

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Karakteristike i struktura enzima litičke polisaharidne monoooksigenaze

Characteristic and structure of lytic polysaccharide monoxygenase

Tonči Rezić^{1*}, Ines Radić¹, Ana Vrsalović Presečki²¹Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska²Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: trezic@pbf.hr

Sažetak

Lignocelulozna biomasa je važan obnovljivi izvor energije i koristi se kao sirovina u proizvodnji biogoriva druge generacije. Zbog vrlo složene strukture, učinkovita enzimaska hidroliza lignocelulozne biomase je ključni izazov današnjice. Litička polisaharidna monoooksigenaza (LPMO) je nedavno otkrivena vrsta enzima koji sadrže bakar, a imaju značajnu ulogu u oksidativnoj razgradnji netopivih biljnih polisaharida i topivih oligosaharida. Stoga je prepoznat kao jedan od bitnih enzima u održivoj pretvorbi lignocelulozne biomase, a važnost ovog enzima potvrđena je brojnim istraživanjima. Nakon reduktivne aktivacije, LPMO cijepa supstrat i potiče razgradnju biomase hidrolitičkim enzimima. U ovom preglednom radu, opisana je uloga LPMO u razgradnji lignocelulozne biomase s naglaskom na strukturu LPMO i mehanizma djelovanja LPMO na celuloznim supstratima.

Ključne riječi: celuloza, lignoceluloza, enzimi, litička polisaharidna monoooksigenaza

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important renewable energy source and is used as a feedstock for the production of second generation biofuels. Due to its very complex structure, efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass is a major challenge today. Lytic polysaccharide monoxygenase (LPMO) is a recently discovered type of copper-containing enzyme that plays a significant role in the oxidative degradation of insoluble plant polysaccharides and soluble oligosaccharides. Therefore, it is considered one of the essential enzymes for the sustainable conversion of lignocellulosic biomass, and its importance has been confirmed by numerous studies. After reductive activation, LPMO cleaves the substrate and promotes biomass degradation by hydrolytic enzymes. In this review, the role of LPMO in the degradation of lignocellulosic biomass is described, focusing on the structure of LPMO and the mechanism of action of LPMO on cellulosic substrates.

Keywords: cellulose, lignocellulose, enzymes, lytic polysaccharide monoxygenase

Uvod

Lignocelulozna biomasa je najzastupljenija sirovina na Zemlji (Langston i sur., 2011) te prema tome i najinteresantnija u smislu razvoja ekološki i ekonomski održivih procesa. Glavni razlog porasta zanimanja za ove sirovine je njihova obnovljivost, dostupnost te činjenica da ne kompromitiraju proizvodnju hrane ili hrane za životinje (Monlau i sur., 2013), dok je glavna prepreka njihovom korištenju njihova izrazita kemijska i fizikalna otpornost na biološku razgradnju. Biološka razgradnja lignoceluloznih sirovina postiže se uporabom gljiva bijelog, smeđeg i mekog truljenja, a u industrijskom mjerilu se radi povećanja učinkovitosti koriste pripravci hidrolitičkih i oksidoreduktivnih enzima spomenutih gljiva. Čak i kada se koriste pripravci enzima umjesto cijelih gljiva, proces je spor i složen, stoga je otkriće litičkih polisaharidnih monoooksigenaza (engl. lytic polysaccharide monoxygenases, LPMO) koje pojačavaju aktivnost celulolitičkih enzima uvelike poboljšalo učinkovitost procesa razgradnje (Rezić i sur., 2021).

LPMO su metaloenzimi s atomom bakra u središtu aktivnog mjesta sudjeluju u razgradnju polisaharida, uključujući hitin i celulozu koji su najzastupljeniji polisaharidi u prirodi (Kracher i sur., 2018). Njihov oksidativni mehanizam otkriven je 2010. godine kada se pokazalo da hitin-vezujući protein CBP21 iz bakterije *Serratiamaccescens* katalizira oksidativno cijepanje β -1,4 glikozidne veze u hitinu te da prilikom cijepanja nastaje C1-oksidirani oligosaharidni produkt (Kont i sur., 2020). Reakcija cijepanja ovisi o dostupnosti kisika ili vodikovog peroksida te vanjskog donora elektrona. Preko 10 godina intenzivnog istraživanja dovelo je do spoznaje da se LPMO nalaze u većini carstava živog svijeta, a danas su klasificirani u osam grupa kategorije enzima s pomoćnom aktivnošću (engl. auxiliary activity, AA) u bazi enzima s aktivnošću na kompleksne ugljikohidrate i glikokonjugate (engl. Carbohydrate-Active Enzymes database, CAZy). Iako su otkriveni relativno nedavno, LPMO enzimi uključeni su u sastav komercijalnih enzimskih pripravaka za proizvodnju biogoriva iz lignocelulozne biomase (Walton i Davies, 2018). S obzirom na važnost novootkrivenih LPMO enzima, važno je poznavati njihovu strukturu i mehanizam njihovog djelovanja na celuloznim supstratima.

U ovom radu opisane su dosadašnje spoznaje vezane uz strukturu LPMO enzima, prikazan je mehanizam djelovanja LPMO na celuloznim supstratima te je opisana uloga kisika odnosno vodikovog peroksida kao i donora elektrona na aktivnost odnosno stabilnost LPMOa.



Karakteristike i struktura LPMO enzima

Iako postoje varijacije u strukturi između različitih grupa LPMO, svima im je zajednička struktura β -lanaca, tipična za imunoglobuline, koju čini 8-10 antiparalelnih β -nabranih ploča koje su povezane s petljama s različitim brojem α -uzvojnica (slika 1a). Domene LPMO obično sadrže 200–250 aminokiselina, kao i kod imunoglobulina, a konačan broj ovisi o dužini petlji koje povezuju β -strukture. U strukturi LPMO prisutne se obično i dvije ili tri disulfidne veze. (Span i sur., 2015). Aktivno mjesto LPMO enzima nalazi se u središtu ravne površine, izloženo djelovanju otapala, za razliku od glikozidhidrolaza koje imaju tunele i utore za vezanje supstrata. Aktivno mjesto sadrži bivalentni ion bakra koordiniran s tri atoma dušika, jedan iz imidazolnog prstena, drugi iz N-terminalne skupine jednog histidina, te treći iz imidazolnog prstena drugog histidina koji tvore T-strukturu koja se naziva „histidinska brana“ (slika 1b) (Ciano i sur., 2018). Pokazalo se da i molekula tirozina (odnosno fenilalanina u grupama AA10 i AA15 koji razlažu hitin) ima ulogu u katalizi (Vaaje-Kolstad i sur., 2017). U LPMO enzimima podrijetlom iz gljiva, N-terminalna skupina histidina je posttranslacijski metilirana. Pretpostavlja se da metilacija nema katalitičku ulogu, već pruža zaštitu od autooksidacijske inaktivacije LPMO (Petrović i sur., 2018).

Raznolikost dimenzija LPMO, topologije površine za vezanje supstrata te strukturalna raznolikost LPMO posljedica su različitog sastava uzvojnica i petlji koje povezuju β -strukture. Regioselektivnost LPMO ovisi o ovim petljama, stoga su najveće varijacije u strukturi LPMO upravo u tim područjima. U AA10 grupi najveće varijacije su u području između prve i treće β -nabrane ploče sendvič strukture, koja se naziva i „petlja 2“ (L2). Najveće varijacije u AA9 grupi javljaju se između prve i druge β -nabrane ploče sendvič strukture. L2 regija sastoji se od različitog broja petlji i kratkih uzvojnica te sadrži jednu ili dvije aromatske aminokiseline smještene na površini.

Upravo ovo područje utječe na prepoznavanje supstrata i na specifičnost prema supstratu jer čini velik dio aktivnog mjesta. Neki LPMO iz AA9 grupe imaju karakterističan „umetak“ između treće i četvrte β -nabrane ploče koji se naziva „petlja 3“ (L3) te koji stupa u interakciju s L2. Varijacije u području za vezanje supstrata na nasuprotnoj strani L2 uključuju kratku petlju (engl. loop short, LS), te „dugu C-terminalnu petlju“ (engl. long C-terminal loop, LC). LS i LC petlja nalaze se samo u AA9 i AA13 LPMO te im je često u sastavu jedna ili više aromatskih aminokiselina za koje postoji mogućnost da sudjeluju u vezanju supstrata (Vaaje-Kolstad i sur., 2017).

Aktivnost LPMO enzima

Dosad otkriveni LPMO pokazuju aktivnost samo na β -1,4 i α -1,4-

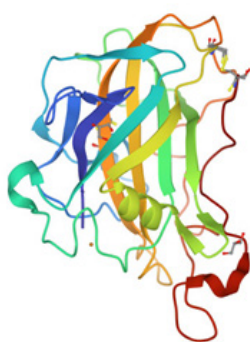
glikozidnim vezama polisaharida. Supstrati na koje LPMO djeluju mogu biti netopivi poput kristalinične celuloze, hitina i škroba (Harris i sur., 2014; Beeson i sur., 2015; Vu i sur., 2014) ili djelomično odnosno potpuno topivi poput hemiceluloze, ksilana, ksiloglukana i beta-glukana (Agger i sur., 2014).

LPMO enzimi cijepaju glikozidne veze oksidativnim mehanizmom u prisutnosti kisika (bilo da on dolazi iz molekule kisika ili vodikovog peroksida) te vanjskog donora elektrona (Berka i sur., 2011). Prvi korak katalize je redukcija bivalentnog atoma bakra Cu (II) na aktivnom mjestu u Cu (I) pomoću donora elektrona te aktivacija molekularnog kisika/vodikovog peroksida. LPMO prihvaća elektrone raznih reducensa, bilo da su oni dodani (poput askorbinske ili galne kiseline), da dolaze iz supstrata (fenolni spojevi nastali razgradnjom lignoceluloze) ili da dolaze iz enzima koji djeluju sinergistički s LPMO poput celobiozadehidrogenaze, ali i formaldehid oksidoreduktaza, polifenoloksidaza i lakaza (Wang i sur., 2021). Redukcija bakra u aktivnom mjestu uzrokuje male konformacijske promjene LPMO (Aachmann i sur., 2012; Kracher i sur. 2018) čime se povećava njegov afinitet prema supstratu. Ovako katalitički aktivan LPMO „izdvaja“ vodik iz glikozidne veze u supstratu (s C1 ili C4 ugljikovog atoma) čime dolazi do neravnoteže elektrona glikozidne veze, a naposljetku i do njenog cijepanja reakcijom eliminacije (Phillips i sur., 2011). Trenutno nije razjašnjen mehanizam kojim LPMO aktivira O₂ ili H₂O₂ te cijepa C–H vezu. Tome pridonosi i vjerojatnost da različite kategorije LPMO iskazuju različite oksidativne mehanizme tijekom cijepanja (Ciano i sur., 2018).

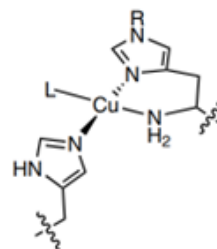
S obzirom na primarnu strukturu te na specifičnost prema supstratu LPMO enzime je moguće podijeliti na tri tipa: LPMO-1 tip enzima koji oksidira C1 atom ugljika što dovodi do formiranja laktona koji spontano hidroliziraju u aldonske kiseline, LPMO-2 tip koji djeluje na C4 atom ugljikovih spojeva prilikom čega nastaju ketoaldeze koje u vodenim otopinama hidroliziraju u gem-diole. LPMO-3 tip je slabije specifičan pa djeluje i na C1 i na C4 atome ugljikovih spojeva (slika 2) (Dimarogona i sur., 2012). Pretpostavlja se i postojanje drugih tipova LPMO, poput C6-oksidirajućih (Quinlan i sur., 2011).

H₂O₂ ili O₂ kao kosupstrati

Eksperimentom Erikssona i suradnika iz 1974. (Eriksson i sur., 1974) godine dokazana je važnost kisika i oksidativnog procesa u razgradnji celuloze, te se stoga od otkrića LPMO mehanizam razgradnje opisuje kao monooksigenazna reakcija u kojoj molekula kisika služi kao akceptor elektrona. Istraživanjem Bissaro i suradnika iz 2017. godine pokazalo se da LPMO preferira H₂O₂ kao kosupstrat (Bissaro i sur., 2017). Dokazali su da u odsutnosti supstrata dolazi do sinteze H₂O₂ kao



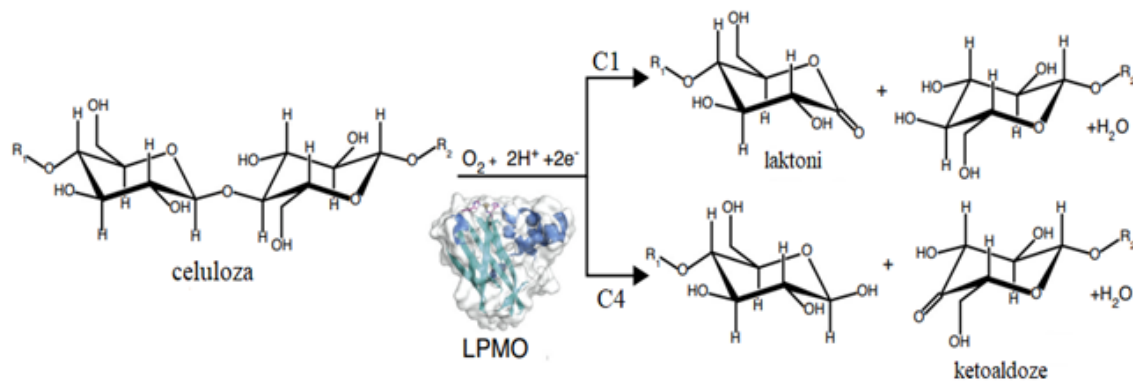
A



B

Slika 1. a). Struktura NcLPMO9C (Borisova i sur., 2015) b). „Histidinska brana“ (Ciano i sur., 2018)

Figure 1. a). Structure of NcLPMO9C (Borisova et al., 2015) b). „Histidine dam“ (Ciano et al., 2018)



Slika 2. Produkti oksidacije celuloznih supstrata uz različite tipove LPMO enzima (prema Vaaje-Kolstad i sur., 2017)

Figure 2. Oxidation products of cellulose substrates with different types of LPMO enzymes (according to Vaaje-Kolstad et al., 2017)

produkta reakcije između kisika i reducensa, dok u prisutnosti supstrata nije moguće detektirati H₂O₂. Razlog tome je korištenje H₂O₂ kao kosupstrata za reakciju oksidacije.

Kinetička istraživanja bakterijskih LPMO i LPMO iz gljiva pokazala su da su konstanta specifičnosti (*k_{cat}*), prividni afinitet enzima prema supstratu (*K_m*) te katalitička učinkovitost s H₂O₂ kao kosupstratom (*k_{cat}/K_m*) duplo veći nego s O₂ kao kosupstratom (Kuusk i sur., 2018). Ove zaključke dodatno podupiru istraživanja redoks parova koji generiraju H₂O₂ (Bissaro i sur., 2017; Kracher i sur., 2020). Navedeno ne isključuje mogućnost da pravi mehanizam ovisi o biološkim uvjetima reakcije razgradnje te o dostupnosti supstrata odnosno kosupstrata. Predloženi mehanizam reakcije s H₂O₂ kao kosupstratom prikazan je na slici 3. Bakar (Cu(II)) u aktivnom mjestu LPMO reducira u Cu(I) u koraku koji se naziva primarna redukcija, a zatim reagira s H₂O₂ u prisustvu supstrata. Ova reakcija rezultira eliminacijom molekule vode te stvaranjem Cu(II)-oksilintermedijera (ili Cu(III)-oksointermedijera) koji može izdvojiti atom vodika iz supstrata.

Dobiveni Cu(II)-hidroksid reagira s radikalom supstrata povratnim mehanizmom koji dovodi do hidroksilacije supstrata te regeneracijom bakra u Cu(I) koji je spreman za ulazak u novi katalitički ciklus. Hidroksilirani supstrat podliježe molekularnoj preraspodjeli što rezultira cijepanjem glikozidne veze i stvaranjem laktona (Hemsworth i sur., 2015).

Ključna razlika u korištenju H₂O₂ i O₂ kao kosupstrata je potreba za reducensom. U monooksigenanim reakcijama količina reducensa stehiometrijski odgovara količini formiranog produkta, dok je u peroksigenanim reakcijama potrebna samo primarna redukcija, a kasnije samo povremeno nakon reoksidacije LPMO (Forsberg i sur., 2019).

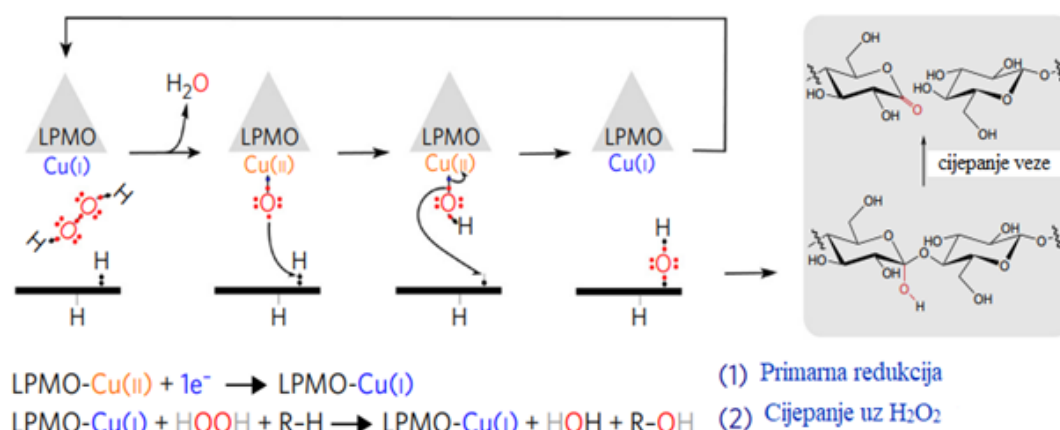
Popratne reakcije i inaktivacija LPMO

Inaktivacija biokatalizatora (enzima) neizbježna je pojava, a ovisi o vrsti enzima i inaktivacijskim uvjetima. Konformaciju enzima održava pet vrsti veza: vodikove veze između polarnih aminokiselina i između peptidnih veza, hidrofobne interakcije između nepolarnih aminokiselina, ionske veze između suprotno nabijenih aminokiselinskih ostataka te kovalentne veze između aminokiselinskih ostataka cisteina, tzv. disulfidni mostovi (Silva i sur., 2018). S obzirom na to da su sve navedene veze osim kovalentnih slabe, može se zaključiti da su enzimi osjetljivi na promjene pH, temperature, ionske jakosti te je stoga potrebno voditi računa o reakcijskim uvjetima u kojima se koriste (Rezić i sur., 2021).

Atom bakra u aktivnom mjestu stabilizira LPMO strukturu, no osim toga malo je poznato o strukturnoj stabilnosti LPMO. Uzimajući u obzir vrlo snažne redoks spojeve koji nastaju u aktivnom mjestu LPMO, moguće je da je zaštita od destruktivnih oksidativnih popratnih reakcija bila pokretačka snaga u evoluciji LPMO (Loose i sur., 2016). Kinetička ispitivanja na LPMO složena su zbog korištenja čvrstih supstrata i mnogih popratnih reakcija (opisanih u nadolazećem tekstu) koje mogu rezultirati inaktivacijom enzima.

Utjecaj oksidativnih popratnih reakcija smanjuje se vezanjem na supstrat, a to se objašnjava činjenicom da je difuzija kisikovih radikala onemogućena jer su uključeni u reakciju cijepanja veza u supstratu (Vaaje-Kolstad i sur., 2017).

Iako visoke koncentracije H₂O₂ dokazano ubrzavaju reakciju LPMO, previsoke koncentracije, uzrokuju oksidativna oštećenja histidina u aktivnom mjestu, odnosno inaktivaciju enzima (Bissaro i sur., 2017). Također, H₂O₂ u bilo kojoj reakcijskoj otopini može uzrokovati oksidacijska oštećenja Fentonovim mehanizmom (Eijsink i sur., 2019).



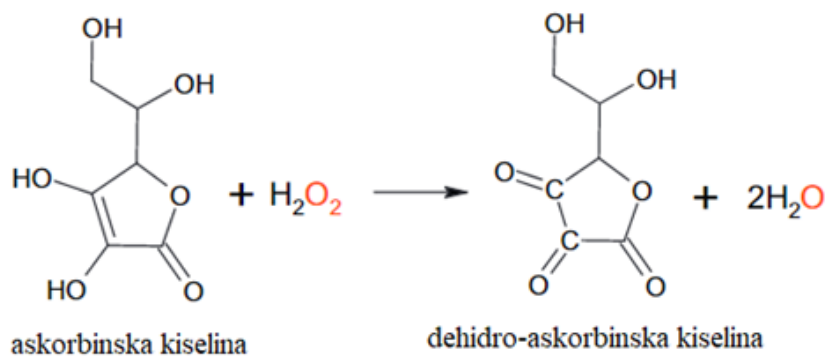
Slika 3. Mehanizam oksidativnog cijepanja glikozidne veze polisaharida uz H₂O₂ kao kosupstrat (prema Bissaro i sur. 2017)

Figure 3. Mechanism of oxidative cleavage of glycosidic bonds of polysaccharides with H₂O₂ as a cosubstrate (according to Bissaro et al. 2017)



Popratna reakcija LPMO koja rezultira generiranjem H₂O₂ uz redukciju kisika, a u odsutnosti supstrata, ima dva predložena mehanizma: u prvom se molekularni kisik reducira u aktivnom mjestu LPMO, otpušta se nastali superoksid koji zatim spontano prelazi u H₂O₂. Drugi mehanizam opisuje nastajanje H₂O₂ u aktivnom mjestu enzima. Prvo dolazi do redukcije molekularnog kisika, nakon čega slijedi dodatna redukcija drugim elektronom te adicija dva protona kako bi se superoksid reducira u H₂O₂. Iako ova popratna reakcija generalno doprinosi aktivnosti LPMO (H₂O₂ djeluje kao kosupstrat), akumulacijom H₂O₂ može doći do spomenutog oksidativnog oštećenja aktivnog mjesta LPMO, odnosno do njegove inaktivacije (Hegnar i sur., 2018). Do generiranja H₂O₂ dolazi i reakcijom molekularnog kisika s reducensom uz ione bakra kao katalizatora čak i kada je on dodan u mikromolarnim koncentracijama (Stepnov i sur., 2021).

Dodatak različitih koncentracija reducensa također ima utjecaj na aktivnost LPMO (Kuusk i sur., 2018). Ukoliko LPMO nije vezan na supstrat, on može posredovanjem H₂O₂ iz aktivne LPMO-Cu (I) forme oksidirati u LPMO-Cu (II). Potonje rezultira stehiometrijskom oksidacijom reducensa (na slici 4 prikazana reakcija oksidacije askorbinske kiseline) te se ta reakcija naziva reakcija peroksidacije reducensa (Kuusk i Våljamäe, 2021). Aktivnost ovako oksidiranog reducensa dovodi do ireverzibilne inaktivacije enzima (Bissaro i sur., 2017). Utjecaj reakcije peroksidacije reducensa na inaktivaciju enzima raste smanjenjem koncentracije supstrata.



Slika 4. Reakcija peroksidacije reducensa (askorbinske kiseline) (prema Kuusk i Våljamäe, 2021)

Figure 4. Reaction of Reductant peroxidation (ascorbic acid) (according to Kuusk i Våljamäe, 2021)

Literatura

- Aachmann F.L., Sorlie M., Skjak-Braek G., Eijsink V.G.H., Vaaje-Kolstad G. (2012) NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (46) 18779–18784. doi: 10.1073/pnas.1208822109
- Beeson W.T., Vu V.V., Span E.A., Phillips C.M., Marletta M.A. (2015) Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, 84 (1) 923–946. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034439>
- Berka R.M., Grigoriev I.V., Otilar R., Salamov A., Grimwood I., Reid I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M.-C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Lombard, V., O Natvig, D., Lindquist, E., Schmutz, J., Lucas, S., Harris, P., Powlowski, J., Bellemare, A., Taylor, D., Butler, G., de Vries, R.P., Allijn, I.E., van den Brink, J., Ushinsky, S., Storms, R., Powell, A.J., Paulsen, I.T., Elbourne, L.D.H., Baker, S.E., Magnuson, J., Laboissiere, S., Clutterbuck, A.J., Martinez, D., Wogulis, M., de Leon, A.L., Rey, M.W., Tsang, A. (2011) Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*, 29 922-927. <https://doi.org/10.1038/nbt.1976>
- Bissaro B., Røhr Å.K., Müller G., Chylenski P., Skaugen M., Forsberg Z. (2017) Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature Chemical Biology*, 13 (10) 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2470>
- Ciano L., Davies G.J., Tolman W.B., Walton P.H. (2018) Bracing copper for the catalytic oxidation of C–H bonds. *Nature Catalysis*, 1 (8) 571–577. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0110-9>
- Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P. (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2 (3) e201209015. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209015>
- Eijsink V.G.H., Petrovic D., Forsberg Z., Mekasha S., Røhr A.K., Várnai K. (2019) On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnology for Biofuels*, 212 (58). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0>
- Eriksson K.E., Pettersson B., Westermark U. (1974) Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Letters*, 49 (2) 282–285. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80531-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80531-4)
- Forsberg Z., Sørli M., Petrović D., Courtade G., Aachmann F.L., Vaaje-Kolstad G., Bissaro B., Røhr Å.K., Eijsink V.G. (2019) Polysaccharide

- degradation by lytic polysaccharide monoxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.015>
- Harris P.V., Xu F., Kreel N.E., Kang C., Fukuyama S. (2014) New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.015>
- Hegnar O.A., Petrovic D.M., Bissaro B., Alfredsen G., Várnai A., Eijsink V.G.H. (2018) Characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Gloeophyllum trabeum* shows a pH-dependent relationship between catalytic activity and hydrogen peroxide production. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 85 (5) <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-18>
- Hemsworth G.R., Johnston E.M., Davies G.J., Walton P.H. (2015) Lytic Polysaccharide Monoxygenases in Biomass Conversion. *Trends in Biotechnology*, 33 (12) 747–761. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.006>
- Kont R., Bissaro B., Eijsink V.G.H., Våljamäe P. (2020) Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Nature Communication*, 11 5786. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19561-8>
- Kracher D., Andlar M., Furtmüller P.G., Ludwig R. (2018) Active-site copper reduction promotes binding of fungal lytic polysaccharide monoxygenase and reduces stability. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (5) 1676–1687. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000109>
- Kracher D., Forsberg Z., Bissaro B., Gangl S., Preims M., Sygmund C., Eijsink, V.G.H., Ludwig, R. (2020) Polysaccharide oxidation by lytic polysaccharide monoxygenase is enhanced by engineered cellobiose dehydrogenase. *FEBS Journal*, 287 897–908. <https://doi.org/10.1111/febs.15067>
- Kuusk S., Kont R., Kuusk P., Heering A., Sørli M., Bissaro B., Eijsink, V.G.H., Våljamäe, P. (2018) Kinetic insights into the role of the reductant in H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 294 1516-1528. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA118.006196>
- Kuusk S., Våljamäe P. (2021) Kinetics of H₂O₂-driven catalysis by a lytic polysaccharide monoxygenase from the fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 297 (4) 101256. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101256>
- Langston J.A., Shaghasi T., Abbate E., Xu F., Vlasenko E., Sweeney M.D. (2011) Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and Glycoside Hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (19) 7007 - 7015. <https://doi.org/10.1128/AEM.05815-11>
- Loose J.S., Forsberg Z., Kracher D., Scheiblbrandner S., Ludwig R., Eijsink V.G.H., Vaaje-Kolstad G. (2016) Activation of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases with cellobiose dehydrogenase. *Protein Science*, 25 2175-2186. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3043>
- Monlau F., Barakat A., Trably E., Dumas C., Steyer J.P., Carrère H. (2013) Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (3) 260–322. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>
- Quinlan R.J., Sweeney M.D., Lo Leggio L., Otten H., Poulsen J.C.N., Johansen K.S., Krogh K.B.R.M., Jørgensen C.I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C.P., Dupree P., Xu F., Davies G.J., Walton P.H. (2011) Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (37) 15079–15084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>
- Petrović D.M., Bissaro B., Chylenski P., Skaugen M., Sørli M., Jensen M.S., Aachmann F.L., Courtade G., Várnai A., Eijsink V.G.H. (2018) Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monoxygenase from auto-oxidative inactivation. *Protein Science*, 27 1636-1650. <https://doi.org/10.1002/pro.3451>
- Phillips C.M., Beeson W.T., Cate J.H., Marletta M.A. (2011) Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monoxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 6 (12) 1399–1406. <https://doi.org/10.1021/cb200351y>
- Rezić T., Trontel A., Pavlečić M., Novak M., Herceg Z., Ivančić Šantek M., Petravić Tominac V., Vrsalović Presečki A., Cvjetko Bubalo M., Andlar M., Rezić I. (2021) Nove spoznaje u biološkoj razgradnji lignoceluloznih sirovina. U: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije Šubarić D, Miličević B (ur.) str. 1-25. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, Hrvatska.
- Silva C., Martins M., Jing S., Fu J., Cavaco-Paulo A. (2017) Practical insights on enzyme stabilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 335–350. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355294>
- Span E.A., Marletta M.A. (2015) The framework of polysaccharide monoxygenase structure and chemistry. *Current Opinion in Structural Biology*, 35 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.002>
- Stepnov A.A., Forsberg Z., Sørli M., Nguyen G.S., Wentzel A., Røhr Å.K., Eijsink V.G.H. (2021) Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics. *Biotechnology for Biofuels*, 14 28. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01879-0>
- Vaaje-Kolstad G., Forsberg Z., Loose J.S.M., Bissaro B., Eijsink V.G.H. (2017) Structural diversity of lytic polysaccharide monoxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 44 67–76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012>
- Vu V.V., Beeson W.T., Phillips C.M., Cate J.H., Marletta M.A. (2014) Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monoxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 136 562-565. <https://doi.org/10.1021/ja409384b>
- Wang D., Li Y., Zheng Y., Hsieh Y.S.Y. (2021) Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monoxygenases. *Frontiers in Chemistry*, 9 (653754), <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.653754>