



来源于真菌 AA9 家族裂解性多糖单加氧酶的研究进展

郭宵 安亚静 柴成程 蒋露莹 路福平 刘夫锋* 戴玉杰*

工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室 工业酶国家工程实验室 天津科技大学
大学生物工程学院 天津 300457

摘要: AA9 家族的裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO)广泛存在于真菌中, 由于其能作用于木质纤维素的结晶多糖, 从而使其在生物转化生物质方面发挥重要的作用。本文首先综述了 AA9 家族 LPMO 的结构特点、催化机制、结构与功能之间的关系, 其次阐述了 AA9 家族 LPMO 的微生物表达与调控, 最后简单介绍了 AA9 家族 LPMO 在转化木质纤维素中的应用。

关键词: 木质纤维素, 生物转化, 裂解性多糖单加氧酶, 构效关系, 微生物表达

Research progress in fungal lytic polysaccharide monooxygenases from AA9 family

GUO Xiao AN Ya-Jing CHAI Cheng-Cheng JIANG Lu-Ying LU Fu-Ping
LIU Fu-Feng* DAI Yu-Jie*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes; College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: The lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) of AA9 is widely distributed in fungi and plays an important role in the bioconversion of biomass because it can degrade crystalline polysaccharide of lignocellulose. The detailed information of the structural features, catalytic mechanism, structure and function and microbial expression and regulation of AA9 LPMO is summarized. Finally, the applications of AA9 LPMO in the conversion of lignocellulose are also discussed.

Keywords: Lignocellulose, Bioconversion, Lytic polysaccharide monooxygenase, Structure-function relationship, Microbial expression

随着石油资源日益枯竭, 目前全球面临着能源和资源的严峻挑战, 然而将可再生的生物质资源转化为能源可有效缓解能源和资源紧张的问

题。我国是农业大国, 每年可利用的农作物秸秆资源在几亿吨左右^[1]。秸秆中的木质纤维素是地球上现存量最大的生物质资源, 包括纤维素、半

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901700)

*Corresponding authors: LIU Fu-Feng: Tel: 86-22-60602717; E-mail: fufengliu@tust.edu.cn

DAI Yu-Jie: Tel: 86-22-60601265; E-mail: yjdai@126.com

Received: 30-03-2020; **Accepted:** 17-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901700)

*通信作者: 刘夫锋: Tel: 022-60602717; E-mail: fufengliu@tust.edu.cn

戴玉杰: Tel: 022-60601265; E-mail: yjdai@126.com

收稿日期: 2020-03-30; 接受日期: 2020-05-17; 网络首发日期: 2020-06-04

纤维素和木质素^[2]。目前秸秆的处理方式主要是农村取暖和就地焚烧,这种处理方式的资源利用率低,除了会造成秸秆资源的大量浪费,还会引起严重的环境问题。早期研究表明,木质纤维素在转化为生物燃料和其他有价值的化学原料方面潜力巨大。因此,若能实现木质纤维素的高效生物物质转化就可同时有效解决能源和环境两方面的问题。目前木质纤维素的生物物质转化主要有三步:预处理、酶解和发酵,其中酶解是最关键的一步^[3]。

由于木质纤维素具有高度的结晶区域^[4],而现有的糖苷水解酶对于底物结晶区域的降解效率很低,从而极大限制了糖苷水解酶在木质纤维素降解中的应用^[5-6]。近年来,裂解性多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO)的发现为酶法降解木质纤维素开辟了新的道路^[7]。LPMO是一类作用于结晶多糖的氧化酶,能够通过氧化作用裂解木质纤维素中的结晶多糖,使其结构松散,为糖苷水解酶提供更多的结合位点^[8]。因此,LPMO和糖苷水解酶协同作用会显著提高木质纤维素的降解效率^[9]。

LPMO是一类铜离子依赖型的氧化酶,于2010年首次被报道^[8]。刚开始根据其序列特点在CAZy数据库中分类为7类辅助酶(auxiliary activities, AA): AA9-AA11^[10-12]、AA13-AA16^[13-16]。其中,AA9^[17]、AA11^[12]、AA13^[13]、AA14^[14]和AA16^[16]

来源于真菌,AA15来源于昆虫^[15],AA10来源于细菌和放线菌等^[11,18]。来源于真菌的AA9家族可以降解不同状态的纤维素,在降解纤维素过程中起到重要作用^[9,17],所以AA9家族LPMO在转化木质纤维素生物物质的过程中起到关键作用。本文主要综述了AA9家族LPMO近5年来的一些研究进展,包括AA9家族LPMO的结构与功能之间的关系,以及其在微生物中的表达调控和应用中的特点,以期AA9家族和其他LPMO的基础和应用研究提供一定的研究思路。

1 结构与功能之间的关系

1.1 AA9家族LPMO的结构特点

截至目前,所报道的AA9家族的LPMO均来源于真菌^[17],如黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、太瑞斯梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*)、异担子菌(*Heterobasidion irregulare*)、嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*)、红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)等。虽然AA9家族LPMO来源广泛,但其结构却有高度的保守性,其结构核心为 β 三明治结构,一般包含8-10个典型的 β 折叠结构,且相邻的 β 折叠由Loop相连^[19](图1A)。活性中心由保守的2个组氨酸、1个酪氨酸和1个铜离子组成(图1B)^[19],其中一些蛋白质中的第一个组氨酸被甲基化修饰^[19-21]。

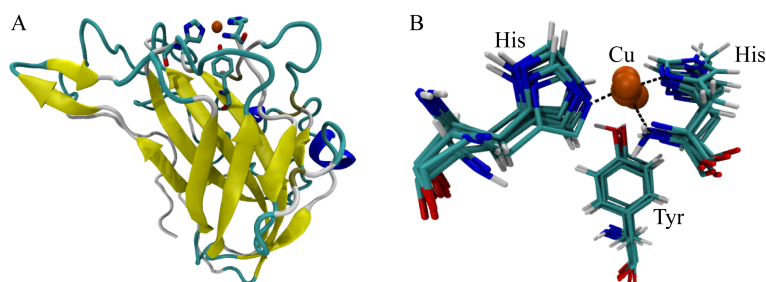


图1 AA9家族LPMO的典型三维结构

Figure 1 The typical 3D structure of AA9 LPMO

注: A: AA9家族LPMO的结构示意图(PDB ID: 4B5Q^[23]); B: 9个AA9家族LPMO活性位点的结构叠加示意图(4B5Q^[23]、4EIS^[24]、4QI8^[25]、4D7U^[26-27]、4EIR^[24]、5ACF^[28]、2YET^[20]、5O2W^[29]、2VTC^[30])。

Note: A: Structure of AA9 LPMO (PDB ID: 4B5Q^[23]); B: Superposition of active-site architectures of 9 AA9 LPMO (4B5Q^[23], 4EIS^[24], 4QI8^[25], 4D7U^[26-27], 4EIR^[24], 5ACF^[28], 2YET^[20], 5O2W^[29], 2VTC^[30])。

铜离子由 2 个组氨酸的侧链和其中 1 个组氨酸的氨基末端的氮原子相连形成一个 T 型结构(图 1B), 常被称为组氨酸支架^[22]。与其他纤维素酶不同的是, 其活性位点并不位于深的凹槽或隧道内, 而是呈一个平面结构^[19]。这可能与其庞大的底物(如晶体纤维素有关)。

根据 AA9 家族 LPMO 的不同氧化断裂位点, 可将其分为 AA9-1、AA9-2、AA9-3 三类。AA9-1 仅氧化多糖链的 C1 位生成内酯型糖, 然后再转化为醛糖酸。AA9-2 仅氧化多糖链的 C4 位生成 4-酮基醛糖^[31]。AA9-3 同时氧化多糖链的 C1 和 C4 位, 生成醛糖酸和 4-酮基醛糖产物^[24]。值得注意的是, 还发现有的 AA9 家族 LPMO 可以氧化多糖链的 C6 位, 但 C6 位氧化不会断裂糖苷键^[32]; 此外, 由于其三维结构尚不清晰, 因此该氧化位点尚存在争议。本文仅基于前 3 种氧化类型对现有晶体结构的 AA9 家族 LPMO 进行了分类, 并将其晶体结构、活性位点和底物的相关信息列于表 1。从表 1 可以看出, 即使来源于同一个真菌的不同

AA9, 其对底物的氧化位点也存在差异。例如, 来自同一粗糙脉孢菌的 *NcLPMO9M* 和 *NcLPMO9C* 分别为 AA9-1 和 AA9-2 类型。

1.2 AA9 家族 LPMO 的催化机制

自 AA9 家族的 LPMO 被发现以来, 国内外研究者已对其催化机制开展了大量的研究。最初发现其催化作用依赖于 O₂, 催化过程如下^[8]: 在抗坏血酸等还原剂存在下, 活性中心的 Cu²⁺接受电子被还原为 Cu⁺, 可以特异性氧化多糖的 C1 或 C4 位碳原子, 或同时氧化 C1 和 C4 位碳原子, 使其糖苷键断裂, 但这种作用方式需要持续的电子源。此外, 有研究发现在抗坏血酸等还原剂存在时, 未与底物结合的 LPMO 可将 O₂ 转化为 H₂O₂^[39], 证明 LPMO 反应的首选共底物是 H₂O₂, 而不是 O₂^[39-40], 而且依赖 H₂O₂ 的反应过程只需要抗坏血酸还原剂提供一个最初的启动反应的电子即可^[41]。为了分析 O₂ 和 H₂O₂ 分别作为共底物时的区别, Hangasky 等^[42]发现依赖于 H₂O₂ 的氧化反应为非特异性氧化, 而依赖于 O₂ 的反应为区域选择性的氧

表 1 AA9 家族 LPMO 的晶体结构、活性位点和底物的相关信息

Table 1 The X-ray structures, active sites and substrates of AA9 LPMO

Site of attack	Protein name	PDB code	Organism	Active site ^a	Substrates	References
C1	<i>PcLPMO9D</i>	4B5Q	<i>P. chrysosporium</i>	His1, His76, Tyr160	Phosphoric acid-swollen cellulose (PASC), Avicel	[23]
	<i>NcLPMO9M</i>	4EIS	<i>N. crassa</i>	MeHis1, His82, Tyr171	PASC	[24]
	<i>NcLPMO9F</i>	4QI8	<i>N. crassa</i>	His1, His72, Tyr157	PASC	[25]
	<i>MtLPMO3</i>	5UFV	<i>M. thermophila</i>	His1, His161, Tyr169	PASC	[33-34]
	GH61E	3EJA	<i>T. terrestris</i>	His1, His68, Tyr153	PASC, Glucan, Xylan, Pectin, Chitin	[9]
	<i>HiLPMO9B</i>	5NNS	<i>H. irregulare</i>	His1, His80, Tyr166	PASC	[35]
C4	<i>NcLPMO9C</i>	4D7U	<i>N. crassa</i>	His1, His83, Tyr166	Cellulose, Cello-oligosaccharide, Hemicellulose	[26-27,36]
	<i>NcLPMO9D</i>	4EIR	<i>N. crassa</i>	MeHis1, His84, Tyr168	PASC	[24]
	<i>LsAA9A</i>	5ACF	<i>Lentinus similis</i>	MeHis1, His78, Tyr164	Cellulose, Xyloglucan, Glucan, Glucomannan, Cello-oligosaccharide	[28,37]
	<i>NcLPMO9A</i>	5FOH	<i>N. crassa</i>	His1, His81, Tyr164	Cellulose, PASC, Xyloglucan, Glucomannan	[38]
C1/C4	<i>TaLPMO9A</i>	2YET	<i>T. aurantiacus</i>	MeHis1, His86, Tyr175	PASC	[20]
	<i>HjLPMO9A</i>	5O2W	<i>H. jecorina</i>	His1, His86, Tyr174	Cellulose, PASC	[29]
	<i>HjLPMO9B</i>	2VTC	<i>H. jecorina</i>	His1, His89, Tyr176	Cellulose	[30]
	<i>CvAA9A</i>	5NLT	<i>Collariella virescens</i>	MeHis1, His78, Tyr164	Cellulose, Xyloglucan, Glucan, Glucomannan, Cello-oligosaccharide	[28]

注: ^a: MeHis1 为被甲基化的组氨酸。

Note: ^a: MeHis1 is the methylated histidine.

化, 但该说法目前尚存在较大争议^[43]。然而, 越来越多的报道证实, AA9 可以利用 H_2O_2 作为共底物, 而且其反应速率比以 O_2 为共底物时更高^[44-48]。但是, H_2O_2 的浓度对 AA9 的活性影响较大。有研究认为高浓度 H_2O_2 可能会使 AA9 氧化失活^[21,41], 而当 AA9 与底物结合后, 其失活概率会低很多^[41]。因此, H_2O_2 在 AA9 催化作用过程中发挥重要的作用, 但其具体作用机制尚需详细研究。

除了 O_2 和 H_2O_2 之外, AA9 家族 LPMO 活性位点的氨基酸对其酶学特性的影响也得到了广泛的研究。例如, Harris 等^[9]分析了几个保守残基对 GH61 功能的重要性, 将活性位点的氨基酸 H1、H68 和 Y153 分别进行突变, 获得突变体 H1N、H68A 和 Y153F, 结果表明, 突变体 H1N 和 H68A 酶活力完全消失; 虽然突变体 Y153F 酶活力大大降低, 但却未完全消失; 将与 Y153 有氢键相连的残基 Q151 突变为 L, 结果发现突变体 Q151L 酶活力却完全丧失, 而突变体 Q151N 和 Q151E 却保留部分酶活力。究其原因, 可能是突变体 Q151N 和 Q151E 仍与 Y153 之间存在氢键相互作用。

此外, 利用系统的生物信息学分析发现, AA9 家族 LPMO 活性位点平面中与底物结合的芳香族氨基酸对其区域选择性的影响很大^[49]。例如, Danneels 等^[50]利用定点突变技术将来源于红褐肉座菌(*H. jecorina*)的 LPMO9A 与底物结合平面的芳香族氨基酸残基 Y24 和 Y211 突变成丙氨酸后, 发现 Y24A 的 C1 氧化能力增强, C4 氧化能力变化不大, 而 Y211A 的 C4 氧化能力增强, C1 氧化能力减弱。类似现象在其他研究报道^[32,34,51]中也得到证实。

1.3 AA9 家族 LPMO 的底物特异性

除了晶体纤维素、微晶纤维素和磷酸膨胀纤维素等纤维素多糖底物, 部分 AA9 家族的 LPMO 也可以作用于木聚糖和木葡聚糖等多糖和可溶性纤维寡糖(表 1)。例如, *NcLPMO9C*、*LsAA9A*、*CvAA9A*、*AN1602* 和 *PaLPMO9H* 均可作用于可溶

性纤维寡糖。为了探明上述 AA9 家族 LPMO 与可溶性寡糖之间的作用机制, 需要进一步分析上述 AA9 家族 LPMO 与可溶性寡糖之间的结构与作用特点^[27,36-37,52-55]。Frandsen 等^[37]发现 *LsAA9A* 能够降解可溶性纤维三糖至六糖, 而 *TaAA9A* 却不能降解上述寡糖。为了探明这两种酶的不同作用机制, 我们进一步比较了它们的三维结构, 发现 *LsAA9A* 的底物结合区域的残基 Asn28、His66 和 Asn67 能与可溶性寡糖形成氢键, 而 *TaAA9A* 却缺乏上述能与寡糖底物形成氢键相互作用的残基 Asn、His 和 Asn^[37]。这 3 个极性氨基酸在其他降解可溶性纤维寡糖的 AA9 家族 LPMO (如 *AN1602*、*NcLPMO9C* 和 *PaLPMO9H*) 中都不同程度地存在。例如, *AN1602* 含有上述 3 个残基, 分别为 Asn30、His69 和 Asn70^[52]; *NcLPMO9C*^[27] 含有两个残基, 分别为 Asn26 和 His64; *PaLPMO9H*^[53] 仅含一个 Asn26。除了活性位点区域含有上述极性残基外, 活性位点组氨酸残基前的 Loop3 在结合可溶性底物过程中也同样发挥着重要作用^[36]。综上所述, 上述残基和区域在 AA9 家族的 LPMO 结合可溶性寡糖过程中可能发挥重要的作用, 但后期尚需通过残基突变或删减等实验和模拟手段来验证这些关键氨基酸对 AA9 家族 LPMO 降解可溶性寡糖的影响, 进而探索其降解机理。

1.4 CBM1 区域对 AA9 家族 LPMO 底物结合、酶活和区域选择性的影响

真菌纤维素酶大多都含有纤维素结合域 (cellulose-binding module, CBM1)。CBM1 有一个富含芳香族氨基酸的平面, 其在结合纤维素中起到重要作用^[56]。然而, 仅有 20% 的 AA9 家族其 LPMO 含有 CBM1^[9]。截至目前, 研究结果表明 CBM1 与底物结合, 酶活和区域选择性密切相关, 但具体作用机制尚不清楚^[57]。在底物结合性方面, 一些 AA9 家族 LPMO 的 CBM1 区域与其结合纤维素的能力密切相关。若删除该区域, 其结合底物纤维素的能力就会降低^[57-58]或完全丧失^[59]。例如, Koseki 等^[59]发现去掉 CBM1 的 *AkCel61* 失去

了结合微晶纤维素的能力。我们认为酶与底物之间的结合能力与其酶活正相关。因此, 含有 CBM1 的 AA9 家族 LPMO 的酶活一般较高^[53]。研究发现, 缺失 CBM1 的 *Pa*LPMO9H^[58] 和 *Nc*LPMO9C^[57] 对纤维素的降解能力也比较低。因此, CBM1 区域对 AA9 家族 LPMO 的底物结合和酶活正相关。

除了上述的底物结合和酶活之外, CBM1 还与 AA9 家族 LPMO 的区域选择性有关。但与上述的底物结合和酶活的正相关不同, CBM1 与 AA9 家族 LPMO 区域选择性的影响却随酶的变化而变化。有研究发现, CBM1 的缺失会严重影响其区域选择性。例如, Chalak 等^[58] 发现缺失 CBM1 的 *Pa*LPMO9H 区域选择性发生了变化, 含 CBM1 的 *Pa*LPMO9H 倾向于发生 C4 氧化, 而缺失 CBM1 的 *Pa*LPMO9H 却趋向于 C1 氧化。当然, 也有研究证明 CBM1 对一些 AA9 家族 LPMO 的区域选择性没有影响。例如, Laurent 等^[57] 发现缺失 CBM1 结构对 *Nc*LPMO9C 区域选择性无影响。类似的性质也体现在来源红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 的 *Hj*LPMO9A^[51]。

综上所述, CBM1 对 AA9 家族 LPMO 的底物结合、酶活和区域选择性密切相关。但 CBM1 与这 3 种功能之间的关系也不一样。缺失 CBM1 的 AA9 家族 LPMO 对纤维素底物的结合力和酶活力几乎都降低。但 CBM1 对 AA9 家族 LPMO 区域选择性的影响却随蛋白的变化而变化。因此, CBM1 在 AA9 中的作用值得进一步研究来明确 CBM1 对 AA9 家族 LPMO 酶学特性的影响。

2 AA9 家族 LPMO 的微生物表达调控

为了加快 AA9 家族 LPMO 的工业化应用, 已开展了大量的 AA9 家族 LPMO 异源表达的相关工作。目前, 考虑到 AA9 家族 LPMO 主要来源于真菌, 大多数研究均将其在毕赤酵母及其他几种真核微生物中实现了异源表达。但由于大肠杆菌研究深入, 为许多外源蛋白提供了最经济和最快速的表达等优势^[27-28]。到目前为止, 5 种 AA9 家族

LPMO 在大肠杆菌中得到成功表达。表 2 汇总了现有 AA9 家族 LPMO 在真核和原核微生物中异源表达及酶活力检测方法。

由于 AA9 家族 LPMO 的第一位组氨酸是活性位点^[43], 因此在大肠杆菌宿主中进行异源表达(表 2)时, 可以利用不同的信号肽将目标蛋白分泌到胞外或周质空间, 获得第一位是组氨酸的重组蛋白。比如郭宵等^[60] 将来源于嗜热毁丝霉的 *Mt*C1LPMO 在大肠杆菌中进行表达, 发现 *PelB* 信号肽可以实现其分泌表达, 而 *Mt*C1LPMO 自身信号肽表达的酶则是胞内可溶性表达, 最终 *PelB* 信号肽表达的蛋白经过发酵条件优化后的可溶性总产量为 12.65 mg/L。但是也有研究将 AA9 家族 LPMO 蛋白基因自身信号肽去掉后利用载体 pET-21a 在大肠杆菌实现蛋白的胞内可溶性表达^[62-63]。此外, de Gouvea 等^[61] 将来源于烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的 *Af*AA9B 包含信号肽在内的全部基因克隆后连接至 pET-28a 载体, 在大肠杆菌异源表达, 表达后的 *Af*AA9B 为包涵体, 将其重折叠后获得有酶活力的蛋白。

由于 AA9 家族 LPMO 都来源于真菌^[17], 所以绝大部分研究将其在常见的真菌表达宿主(如毕赤酵母、米曲霉、嗜热毁丝霉、里氏木霉、构巢曲霉和青霉菌)中进行了异源表达(表 2)。毕赤酵母作为最常用的真核表达系统, 基因操作技术相对成熟, 被广泛用来异源表达 AA9 家族的 LPMO。考虑到 AA9 家族 LPMO 的第一个氨基酸就是活性位点, 因此在构建质粒时可以将 AA9 家族 LPMO 成熟肽的 N 端与信号肽识别位点直接相连, 以便信号肽酶正确切割^[59,66], 获得具有正确 N 端序列的 LPMO。另外, 还可以在构建质粒时添加合适的酶切位点, 翻译后利用相应的酶切获得首位为组氨酸的酶分子。例如, Westereng 等^[68] 在第一位组氨酸的前面加入肠激酶的识别序列 (LEKRDDDDR/HYTF), 肠激酶的切割位点在 DDDDR 的 C 端, 蛋白表达后利用肠激酶处理可得到第一位是组氨酸的重组蛋白。

表 2 AA9 家族 LPMO 在不同宿主中的异源表达

Table 2 Examples of AA9 LPMO heterologous expression in different hosts

Expression host	Protein name	Organism	Signal peptide	Methods for measuring LPMO activity	References
<i>Escherichia coli</i>	<i>MtC1LPMO</i>	<i>M. thermophila</i>	MLTTTFALLTAALGVSA	2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP)	[60]
	<i>MtC1LPMO</i>	<i>M. thermophila</i>	PeIB	2,6-DMP	[60]
	<i>AfAA9B</i>	<i>A. fumigatus</i>	MTLSKITSIAGLLASASLVAG	2,6-DMP, DNS	[61]
	<i>CgAA9</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	—	DNS, HPLC	[62]
	<i>TaAA9A</i>	<i>T. aurantiacus</i>	—	2,6-DMP, ESI-MS	[63]
	<i>TcAA9A</i>	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	—	2,6-DMP, ESI-MS	[63]
<i>Pichia pastoris</i>	GH61	<i>Sporotrichum thermophile</i>	α -factor	DNS	[64]
	<i>PaLPMO9H</i>	<i>Podospora anserina</i>	α -factor	HPAEC-PAD, ESI-MS	[65]
	<i>GcLPMO9A</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	α -factor	HPAEC-PAD, MALDI-ToF MS	[66]
	PMO9A_MALCI	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	α -factor	HPAEC, MS	[67]
	<i>PcGH61D</i>	<i>P. chrysosporium</i>	α -factor	HPAEC, MALDI-TOF	[68]
	<i>AkCel61</i>	<i>Aspergillus kawachii</i>	α -factor	HPAEC-PAD	[59]
	<i>StCel61a</i>	<i>S. thermophile</i>	α -factor	DNS	[64]
	AN1602	<i>Aspergillus nidulans</i>	MKFSSVLALAASAKLVAS	MALDI-TOF, HPAEC-PAD	[52]
	<i>TaLPMO9A</i>	<i>T. aurantiacus</i>	MSFSKIIATAGVLASASLVAG	MALDI-TOF	[21]
	<i>NcLPMO9C</i>	<i>N. crassa</i>	MKTGSILAALVASASA	2,6-DMP, HPAEC, HPSEC	[57]
	PMO-01867	<i>N. crassa</i>	MKSSLLVVLTAGLAVRDAIA	Amplex Red assay, HPLC	[39]
	PMO-02916	<i>N. crassa</i>	MKTGSILAALVASASA	Amplex Red assay, HPLC	[39]
	PMO-08760	<i>N. crassa</i>	MRSTLVTGLIAGLLSQQAAA	Amplex Red assay, HPLC	[39]
	PMO-03328	<i>N. crassa</i>	MLPSISLLLAALGTSA	Amplex Red assay, HPLC	[39]
	<i>FgLPMO9A</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	MSSFITKTVLAALVAAAGVRA	MALDI-ToF, HPAEC	[69]
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>TaLPMO9A</i>	<i>T. aurantiacus</i>	MSFSKIIATAGVLASASLVAG	MALDI-ToF, HPAEC-PAD	[21]
	<i>MtLPMO9A</i>	<i>M. thermophila</i>	MLTTTFALLTAALGVSA	HPAEC, MALDI-TOF	[70-71]
	<i>MtLPMO9B</i>	<i>M. thermophila</i>	MKSFTLTTLAALAGNAAA	HPAEC, MALDI-TOF	[70]
<i>Trichoderma Reesei</i>	<i>MtLPMO9C</i>	<i>M. thermophila</i>	MKVLAPLILAGAASA	HPAEC, MALDI-TOF	[70]
	GH61A	<i>T. aurantiacus</i>	MSFSKIIATAGVLASASLVAG	PHBAH, HPLC	[9]
	GH61B	<i>T. Reesei</i>	MKSFTIAALAALWAQEAAA	PHBAH, HPLC	[9]
<i>A. nidulans</i>	GH61E	<i>T. Reesei</i>	MLANGAIVFLAAALGVSG	PHBAH, HPLC	[9]
	<i>MtLPMO9J</i>	<i>M. thermophila</i>	MKLSLFSVLATALTVEG	MALDI-TOF MS, HPAEC-PAD	[72]
<i>Penicillium verruculosum</i>	<i>PvLPMO9A</i>	<i>P. verruculosum</i>	MPSTKVAALSAVLALASTVAG	2,6-DMP	[73]
	<i>TtLPMO</i>	<i>T. terrestris</i>	MLANGAIVFLAAALGVSG	Fluorimetric assay of the oxygen consumption rate	[74]
	<i>TrLPMO</i>	<i>T. reesei</i>	MIQKLSNLLVTALAVATGVVG	Fluorimetric assay of the oxygen consumption rate	[74]

注：—：无数据。文献中未说明用的哪个信号肽。

Note: —: No data. The reference didn't indicate which signal peptide was used.

迄今为止，已有多种信号肽被用于 AA9 家族 LPMO 在真菌表达宿主中进行分泌表达。利用毕赤酵母为宿主表达 AA9 家族 LPMO 时最常用的是来源于毕赤酵母常用载体上的 α -factor 信号肽^[59,64,68]和基因自身信号肽^[39,57]。此外，不同的信号肽对

同一个 AA9 家族 LPMO 表达的效果也得到了广泛的报道。例如，Ladevèze 等^[75]利用基因自身的信号肽和 α -factor 信号肽在毕赤酵母中分别分泌表达 3 个目的蛋白，发现 *GcLPMO9A* 和 *GcLPMO9B* 利用基因自身的信号肽比 α -factor 信号肽分泌表达的

目标蛋白产量更高, 而 *GcLPMO9C* 则是 α -factor 信号肽分泌表达的目标蛋白产量更高; 但是 3 个酶的比活力都是自身信号肽分泌表达的更高, 原因是自身信号肽分泌表达的蛋白获得更多具有活性的正确 N 端组氨酸的 LPMO, 而 α -factor 信号肽含有两个蛋白酶切割位点 Kex2 和 Ste13, Ste13 的切割位点在 EAEA 四肽的下游, 当蛋白在毕赤酵母中过表达时, 这个四肽经常被保留下来, 从而使 LPMO 的 N 端活性位点 His 被破坏而丧失酶活。Kadowaki 等^[72]利用 *MtLPMO9J* 基因自身信号肽和 pEXPYR 载体上的葡萄糖淀粉酶信号肽两种信号肽在构巢曲霉中表达 *MtLPMO9J*, 发现基因自身信号肽成功分泌表达 N 端组氨酸正确的 *MtLPMO9J*, 而另一个信号肽表达的 *MtLPMO9J* 其 N 端不正确, 因而也没有酶活力。综上所述, 在真菌中分泌表达 AA9 家族 LPMO 时, 相比 α -factor 信号肽, 利用基因自身信号肽分泌表达的 N 端正确的重组蛋白较多, 而且构建质粒时, 利用基因自身信号肽相比其他信号肽更方便构建, 所以利用基因自身信号肽分泌表达 AA9 家族 LPMO 具有一定的优势。目前将 AA9 家族 LPMO 在真菌表达宿主进行信号肽优化的研究较少, 后期研究可以利用不同信号肽来实现 AA9 家族 LPMO 的高效表达, 研究信号肽与 LPMO 的构效关系。

由表 2 还可以看出, 除了细菌表达宿主和毕赤酵母真菌表达宿主, 还有一部分 AA9 家族 LPMO 在其他真菌表达宿主中进行了重组表达。研究表明, 在其他真菌表达宿主中表达的 AA9 家族 LPMO 的 N 端第一位组氨酸被甲基化^[19-21]。N 端组氨酸被甲基化修饰后 LPMO 的最大特性是对 H_2O_2 造成的氧化失活具有更高的抵抗性, 保护了 LPMO 被来自活性位点产生的氧而造成的氧化失活^[21]。N 端组氨酸甲基化后对 LPMO 其他特性的影响还没有研究透彻, 不过 Petrovic 等^[21]发现 N 端组氨酸是否甲基化对 *TaLPMO9A* 的底物特异性、His1 的 pKa、与铜离子的亲和力影响较小。由于 N 端组氨

酸被甲基化修饰后的 LPMO 可以降低其自身氧化失活的比例, 因此提高了酶的稳定性, 这一点在工业应用中起到重要作用。总体来说, AA9 家族 LPMO 大部分是在毕赤酵母中进行了异源表达, 因为毕赤酵母是研究最透彻的真菌表达宿主, 基因操作技术比较成熟, 其他真菌表达宿主可能存在转化难、不易操作等问题。

目前, 表征 LPMO 酶活力的方法主要有通过检测氧化产物和检测反应过程中由底物或产物引起吸光值或荧光值的变化两大类。例如, 用 HPAEC-PAD 和 MALDI-TOF 检测产物中的寡糖和氧化寡糖^[66], 通过氧化产物分子量大小分析寡糖产物大小及 LPMO 的氧化产物, 进而分析 LPMO 的氧化位点, 但此方法对实验设备的要求较高。利用吸光值或荧光值变化检测 LPMO 酶活力的方法有以下 5 种: (1) 比较常用的方法是用 DNS 方法检测降解纤维素产生的还原糖来计算酶活力^[62,64]; (2) 利用离子吸附来检测底物被 Cl 氧化后生成的羧基^[47]; (3) 由于 LPMO 降解底物反应过程需要利用氧气, 利用氧气的消耗量来计算酶活力^[74]; (4) 在 LPMO 反应过程有 H_2O_2 的产生, 也可以用 H_2O_2 的生成量来表示酶活力^[39]; (5) 利用 AA9 家族 LPMO 氧化 2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-dimethoxyphenol, 2,6-DMP) 生成有色物质来检测其酶活力^[48], 这种检测方法相对快捷方便, 已得到了广泛的应用。

3 AA9 家族 LPMO 的应用研究

3.1 底物预处理方式对 AA9 家族 LPMO 应用的影响

由于木质纤维素的特殊致密结构极大地限制了酶解效率, 在酶解之前用机械物理或化学等方法处理木质纤维素, 以破坏其致密的结晶结构, 有利于后续的酶解处理。当然, 不同的预处理会对木质纤维素产生不同的效果, 进而影响 AA9 家族 LPMO 的酶解效果。例如, Hu 等^[76]发现来源于嗜热子囊菌 (*T. aurantiacus*) 的 AA9 与纤维素酶协同作用 48 h, 有机试剂预处理的玉米秸秆水解率提高

25%，而蒸汽预处理的玉米秸秆水解率则仅提高了14%，远小于有机试剂预处理；他们分析认为可能是由于纤维素底物的结构不一致导致，AA9 与纤维素酶协同时，对结晶度高的纤维素 I 底物协同效率高，却对结晶度较低的纤维素 II 和 III 没有协同作用。然而，在比较了热水预处理、有机试剂预处理和碱液预处理这 3 种常见的预处理方式后，Rodríguez-Zúñiga 等^[77]发现热水预处理生物物质是 LPMO 发挥最大氧化作用的预处理方式，分析原因是热水预处理产生的木质素最多，而木质素可以为 LPMO 提供电子^[64,78]，从而提高 LPMO 对生物质的降解效率。电子供体在 AA9 家族 LPMO 的催化过程发挥重要作用，木质素已经被证明可以为 AA9 家族 LPMO 提供电子^[64,76-78]，目前发现的电子供体也比较多^[7]，常用的电子供体是抗坏血酸^[8,31,53]，然而不同的 LPMO 对不同电子供体的特异性也不一致^[70]。但是木质素可以为 AA9 家族 LPMO 提供电子这一发现具有重要意义，因为在降解木质纤维素时，若底物中的成分可以当电子源，就不需要添加外来电子源，这可以节省工业应用的经济成本。

3.2 AA9 家族 LPMO 在生物能源方面的应用

由于 AA9 家族 LPMO 可以降解晶体状态的纤维素，进而更有利于其他纤维素酶对纤维素的降解，酶解后生成的糖可进一步发酵生成生物乙醇，能缓解全球能源和资源紧张的问题^[79-80]。因此，AA9 家族 LPMO 与纤维素酶的协同作用得到了广泛的研究，大部分 AA9 家族 LPMO 与不同纤维素酶是协同作用，但是协同程度不尽相同。例如，Dimarogona 等^[64]证明 *StCel61a* 和 *Celluclast* 1.5 L 的比例为 1:2 降解云杉时，还原糖的含量提高了 42%。Bulakhov 等^[81]将 3 种 AA9 家族 LPMO 分别替换总纤维素酶的 10%来降解微晶纤维素，与纤维素酶单独降解相比，还原糖的产量提高了 17%–31%。Du 等^[82]发现当 *AnLPMO15g* 与纤维素酶共同降解羧甲基纤维素、微晶纤维素和稻草

时，还原糖产量是纤维素酶单独降解时的 1.08、1.93 和 2.31 倍，因此，同一个 LPMO 与纤维素酶协同作用时，对不同底物的降解程度差异也较大。

AA9 家族 LPMO 除了与纤维素酶协同作用，还存在抑制效果，如 *MtLPMO9L* 与纤维二糖水解酶 II 存在协同作用，却与纤维二糖水解酶 I 存在抑制效果^[83]。此外，当 AA9 家族 LPMO 与其他酶协同降解底物时，酶的不同添加比例^[62]及底物固形物含量^[84]对降解效率都有影响。因此，虽然 AA9 家族 LPMO 的添加可以提高对木质纤维素底物的降解效率^[85]，但是在工业应用中底物合适的预处理方式、合适的酶的剂量与配比都值得更深入的研究。

3.3 AA9 家族 LPMO 在纳米纤维方面的应用

近年来，纤维素以纤维素纳米纤维的形式在可持续材料研究中得到广泛应用。纳米纤维的生产通常需要苛刻的化学条件和强大的机械纤维性颤动，这两者都对环境有负面影响。最新研究表明 LPMO 可以促进纳米纤维的形成^[86-87]。例如，*NcLPMO9F* 和 *NcLPMO9E* 处理后的纳米纤维其胶体稳定性增加。与传统的纳米纤维制备方法相比，LPMO 制备的纳米颗粒具有更好的力学性能，证明 LPMO 在纤维素纳米材料制备中的独特用途，而且减少了有毒化学物质的使用和制备纳米纤维性的高能耗，表明 LPMO 具有制备纤维素纳米材料的绿色选择潜力^[87]。

4 结语和展望

木质纤维素作为自然界中最丰富的可再生资源，将其高效降解进而转化为其他材料及能源是研究的重点。AA9 家族 LPMO 可以通过氧化断裂糖苷键的方式降解晶体纤维素，因此 AA9 家族 LPMO 的研究对生物质的转化具有重要意义。虽然截至目前已经利用晶体衍射技术解析获得了 14 种 LPMO 的三维结构，并基于此提出了它们氧化断裂糖苷键的作用机制，但具体的作用机制尚不明确。作为常见的氧化还原酶，其催化反应过程中电子传递过程

比较复杂, 利用现有实验手段很难解析, 可以考虑结合量化计算和分子动力学模拟, 进一步探究 LPMO 的催化机制和氧化还原过程中电子传递过程。基于现有 LPMO 的三维结构可以发现其活性位点位于蛋白质表面且呈平面结构, 虽然该活性位点区域有利于与木质纤维素等底物结合, 但其与底物之间的亲和作用力较弱, 因此其降解效率较低, 从而使降解所需时间也较长。可利用分子模拟技术在 LPMO 活性位点附近通过残基突变来获得与底物具有较高亲和性的突变体, 最终获得高酶活的 LPMO。除了提高 LPMO 的酶活, LPMO 的高效异源表达对其工业化应用也至关重要。因此, 选择合适的表达宿主, 并对其转录和表达调控等进行系统优化以筛选获得高效表达 LPMO 的宿主。此外, 考虑到 N 端第一个氨基酸 His 是其活性位点, 因此, LPMO 的分泌及其信号肽的选择对其高效表达和调控至关重要。除了文中提到 LPMO 在生物能源及纳米纤维方面的应用, LPMO 在饲料添加剂及生产功能性寡糖等方面的应用也值得期待。我们相信, 随着 LPMO 研究领域的快速发展, 自然界中越来越多的 LPMO 会被发现, 其酶学特性的进一步研究也会让 LPMO 的应用领域得到进一步扩展。

REFERENCES

- [1] Du FG, Feng WS. Progress in alcohol production from straw: a demonstration project[J]. *Modern Chemical Industry*, 2009, 29(1): 16-19 (in Chinese)
杜风光, 冯文生. 秸秆生产乙醇示范工程进展[J]. *现代化工*, 2009, 29(1): 16-19
- [2] Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview[J]. *International Microbiology*, 2002, 5(2): 53-63
- [3] Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective[J]. *Bio Energy Research*, 2010, 3(1): 82-92
- [4] Jarvis M. Cellulose stacks up[J]. *Nature*, 2003, 426(6967): 611-612
- [5] Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5): 452-481
- [6] Merino ST, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization[A]. Olsson L. *Biofuels*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007: 95-120
- [7] Meier KK, Jones SM, Kaper T, et al. Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(5): 2593-2635
- [8] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 219-222
- [9] Harris PV, Welner D, McFarland KC, et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(15): 3305-3316
- [10] Levasseur A, Drula E, Lombard V, et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 41
- [11] Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 45
- [12] Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, et al. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 10(2): 122-126
- [13] Lo Leggio L, Simmons TJ, Poulsen JCN, et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 5961
- [14] Voshol GP, Vijgenboom E, Punt PJ. The discovery of novel LPMO families with a new Hidden Markov model[J]. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 105
- [15] Sabbadin F, Hemsworth GR, Ciano L, et al. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 756
- [16] Filiatrault-Chastel C, Navarro D, Haon M, et al. AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 1-15
- [17] Monclaro AV, Filho EXF. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: recent developments and application in lignocellulose breakdown[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 771-778
- [18] Hemsworth GR, Johnston EM, Davies GJ, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(12): 747-761
- [19] Beeson WT, Vu VV, Span EA, et al. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, 84: 923-946
- [20] Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(37): 15079-15084
- [21] Petrovic DM, Bissaro B, Chylenski P, et al. Methylation of

- the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation[J]. *Protein Science*, 2018, 27(9): 1636-1650
- [22] Li X, Zhang LL, Tian L, et al. The advance of efficient catalysis of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2016, 43(10): 970-979 (in Chinese)
- 李欣, 张丽丽, 田莉, 等. 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
- [23] Wu M, Beckham GT, Larsson AM, et al. 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
- [24] Li X, Beeson IV WT, Phillips CM, et al. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases[J]. *Structure*, 2012, 20(6): 1051-1061
- [25] Tan TC, Kracher D, Gandini R, et al. Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7542
- [26] Agger JW, Isaksen T, Várnai A, et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(17): 6287-6292
- [27] Isaksen T, Westereng B, Aachmann FL, et al. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(5): 2632-2642
- [28] Simmons TJ, Frandsen KEH, Ciano L, et al. Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1064
- [29] Hansson H, Karkehabadi S, Mikkelsen N, et al. High-resolution structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Hypocrea jecorina* reveals a predicted linker as an integral part of the catalytic domain[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(46): 19099-19109
- [30] Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, et al. 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
- [31] Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(2): 890-892
- [32] Chen C, Chen JY, Geng ZG, et al. Regioselectivity of oxidation by a polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 155
- [33] Span EA, Suess DLM, Deller MC, et al. The role of the secondary coordination sphere in a fungal polysaccharide monooxygenase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(4): 1095-1103
- [34] Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, et al. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(2): 562-565
- [35] Liu B, Kognole AA, Wu M, et al. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition[J]. *FEBS Journal*, 2018, 285(12): 2225-2242
- [36] Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, et al. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(38): 22955-22969
- [37] Frandsen KEH, Simmons TJ, Dupree P, et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 298-303
- [38] Petrovic DM, Várnai A, Dimarogona M, et al. Comparison of three seemingly similar lytic polysaccharide monooxygenases from *Neurospora crassa* suggests different roles in plant biomass degradation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(41): 15068-15081
- [39] Kittl R, Kracher D, Burgstaller D, et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 79
- [40] Bissaro B, Streit B, Isaksen I, et al. Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(3): 1504-1513
- [41] Bissaro B, Røhr ÅK, Müller G, et al. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(10): 1123-1128
- [42] Hangasky JA, Iavarone AT, Marletta MA. Reactivity of O₂ versus H₂O₂ with polysaccharide monooxygenases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(19): 4915-4920
- [43] Eijssink VGH, Petrovic D, Forsberg Z, et al. On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 58
- [44] Kuusk S, Bissaro B, Kuusk P, et al. Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(2): 523-531
- [45] Kuusk S, Kont R, Kuusk P, et al. Kinetic insights into the role of the reductant in H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase[J]. *The*

- Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(5): 1516-1528
- [46] Müller G, Chylenski P, Bissaro B, et al. The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 209
- [47] Wang DM, Li J, Wong ACY, et al. A colorimetric assay to rapidly determine the activities of lytic polysaccharide monooxygenases[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 215
- [48] Breslmayr E, Hanžek M, Hanrahan A, et al. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 79
- [49] Moses V, Hatherley R, Tasthan Bishop Ö. Bioinformatic characterization of type-specific sequence and structural features in auxiliary activity family 9 proteins[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 239
- [50] Danneels B, Tanghe M, Joosten HJ, et al. A quantitative indicator diagram for lytic polysaccharide monooxygenases reveals the role of aromatic surface residues in H₂LPMO9A regioselectivity[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0178446
- [51] Danneels B, Tanghe M, Desmet T. Structural features on the substrate-binding surface of fungal lytic polysaccharide monooxygenases determine their oxidative regioselectivity[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(3): 1800211
- [52] Jagadeeswaran G, Gainey L, Mort AJ. An AA9-LPMO containing a CBM1 domain in *Aspergillus nidulans* is active on cellulose and cleaves cello-oligosaccharides[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 171
- [53] Bennati-Granier C, Garajova S, Champion C, et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospira anserina*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 90
- [54] Courtade G, Wimmer R, Röhr AK, et al. Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with β -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(21): 5922-5927
- [55] Zhou XL, Zhu HH. Current understanding of substrate specificity and regioselectivity of LPMOs[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2020, 7: 11-30
- [56] Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition[J]. Biochemical Journal, 2004, 382(3): 769-781
- [57] Laurent CVFP, Sun PC, Scheiblbrandner S, et al. Influence of lytic polysaccharide monooxygenase active site segments on activity and affinity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6219
- [58] Chalak A, Villares A, Moreau C, et al. Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 206
- [59] Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, et al. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(6): 1279-1285
- [60] Guo X, An YJ, Chai CC, et al. Fermentation condition optimization of recombinant lytic polysaccharide monooxygenase extracellularly expressed in *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(5): 31-37 (in Chinese)
郭宵, 安亚静, 柴成程, 等. 大肠杆菌分泌表达裂解性多糖单加氧酶发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 31-37
- [61] de Gouvea PF, Gerolamo LE, Bernardi AV, et al. Lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* can improve enzymatic cocktail activity during sugarcane bagasse hydrolysis[J]. Protein & Peptide Letters, 2019, 26(5): 377-385
- [62] Kim IJ, Nam KH, Yun EJ, et al. Optimization of synergism of a recombinant auxiliary activity 9 from *Chaetomium globosum* with cellulase in cellulose hydrolysis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8537-8547
- [63] Zhang RQ, Liu YC, Zhang Y, et al. Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monooxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(14): 5739-5750
- [64] Dimarogona M, Topakas E, Olsson L, et al. Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 480-487
- [65] Fanuel M, Garajova S, Ropartz D, et al. The *Podospira anserina* lytic polysaccharide monooxygenase PaLPMO9H catalyzes oxidative cleavage of diverse plant cell wall matrix glycans[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 63
- [66] Kojima Y, Várnai A, Ishida T, et al. A lytic polysaccharide monooxygenase with broad xyloglucan specificity from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* and its action on cellulose-xyloglucan complexes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(22): 6557-6572
- [67] Basotra N, Dhiman SS, Agrawal D, et al. Characterization of a novel lytic polysaccharide monooxygenase from *Malbranchea cinnamomea* exhibiting dual catalytic behavior[J]. Carbohydrate Research, 2019, 478: 46-53
- [68] Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, et al. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27807
- [69] Nekiunaite L, Petrović DM, Westereng B, et al. FgLPMO9A from *Fusarium graminearum* cleaves xyloglucan independently of the backbone substitution pattern[J]. FEBS Letters, 2016, 590(19): 3346-3356
- [70] Frommhagen M, Koetsier MJ, Westphal AH, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing

- agent specificity[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 186
- [71] Frommhagen M, Sforza S, Westphal AH, et al. Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 101
- [72] Kadowaki MAS, Várnai A, Jameson JK, et al. Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202148
- [73] Semenova MV, Gusakov AV, Telitsin VD, et al. Purification and characterization of two forms of the homologously expressed lytic polysaccharide monooxygenase (PvLPMO9A) from *Penicillium verrucosum*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2020, 1868(1): 140297
- [74] Gusakov AV, Bulakhov AG, Demin IN, et al. Monitoring of reactions catalyzed by lytic polysaccharide monooxygenases using highly-sensitive fluorimetric assay of the oxygen consumption rate[J]. *Carbohydrate Research*, 2017, 452: 156-161
- [75] Ladevèze S, Haon M, Villares A, et al. The yeast *Geotrichum candidum* encodes functional lytic polysaccharide monooxygenases[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 215
- [76] Hu JG, Arantes V, Pribowo A, et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass[J]. *Energy & Environmental Science*, 2014, 7(7): 2308-2315
- [77] Rodríguez-Zúñiga UF, Cannella D, de Campos Giordano R, et al. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(5): 2896-2903
- [78] Westereng B, Cannella D, Wittrup Agger J, et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18561
- [79] Chylenski P, Bissaro B, Sørle M, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in enzymatic processing of lignocellulosic biomass[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(6): 4970-4991
- [80] Harris PV, Xu F, Kreel NE, et al. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 162-170
- [81] Bulakhov AG, Gusakov AV, Chekushina AV, et al. Isolation of homogeneous polysaccharide monooxygenases from fungal sources and investigation of their synergism with cellulases when acting on cellulose[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(5): 530-537
- [82] Du LP, Ma LJ, Ma Q, et al. Hydrolytic boosting of lignocellulosic biomass by a fungal lytic polysaccharide monooxygenase, AnLPMO15g from *Aspergillus niger*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 126: 309-315
- [83] Zhou HC, Li T, Yu ZC, et al. A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 570-576
- [84] Hu JG, Chandra R, Arantes V, et al. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 149-153
- [85] Correa TLR, dos Santos LV, Pereira GAG. AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(1): 9-16
- [86] Moreau C, Tapin-Lingua S, Grisel S, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 156
- [87] Koskela S, Wang SN, Xu DF, et al. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(21): 5924-5933