

# AA10 家族裂解多糖单加氧酶的模块化组成及底物选择性的研究进展

乔晨曦<sup>1</sup>, 王素英<sup>1</sup>, 张宏宇<sup>\*1</sup>, 娄婷婷<sup>2</sup>, 沈洁如<sup>1</sup>, 苏新玲<sup>1</sup>

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

乔晨曦, 王素英, 张宏宇, 娄婷婷, 沈洁如, 苏新玲. AA10 家族裂解多糖单加氧酶的模块化组成及底物选择性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1291-1309.

QIAO Chenxi, WANG Suying, ZHANG Hongyu, LOU Tingting, SHEN Jieru, SU Xinling. Research progress in modular composition and substrate selectivity of AA10 lytic polysaccharide monooxygenases[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1291-1309.

**摘要:** AA10 家族裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)主要分布于细菌中, 因其具有催化纤维素和几丁质等结晶多糖氧化降解的特性, 在工业生物质转化过程中具有极强的应用潜力, 从而受到广泛关注。然而, AA10 家族不同 LPMOs 作用的底物种类及氧化位点和氧化产物也不尽相同, LPMOs 的结构与组成对其底物选择性的影响机制有待进一步探究。因此, 本文综述了 AA10 家族 LPMOs 的模块化结构组成及其催化机制, 梳理了 AA10 家族 LPMOs 的底物谱, 系统总结了 AA10 家族 LPMOs 的结构、关键作用残基及多模块组合对底物选择性影响的最新进展, 并展望了 LPMOs 在生物质转化和生物燃料工业中广阔的应用前景。

**关键词:** 生物质; 生物催化; 裂解多糖单加氧酶; 底物选择性

资助项目: 2021 年天津市研究生科研创新项目(2021YJSS297); 天津市大学生创新创业训练计划项目(202210069236)  
This work was supported by the 2021 Tianjin Graduate Research and Innovation Project (2021YJSS297) and the Tianjin Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202210069236).

\*Corresponding author. E-mail: zhanghongyu@tjcu.edu.cn

Received: 2022-07-08; Accepted: 2022-09-12; Published online: 2022-11-04

## Research progress in modular composition and substrate selectivity of AA10 lytic polysaccharide monoxygenases

QIAO Chenxi<sup>1</sup>, WANG Suying<sup>1</sup>, ZHANG Hongyu<sup>\*1</sup>, LOU Tingting<sup>2</sup>, SHEN Jieru<sup>1</sup>, SU Xinling<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

<sup>2</sup> Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Customs, Tianjin 300461, China

**Abstract:** AA10 lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) mainly exist in bacteria. They have great application potential in industrial biomass conversion because of the ability in degrading crystalline polysaccharides such as cellulose and chitin and thus have attracted wide attention. However, the substrates, oxidation sites, and oxidation products vary among different AA10 LPMOs, and the influence mechanism of the structure and composition of LPMOs on the substrate selectivity remains to be explored. This paper introduced the modular structure, catalytic mechanism, and substrate spectrum of AA10 LPMOs. Further, we reviewed the research progress in the effects of structure, critical functional residues, and module combination of AA10 LPMOs on substrate selectivity. On this basis, we put forward the application prospects of LPMOs in biomass conversion and biofuel industry.

**Keywords:** biomass; biocatalysis; lytic polysaccharide monoxygenases; substrate selectivity

由于化石能源的不可再生性，全球能源和资源紧张的趋势日益严峻，木质纤维素和几丁质分别作为理想的燃料和工农业、医疗用品相关材料的主要替代来源，在实现可持续发展和碳中和目标时所扮演的角色越来越重要<sup>[1]</sup>。木质纤维素是地球上储量最丰富的可再生资源，纤维素含量可观，将其转化为能源不但可以缓解化石燃料短缺的危机，而且可以减少环境污染<sup>[2]</sup>。但是，由于植物细胞壁中的天然纤维素多是以顽固的结晶状态存在，结构整齐致密，形成了天然的抗降解屏障，阻隔了纤维素酶等糖苷水解酶对结晶区域多糖链的可及性，从而阻碍了糖苷水解酶对结晶纤维素的有效降解<sup>[3]</sup>。几丁质是自然界第二丰富的生物质，几丁质及其降解产物在食品、化妆品、医药、纺织工业、废水处理和农业中具有广泛应用<sup>[4]</sup>。然而几丁

质也存在着与木质纤维素同样的问题，即降解难度大、耗能高及环境污染严重。因此，如何增强顽固性多糖结晶区域的降解效率激发了人们对新型酶的挖掘和探索<sup>[5-6]</sup>。

近年来，裂解多糖单加氧酶 (lytic polysaccharide monoxygenases, LPMOs) 的发现彻底刷新了人们对酶法降解结晶多糖的认识<sup>[7]</sup>。LPMOs 是一类铜离子依赖的对纤维素和几丁质具有氧化裂解作用的单加氧酶，在古生菌、细菌、真菌和病毒中都有发现，可显著提高纤维素酶和几丁质酶的活性<sup>[8-13]</sup>。随着新型 LPMOs 晶体结构的获得及功能的验证，发现 LPMOs 对底物具有不同于糖苷水解酶的切割断键机制，而且从分类上并不属于糖苷水解酶家族<sup>[9,12]</sup>。研究发现，LPMOs 通过氧化裂解顽固性多糖的结晶结构，为糖苷水解酶提供更多

的结合位点,从而增加糖苷水解酶对底物的可及性来促进糖苷水解酶体系对可溶性底物的降解<sup>[10,14]</sup>。因此在 2013 年, LPMOs 被归入碳水化合物活性酶(carbohydrate active enzyme, CAZY, <http://www.cazy.org>)数据库的辅助活性(auxiliary activities, AA)家族<sup>[15]</sup>。根据 LPMOs 氨基酸序列及功能的相似性,在 CAZY 数据库中将其分为 AA9-11 和 AA13-16 辅助活性家族。其中 AA9、10 家族发现最早,目前对 AA9 家族的研究报道比较详尽,已有文章对该家族的相关研究进行了详细的总结归纳<sup>[16-18]</sup>。研究发现,与 AA9 家族 LPMOs 相比较,AA10 家族 LPMOs 分布广泛,其模块化结构域的组成和底物谱具有多样性,但目前未有文献对其进行系统的分析和归纳。AA10 家族 LPMOs 主要分布在细菌的变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*),还有少数分布在病毒、真菌、昆虫和古生菌中<sup>[15]</sup>。截至目前,CAZY 数据库共收录 AA10 家族的 LPMOs 7 833 个,7 558 个蛋白来源于细菌,260 个蛋白来源于病毒,11 个来源于真菌,2 个来源于古生菌,2 个未被鉴定。AA10 家族 LPMOs 的模块化组成不限于 AA9 家族中已报道的碳水化合物结合模块,还包括其他功能化模块。AA10 家族 LPMOs 不仅可以作用于纤维素和几丁质,还有少数酶对半纤维素(如木聚糖、甘露聚糖)也有氧化降解作用<sup>[19-21]</sup>。此外,以天然生物质作为底物进行降解发现,有些 LPMOs 对玉米壳、稻草等具有一定降解能力<sup>[20,22-23]</sup>,这一特性使得 AA10 家族 LPMOs 在生物炼制中具有重要的应用潜力。然而,它们的底物选择性机制尚不明确,需要进一步探究。为此,本文首先介绍了 AA10 家族 LPMOs 模块化结构的组成及其催化机制,对 AA10 家族 LPMOs 的底物谱进行了梳理,着重

从 LPMOs 的结构、活性中心关键作用残基及 LPMOs 功能模块组成等方面分析了其底物的特异性识别机制,展望了 AA10 家族 LPMOs 的研究难点和未来的发展前景,以期为 LPMOs 基础和应用的科学研究提供一定的参考和科学依据。

## 1 AA10 家族 LPMOs 模块化结构的组成

LPMOs 的结构域组成既有单一模块形式,也有多模块组合的形式。首次报道的 LPMOs (来源于 *Serratia marcescens* 的 SmAA10A<sup>[24]</sup>)只含有 1 个 AA10 家族的催化结构域,随着越来越多 LPMOs 的结构被解析,人们发现部分 LPMOs 含有多个结构域且具有多样性。Horn 等<sup>[25]</sup>证实 30% 的 AA10 家族 LPMOs 序列除保守的 AA10 催化结构域模块外还包含 1 个或多个其他功能模块。研究证实,含有 1 个以上催化结构域的 LPMOs 在降解结晶多糖方面要优于单结构域的 LPMOs<sup>[26]</sup>。Book 等<sup>[27]</sup>对 AA9 和 AA10 家族 LPMOs 氨基酸序列进行系统发育分析,发现 AA10 家族 LPMOs 的模块化组成变化更大,其变化不限于碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs),还包括其他功能化模块。目前已表征的 AA10 家族 LPMOs 的结构域组成类型具有多样性(表 1)。部分已知的 LPMOs 包含 1 个 AA10 催化结构域模块和 1 个或多个 CBMs 模块,在 AA10 家族中 CBMs 模块主要包括 CBM2、CBM3、CBM5/12、CBM10 和 CBM73 等(图 1)。有些 LPMOs 还包含其他功能结构域,如纤维连接蛋白结构域(fibronectin type III, FNIII)、未知结构域 X1 等。例如,来源于 *Bacillus thuringiensis* 的 BtLPMO10A,除 1 个 AA10 催化结构域模块

表 1 AA10 家族中已验证功能的 LPMOs  
Table 1 AA10 LPMOs with proven functions

| GenBank accession No. | Enzyme name                                   | Associated CBMs                | Substrate         | Oxidized position | References |
|-----------------------|---|--------------------------------|-------------------|-------------------|------------|
| AJP62637.1            | Lpmo10A; BtLPMO10A                            | CBM5/12, two FNIII             | Chitin            | C1                | [28-29]    |
| CAB61600.1            | CelS2; ScLPMO10C; ScAA10C; SCO1188; SCG11A.19 | CBM2                           | Cellulose         | C1                | [30-34]    |
| CAB61160.1            | ScLPMO10B; SCO0643; SCF91.03c                 | NA                             | Cellulose         | C1/C4             | [32]       |
| ACV09037.1            | Jden_1381; JdLPMO10A; LPMO10A                 | CBM5/12; GH18                  | Chitin            | NA                | [35-37]    |
| –                     | JdLPMO10B                                     | CBM2                           | Cellulose         | NA                | [36]       |
| CBI42985.1            | ChbB; BaAA10A; BaCBM33; Rbam17540; BAMF_1859  | NA                             | Chitin            | C1                | [38]       |
| ATI74801.1            | BlLpmo10A                                     | NA                             | Chitin            | C1                | [31,39]    |
| AAU88202.1            | bp21; CBP21; Cbp; SmAA10; A; SmLPMO10A        | NA                             | Chitin            | NA                | [24,26,31] |
| ADL45185.1            | MaLPMO10B                                     | CBM2                           | Cellulose, chitin | C1, C4, C1/C4     | [26,31]    |
| AAU39477.1            | ChbB; Cbp; BliCBP; BlAA10A; BLi00521; BL00145 | NA                             | Chitin            | C1                | [40]       |
| ACE83992.1            | CjLPMO10A; CJA_2191                           | CBM5/12; CBM73                 | Chitin            | NA                | [31,41]    |
| ACE84760.1            | CjLPMO10B; CJA_3139                           | CBM10                          | Cellulose         | C1                | [41]       |
| AAO80225.1            | EfAA10A; EF0362; EfCBM33A; EfaCBM33           | NA                             | Chitin            | C1                | [42]       |
| AAO80225.1            | EfLPMO10A                                     | NA                             | Chitin            | NA                | [42]       |
| CAJ89556.1            | SamLPMO10B                                    | NA                             | Chitin            | C1                | [43]       |
| CAJ90160.1            | SAML1174                                      | CBM2                           | Cellulose         | NA                | [43]       |
| BAG23684.1            | SGR_6855; SgLPMO10F                           | NA                             | Chitin            | C1                | [44]       |
| EOY47895.1            | SlLPMO10E; SLI_3182                           | NA                             | Chitin            | NA                | [45]       |
| AAZ55306.1            | Tfu_1268; E7; TfLPMO10A                       | CBM2; X1                       | Cellulose, chitin | C1/C4             | [32,46-48] |
| AAZ55700.1            | E8; TfAA10B; Tfu_1665                         | CBM2; X1                       | Cellulose         | C1                | [32,46]    |
| AAF96709.1            | GbpA; VcGbpA; VcAA10B; VCA0811                | CBM5/12; GbpAD2; GbpAD3; CBM73 | Chitin            | NA                | [49]       |
| ABA49030.1            | BpAA10A                                       | NA                             | Chitin            | NA                | –          |
| AEO07443.1            | LMRG_01781; GbpA; LmLPMO10; Lmo2467           | Two CBM5/12; two FNIII         | Cellulose, chitin | NA                | [50]       |
| –                     | MaLPMO10C                                     | NA                             | Chitin            | C1                | [26]       |
| D9T1F0                | MaLPMO10D                                     | CBM2                           | Cellulose, chitin | C1/C4             | [26]       |
| –                     | MaLPMO10E                                     | NA                             | Cellulose         | C1                | [26]       |
| AEE44415.1            | CfiLPMO10; Celf_0270                          | CBM2                           | Chitin            | C1/C4             | [21]       |
| ADG73094.1            | CflaLPMO10A; Cfla_0175                        | CBM2                           | Cellulose         | C1                | [21]       |
| ADG73091.1            | CflaLPMO10B; Cfla_0172                        | CBM2                           | Cellulose, xylan  | C1/C4             | [21]       |
| ADG73234.1            | CflaLPMO10C; Cfla_0316                        | CBM2                           | Cellulose, xylan  | C1/C4             | [21]       |
| AAF22274.1            | ManA; CcAA10A                                 | Two CBM3, GH5                  | Mannan            | NA                | [51]       |
| ABC27701.1            | HcAA10-2; HCH_00807                           | CBM2                           | Cellulose         | C1                | [52]       |
| CAE14645.1            | CbpL; plu2352                                 | NA                             | Chitin            | NA                | [53]       |

(待续)

(续表 1)

| Genbank accession No. | Enzyme name         | Associated CBMs          | Substrate                | Oxidized position | References |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|------------|
| BAG17028.1            | SGR_199; SgLPMO10A  | CBM2                     | Cellulose, chitin        | NA                | [54]       |
| ADW01716.1            | Sfla_0248           | NA                       | Chitin                   | NA                | -          |
| ACR14100.1            | TERTU_0046; TtAA10A | CBM10                    | Cellulose                | NA                | [53,55]    |
| AFR32946.1            | Tma12               | NA                       | Chitin                   | NA                | [56]       |
| BAA25629.1            | ACV034              | NA                       | NA                       | NA                | [57]       |
| AAP09751.1            | BcLPMO10A           | CBM5/12, two FNIII       | Chitin                   | C1                | [58]       |
| MT882343              | AA10_07             | CBM2                     | Cellulose                | NA                | [59]       |
| AIY28331.1            | PcAA10A             | CBM5/12, CBM3, two FNIII | Cellulose, xylan         | NA                | [20]       |
| -                     | KpLPMO10A           | NA                       | Cellulose, chitin, xylan | C1/C4, C1         | [19]       |
| WP_099398589.1        | Cm3403              | NA                       | Chitin                   | NA                | [60]       |
| WP_039915213.1        | CmAA10              | NA                       | Chitin                   | C1                | [61]       |
| ADP32663              | BatLPMO10           | NA                       | Chitin                   | C1                | [62]       |

NA: 不含有或尚未阐明; -: 无数据报道; CBMs: 碳水化合物结合结构域; FNIII: 纤连蛋白III; GHs: 糖苷水解酶结构域; GbpADs: GbpA 特有结构域; X1: 未知功能的保守结构域

NA: None or not specified; -: No data reported; CBMs: Carbohydrate binding domain; FNIII: Fibronectin type III; GHs: Glycoside hydrolase domain; GbpADs: GbpA specific domain; X1: A conservative domain of an unknown function.

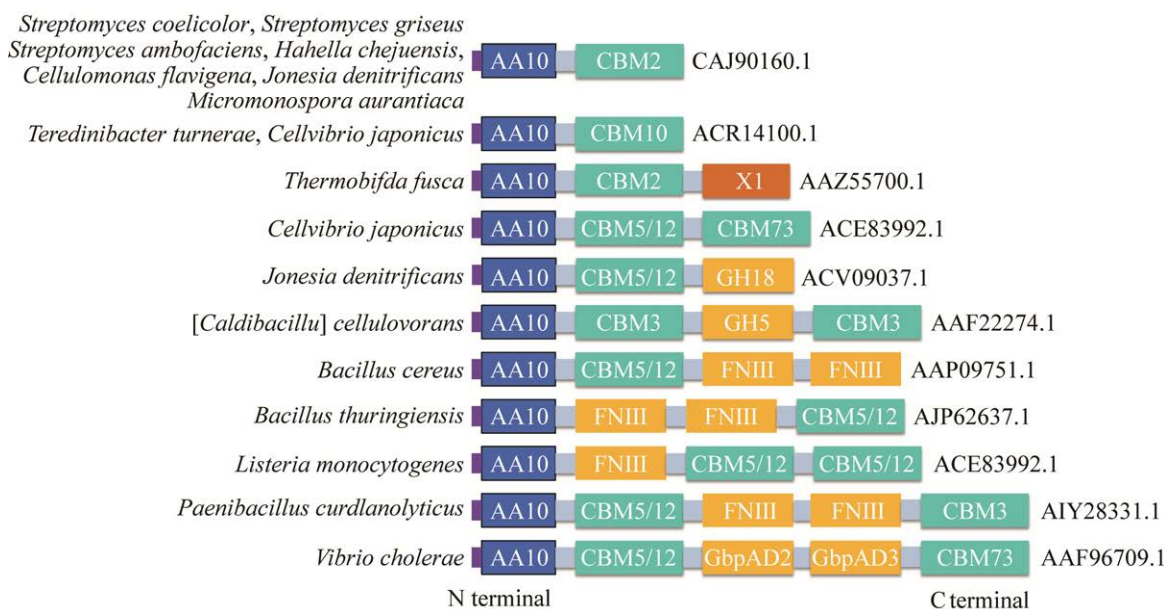


图 1 已表征的 AA10 家族 LPMOs 多模块组成类型 AA10: LPMOs 催化模块; CBMs: 碳水化合物结合模块; X1: 未知功能的保守模块; FN: 纤维连接蛋白; GbpA: 该酶特有结构域; N 端紫色: 信号肽

Figure 1 Multi-modular composition of characterized AA10 LPMOs. AA10: LPMOs catalytic module; CBMs: Carbohydrate-binding module; X1: Conservative module for unknown function; FN: Fibronectin; GbpA: A domain specific to that enzyme; N-terminal purple: Signal peptide.

和 CBM5 模块外, 还有两个 FNIII 模块<sup>[28]</sup>。这些结构域之间由柔性连接体进行连接, 这些连接体无序但具有延伸性, 在各个结构域之间形成间隔, 并保证结构域彼此能够独立移动<sup>[30]</sup>。此外, 也有少量 LPMOs 具有其他催化结构域模块, 如糖苷水解酶结构域(glycoside hydrolases, GHs), 主要是 GH5 和 GH18。2020 年 Mekasha 等<sup>[35]</sup>在对来源于 *Jonesia denitrificans* 的具有几丁质氧化降解活性的 JdLPMO10A 的功能进一步研究发现, JdLPMO10A 独特地结合了两种不同的多糖降解活性, 既有 LPMOs 的辅助活性又具有糖苷水解酶降解活性。该酶同时含有 AA10 催化结构域模块和 GH18 催化结构域模块, 因此, 推测正是其特殊的结构组成拓展了酶的功能。JdLPMO10A 的几丁质降解活性可与已知的几丁质酶和 *S. marcescens* 的 LPMOs 协同作用活性相媲美或超过其活性<sup>[35]</sup>。此双功能酶的发现为开发生物质转化的高效催化剂开辟了新的途径。

## 2 LPMOs 的催化机制

自从发现 LPMOs 可以提高单糖产量以来, 其异常平坦的底物结合面成为研究的焦点。Li 等<sup>[63]</sup>最早提出了 1 种基于超氧化物的催化机理, 即底物的 C1-H 或 C4-H 键中的 1 个氢原子被超氧化物吸收。Vu 等<sup>[64]</sup>发现, 由于 LPMOs 的多样性, LPMOs 所作用的底物种类及对底物分子的氧化区域都表现出了巨大的差异, AA9 家族 LPMOs 可以归为 LPMO1、LPMO2 和 LPMO3 这 3 个类型, LPMO1 只氧化葡萄糖苷的 C1 位, LPMO2 只氧化葡萄糖苷 C4 位; LPMO3 氧化葡萄糖苷 C1 和 C4 位。LPMOs 结合底物后, 首先要接受电子供体提供的电子, 通过电子传递链传递给活性中心的 Cu(II), 将其还原为 Cu(I)<sup>[5]</sup>。Bey 等<sup>[65]</sup>发现 LPMOs 对多

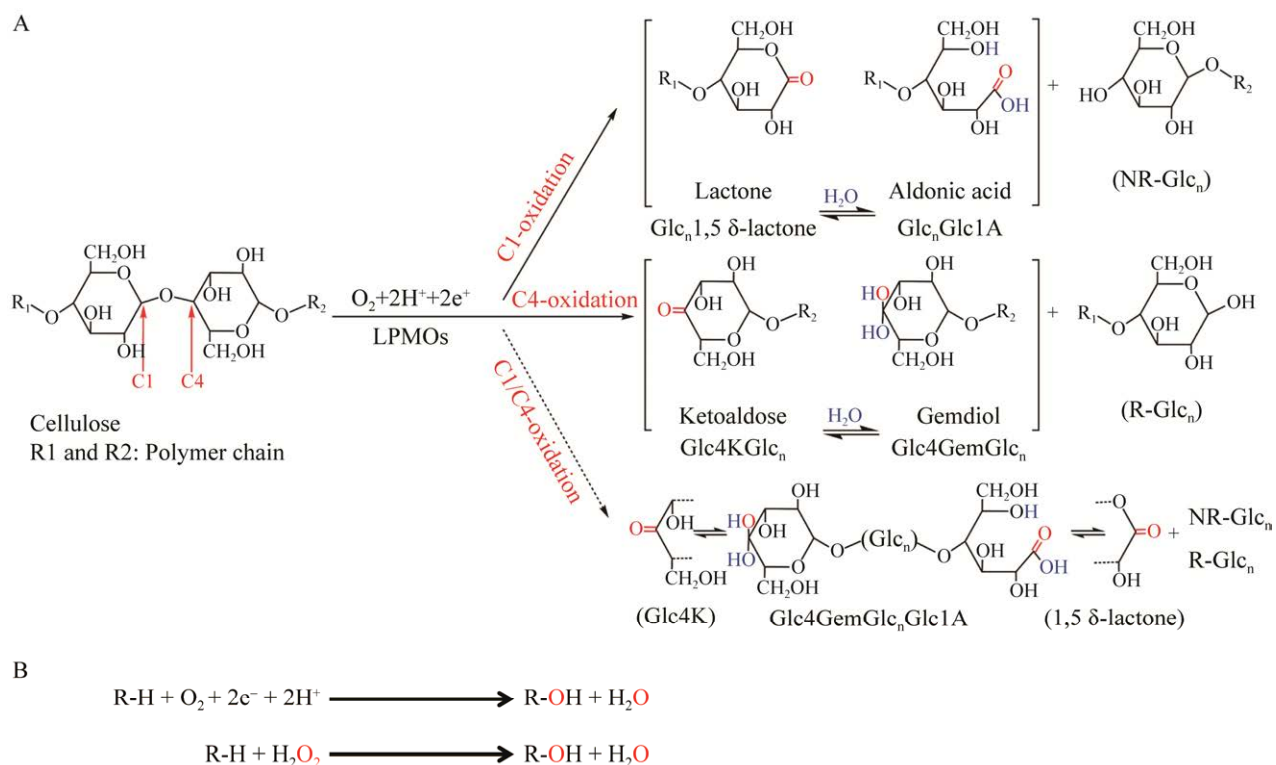
糖作用的产物分布随反应过程中纤维二糖脱氢酶(CDH)相对含量的变化而变化, 表明对 LPMOs 电子供应的差异可能是 LPMOs 催化过程中的一个决定因素。2013 年, Hemsworth 等<sup>[66]</sup>首次报道了含 Cu(II)的 AA10 家族 LPMOs 的晶体结构, 证明了 Cu(II)在 X 射线作用下被还原为 Cu(I)。此外, Kjaergaard 等<sup>[67]</sup>研究表明, 外源配体在铜离子上的还原解离是通过一种简单的游离机制进行的, 而不是通过联合置换。大多研究认为, 在反应过程中, 其中 1 个电子将 LPMOs 结合的 Cu(II)还原为 Cu(I), 然后结合分子氧, 并从多糖底物的 C1 或 C4 位置获取质子<sup>[1]</sup>; 第 2 个电子可引起底物的羟基化和糖苷键的断裂<sup>[13]</sup>。在大多数情况下, 抗坏血酸可作为 LPMOs 的电子供体, 也可以从其他各种分子和酶系统中获得电子<sup>[13,68]</sup>。

综合已报道的 LPMOs 催化特点及其他铜单加氧酶的催化机制, Walton 等<sup>[69]</sup>提出了 LPMOs 可能的两种催化机制(图 2)<sup>[26,70]</sup>: 一种为 LPMOs 在与底物结合之前与 O<sub>2</sub> 结合, 而且在催化开始时与底物解离。这种解离可能是短暂的, 但该方案假设的前提是活性部位必须暴露在溶液中, 否则 O<sub>2</sub> 不会与酶结合; 另一种机制为 LPMOs 首先与底物结合, 但在 LPMOs 的结合表面和底物之间存在可以接触到 O<sub>2</sub> 的活性位点<sup>[69]</sup>。这一假设在 Frandsen 等<sup>[71]</sup>的研究中得到了结构上的支持, 该结构表明在 LPMOs 和底物之间形成了一个可接近溶液的 O<sub>2</sub> 结合空穴。Walton 等<sup>[69]</sup>推测真实的 LPMOs 催化机制可能是两个方案共同作用的结果。

## 3 AA10 家族 LPMOs 的底物谱

### 3.1 纤维素和几丁质

2005 年, Vaaje-Kolstad 等<sup>[11]</sup>在黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*)中发现了一种非催化蛋白 CBP21,



**图 2 典型 LPMOs 的催化机理** A: LPMOs 对纤维素的氧化裂解, 其中 NR-Glc<sub>n</sub> 指天然非还原性末端, R-Glc<sub>n</sub> 指天然还原性末端<sup>[26]</sup>. B: 以 O<sub>2</sub> 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为共底物驱动的两 LPMOs 反应机理的一般反应方案<sup>[70]</sup>

Figure 2 Catalytic mechanism of typical LPMOs. A: Oxidative cracking of cellulose by LPMOs, where NR-Glc<sub>n</sub> refers to the natural non-reducing terminal and R-Glc<sub>n</sub> refers to the natural reducing terminal<sup>[26]</sup>. B: General reaction scheme of two LPMOs reaction mechanisms driven by O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as co-substrate<sup>[70]</sup>.

属于 AA10 家族 LPMOs, 其不但可以增加水解酶对几丁质的转化率, 而且在电子供体、二价金属离子和氧气的存在下, 可以氧化裂解几丁质的糖苷键, 生成 C1 位氧化产物, 通过核磁共振和等温量热滴定实验证实 CBP21 活性位点的金属离子是铜离子<sup>[13,72]</sup>。随后大量研究证实, AA10 家族蛋白能以协同氧化方式提高纤维素酶的活性。但是, 不同的酶对应的氧化产物不同<sup>[10]</sup>。同样是来源于天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)的 CelS2 蛋白, 可催化纤维素产生 C1 位氧化产物, 而 ScLPMO10B 可催化纤维素产生 C1 和 C4 位氧化产物<sup>[32]</sup>。对 CAZy 数据

库中已收录的所有 AA10 家族 LPMOs 氨基酸序列进行系统发育分析发现, 所有具有几丁质活性的 LPMOs 都只氧化 C1 位碳原子, 而那些作用于纤维素的 LPMOs 要么只氧化 C1 位置, 要么产生 C1 和 C4 氧化产物的混合物<sup>[32]</sup>。此外, 还有一些 LPMOs 既能氧化纤维素中 C1 和 C4 位置, 也能氧化几丁质中的 C1 位碳原子<sup>[26]</sup> (图 3)。C1 位置氧化, 产生对应的醛糖酸内酯, 内酯自发水解形成醛糖酸<sup>[73]</sup>; C4 位置氧化, 产生对应的 4-酮基醛糖<sup>[74]</sup>; 具有混合 C1/C4 活性的 LPMOs 可产生双氧化产物, 即生成醛糖酸内酯和 4-酮基醛糖<sup>[32]</sup> (图 3)。

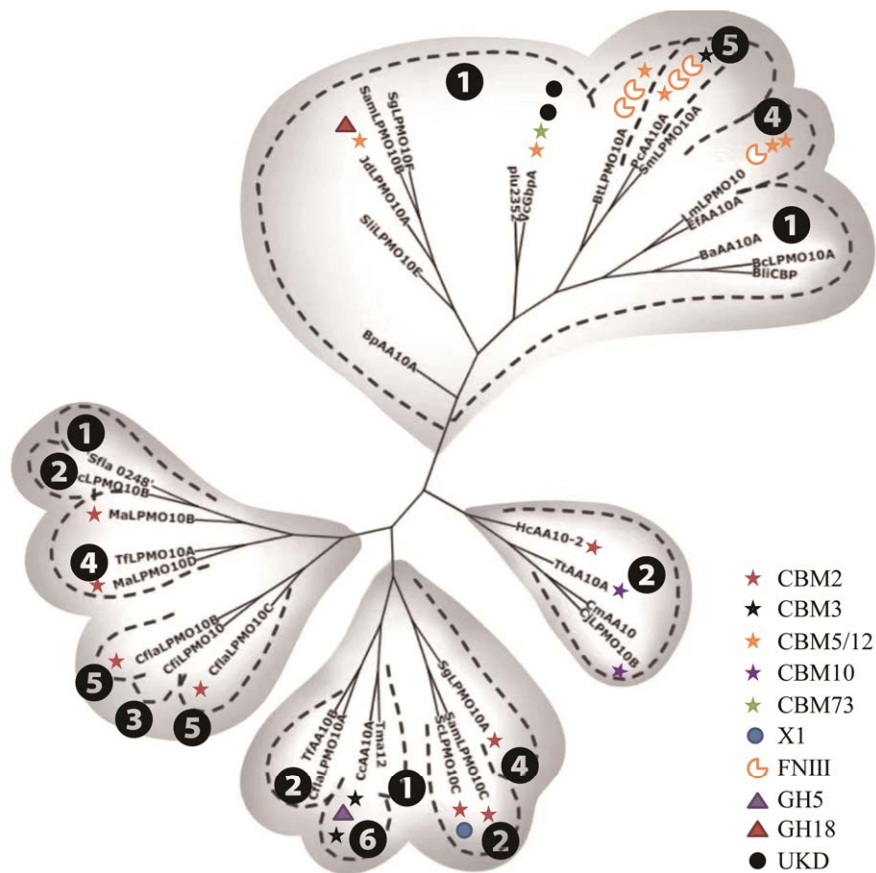


图3 AA10 家族 LPMOs 系统发育树及其底物谱 圆圈序号代表作用底物种类, ①: C1 几丁质; ②: C1 纤维素; ③: C1/C4 纤维素; ④: C1/C4 纤维素、几丁质; ⑤: C1/C4 纤维素、木聚糖; ⑥: C1/C4 纤维素、甘露聚糖; 图标符号代表结构域

Figure 3 Phylogenetic tree and substrate spectrum of AA10 LPMOs. The circle numbers represented the acting substrate types, ①: C1 chitin; ②: C1 cellulose; ③: C1/C4 cellulose; ④: C1/C4 cellulose, chitin; ⑤: C1/C4 cellulose, xylan; ⑥: C1/C4 cellulose and mannan; The icon symbol represents a domain.

研究表明, 来自同一微生物的不同 LPMOs 可具有不同的底物降解活性, 而有些 LPMOs 自身可具有多种底物活性, 如同时具备纤维素和几丁质活性<sup>[32,50,54,61]</sup> (图 3)。2014 年, Gardner 等<sup>[75]</sup>发现来自植物细胞壁降解细菌 *Cellvibrio japonicus* 的 CjLPMO10B 具有 C1 位氧化的纤维素活性, 而 Forsberg 等<sup>[41]</sup>于 2016 年表征了同样来源于 *C. japonicus* 的 CjLPMO10A, 发现其并不具有纤维素活性, 而是对几丁质底物有氧化

降解作用, 氧化位点在 C1 位置。与之类似的还有来源于 *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 的 SamLPMO10B 和 SamLPMO10C, 前者具有 C1 位氧化的几丁质活性, 而后者具有 C1 位氧化的纤维素活性<sup>[43]</sup>。之后, Forsberg 等<sup>[26]</sup>又对来源于 *Micromonospora aurantiaca* 的一系列 LPMOs 进行了表征及氧化活性位点研究, 发现 MaLPMO10B 和 MaLPMO10D 具有 C1/C4 纤维素活性, MaLPMO10E 具有 C1 位氧化纤维素活



性, MaLPMO10C 具有 C1 位氧化几丁质活性。突变分析表明催化中心铜离子附近的氨基酸残基可能参与了底物定位, 是决定 C1:C4 产物比例的主要因素<sup>[26]</sup>。

### 3.2 半纤维素

半纤维素在结构上比纤维素更复杂, 主要包括木聚糖、甘露聚糖和木葡聚糖等。半纤维素结晶度较低, 结构分支和乙酰化使其较难分解<sup>[25]</sup>。目前发现的 AA10 家族 LPMOs 主要用于半纤维素中的木聚糖和甘露聚糖, 但对于半纤维素的活性通常不会单独出现, 它们总是伴随纤维素、几丁质氧化活性同时出现, 来源于 *Caldibacillus cellulovorans* 的 CcAA10A 为一个特例, 只具有甘露聚糖活性<sup>[51]</sup>。对这些具有木聚糖或甘露聚糖活性的 LPMOs 的结构域组成分析发现, 它们都含有 CBMs 模块或 GHs 模块, 而这两类结构域分别具有木聚糖活性和甘露聚糖活性(表 2)。例如, 来源于 *Cellulomonas flavigena* 的多结构域 CflaLPMO10B、CflaLPMO10C 都具有纤维素、木聚糖氧化活性<sup>[21]</sup>; 来源于

表 2 AA10 家族 LPMOs 中各功能模块对应底物选择性<sup>[11]</sup>

Table 2 Substrate preferences for protein functional modules of AA10 LPMOs<sup>[11]</sup>

| Module name | Acting substrate or function            |
|-------------|---|
| AA10        | LPMO10 catalytic domain                 |
| CBM2        | Chitin, cellulose, xylan                |
| CBM3        | Cellulose, chitin                       |
| CBM5/12     | Chitin, cellulose                       |
| CBM10       | Cellulose                               |
| CBM73       | Chitin                                  |
| FNIII       | Various soluble and insoluble substrate |
| GH5         | Cellulose, mannan, chitosan, xylan      |
| GH18        | Chitin, chitosan                        |

CBMs: 碳水化合物结合结构域; FN: 纤连蛋白; GHs: 糖苷水解酶结构域

CBMs: Carbohydrate binding domain; FN: Fibronectin; GHs: Glycoside hydrolase domain.

*Kitasatospora papulosa* 的 KpLPMO10A 具有纤维素、几丁质、木聚糖氧化活性<sup>[19]</sup>。2020 年, Limsakul 等<sup>[20]</sup>对来源于 *Paenibacillus curdlanolyticus* 的多结构域 PcAA10A 进行底物谱分析发现, 此酶的 AA10 催化结构域对纤维素、几丁质、木聚糖、甘露聚糖均有活性, 反而其整体蛋白丧失了甘露聚糖活性。

### 3.3 复合型多糖底物

玉米壳、甘蔗渣和稻草是生产燃料和材料的主要木质纤维素原料。玉米壳和稻草都是粮食生产的副产品, 玉米壳中含有 43.8%纤维素、39.6%半纤维素(主要是木聚糖)、14.3%木质素<sup>[76]</sup>, 而稻草含有 30%的纤维素、10.4%木聚糖、23.3%木质素<sup>[77]</sup>。木质纤维素生物质的生物转化过程具有挑战性, 因为其复杂的结晶结构, 特别是含有木聚糖和木质素的结晶和复合纤维素<sup>[78]</sup>。在酶法降解纤维素过程中通常使用化学预处理去除半纤维素和木质素成分, 增加无定形纤维素, 使纤维素更容易被糖苷水解酶所利用。然而, 化学预处理具有产生有毒物质, 抑制纤维素水解酶和微生物生长, 以及增加水处理成本并浪费能源等缺点<sup>[79]</sup>。目前发现 AA10 家族的 LPMOs 对玉米壳<sup>[20]</sup>和稻草<sup>[52]</sup>有一定的降解作用, 玉米壳和稻草也常用于测试 LPMOs 的活性<sup>[22-23]</sup>。Limsakul 等<sup>[20]</sup>在比较 PcAA10A 和催化结构域多肽(PcAA10A\_CD)对复合型结晶多糖(玉米壳、稻草)的降解效果时发现, 二者对玉米壳的降解效果要好于稻草, 推测可能是由于玉米壳中木聚糖的含量高于稻草, 而玉米壳中阻碍木质纤维生物质酶降解的木质素含量<sup>[79]</sup>低于稻草, 从而降低了对稻草的降解。另外还发现 PcAA10A 无须化学前处理即可降解木质纤维生物质中的多糖, 具有对环境友好、能耗低、废物管理少等优点<sup>[20]</sup>。

## 4 AA10 家族 LPMOs 对底物的选择性

### 4.1 AA10 家族 LPMOs 的结构与底物选择性的关系

蛋白质的结构决定其功能。不同家族 LPMOs 的成员虽然序列一致性较低,但他们的结构具有很大的相似性。LPMOs 都具有 1 个轻微扭曲的纤维连接蛋白样/免疫球蛋白样  $\beta$ -夹心的核心结构,由 2 个  $\beta$  折叠片组成,共有 7 条或 8 条  $\beta$  链<sup>[80]</sup>。延伸的平坦表面可以通过  $\alpha$ -螺旋环扩大,平坦的表面使 LPMOs 能够结合到结晶多糖的表面,通过氧化机制裂解糖苷键;暴露于溶剂的活性部位由两个完全保守的组氨酸组成,1 个是 N 端残基,两个组氨酸侧链和 N 端氨基以一种称为组氨酸支架的排列方式协调铜离子形成 T 形几何构型<sup>[26]</sup>(图 4)。因为这个铜位点在所有类型的 LPMOs 中都是保守的,所

以酶的性能、底物特异性和氧化区域选择性的变化由组成结合表面的氨基酸的变化决定<sup>[26]</sup>。所有 LPMOs 都包含多个延伸环,通过它们形成底物结合表面,参与多糖的识别和结合;由于底物特异性的不同,这些环包含了与 LPMOs 底物结合有关的各种亲水性和芳香性氨基酸残基<sup>[56]</sup>。

AA10 家族具有几丁质活性的 LPMOs 包含更多的亲水性氨基酸,如苏氨酸、谷氨酰胺或丝氨酸,与纤维素底物相比,它可以通过极性相互作用结合更具亲水性的几丁质表面(乙酰氨基葡萄糖)<sup>[63,81]</sup>。来源于 *Streptomyces lividans* 具有几丁质氧化活性的 SliLPMO10E,其整个结构由 7 条反平行链组成,排列成两片;一片包含 3 条反平行链(S1、S3 和 S6),另一片包含 4 条反平行链(S4、S5、S7 和 S8)(图 4)<sup>[45]</sup>。这种扭曲的夹心折叠与其他 AA10 家族 LPMOs 结构<sup>[32,49,66]</sup>的折叠是一致的。链 S1 和 S3 之间是环 2 区域,它决定了不同家族 LPMOs 之间在

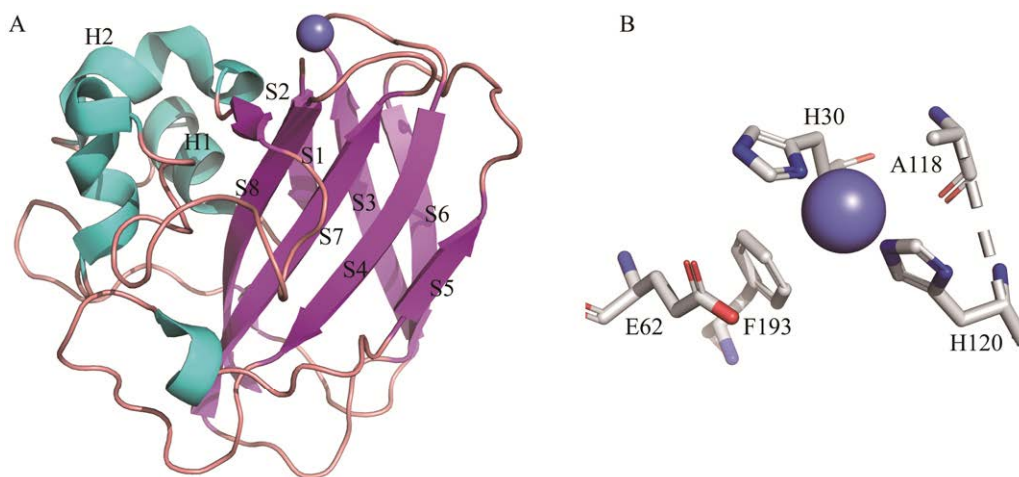


图 4 SliLPMO10E 的 X 射线晶体结构示意图<sup>[45]</sup> A: 图中  $\beta$ -片状折叠显示为紫色,环 2 区域显示为青色,二硫键以粉色表示,铜原子以球状表示。B: 图中棒状表示活性中心,配位的 His 残基为银色,深蓝色球状物为铜原子

Figure 4 X-ray crystal structure diagram of SliLPMO10E<sup>[45]</sup>. A: The  $\beta$ -sheet fold in the figure is purple, the loop 2 region is cyan, the disulfide bond is pink, and copper atom is spherical. B: The rod-like structure represents an active center, the coordinated His residue is silver, and the deepblue ball is copper atom.

大小上的差异;在 SlLPMO10E 中,该区域由两个  $\beta$ -螺旋(H1 和 H2)和 1 个小的  $\beta$ -链(S2)组成;还存在两个二硫键, Cys43/Cys51 和 Cys78/Cys196,后者将环 2 连接到 C-末端  $\beta$  链(S8)上;在其他 LPMOs 中也发现了二硫键,二硫键的形成很可能是 LPMOs 结构稳定性的关键<sup>[45]</sup>。在对具有几丁质<sup>[82]</sup>和纤维素<sup>[26,30]</sup>氧化裂解活性的 AA10 家族 LPMOs 的残基突变表明,对 LPMOs 催化性能有负面影响的突变主要影响 LPMOs 在反应条件下的稳定性,同时发现酶活降低是由于对底物结合能力的降低。此外, Bissaro 等<sup>[83]</sup>证明, LPMOs 在无底物的情况下,通过还原的铜与  $O_2$  或  $H_2O_2$  反应可以生成活性氧化物。

蛋白质是以具有影响其功能和活性的内在动态存在的, LPMOs 底物结合区域的结构特点也与其功能相关。Arora 等<sup>[84]</sup>发现, LPMOs 的底物结合区具有很高的柔性,具有显著且持续的微小构象变化;其中组氨酸支架周围的环区相对更具流动性,环区运动与底物结合侧的结构动力学相一致,能够产生酶与底物结合所需的结构变化。

#### 4.2 AA10 家族 LPMOs 的保守残基与底物选择性的关系

在 AA10 家族 LPMOs 中,大多数结构变异发生在核心  $\beta$ -三明治的  $\beta$ -链 S1 和 S3 之间的区域,也被称为环 2<sup>[27,85]</sup>。静态的活性位点具有一个扭曲的八面体或三角双锥体配位几何 Cu(II)离子,它在催化反应中被还原成 Cu(I);在还原状态下,铜中心具有 T 形几何配位,其余的配位价由水或底物中的氧配体补足;铜离子面向蛋白质的轴向位置,通常在真菌 AA9 家族 LPMOs 中有 1 条 Tyr 侧链,而在大多数细菌 AA10 家族 LPMOs 中有一条 Phe 侧链<sup>[56]</sup>。LPMOs 的底物识别在很大程度上取决于平坦

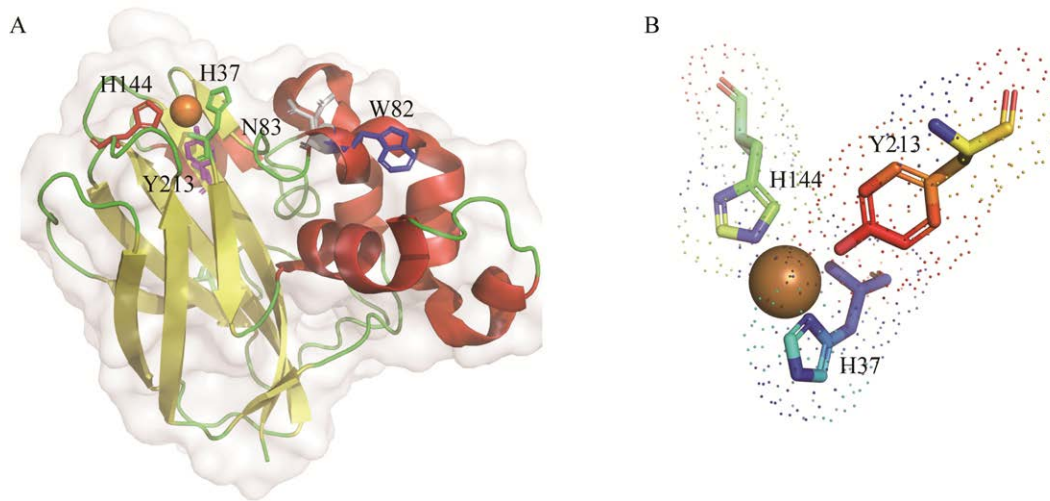
底物结合表面氨基酸残基的微小变化<sup>[26]</sup>。通过一系列对底物结合表面保守残基的突变发现, AA10 家族 LPMOs 上相应保守残基对底物结合有显著影响。

LPMOs 底物结合表面的芳香残基常通过堆积相互作用(如 Phe27 的相互作用)促进与糖环的相互作用<sup>[86]</sup>。分子建模也证实,表面暴露的芳香残基对多糖的识别和结合很重要。Limsakul 等<sup>[20]</sup>通过将 PcAA10A 的 AA10 催化结构域(PcAA10A\_CD)上的两个芳香残基 Trp51 和 Phe171 突变为 Ala,证明这两个芳香残基可通过堆叠相互作用与己糖和戊糖环相互作用,参与 PcAA10A\_CD 对木聚糖、纤维素和甘露聚糖的底物选择。专门氧化几丁质的 AA10 家族 LPMOs 的底物结合表面都有 1 个 Thr 残基,当它与 Phe54 结合时会丧失其几丁质活性<sup>[26]</sup>。去除来源于 *Thermobifias fusca* 的 TfAA10A 结合表面的 Trp82 和 Asn83,酶与底物的结合显著减少,表明这两种残基在与结晶纤维素的结合中起关键作用(图 5)<sup>[46]</sup>。AA10 家族 LPMOs 通常有 1 个单独暴露于底物结合表面的 Tyr 残基,突变来源于 *S. marcescens* 的 SmCBP21 的 Tyr 残基(与 TfAA10A Trp82 处于相同位置),可显著降低其与几丁质的结合<sup>[81]</sup>。

去除 N-末端组氨酸残基(His37)可消除铜-组氨酸支架,从而消除铜与 LPMOs 活性位点的结合。这种变化大大减少了结合,证明了铜-组氨酸支架在介导 LPMOs-底物结合中的重要作用<sup>[46]</sup>。

#### 4.3 多结构域 AA10 家族 LPMOs 与底物选择性的关系

在 AA10 家族 LPMOs 的多结构域中,CBMs 结构域在 LPMOs 催化功能方面具有重要作用。CBMs 根据其氨基酸序列的相似性被划分为 13 个家族,CAZy 数据库中收录有 89 个不同的 CBMs 亚家族,这些 CBMs 在底物特异性方面



**图 5 TfAA10A 的晶体结构及其活性位点<sup>[46]</sup>** A: 红色区域为  $\alpha$ -螺旋、黄色区域为  $\beta$ -片状折叠和绿色区域为环的带状结构; 表面突变残基的位置显示为绿色 His37、紫色 Tyr213、灰色 Asn83 和蓝色 Trp82; 铜原子是一个橙色的球体, His144 为红色. B: 棒状表示活性中心, 铜原子为一个橙色的球体  
Figure 5 Overall structure and active site of TfAA10A<sup>[46]</sup>. A: The red region was an  $\alpha$ -helix, the yellow region was a  $\beta$ -sheet fold, and the green region was a ring-band structure; The positions of the surface mutated residues are shown as green (His37), purple (Tyr213), gray (Asn83), and blue Trp82; The copper atom is an orange sphere and His144 is red. B: The rod-like structure represents an active center, the copper atom is an orange sphere.

表现出显著差异。CBMs 能与一些不溶性多糖结合, 并增加底物附近的酶浓度, 从而增加 LPMOs 与底物的结合效率<sup>[54]</sup>。基于 Pfam 数据库的蛋白分析, 对 AA10 家族的 LPMO 蛋白模块的功能进行注释发现其含有的 CBMs 模块底物结合范围十分广泛(表 2), 既有顽固性结晶多糖, 也有结晶度较低且易分解的多糖, LPMOs 的底物选择性与其结构域组成密切相关。CBM2、CBM3、CBM5/12 都同时具有纤维素和几丁质两种底物结合能力, 而且 CBM2 还具有木聚糖结合能力。但多结构域 AA10 家族 LPMOs 的底物偏好性并不是和其含有的 CBMs 底物结合能力完全对应。来源于 *Listeria monocytogenes* 的 LmLPMO10 对几丁质、纤维素都有氧化活性, 它含有 1 个 AA10 催化结构域、1 个 FNIII 模块和两个 CBM5/12 模块, 其中 AA10 模块可与几

丁质或纤维素特异性结合, CBM5/12 模块也有几丁质和纤维素结合能力<sup>[50]</sup>。因此, LmLPMO10 的广泛结合特异性可能是基于 AA10 模块和 CBM5/12 模块的联合作用<sup>[50]</sup>。来源于 *Vibrio cholera* 的 VcGbpA 也包含 1 个 AA10 模块和 1 个 CBM5/12 模块, 但其与几丁质结合作用较强, 而与纤维素的结合较弱<sup>[49]</sup>。进一步的研究证实, 多个 CBMs 结构域的同时出现常常导致结合能力的增强, 这就可以解释为什么与 VcGbpA 相比 LmLPMO10 与纤维素的结合能力更强<sup>[50]</sup>。CBMs 模块的不同组合类型造成了 LPMOs 对底物活性的变化。为了评价 PcAA10A 非催化结构域的作用效果, Limsakul 等<sup>[20]</sup>比较了全长 PcAA10A 和催化结构域多肽(PcAA10A\_CD)对微晶纤维素和木质纤维生物质(玉米壳和稻草)等不溶性底物的活性, 发现 PcAA10A 对这些底物

的活性显著高于 PcAA10A\_CD, 猜测可能是因为非催化结构域(CBM5、2 个 FNIII 和 CBM3b)可以促进结晶型和复合型多糖底物解构。Forsberg 等<sup>[32,41]</sup>证实 CBMs 可以使 LPMOs 更加活跃和稳定。带有共价连接 CBM2 (ScLPMO10C、MaLPMO10B 和 MaLPMO10D)模块的 LPMOs 产生的裂解产物比无 CBMs 的 ScLPMO10B 的产率要高<sup>[26]</sup>。

除 CBMs 模块外, 多结构域 AA10 家族 LPMOs 中还常含有 FNIII、GHs 或未知功能模块(X1)。其中糖苷水解酶模块主要为 GH5 和 GH18, 由于这些模块具有催化功能, 因此, 含有 GHs 模块的 LPMOs 功能存在两种可能: 一种可能是两种催化活性共存, 拓展酶功能; 另一种可能是糖苷水解酶活性与 LPMOs 氧化裂解活性只存在其一。来源于 *J. denitrificans* 的 JdLPMO10A 属于前者<sup>[35]</sup>, 而来源于 *C. cellulovorans* 的 CcAA10A 属于后者, 它只具有糖苷水解酶活性<sup>[51]</sup>。在对 FNIII 和 X1 结构域的功能验证时发现, 这些结构域的去并不影响酶与底物的结合和酶活性, 在 LPMOs 中的功能还需进一步探究。Limsakul 等<sup>[20]</sup>推测 FNIII 可通过改变纤维素的表面从而增强内切酶对不溶性纤维素的催化活性。在部分多结构域 AA10 家族 LPMOs 中, X1 结构域位于 AA10 催化结构域和 CBMs 之间, 推测 X1 结构域的作用与介导结合有关, 可取代糖基化连接物或保护长的非结构区域免受蛋白质降解。Payne 等<sup>[87]</sup>发现 X1 结构域位于 AA10 催化结构域和 CBM2 结构域之间, 可能发挥类似于 CBMs 的作用, 以帮助 AA10 结构域直接结合纤维素。X1 结构域具有保护催化结构域和 CBMs 结构域之间的非结构化连接体的结构特征, 因此, Kruer-Zerhusen 等<sup>[46]</sup>猜测在细菌中最有可能的作用是抗蛋白水解。

## 5 前景与展望

LPMOs 的发现刷新了人们对酶法降解结晶多糖的认识, 揭示了一种新型多糖降解酶的催化机制, 其直接作用于结晶多糖的特性也赋予它们在二代生物炼制中广阔的应用前景, 为生物燃料的商业化生产开辟了新的可能性。因此, AA10 家族 LPMOs 的研究对生物质转化和生物燃料工业的应用具有重要意义。然而, 目前对 AA10 家族 LPMOs 的探索还十分有限。虽然对 AA10 家族 LPMOs 底物谱已经有了初步的了解, 并通过结构域切除、定点突变等策略对其底物结合特性进行了研究, 但目前还有许多难题尚待解析。

在 LPMOs 今后的研究中, 以下几个方面非常值得关注: (1) 采用分子生物学和生物化学技术, 对 AA10 家族 LPMOs 非催化结构域的功能进行探究, 主要包括其对酶与底物结合能力的影响, 对糖苷水解酶的协同降解作用的影响, 对降解产物的类型及比例的影响, 以及其与催化结构域相互作用的机制。例如, 典型的 CBMs 结构域提高 LPMOs 活性的机制, 以及 CBMs、连接区和催化结构域之间的相互作用机制的解析。(2) 结合定向进化、半理性设计和理性设计等蛋白质工程手段开展工程化改造和功能验证, 探究催化结构域位点突变对底物结合和定位的影响, 以及对酶-底物复合物中的电子转移造成的影响。通过更多的关于酶-底物相互作用的数据, 深入解析 AA10 家族 LPMOs 底物选择性的内在机制。例如, 可以探究位于或靠近轴向铜配位的保守氨基酸突变对铜配位和底物结合的影响, 从而揭示其对 LPMOs 功能的影响。(3) 目前已完成蛋白纯化、功能验证的 AA10 家族 LPMOs 共 45 个(表 1), 仅占 CAZY 数据库中收录总量的 0.6%左右, 只是冰山一角, 因

此亟须加速对新型 LPMOs 的挖掘和表征。(4) 针对多结构域组成的分子量比较大的 AA10 家族 LPMOs, 高效的异源表达体系是对其进一步研究的前提。例如, 引入冷休克表达载体和优化伴侣表达蛋白, 从而获得更多的可溶性蛋白。以上问题的阐明不仅为 LPMOs 催化机理的深入解析奠定了基础, 也从根本上推动了 LPMOs 在生物质转化和生物燃料工业中的应用。

## REFERENCES

- [1] MEIER KK, JONES SM, KAPER T, HANSSON H, KOETSIER MJ, KARKEHABADI S, SOLOMON EI, SANDGREN M, KELEMEN B. Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(5): 2593-2635.
- [2] 任利枢. 我国农业废弃物处理现状[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2019(8): 35.  
REN LS. Present situation of agricultural waste treatment in China[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019(8): 35 (in Chinese).
- [3] HILL JL, HAMMUDI MB, MING TE. The *Arabidopsis* cellulose synthase complex: a proposed hexamer of CESA trimers in an equimolar stoichiometry[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(12): 4834-4842.
- [4] GORTARI MC, HOURS RA. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2013. DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-10.
- [5] FROMMHAGEN M, WESTPHAL AH, van BERKEL WJH, KABEL MA. Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1080.
- [6] ZHANG HY, DONG SR, LOU TT, WANG SY. Complete genome sequence unveiled cellulose degradation enzymes and secondary metabolic potentials in *Streptomyces* sp. CC0208[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(3): 267-276.
- [7] HEMSWORTH GR, JOHNSTON EM, DAVIES GJ, WALTON PH. Lytic polysaccharide monoxygenases in biomass conversion[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(12): 747-761.
- [8] JOHANSEN KS. Lytic polysaccharide monoxygenases: the microbial power tool for lignocellulose degradation[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(11): 926-936.
- [9] KARKEHABADI S, HANSSON H, KIM S, PIENS K, MITCHINSON C, SANDGREN M. The first structure of a glycoside hydrolase family 61 member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å resolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 383(1): 144-154.
- [10] FORSBERG Z, VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, BUNÆS AC, STENSTRØM Y, MACKENZIE A, SØRLIE M, HORN SJ, EIJSINK VGH. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2011, 20(9): 1479-1483.
- [11] VAAJE-KOLSTAD G, HORN SJ, van AALTEN DMF, SYNSTAD B, EIJSINK VGH. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(31): 28492-28497.
- [12] VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, HORN SJ, LIU ZL, ZHAI H, SØRLIE M, EIJSINK VGH. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 219-222.
- [13] QUINLAN RJ, SWEENEY MD, LO LEGGIO L, OTTEN H, POULSEN JC, JOHANSEN KS, KROGH KB, JØRGENSEN CI, TOVBORG M, ANTHONSEN A, TRYFONA T, WALTER CP, DUPREE P, XU F, DAVIES GJ, WALTON PH. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(37): 15079-15084.
- [14] PIERCE BC, AGGER JW, ZHANG ZH, WICHMANN J, MEYER AS. A comparative study on the activity of fungal lytic polysaccharide monoxygenases for the depolymerization of cellulose in soybean spent flakes[J]. *Carbohydrate Research*, 2017, 449: 85-94.
- [15] ANTHONY L, ELODIE D, VINCENT L, COUTINHO PEDRO M, BERNARD H. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 41.
- [16] 郭宵, 安亚静, 柴成程, 蒋露莹, 路福平, 刘夫锋, 戴玉杰. 来源于真菌 AA9 家族裂解性多糖单加氧酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2309-2320.

- GUO X, AN YJ, CHAI CC, JIANG LY, LU FP, LIU FF, DAI YJ. Research progress in fungal lytic polysaccharide monoxygenases from AA9 family[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2309-2320 (in Chinese).
- [17] 吴帅帅, 田娟, 谢宁, 王娟, 刘刚. AA9 家族裂解多糖单加氧酶研究进展[J]. *纤维素科学与技术*, 2020, 28(3): 70-79.
- WU SS, TIAN J, XIE N, WANG J, LIU G. Progress of AA9 family lytic polysaccharide monoxygenase[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2020, 28(3): 70-79 (in Chinese).
- [18] 李欣, 张丽丽, 田莉, 张怀强, 陈冠军, 王禄山. 裂解多糖单加氧酶高效催化的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(10): 970-979.
- LI X, ZHANG LL, TIAN L, ZHANG HQ, CHEN GJ, WANG LS. The advance of efficient catalysis of lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2016, 43(10): 970-979 (in Chinese).
- [19] CORRÊA TLR, JÚNIOR AT, WOLF LD, BUCKERIDGE MS, dos SANTOS LV, MURAKAMI MT. An Actinobacteria lytic polysaccharide monoxygenase acts on both cellulose and xylan to boost biomass saccharification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 117.
- [20] LIMSAKUL P, PHITSUWAN P, WAEONUKUL R, PASON P, TACHAAPAUKOON C, POOMPUTSA K, KOSUGI A, SAKKA M, SAKKA K, RATANAKHANOKCHAI K. A novel AA10 from *Paenibacillus curdolanolyticus* and its synergistic action on crystalline and complex polysaccharides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17): 7533-7550.
- [21] LI J, SOLHI L, GODDARD-BORGER ED, MATHIEU Y, WAKARCHUK WW, WITHERS SG, BRUMER H. Four cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases from *Cellulomonas* species[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 29.
- [22] GUO X, AN YJ, LU FP, LIU FF. Optimization of synergistic degradation of steam exploded corn straw by lytic polysaccharide monoxygenase R17L and cellulase[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 182: 114924.
- [23] LI F, LIU YX, LIU Y, LI YJ, YU HB. Heterologous expression and characterization of a novel lytic polysaccharide monoxygenase from Natrialbaeae archaeon and its application for chitin biodegradation[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 354: 127174.
- [24] HAMRE AG, EIDE KB, WOLD HH, SØRLIE M. Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monoxygenase[J]. *Carbohydrate Research*, 2015, 407: 166-169.
- [25] HORN SJ, VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, EIJSINK VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 45.
- [26] FORSBERG Z, BISSARO B, GULLESEN J, DALHUS B, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monoxygenase functionality[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(4): 1397-1412.
- [27] BOOK AJ, YENNAMALLI RM, TAKASUKA TE, CURRIE CR, PHILLIPS GN, FOX BG. Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 109.
- [28] MANJEET K, MADHUPRAKASH J, MORMANN M, MOERSCHBACHER BM, PODILE AR. A carbohydrate binding module-5 is essential for oxidative cleavage of chitin by a multi-modular lytic polysaccharide monoxygenase from *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 127: 649-656.
- [29] ZHANG HY, ZHAO Y, CAO HL, MOU GQ, YIN H. Expression and characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Bacillus thuringiensis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79: 72-75.
- [30] COURTADE G, FORSBERG Z, HEGGSET EB, EIJSINK VGH, AACHMANN FL. The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monoxygenase promote localized cellulose oxidation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(34): 13006-13015.
- [31] COURTADE G, LE SB, SÆTROM GI, BRAUTASET T, AACHMANN FL. A novel expression system for lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Carbohydrate Research*, 2017, 448: 212-219.
- [32] FORSBERG Z, MACKENZIE AK, SØRLIE M, RØHR ÅK, HELLAND R, ARVAI AS, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Proceedings of National Academy*

- of Sciences of the United States of America, 2014, 111(23): 8446-8451.
- [33] MAGALI T, BARBARA D, MATTHIAS L, KOEN B, INGEBORG S, TOM D. Disulfide bridges as essential elements for the thermostability of lytic polysaccharide monoxygenase LPMO10C from *Streptomyces coelicolor*[J]. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS, 2017: 1-8.
- [34] COURTADE G, FORSBERG Z, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH, AACHMANN FL. Chemical shift assignments for the apo-form of the catalytic domain, the linker region, and the carbohydrate-binding domain of the cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenase ScLPMO10C[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2017, 11(2): 257-264.
- [35] MEKASHA S, TUVENG RT, ASKARIAN F, CHOUDHARY S, SCHMIDT-DANNERT C, NIEBISCH A, MODREGGER J, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH. A trimodular bacterial enzyme combining hydrolytic activity with oxidative glycosidic bond cleavage efficiently degrades chitin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(27): 9134-9146.
- [36] MEKASHA S, FORSBERG Z, DALHUS B, BACIK JP, CHOUDHARY S, SCHMIDT-DANNERT C, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH. Structural and functional characterization of a small chitin-active lytic polysaccharide monoxygenase domain of a multi-modular chitinase from *Jonesia denitrificans*[J]. FEBS Letters, 2016, 590(1): 34-42.
- [37] CHRISTENSEN IA, EIJSINK VGH, AACHMANN FL, COURTADE G. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N resonance assignment of the apo form of the small, chitin-active lytic polysaccharide monoxygenase JdLPMO10A from *Jonesia denitrificans*[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2021, 15(1): 79-84.
- [38] GREGORY RC, HEMSWORTH GR, TURKENBURG JP, HART SJ, WALTON PH, DAVIES GJ. Activity, stability and 3-D structure of the Cu(II) form of a chitin-active lytic polysaccharide monoxygenase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003), 2016, 45(42): 16904-16912.
- [39] COURTADE G, BALZER S, FORSBERG Z, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH, AACHMANN FL. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N resonance assignment of the chitin-active lytic polysaccharide monoxygenase BILPMO10A from *Bacillus licheniformis*[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2015, 9(1): 207-210.
- [40] MANJEET K, PURUSHOTHAM P, NEERAJA C, PODILE AR. Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases[J]. Microbiological Research, 2013, 168(7): 461-468.
- [41] FORSBERG Z, NELSON CE, DALHUS B, MEKASHA S, LOOSE JSM, CROUCH LI, RØHR ÅK, GARDNER JG, EIJSINK VGH, VAAJE-KOLSTAD G. Structural and functional analysis of a lytic polysaccharide monoxygenase important for efficient utilization of chitin in *Cellvibrio japonicus*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(14): 7300-7312.
- [42] VAAJE-KOLSTAD G, BØHLE LA, GÅSEIDNES S, DALHUS B, BJØRÅS M, MATHIESEN G, EIJSINK VGH. Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high-resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 416(2): 239-254.
- [43] VALENZUELA SV, FERRERES G, MARGALEF G, PASTOR FJ. Fast purification method of functional LPMOs from *Streptomyces ambofaciens* by affinity adsorption[J]. Carbohydrate Research, 2017, 448: 205-211.
- [44] NAKAGAWA YS, KUDO M, LOOSE JSM, ISHIKAWA T, TOTANI K, EIJSINK VGH, VAAJE-KOLSTAD G. A small lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces griseus* targeting  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitin[J]. The FEBS Journal, 2015, 282(6): 1065-1079.
- [45] CHAPLIN AK, WILSON MT, HOUGH MA, SVISTUNENKO DA, HEMSWORTH GR, WALTON PH, VIJGENBOOM E, WORRALL JAR. Heterogeneity in the histidine-brace copper coordination sphere in auxiliary activity family 10 (AA10) lytic polysaccharide monoxygenases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(24): 12838-12850.
- [46] KRUEER-ZERHUSEN N, ALAHUHTA M, LUNIN VV, HIMMEL ME, BOMBLE YJ, WILSON DB. Structure of a *Thermobifida fusca* lytic polysaccharide monoxygenase and mutagenesis of key residues[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 243.
- [47] RODRIGUES KB, MACÊDO JKA, TEIXEIRA T, BARROS JS, ARAÚJO ACB, SANTOS FP, QUIRINO BF, BRASIL BSAF, SALUM TFC, ABDELNUR PV, FAVARO LCL. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization[J].



- Carbohydrate Research, 2017, 448: 175-181.
- [48] RUSSO DA, ZEDLER JAZ, WITTMANN DN, MÖLLERS B, SINGH RK, BATTH TS, van OORT B, OLSEN JV, BJERRUM MJ, JENSEN PE. Expression and secretion of a lytic polysaccharide monoxygenase by a fast-growing cyanobacterium[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1-13.
- [49] WONG E, VAAJE-KOLSTAD G, GHOSH A, HURTADO-GUERRERO R, KONAREV PV, IBRAHIM AFM, SVERGUN DI, EIJSINK VGH, CHATTERJEE NS, van AALTEN DMF. The *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(1): e1002373.
- [50] PASPALIARI DK, LOOSE JSM, LARSEN MH, VAAJE-KOLSTAD G. *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monoxygenase[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(5): 921-936.
- [51] SUNNA A, GIBBS MD, CHIN CW, NELSON PJ, BERGQUIST PL. A gene encoding a novel multidomain beta-1, 4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 664-670.
- [52] GHATGE SUNIL S, TELKE AA, WAGHMODE TR, LEE Y, LEE KW, OH DB, SHIN HD, KIM SW. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 3041-3055.
- [53] YANG JC, MADUPU R, DURKIN AS, EKBORG NA, PEDAMALLU CS, HOSTETLER JB, RADUNE D, TOMS BS, HENRISSAT B, COUTINHO PM, SCHWARZ S, FIELD L, TRINDADE-SILVA AE, SOARES CAG, ELSHAHAWI S, HANORA A, SCHMIDT EW, HAYGOOD MG, POSFAI J, BENNER J, et al. The complete genome of *Teredinibacter turnerae* T7901: an intracellular endosymbiont of marine wood-boring bivalves (shipworms)[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6085.
- [54] SATO K, CHIBA D, YOSHIDA S, TAKAHASHI M, TOTANI K, SHIDA Y, OGASAWARA W, NAKAGAWA YS. Functional analysis of a novel lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces griseus* on cellulose and chitin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 2085-2091.
- [55] FOWLER CA, SABBADIN F, CIANO L, HEMSWORTH GR, Luisa ELIAS L, BRUCE N, MCQUEEN-MASON S, DAVIES GJ, WALTON PH. Discovery, activity and characterisation of an AA10 lytic polysaccharide oxygenase from the shipworm symbiont *Teredinibacter turnerae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 232.
- [56] YADAV SK, ARCHANA, SINGH R, SINGH PK, VASUDEV PG. Insecticidal fern protein Tma12 is possibly a lytic polysaccharide monoxygenase[J]. *Planta*, 2019, 249(6): 1987-1996.
- [57] MITSUHASHI W, SAITO H, SATO M. Complete nucleotide sequence of the fusolin gene of an entomopoxvirus in the cupreous chafer, *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae)[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27(10): 869-876.
- [58] MUTAHIR Z, MEKASHA S, LOOSE JSM, ABBAS F, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH, FORSBERG Z. Characterization and synergistic action of a tetra-modular lytic polysaccharide monoxygenase from *Bacillus cereus*[J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(15): 2562-2571.
- [59] STEPNOV AA, FORSBERG Z, SØRLIE M, NGUYEN GS, WENTZEL A, RØHR ÅK, EIJSINK VGH. Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 28.
- [60] ZHANG AL, MO XF, ZHOU N, WANG YY, WEI GG, HAO ZK, CHEN KQ. Identification of chitinolytic enzymes in *Chitinolyticbacter meiyuanensis* and mechanism of efficiently hydrolyzing chitin to *N*-acetyl glucosamine[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 572053.
- [61] WANG DM, LI J, WONG ACY, AACHMANN FL, HSIEH YSY. A colorimetric assay to rapidly determine the activities of lytic polysaccharide monoxygenases[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 215.
- [62] YU MJ, YOON SH, KIM YW. Overproduction and characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase in *Bacillus subtilis* using an assay based on ascorbate consumption[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93/94: 150-156.
- [63] LI X, BEESON WT, PHILLIPS CM, MARLETTA MA, CATE JHD. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monoxygenases[J]. *Structure: London, England*: 1993, 20(6): 1051-1061.

- [64] VU VV, BEESON WT, PHILLIPS CM, CATE JHD, MARLETTA MA. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(2): 562-565.
- [65] BEY M, ZHOU SM, POIDEVIN L, HENRISSAT B, COUTINHO PM, BERRIN JG, SIGOILLOT JC. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospira anserina*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(2): 488-496.
- [66] HEMSWORTH GR, TAYLOR EJ, KIM RQ, GREGORY RC, LEWIS SJ, TURKENBURG JP, PARKIN A, DAVIES GJ, WALTON PH. The copper active site of CBM33 polysaccharide oxygenases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(16): 6069-6077.
- [67] KJAERGAARD CH, QAYYUM MF, WONG SD, XU F, HEMSWORTH GR, WALTON DJ, YOUNG NA, DAVIES GJ, WALTON PH, JOHANSEN KS, HODGSON KO, HEDMAN B, SOLOMON EI. Spectroscopic and computational insight into the activation of O<sub>2</sub> by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(24): 8797-8802.
- [68] KRACHER D, SCHEIBLBRANDNER S, FELICE AKG, BRESLMAYR E, PREIMS M, LUDWICKA K, HALTRICH D, EIJSINK VGH, LUDWIG R. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation[J]. *Science*, 2016, 352(6289): 1098-1101.
- [69] WALTON PH, DAVIES GJ. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 195-207.
- [70] GABER Y, RASHAD B, HUSSEIN R, ABDELGAWAD M, ALI NS, DISHISHA T, VÁRNAI A. Heterologous expression of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107583.
- [71] FRANDBSEN KEH, SIMMONS TJ, DUPREE P, POULSEN JCN, HEMSWORTH GR, CIANO L, JOHNSTON EM, TOVBORG M, JOHANSEN KS, von FREIESLEBEN P, MARMUSE L, FORT S, COTTAZ S, DRIGUEZ H, HENRISSAT B, LENFANT N, TUNA F, BALDANSUREN A, DAVIES GJ, LO LEGGIO L, et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 298-303.
- [72] BEESON WT, VU VV, SPAN EA, PHILLIPS CM, MARLETTA MA. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 923-946.
- [73] WESTERENG B, AGGER JW, HORN SJ, VAAJE-KOLSTAD G, AACHMANN FL, STENSTRØM YH, EIJSINK VGH. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1271(1): 144-152.
- [74] ISAKSEN T, WESTERENG B, AACHMANN FL, AGGER JW, KRACHER D, KITTL R, LUDWIG R, HALTRICH D, EIJSINK V GH, HORN SJ. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(5): 2632-2642.
- [75] GARDNER JG, CROUCH L, LABOUREL A, FORSBERG Z, BUKHMAN YV, VAAJE-KOLSTAD G, GILBERT HJ, KEATING DH. Systems biology defines the biological significance of redox-active proteins during cellulose degradation in an aerobic bacterium[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(5): 1121-1133.
- [76] TACHAAPAIBOON C, KYU KL, RATANAKHANOKCHAI K. Purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. K-8 by using corn husk column[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(12): 2441-2445.
- [77] PHITSUWAN P, PERMSRIBURASUK C, WAEONUKUL R, PASON P, TACHAAPAIBOON C, RATANAKHANOKCHAI K. Evaluation of fuel ethanol production from aqueous ammonia-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2016, 93: 150-157.
- [78] BARAMEE S, PHITSUWAN P, WAEONUKUL R, PASON P, TACHAAPAIBOON C, KOSUGI A, RATANAKHANOKCHAI K. Alkaline xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from the novel anaerobic alkalithermophilic bacterium *Cellulosibacter alkalithermophilus* and its hydrolysis of insoluble polysaccharides under neutral and alkaline conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(4): 643-650.

- [79] TEERAVIVATTANAKIT T, BARAMEE S, PHITSUWAN P, SORNYOTHA S, WAEONUKUL R, PASON P, TACHAAPAIKOON C, POOMPUTSA K, KOSUGI A, SAKKA K, RATANAKHANOKCHAI K. Chemical pretreatment-independent saccharifications of xylan and cellulose of rice straw by bacterial weak lignin-binding xylanolytic and cellulolytic enzymes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22): e01522-e01517.
- [80] VAAJE-KOLSTAD G, FORSBERG Z, LOOSE JS, BISSARO B, EIJSINK VGH. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 44: 67-76.
- [81] VAAJE-KOLSTAD G, HOUSTON DR, RIEMEN AHK, EIJSINK VGH, van AALTEN DMF. Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(12): 11313-11319.
- [82] LOOSE JSM, ARNTZEN MØ, BISSARO B, LUDWIG R, EIJSINK VGH, VAAJE-KOLSTAD G. Multipoint precision binding of substrate protects lytic polysaccharide monooxygenases from self-destructive off-pathway processes[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(28): 4114-4124.
- [83] BISSARO B, RØHR ÅK, MÜLLER G, CHYLENSKI P, SKAUGEN M, FORSBERG Z, HORN SJ, VAAJE-KOLSTAD G, EIJSINK VGH. Oxidative cleavage of polysaccharides by monooxygenases depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(10): 1123-1128.
- [84] ARORA R, BHARVAL P, SARSWATI S, SEN TZ, YENNAMALLI RM. Structural dynamics of lytic polysaccharide monooxygenases reveals a highly flexible substrate binding region[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2019, 88: 1-10.
- [85] WU M, BECKHAM GT, LARSSON AM, ISHIDA T, KIM S, PAYNE CM, HIMMEL ME, CROWLEY MF, HORN SJ, WESTERENG B, IGARASHI K, SAMEJIMA M, STAHLBERG J, EIJSINK VGH, SANDGREN M. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(18): 12828-12839.
- [86] BENNATI-GRANIER C, GARAJOVA S, CHAMPION C, GRISEL S, HAON M, ZHOU SM, FANUEL M, ROPARTZ D, ROGNIAUX H, GIMBERT I, RECORD E, BERRIN JG. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 90.
- [87] PAYNE CM, RESCH MG, CHEN LQ, CROWLEY MF, HIMMEL ME, TAYLOR LE 2nd, SANDGREN M, STAHLBERG J, STALS I, TAN ZP, BECKHAM GT. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(36): 14646-14651.