, 与 GOD 相比, fFAD-GDH 不能利用六氨合钌(III) 作为电子受体^[55]。Okurita 等^[56] 在比较 FAD-GDH 和 GOD 结构的基础上, 构建了一个能够利用六氨合钌(III) 作为电子受体的黄曲霉来源的突变体——*Af*GDH-H403D, 在通向 FAD 辅助因子的通路入口处引入一个带负电荷的谷氨酸残基, 吸引带正电的六氨合钌(III), 并引导电子受体进入通路(图3中c1)。而野生型 GOD 中相应的氨基酸是带负电荷的, 这解释了 GOD 可以利用六氨合钌(III) 作为电子受体的原因。电化学测量结果显示, *Af*GDH-H403D 和六氨合钌(III) 对 10 mmol/L 葡萄糖的响应电流为 46.0 μA , 与野生型 *Af*GDH 和铁氰化物 (47.8 μA) 的响应电流类似。因此, *Af*GDH-H403D 适合于以六氨合钌(III) 为介质构建的酶电极。利用这种改造的 fFAD-GDH 可加快血糖监测传感器的发展, 提高监测准确性。

发展第二代、第三代葡萄糖传感器的另外研究

内容是通过改造葡萄糖脱氢酶、纤维二糖脱氢酶等可以氧化葡萄糖的酶进行分子改造, 实现葡萄糖的高效检测^[57-59]。构建 DET 型 fFAD-GDHs 最先进和最具挑战性的方法是构建一种融合 fFAD-GDH 和 CYT_{CDH} 结构域的融合蛋白(图3中c2)。Ito 等^[60] 报道了利用 *Pc*CDH 和 *Af*GDH 构建细胞色素 b 融合蛋白。*Pc*CDH 是一种已知的具有 DET 功能的单分子酶, 根据结构预测, *Pc*CDH 的血红素 b 结构域在 *Af*GDH 的 N 端融合。由于 *Pc*CDH 的血红素 b 结构域可能存在于 *Af*GDH 的 FAD 附近, 因此, FAD 和血红素之间可以实现分子内电子转移, 从而实现 DET。实验结果表明, 细胞色素 b 融合的 *Af*GDH 表现出分子内电子转移和 DET 能力, 且保持原始底物特异性。pH 值的降低和二价阳离子的存在改善了分子内电子转移, 但远不如 CDH 自身的分子内转移。此外, CDH 可将细胞色素 b 作为“内置”氧化还原介质, 在 FAD 和外部电子受体之间传递电子, 因此产生了利用 CDH 来直接检测葡萄糖的新想法(图3中d)。嗜热型纤维二糖脱氢酶(*Ct*CDH) 在底物结合域通过半胱氨酸与酪氨酸交换, 提高了对葡萄糖的催化能力, 使葡萄糖检测灵敏度提高了 10 倍^[61]。

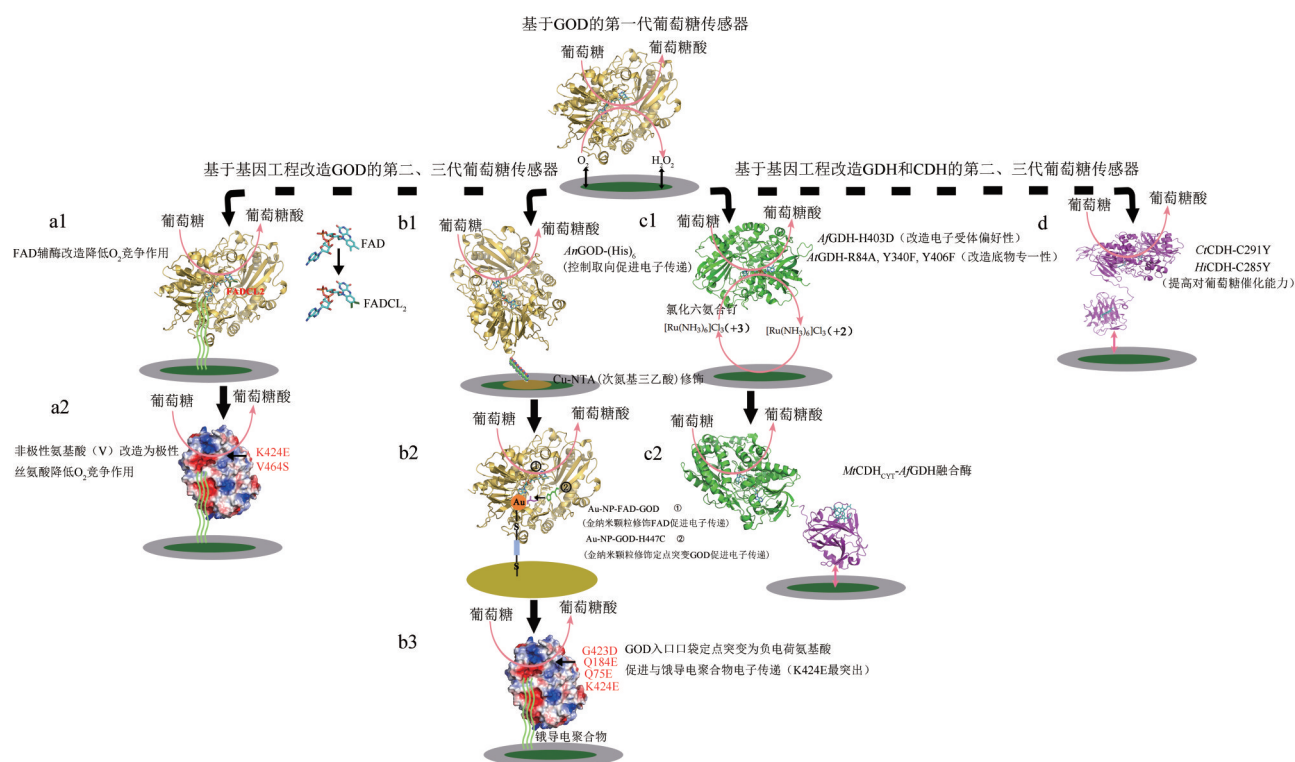


Fig. 3 Glucose biosensor development map

图3 葡萄糖生物传感器发展历程图

基于第一代酶传感器原理, 本实验室自主研发的SBA系列生物传感分析仪于1989年开始应用, 是目前中国唯一的商品化工业酶电极分析系统, 在食品发酵、生物医药和科研教学等领域已广泛应用^[62]。为克服传统酶分子传感元件随机固定导致酶传感器稳定性不高、均质性差异大的问题, 促进原有葡萄糖生物传感器升级换代和新型传感器研制, 最近, 本实验室采用生物信息学、分子生物学等生物技术, 定向设计和高效表达带有CBM亲和肽的融合酶(GOD-NL-CBM2, GDH-NL-CBM2)分子, 实现酶分子传感元件在电极表面有利空间取向可控固定, 使葡萄糖传感器的传感性能(灵敏度、检测限、稳定性、重现性)显著提高。在此基础上, 建立融合酶传感元件标准化操作工艺和质量控制体系, 使传感器件具有良好均质性、高效和稳定的酶化学和电化学(换能器)催化活性, 可实现新型融合酶生物传感器的商品化应用^[63-64]。

2.2 乳糖生物传感器

乳糖是牛奶中的主要碳水化合物, 浓度为4%~5% (w/v), 母乳中约为8%, 在人类饮食中占有重要作用。然而许多人对乳糖具有不耐受症, 因此食品中乳糖含量的精准控制至关重要。在过去几十年

中, 几种用于乳糖测定的酶生物传感器已经得到了开发。其中, CDH可以特异催化乳糖, 并且可以将催化乳糖产生的电子直接转移到电极上。因此, CDH成为开发第三代乳糖生物传感器的重要酶类。

为了增强CDH与电极间直接电子传递效率, 促进第三代乳糖传感器的发展, 人们利用新的电极材料、纳米材料(单/多壁碳纳米管、金纳米粒子、石墨烯)和化学修饰电极表面, 以增加CDH结合的有效表面积, 或者通过控制CDH在表面上的适当取向来增加电流密度、提高DET速率。CDH的糖基化程度约为9%~16%, 与GOD类似。基于前期研究, 研究者将来源于黄孢原毛平革菌(*Pc*)和白腐菌(*Cs*)中的CDH, 经甘露糖苷酶和糖苷内切酶处理后, 获得去糖基化酶^[65]。在底物存在时, 用去糖基化*Pc*CDH和*Cs*CDH修饰的石墨电极的最大电流比用相应糖基化CDH修饰的电极高40%~65%, 并提高了酶对乳糖的专一性, 这可能归因于去糖基化促使电极表面电活性CDH分子数量的增加, 并使酶的尺寸缩小, 从而促进直接电子传递(图4中a1, a2)。此外, 电极和蛋白质表面(负责DET的部分表面)之间的静电兼容性对建立高效DET通道起着关键作用, 氧化还原酶/电极界

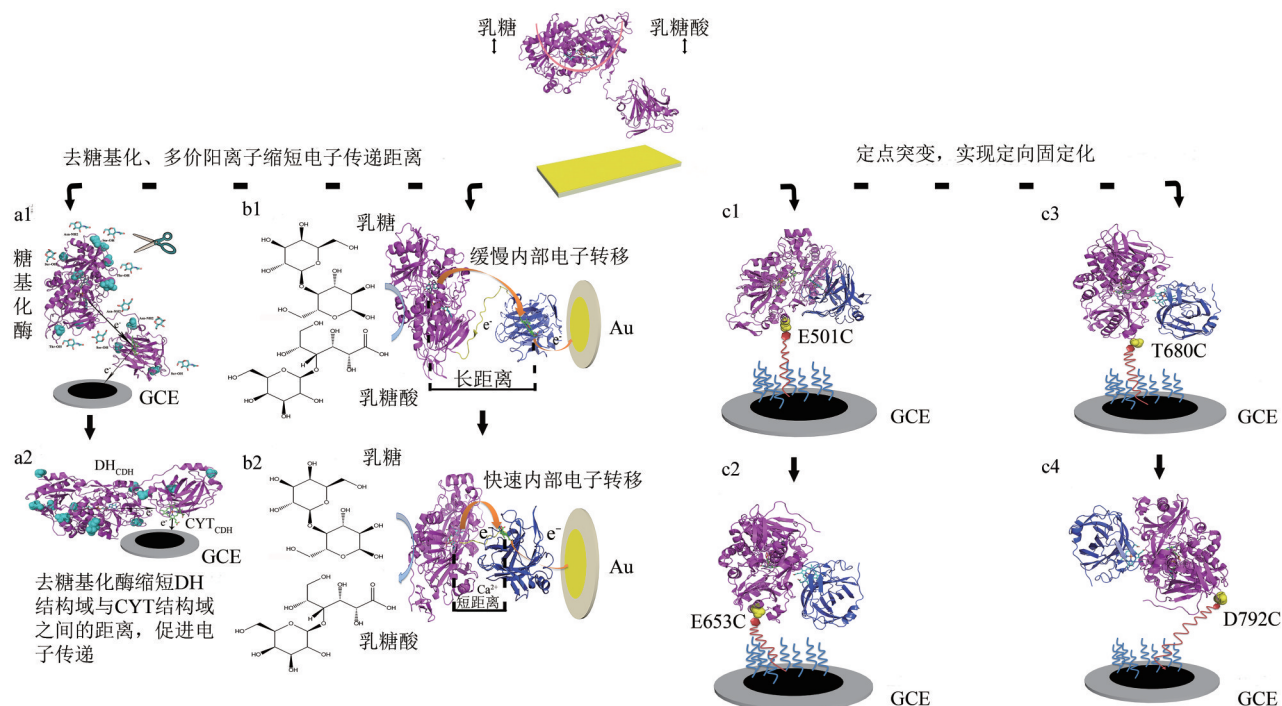


Fig. 4 Methods for enhancing efficient electron transport in CDH are summarized

图4 增强CDH有效电子传递方法概括

a1, a2: 去糖基化过程。参与去糖基化的酶, HF (糖苷内切酶), EC 3.2.1; MAN (α -甘露糖苷酶), EC 3.2.1.24. b1, b2: 多价阳离子促进带负电的蛋白质和电极直接DET过程。c1~4: 定点突变*Mi*CDH控制不同取向过程。GCE: 玻碳电极; Au: 金电极。

面的极性极大地影响酶分子在电极上的吸附和取向,有时不促进DET过程,甚至阻碍酶的吸附。针对这一问题,研究者已经深入研究了酶-酶和酶-界面的相互作用,发现小的多价阳离子,例如, Mg^{2+} 或 Ca^{2+} ,可以促进带负电荷的蛋白质和电极之间DET的能力^[66-68]。这可以归因于 Ca^{2+} 在 DH_{CDH} 和 CYT_{CDH} 的界面上被天冬氨酸和谷氨酸的羧基络合,从而导致两个结构域更紧密的相互作用和更高的DET速率(图4中b1, b2)。

随着基因工程的发展,优化DET速率或解决DET问题最常用的方法之一是通过定点突变来定向固定氧化还原酶。例如, Ma等^[69-70]将单个Cys残基引入到嗜热肉豆蔻球菌纤维二糖脱氢酶($MtCDH$)的 DH_{CDH} 表面,不同变体的Cys残基能够以不同的取向与多壁碳纳米管电极表面的修饰马来酰亚胺基团共价偶联(图4中c1~4)。 DH_{CDH} 直接面对电极的取向是很困难的,因为CYT也在底物通道上以闭合构象与DH相互作用,接受催化FAD辅因子的电子。因此,研究者选择了靠近蛋白质界面但不干扰结构域相互作用的残基E501(图4中c1);另外,底物通道右侧引入一个突变E653C(图4中c2)。逆定向是通过突变T680C DH_{CDH} 底部实现的,以获得CYT血红素辅助因子与电极之间的最远距离(图4中c3)。 CDH 碳水化合物结合模块(CBM)上的突变D792C是 CDH 在纤维素上的自然取向,在电极上以顶部定向共价固定(图4中c4)。研究表明,与非定向固定相比,这种固定方法使固定在电极上的电接触(活性)酶量增加了

4~5倍。在30 mmol/L Ca^{2+} 存在下,DET速率均有所增加,其中,E501C和D792C的电流分别增加了14.4倍和4.8倍;由于D792C中CYT距离电极表面最远,因此电子传递速率最低。但血红素b辅因子的氧化还原电位不受酶取向的影响。

2.3 乙醇生物传感器

在医疗、化工、交通等多个领域都需要对乙醇进行高灵敏度、高选择性和高准确度的定量检测。目前,常用的检测乙醇浓度的方法有气相色谱法、分光光度法和呼气法^[71-72]等。虽然其中一些方法精确可靠,但它们复杂且耗时,利用酶传感器法可以克服这些缺点。迄今为止,几乎所有基于AOX的乙醇传感器都是基于对 O_2 消耗或 H_2O_2 生成进行监测(表3)。

Clark电极是最常见的 O_2 监测电极,它由一个铂电极和一个参比电极(通常是Ag/AgCl)组成,该参比电极浸入电解液中,并被一个半透膜覆盖, O_2 通过该半透膜扩散。当铂电极上施加相对于Ag/AgCl的-600 mV电位时, O_2 减少,并产生与 O_2 浓度成正比的电流。基于氧气检测的乙醇传感器具有不受其他样品化学成分干扰的优点,但存在背景信号高、精密度低和重复性差等问题。基于以上一些缺点, H_2O_2 的检测是克服这些缺点最常用的替代方法。

1974年, Giubault和Lubrano^[73]描述了AOX基于 H_2O_2 检测的第一个乙醇安培传感器。该传感器是由来自于担子菌的可溶性AOX构成,基于在铂电极上的酶促反应过程,并且发生在相对于

Table 3 Electrode performance based on O_2 and H_2O_2 detection

表3 基于 O_2 和 H_2O_2 检测的电极性能

检测成分	AOX固定化技术	检测限	线性范围	稳定性	参考文献
O_2	GA交联, 尼龙布固定	1 mmol/L	1~10 mmol/L	2周	[74]
	GA与过氧化氢酶共价结合在尼龙布上	1 mg/L	1~25 mg/L	2周	[75]
	聚丙烯膜上AOX凝胶溶液的GA网状化	0.5 mmol/L	0.5~15 mmol/L	600次	[76]
	固定在尼龙网支撑的高钙酸盐中的酵母细胞	0.2 mmol/L	0.2~1.2 mmol/L	30% (8 d)	[77]
	含AOX的均质蘑菇组织与明胶的GA交联	0.2 mmol/L	0.2~20 mmol/L	82% (60次, 10 h)	[78]
	用GA将酵母固定在明胶中	0.5 mmol/L	0.5~7.5 mmol/L	50% (7 h)	[79]
H_2O_2	可溶性AOX	5 mg/L	5~75 mg/L	2周	[80]
	Nafion膜固定	0.05 mmol/L	0.1~10 mmol/L	6 h后>90%	[81]
	固定在含有PEI的PCS水凝胶中	0.01 mmol/L	0.01~30 mmol/L	12 h后>95%	[82]
	通过阴离子交换过程固定在PVF CLO ₄ 基质中	0.5 mmol/L	0.5~3 mmol/L	36 d检测132次	[83]
	聚二甲硅氧烷(PDMS)共固定化AOX和辣根过氧化物酶(HRP)	0.01 mmol/L	0.01~30 mmol/L	-	[84]
	GA交联	0.1 mmol/L	0.1~0.5 mmol/L	90次检测后>97%	[85]

Ag/AgCl的+600 mV的高电位上。在这项开创性工作之后,许多乙醇传感器都是基于 H_2O_2 检测,与其他类型的传感器相比, H_2O_2 传感器具有较低的检测线和较宽的线性范围,制作方便等优点。目前市场上乙醇传感器多基于 H_2O_2 的检测。

2.4 AA3家族其他酶应用前景

AAO氧化催化系列芳香族和一些脂肪族的含共轭伯羟基的多不饱和醇。由于AAO催化底物范围广和它的立体选择性机制,使这类酶作为工业生物催化剂具有良好的性能,目前在染料脱色、纸浆漂白、香料合成、仲醇除乙酰化和糠醛氧化、生物聚合物前体合成等多个方面都有应用,而作为生物传感器敏感元件的研究尚未见报道^[86]。目前AAO的使用能力主要受限于异源表达水平不高,为此多项研究集中于探索建立AAO的异源表达体系(宿主菌、表达载体、信号肽类型、启动子类型)或通过定点突变技术提高AAO催化活性、稳定性等性能^[87-89]。随着研究的深入,不同来源AAO的结构和生化性质正在逐步被揭示,这对理解AAO的结构-功能关系并促进其产业化应用具有重要意义。

基于对吡喃糖的催化特异性,POX已被应用于葡萄糖、半乳糖、木糖等碳水化合物的传感检测。Lidén等^[90]首次将来自黄孢原毛平革菌的PcPOX与HRP共固定在碳糊电极(CPE)上,该双酶传感器可同时检测 H_2O_2 和葡萄糖,对葡萄糖(840 nA, $30.2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$)、木糖(80 nA)、半乳糖(36 nA)均有良好反应。此后,基于POX的生物传感器主要用于食品和饮料的分析和各种食品发酵过程的监测。2008年,Odaci等^[91]将来自于革盖菌属的CsPOX固定在CPE上,用于红酒样品中葡萄糖含量的检测。然而,与标准DNS法相比,由于酶的特异性低,它能够有效地氧化除葡萄糖以外的几种糖类,因此这可能会损害其在选择性葡萄糖监测中的使用,测得的葡萄糖含量值有些低(差别最大可达7%)。此外,研究人员还将CsPOX固定于金电极上制备生物传感器并用于酿酒酵母在生物反应器中的培养过程监测,分析结果与以高效液相色谱法为参考的葡萄糖含量测定结果具有良好的相关性。但该生物传感器的稳定性不高,当存储在缓冲溶液一个月后,活性损失至初始活性的72%^[92]。随后进一步的研究报告了构建基于CsPOX的生物传感器,这些传感器利用CsPOX自身的优势,既可氧化 α 型葡萄糖,又可氧化 β 型葡萄糖,通过在电极表面电沉积金属纳米粒子,用于

分析几种饮料中的葡萄糖,如软饮料、冰茶、能量饮料、牛奶和果汁,所有这些传感器与参考方法相比都取得了良好的结果^[93]。

由于POX广泛的底物特异性,其应用范围正在逐步扩大,研究也逐渐向新型POX的发现、理想型酶突变体的改造以及在电极上的有效固定化等方面深入。随着人们对利用基于POX的设备检测各种生物分子的兴趣不断增长,以POX作为生物敏感元件的传感器有望为食品和饮料行业、疾病诊断、生物过程监测和环境污染筛选等领域创造巨大的应用价值。

3 展 望

近几十年来,CAZy-AA3家族酶作为生物电化学传感器的识别元件一直发挥着重要作用。生物传感器是化学、生物化学和物理学的交叉领域,酶作为传感器的核心元件,其自身性能决定了生物传感器的性能和应用范围。目前,具有高灵敏度和高选择性的电化学生物传感器在临床、制药、环境和工业等多个领域显示出巨大的应用潜力。但是天然酶本身具有不稳定性、易变性等缺点,并且测定其性质通常在均匀溶液中,底物、氧化还原介质和酶都是游离的,没有浓度分布差异且氧化还原介质、底物将通过最佳接触点接近酶。而当酶被固定在电极表面应用时,酶的部分构象会改变,并且可能会出现浓度梯度,从而改变其对底物和/或氧化还原介质的反应性、稳定性、对其他化学物质的耐受性等许多性质。因此到目前为止,很难找到一种天然酶能满足构建理想生物传感器所需的全部特性(高灵敏度、高选择性、高稳定性),也没有建立一种通用的工程方法来有效固定氧化还原酶以改进其电化学应用。

当前,蛋白质工程已经在设计具有特定功能特性的氧化还原酶方面发挥了重要作用。国内外已有很多优秀的专家学者针对传感器用酶,进行特定的基因工程改造,利用蛋白质工程学帮助研究人员按其需要量身定制特定的生物酶应用到生物传感器中,通过模仿自然进化过程,结合不同的诱变方法来产生酶变体,或利用突变特定的位点赋予酶特定属性,以产生具有所需催化性能的酶变体^[60, 94-96]。部分研究结果显示,通过系统筛选氨基酸的突变位置和类型会产生具有增强或特殊性质的酶,例如,提高对特定分析物的亲和力,增强稳定性,提高电子转移速率,以及提供定向或更稳定的固定。但是

有些情况为特定目的而专门设计的突变可能会在电化学生物传感器应用中产生另一种不利影响。解决这些问题的关键是结合蛋白质工程和生物传感器领域的科学知识指导酶分子传感元件理性设计。随着大数据时代对酶分子序列、结构、功能的深入认识,可以借助计算模拟/分子对接等方式根据功能需求全面预测氨基酸大小、极性、电荷和氧化还原电位等性质并结合蛋白质工程技术、氧化还原介质/聚合物合成和电化学方面的专业知识实现理性改造。目前,蛋白质工程改造酶的生物传感器研究仍处于起步阶段,尤其是国内大部分优良商品化酶的来源依赖于国外进口,虽然有些研究采用了自制酶,但离实用性要求相差甚远,因此更应加大酶分子传感器用酶的研究和开发力度,实现可适用的生物传感设备产业化制造,促进中国从生物传感器研究大国向生物传感器制造强国的转变。

参 考 文 献

- [1] Lombard V, Ramulu H G, Drula E, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*, 2013, **42**(1): 490-495
- [2] Sützl L, Laurent C V P, Abrera A T, *et al.* Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(6): 2477-2492
- [3] Zamocky M, Ludwig R, Peterbauer C, *et al.* Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Curr Protein Pept Sci*, 2006, **7**(3): 255-280
- [4] Westermark U, Eriksson K E. Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem Scand*, 1974, **28**: 209-214
- [5] Tan T C, Kracher D, Gandini R, *et al.* Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7542-7553
- [6] Hildebrand A, Addison J B, Kasuga T, *et al.* Cellobionic acid inhibition of cellobiohydrolase I and cellobiose dehydrogenase. *Biochem Eng J*, 2016, **109**: 236-242
- [7] Banerjee S, Roy A, Madhusudhan M S, *et al.* Structural insights of a cellobiose dehydrogenase enzyme from the basidiomycetes fungus *Termitomyces clypeatus*. *Comput Biol Chem*, 2019, **82**: 65-73
- [8] Harada H, Onoda A, Uchihashi T, *et al.* Interdomain flip-flop motion visualized in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase using high-speed atomic force microscopy during catalysis. *Chem Sci*, 2017, **8**(9): 6561-6565
- [9] Kracher D, Scheiblbrandner S, Felice A K G, *et al.* Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 2016, **352**(6289): 1098-1101
- [10] Kracher D, Forsberg Z, Bissaro B, *et al.* Polysaccharide oxidation by lytic polysaccharide monooxygenase is enhanced by engineered cellobiose dehydrogenase. *FEBS J*, 2019, **287**(5): 897-908
- [11] Tokin R, Ipsen J R, West H P, *et al.* The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. *Biotechnol Lett*, 2020, **42**(1): 10529-10539
- [12] Loose J S M, Arntzen M, Bissaro B, *et al.* Multi-point precision binding of substrate protects LPMOs from self-destructive off-pathway processes. *Biochemistry*, 2018, **57**(28): 484-517
- [13] Beeson W T, Vu V V, Span E A, *et al.* Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annu Rev Biochem*, 2015, **84**(1): 923-946
- [14] Keller M B, Badino S F, Rjel N, *et al.* A comparative biochemical investigation of the impeding effect of C1-oxidizing LPMOs on cellobiohydrolases. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100504-100515
- [15] Brander S, Lausten S, Ipsen J, *et al.* Colorimetric LPMO assay with direct implication for cellulolytic activity. *Biotechnol Biofuels*, 2021, **14**(1): 1451-1464
- [16] Bourbonnais R, Paice M G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *pleurotus sajor-caju*. *Biochem Journal*, 1988, **255**(2): 445-450
- [17] Levasseur A, Lomascolo A, Chabrol O, *et al.* The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. *BMC Genomics*, 2014, **15**(1): 1-24
- [18] Mathieu Y, Piumi C, Valli R, *et al.* Activities of secreted aryl alcohol quinone oxidoreductases from *Pycnoporus cinnabarinus* provide insights into fungal degradation of plant biomass. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82**(8): 2411-2423
- [19] Viña Gonzalez J, Jimenez Lalana D, Sancho F, *et al.* Structure guided evolution of aryl alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii* for the selective oxidation of secondary benzyl alcohols. *Adv Synth Catal*, 2019, **361**(11): 2514-2525
- [20] Serrano A, Carro J, Martínez A T. Reaction mechanisms and applications of aryl-alcohol oxidase. *Enzymes*, 2020, **47**: 167-192
- [21] Muller D. Oxidation of glucose with extracts of *Aspergillus niger*. *Biochem Z*, 1928, **199**(1): 136-170
- [22] Ahmed F, Anees A, Husain Q. Enzymatically synthesised nano-gold decorated reduced graphene oxide for development of an enhanced glucose oxidase-based amperometric biosensor. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol*, 2021, **4**(3/4): 206-221
- [23] Khatami S H, Vakili O, Ahmadi N, *et al.* Glucose oxidase: applications, sources, and recombinant production. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, **3**(2): 1-12
- [24] Li J X, Zhang W H, Tong Z R, *et al.* Fiber optic sensor modified by graphene oxide-glucose oxidase for glucose detection. *Opt Commun*, 2021, **492**(6): 126983-126989
- [25] Jithendar T, Sairam K, Verma V. Purification, characterization, thermostability and shelf life studies of glucose oxidase from *Aspergillus niger* PIL7. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2015, **6**(3): 1666-1678
- [26] Imperio D, Campo F, Panza L. Exploring glycosyl sulphates as donors for chemical glycosylation. *Org Biomol Chem*, 2021, **19**: 4930-4936
- [27] Bak T G, Sato R. Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*: I. induction of its synthesis by p-benzoquinone and hydroquinone. *Biochim Biophys Acta*, 1967, **139**(2): 265-276
- [28] Mori K, Nakajima M, Kojima K, *et al.* Screening of *Aspergillus*-

- derived FAD-glucose dehydrogenases from fungal genome database. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(11): 2255-2263
- [29] Graham E, Gottschalk A. Studies of mucoproteins I. The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1960, **38**(3): 513-524
- [30] Bak T G, Sato R. Studies on glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. IV. Histidyl residue as an active site. *Biochim Biophys Acta*, 1967, **146**(2): 328-335
- [31] Yoshida H, Sakai G, Mori K, *et al.* Structural analysis of fungus-derived FAD glucose dehydrogenase. *Sci Rep*, 2015, **5**(1): 13498-13511
- [32] Ozawa K, Iwasa H, Sasaki N, *et al.* Identification and characterization of thermostable glucose dehydrogenases from thermophilic filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101**(1): 173-183
- [33] Lee H, Lee Y S, Reginald S S, *et al.* Biosensing and electrochemical properties of flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent glucose dehydrogenase (GDH) fused to a gold binding peptide. *Biosens Bioelectron*, 2020, **165**: 112427-112435
- [34] Hirofumi K, Komori I, Furubayashi N, *et al.* Crystallographic analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2015, **71**(8): 1017-1019
- [35] Yamashita Y, Ferri S, Huynh M L, *et al.* Direct electron transfer type disposable sensor strip for glucose sensing employing an engineered FAD glucose dehydrogenase. *Enzyme Microb Technol*, 2013, **52**(2): 123-128
- [36] Janssen F W, Kerwin R M, Ruelius H W. Alcohol oxidase, a novel enzyme from a basidiomycete. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, **20**(5): 630-634
- [37] Zavec D, Troyer C, Maresch D, *et al.* Beyond alcohol oxidase: the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* utilizes methanol also with its native alcohol dehydrogenase Adh2. *FEMS Yeast Res*, 2021, **21**(2): foab009
- [38] Koch C, Neumann P, Valerius O, *et al.* Crystal structure of alcohol oxidase from *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 2016, **11**(2): e0149846
- [39] Vonck J, Parcej D N, Mills D J. Structure of alcohol oxidase from *Pichia pastoris* by cryo-electron microscopy. *PLoS One*, 2016, **11**(7): e0159476
- [40] Tjallinks G, Martin C, Fraaije M W. Enantioselective oxidation of secondary alcohols by the flavoprotein alcohol oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 2021, **704**(3): 108888-108892
- [41] Mario A, Thomas L. Pyranose oxidase identified as a member of the GMC oxidoreductase family. *Bioinformatics*, 2003(10): 1216-1220
- [42] Abrera A T, Chang H, Kracher D, *et al.* Characterization of pyranose oxidase variants for bioelectrocatalytic applications. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019, **1868**(2): 140335-140344
- [43] Mendes S, Banha C, Madeira J, *et al.* Characterization of a bacterial pyranose 2-oxidase from *Arthrobacter siccitolerans*. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, **133**(1): 34-43
- [44] Abrera A T, Sützl L, Haltrich D. Pyranose oxidase: a versatile sugar oxidoreductase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, 2020, **132**: 107409-107419
- [45] Islam T, Booker C, Tolkmachev D, *et al.* Limited proteolysis of pyranose 2-oxidase results in a stable and active complex. *PeerJ Mater Sci*, 2020, **2**: 247-252
- [46] Klinman J P. Life as aerobes: are there simple rules for activation of dioxygen by enzymes?. *J Biol Inorg Chem*, 2001, **6**(1): 1-13
- [47] Tremey E, Suraniti E, Courjean O, *et al.* Switching an O₂ sensitive glucose oxidase bioelectrode into an almost insensitive one by cofactor redesign. *Chem Commun*, 2014, **50**(44): 5912-5914
- [48] Sode K, Loew N, Ohnishi Y, *et al.* Novel fungal FAD glucose dehydrogenase derived from *Aspergillus niger* for glucose enzyme sensor strips. *Biosens Bioelectron*, 2017, **87**(15): 305-311
- [49] Tremey E, Stines-Chaumeil C, Gounel S, *et al.* Designing an O₂-insensitive glucose oxidase for improved electrochemical applications. *ChemElectroChem*, 2017, **4**(10): 2520-2526
- [50] Mano N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. *Bioelectrochemistry*, 2019, **128**: 218-240
- [51] Demin S, Hall E. Breaking the barrier to fast electron transfer. *Bioelectrochemistry*, 2009, **76**(1-2): 19-27
- [52] Xiao Y, Patolsky F, Katz E, *et al.* 'Plugging into enzymes': nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 2003, **299**(5614): 1877-1881
- [53] Holland J T, Lau C, Brozik S, *et al.* Engineering of glucose oxidase for direct electron transfer *via* site-specific gold nanoparticle conjugation. *J Am Chem Soc*, 2010, **133**(48): 19262-19265
- [54] Suraniti E, Courjean O, Counel S. Uncovering and redesigning a key amino acid of glucose oxidase for improved biotechnological applications. *Electroanalysis*, 2013, **25**(2): 606-611
- [55] Loew N, Tsugawa W, Nagae D, *et al.* Mediator preference of two different FAD-dependent glucose dehydrogenases employed in disposable enzyme glucose sensors. *Sensors*, 2017, **17**: 2636-2647
- [56] Okurita M, Suzuki N, Loew N, *et al.* Engineered fungus derived FAD-dependent glucose dehydrogenase with acquired ability to utilize hexaammineruthenium(III) as an electron acceptor. *Bioelectrochemistry*, 2018, **123**: 62-63
- [57] 闻一凡, 顾磊, 张娟, 等. 定点突变提高毕赤酵母产葡萄糖氧化酶的氧化稳定性. *食品与生物技术学报*, 2016, **35**(12): 1260-1267
- Wen Y F, Gu L, Zhang J, *et al.* *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, **35**(12): 1260-1267
- [58] Tu T, Wang Y, Huang H Q, *et al.* Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution. *Food Chem*, 2019, **281**: 163-170
- [59] 廖兆民, 蔡俊, 林建国, 等. 黑曲霉葡萄糖氧化酶基因在毕赤酵母中的表达及产酶条件的优化. *生物技术通报*, 2021, **37**(6): 97-107
- Liao Z M, Cai J, Lin J G, *et al.* *Biotechnology Bulletin*, 2021, **37**(6): 97-107
- [60] Ito K, Shimazaki J O, Kazushige M, *et al.* Designer fungus FAD glucose dehydrogenase capable of direct electron transfer. *Biosens Bioelectron*, 2018, **123**: 114-123
- [61] Bollella P, Katz E. Enzyme-based biosensors: tackling electron transfer issues. *Sensors*, 2020, **20**(12): 3517-3549
- [62] 史建国, 李一苇, 张先恩. 我国生物传感器研究现状及发展方向. *山东科学*, 2015, **28**(1): 28-35
- Shi J G, Li Y W, Zhang X E. *Shandong Science*, 2015, **28**(1): 28-35
- [63] Han Q, Gong W, Zhang Z, *et al.* Orientated immobilization of FAD-dependent glucose dehydrogenase on electrode by carbohydrate-binding module fusion for efficient glucose assay. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(11): 5529-5549

- [64] Gong W, Han Q, Chen Y, *et al.* A glucose biosensor based on glucose oxidase fused to a carbohydrate binding module family 2 tag that specifically binds to the cellulose-modified electrode. *Enzyme Microb Technol*, 2021, **150**: 109869-109878
- [65] Ortiz R, Matsumura H, F Tasca, *et al.* Effect of deglycosylation of cellobiose dehydrogenases on the enhancement of direct electron transfer with electrodes. *Anal Chem*, 2012, **84**(23): 10315-10323
- [66] Schulz C, Ludwig R, Micheelsen P O, *et al.* Enhancement of enzymatic activity and catalytic current of cellobiose dehydrogenase by calcium ions. *Electrochem Commun*, 2012, **17**: 71-74
- [67] Kracher D, Zahma K, Schulz C, *et al.* Inter-domain electron transfer in cellobiose dehydrogenase: modulation by pH and divalent cations. *FEBS J*, 2015, **282**(16): 3136-3148
- [68] Bollella P, Ludwig R, Gorton L. Cellobiose dehydrogenase: insights on the nanostructuration of electrodes for improved development of biosensors and biofuel cells. *Appl Mater Today*, 2017, **9**: 319-332
- [69] Al-Lolage F A, Meneghello M, Ma S, *et al.* A flexible method for the stable, covalent immobilization of enzymes at electrode surfaces. *ChemElectroChem*, 2017, **4**(6): 1528-1534
- [70] Ma S, Laurent C, Meneghello M, *et al.* Direct electron transfer anisotropy of a site-specifically immobilized cellobiose dehydrogenase. *ACS Catal*, 2019, **9**(8): 7607-7615
- [71] 张宇航, 杨晓炜, 张慧, 等. 生物传感器快速检测血液乙醇含量的研究进展. *牡丹江医学院学报*, 2017, **38**(3): 123-129
Zhang Y H, Yang X W, Zhang H, *et al.* *Journal of Mudanjiang Medical College*, 2017, **38**(3): 123-129
- [72] 李岭卓, 李锐, 熊小毛, 等. 发酵液中乙醇含量的测定方法. *酿酒科技*, 2018(4): 126-133
Li L Z, Li R, Xiong X M, *et al.* *Liquor-making Technology*, 2018(4): 126-133
- [73] Guilbault G G, Lubrano G J. Amperometric enzyme electrodes: Part III. Alcohol oxidase. *Anal Chim Acta*, 1974, **69**(1): 189-194
- [74] Nanjo M, Guilbault G G. Amperometric determination of alcohols, aldehydes and carboxylic acids with an immobilized alcohol oxidase enzyme electrode. *Anal Chim Acta*, 1975, **75**(1): 169-180
- [75] Verduyn C, Dijken J, Scheffers W A, *et al.* A simple, sensitive, and accurate alcohol electrode. *Biotechnol Bioeng*, 2010, **25**(4): 1049-1055
- [76] Belghith H, Romette J L, Thomas D. An enzyme electrode for on-line determination of ethanol and methanol. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**(9): 1001-1005
- [77] Gonchar M V, Maidan M M, Moroz O M, *et al.* Microbial O₂ and H₂O₂ electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements. *Biosens Bioelectron*, 1998, **13**(9): 945-952
- [78] Akyilmaz E, Dinckaya E. A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum. *Talanta*, 2001, **53**(3): 505-509
- [79] Akyilmaz E, Dinckaya E. An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosens Bioelectron*, 2005, **20**(7): 1263-1269
- [80] Lubrano G J, Faridnia M H, Palleschi G, *et al.* Amperometric alcohol electrode with extended linearity and reduced interferences. *Anal Biochem*, 1991, **198**(1): 97-103
- [81] Karyakin A, Karyakina E, Gorton L, *et al.* Prussian-blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta*, 1996, **43**(9): 1597-1606
- [82] Patel N G, Meier S, Cammann K, *et al.* Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sens Actuators B Chem*, 2001, **75**(1-2): 101-110
- [83] Gülce H, Gülce A, Kavanoz M, *et al.* A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination. *Biosens Bioelectron*, 2002, **17**(6-7): 517-521
- [84] Al-Halhouli A T, Düring L, Alahmad L, *et al.* Fabrication and testing of a photonic ethanol biosensor//IEEE. 2015 16th International Conference on Research and Education in Mechatronics. Bochum: IEEE, 2016, **3**: 1-15
- [85] Tipmanee M, Thanachasai S. Amperometric biosensors using different alcohol oxidases. *Appl Mech Mater*, 2019, **891**: 90-95
- [86] Liu E, Segato F, Prade R A, *et al.* Exploring lignin depolymerization by a bi-enzyme system containing aryl alcohol oxidase and lignin peroxidase in aqueous biocompatible ionic liquids. *Bioresour Technol*, 2021, **338**: 125564-12572
- [87] Jankowski N, Urlacher V B, Koschorreck K, *et al.* Two adjacent C-terminal mutations enable expression of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii* in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, **105**: 7743-7755
- [88] Jankowski N, Koschorreck K, Urlacher V B, *et al.* High-level expression of aryl-alcohol oxidase 2 from *Pleurotus eryngii* in *Pichia pastoris* for production of fragrances and bioactive precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**: 9205-9218
- [89] Mask A, Pmrh A, Modg A, *et al.* Enzymatic versatility and thermostability of a new aryl-alcohol oxidase from *Thermothelomyces thermophilus* M77. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, **1864**(10): 129681-129732
- [90] Lidén H, Volc J, Marko-Varga G, *et al.* Pyranose oxidase modified carbon paste electrodes for monosaccharide determination. *Electroanalysis*, 1998, **10**: 223-230
- [91] Odaci D, Telefoncu A, Timur S, *et al.* Pyranose oxidase biosensor based on carbon nanotube (CNT)-modified carbon paste electrodes. *Sens Actuators B Chem*, 2008, **132**: 159-165
- [92] Yuksel M, Akin M, Geyik C, *et al.* Offline glucose biomonitoring in yeast culture by polyamidoamine/cysteamine-modified gold electrodes. *Biotechnol Prog*, 2011, **27**: 530-538
- [93] 陈颖, 李莎, 胡婷, 等. 吡喃糖氧化酶法检测 1,5-脱水葡萄糖醇的空白限、检出限和功能灵敏度的建立及评价. *检验医学与临床*, 2019, **16**(15): 2131-2133
Chen Y, Li S, Hu T, *et al.* *Laboratory Medicine and Clinic*, 2019, **16**(15): 2131-2133
- [94] Hoque M A, Zhang Y, Li Z, *et al.* Remodeling enzyme active sites by stepwise loop insertion. *Methods Enzymol*, 2020, **643**: 111-127
- [95] Ning X Y, Zhang Y L, Yuan T T, *et al.* Enhanced thermostability of glucose oxidase through computer-aided molecular design. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(2): 425-436
- [96] 冯雁. 酶功能进化新策略及应用. *工业微生物*, 2017, **47**(1): 66-67
Feng Y. *Industrial Microbiology*, 2017, **47**(1): 66-67

Research Progress of CAZy-AA3 Family Enzymes and Their Applications in Biosensors*

ZHANG Zhen-Yu, GONG Wei-Li**, MA Yao-Hong, ZHU Si-Rong, WANG Bing-Lian,
HAN Qing-Ye, CHEN Yan-Ru

(Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

Abstract Enzymes in the “Auxiliary Activities” (AA) 3 family in the Carbohydrate-Active enZYmes Database (CAZy) belong to the glucose-methanol-choline family. All the members in AA3 family use flavin-adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor, assisting enzymes from other AA families to perform their functions *via* their reaction products (H_2O_2 or hydroquinone), or facilitating glycoside hydrolase to degrade lignocellulose. According to the structure and sequence similarity, the enzymes from AA3 family were further subdivided into 4 subfamilies, mainly including cellobiose dehydrogenase, aryl-alcohol oxidase and glucose oxidoreductase, alcohol oxidase, pyranose oxidoreductase. On account of the high expression level, efficient catalysis, diversity of biotransformation, and fast electron transport kinetics, AA3 enzymes have become an interesting target for electrochemical biosensors. In order to improve the performance parameters of biosensors, a tremendous development has been obtained in the field ranging from the production of new AA3 enzymes with tailor-designed properties, such as the improved specific activity, low O_2 sensitivity and enhanced redox mediator interaction, to their efficient immobilization in a variety of nanomaterials. Thus in this paper, we provide an overview of the phylogenetic, molecular, and catalytic properties of CAZy-AA3 family enzymes, and the latest research progress of AA3 enzymes used in electrochemical biosensors was also summarised. In the development trend of the future study, it calls for the combination of protein engineering skills with expertise on redox mediator/polymer synthesis and electrochemistry to facilitate the application of AA3 enzymes in biosensor.

Key words enzymes from AA3 family, flavin adenine dinucleotide (FAD), subfamilies, biosensor

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0223

* This work was supported by a grant from the Foundation of Qilu University of Technology of Cultivating Subject for Biology and Biochemistry (ESIBBC202010).

** Corresponding author.

Tel: 86-15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

Received: August 4, 2021 Accepted: October 28, 2021