

裂解多糖单加氧酶高效催化的研究进展*

李欣 张丽丽 田莉 张怀强 陈冠军 王禄山**

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)是一类新发现的铜离子依赖性的氧化酶, 常具有多种模块化组合, 能够高效氧化降解生物质多糖。LPMOs 的催化结构域为 β 三明治结构, 活性中心含有一个铜离子。该酶的催化反应过程相对于糖苷水解酶类更加复杂, 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 $\text{Cu}[\text{II}]$, 将其还原为 $\text{Cu}[\text{I}]$, $\text{Cu}[\text{I}]$ 结合并活化分子氧后, 再氧化降解多糖链的糖苷键, 生成氧化产物和非氧化产物。近年来的研究表明, 在木质纤维素降解酶系中加入 LPMOs 能显著提高其对结晶纤维素的转化效率, 因此 LPMOs 相关研究的深入开展可以拓展人们对其高效降解机制的认识, 从而为高效降解酶系的复配以降低工业规模的生产成本等提供理论指导。本文综述了该领域相关研究的最新进展, 分析了 LPMOs 潜在的研究方向与工业化应用的前景。

关键词 裂解多糖单加氧酶, 模块化组合, 活性中心架构, 底物结合, 电子传递链

学科分类号 Q936

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0175

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素三部分组成。其中, 纤维素在木质纤维素中的比例约占 40%~50%^[1], 由葡萄糖分子通过 β -1, 4-糖苷键连接, 是地球上最为丰富的生物质多糖。在很长一段时间里, 人们一直认为纤维素的降解由糖苷水解酶完成, 然而纤维素分子链内部及链间形成了复杂的氢键网络, 严重影响了外切纤维素酶等糖苷水解酶的水解速率^[2]。2010 年, 《科学》(*Science*)报道了 CBM33 家族成员可通过氧化方式高效断裂多糖链糖苷键^[3], 随后人们发现原来属于 GH61 家族的纤维素酶类, 其化学反应的本质也为氧化过程^[4], 通过氧化还原反应高效断裂结晶纤维素的糖苷键。基于其催化反应的性质, 人们将这类酶统称为裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)。LPMOs 通过氧化断键在多糖链上形成新的断点, 辅助木质纤维素降解酶类对底物进行高效降解, 可明显提高生物质的转化效率。

1 LPMOs 的分布与归类

LPMOs 广泛分布在纤维素降解活性的真菌与细菌的降解酶系统中。其中, 真菌 LPMOs 主要存在于子囊菌门和担子菌门中^[5-7], 由于其微弱的内

切纤维素酶活性而在很长一段时间内被归为糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)61 家族^[8]。2007 年, Merino 等^[9]发现 GH61 家族的一些成员与纤维素酶混合使用时提高了木质纤维素的转化效率, 这一现象引起人们的兴趣。随后 Karkehabadi 等^[10]获得了 GH61 家族蛋白的第一个结晶结构 *Ti*-Cel61B, 发现其结构中具有保守的平整表面, 并通过靠近 N 端的 2 个组氨酸来结合金属离子, 该酶结构中没有糖苷水解酶中普遍存在的催化活性凹槽, 这一发现表明 GH61 家族可能不是糖苷水解酶类。2011 年, Quinlan 等^[4]通过分析 *Ta*GH61A 的产物和酶分子中金属离子的种类, 证明了 GH61 家族成员为铜离子依赖性的氧化酶, 能够通过氧化反应断裂结晶纤维素的分子链。随后 Phillips 和 Vu 等通过实验发现, 不同的 GH61 成员其氧化产物不同, 如作用于磷酸

* 国家自然科学基金(31370111), 山东省自然科学基金(ZR2013CM038)和山东大学基本科研业务费专项资金资助(2015YQ004)。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-05-24, 接受日期: 2016-08-31

膨胀纤维素时, 来源于粗糙脉孢菌的 GH61-5 产生醛糖酸的 C1 位氧化产物, GH61-4 产生 4- 酮基醛糖的 C4 位氧化产物, 而 GH61-13 产生醛糖酸(C1 位氧化)和 4- 酮基醛糖(C4 位氧化)的产物^[11-13], 这表明不同的 LPMOs 具有不同的底物结合位点。

之前细菌 LPMOs 被归类到碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBM)33 家族, 主要分布在细菌的变形菌门、厚壁菌门和放线菌门, 还有少数分布在病毒、真菌、昆虫和古菌中, 主要作用于几丁质。几丁质结构类似结晶纤维素, 也是一类高度结晶的生物大分子, 由 N- 乙酰葡萄糖胺通过 β -1, 4- 糖苷键连接聚合而成。几丁质是地球上除纤维素外最丰富的有机化合物之一, 广泛存在于节肢动物的表皮、低等无脊椎动物和真菌的细胞壁中。早在 2005 年, Vaaje-Kolstad 等^[14]从黏质沙雷氏菌中发现了一种非催化蛋白 CBP21, 可以增加水解酶对几丁质的可及性。在 2010 年末, Vaaje-Kolstad 等^[3]证实 CBP21 在电子供体、二价金属离子和 O₂ 存在的条件下以氧化方式断裂几丁质糖链的糖苷键, 产生 C1 位氧化产物。Aachmann 等^[15]通过核磁共振和等温量热滴定实验也确认了 CBP21 活性位点的金属离子是铜离子。随后人们又证实了来自链霉菌属的 CBM33 蛋白能以协同的氧化方式作用于纤维素^[16], 并且氧化产物不同, 如 CelS2 产生 C1 位氧化产物, ScLPMO10B 产生 C1 和 C4 位氧化产物^[17]。这都表明了 CBM33 家族成员也是铜离子依赖性的氧化酶类。

2012 年, Medie 等^[18]首次将这些酶定义为“裂解氧化酶”(lytic oxidases), 后来 Horn 等^[1]采用裂解多糖单加氧酶(lytic polysaccharide monooxygenases, LPMOs)给出该类酶的准确定义。随着组学数据的急剧增加, 2013 年碳水化合物活性酶数据库(CAZy, <http://www.cazy.org>)将 LPMOs 与木质素降解酶归为一大类, 统称为“辅助活性酶类”(auxiliary activities, AA)^[19]。现将 GH61 家族重新归为 AA9 家族, CBM33 家族重新归为 AA10 家族。随后人们发现了作用于几丁质的真菌 AA11 家族以及作用于淀粉的 AA13 家族也是铜离子依赖性的 LPMOs^[20-21]。目前 CAZy 数据库中 AA 家族基因序列已多达 12 000 条, LPMOs 主要分布在 AA9、AA10、AA11 和 AA13 家族。随着基因组测序技术的快速发展, 对天然生境中微生物群落组成的分析发现, 陆生堆肥生境中主要发生的是高温好氧的降解过程, 其中主要的降解菌是子囊菌门与放线菌门

的微生物^[22-23], 分析主要降解微生物的基因组, 发现了大量编码 LPMOs 的基因。

2 LPMOs 的模块化结构

基因组中的 LPMOs 常常由多个结构域组成, 除了催化结构域外, 还常与 CBM 相连。这种与糖苷水解酶类似^[24-28]的模块化组合拓展了酶分子的底物特异性。AA9 家族成员虽然序列多变, 但模块化组合很稳定(图 1)。有的以单一的催化结构域存在, 有的与 CBM 连接(约占 22%), CBM 绝大多数为 CBM1, 还有少量的 CBM18。经研究发现, 来源于柄孢壳菌属的 PaLPMO9A、PaLPMO9E 和 PaLPMO9H 都连接有一个 CBM1, 其降解纤维素的效率高于来源于同菌属的其他 LPMOs^[29], 这说明 CBM1 能够促进催化结构域与不溶性纤维素底物的结合, 提高 LPMOs 酶分子在局部区域的浓度, 从而提高该酶分子对底物的降解效率。所以 CBM1 能够增强纤维素酶^[30]、半纤维素酶^[31]和氧化还原酶^[29, 32]的活性。

AA10 家族成员的序列差异性较大, 模块化组合多样(图 1)。约 23% 的 AA10 家族成员能够与多种 CBM (CBM2、CBM3、CBM5、CBM10 和 CBM12)形成模块化组合。不仅如此, 单个 AA10 催化结构域甚至可以与 2~3 个 CBM 模块相连, 这种组合模式促进了酶分子对底物的结合, 并扩大了 AA10 家族的底物范围, 使其能够结合纤维素和几丁质等生物质大分子, 还有极少成员能与 GH2 和 GH18 这些糖苷水解酶的催化结构域相连, 表明这些多结构域的酶分子可能具有水解和氧化等多种功能。另外, 在已有模块化组合的细菌 AA10 成员中, 约 64% 含有纤连蛋白 III (fibronectin type 3, FN3)模块, 主要分布在芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属和肠球菌属中, 这种模块化组合可能与 LPMOs 不断被发现的新生物学功能和活性有关。研究表明, 一些细菌的致病因子, 如霍乱弧菌的锚定因子 GbpA 和李斯特菌的 LMO2467 都是 LPMOs^[33-34], 并且与 GbpA 相连的 FN3 结构域能够促进细菌附着到宿主的肠上皮细胞^[35]。最近 Chiu 等^[36]在昆虫痘病毒中发现了一种纺锤体蛋白的结构, 含有 LPMO 结构域, 据报道其与病毒发病机理相关, 并与杆状病毒中的 gp37 结构域一起被归到 AA10 家族。除此之外, 还有很大一部分 LPMOs 含有未知功能的 C 端结构域, 这表明除了降解生物质外, 这些 LPMOs 还可能具有其他多种生物学功能。

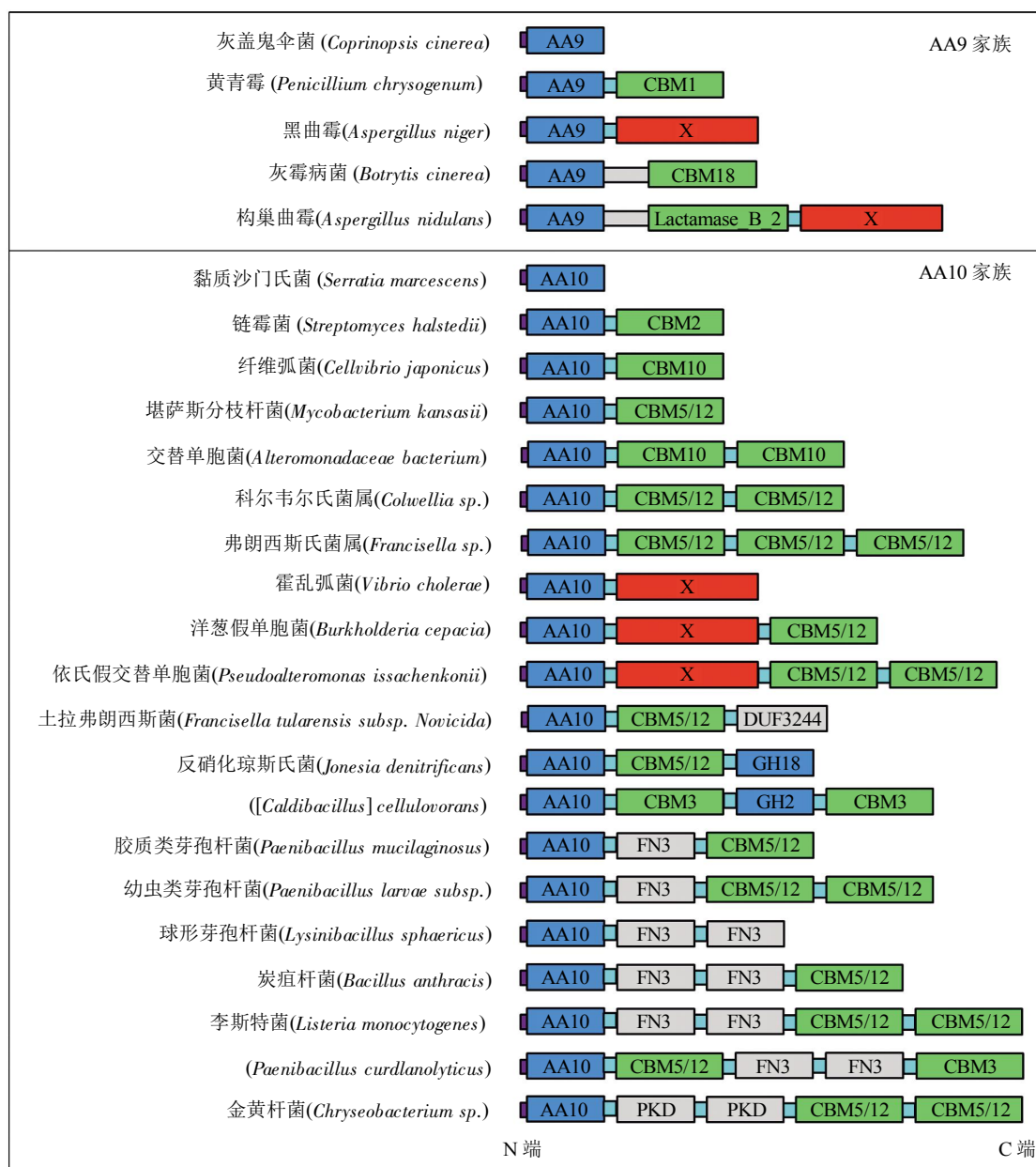


Fig. 1 Examples of modular LPMOs

图 1 LPMOs 模块化示意图

蓝色：催化模块(AA 和 GH)，绿色：碳水化合物结合模块(CBMs)，红色：未知功能的保守模块(X)，灰色：纤连蛋白Ⅲ(FN3)及其他结构域(已标注)，紫色：信号肽，蓝绿色：富含脯氨酸/丝氨酸的连接肽，未标注的灰色模块：未注释的连接区域。此图以 Levasseur *et al.* 2013^[19]为基础重新绘制。

3 LPMOs 催化结构域的立体拓扑结构与催化中心架构

通过模块化组合分布可以发现，AA9 和 AA10 家族成员的催化模块位于 N 端，辅助模块都位于 C 端，这可能与其 N 端的第一个组氨酸与铜离子

的正确配位有一定关系，进而对维持 LPMOs 酶分子活性具有重要意义。LPMOs 的结构核心都是类免疫球蛋白的 β 三明治结构，通常包含 8~10 个 β 折叠^[37]， β 折叠之间由一些 Loop 相连，其中多变较长的 Loop(L2、LS 和 LC)构成了真菌 LPMOs 的活性中心^[38](图 2a)。与糖苷水解酶类具有结合底物

的凹槽或孔道不同, LPMOs 的活性中心是一个具有铜离子结合位点的平整表面。

2011 年以后获得的真菌 LPMOs 的结晶结构, 其活性中心架构中均含有铜离子^[39-41]。该铜离子与 3 个氮原子进行配位, 在 *Nc*LPMO9M(PDB 号 4EIS)中 H82 咪唑基上的 N ϵ 、H1 咪唑基上的 N δ 和氨基氮参与配位; 其中这 2 个氨基酸绝对保守, 构成“组氨酸钳”(histidine brace)的特定架构, 形成了三配位的 T 型配位面, 这种配位是还原态 Cu[I]的主要配位方式; 当 LPMOs 处于氧化态时, Cu[II]的配位数增多, 除了“组氨酸钳”外, 还包括轴向酪氨酸的氧原子和溶剂中的多个氧原子

(图 2b), 形成扭曲八面体或三角双锥的配位构型。

除了活性位点铜离子的配位氨基酸保守外, 在纤维素降解活性的真菌 LPMOs 中还发现了保守的氢键网络(图 2b), 主要由 H160、Q169、Y171 (*Nc*LPMO9M, PDB 号 4EIS)和周围的水分子之间形成氢键。这种氢键网络在其他 LPMOs 家族活性中心均有发现, 其中的氨基酸残基均保守, 人们猜测这些氨基酸残基能够稳定“组氨酸钳”, 与底物形成氢键, 改变铜离子活性中心的微环境^[42]。统计发现, 只有活性位点和氢键网络中含有酪氨酸的 LPMOs 能够氧化底物的 C4 位^[38], Frandsen 等^[40]认为这可能与底物结合的位置特异性有关。

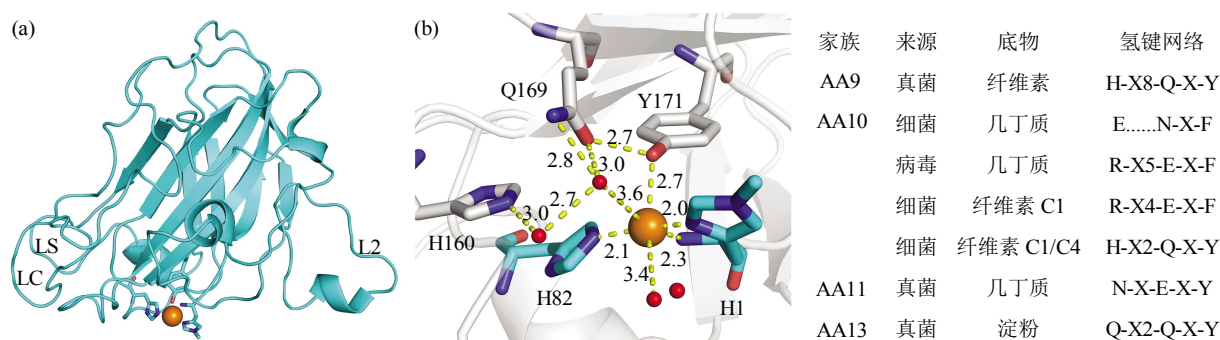


Fig. 2 The structure of LPMOs and the conserved H-bonding network in the architecture of active site

图 2 LPMOs 的结构及其活性中心的保守氢键网络

(a) 粗糙脉孢菌的 *Nc*LPMO9M 结构, PDB 号 4EIS, (b) *Nc*LPMO9M 的 Cu 活性中心及保守氢键网络, PDB 号 4EIS, H1 和 H82 为“组氨酸钳”的组成部分, 以天蓝色棒状显示。铜离子以橘黄色球状显示。水分子以红色小球显示。距离的单位为 Å。此图以 Span *et al.*, 2015^[42]为基础重新绘制。

4 LPMOs 底物结合的特异性与氧化产物的多样性

糖苷水解酶与底物的结合具有特异性^[43-44], LPMOs 也是如此。AA9 家族蛋白的活性中心位于其分子平整表面, 该表面的结构与 A 型碳水化合物结合模块(CBM)相似, 人们推测其表面的芳香族氨基酸通过 π -H 相互作用与多糖底物结合^[41]。研究发现, 降解结晶纤维素的真菌 LPMOs, 其位于底物结合平面的芳香族氨基酸残基相对保守, 这些芳香族氨基酸残基之间的距离大致是底物糖环距离的 2 倍或 3 倍(10~15Å)(图 3a), 这表明这些氨基酸的芳香环侧链可以通过 π -H 相互作用与单根糖链内的相应糖环形成相互作用。此外, 部分 AA9 蛋白底物结合平面内芳香族氨基酸之间的距离与结晶纤

维素链与链之间的距离大致吻合(8.2Å), 表明了 AA9 蛋白可以结合多条糖链^[41](图 3a)。另外, AA10 和 AA11 家族蛋白的底物结合平面含有较多带有亲水侧链的保守氨基酸, 如位于 *Ba*CBM33 底物结合平面上的 N63、Q65、T122、D191、T192 和 N194, 可通过氢键相互作用结合几丁质链中的乙酰基^[20, 37]。AA13 家族蛋白可以高效降解淀粉, 其活性中心架构中含有一条较浅的沟槽, 能够适应淀粉分子链的多种螺旋结构^[21, 42, 45]。这些研究表明 LPMOs 的底物结合区域具有结合特异底物结构的对应结构特征。

真菌 LPMOs 结合相应底物后, 推测其催化分子氧中的 1 个氧原子氧化断裂多糖链的糖苷键, 生成不同聚合度的氧化产物和非氧化产物, 另外 1 个氧原子结合 2 个质子和 2 个电子形成水分子^[11-13, 46]。

分子进化分析与产物组成的深入研究表明,大部分真菌 LPMOs 可以归为 3 类^[13, 47]: LPMO1、LPMO2 和 LPMO3, 其中 LPMO1 只氧化葡萄糖的 C1 位, 产生对应的醛糖酸内酯, 随后形成醛糖酸; LPMO2 只氧化 C4 位, 产生对应的 4-酮基醛糖;

LPMO3 氧化 C1 和 C4 位, 生成醛糖酸内酯和 4-酮基醛糖产物^[13, 17], LPMO3 中还包括 LPMO3* 亚类, 只能氧化 C1 位(图 3b). 这进一步表明真菌 LPMOs 对结晶纤维素的氧化降解具有空间位置特异性的特征.

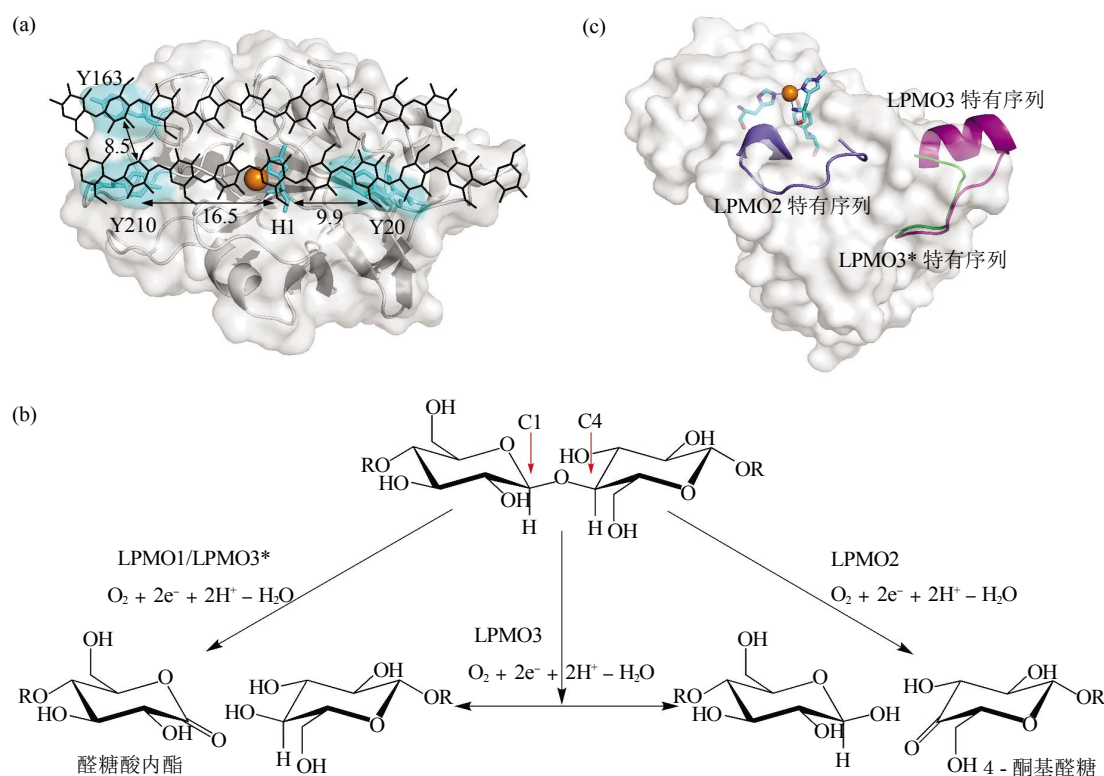


Fig. 3 The substrate-binding, oxidative cleavage of glucosidic bond of LPMOs and the structure basis of oxidation's regioselectivity

图 3 LPMOs 与底物的结合、氧化断键和氧化特异性的结构基础

(a) *NcLPMO9M* (PDB 号 4EIS) 与纤维素糖链的相互作用示意图(蛋白表面与糖链进行 π -H 相互作用的芳香族氨基酸以天蓝色棍棒形式显示), (b) LPMOs 氧化断键示意图. LPMOs 催化多糖链的氧化断键, C1 位氧化生成醛糖酸内酯, C4 位氧化生成酮基醛糖, 此图参考 Hemsworth *et al.* 2015^[48]重新绘制. (c) 与 LPMOs 氧化特异性有关的 Loop. 蓝色: LPMO2 特有的序列(*NcLPMO9D*, PDB 号 4EIR); 紫色: LPMO3 特有的序列(*NcLPMO9M*, PDB 号 4EIS); 绿色: LPMO3* 特有的序列(MYCTH_92668 的模建结构), 天蓝色: 铜离子配位氨基酸; 橘黄色: 铜离子. 此图以 Besson *et al.* 2015^[49]为参考重新绘制.

真菌 LPMOs 的氧化特异性与活性中心结合平面内多变的 Loop 有关, Van 等^[13]对真菌 LPMOs 序列和结晶结构进行比对分析发现, LPMO2 中有一段 9~14 个氨基酸的插入序列, 这段序列在活性位点表面形成了一个短螺旋, 可能直接参与结合纤维素底物, 而 LPMO3 在 20 位残基后有一段 12 个氨基酸的插入序列, 结晶结构分析表明这段序列形成了一段长的带有短螺旋的 L2, 删除粗糙脉孢菌 NCU07760(LPMO3)中的这段序列后, 该酶不产生 C4 位氧化产物, 而天然 LPMO3* 结构中的 L2 无

LPMO3 的螺旋结构(图 3c), 所以可以推测 LPMO3 中的这段插入序列可以影响酶分子在底物上的定位和活性架构对糖苷键中 C1 和 C4 位的定位. 酶分子空间位置特异性化学结构基础的深入分析, 对 LPMOs 的作用机理、协同机制以及酶系复配都有重要的指导意义, 因此这将是相关研究的重要方向.

5 LPMOs 的催化需要电子供体与高效电子传递

基于 LPMOs 催化机理的分析, 除了铜离子和

氧之外, LPMOs 还需要 2 个电子参与催化氧化反应, 所以其功能的发挥还取决于电子供体及其持续供给效率^[49]. 研究表明, AA9 家族蛋白质与纤维二糖脱氢酶(cellobiose dehydrogenase, CDH)共同加入到纤维素酶系中, 可以提高其对高度结晶的细菌纤维素、微晶纤维素以及磷酸膨胀纤维素的降解速率, 产物中葡萄糖的生成量提高了 2~8 倍^[50], 推测 LPMOs 在纤维素结晶区等难降解区域氧化断裂形成新的断点, 帮助持续性外切纤维素酶(cellobiohydrolase, CBH)更好地发挥功能^[51], 并可降低纤维素结晶度^[49, 52]. 在这个酶反应体系中, CDH 充当了 LPMOs 的电子供体. 研究发现, CDH 主要存在于木质纤维素降解真菌的胞外酶系, 能够促进纤维素和木质素的降解^[53]. CDH 由含有 FAD 的脱氢域(dehydrogenase, DH)和含有铁卟啉环的细胞色素域(cytochrome, CYT)组成, CDH 的 DH 结

构域可催化纤维二糖生成纤维二糖 -1, 5- 内酯, 同时将电子传递给 DH 结构域中的 FAD 将其还原为 FADH_2 ^[54]; 电子再经 CDH 的 CYT 结构域传递给真菌 LPMOs^[55], 将其活性中心的 $\text{Cu}[\text{II}]$ 还原为 $\text{Cu}[\text{I}]$, 从而驱动 LPMOs 发挥作用^[12, 50, 56] (图 4).

由于 LPMOs 的活性位点位于蛋白表面的平面区域, 所以铜离子催化中心也有可能直接与 CDH 接触来接收电子. 但考虑到反应中底物的存在, LPMOs 的活性位点表面很有可能结合纤维素底物, 这就阻止了铜中心与 CDH 的直接接触. 通过全序列比对真菌 LPMOs 的成员, 发现在其 C 端位置有一段较为保守的 P-G-P 区域, 这可能是 CDH 的结合位点^[55]. 所以 LPMOs 蛋白分子上应该存在与 CDH 相互作用的位点, 需要进行深入地研究来确定两者之间相互作用的区域与电子传递机制.

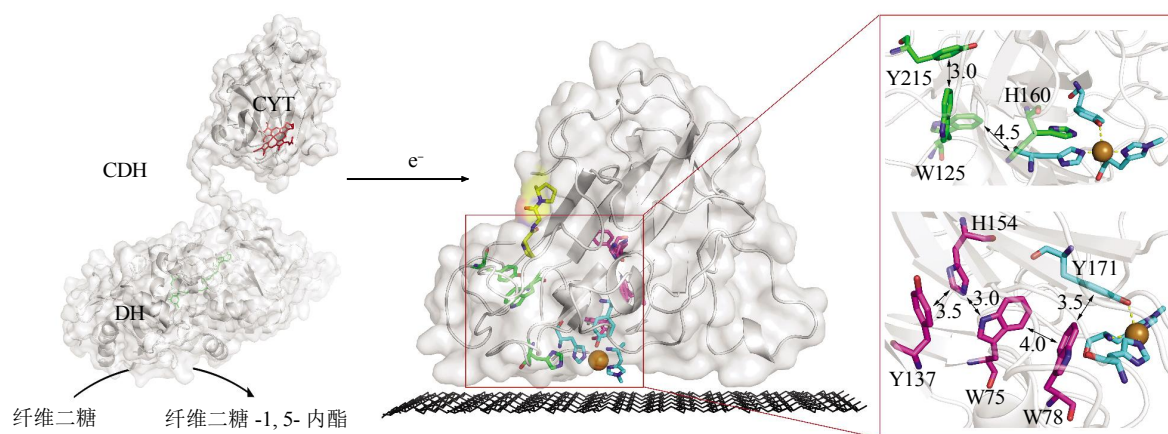


Fig. 4 The electron transfer between NcCDH and NcLPMO9M

图 4 NcCDH 与 NcLPMO9M 之间的电子传递

电子供体 CDH: *Nc*-CDH1, PDB 号 4QI7; AA9: *Nc*LPMO9M, PDB 号 4EIS. 黄色: CDH 结合位点(²¹⁸Pro-Gly-Pro²²⁰); 绿色: 电子传递链 1, 在所有纤维素活性真菌 LPMOs 中均保守; 紫色: 电子传递链 2, 在 LPMO3 中保守; 天蓝色: 铜离子的配位氨基酸; 橘黄色: 铜离子. 此图在 Besson *et al.* 2015^[38]的基础上进行了修改并重新绘制.

AA9 家族蛋白质分子上预测的 CDH 结合位点到活性中心铜离子的距离大致为 21Å, 因此, 两者之间应存在着位于蛋白质内部的电子传递链. 基于 AA9 家族蛋白的结构比对了多条序列, 人们发现了一些保守氨基酸, 这些氨基酸将活性中心保守的组氨酸与预测的 CDH 结合位点相连, 猜测它们可能构成了蛋白质内部的电子传递链. 如在粗糙脉孢菌的 *Nc*LPMO9M 中, 保守氨基酸残基 Y215、W125 和 H160(这些氨基酸残基在所有已表征的纤维素活

性真菌 LPMOs 中绝对保守)之间的距离都在 3.0~4.5Å 之间, 表明这些氨基酸可能参与了氧化还原反应过程中的电子转移. 另外在结构比对过程中还发现, 能够氧化糖链 C4 位的 AA9 蛋白结构存在着保守的 Tyr、Trp、His, 具备传递电子的性质, 并与预测的 CDH 结合位点和铜中心相连^[4, 10, 41], 并且这条通路中任意两个相邻氨基酸之间的距离在 3.0~4.0Å 之间, 表明它们也可能作为电子传递链的组成部分^[38](图 4). 因此需要利用结构生物信息

学与实验进一步验证电子在蛋白质内部的传递过程。

除了 CDH 可以作为 LPMOs 的电子供体外, 木质纤维素等复杂底物的降解产物也可能充当电子供体. 在无外源电子供体的情况下, 添加嗜热侧孢霉 AA9 家族的 LPMOs, 可以使糖收率提升 20%^[57], 并且研究发现, 当 LPMOs 和纤维素酶作用于纯纤维素底物时, 必须添加外源电子供体, 但作用于预处理的木质纤维素底物时, 则无需加入外源电子供体, 并且底物中木质素的含量越高, LPMOs 与纤维素酶的协同作用越强^[58], 这说明木质素的预处理产物可能是 LPMOs 的电子供体. 有研究表明, 不溶性大分子木质素通过其降解生成的可溶性小分子木质素进行电子的长距离传递, 最终传递给 LPMOs^[59]. 因此氧化酶类可能通过协同方式作用于木质素和纤维素, 完成其高效降解. 最近 Cannella 等^[60]以光合色素作为 LPMOs 的电子供体, 构建了一套光驱动的稳定快速反应体系, 使其催化活性最多提升 100 倍, 并推测 H87 和 H86(*Ti*LPMO9E, PDB 号 2YET)为光合色素在 LPMOs 上的电子传递链. 因此通过构建新型的电子供体体系可以显著提高 LPMOs 在生物技术和化学处理工艺中的应用潜力.

6 展 望

作为自然界中最丰富的碳源, 植物生物质高效降解的研究得到越来越多的关注. 植物生物质的主要成分是木质纤维素, 由于木质纤维素具有“生物质抗降解屏障”的特征^[61], 所以解决问题的关键在于找到经济高效的木质纤维素降解酶系统. LPMOs 的发现揭示了一种新型多糖降解酶的催化机制, 拓展了人们的传统认识. LPMOs 在自然界降解木质纤维素的微生物胞外酶系中广泛分布, 与纤维素水解酶类协同促进对结晶纤维素的降解. LPMOs 还可生成 H₂O₂ 副产物^[62], 具有杀菌功能. 因此 LPMOs 的相关研究丰富了人们对木质纤维素降解的认识, 为木质纤维素高效降解提供了全新的思路.

与糖苷水解酶的降解机制不同, LPMOs 氧化作用的发挥还需要电子供体, 真菌 LPMOs 可利用 CDH 作为电子供体, 然而结构对接分析却未得到很好的结果^[55], 所以了解两者的结构域功能, 找到 LPMOs 上的功能区与其电子受体氨基酸, 实验验证相关电子传递过程, 对下一步高效催化机制的展开非常重要. 另外, 在微生物中并不是所有分泌

LPMOs 的真菌都产生 CDH, 在细菌中也未发现 CDH, 所以在木质纤维素的天然降解体系中必然存在其他的电子供体及对应的电子传递链, 如 Gardner 等^[63]在细菌中发现了一类 C 端结构域类似细胞色素的碳水化合物结合蛋白 cbp2D 和 cbp2E, 这些蛋白质能够提高细菌 LPMOs 的催化效率, 猜测其可能作为电子供体, 因此该领域的相关研究正在全面展开. 需要指出的是, 工业大规模应用中外源添加电子供体的成本较高, 因此, 寻找 LPMOs 高效催化反应所需的天然电子供体, 构建一套促进木质纤维素高效降解的酶系统, 并阐明其高效降解与协同机制, 将是该领域的重要研究方向.

参 考 文 献

- [1] Horn S J, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, **5**(1): 45-56
- [2] 孟凡辉, 蒋绪恺, 刘琳, 等. 纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析. *生物化学与生物物理进展*, 2015, **42**(3): 201-210
Meng F H, Jiang X K, Liu L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2015, **42**(3): 201-210
- [3] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn S J, *et al.* An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 2010, **330**(6001): 219-222
- [4] Quinlan R J, Sweeney M D, Lo Leggio L, *et al.* Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(37): 15079-15084
- [5] Alfaro M, Oguiza J A, Ramirez L, *et al.* Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, 2014, **102**(8): 28-43
- [6] Floudas D, Binder M, Riley R, *et al.* The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 2012, **336**(6089): 1715-1719
- [7] Riley R, Salamov A A, Brown D W, *et al.* Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(27): 9923-9928
- [8] Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, *et al.* Homologous expression and characterization of Cel61A(EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(24): 6498-6507
- [9] Merino S T, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2007, **108**(1): 95-120
- [10] 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. *Journal of Molecular Biology*, 2008, **383**(1): 144-154
- [11] Beeson W T, Phillips C M, Cate J H, *et al.* Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide

- monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(2): 890–892
- [12] Phillips C M, Beeson W T, Cate J H, *et al.* Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 2011, **6**(12): 1399–1406
- [13] Vu V V, Beeson W T, Phillips C M, *et al.* Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **136**(2): 562–565
- [14] Vaaje-Kolstad G, Horn S J, Van Aalten D M, *et al.* The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(31): 28492–28497
- [15] Achmann F L, Sorlie M, Skjak-Braek G, *et al.* NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(46): 18779–18784
- [16] Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, *et al.* Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 2011, **20**(9): 1479–1483
- [17] Forsberg Z, Mackenzie A K, Sørli M, *et al.* Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(23): 8446–8451
- [18] Mba Medie F, Davies G J, Drancourt M, *et al.* Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature reviews Microbiology*, 2012, **10**(3): 227–234
- [19] Levasseur A, Drula E, Lombard V, *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, **6**(1): 41–54
- [20] Hemsworth G R, Henrissat B, Davies G J, *et al.* Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 2014, **10**(2): 122–126
- [21] Vu V V, Beeson W T, Span E A, *et al.* A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(38): 13822–13827
- [22] Zhang L, Ma H, Zhang H, *et al.* *Thermomyces lanuginosus* is the dominant fungus in maize straw composts. *Bioresource Technology*, 2015, **197**(1): 266–275
- [23] Zhang L, Zhang H, Wang Z, *et al.* Dynamic changes of the dominant functioning microbial community in the compost of a 90-m³ aerobic solid state fermentor revealed by integrated meta-omics. *Bioresource Technology*, 2016, **203**(1): 1–10
- [24] Borisova A S, Eneyskaya E V, Bobrov K S, *et al.* Sequencing, biochemical characterization, crystal structure and molecular dynamics of cellobiohydrolase Cel7A from *Geotrichum candidum* 3C. *The FEBS Journal*, 2015, **282**(23): 4515–4537
- [25] Kim Do Y, Lee M J, Cho H Y, *et al.* Genetic and functional characterization of an extracellular modular GH6 endo-beta-1, 4-glucanase from an earthworm symbiont, *Cellulosimicrobium funkei* HY-13. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, **109**(1): 1–12
- [26] Konanani R, Walter S T, Kgama M, *et al.* Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite, *Trinervitermisse trinervoides* and the characterisation of a multimodular beta-1, 4-Xylanase (GH11). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016(DOI: 10.1002/bab.1480)
- [27] Perez R, Eyzaguirre J. *Aspergillus fumigatus* produces two arabinofuranosidases from glycosyl hydrolase family 62: comparative properties of the recombinant enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016 (DOI: 10.1007/s12010-12016-11984-12010)
- [28] Xue X, Wang R, Tu T, *et al.* The N-Terminal GH10 domain of a multimodular protein from *caldicellulosiruptor bescii* is a versatile xylanase/beta-glucanase that can degrade crystalline cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, **81** (11): 3823–3833
- [29] Bennati-Granier C, Garajova S, Champion C, *et al.* Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, **8**(1): 90–103
- [30] Couturier M, Feliu J, Haon M, *et al.* A thermostable GH45 endoglucanase from yeast: impact of its atypical multimodularity on activity. *Microbial Cell Factories*, 2011, **10**(1): 103–113
- [31] Pham T A, Berrin J G, Record E, *et al.* Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module. *Journal of Biotechnology*, 2010, **148**(4): 163–170
- [32] Ravalason H, Herpoel-Gimbert I, Record E, *et al.* Fusion of a family 1 carbohydrate binding module of *Aspergillus niger* to the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase for efficient softwood kraft pulp biobleaching. *Journal of Biotechnology*, 2009, **142**(3–4): 220–226
- [33] Loose J S, Forsberg Z, Fraaije M W, *et al.* A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monooxygenase. *FEBS Letters*, 2014, **588**(18): 3435–3440
- [34] Paspaliari D K, Loose J S, Larsen M H, *et al.* *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase. *The FEBS Journal*, 2015, **282**(5): 921–936
- [35] Wong E, Vaaje-Kolstad G, Ghosh A, *et al.* The *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces. *PLoS Pathogens*, 2012, **8**(1): e1002373
- [36] Chiu E, Hijnen M, Bunker R D, *et al.* Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their *in vivo* crystallization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(13): 3973–3978
- [37] Hemsworth G R, Taylor E J, Kim R Q, *et al.* The copper active site of CBM33 polysaccharide oxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**(16): 6069–6077
- [38] Beeson W T, Vu V V, Span E A, *et al.* Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, **84**: 923–946
- [39] Borisova A S, Isaksen T, Dimarogona M, *et al.* Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide

- monooxygenase with broad substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(38): 22955–22969
- [40] Frandsen K E, Simmons T J, Dupree P, *et al.* The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 2016, **12**(4): 298–303
- [41] Li X, Beeson W T T, Phillips C M, *et al.* Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. *Structure*, 2012, **20**(6): 1051–1061
- [42] Span E A, Marletta M A. The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, **35**(1): 93–99
- [43] Liu S, Shao S, Li L, *et al.* Substrate-binding specificity of chitinase and chitosanase as revealed by active-site architecture analysis. *Carbohydrate Research*, 2015, **418**(1): 50–56
- [44] Tian L, Liu S, Wang S, *et al.* Ligand-binding specificity and promiscuity of the main lignocellulolytic enzyme families as revealed by active-site architecture analysis. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1): 23605–23615
- [45] Lo Leggio L, Simmons T J, Poulsen J C, *et al.* Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nature Communications*, 2015, **6**(1): 5961–5969
- [46] Kim S, Stahlberg J, Sandgren M, *et al.* Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxygen, oxygen-rebound mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(1): 149–154
- [47] Book A J, Yennamalli R M, Takasuka T E, *et al.* Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, **7**(1): 109–122
- [48] Hemsworth G R, Johnston E M, Davies G J, *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. *Trends in Biotechnology*, 2015, **33**(12): 747–761
- [49] Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**(19): 8455–8465
- [50] Langston J A, Shaghasi T, Abbate E, *et al.* Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77**(19): 7007–7015
- [51] Vermaas J V, Crowley M F, Beckham G T, *et al.* Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2015, **119**(20): 6129–6143
- [52] Eibinger M, Ganner T, Bubner P, *et al.* Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(52): 35929–35938
- [53] 方靖. 纤维二糖脱氢酶在纤维素和木质降解中的作用机制研究. 山东大学, 1998
- FANG Jing. Study on the mechanism of cellobiose dehydrogenase in cellulose and lignin degradation. Shandong University, 1998
- [54] Higham C W, Gordon-Smith D, Dempsey C E, *et al.* Direct ¹H NMR evidence for conversion of beta-D-cellobiose to cellobionolactone by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FFBS Letters*, 1994, **351**(1): 128–132
- [55] Tan T C, Kracher D, Gandini R, *et al.* Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nature Communications*, 2015, **6**(1): 7542–7552
- [56] Sygmond C, Kracher D, Scheiblbrandner S, *et al.* Characterization of the two *Neurospora crassa* cellobiose dehydrogenases and their connection to oxidative cellulose degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, **78**(17): 6161–6171
- [57] Dimarogona M, Topakas E, Olsson L, *et al.* Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. *Bioresource Technology*, 2012, **110**(1): 480–487
- [58] Hu J, Arantes V, Pribowo A, *et al.* Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy & Environmental Science*, 2014, **7**(7): 2308–2315
- [59] Westereng B, Cannella D, Wittrup Agger J, *et al.* Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Scientific Reports*, 2015, **5**(1): 18561–18569
- [60] Cannella D, Mollers K B, Frigaard N U, *et al.* Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. *Nature Communications*, 2016, **7**(1): 11134–11141
- [61] Himmel M E, Ding S-Y, Johnson D K, *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, **315**(5813): 804–807
- [62] Kittl R, Kracher D, Burgstaller D, *et al.* Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, **5**(1): 79–91
- [63] Gardner J G, Crouch L, Labourel A, *et al.* Systems biology defines the biological significance of redox-active proteins during cellulose degradation in an aerobic bacterium. *Molecular Microbiology*, 2014, **94**(5): 1121–1133

The Advance of Efficient Catalysis of Lytic Polysaccharide Monooxygenases*

LI Xin, ZHANG Li-Li, TIAN Li, ZHANG Huai-Qiang, CHEN Guan-Jun, WANG Lu-Shan**

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are newly discovered copper-dependent oxidases usually with diverse modular combinations, and can decompose biomass polysaccharides through an oxidative mechanism. The catalytic domains of LPMOs share a β -sandwich structure, and their active sites contain a single copper ion. Their catalytic reaction process is more complicated than that of glycoside hydrolases. After binding the substrate, electrons provided by the electron donor are transferred to Cu[II] in the active site of LPMOs *via* electron transport chain, then Cu[II] is reduced to Cu[I] which bind and activate oxygen, finally LPMOs break down the glycosidic bond of polysaccharides *via* oxidative cleavage, generating oxidized and non-oxidized products. Recent studies demonstrate that LPMOs can significantly enhance the efficiency of lignocellulolytic enzymes in degrading crystalline cellulose. Further investigation of LPMOs can expand the understanding of their efficient degradation mechanism and provide theoretical guidance for recomposing high-efficiency degradation enzymes to lower the cost in industrial application. This review addresses the recent research progress of LPMOs and analyzes perspective of potential research fields and practical applications.

Key words LPMOs, modular combination, active site architecture, substrate-binding, electron transport chain

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0175

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31370111), Natural Science Foundation of Shandong Province(ZR2013CM038) and The Fundamental Research Funds of Shandong University(2015YQ004).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

Received: May 24, 2016 Accepted: August 31, 2016