TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Trichoderma reesei tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariid monooksügenaasi *Tr*AA9A kõrvalreaktsioonide iseloomustamine 2,6-dimetoksü hüdrokinoonil

Bakalaureusetöö

12 EAP

Alisa Kamnerov

Juhendaja: PhD Silja Kuusk

TARTU 2022

Infoleht

Trichoderma reesei tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariid monooksügenaasi *Tr*AA9A kõrvalreaktsioonide iseloomustamine 2,6-dimetoksü hüdrokinoonil

2010-2011. aastal avastatud lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO-d) on redoksensüümid, mis on võimelised lagundama kristallilist tselluloosi ja looma juurdepääsu teistele fermentidele. Selline võime teeb LPMO-dest võtmekomponendi tööstustehnoloogia arengus. Taimne biomass on kõige rikkalikum taastuv bioressurss Maal ja lähiaastatel isegi saaks asendada naftat. Hiljuti tehtud avastus, et tegu võib-olla peroksügenaasidega tõstis jälle huvi ja vajadust LPMO-de uurimiseks, seega efektiivsete töötlemis mehhanismide väljatöötamine on peamine eesmärk. Selles töös iseloomustati tselluloosaktiivse LPMO *Tr*AA9A peroksüdaasset kõrvalreaktsioonide aktiivsust 2,6-dimetoksü hüdrokinoonil (DMHQ) substraadil.

Märksõnad: Vesinikperoksiid, lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas, *Trichoderma reesei*, tselluloosaktiivne, kineetika

CERCS: P310; Proteiinid, ensümoloogia

Characterization of *Trichoderma reesei* cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase *Tr*AA9A side reactions on 2,6-dimethoxy hydroquinone

The lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) discovered in 2010-2011 are redox enzymes that can degrade crystalline cellulose, providing access to other enzymes and making LPMOs a key component in industrial technology development. Plant biomass is the richest renewable bio-resource on Earth and could even replace petroleum in the coming years. The recent discovery supposing that LPMOs are peroxygenases have again increased the interest and need to study LPMOs, so the development of efficient processing mechanisms is the main goal. This work describes the peroxidase side reactions of the cellulose active LPMO *Tr*AA9A on the substrate 2,6-dimethoxy hydroquinone (DMHQ).

Keywords: Hydrogen peroxide, lytic polysaccharide monooxygenase, *Trichoderma reesei*, cellulose-active, kinetics

CERCS: P310; Proteins, enzymolog

Sisukord

Infoleht....2
Sisukord....3
Kasutatud lühendid....4
SISSEJUHATUS....5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE....6
1.1. Tselluloos....6
1.2. Tselluloosi ensümaatiline lagundamine....7
1.3. LPMO....8
1.3.1. LPMO vahendatud tselluloosi lagundamine....10
1.3.2. LPMO katalüüsitud kõrvalreaktsioonid....11
1.3.3. *Tr*AA9A iseloomustus....13
1.4. Ping-pong mehhanismile vastava reaktsiooni Michaelis-Menteni võrrand....14
2. EKSPERIMENTAALOSA....16
2.1. Töö eesmärgid....16
2.2. Materjal ja metoodika....16
2.2.1. Ensüümid ja kasutatud reagendid....16
2.2.2. *Tr*AA9A vasega küllastamine....16
2.2.3. Kineetika katsed....16
2.2.4. Platoostumise katse....17
2.2.5. Katalaasiga katsed....17
2.3. Tulemused....17
2.3.1. Ensüümist sõltumatud reaktsioonid....17
2.3.2. DMHQ oksüdeerumise ajakõverad - *Tr*AA9A pöördumatu inaktivatsioon....19
2.3.3. Algkiiruste määramine....21
2.3.4. DMHQ oksüdeerimise algkiiruste vastavus Michaelis-Menteni võrrandile....23
2.4. Arutelu....26
KOKKUVÕTE....29
SUMMARY....30
Kirjanduse loetelu....32
Kasutatud veebiaadressid....35
Lihtlitsents....36

Kasutatud lühendid

LPMO – lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas

DMHQ – 2,6-dimetoksü hüdrokinoonil

DMQ – 2,6-dimetoksükinoon

T. reesei – *Trichoderma reesei*

*Tr*AA9A – seenest *Trichoderma reesei* pärinev LPMO

CB – tsellobioos

CBH – tsellobiohüdrolaas

GH – glükosiidhüdrolaasid

GT – glükosüültransferaasid

PL – polüsahhariidlüaasid

CE – süsivesikute esteraasid

AA – abistavad ensüümid

EG – endoglükanaasid

NaAc – naatriumatsetaat

AscA – askorbiinhape

Tris-HCl – Tris-vesinikkloriidi puhver

V_{max} – maksimaalne kiirus

$V_{(i)}$ – reaktsiooni algkiirus

^{app} – näiline parameeter

k_{cat} – katalüütiline konstant

K_M – Michaelis-Menteni konstant

$k_{(i)}$ – inaktivatsiooni kiirus konstant

$p_{(i)}$ – inaktivatsiooni tõenäosus

$t_{\frac{1}{2}}$ – pooleluiga

SISSEJUHATUS

Esimese põlvkonna vedelate biokütuste tootmise mehhanism toidukultuuridest on hästi teada, kuid kuna tegu on laialdaselt kasutatava lähtematerjaliga, tekkis vajadus uute tootmismeetodite välja töötamiseks. Sellest tulenevalt otsustati pöörata suuremat rõhku odavamatele ja kättesaadavamatele lähtematreljalidele. Lignotselluloos sai üheks biomatrejalidest, mida kasutatakse teise põlvkonna biokütuse tootmisel. Viimasel ajal on õnnestunud lahendada mõned mõned tehnilised ja majanduslikud väljakutsed, kuid siiamaani on teise põlvkonna biokütuste tootmisel suured piiravad faktorid, mis ei luba selle meetodi kasutusele võtmist (Sims *et al*., 2010).

Peamine probleem biomassi ensümaatilisel lagundamisel on selle kõrge hind, tulenev sellest, et näiteks võrreldes tärklise hüdrolüüsiga on samaväärse koguse etanooli tootmiseks vaja 40–100 korda rohkem ensüümi kogust (Merino ja Cherry, 2007). Sellel põhjusel on sobiliku ensüümide segu väljatöötamine oluline, et tagada säästlik ja efektiivne lagundamisprotsessi (Wood ja Garcia-Campayo, 1990).

Teiseks piiravaks faktoriks on see, et lignotselluloosi on raske lagundada (Himmel *et al*., 2007). Hiljuti leiti spetsiifiliste ensüümide klass, mis on võimelised oksüdeerima polüsahhariide. See klass sai nimeks lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO) ja on ensümaatilisel biomassi lagundamisel võtmekomponendid (Kuusk *et al*., 2018). 2017. aastal avastati, et tegu võib olla pereksügenaasidega. LPMO-d omavad suurt potentsiaali ning tähtis on nende toimemehhanismi ja kineetikat täpsemalt uurida. Kõige paremini iseloomustatud LPMO on seenest *Trichoderma reesei* eraldatud *Tr*AA9A (Gupta *et al*., 2016).

Selle töö eesmärk on iseloomustada *Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse LPMO *Tr*AA9A kõrvalreaktioonide kineetikat, kasutades kõrvalreaktsioonide aktiivsuse määramiseks 2,6-dimetoksü hüdrokinoon (DMHQ) substraati ja produkti tekke mõõtmiseks erinevaid meetodeid.

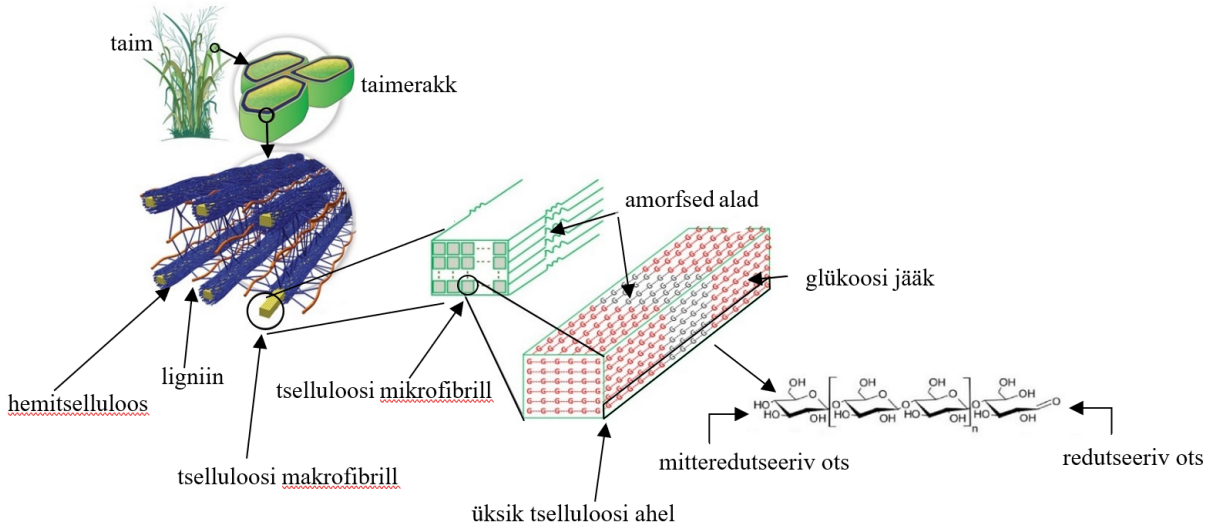
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Tselluloos

Tselluloos on üks levinumaid biomaterjale Maal. Ülemaailmne aastatoodang on umbes $1{,}5x10^{12}$ tonni ja seetõttu on see väga oluline ja jätkusuutlik biomaterjal (Rosenau *et al*., 2018). Tavaliselt sünteesivad tselluloosi taimed, kuid ka mõned bakterid on võimelised seda tegema (Ross *et al*., 1991). Taimede rakukesta peamisteks koostisosadeks on tselluloos, hemitselluloosid ja ligniin. Tselluloosi koos hemitsellulooside ja ligniiniga nimetatakse lignotselluloosiks (Joonis 1) (Hendriks ja Zeeman, 2009).

Tselluloos on glükoosi homopolümeer ja selle monomeerid on seotud omavahel β-(1,4) glükosiidsete sidemetega (Joonis 1) (Ross *et al*., 1991). Tselluloosi ahelad interakteeruvad omavahel moodustades kristallilisi struktuure. Tselluloosi ahelad on paigutatud teineteise suhtes paralleelselt ja on korraldatud lehtedena. Ahelad interakteeruvad omavahel vesiniksidemete vahendusel, samas kui lehtede vaheline side on stabiliseerunud nii Van der Waalsi dispersioonijõudude kui ka nõrkade vesiniksidemetega (Chami Khazraji ja Robert, 2013). Tselluloosi ahel omab mitteredutseerivat ja redutseerivat otsa (McDonald *et al*., 2012).

Tänapäeval on teada neli tselluloosi kristallilist vormi (I, II, III ja IV), kus tselluloos I on kõige mittestabiilse vorm ja II vorm on kõige stabiilsem (Klemm *et al*., 2005). Tselluloosi kristallilist vormi ja füüsikalisi omadusi võivad mõjutada erinevad faktorid nagu ahelate vahelised interaktsioonid, ahelate üksteise vaheline kaugus ja arv (Hill Jr *et al*., 2014). Looduslik tselluloos I esineb üheahelalises Iα ja kaheahelalises Iβ vormis. Tselluloosi Iα saadakse peamiselt vetikatest ja tselluloosi Iβ peamiselt taimedest ja mantelloomadest. Tselluloosi I edasise töötlemisel saadakse vorme II, III ja IV (Zugenmaier, 2008).



Joonis 1. Lignotselluloosse biomassi molekulaarstruktuuri graafiline kirjeldus. Joonisel on näha tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini paigutus taime rakukests. Tselluloosi mikrofibrillid on pakitud makrofibrillideks. Mikrofibrillid koosnevad tselluloosiahelatest, mis on omavahel seotud van der Waalsi jõudude ja vesiniksidemetega. Tselluloosi ahel koosneb korduvatest ühikutest ehk (glükoosi dimeer) (Brown Jr, 1996). Tselluloosi ahelal on üks redutseeriv ja üks mitteredutseeriv ots, ning iga glükoosi monomeer on teise suhtes 180° pööratud (McDonald *et al*., 2012). Joonis on kokkupandud erinevatest joonistest: lignotselluloosi joonis on võetud C. E Wyman (2009) tööst, mikrofibrillide ja makrofibrilli struktuur on võetud D. Kumar (2013) tööst, tselluloosiahela struktuuri skeem on võetud R. Velleste (2010) tööst.

Tänu kristallilisele struktuurile on tselluloos tugev, kiuline ja vees lahustumatu polüsahhariid, mis mängib olulist rolli taimeraku seinte ehituses ja teeb temast suurepäraste mehaaniliste omadustega biomaterjali (Brigham, 2018). Modifitseerimata tselluloosi kasutatakse suures osas paberi, papi ja kiudude valmistamiseks. Tselluloosil on suur potentsiaal uute toodete arendamises, mis põhinevad selle biomaterjali erinevate mehhanismide kaudu modifitseerimisel (Rosenau *et al*., 2018).

1.2. Tselluloosi ensümaatiline lagundamine

Looduses vahendavad tselluloosi lagundamist peamiselt mikroorganismid, bakterid ja seened (Wood ja Garcia-Campayo, 1990). Lignotselluloosi biomassi lagundamiseks mõeldud ensüümid saadakse peamiselt seentest, kuna nemad on võimelised sekreteerima ensüüme kõrge tootlikkusega. Üks levinumatest nendest on pehmemädanikseen *Trichoderma reesei* (Merino ja Cherry, 2007).

CAZy andmebaasist saadud informatsiooni järgi, ensüüme, mis lagundavad, modifitseerivad või sünteesivad glükosiidseid sidemeid, jagatakse 5 klassi:

- Glükosiidhüdrolaasid (GH) – glükosiidsete sidemete hüdrolüüs ja/või ümberkorraldamine
- Glükosüültransferaasid (GT) – glükosiidsete sidemete moodustumine
- Polüsahhariidlüaasid (PL) – glükosiidsete sidemete mittehüdrolüütiline lõhustamine
- Süsivesikute esteraasid (CE) – süsivesikute estrite hüdrolüüs

- Abistavad ensüümid (AA) – redoksensüümid, mis toimivad koos teiste ülalpool toodud ensüümide klassidega

Edaspidises ülevaates käsitletakse GH-sid ja AA-sid. „*Auxiliary Activities*“ või „abiensüümid“ (AA) on laialt levinud redoksensüümide klass, mis on seotud taime rakuseina lagundamisega. Selle klassi ensüümid on võimelised soodustama GH, PL ja CE ensüümidele ligipääsu taime rakuseinasse (Levasseur *et al*., 2013). Glükosiidhüdrolaasid (GH) on laialt levinud ensüümide rühm, mis hüdrolüüsib glükosiidseid sidemeid. Tselluloosi hüdrolüüsivad GH-d jagatakse kolmeks:

- Eksoglükanaasid või tsellobiohüdrolaasid (CBH) – vabastavad tsellobioosi subühikud tselluloosiahela otstest
- Endoglükanaasid (EG) – lõikavad β-glükosiidseid sidemeid juhuslikus kohas
- β-glükosidaasid – hüdrolüüsivad tsellobioosi glükoosiks

Lignotselluloos on väga raskesti lagundatav (Himmel *et al*., 2007). Nagu eelnevalt mainitud, on omavahel β-(1,4) sidemetega seotud glükoosi monomeeridest koosnevad tselluloosi ahelad võimelised moodustama kristallilisi struktuure, mis teevad tselluloosi raskesti lagundatavaks (Seiboth *et al*., 2011).

Tselluloosi efektiivne lagundamine on võimalik ainult erinevate ensüümide koostöös. Nähtust, kus ensüümide segu aktiivsus on suurem kui üksikute ensüümkomponentide aktiivsuste summa, nimetatakse ensüümide vaheliseks sünergismiks (Wood ja Garcia-Campayo, 1990). Sellised süsteemid koosnevad paljudest erineva spetsiifilisuse ja erineva toimeviisiga ensüümidest. (Béguin, 1990).

Sünergism nõuab, et tselluloosi lagundamisel toimiks kõik kolm tsellulaasi koostöös (Song *et al*., 2018). EG-d on võimelised lõikama tselluloosiahelaid tselluloosi kristalli amorfsetes piirkondades (Joonis 1), tekitades tselluloosikristallile uusi ahela otsi ja luues seeläbi ligipääsu CBH-dele. CBH-d hüdrolüüsivad protsessiivselt tselluloosiahelat, vabastades produktina tsellobioosi. Viimase etapina hüdrolüüsivad β-glükosidaasid tsellobioosi, vältides tsellobioosi kogunemist ja tsellulaaside aktiivsuse inhibeerimist (Béguin, 1990).

1.3. LPMO

Lüütilised polüsahhariid monooksügenaasid (LPMO-d) on 2010. aastal avastatud ensüümide klass (Vaaje-Kolstad *et al*., 2010). LPMO-d pakkuvad suurt huvi teadlastele, sest on võimelised

oksüdeerima polüsahhariide (Chylenski *et al*., 2019). LPMO-sid toodavad peamiselt seened ja bakterid (Bortsova *et al*., 2018).

Biomassi efektiivne lagundamine on väga oluline ja LPMO-del on seal tähtis ülesanne. LPMO-d on võimelised lagundama resistentseid polüsahhariide, nagu näiteks tselluloosi, kahjustades tselluloosi kristalli pinda oksüdatiivse toimega. See tagab parema juurdepääsu teistele ensüümidele ja teeb LPMO-dest võtmekomponendi tselluloosi ensümaatilise lagundamise tehnoloogia arengus (Jensen *et al*., 2019). Oluliseks erinevuseks EG-de ja LPMO-de vahel on see, et EG-de aktiivsus on piiratud amorfsete piirkondadega aga LPMO-d on võimelised tegema tselluloosiahelasse katkeid ka kristallilistes piirkondades. Tulemuseks on sünergistlik koostoime. LPMO-de ja tsellulaaside vahel. LPMO-d on struktuurselt ja biokeemiliselt põhjalikult iseloomustatud, kuid hetkel on vähe informatsiooni nende kineetika kohta.

LPMO-d on vasest sõltuvad ensüümid, mis vajavad polüsahhariidide oksüdatiivseks lagundamiseks elektroni doonorit ning O_2 või H_2O_2 ko-substraad juuresolekut (Quinlan *et al*., 2011). LPMO-de struktuurid on suhteliselt sarnased, esinedes konserveerunud β-võileib struktuurina (Joonis 2) (Calderaro *et al*., 2021). LPMO-del on Cu sidumiseks histidiini klamber. Tavaliselt koosneb histidiini klamber kahest histidiini jäägist, millest üks on N-terminaalne aminohape. Enamikul seni iseloomustatud LPMO-del on suhteliselt lamedakujulised substraadi sidumispinnad, mis võimaldavad sidumist kristalliliste substraatide pindadega (Vaaje-Kolstad *et al*., 2017).

Joonis 2. LPMO *Tr*AA9A struktuur. *Tr*AA9A C-terminaalne linker on punane ja vaseaatom on kollane. Cu mängib olulist rolli O2 ja H2O2 sidumisel (Kjaergaard *et al*., 2014). LPMO aktiivtsentri lame ehitus võimaldab ligipääsu kristallilisele substraadile (Vaaje-Kolstad *et al*., 2017). Joonis on võetud (Hansson *et al*., 2017) tööst.

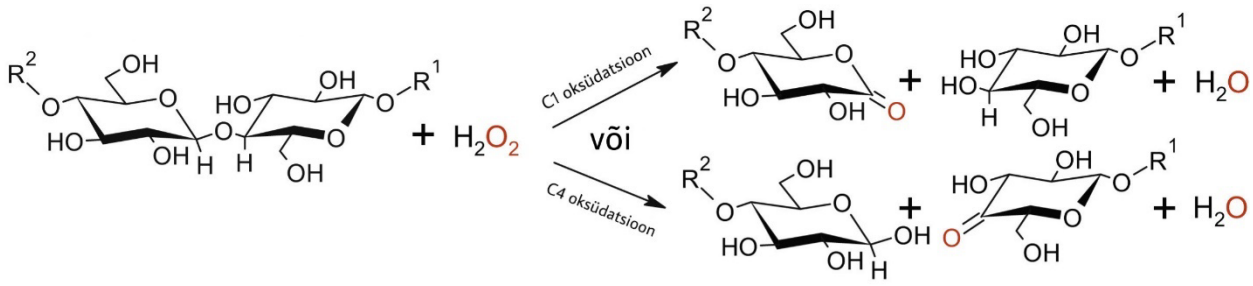
LPMO-d jagatakse CAZy andmebaasi järgi seitsmesse AA perekonda, AA9-AA11 ja AA13-AA16 (Lo Leggio *et al*., 2015).

Esimesena iseloomustati perekondadesse AA9 ja AA10 kuuluvaid ensüüme, mida algselt tunti kui GH61 ja CBM33 (Calderaro *et al*., 2021). CBM33 on võimelised lagundama kristallilist tselluloosi ja kitiini. LPMO AA11, AA13 ja AA14 perekondade esindajaid leidub ainult seentes ja need omavad aktiivsust vastavalt kitiinil, tärklisel ja hemitselluloosidel (Calderaro *et al*., 2021).

LPMO-de aktiivsust on näidatud ka lahustuvate oligosahhariidide suhtes. Näiteks suudab *Neurospora crassa*-st saadud LPMO, *Nc*LPMO9C lõhustada pikki lahustuvaid oligosahhariide. Selle ensüümi poolt vabastatud oligosahhariidi produktid sisaldavad mitteredutseerivas otsas 4-geminaaldiool rühma (Isaksen *et al*., 2014).

1.3.1. LPMO vahendatud tselluloosi lagundamine

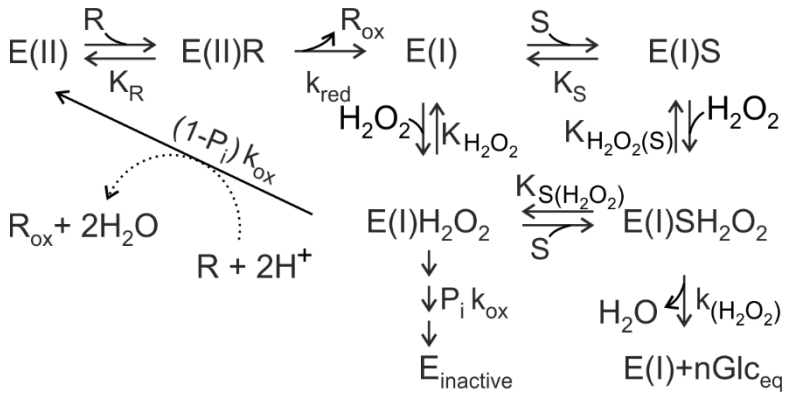
LPMO-d on võimelised oksüdeerima glükosiidseid sidemeid C1 ja/või C4 oksüdeeritud fragmentideks (Skeem 1). C1-oksüdatsiooni tulemusena moodustub laktoon, mis hüdraatub aldoonhappeks. C4-oksüdatsiooni käigus moodustub 4-ketoaldoos, mis seejärel hüdraatub 4-geminaaldiooliks (Calderaro *et al*., 2021).



Skeem 1. LPMO vahendatud tselluloosi lagundamine. Oksüdatsiooni teel saadud produktid on C1 laktoon ja C4 4-ketoaldoos. Joonis võetud (Kuusk ja Väljamäe, 2021) tööst.

Algselt arvati, et glükosiidsete sidemete lagundamiseks kasutavad LPMO-d ko-substraadina O_2-te (Vaaje-Kolstad *et al*., 2010). Kuid hiljuti tehtud avastus näitas, et tegelikult on H_2O_2 eelistatud ko-substraadina (Bissaro *et al*., 2017).

Nagu varem oli öeldud, vajavad LPMO-d redutseerijat. Kui ko-substraadiks on O_2 (oksüdaasne reaktsioon), siis kulub ühe glükosiidse sideme lagundamiseks kaks elektroni. Kui ko-substraadiks on H_2O_2, siis on elektroni doonorit vaja ainult LPMO viimiseks katalüüsitud aktiivse Cu(I) vormi ja glükosiidse sideme lagundamiseks elektroni vaja ei lähe (Skeem 2) (Bissaro *et al*., 2017).



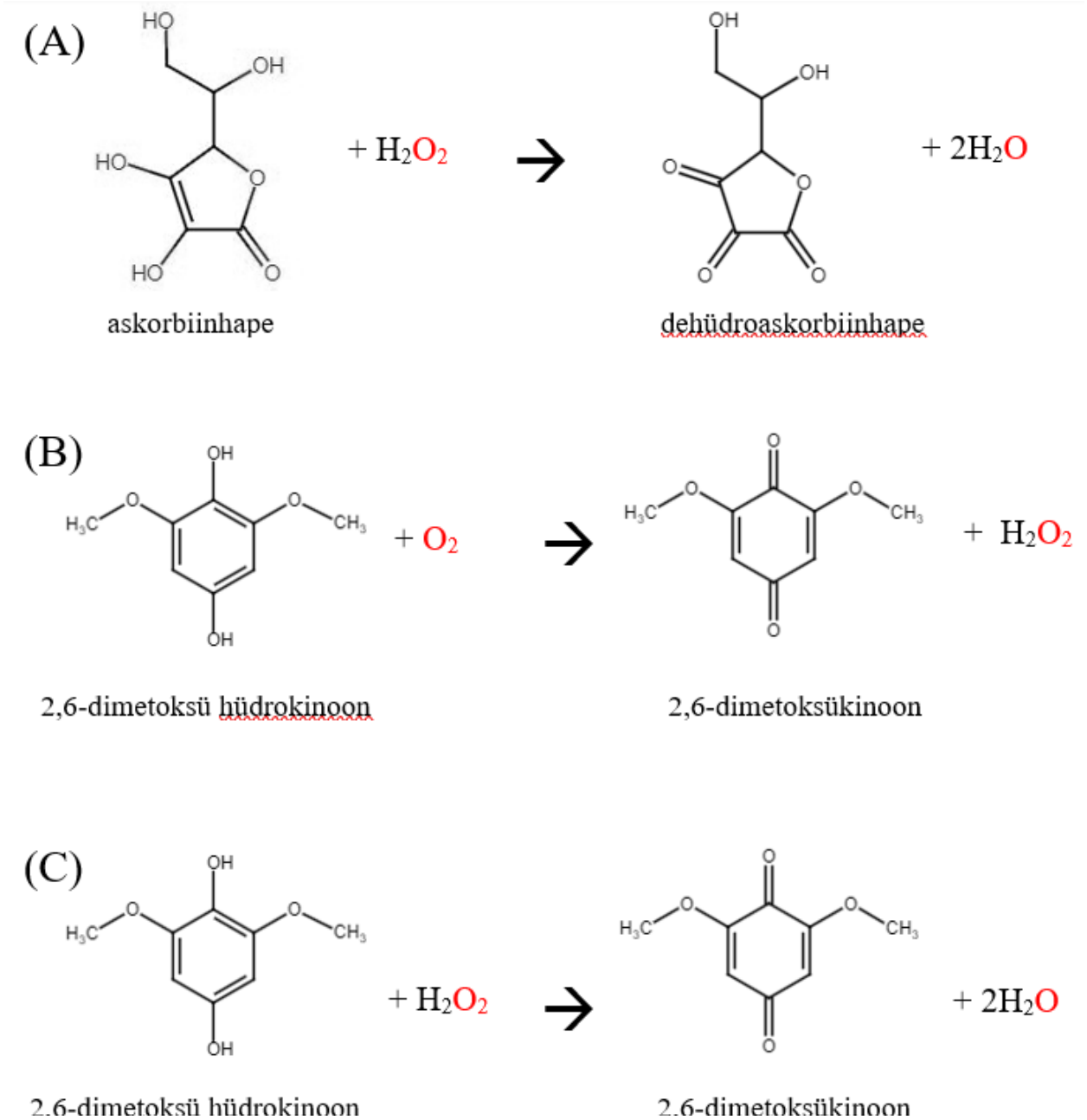
Skeem 2. H2O2-põhise katalüütilise reaktsiooni teoreetiline skeem tselluloosi juuresolekul. Siin on näidatud LPMO peroksügenaasse (paremal) ja peroksüdaasse (vasakul) reaktsiooni kineetiline mehhanism. Skeemil on redutseerija R(selle töö raames on R DMHQ) ja tselluloos on S. E(II), E(I) ja Einaktiivne tähistavad vastavalt LPMO-Cu(II), LPMO-Cu(I) redoksolekuid ja inaktiivset ensüümi. Tselluloosi oksüdatiivsel lagundamisel tekkiv produkt on tähistatud nGlceq. Kuna LPMO inaktiveerimise täpne keemiline reaktsioon ei ole teada, näidatakse seda osa järjestikuste nooltega. Skeem on võetud (Kuusk ja Väljamäe, 2021) tööst.

1.3.2. LPMO katalüüsitud kõrvalreaktsioonid

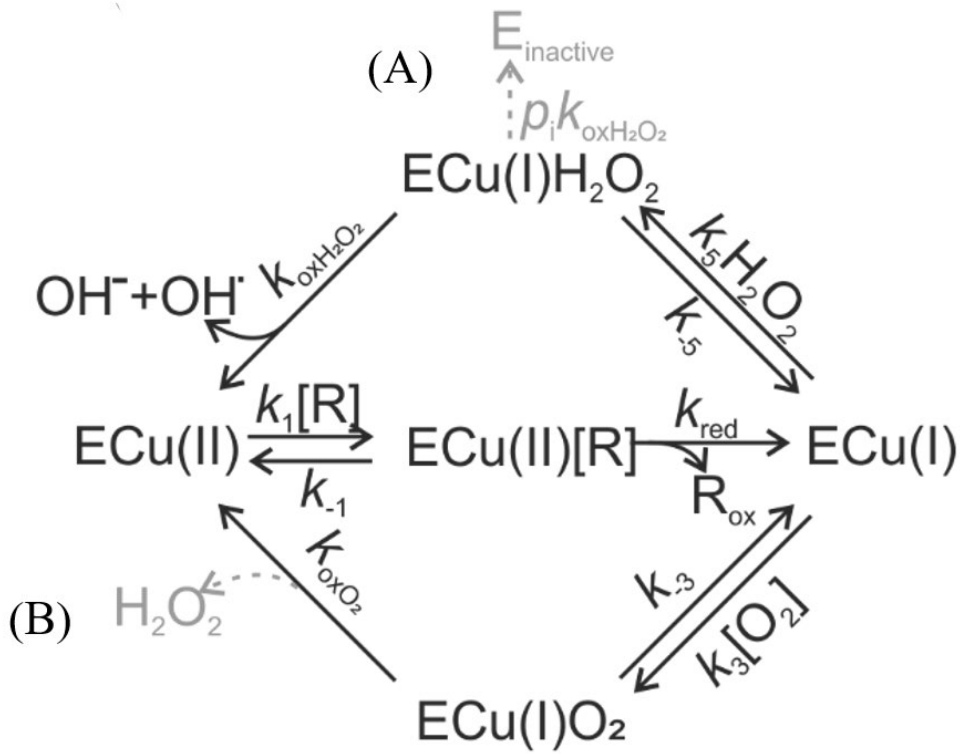
Tselluloosi LPMO-de vahendatud lagundamise uurimisel tuleb arvesse võta erinevaid kõrvalreaktsioone, mida on raske vältida (Eijsink *et al*., 2019). Kõrvalreaktsioonide hulka kuuluvad:

- Redutseerija reageerib LPMO-st sõltumatult O_2-ga ja selle tulemusena tekib H_2O_2 (Skeem 3B)
- Redutseerija reageerib LPMO-st sõltumatult H_2O_2
- Tselluloosist vaba LPMO katalüüsib redutseerija oksüdeerumist O_2 poolt (redutseerija oksüdaasne reaktsioon) ja selle tulemusena tekkib H_2O_2
- Tselluloosist vaba LPMO katalüüsib redutseerija oksüdeerumist H_2O_2 poolt (redutseerija peroksüdaasne reaktsioon) ja selle tulemusena toimub LPMO inaktivatsioon

Redutseerijate askorbiinahappe ja mingu töös kasutatud 2,6-dimetoksü hüdrokinooni (DMHQ) reaktsioonid H_2O_2 on näidatud skeemidel (Skeem 3A ja 3C).



Skeem 3. Redutseerijate peroksüdaasne reaktsioon (A ja C) ning oksüdaasne reaktsioon (B). (A) On näidatud askorbiinhape reaktsioon H_2O_2-ga, mille produktideks on dehüdroaskorbiinhape ja H_2O. (B) On näidatud DMHQ reaktsioon O_2-ga, mille produktideks on DMQ ja H_2O_2. (C) On näidatud DMHQ reaktsioon H_2O_2-ga, mille produktideks on DMQ ja H_2O.



Skeem 4. Teoreetiline LPMO redutseerimise/oksüdeerimine skeem tselluloosi puudumisel. (A) Skeemil on toodud LPMO-d (E) ning Cu(I) ja Cu(II) tähistavad vase aktiivtsentri oksüdatsiooniastet. Redutseerijal (R) ja oksüdeerijatel (O_2 ja H_2O_2) on lubatud seonduda ainult vastavalt LPMO Cu(II) ja Cu(I) vormidega. Punktiirjoontega (helehall) on näidatud (A) H_2O_2 moodustumine O_2-ga ja (B) LPMO oksüdatsioon H_2O_2 toimel, mis viib pöördumatu inaktivatsioonini ($p_i k_{oxH2O2}$, kus p_i on tõenäosus, millega LPMO inaktiveerub reaktsioonis H_2O_2-ga ja k_{ox} on antud töö raames võrdne k_{cat}). Skeem on võetud (Kuusk *et al*., 2019) tööst.

Tselluloosi lagundamisel on probleemiks ensüümide inaktivatsioon. (Kadić *et al*., 2021). LPMO inaktivatsioon (Skeem 4A) tekib siis, kui substraadi puudumisel lahuses olev redutseeritud LPMO reageerib H_2O_2-ga (Skeemid 2 ja 4). Inaktivatsiooni mehhanismid ei ole täpselt teada, kuid arvatakse, et H_2O_2-st tekkivad hüdroksüülradikalid reageerivad LPMO katalüütiliselt oluliste aminohapetega (Bissaro *et al*., 2017). Kuna substraat kaitseb LPMO-d inaktivatsiooni eest (Skeem 2), siis on oluline tagada tingimused, kus redutseeritud LPMO-d oleksid võimalikult vähe aega ilma substraadita (Eijsink *et al*., 2019).

1.3.3. *Tr*AA9A iseloomustus

*Tr*AA9A nimetus koosneb lühendist „*Tr*“ ja „AA9A“, mis viitavad pehmemädanikseen *Trichoderma reesei* ja LPMO-de klassile AA (*auxiliary activity* - abitegevused). *Tr*AA9A vana nimetus oli *Tr*Cel61A (Song *et al.*, 2018)

Mesofiilne seen *T. reesei* (teine nimetus *Hypocrea jecorina*) toodab suures koguses tselluloosi lagundavaid ensüüme (kahte eksoglükanaasi ja umbes kaheksat endoglükanaasi). *T. reesei* on tselluloosi lagundamise mudelorganismiks ja teda kasutakse laialdaselt tsellulaaside tootmisel tööstuslikuks otstarbeks (Gupta *et al.*, 2016).

Varasemalt klassifitseeriti AA9 perekond GH61 glükosiid hüdrolaaside perekonnnana (Harris *et al*., 2010). Hiljuti avastati, et tegu on hoopis Cu-sõltuvate peroksügenaasidega ning nad paigutati AA9 LPMO perekonda. AA9 ensüümid katalüüsivad C1, C4 ja C1/C4 oksüdatsiooni ning see ensüümide klass esineb peamiselt seentes (Levasseur *et al*., 2013).

*Tr*AA9A on modulaarne valk, mis koosneb 323 aminohappest, 1-220 aminohappejääkidest koosnevast AA9 katalüütilises domeenist, 221-288 aminohappejääkidest koosnevast linkerpeptiidist ja süsivesikule seonduvast moodulist (Hansson *et al*., 2017). *Tr*AA9A-l on β-lehtedest koosneva β-võileiva struktuur, mis on näidatud Joonisel 2 (Karkehabadi *et al*., 2008).

1.4. Ping-pong mehhanismile vastava reaktsiooni Michaelis-Menteni võrrand

Ensüümid on bioloogilised katalüsaatorid, mille uurimine ja täpne kirjeldamine on väga tähtis. Selle jaoks, et kirjeldada reaktsiooni algkiiruse sõltuvust substraadi kontsentratsioonist, tuletasid L. Michaelis ja M. Menten võrrandi 1. Michaelis-Menteni võrrand annab võimaluse kirjeldada väga paljude ensüümimolekulide katalüütilist aktiivsust (Jakovleva, 2005) .

$$V = Vmax \times \frac{[S]}{(Km+[S])} \qquad \text{(võrrand 1)}$$

Võrrandis 1 on V produkti tekke kiirus, K_m on ensüüm-substraadi kompleksi dissotsiatsioonikonstant ehk Michaelise-Menteni konstant, V_{max} on maksimaalne reaktsioonikiirus ja [S] substraadi kontsentratsioon (Johnson ja Goody, 2011) .

Enamik ensüüme on võimelised katalüüsima reaktsioone, mis hõlmavad mitut substraati. Kahe substraadi sidumine võib toimuda kahe mehhanismi kaudu, järjestatud ja mittejärjestatud mehhanismi kaudu. Mittejärjestatud mehhanismi tuntakse kui ping-pongi mehhanismi, kus substraadid ei seostu samaaegselt ensüümile (Cleland, 1973).

Varasemast on teada, et *Tr*AA9A katalüüsitud, H_2O_2-st sõltuv askorbiinhappe oksüdeerimise kineetika on kooskõlas ping-pong mehhanismiga (Kuusk ja Väljamäe, 2021). Ping-pong mehhanismi puhul peab olema algkiiruse sõltuvus substraatide (DMHQ ja H_2O_2) kontsentratsioonidest kooskõlas võrrandiga 2 (Kont *et al*., 2020).

$$\frac{V_i}{E_0} = \frac{k_{cat}[DMHQ][H_2O_2]}{K_{M(H_2O_2)}[DMHQ]+K_{M(DMHQ)}[H_2O_2]+[DMHQ][H_2O_2]} \qquad \text{(võrrand 2)}$$

Võrrandis 2 on $V_{(i)}$ reaktsiooni algkiirus (µM s^{-1}), E_0 *Tr*AA9A kontsentratsioon (µM), k_{cat} katalüütiline konstant (s^{-1}) ning $K_{M(H2O2)}$ ja $K_{M(DMHQ)}$ on Michaelise-Menteni konstandid (µM) vastavalt H_2O_2 ja DMHQ jaoks.

Kahesubstraatsete reaktsioonide kineetika mõõtmisel kasutatakse katselist lähenemist, kus ühe katseseeria piires hoitakse ühe substraadi kontsentratsioon konstantsena ja muudetakse ainult teise substraadi kontsentratsiooni (Kont *et al*., 2020). Järgmise peatüki raames on toodud joonisel 6 esitatud algkiirused mõõdetud nii, et ühe katseseeria piires on DMHQ kontsentratsioon olnud konstantne ja muudetud on ainult H_2O_2 kontsentratsioon.

Kui lugeda [DMHQ] konstandiks, siis taandub kahesubstraatse reaktsiooni võrrand 2, tavalisele, ühesubstraatse reaktsiooni jaoks tuletatud Michaelis-Menteni võrrandile 3 (Zaitseva *et al*., 2016).

$$\frac{V_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app}[H_2O_2]}{K_{M(H_2O_2)}^{app}+[H_2O_2]} \qquad \text{(võrrand 3)}$$

Erinevalt ühesubstraatse reaktsiooni kineetika jaoks tuletatud Michaelis-Menteni võrrandist ei ole võrrandis 3 esitatu katalüütiline konstant (k_{cat}^{app}) ja Michalise konstant ($K_{M(H2O2)}^{app}$) tõelised vaid niiöelda näilised parameetrid (sellest tulenevalt on nad tähistatud ülaindeksiga ^{app}). Näiliste Michaelis-Menteni võrrandi parameetrite väärtused sõltuvad konstantsena hoitud substraadi (meie töö puhul DMHQ) kontsentratsioonist vastavalt võrranditele 4, 5 ja 6 (Cornish-Bowden, 2013).

$$k_{cat}^{app} = \frac{k_{cat}[DMHQ]}{K_{M(DMHQ)}+[DMHQ]} \qquad \text{(võrrand 4)}$$

$$K_{M(H_2O_2)}^{app} = \frac{K_{M(H_2O_2)}[DMHQ]}{K_{M(DMHQ)}+[DMHQ]} \qquad \text{(võrrand 5)}$$

$$\frac{k_{cat}^{app}}{K_{M(H_2O_2)}^{app}} = \frac{k_{cat}}{K_{M(H_2O_2)}} \qquad \text{(võrrand 6)}$$

Võrranditest 4 ja 5 nähtub, et näilised k_{cat} ja $K_{M(H2O2)}$ sõltuvad DMHQ kontsentratsioonist vastavalt hüperboolile (nende väärtused on DMHQ kontsentratsiooni kasvades küllastuvad). Näiline katalüütiline efektiivsus ($k_{cat}^{app}/K_{M(H2O2)}^{app}$) on aga DMHQ kontsentratsioonist sõltumatu (võrrand 6). Viimane omadus on ping-pong mehhanismile iseloomulik kineetiline tunnus (Cornish-Bowden, 2013).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Minu bakalaureusetöö eesmärk oli iseloomustada *Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse LPMO *Tr*AA9A peroksüdaasseid kõrvalreaktsioone, kuna nende struktuur ja biokeemia on põhjalikult iseloomustatud, kuid on vähe informatsiooni nende kineetika kohta.

2.2. Materjal ja metoodika

1,4-dihüdroksü-2,6-dimetoksübenseen (DMHQ) osteti Sigma-Aldrich®'st (lot #MKBV3690V). 10 mM DMHQ (97%; MW=170 g/mol) lahustati fosfaatpuhvris (H_3PO_4 0,15 mM), jaotati alikvootideks ja säilitati -20°C juures. Sulatati vahetult enne kasutamist ja hoiustati jää peal kogu kasutamise ajal.

2.2.1. Ensüümid ja kasutatud reagendid

***Tr*AA9A** saadi professor VGH Eijsink'i laborist.

Katalaas osteti Sigma-Aldrich®'st (lot #SLBG1321V). Katalaas lahustati 50 mM Tris-HCl puhvris (pH 7) lõppkontsentratsioonini 2 mg/ml.

Vesinikperoksiidi põhilahusest (H_2O_2 30%, 9,8 M) (Honeywell, #SZBG2070) valmistati lahjendused vette vähem kui 1 tund enne kasutamist.

Kogutöö vältel kasutati Milli-Q® Ultrapure vett (>18,2 megaohmi cm^{-1}), mis oli eelnevalt puhastatud Chelexi® kolonnis, et eemaldada metallijäägid.

2.2.2. *Tr*AA9A vasega küllastamine

*Tr*AA9A ensüümi aktiveerimiseks tuleb reaktsioonitsenter varustada vaseiooniga. 200 µl ensüümipreparaadile (130 µM) lisati 20 µl $CuSO_4$ vesilahust (5 mM). Saadud lahus inkubeeriti üleöö toatemperatuuril. Järgmisel päeval puhastati vasega varustatud ensüüm lahuses olevast vabast vasest Toyopearl® – HW40 kolonnil (V_{kolonn} = 2,5 ml). Kolonn (pH 5), fraktsioone koguti ~200 µl kaupa. Fraktsioonide valgusisaldust mõõdeti lainepikkusel 280 nm NanoDrop™ ND-2000c spektrofotomeetriga. Suurema valgu sisaldusega fraktsioonid segati kokku.

2.2.3. Kineetika katsed

Reaktsioonisegude lõppruumalad olid 0,5 ml ning nad sisaldasid 50 mM NaAc (pH 5) puhvrit, ensüümi *Tr*AA9A lõppkontsentratsioonil 0,05 µM, substraati DMHQ kolmel erineval

lõppkontsentratsioonil 100, 200 või 500 µM ning vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioonidel 5, 10, 20, 50, 100 või 200 µM. Reaktsioonid DMHQ kontsentratsiooniga 200 µM sisaldasid ensüümi *Tr*AA9A lõppkontsentratsioonil 0,25 µM. Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, DMHQ, *Tr*AA9A ja H_2O_2. Proove hakati mõõtma 30 sekuntdit peale vesinikperoksiidi lisamist. Tulemused saadi spektrofotomeetri abil (lainepikkus A292 nm; programmi pikkus DMHQ 100 ja 500 µM kontsentratsiooni puhul oli 180 sekundit ja 200 µM puhul oli 600 sekundit, optiline tihedus mõõdeti 1 sekundi intervallidega). Taustaproovi mõõtmiseks tehti reaktsioonisegu puhvri ja DMHQ substraadiga. Mittelineaarse lähenemise uurimiseks kasutati STATISTICA programmi.

2.2.4. Platoostumise katse

Reaktsioonisegude lõppruumalad olid 0,5 ml ning nad sisaldasid 50 mM NaAc (pH 5) puhvrit, ensüümi *Tr*AA9A lõppkontsentratsioonidel: 0,05 µM, 0,1 µM, 0,15 µM, 0,25 µM, vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioonil 200 µM ja substraati DMHQ lõppkontsentratsioonil 200 µM. Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, substraat, ensüüm ja vesinikperoksiid. Proove inkubeeriti 50 min 25 °C juures ja siis mõõdeti saadi spektrofotomeetri abil reaktsioonisegude neeldumist lainepikkusel A292 nm. Taustaproovi mõõtmiseks viidi läbi katse puhvri ja DMHQ substraadiga.

2.2.5. Katalaasiga katsed

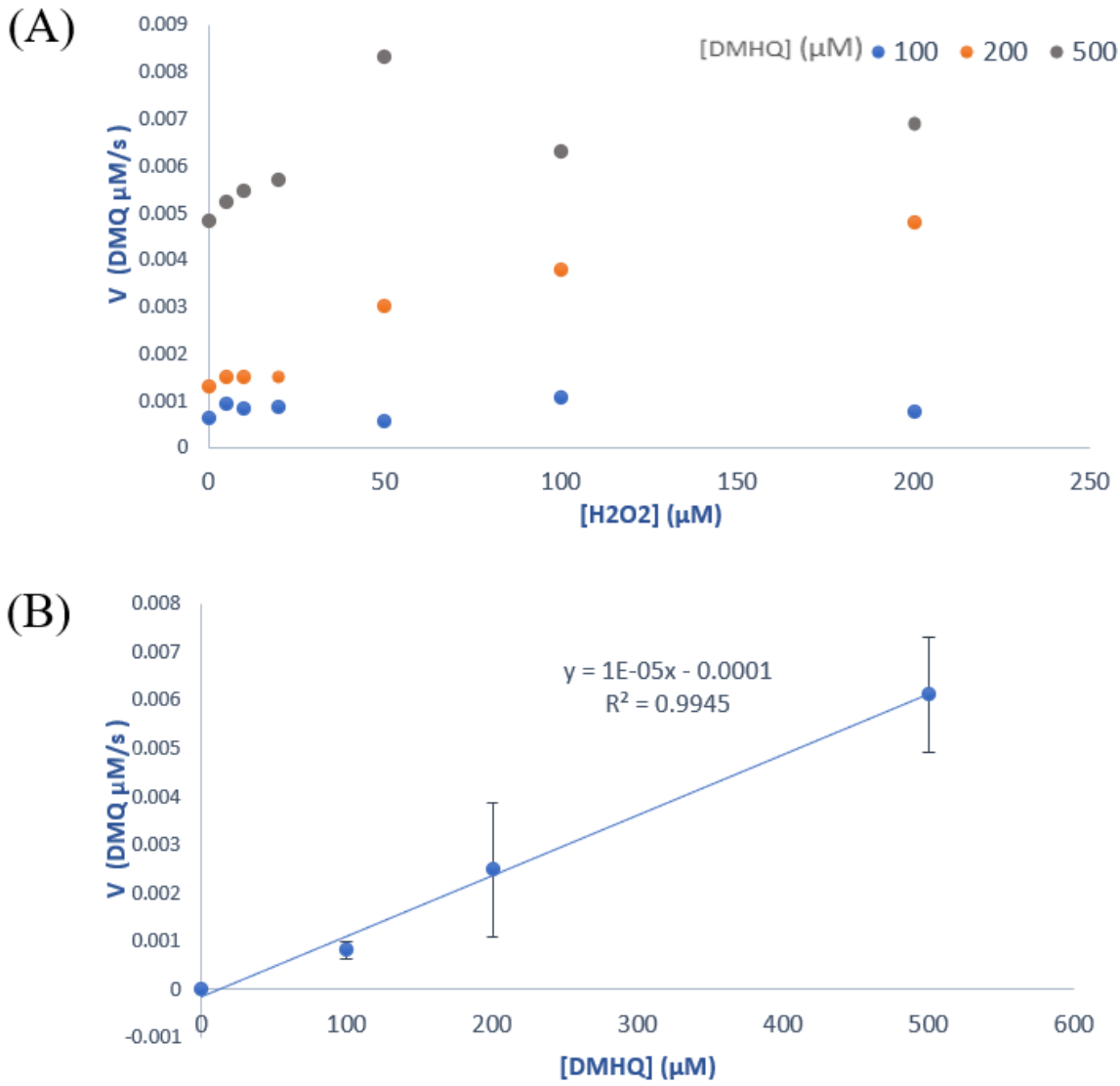
Reaktsioonisegude lõppruumalad olid 0,5 ml ning nad sisaldasid 50 mM NaAc (pH 5) puhvrit, ensüümi *Tr*AA9A lõppkontsentratsioonil 0,25 µM, katalaasi lõppkontsentratsioonil 200 üh/ml ehk 0,07 mg/ml ja substraati DMHQ lõppkontsentratsioonil 500 µM. Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, substraat, katalaas, ning pärast katalaasi lisamist inkubeeriti 5 minutid 25°C juures (inkubeeriti ainult proove, mis sisaldasid katalaasi). Seejärel lisati ensüüm ja 30 sekundi pärast mõõdeti tulemused spektrofotomeetri abil (lainepikkus A292 nm; programmi pikkus 180 sekundit, optiline tihedus mõõdeti 1 sekundi intervallidega).

2.3. Tulemused

2.3.1. Ensüümist sõltumatud reaktsioonid

Paljud fenoolsed ühendid oksüdeeruvad hapniku toimel ka ensüümist sõltumatult (Joonis 3). Selleks, et ensüümkatalüüsitud reaktsiooni kineetikat analüüsida on vaja ensüümist sõltumatute, taustareaktsioonide osa maha lahutada.

Selle uuringu jaoks kasutati katsete tulemusi, kus puudus *Tr*AA9A. Katsed tehti kolmel erineval DMHQ kontsentratsioonil ja kolmes korduses. Selle jaoks, et neeldumised konverteerida produkti kontsentratsiooniks kasutati ekstinktsioonikoefitsienti (laine pikkusele A292 nm vastav koefitsient on 0,01368 $\mu M^{-1}cm^{-1}$) (Kracher *et al.*, 2016). $V_{(i)}$ arvutamiseks kasutati Exceli funktsiooni SLOPE. Katsetulemused näitasidki, et ka *Tr*AA9A puudumisel toimus DMHQ oksüdeerumine.



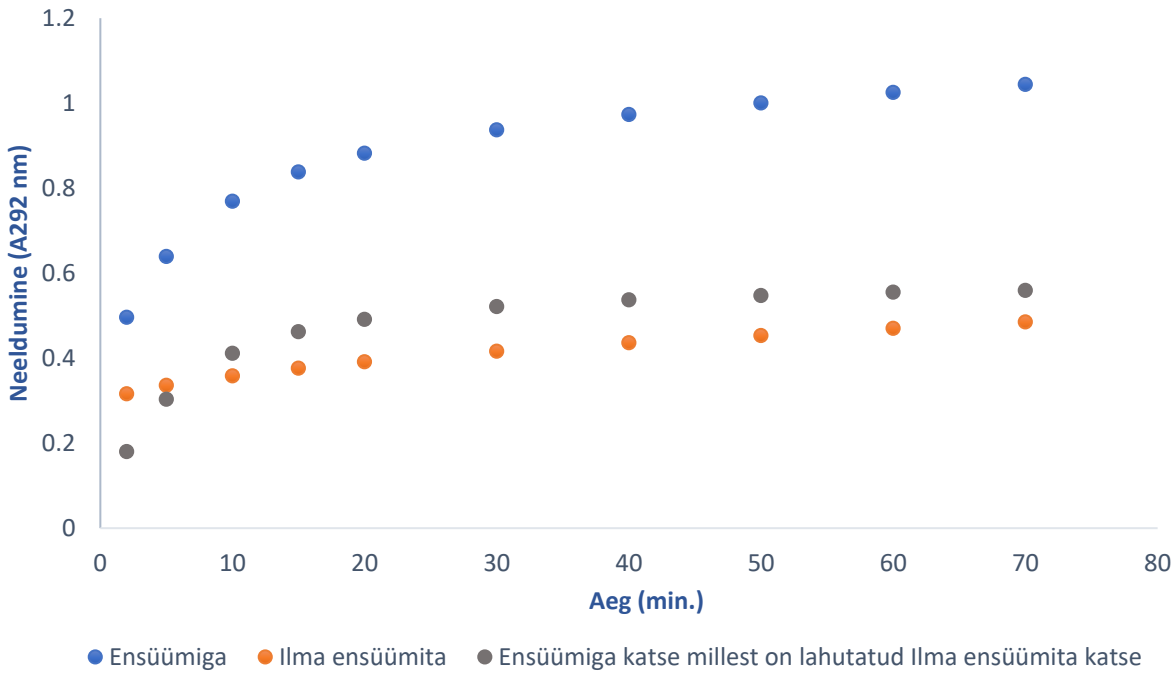
Joonis 3. *Tr*AA9A puudumisel mõõdetud reaktsiooni kiirused. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures. (A) DMHQ oksüdeerumise kiirus mõõdetuna erinevatel H_2O_2 kontsentratsioonidel. DMHQ kontsentratsioonid on defineeritud joonisel. (B) DMHQ oksüdeerumise sõltuvus DMHQ kontsentratsioonist.

DMHQ oksüdeerumise kiirus oli sõltumatu reaktsioonikeskkonda lisatud H_2O_2 kontsentratsioonist (Joonis 3A), mis viitab sellele, et oksüdeerumine on vahendatud O_2 poolt. DMHQ oksüdeerumise kiirus kasvas koos DMHQ kontsentratsiooniga (Joonis 3B).

Eeldades, et O_2 kontsentratsioon on ligikaudu 0,25 mM saame DMHQ mitteensümaatilise oksüdeerumise kiiruskonstandiks $\frac{0{,}00001\ s^{-1}}{0{,}00025\ M^{-1}} = \mathbf{0{,}04\ M^{-1}\ s^{-1}}$.

2.3.2. DMHQ oksüdeerumise ajakõverad - *Tr*AA9A pöördumatu inaktivatsioon

Varasemad katsed on näidanud, et koos askorbiinhappe ja H_2O_2-ga inkubeerides toimub TrAA9A pöördumatu inaktivatsioon (Kuusk ja Väljamäe, 2021). Antud töös uurisime, kas selline inaktivatsioon toimub ka juhul, kui askorbiinhappe asemel on redutseerijaks DMHQ. Tulemuste saamiseks inkubeeriti DMHQ (200 µM) ja *Tr*AA9A (250 µM) H_2O_2 (200 µM) juuresolekul 70 minuti jooksul, mõõtes erineval ajal (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 ja 70 min.) neeldumist A292 nm juures. Tulemused (Joonis 4) näitasid, et neeldumine 292 nm juures saavutab platoo ligikaudu 30 min möödudes.



Joonis 4. *Tr*AA9A vahendatud DMHQ oksüdeerumine seiskub reaktsiooni toimudes. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures. *Tr*AA9A, DMHQ ja H_2O_2 kontsentratsioonid olid vastavalt 0,25 µM, 200 µM ja 200 µM. Joonisel on saadud tulemused *Tr*AA9A juuresolekul (sinine) ja puudumisel (oranž) ning nende erinevus (hall).

Nagu on näidatud joonisel Joonisel 4 siis seiskub DMHQ oksüdeerumine juba esimese 30 minuti möödudes. Põhjused, miks ensüümkatalüüsitud reaktsioonid võivad jõuda platoole võivad olla:

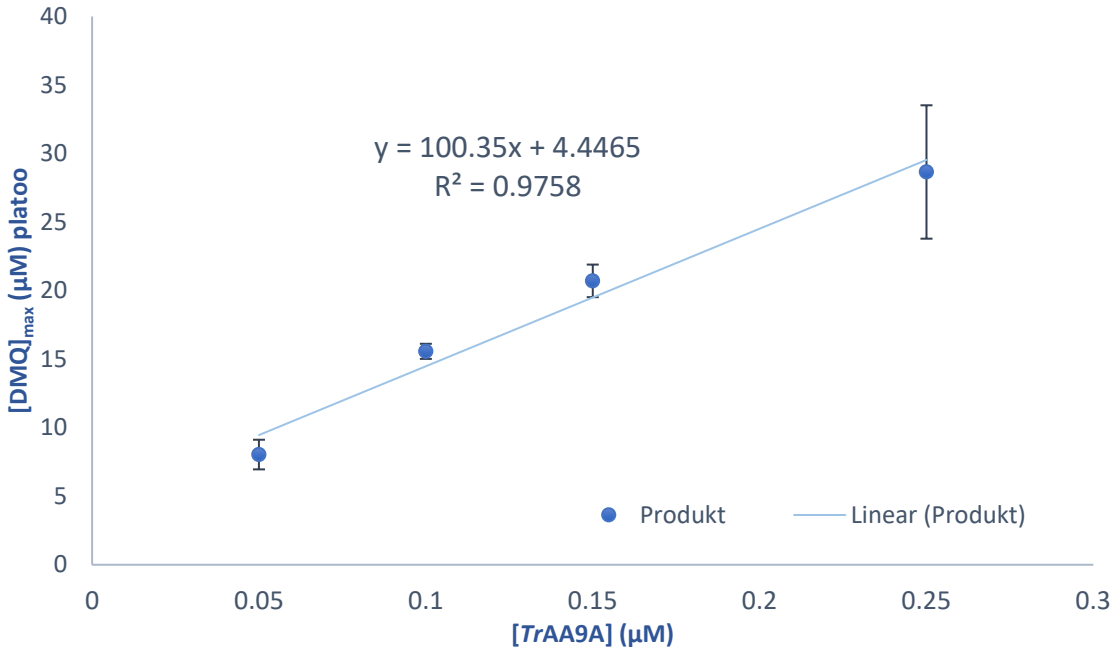
- Substraatide ära tarbimine
- Ensüümi inaktiveerumine
- Tugev produktinhibitsioon

DMHQ oksüdeerumine seiskub A292 nm väärtuse ligikaudu 1,0 juures (Joonis 4). Neeldumisele 1,0 vastab produkti DMQ kontsentratsioon, [DMQ]= $\frac{1,0}{0,01368}$ = 73,09 µM (A292 platoo hindamisel

ei ole maha lahutatud tausta neeldumist, seega tulemus [DMQ]=73 µM on üle hinnatud). Kuna DMHQ ja H_2O_2 vahelise reaktsiooni stöhhiomeetria on $\frac{1}{1}$ (Skeem 3B), siis ei saa ära tarbitud DMHQ ja H_2O_2 kontsentratsioonid olla suuremad kui 73 µM. Kuna DMHQ ja H_2O_2 kontsentratsioonid olid 200 µM, siis saame järeldada, et tegemist pole substraadi ära tarbimisega.

Selleks, et eristada ensüümi inaktiveerumisest või produktinhibitsioonist põhjustatud reaktsiooni seiskumist teostati „platoostumise katsed“ ehk platoole jõudmine erinevatel *Tr*AA9A kontsentratsioonidel. Nendes katsetes inkubeeriti DMHQ (200 µM) ja H_2O_2 (200 µM) 50 min kasutades erinevaid *Tr*AA9A kontsentratsioone.

50 minutilise inkubeerimise jooksul tekkinud produkti hulk (vastab maksimaalsele DMQ produkti hulgale ehk platoole) sõltus lineaarselt *Tr*AA9A kontsentratsioonist (Joonis 5).



Joonis 5. Platoo kõrguse ($[DMQ]_{max}$) sõltuvus *Tr*AA9A kontsentratsioonist. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures. Pidev joon näitab andmete lineaarset regressiooni.

Kuna produktinhibitsiooni tugevus ei sõltu ensüümi kontsentratsioonist, siis viitavad toodud tulemused (Joonis 5) sellele, et DMHQ oksüdeerumise seiskumine on põhjustatud *Tr*AA9A inaktivatsioonist. Joonise 5 järgi saame öelda, et üks ensüümi molekul on võimeline maksimaalselt katalüüsima 100 ± 11 DMHQ molekuli oksüdeerumist.

2.3.3. Algkiiruste määramine

Kuna Michaelis-Menteni võrrandisse lähevad ensüümkatalüüsitud reaktsiooni algkiirused, siis on viimaste määramine ensüümkineetika analüüsil esimeseks ülesandeks. Empiiriliselt on algkiirus defineeritud, kui reaktsiooni kiirus olukorras, kus produkti moodustumine ajas on lineaarne.

Reaktsiooni kulgedes kiirus väheneb, seega produkti moodustumine ajas ei ole lineaarne. Seda saab näha Jooniselt 6, mis näitab produkti (2,6-dimetoksükinoon, DMQ) moodustumist *Tr*AA9A (0,25 µM) katalüüsitud DMHQ oksüdeerimisel.

DMQ moodustumine on kirjeldatav lihtsa esimest järku reaktsiooni võrrandi 7 abil (Cornish-Bowden, 2013b).

$$[DMQ] = [DMQ]_{max}(1 - e^{-k_{obs}t}) \qquad \text{(võrrand 7)}$$

Võrrandis 7 on $[DMQ]_{max}$ maksimaalne produkti kontsentratsioon (platoo, µM) ja k_{obs} näiline esimest järku kiiruskonstant (s^{-1}) (Cornish-Bowden, 2013b). Leides katseandmete lähendamisel (mittelineaarse regressioonanalüüsi teel) võrrandile 7 parameetrite $[DMQ]_{max}$ ja k_{obs} väärtused on reaktsiooni algkiirus arvutatav võrrandi 8 kaudu.

$$V_{(i)} = \left(\frac{d[DMQ]}{dt}\right)_{t\to 0} = [DMQ]_{max}k_{obs} \qquad \text{(võrrand 8)}$$

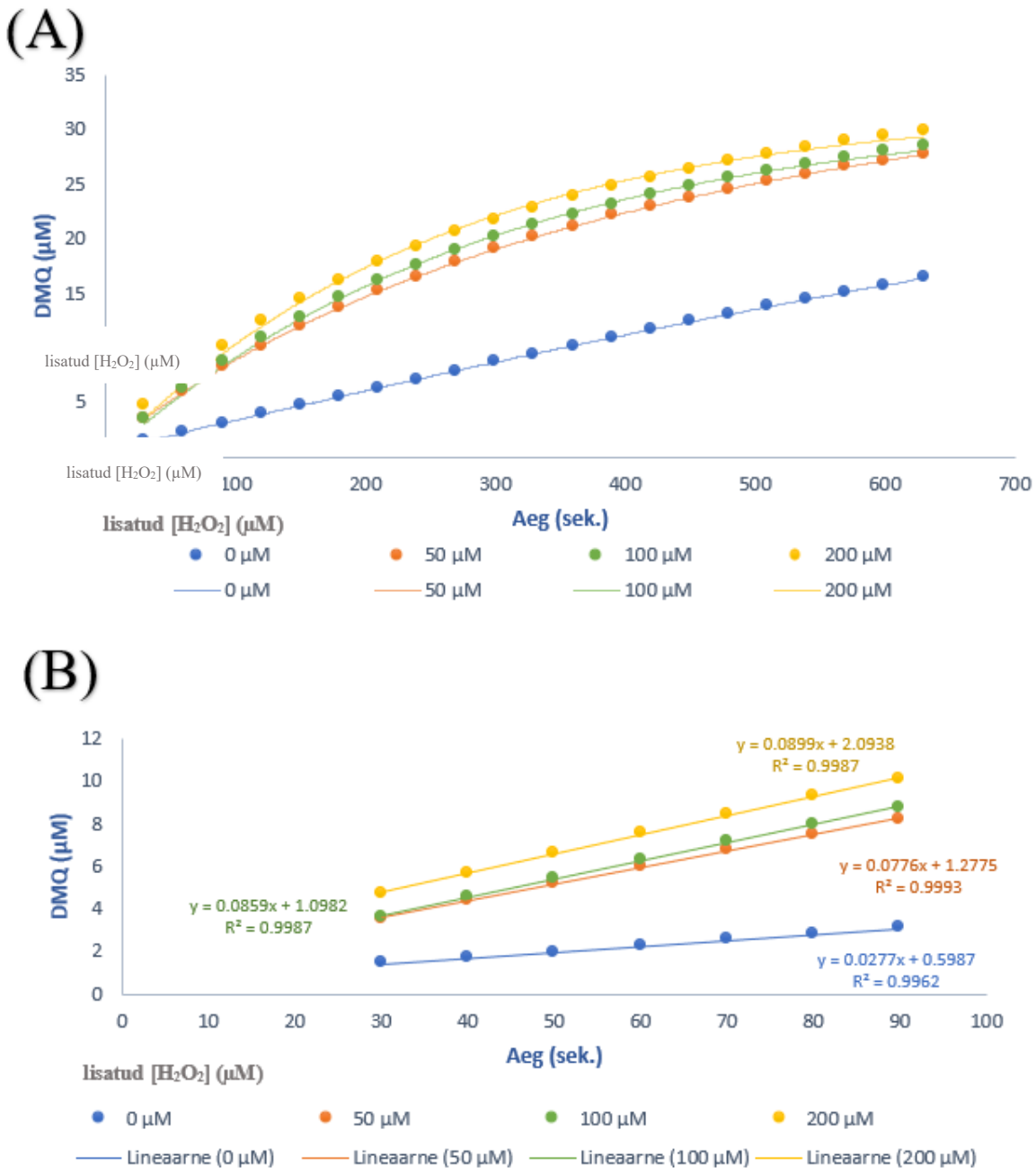
Võrrandis 8 on $V_{(i)}$ reaktsiooni algkiirus ($\mu M^{-1}\ s^{-1}$).

Lihtsama võimaluse algkiiruste määramiseks pakub ajakõvera selle osa analüüs, kus produkti teke on ajas lineaarne. DMHQ oksüdeerumise ajakõverate analüüsist selgus, et reaktsiooni esimese 90 sekundi jooksul on produkti moodustumine ajas ligikaudu lineaarne (Joonis 6B) ja algkiirus on leitav lihtsa lineaarse regressioonanalüüsi teel.

Tabel 1. Kahel erineval meetodil mõõdetud algkiiruste andmete tabel. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures.

$[H_2O_2]$ (µM)	$\frac{[DMQ]_{max}\times k_{obs}}{TrAA9A}$ **(s^{-1})**	$\frac{V(90\ sek.)}{TrAA9A}$ **(s^{-1})**
0	0,131	0,112
50	0,425	0,310
100	0,429	0,344
200	0,499	0,360

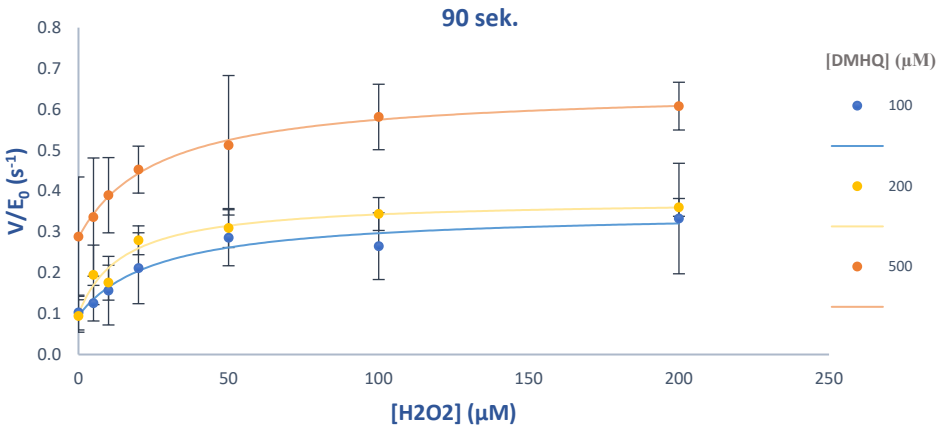
Saadud tulemustest (Tabel 1.) saame järeldada, et kahel viisil leitud kiirused on piisavalt sarnased ja edaspidi kasutame töös $\frac{V(90\ sek.)}{TrAA9A}$.



Joonis 6. *Tr*AA9A katalüüsitud DMHQ oksüdeerumise ajakõverad. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures. Ensüümi ja DMHQ vastavad kontsentratsioonid olid 0,25 µM ja 200 µM. H_2O_2 kontsentratsioonid on tähistatud joonistel. (A) 10 min jooksul mõõdetud DMQ teke. Sümbolid näitavad mõõdetud DMQ kontsentratsiooni (kui produkti kontsentratsiooni mõõdeti 1-sek intervalliga, siis on joonise selguse huvides näidatud produkti moodustamine 30 sek intervalliga) ja pidevad jooned näitavad katseandmete lähendamisel vastavalt võrrandile 7 saadud mittelineaarse regressiooni tulemusi. (B) Samad andmed, kui paneelil A, kuid näidatud on produkti moodustumine esimese 90 sekundi jooksul. Pidevad jooned näitavad katseandmete lineaarse regressiooni tulemusi.

2.3.4. DMHQ oksüdeerimise algkiiruste vastavus Michaelis-Menteni võrrandile

Joonisel 7 esitatud tulemustest nähtub, et ka ilma reaktsioonikeskkonda H_2O_2-te lisamata toimub DMHQ oksüdeerimine arvestatava kiirusega (see on eriti ilmne 500 µM DMHQ kontsentratsioonil tehtud katseseeria puhul).



Joonis 7. DMHQ oksüdeerimise kiiruse (V/E_0) sõltuvus H_2O_2 kontsentratsioonist. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50 mM, pH 5) 25°C juures. Andmed on esitatud katsete keskväärtustena (n = 3, sõltumatud katsed) ja veatulbad näitavad standardhälvet. Joonisel on esitatud kolm katseseeriat (mõõdetud 100, 200 ja 500 µM DMHQ kontsentratsioonil), mis näitavad algkiiruse (läbi jagatuna ensüümi kontsentratsiooniga) sõltuvust reaktsioonikeskkonda lisatud H_2O_2 kontsentratsioonist. pidevad jooned näitavad katseandmete lähendamisel vastavalt võrrandile 9 saadud mittelineaarse regressiooni tulemusi.

Esimene võimalus – tegemist on *Tr*AA9A katalüüsitud DMHQ oksüdeerumisega O_2 toimel. Sellisel juhul ei tohiks katsetes, kuhu vesinik peroksiidi ei lisatud, olla DMHQ oksüdeerimine inhibeeritud katalaasi poolt.

Katalaas on ensüüm, mis katalüüsib vesinikperoksiidi lagunemist veeks ja hapnikuks (Góth *et al*., 2004).

Skeem 5. Vesinikperoksiid lagundamine veeks ja hapnikuks katalaasi juuresolekul (Alfonso-Prieto *et al*., 2009)

Juhul kui *Tr*AA9A kasutab ko-substraatidena nii O_2-te kui ka H_2O_2-te peaks DMHQ oksüdeerimine toimuma vastavalt reaktsiooniskeemidele (Skeem 3B) ja (Skeem 3C). Katalaas on võimeline inhibeerima ainult H_2O_2 osalusel toimuvat reaktsiooni (Skeem 3C). Kuna H_2O_2 osalusel toimuva reaktsiooni kiirus ei saa olla suurem, kui H_2O_2 tekkimise kiirus O_2 reaktsioonis (Skeem

3B), siis oleks maksimaalseks katalaasi lisamise efektiks 2 kordne DMHQ oskŭdeerimise kiiruse langus.

Katalaasi puudumisel ja juuresolekul määratud DMHQ (500 µM) oksüdeerimise kiirusteks on mõõdeti vastavalt 0,389 ± 0,013 s^{-1} ja 0,156 ± 0,0155 s^{-1}. Katalaasi juuresolek alandas kiirust keskmiselt 2,49 ± 0,2 s^{-1} korda.

Lisaks H_2O_2 tekkimisele DMHQ oksüdaasses reaktsioonis (Skeem 4C) on võimalik ka H_2O_2 sisaldumine DMHQ preparatsioonis. H_2O_2 sisaldumisele DMHQ preparatsioonis viitavad ka suuresti erinevad DMHQ oksüdeerimise kiirused, mis saadi erinevate inimeste poolt valmistamistatud DMHQ preparatsioonidega. Katsetes, kus H_2O_2 reaktsioonikeskkonda ei lisatud olid DMHQ (500 µM) oksüdeerumise kiirused 0,13 s^{-1} (minu poolt valmistatud DMHQ preparatsioon) ja 0,37 s^{-1} (Hegne Puparti poolt valmistatud preparatsioon). Kuna DMHQ oksüdeerub O_2 toimel (Joonis 3A) ensüümist sõltumatult ja reaktsiooni tulemusena tekib H_2O_2, siis on võimalik, et erinevate inimeste poolt tehtud DMHQ preparatsioonides võis nende valmistamise käigus tekkida erinev hulk H_2O_2.

Juhul kui DMHQ preparatsioonis sisaldub ka H_2O_2, siis tuleb tulemuste analüüsiks kasutada modifitseeritud Michaelis-Menteni võrrandit, mis arvestaks DMHQ preparatsioonis sisalduvat H_2O_2-te ($[H_2O_2]_{DMHQ}$). Lisades võrrandile 3 konstandi $[H_2O_2]_{DMHQ}$ saame võrrandi 9.

$$\frac{V_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app}([H_2O_2]+[H_2O_2]_{DMHQ})}{K_{M(H_2O_2)}^{app}+[H_2O_2]+[H_2O_2]_{DMHQ}} \qquad \text{(võrrand 9)}$$

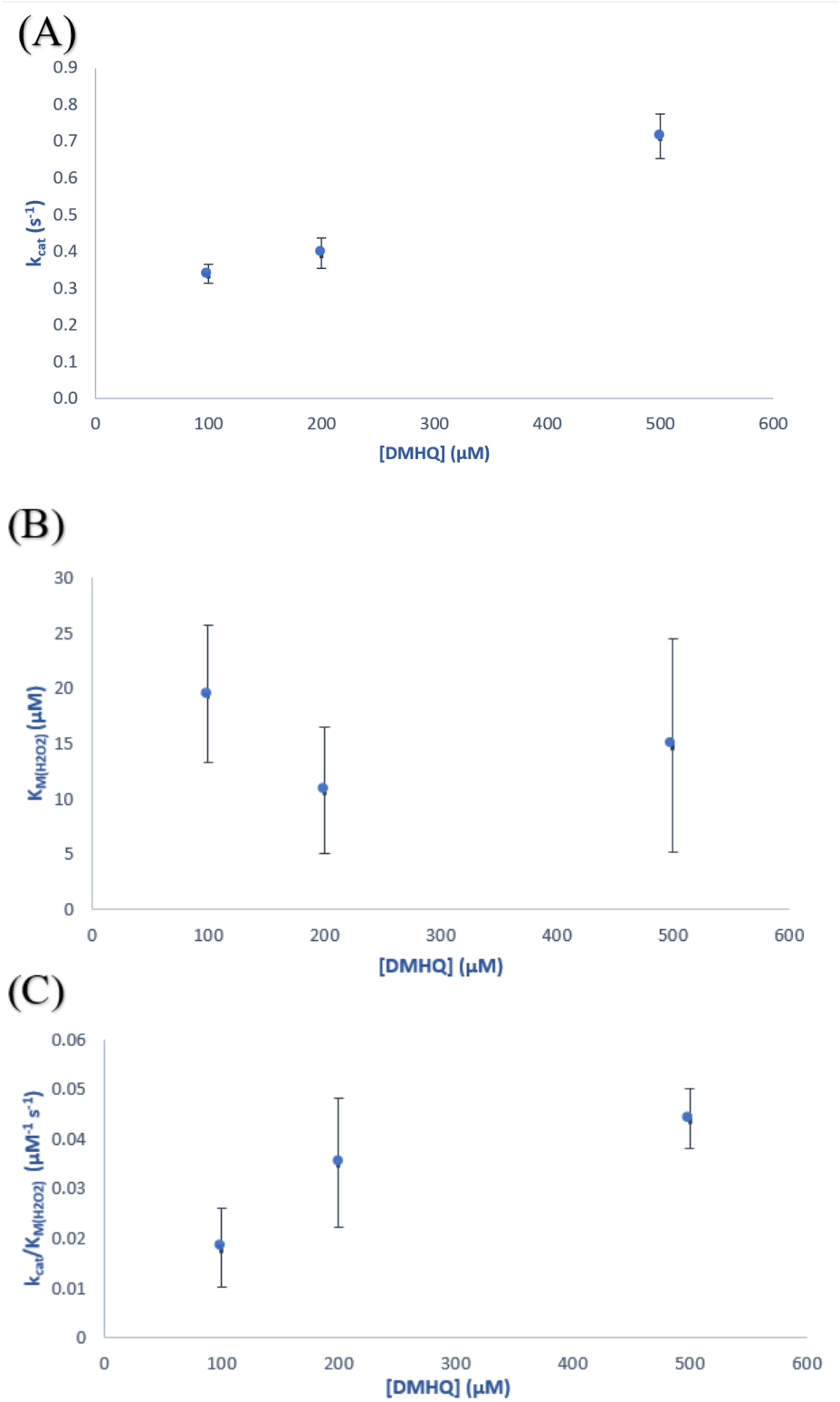
Võrrandis 9 on $[H_2O_2]$ reaktsioonikeskkonda teadlikult lisatud H_2O_2 kontsentratsioon ja $[H_2O_2]_{DMHQ}$ on DMHQ preparatsiooni valmistamise käigus sinna tahtmatult tekkinud H_2O_2 kontsentratsioon.

Tabel 2. Näiliste ensüümkineetika parameetrite väärtused mõõdetuna erinevatel DMHQ kontsentratsioonidel. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50mM, pH 5) 25°C juures

[DMHQ] (µM)	**k_{cat}^{app} (s^{-1})**	**$K_{M(H2O2)}^{app}$ (µM)**	**k_{cat}^{app}/ $K_{M(H2O2)}^{app}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)**	**[H_2O_2] (µM)**
100	0,35 ± 0,02	20 ± 9	0,018 ± 0,008	7 ± 4
200	0,38 ± 0,02	11 ± 4	0,035 ± 0,013	4 ± 2
500	0,65 ± 0,01	15 ± 2	0,042 ± 0,006	12 ± 2

Joonisel 7 on näidatud katseandmete lähendamine võrrandile 9 ja saadud parameetrite väärtused on toodud Tabelis 2. Näiliste ensüümkineetika parameetrite sõltuvus DMHQ kontsentratsioonist

on näidatud Joonisel 8. Kokkuvõtvalt võib öelda, et kuigi võrrand 9 kirjeldas katseandmeid piisavalt hästi, siis tulid $K_{M(H2O2)}$ väärtused suure veaga .



Joonis 8. Näiliste ensüümkineetika parameetrite (A) k_{cat}, (B)$K_{M(H2O2)}$ ja (C) $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ sõltuvus DMHQ kontsentratsioonist. Reaktsioonid viidi läbi NaAc puhvris (50 mM, pH 5) 25°C juures. Andmed on esitatud katsete keskväärtustena (n = 3, sõltumatud katsed) ja veatulbad näitavad standardhälvet.

2.4. Arutelu

Lignotselluloosi ensümaatilisel lagundamisel on üheks peamiseks kuluallikaks ensüümide kõrge hind. See on ka põhjuseks, miks stabiilsete ensüümide väljatöötamine on oluliseks väljakutseks. Kuna LPMOd inaktiveeruvad redutseerija peroksüdaasses reaktsioonis pöördumatult, siis on vajalik leida tingimusi või redutseerijaid, mille juures ensüüm oleks stabiilsem. Kõigepealt on aga vajalik inaktivatsiooni kineetika iseloomustamine.

Käesolevas töös saadud tulemuste alusel saame arvutada näilise inaktivatsiooni kiiruskonstandi (k_i^{app}). k_i^{app} on seotud redutseerija peroksüdaasse reaktsiooni kiiruskonstandiga (k_{cat}^{app}) vastavalt võrrandile 10, kus p_i on inaktivatsiooni tõenäosus (Kuusk ja Väljamäe, 2021).

$$k_i^{app} = k_{cat}^{app} \times p_i \qquad \text{(võrrand 10)}$$

Üks *Tr*AA9A molekul oli võimeline maksimaalselt 100 ± 11 DMHQ molekuli oksüdeerimist ehk ligikaudu 100 redutseerija peroksüdaasset reaktsiooni (Joonis 5). Teades maksimaalset peroksüdaassete reaktsioonide arvu, saame $p_i = \frac{1}{100}$ ehk inaktivatsiooni tõenäosus on 0,01 ± 0,0011.

Teades, et DMHQ oksüdeerimise k_{cat}^{app} = 0,65 s^{-1} (antud arutelu raames otsustasin kasutada 500 µM DMHQ juuresolekul saadud k_{cat}^{app} väärtust; Tabel 2), siis saame k_i^{app} = 0,65 s^{-1} × 0,01 = 0,0065 ± 0,0007 s^{-1}.

Parem suurus ensüümi stabiilsuse mõistmiseks on tema pooleluiga. Ensüümi pooleluiga $t_{\frac{1}{2}}$ on seotud inaktivatsiooni kiiruskonstandiga vastavalt võrrandile 11.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{ln2}{k_i^{app}} \qquad \text{(võrrand 11)}$$

Võrrandi 11 järgi on 500 µM DMHQ juuresolekul ja küllastaval H_2O_2 kontsentratsioonil $t_{\frac{1}{2}} = \frac{ln2}{0{,}0065\ s^{-1}}$ = 106 s. Tööstuslikul lignotselluloosi lagundamisel võiks ensüüm püsida mitu päeva stabiilne, kuid antud töö uuringu tingimustel on ensüümi pooleluiga kõigest alla 2 minuti. Selline tulemus näitab, et LPMO ebastabiilsus on oluline probleem, mida peaks lahendama.

Pooleluiga sõltub H_2O_2 kontsentratsioonist, mida madalam, seda suurem on pooleluiga. Tööstuslikes tingimusteks ei sobiks käesolevas töös kasutatud meetod, kus korraga lisatakse suur kogus/kontsentratsioon H_2O_2, kuna LPMO-de inaktivatsioon on sellistel tingimustel tugev. Optimaalne lahendus sellele oleks H_2O_2 kontsentratsiooni hoidmine palju madalamal kui $K_{M(H2O2)}^{app}$ väärtus (Tabel 2). Kuna $K_{M(H2O2)}^{app}$ väärtused olid suurusjärgus 10 µM (Tabel 2), siis võiks sobilik vesinik peroksiidi kontsentratsioon jääda alla 1 µM. Seda on võimalik saavutada

H_2O_2 väikeste osadena juurde lisamise teel või ensüümide kasutamisega, mis on võimelised *in situ* H_2O_2 genereerima (Kont *et al*., 2021).

Eeldades, et H_2O_2 kontsentratsioon võiks olla palju väiksem, kui $K_{M(H2O2)}$, siis lihtsustub Michaelis-Menteni võrrand (võrrandi 3) võrrandiks 12.

$$\frac{V_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app}}{K_{M(H_2O_2)}^{app}} \times [H_2O_2] \qquad \text{(võrrand 12)}$$

Võrrandist 12 näeme, et kiirus on määratud $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ poolt ja sõltub vesinik peroksiidi kontsentratsioonist lineaarselt.

*Tr*AA9A katalüüsitud tselluloosi peroksügenaasse reaktsiooni $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ on võrdne 290 000 M^{-1} s^{-1} ± 50 000 (Kuusk ja Väljamäe, 2021). Antud töös mõõdetud DMHQ peroksügenaasse reaktsiooni näiline $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ oli 42 000 M^{-1} s^{-1} (Tabel 2). Näiline $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ *Tr*AA9A inaktivatsiooni jaoks on leitav võrrandist 13.

$$\frac{k_i^{app}}{K_{M(H_2O_2)}} = \frac{k_{cat}^{app} \times p_i}{K_{M(H_2O_2)}} \qquad \text{(võrrand 13)}$$

Kasutades võrrandit 13 saame näiliseks $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ väärtuseks 420 M^{-1} s^{-1}. Võrreldes seda tselluloosi peroksügenaasse reaktsiooni $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ väärtusega näeme, et viimane toimub inaktivatsiooniga võrreldes ligikaudu 700 korda suurema efektiivsusega. Lisaks kaitseb tselluloos *Tr*AA9A-d inaktivatsiooni eest. Redutseerija peroksüdaasne reaktsiooni toimub ainult tselluloosi küljest vaba ensüümiga ja tselluloosile seostunud ensüüm on kaitstud. Seega on eeldatavad pooleluead tselluloosi juuresolekul pikemad

Oluliseks küsimuseks on ka see, et kas p_i sõltub redutseerijast? Kasutades redutseerijana askorbiinhapet leiti, et üks *Tr*AA9A molekul suutis katalüüsida 138 askorbiinhappe molekuli oksüdeerimist (Kuusk ja Väljamäe, 2021). See tulemus on sarnane antud töös mõõdetud väärtusega kasutades redutseerijana DMHQ. Küsimusele vastamiseks on vajalik rohkem andmeid erinevate redutseerijatega.

Kõige parem oleks leida redutseerija, mille puhul LPMO inaktivatsiooni üldse ei toimuks. Vaadates ping-pongi mehhanismile vastavat reaktsiooniskeemi (Skeem 4) siis näeme, et inaktivatsiooni etapp ei sõltu redutseerijast. See mehhanismi väldib samaaegset H_2O_2 ja redutseerija seostumist ensüümiga kompleksis. Redutseerija viib LPMO Cu(I) vormi ja edasine oksüdeerimine H_2O_2 toimel temast ei sõltu.

Lõpetuseks vaatame, kas DMHQ oksüdeerimine järgib ping-pong mehhanismi? Ping-pong mehhanismile on iseloomulik näilise k_{cat}/K_M sõltumatus teise substraadi kontsentratsioonist, ehk

siis näiline $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ peaks olema sõltumatu [DMHQ]-st (võrrand 6). Varem avaldatud *Tr*AA9A askorbiinhappe peroksüdaasse reaktsiooni puhul oli $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ sõltumatu askorbiinhappe kontsentratsioonist (Kuusk ja Väljamäe, 2021). Joonisel 8C toodud $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ sõltuvuse põhjal [DMHQ]-st on raske otsustada, kas DMHQ oksüdeerimine järgis ping-pong mehhanismi või mitte. Joonisel 8C on näha, et $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ on erineval DMHQ kontsentratsioonil erineva väärtusega. Antud töös probleemiks oli $K_{M(H2O2)}$ määramine, millel tuli suur viga (Tabel 2). See tuleneb sellest, et kasutatud DMHQ preparatsioon sisaldas sinna tekkinud H_2O_2-te.

Kuna DMHQ preparatsioonis olev H_2O_2 tekib sinna reaktsioonis õhuhapnikuga, siis oleks DMHQ peroksüdaasse reaktsiooni kineetika täpsemaks määramiseks vaja valmistada lahused ja teostada reaktsioonid hapnikuvabades tingimustes (Kadić *et al*., 2021).

KOKKUVÕTE

2017. aastal avastati, et LPMO-d on peroksügenaasid, mis oksüdeerivad polüsahhariide H_2O_2 juuresolekul. Kuna LPMO-d on puidubiokeemia seisukohast väga suure potentsiaalga ensüümid, on oluline põhjalikult uurida nende toimemehhanismi ja kineetikat. Käesolevas töös uuriti seenest *Trichoderma reesei* pärit LPMO-d *Tr*AA9A. See on tselluloosaktiivne LPMO, mille kineetikat on meie laboris varasemalt uuritud. On selgunud, et tselluloosi lagundamise reaktsiooni käigus võib lisaks põhireaktsioonile toimuda ka kõrvalreaktsioone. Antud töös kasutati *Tr*AA9A kõrvalreaktsioonide kineetiliseks iseloomustamiseks 2,6-dimetoksü hüdrokinoon (DMHQ) substraati ning produkti tekke mõõtmiseks spektrofotomeetrilist meetodit.

Tulemused näitasid, et *Tr*AA9A on võimeline oksüdeerima maksimaalselt 100 DMHQ molekuli ja seejärel inaktiveerub, seega inaktivatsiooni tõenäosus on 1%. Kasutades inaktivatsiooni kiiruskonstanti (0,0065 s^{-1}), saime ensüümi pooleeluea väärtuseks 106 sekundit, mis viitab ensüümi ebastabiilsusele. Antud töös mõõdetud DMHQ peroksügenaasse reaktsiooni näiline $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ väärtus on 42 000 M^{-1} s^{-1} ja *Tr*AA9A inaktivatsiooni näiline $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ väärtus on 420 M^{-1} s^{-1}. Võrreldes seda tselluloosi peroksügenaasse reaktsiooni $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ näilise väärtusega 290 000 M^{-1} s^{-1} näeme, et viimane toimub inaktivatsiooniga võrreldes ligikaudu 700 korda suurema efektiivsusega. Antud töö raames $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ sõltuvuse põhjal [DMHQ]-st ei õnnestunud tuvastada, kas DMHQ oksüdeerimine järgis ping-pong mehhanismi või mitte. Probleemiks oli $K_{M(H2O2)}$ määramine, millel tuli suur viga.

*Tr*AA9A toimemehhanismi ja kineetika täpsemaks kirjeldamiseks on vaja teha täpsustavaid uuringuid ja DMHQ peroksüdaasse reaktsiooni kineetika täpsemaks määramiseks vaja valmistada lahused ja teostada reaktsioonid hapnikuvabades tingimustes.

Characterization of *Trichoderma reesei* cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase *Tr*AA9A side reactions on 2,6-dimethoxy hydroquinone

Alisa Kamnerov

SUMMARY

The mechanism for producing first-generation liquid biofuels from food crops is well known, but since it is a widely used feedstock, a new production method needs to be developed. It was decided to pay more attention to cheaper and more affordable second-generation biofuels from lignocellulosic feedstocks. One of the components of lignocellulose is cellulose, which is a major component of plant cell membranes and the most abundant biopolymer on Earth. Due to its high distribution, cellulose is a potential source material for biofuel production.

Bacteria and fungi are the main degraders of cellulose in nature, and the lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) isolated from them play a major role in the degradation of cellulose. LPMO's are redox enzymes capable of degrading crystalline cellulose and providing access to other enzymes. The most thoroughly studied LPMO *Tr*AA9A has been isolated from the fungus *Trichoderma reesei*.

It has recently been discovered that LPMO's are capable to react with H_2O_2, which differs from the classical reaction with molecular oxygen, and has attracted interest in the study of reaction kinetics. Unfortunately, in addition to the main reaction, side reactions can occur during the cellulose degradation reaction. In this work, kinetic characterization of cellulose-active LPMO *Tr*AA9A side reactions was performed using substrate 2,6-dimethoxy hydroquinone (DMHQ) and spectrophotometric method to measure product formation.

The results showed that *Tr*AA9A was capable of oxidizing a maximum of 100 DMHQ molecules, with a 1% probability of inactivation. Using the inactivation rate constant (0.0065 s^{-1}), an enzyme half-life of 106 seconds was obtained, indicating enzyme instability. The apparent $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ value of the DMHQ peroxygenase reaction measured in this work is 42,000 M^{-1} s^{-1} and the apparent $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ value of *Tr*AA9A inactivation is 420 M^{-1} s^{-1}. Comparing this cellulose peroxygenase reaction with an apparent $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ value of 290,000 M^{-1} s^{-1} shows that the latter is approximately 700 times more efficient than inactivation. In this study, the dependence of $k_{cat}/K_{M(H2O2)}$ on [DMHQ] did not indicate whether the oxidation of DMHQ followed a ping-pong mechanism or not. The problem was the determination of $K_{M(H2O2)}$, which showed large deviation.

Further studies are required to better understand the mechanism of action and kinetics of *Tr*AA9A. In addition, solutions and reactions performed under conditions without O_2 are needed to further elucidate the kinetics of the DMHQ peroxidase reaction.

Kirjanduse loetelu

Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., ja Rovira, C. (2009). The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(33), 11751–11761. https://doi.org/10.1021/ja9018572

Béguin, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology*, *44*(1), 219–248.

Bissaro, B., Røhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., ja Eijsink, V. G. H. (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

Bortsova, O. A., Dubovitskaja, V. I., Vertebny, V. E., Homjakov, J. V., Panova, G. G., ja Galuško, A. S. (2018). [Hüdrolüütiliste ja monooksügenaastsellulaaside aktiivsuse dünaamika taimejääkide ja mullajäätmete segude kääritamise protsessis]. *Agrofüüsika*, *4*, 17–23.

Brigham, C. (2018). 3.22.3.2. Cellulose. In B. Török ja T. Dransfield (Eds.), *Green Chemistry* (pp. 753–770). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3

Brown Jr, R. M. (1996). The biosynthesis of cellulose. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, *33*(10), 1345–1373.

Calderaro, F., Bevers, L. E., ja van den Berg, M. A. (2021). Oxidative Power: Tools for Assessing LPMO Activity on Cellulose. *Biomolecules*, *11*(8), 1098. https://doi.org/10.3390/biom11081098

Chami Khazraji, A., ja Robert, S. (2013). Interaction Effects between Cellulose and Water in Nanocrystalline and Amorphous Regions: A Novel Approach Using Molecular Modeling. *Journal of Nanomaterials*, *2013*, 409676. https://doi.org/10.1155/2013/409676

Chylenski, P., Bissaro, B., Sørlie, M., Røhr, Å. K., Várnai, A., Horn, S. J., ja Eijsink, V. G. H. (2019). Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass. *ACS Catalysis*, *9*(6), 4970–4991. https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00246

Cleland, W. W. (1973). Derivation of rate equations for multisite ping-pong mechanisms with ping-pong reactions at one or more sites. *J. Biol. Chem*, *248*(24), 8353–8355.

Cornish-Bowden, A. (2013). *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley ja Sons.

Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B., ja Vaaje-Kolstad, G. (2019). On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 58. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0

Góth, L., Rass, P., ja Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*, *8*(3), 141–149. https://doi.org/10.1007/BF03260057

Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., ja Silva, R. N. (2016). The Post-genomic Era of Trichoderma reesei: What's Next? *Trends in Biotechnology*, *34*(12), 970–982. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003

Hansson, H., Karkehabadi, S., Mikkelsen, N., … ja Sandgren, M. (2017). High-resolution structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from Hypocrea jecorina reveals a predicted linker as an integral part of the catalytic domain. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(46), 19099–19109. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.799767

Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., … ja Lo Leggio, L. (2010). Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry*, *49*(15), 3305–3316. https://doi.org/10.1021/bi100009p

Hendriks, A., ja Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10–18.

Hill Jr, J. L., Hammudi, M. B., ja Tien, M. (2014). The Arabidopsis cellulose synthase complex: A proposed hexamer of CESA trimers in an equimolar stoichiometry. *The Plant Cell*, *26*(12), 4834–4842.

Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., ja Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, *315*(5813), 804–807. https://doi.org/10.1126/science.1137016

Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijsink, V. G. H., ja Horn, S. J. (2014). A C4-oxidizing Lytic Polysaccharide Monooxygenase Cleaving Both Cellulose and Cello-oligosaccharides *. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(5), 2632–2642. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530196

Jakovleva, G. E. (2005). *[Ensüümid kliinilises biokeemias]*. ЗАО «Вектор-Бест». https://docplayer.com/49584485-Fermenty-v-klinicheskoy-biohimii.html

Jensen, M. S., Klinkenberg, G., Bissaro, B., Chylenski, P., Vaaje-Kolstad, G., Kvitvang, H. F., Nærdal, G. K., Sletta, H., Forsberg, Z., ja Eijsink, V. G. H. (2019). Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase provides insights into substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(50), 19349–19364. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010056

Johnson, K. A., ja Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*, *50*(39), 8264–8269. https://doi.org/10.1021/bi201284u

Kadić, A., Várnai, A., Eijsink, V. G. H., Horn, S. J., ja Lidén, G. (2021). In situ measurements of oxidation–reduction potential and hydrogen peroxide concentration as tools for revealing LPMO inactivation during enzymatic saccharification of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1), 46. https://doi.org/10.1186/s13068-021-01894-1

Karkehabadi, S., Hansson, H., Kim, S., Piens, K., Mitchinson, C., ja Sandgren, M. (2008). The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from Hypocrea

jecorina, at 1.6 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, *383*(1), 144–154. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.016

Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, … ja Solomon, E. I. (2014). Spectroscopic and computational insight into the activation of O2 by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(24), 8797–8802. https://doi.org/10.1073/pnas.1408115111

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., ja Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, *44*(22), 3358–3393. https://doi.org/10.1002/anie.200460587

Kont, R., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H., ja Väljamäe, P. (2020). Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Nature Communications*, *11*(1), 5786. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19561-8

Kont, R., Pihlajaniemi, V., Niemelä, K., Kuusk, S., Marjamaa, K., ja Väljamäe, P. (2021). H2O2 in Liquid Fractions of Hydrothermally Pretreated Biomasses: Implications of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *ACS Sustainable Chemistry ja Engineering*, *9*(48), 16220–16231. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05491

Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G., ja Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, *352*(6289), 1098–1101.

Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H., Sørlie, M., ja Väljamäe, P. (2018). Kinetics of H2O2-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(2), 523–531. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817593

Kuusk, S., Kont, R., Kuusk, P., Heering, A., Sørlie, M., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H., ja Väljamäe, P. (2019). Kinetic insights into the role of the reductant in H2O2-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(5), 1516–1528. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006196

Kuusk, S., ja Väljamäe, P. (2021). Kinetics of H2O2-driven catalysis by a lytic polysaccharide monooxygenase from the fungus Trichoderma reesei. *Journal of Biological Chemistry*, 101256. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101256

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., ja Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41

McDonald, J. E., Rooks, D. J., ja McCarthy, A. J. (2012). Chapter nineteen—Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms. In H. J. Gilbert (Ed.), *Cellulases* (Vol. 510, pp. 349–374). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7

Merino, S. T., ja Cherry, J. (2007). Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In L. Olsson (Ed.), *Biofuels* (pp. 95–120). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2007_066

Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Leggio, L. L., … ja Anthonsen, A. (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.

Rosenau, T., Potthast, A., ja Hell, J. (2018). *Cellulose science and technology: Chemistry, analysis, and applications*. John Wiley ja Sons.

Ross, P., Mayer, R., ja Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, *55*(1), 35–58.

Seiboth, B., Ivanova, C., ja Seidl-Seiboth, V. (2011). Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. In *Biofuel production-recent developments and prospects*. https://doi.org/10.5772/16848

Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., ja Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, *101*(6), 1570–1580. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046

Song, B., Li, B., Wang, X., Shen, W., Park, S., Collings, C., Feng, A., Smith, S. J., Walton, J. D., ja Ding, S.-Y. (2018). Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 41. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1023-1

Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J. S., Bissaro, B., ja Eijsink, V. G. (2017). Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, *44*, 67–76. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012

Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørlie, M., ja Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, *330*(6001), 219–222. https://doi.org/10.1126/science.1192231

Wood, T. M., ja Garcia-Campayo, V. (1990). Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, *1*(2), 147–161. https://doi.org/10.1007/BF00058833

Zaitseva, A. S., Turovskaja, A. D., Grišhaeva, A. R., Šiškareva, E. I., ja Arljapov, V. A. (2016). [Pärmi Debaryamyces hansenii ja bakteri Gluconobacter oxydans elektrontranspordi redutseerimiskineetika glükoosi juuresolekul]. *Tula State University. Natural Sciences*, *4*, 51–63.

Zugenmaier, P. (2008). *Crystalline cellulose and cellulose derivatives: Characterization and structures*. Springer.

Kasutatud veebiaadressid

1) http://www.cazy.org/ [viimati külastatud 24.05.2021]
2) https://www.sigmaaldrich.com/EE/en/product/aldrich/565032 [viimati külastatud 24.05.2021]

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, ALISA KAMNEROV,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„*Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariidi monooksügenaasi *Tr*AA9A kõrvalreaktsioonide iseloomustamine“,

mille juhendaja on SILJA KUUSK,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Alisa Kamnerov

26.05.2022