

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Ragnar Viikoja

**B-GLÜKOSIDAASI TRANSGLÜKOSÜLEERIMISE PRODUKTIDE
MÕJU TSELLULAAS CEL7A AKTIIVSUSELE**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Riin Kont, MSc

Priit Väljamäe, PhD

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 TSELLULOOS JA TSELLULOOSI LAGUNDAMINE	5
1.1.1 <i>Tselluloos</i>	5
1.1.2 <i>Tselluloosi lagundamine</i>	6
1.2 B-GLÜKOSIDAASID	7
1.2.1 <i>β-glükosidaaside roll tselluloosi lagundamisel</i>	7
1.2.2 <i>Tööstuses kasutatavad β-glükosidaasid</i>	9
1.3 TRANSLÜKOSÜLEERIMINE	9
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	13
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	13
2.2 MATERJALID JA ENSÜÜMID	13
2.3 METOODIKA	13
2.3.1 <i>Transglükosüleerimisreaktsiooni läbiviimine</i>	13
2.3.2 <i>Transglükosüleerimise produkti analüüs ja puhastamine</i>	14
2.3.3 <i>Transglükosüleerimise produkti kontsentratsiooni määramine redutseerivate</i> <i>gruppide sisalduse alusel</i>	14
2.3.4 <i>Ensüümide HjeCel7A ja AtCel7A inhibitsioon transglükosüleerimise produkti ja</i> <i>tsellobioosi poolt MUL substraadil</i>	14
2.3.5 <i>Transglükosüleerimise produkti inhibitsioonitüübi määramine HjeCel7A suhtes</i> 15	
2.4 TULEMUSED JA ARUTELU	16
2.4.1 <i>Transglükosüleerimise produkti valmistamine ja lahutamine reaktsioonisegust</i> .	16
2.4.2 <i>Transglükosüleerimise produkti inhibitsiooni määramine ensüümile Cel7A IC₅₀</i> <i>arvutamise teel</i>	18
KOKKUVÕTE.....	22
SUMMARY	23
KASUTATUD KIRJANDUS.....	25
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	28
LIHTLITSENTS.....	29

KASUTATUD LÜHENDID

A. niger – *Aspergillus niger*

A. thermophilum, *At* – *Acremonium thermophilum*

BCA – bitsinkoonhape

BG – β -glükosidaas

CBH – tsellobiohüdrolaas

GH – glükosiid hüdrolaas

H. jecorina, *Hje* – *Hypocrea jecorina*

HPLC-kõrgsurvevedelikkromatograafia

MUL – 4-metüül-umbelliferüül- β -laktosiid

pNPG – para-nitrofenüül- β -glükosiid (4-nitrophenyl β -lactoside)

SISSEJUHATUS

Üha kasvav energiavajadus ning naftavarude kahanemine on viinud huviorbiiti loodussõbraliku bioetanooli väljatöötamise. Viimasel aastakümnel on eriti jõudsalt arenenud ning suure tähelepanu all teise põlvkonna bioetanool, sest esimese põlvkonna bioetanooli tootmine, mis põhineb suhkruroo- ja maisipõhisel toorainel, konkureerib tugevalt toiduainetööstusega. Teise põlvkonna bioetanooli tootmine lähtub tselluloosest biomassist ja selle saab jagada kolmeks etapiks (Lynd et al., 2008). Esimese etapina toimub biomassi eeltötlus, mille käigus toimuvad ümberkorraldused taime rakukesta struktuuris, et suurendada järgnevas hüdrolyüsi etapis tselluloosi lagundamise efektiivsust. Tselluloosi hüdrolyüsi käigus vabanev glükoos fermenteeritakse viimases tootmisfaasis mikroorganismide (peamiselt *Saccharomyces cerevisiae*) elutegevuse käigus etanooliks. Tselluloosi hüdrolyüs viiakse läbi ensümaatilisel teel kasutades tselluloosi lagundavaid ensüüme – tsellulaase (Himmel et al., 2007). Tselluloosi keeruka struktuuri tõttu on tselluloosi täielikuks lagundamiseks vajalikud erineva toimemehhanismiga tsellulaasid. Endotsellulaasid vabastavad tselluloosi ahelast erineva pikkusega fragmente, mis on substraadiks tsellobiohüdrolaasidele. Tsellobiohüdrolaaside läbi viidud reaktsiooni tulemusel vabaneb tsellobioos mis on omakorda substraadiks β -glükosidaasidele. β -glükosidaasid viivad tselluloosi hüdrolyüsi lõpuni, vabastades glükoosi. Kuna tsellobioos on tsellobiohüdrolaasidele tugevaks inhibiitoriks on β -glükosidaasid olulise tähtsusega (Lynd et al., 2002). Töötades välja efektiivsemaid ensüümseguisid on võimalik teise põlvkonna bioetanooli tootmiskulusid vähendada (Himmel et al., 2007).

Lisaks on bioetanooli ökonoomsemaks tootmiseks otstarbekas viia ensümaatilist hüdrolyüsi läbi kõrge kuivaine sisalduse juures, millega paraku kaasneb tsellobioosi kontsentratsiooni kasv reaktsioonisegus. Paralleelselt tsellobioosi hüdrolyüsiga avaldub β -glükosidaasidel kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil ka transglükosüleerimisaktiivsus, mille toimumise põhjus on seni välja selgitamata (Teugjas ja Väljamäe, 2013b). Transglükosüleerimisel tekib peamise produktina trisahhariid, mis võib sarnaselt tsellobioosile tsellobiohüdrolaase inhibeerida (Bohlin et al., 2012).

Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada, kas kõrgel substraadi kontsentratsioonil sünteesitud transglükosüleerimise produktid inhibeerivad vahetult tselluloosi hüdrolyüsi võtmeensüümi tsellobiohüdrolaasi Cel7A.

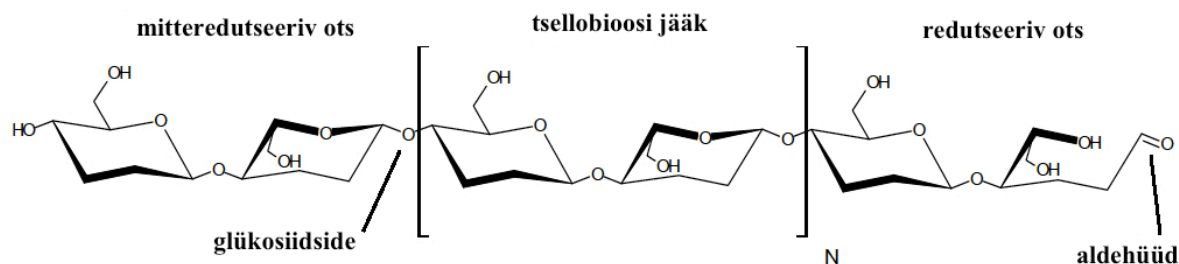
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Tselluloos ja tselluloosi lagundamine

1.1.1 Tselluloos

Tselluloos on looduses kõige laiemalt levinud biopolümeer. Peamised tselluloosi produtseerijad on taimed ja vetikad, kuid seda suudavad sünteesida ka mõned loomad (näiteks mantelloomad) ja bakterid (näiteks *Acetobacter xylinum*) (Hon, 1994). Tselluloos on põhiline taimede rakuseina koostisosa, andes sellele iseloomuliku kuju ja tugevuse. Erinevalt tähtsusest, mis täidab taimes varuallika funktsiooni, on taimede rakuseinas paikneval tselluloosil peamiselt struktuurne ülesanne (Lynd et al., 2002). Taimede rakukesta koostises moodustab tselluloos teiste taimsete polümeeride: ligniini ja hemitselluloosiga keerulise, läbipõimunud maatriksi (Lynd et al., 2002). Tselluloosi funktsioon bakterites pole aga täpselt teada, kuid arvatakse, et osad bakterid toodavad tselluloosi kaitseks üleliigse UV kiirguse eest, aeroobsed bakterid kasutavad ka toodetud tselluloosi mati moodustamiseks, et püsida vedelik-õhk piirpinnal (Iguchi et al., 2000).

Tselluloos on homopolümeer, koosnedes β -1,4-glükosiidse sidemega ühendatud glükoosi jääkidest. Iga järgnev glükoosi jääk tselluloosi ahelas on eelmise suhtes 180 kraadise nurga all, mistõttu on tselluloosis väikseim korduv ühik mitte glükoos, vaid tsellobioos (joonis 1) (Atalla, 1990). Ahelate otstes paiknevad glükoosijäägid on teineteise suhtes keemiliselt erinevad, mistõttu eristatakse tselluloosi ahela redutseerivat ja mitteredusteerivat otsa. Redutseerivas otsas esineb taskaal tsüklilise poolatsetaalse vormi ja lineaarse aldehüüdse vormi vahel, mitteredutseeriva otsa moodustav glükoosijääk on alati tsüklilises vormis (Brown ja Saxena, 2000). Tselluloosi ahelad interakteeruvad omavahel van der Waalsi jõudude ja vesiniksidemete vahendusel ning moodustavad kõrgemat järku struktuure. Tselluloosi ahelad on lineaarsed ja sünteesimehhanismist tulenevalt omavahel paralleelselt paigutatud, mis võimaldab korrapäraste kristalliliste struktuuride moodustumist. Puhtalt kristallilisel kujul tselluloos taimede rakukestas siiski ei esine, vaid sisaldab ka amorfseid piirkondi, kus ahelate vaheline seondumine on nõrgem ja ahelate paiknemine seega ebakorrapärane (Lynd et al., 2002; Teeri, 1996).



joonis 1. Tselluloosi molekul koosneb β -1,4-glükosiidse sidemega ühendatud glükoosi jääkidest, mis on üksteise suhtes paigutatud 180 kraadise nurga alla ning seetõttu on tselluloosi ahela väikseim korduv ühik tsellobioos. Ahela otste keemilisest erinevusest tulenevalt eristatakse redutseerivat ja mitteredutseerivat otsa. Joonis on modifitseeritud kujul pärit Atalla, 1990 artiklist.

1.1.2 Tselluloosi lagundamine

Tselluloosi lagundavad peamiselt seened ja bakterid, kes toodavad ekstratsellulaarseid ensüüme – tsellulaase, et lagundada tselluloos endale metaboliseeritavaks ühendiks, glükoosiks. Enamik tänaseks kirjeldatud tsellulaasidest on glükosiid hüdrolaasid (GH). GH-d on grupp ensüüme, mis viivad läbi glükosiidse sideme hüdrolüüsi. GH-d on primaarstruktuuri sarnastuste alusel jagatud rohkem kui 130-ks perekonnaks (Henrissat et al., 1991). Tselluloosi keerulise struktuuri tõttu on selle efektiivseks hüdrolüüsiks vajalik erineva toimemehhanismiga tsellulaaside koostöö. Kõige suuremal hulgal toodavad tsellulolüütilised mikroorganismid tsellobiohüdrolaase (CBH) – eksoaktiivsusega ensüüme, mis alustavad tselluloosi hüdrolüüsi ahela otsast. CBH-d lagundavad peamiselt tselluloosi kristallilisi piirkondi ning vabastavad hüdrolüüsiproduktina tsellobioosi (Lynd et al., 2002). Väheemas koguses toodetakse endoglükanaase, mis teevad katkeid juhuslikesse positsioonidesse tselluloosi ahelas ning tekitavad uusi ahela otsi CBH-dele (Lynd et al., 2002; Teeri, 1996). Kolmas grupp ensüüme tselluloosi hüdrolüüsil on β -glükosidaasid (BG), mis viivad tselluloosi hüdrolüüsi lõpuni, katalüüsides endoglükanaaside ja CBH-de vabastatud tsellodekstriinide ja tsellobioosi hüdrolüüsi glükoosiks (Lynd et al., 2002; Teeri, 1996). Lisaks hüdrolüütilistele tsellulaasidele on hetkel kõrgendatud tähelepanu all hiljuti avastatud oksüdatiivsed tsellulaasid. Oksüdatiivsed tsellulaasid võimendavad klassikaliste tsellulaaside aktiivsust kristallilisel tselluloosil ning on näidatud, et nad osalevad ka tsellooligosahhariidide ja hemitselluloosi lagundamisel (Agger et al., 2014).

1.1.2.1 *Hypocrea jecorina* Cel7A

Kõige põhjalikumalt uuritud tsellulolüütiline organism on pehmemädanik seen *Hypocrea jecorina* (*H. jecorina*) (anamorf *Trichoderma reesei*). Ta sünteesib tselluloosi hüdrolyüsiks kahte CBH-d (Cel7A ja Cel6A), nelja endoglükanaasi (Cel7B, Cel5A, Cel12A ja Cel45A) ja kahte β -glükosidaasi (Cel1A ja Cel3A) (Zhang ja Lynd, 2004).

Kõige suuremal hulgal toodab *H. jecorina* CBH-d Cel7A (*HjeCel7A*), mis moodustab toodetud tsellulaaside hulgast ligikaudu 60 % (Zhang ja Lynd, 2004). Enamik tsellulaase on bimodulaarse ehitusega, koosnedes katalüütilisest ja tselluloosile seondumise domeenist. Need kaks domeeni on omavahel ühendatud peptiidse linkeri kaudu. *HjeCel7A* katalüütiline domeen koosneb kahest antiparalleelsete β -lehtede kihist, millest ulatuvad välja neli lingu, mis moodustavad tunnelikujulise ensüümi aktiivtsentri. Aktiivtsenter mahutab 10 järjestikust glükoosijääki tselluloosiahelast ning katalüüs toimub tunneli ühes otsas. Hüdrolyüsi tulemusel vabaneb produkt (peamiselt tsellobioos) tselluloosi ahela redutseerivast otsast (Divne et al., 1998; Rabinovich et al., 2002; Ståhlberg et al., 1996)

HjeCel7A ja teiste perekond 7 CBH-de puhul on näidatud reaktsioonikeskkonda tekkiva tsellobioosi inhibeerivat mõju nende aktiivusele. Tsellobioos seondub peamiselt ensüümi aktiivtsentri +1; +2 glükoosiühiku seondumiskohtadesse ning takistab tselluloosiahela edasist hüdrolyüsi (Murphy et al., 2013).

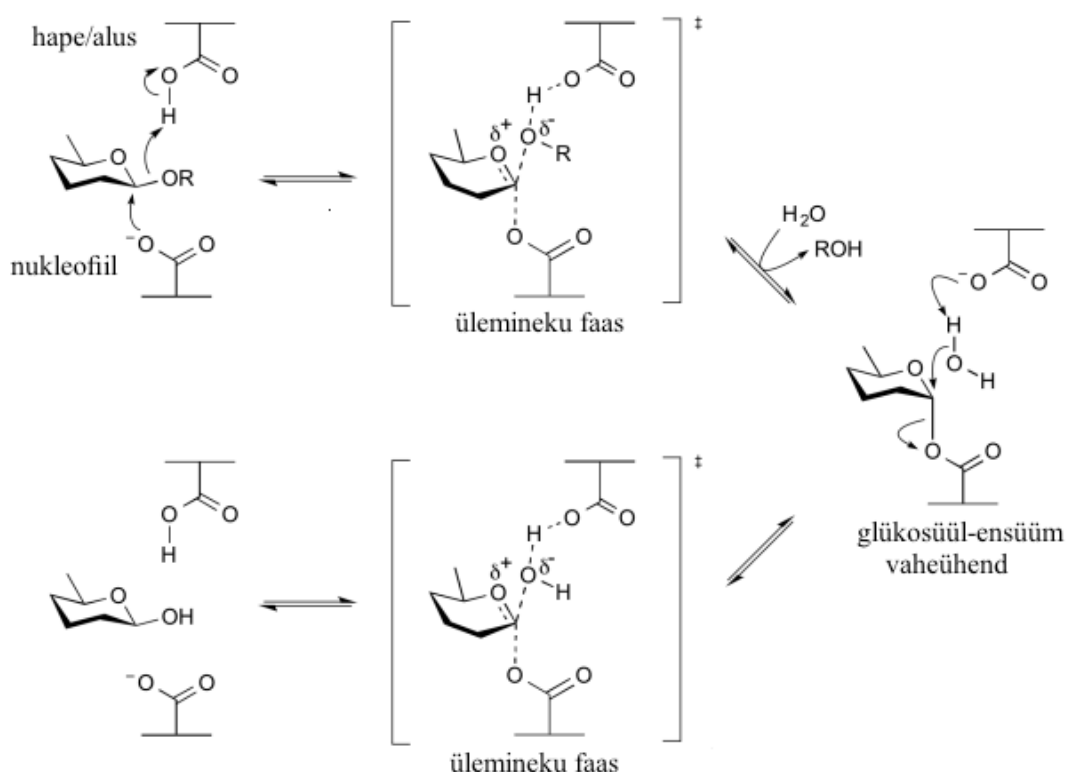
1.2 β -glükosidaasid

1.2.1 β -glükosidaaside roll tselluloosi lagundamisel

Mikroorganismid ekstratsellulaarsed BG-d lagundavad tsellobioosi kaheks glükoosiks, mida mikroorganismid on võimelised edasi kataboliseerima. Taimedes osalevad BG-d β -glükaani sünteesis rakukesta arengul, pigmentide metabolismis ja viljade valmimises ning imetajates glükosüülkeramiidide hüdrolyüsil (Singhania et al., 2013). Enamus mikroorganismide sünteesitud BG-d kuuluvad GH-e perekondadesse 1, 3, 9, 30 ja 116. Tselluloosi hüdrolyüsil osalevad BG-d kuuluvad enamasti perekondadesse 1 ja 3 (Cantarel et al., 2009; Henrissat et al., 1991).

Katalüüsi stereokeemia alusel jagatakse tsellulaasid kas konfiguratsiooni retentsiooni või inversiooniga töötavateks ensüümideks. Perekondade 1 ja 3 BG-d kasutavad konfiguratsiooni retentsiooni mehhanismi (joonis 2). Sarnaselt enamikele tsellulaasidest tagavad BG-de hüdrolyütilise aktiivsuse peamiselt kaks aktiivtsentris paiknevat

karboksüülhape jääki, millest üks käitub kui nukleofiil ja teine vahendab hape/aluse katalüüsi. Reaktsiooni esimene aste algab glükosiidse sideme hapniku protoneerimisega ning nukleofiilse atakiga C₁ anomeersele süsinikule. Tulemuseks on glükosiidse sideme lagunemine ning ensüüm-glükosüül vaheühendi teke. Reaktsiooni teises astmes toimub ensüüm-glükosüül vaheühendi hüdrolüüs. Retentsiooni teel läbi viidava hüdrolüüsi tulemusel on vabanev produkt β -konfiguratsioonis (Davies ja Henrissat, 1995; Singhanian et al., 2013)



Joonis 2. BG-de vahendatud glükosiidse sideme hüdrolüüsi katalüüsi mehhanism. Glükosiidse sideme hüdrolüüs toimub konfiguratsiooni retentsiooniga. Tegemist on kaheastmelise reaktsiooniga, kus esimeses etapis atakeerib üks karboksüülhape (nukleofiil) substraadi anomeerset tsentrit, teine aga protoneerib glükosiidse sideme hapniku, mille tulemusel eemaldub aglükoon (ROH). Aglükooni eemaldamise tagajärjel tekib ensüüm-glükosüül vaheühend. Teises etapis atakeerib vee molekul aluskatalüüsitiliselt ensüüm-glükosüül vaheühendi anomeerset süsinikku, mille tagajärjel vabaneb β -glükooos. Joonis on pärit modifitseeritud kujul Cazy andmebaasist.

1.2.2 Tööstuses kasutatavad β -glükosidaasid

BG-del on teise põlvkonna bioetanooli tootmisel kaks olulist rolli:

- ✓ BG-d hüdrolyüsivad CBH-de ja endoglükanaaside vabastatud tsellobioosi glükoosiks ning aitavad sellega vähendada CBH-de produktinhibitsiooni (Murphy et al., 2013).
- ✓ Tsellobioosi hüdrolyüs glükoosiks on olulise tähtsusega, kuna peamine fermentatsiooni etapis kasutatav mikroorganism *Sahharomyces cerevisiae* kasutab vaid glükoosi (Galazka et al., 2010).

Tööstuslikult on suure tähtsusega mikroorganism *H. jecorina*, keda on põhjalikult uuritud alates 1950. aastast. Kõige enam kasutatakse tööstuslikes ensüümsegudes *H. jecorina* tsellulaase. *H. jecorina* peamiseks puuduseks on aga madal BG-de hulk, mistõttu on konstrueeritud suurema BG-de produktsiooniga *H. jecorina* tüvesid (Rahman et al., 2009). *H. jecorina* algseid promootoreid on homoloogilise rekombinatsiooni teel asendatud tõhusamate promootoritega ning asendatud tema BG-de geene nii *A. nigeri* kui ka teiste mikroorganismide BG geenidega. Nende muudatustega on saavutatud kordades suurema BG aktiivsusega tüvesid (Nakazawa et al., 2012; Rahman et al., 2009).

Kuna *Aspergillus niger* (*A. niger*) on looduses kõige efektiivsem BG-de tootja siis sisaldavad paljud kommertsiaalsed tselluloosi hüdrolyüsil kasutatavad ensüümsegud *A. nigeri* BG-d. Ta sünteesib GH-de 3. perekonda kuuluvat β -glükosidaasi. (Dan, 2000; Seidle ja Huber, 2005). Lisaks kasutatakse termostabiilseid BG-sid, mida toodavad termofiilsed mikroorganismid nagu: *Acremonium thermophilum*, *Thermoascus aurantiacus* ja *Penicillium brasilianum*. Nimetatud organismide BG-de optimaalne töötemperatuur jääb vahemikku 60°C – 80°C. Termostabiilsete ensüümide kasutamise eeliseks on nende kõrgem spetsiifiline aktiivsus, parem stabiilsus ja kiirem hüdrolyüsi aeg, mistõttu oleks võimalik alandada ensüümide kogust hüdrolyüsil. Lisaks aitab kõrgem temperatuur vähendada reaktsioonisegu saastumist teiste mikroorganismidega. (Anastasia ja Henning, 2013; Krogh et al., 2010; Tong et al., 1980).

1.3 Transglükosüleerimine

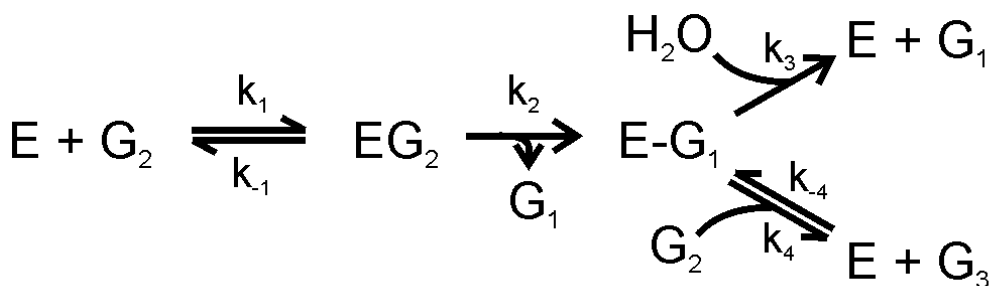
Lisaks glükosiidse sideme hüdrolyüsile on võimalik ka BG-de katalüüsiv glükosiidse sideme teke. Selleks on kaks võimalust. Esimene võimalus on glükosiidse sideme moodustumine termodünaamiliselt kontrollitud hüdrolyüsi pöördreaktsiooni käigus. Vastassuunalise reaktsiooni toimumise tasakaalu määrab ära tasakaalukonstant (K_{eq}). Kuna

tasakaaluolekus on Gibbsi energia (ΔG) (võrrand 1) võrdne 0-ga, siis asendades ΔG võrrandis 1, on võimalik ühendi moodustumise standartset vabaenergia muutu teades leida reaktsiooni tasakaalukonstant (võrrand 2).

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_{eq} = 0 \quad (\text{võrrand 1})$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{võrrand 2})$$

Glükosiidse sideme hüdrolyüsi ΔG° ligikaudu 15 kJ/mol ning võrrand 1 abil on võimalik leida keemilise reaktsiooni tasakaalukonstant, mis tsellobioosi hüdrolyüsile on 430. Saadud küllaltki suur tasakaalukonstandi väärtus viitab sellele, et tasakaal on nihutatud tugevasti hüdrolyüsi suunas ning vastassuunaliselt kulgeb reaktsioon ainult väga kõrgel glükoosi kontsentratsioonil.

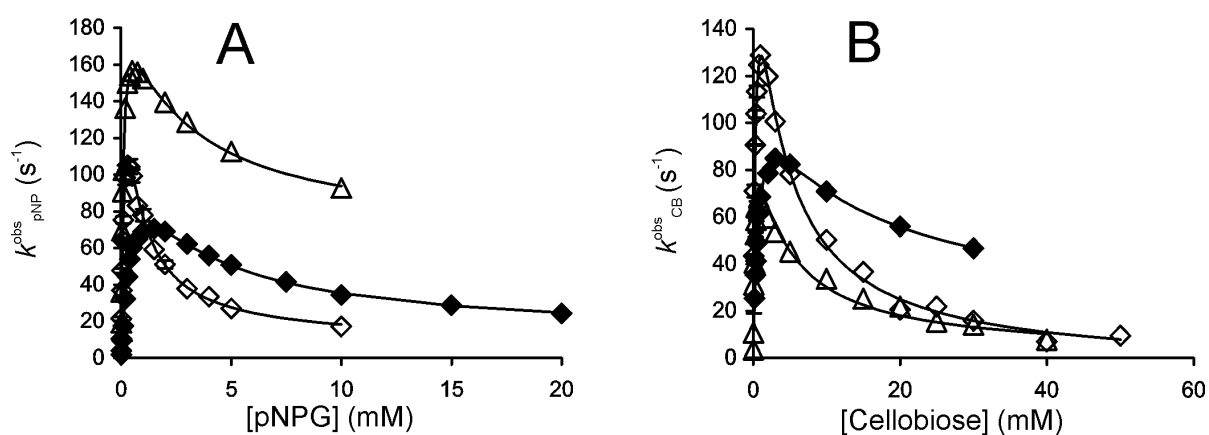


Joonis 3. BG-de katalüüsitud tsellobioosi lagundamine. Tsellobioos (G_2) seondub ensüümiga (E) ja moodustab Michaelise kompleksi. Järgmise etapina tekib glükosüül-ensüüm vaheühend ($E-G_1$) ja vabaneb üks glükoosi molekul (G_1). Hüdrolyüsi toimumisel on ensüüm-glükosüül vaheühendi aktseptoriks vee molekul ning moodustub glükoos (ülemine rada). Paralleelselt kulgeval transglükosüleerimisel on aktseptoriks tsellobioos. Reaktsiooni tulemusena moodustub trisahhariid (G_3) (alumine rada). Joonis on pärit artiklist Teugas ja Väljamäe, 2013.

Teine võimalus on kineetiliselt kontrollitud glükosiidse sideme moodustumine transglükosüleerimise käigus. Transglükosüleerimise käigus tekib esmalt retentsiooni mehhanismi kasutavate ensüümidele omane glükosüül-ensüüm vaheühend, teises etapis ei toimu aga vaheühendi liitmist vee molekulile vaid toimub liitmine aktseptorsuhkrule. Kui tsellobioosi hüdrolyüsi tulemusena tekib kaks glükoosimolekuli siis transglükosüleerimise tulemusena tekib kahest tsellobioosimolekulist üks glükoos ja üks trisahhariid (joonis 3). Transglükosüleerimise käigus on võimalik ka pikemate oligosahhariidide süntees. Näiteks kui aktseptoriks on juba varem sünteesitud trisahhariid, moodustub ensüüm-glükosüül vaheühendi lagunemisel tetrasahhariid. Transglükosüleerimine on kineetiliselt kontrollitud, mis tähendab, et lõpuks toimub transglükosüleerimise käigus sünteesitud oligosahhariidide hüdrolyüs glükoosiks (Bohlin et al., 2012; Rantwijk et al., 1999).

Transglükosüleerimise teel sünteesitud disahhariidide puhul on näidatud, et nad on induktoriks tsellulaaside transkriptsiooni aktivatsioonil. Näiteks *H. jecorina* puhul on näidatud, et tsellulaaside tootmine toimub vaid tselluloosi olemasolul seene elukeskkonnas. Tselluloosi puudumisel sünteesitakse ainult teatud tsellulaase (EG I ja Cel7A) väga madalas kontsentratsioonis (Suto ja Tomita, 2001). Kui keskkonnas ei ole kergesti omastatavaid suhkruid, siis substraadi "ilmumisel" keskkonda toimub tselluloosi lagundamisel vabanevast tsellobioosist transglükosüleerimise teel disahhariidsete induktorite süntees. Peamised kirjeldatud transglükosüleerimise teel moodustatud disahhariidsed induktorid on soforoos (glükosüül- β (1,2)-glükoos) ning gentiobioos (glükosüül- β (1,6)-glükoos) (Kurasawa et al., 1992; Mandels et al., 1961; Vaheri et al., 1978).

Enamike BG-de puhul on näidatud suurenenud transglükosüleerimisaktiivsust kõrgel substraadi kontsentratsioonil ($S \gg K_M$) (Bohlin et al., 2012). See avaldub kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel näilise substraatinhibitsioonina (joonis 4) (Bohlin et al., 2012; Teugjas ja Väljamäe, 2013b). Varasemalt pakuti hüdrolyütilise aktiivsuse languse põhjuseks lisaks ka otsest BG-de inhibitsiooni substraadile, samas ei ole sellele ühtegi eksperimentaalset tõestust (Riou et al., 1998). Bohlin et al. aga näitasid, et hüdrolyüsiga paralleelselt toimuv transglükosüleerimine on ainus põhjus hüdrolyüsi osakaalu vähenemisele kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil (Bohlin et al., 2012). Samas pole aga siiani uuritud substraadi kontsentratsiooni kasvuga kaasneva transglükosüleerimisreaktsiooni osakaalu suurenemise bioloogilist rolli.



Joonis 4. Para-nitrofenüül- β -glükosiidi (pNPG) ja tsellobioosi hüdrolyüs BG-dega. Kiiruskonstant pNPG (A) ja tsellobioosi (B) hüdrolyüsil BG-de *TaBG3* (\diamond), *AtBG3* (Δ) ja *N188BG* (\blacklozenge) poolt 25°C juures. Joonis on pärit artiklist Teugjas ja Väljamäe, 2013.

Esiteks võib olla tegu lihtsalt ensüümide kasutatava katalüüsi mehhanismiga kaasneva paratamatusega. Samas on aga näidatud, et sarnaste K_M väärtustega BG-de puhul varieerub substraadi kontsentratsioon, mis toob kaasa hüdrolüüsi osakaalu languse ja transglükosüleerimise osakaalu tõusu, mitme suurusjärgu ulatuses (Bohlin et al., 2012). Lisaks on leitud, et osadel BG-del, mis on lisaks ka glükoositolerantsed, ei esine näilist substraatinhibitsiooni isegi väga kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel (Pei et al., 2012). Toetudes toodud näidetele, võib öelda, et kõik BG-d ei käitu kõrgel substraadi kontsentratsioonil sarnaselt, mis omakorda paneb toodud väite õigsuses kahtlema.

Teiseks, kuna transglükosüleerimise rolli on näidatud tsellulaasi geenide regulatsioonis, täpsemalt disahhariidse induktori sünteesil tsellulaasi geenide transkriptsiooni aktivatsiooniks, võib oletada, et kõrgel substraadi kontsentratsioonil – olukorras, kus seenel on toitu piisavalt – inhibeeritakse tsellulaaside aktiivsust samuti transglükosüleerimise produktide osalusel (Mandels ja Reese, 1960). Üheks võimaluseks on ensüümide aktiivsuse inhibeerimine geeni tasandil. Sel juhul peab transglükosüleerimise produkt sisenema esmalt transporteri kaudu rakku. Erinevatel seentel on näidatud kõrge afiinsusega oligosahharidide transporterite olemasolu. Selle kohta, kas neid ekspresseeritakse ka kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil, aga andmed puuduvad (Mandels ja Reese, 1960).

Kolmandaks võimaluseks on eelnevalt ekstratsellulaarsesse keskkonda sekreteeritud tsellulaaside vahetu inhibeerimine. Kuna transglükosüleerimisprodukti osakaal võrreldes tsellobioosiga on reaktsioonikeskkonnas märgatavalt madalam, peaks sünteesitud transglükosüleerimise produkt olema tsellulaasidele tsellobioosiga võrreldes märgatavalt tugevamaks inhibiitoriks.

Toodud andmetele toetudes plaanisimegi uurida, kas kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil BG-de sünteesitud transglükosüleerimise produkt inhibeerib ekstratsellulaarsete tsellulaaside aktiivsust tugevamini kui tsellobioos (Bohlin et al., 2012; Teugjas ja Väljamäe, 2013).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Minu bakalaureusetöö eesmärk oli välja selgitada, kas kõrgel substraadi kontsentratsioonil moodustuv BG-de transglükosüleerimisprodukt mõjub inhibeerivalt *Hypocrea jecorina* ja *Acremonium thermophilum* CBH-le Cel7A.

2.2 Materjalid ja ensüümid

BG *At*BG puhastas Hele Teugjas (Teugjas ja Väljamäe, 2013). Tsellobiohüdrolaas *Hje*Cel7A puhastas *H. jecorina* QM 9414 kultuurifiltraadist Priit Väljamäe vastavalt protokollidele (Hakansson et al, 1979; Kipper et al, 2005). Kultuurifiltraat, mis sisaldas ensüümi *At*Cel7A, saadi Terhi Puranen-i käest, Oü Roal (Rajamäki, Soome), *At*Cel7A puhastas Jürgen Jalak (Teugjas ja Väljamäe, 2013a). Glükoos, veise seerumi albumiin (BSA) ja madalmolekulaarsed mudelsubstraadid 4-metüül-umbelliferüül- β -laktosiid (MUL) ja para-nitrofenüül- β -laktosiid (pNPL) osteti Sigma- Aldrichist. Tsellobioos (puhtusega $\geq 99\%$) osteti Flukast.

2.3 Metoodika

2.3.1 Transglükosüleerimisreaktsiooni läbiviimine

Reaktsioon viidi läbi 50 mM naatriumatsetaat (NaAc) puhvril pH 5 juures, kuhu oli lisatud 0,1 g/l BSA-d, et vältida ensüümi mittespetsiifilist seondumist. Reaktsiooni lõppruumala oli 500 μ L ja reaktsioon viidi läbi 45°C juures. Tsellobioosi kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 100 mM. Reaktsioon käivitati ensüümi *At*BG lisamisega lõppkontsentratsioonil 10 nM ja peatati pärast 5 min, 30 min, 1 h või 2 h möödumist 100°C juures 20 min kuumutades.

2.3.2 Transglükosüleerimise produkti analüüs ja puhastamine

5 min, 30 min, 1 h ja 2 h jooksul moodustunud hüdrolüüsi ja transglükosüleerimise produktide hulga määrati kõrgsurvevedelikkromatograafiat (HPLC) kasutades. Selleks kasutati Aminex HPX – 87P (BioRad, 5 µm, 250 mm x 7,8 mm) kolonniga varustatud Prominex HPLC süsteemi (Shimadzu) ning kasutati RID-10A (Shimadzu) detektorit. RID-10A detekteerib molekule murdumisnäitaja alusel. Kolonni temperatuur oli 80°C, detektori temperatuur 60°C ja elueerimiseks kasutati vett voolukiirusel 0,6 ml/min. Reaktsioonisegude kolonnile süstimise koguseks oli 100 µl. Transglükosüleerimise produkti koguti retentsiooniajaga 9,5 - 10,5 minuti vahel ja säilitati -18°C juures enne kasutamist.

2.3.3 Transglükosüleerimise produkti kontsentratsiooni määramine redutseerivate gruppide sisalduse alusel

Kogutud transglükosüleerimise produkti kontsentratsioon määrati redutseerivate gruppide sisalduse alusel kasutades modifitseeritud bitsinkoonhappe (BCA) meetodit (Hakansson et al., 1979). Redutseerivate gruppide sisalduse määramiseks lisati 0,3 ml proovile 0,3 ml BCA reagenti. BCA reagent segati reagentidest A (vesilahus, mis sisaldas 1,94 g/l BCA; 54,28 g/l Na₂CO₃ ; 24,2 g/l Na₂HCO₃) ja B (vesilahus, mis sisaldas 1,25 g/l CuSO₄ x 5H₂O; 1,26 g/l L-Seriini) suhtes 1/1. Segu kuumutati 30 minutit 75°C juures ja jahtunud proovide neeldumine mõõdeti Shimadzu UV-1601 PC spektrofotomeetril 560 nm juures. Redutseerivate gruppide sisaldus määrati tsellobioosi (0 – 25 µM) kaliibri alusel. Katset viidi läbi kolmes korduses.

2.3.4 Ensüümide *HjeCel7A* ja *AtCel7A* inhibitsioon transglükosüleerimise produkti ja tsellobioosi poolt MUL substraadil.

Inhibitsioonitugevuste määramiseks mõõdeti MUL hüdrolüüsi algkiiruseid transglükosüleerimise produkti või tsellobioosi juuresolekul ja puudumisel. Reaktsiooni viidi läbi 50 mM NaAc puhvril pH 5 juures. Reaktsiooni lõppruumala oli 0,9 ml ja reaktsioon viidi läbi mikrotsentrifuugi topsides 25°C juures. Inhibiitori kontsentratsiooni varieeriti vahemikus

0 μM – 200 μM . MUL kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 5 μM . Reaktsioon käivitati Cel7A/BSA ensüümseguga. Cel7A ja BSA lõppkontsentratsioon oli reaktsioonisegus vastavalt 10 nM ja 0,1 g/l. Reaktsioon peatati 30 minuti möödudes reaktsiooni lõppmahust 1/10 osa (100 μl) 1 M ammooniumhüdrosiidi lisamisega. Vabanenud MU märke suhteline hulk detekteeriti fluorestsentsi mõõtmise teel kasutades Hitachi F-4500 fluorimeetrit ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 360 nm ja 450 nm. Määrati ka antud ensüümide tsellobioosi poolne inhibitsioon. Selleks viidi katset läbi analoogselt eelkirjeldatule, tsellobioosi kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0 – 200 μM . Katset teostati kolmes korduses.

2.3.5 Transglükosüleerimise produkti inhibitsioonitüübi määramine *HjeCel7A* suhtes

Inhibitsioonitüübi määramiseks kasutati pNPL substraati ja mõõdeti pNPL hüdrolüüsi algkiirusi transglükosüleerimise produkti ja tsellobioosi juuresolekul. Transglükosüleerimise produkti ja tsellobioosi kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0,015 – 1 mM. Reaktsioone viidi läbi 50 mM pH 5 NaAc puhvril (sisaldas BSA-d 0,1 g/l) 25°C juures 5 minutit. Reaktsioonid käivitati *HjeCel7A* (lõppkontsentratsioonis 0,5 μM) lisamisega ja peatati reaktsioonide lõppmahust 1/10 osa 1 M ammooniumhüdrosiidi lisamisega. Vabanenud pNP märke suhteline hulk määrati neeldumise alusel Shimadzu UV-1601 PC spektrofotomeetril 414 nm juures.

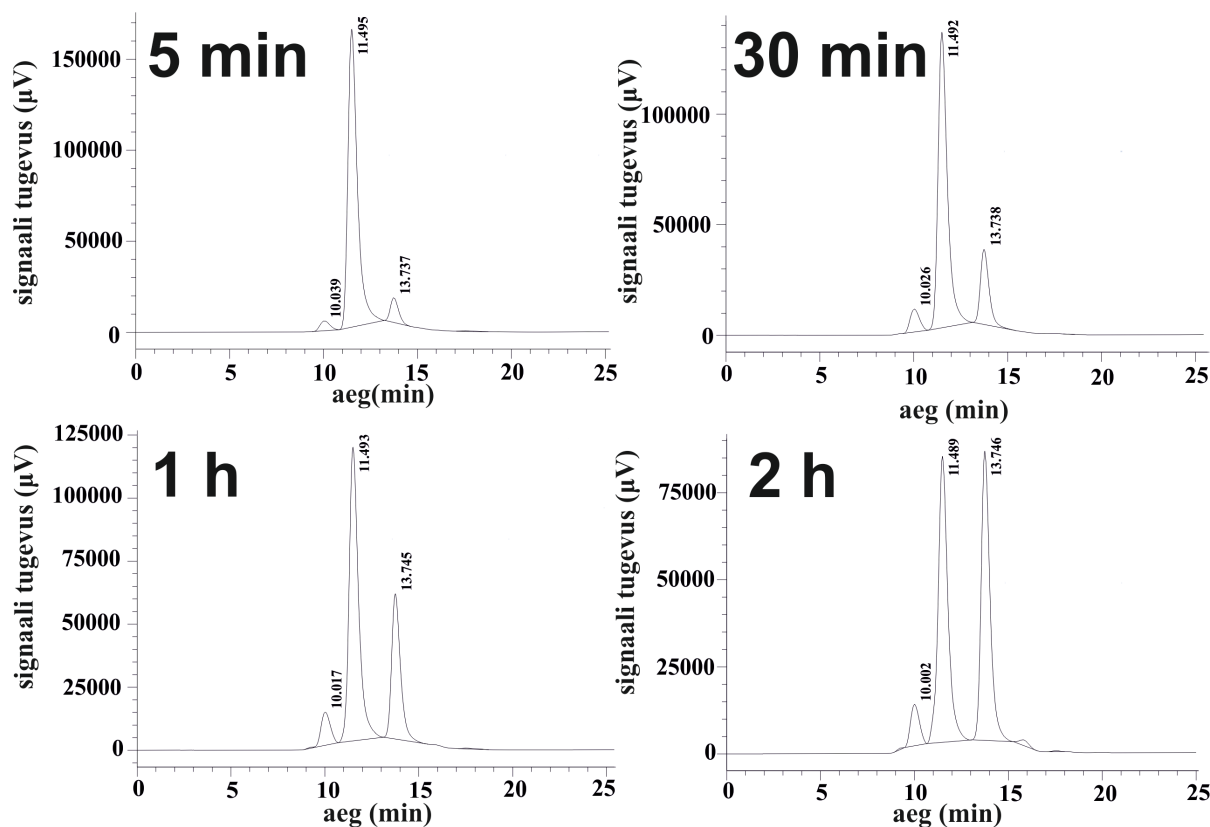
2.4 Tulemused ja arutelu

2.4.1 Transglükosüleerimise produkti valmistamine ja lahutamine reaktsioonisegust

Selleks, et määrata kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil toimuva transglükosüleerimise käigus moodustuvate transglükosüleerimise produktide inhibeerivat mõju ensüümile Cel7A, viidi esmalt läbi tsellobioosi töötlus ensüümiga *AtBG* kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil (100 mM) nelja erineva ajavahemiku jooksul (5 min, 30 min, 1 h, 2 h). Hüdrolüüsi ja transglükosüleerimise produktide osakaalu hindamiseks analüüsiti proove HPLC-l (joonis 5).

Joonisel 5 on toodud HPLC kromatogrammide erinevate ajapunktide kohta. Kaliibrite kaudu teame, et tsellobioos elueerub retentsiooniajaga $11,486 \pm 0,007$ min ja glükoosi retentsiooniaeg on $13,733 \pm 0,011$ min. Reaktsioonisegu lahutamisel HPLC-l on näha glükoosi ja tsellobioosi ees lisapiiki, retentsiooniajaga $10,015 \pm 0,017$ min, mis eeldatavasti vastab transglükosüleerimise produktile. Erinevate suhkrute protsendilist osakaalu väljendati kromatogrammidel olevate piikide pindalade alusel.

5 minutilise ensüümtötluse järel oli reaktsioonisegus transglükosüleerimise produkti osakaal suhteliselt madal (2,9 % kogusuhkrust). Ka tsellobioosi hulk ei olnud märkimisväärselt vähenenud ning moodustas 87,8 % kogusuhkrust. 5 minutiga ei olnud reaktsioonisegusse kogunenud ka suures koguses glükoosi, peamist hüdrolüüsi produkti. Glükoos moodustas vaid 6,2 % kogusuhkrust (joonis 5). 30. minutiks oli transglükosüleerimise produkti osakaal suurenenud 5,7 %-ni kogusuhkrust, samas oli ka märgatavalt tõusnud glükoosi osakaal, moodustades kogusuhkrust 17,3 %. Tsellobioosi osakaal oli 30. minutiks vähenenud 74,3 %-ni (joonis 5). 1 tunni möödudes oli glükoosi osakaal kasvanud 28,6 %-ni, moodustades ligikaudu pool reaktsioonisegusse jäänud tsellobioosist (62 %). Transglükosüleerimise produkt moodustas 1 tunni möödudes 6,8 % kogusuhkrust (joonis 5). 2 tunni möödudes olid moodustunud glükoosi ja lagundamata tsellobioosi osakaalud võrdsustunud: 43,3 % glükoosi ning 47 % tsellobioosi. Transglükosüleerimise produkti osakaal oli võrreldes 1 tunni kestnud reaktsiooniga aga vähenenud, moodustades 6,2 % kogusuhkrust (joonis 5). 2 tunni möödudes oli näha, et transglükosüleerimise produkti moodustumine on pidurdunud ning edasiseks uurimiseks ja transglükosüleerimise produkti preparatiivseks valmistamiseks otsustati kasutada 1 tund kestvat reaktsiooni.



Joonis 5. Transglükosüleerimisreaktsioon BG *AtBG*-ga. Reaktsiooni viidi läbi 45°C 50 mM NaAc puhvrts pH 5 juures, kuhu oli lisatud 0,1 g/l BSA-d. Tsellobioosi algkontsentratsioon oli 100 mM, *AtBG* kontsentratsioon oli 10 nM. Transglükosüleerimise osakaalu leidmiseks varieeriti reaktsiooni aega: 5 min (A), 30 min (B), 1 h (C) ja 2 h (D). Suhkrute standartitele vastavad retentsiooniajad on tsellobioosi puhul $11,49 \pm 0,007$ min ning glükoosi puhul $13,73 \pm 0,011$ min.

Eelneva analüütilise lahutamise käigus selgitati välja, et optimaalne reaktsiooniaeg transglükosüleerimise produkti moodustumiseks on 1 tund. Järgnevalt korrati transglükosüleerimisreaktsiooni meetodite osas kirjeldatud tingimustel suuremas mahus (1 ml). Reaktsioonisegu (1 ml) lahutati HPLC-l ja transglükosüleerimise produkti fraktsioon koguti retentsioonaja vahemikus 9,5 – 10,5 min. Reaktsioonisegu süstiti kolonnile 100 µl ning puhastati kahes korduses ning fraktsioonid liideti. Seejärel määrati transglükosüleerimise produkti sisaldavas fraktsioonis redutseerivate gruppide sisaldus, kasutades modifitseeritud BCA meetodit. Redutseerivate gruppide sisalduse alusel väljendasime transglükosüleerimise produkti kontsentratsiooni lahuses. 100 mM tsellobioosi baasil õnnestus 1 tunni jooksul sünteesida $3,35 \pm 0,33$ mM transglükosüleerimise produkt.

Eelnevalt on näidatud, et kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil toimuva transglükosüleerimise käigus moodustub kahest tsellobioosist üks glükoosi molekul ja üks trisahhariidi molekul (joonis 3) (Bohlin et al., 2012; Seidle ja Huber, 2005). Lisaks on näidatud, et *A. nigeri* BG3-e peamine transglükosüleerimise produkt on trisahhariid glükoos-β-1,6-glükoos-β-1,4-glükoos, mida tekib ligikaudu 75 % ulatuses kogu transglükosüleerimise

käigus sünteesitud produktidest. Vähemal määral tekib trisahhariidi glükoos- β -1,4-glükoos- β -1,4-glükoos ning mõningatel andmetel on nädatud lisaks veel gentiobioosi moodustumist (Bohlin et al., 2012; Seidle ja Huber, 2005). Kuna transglükosüleerimisreaktsioonist puhastatud produkti molekulaarset struktuuri ei iseloomustatud, siis ei saa kindlalt väita, et tegu on trisahhariidiga. Lähtudes aga varasemalt avaldatud tulemustest ning võrreldes tsellobioosiga transglükosüleerimise produkti varasemast retentsiooniajast (joonis 5), eeldati, et puhastatud transglükosüleerimise produkt on trisahhariid.

2.4.2 Transglükosüleerimise produkti inhibitsiooni määramine ensüümile Cel7A IC_{50} arvutamise teel

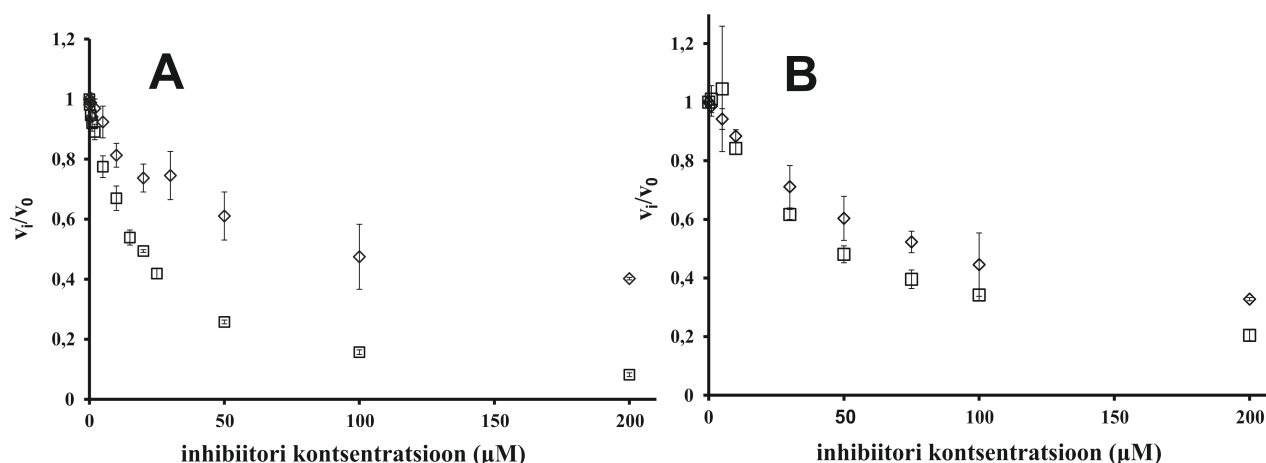
Transglükosüleerimise produkti inhibitsiooni CBH-le Cel7A uuriti kasutades madalmolekulaarseid substraate MUL ja pNPL. Inhibitsiooni tugevust kirjeldati antud töös IC_{50} väärtuse kaudu. IC_{50} väärtus vastab inhibiitori kontsentratsioonile, mis alandab reaktsiooni kiirust 50 %. IC_{50} väärtuse määramiseks varieeriti transglükosüleerimise produkti kontsentratsiooni vahemikus 0 – 200 μ M konstantsel MUL kontsentratsioonil (5 μ M). Referentsreaktsioonina viidi läbi MUL hüdroolüüsi inhibiitori puudumisel. Tulemused on esitatud graafikul v_i/v_0 versus inhibiitori kontsentratsioon. v_i/v_0 on reaktsiooni kiirus inhibiitori juuresolekul referentsreaktsiooni suhtes, mida väljendati mõõdetud fluorestsentsi intensiivsuste suhtena. Mõõtmistulemustega teostati mittelineaarne regressioon *Statistica* programmi kasutades lähtudes võrrandist 3. Regressioonanalüüsi tulemusena leiti K_i ja K_M väärtused mida kasutati järgnevalt IC_{50} väärtuse arvutamisel vastavalt võrrandile 4. Reaktsiooni tingimused olid valitud nii, et $[S] \ll K_M$ (HjeCel7A K_M MUL jaoks on ligikaudu 300 μ M), mistõttu muutub võrrandiliige $[S]/K_M$ tühiseks (võrrand 4) ja $IC_{50} \approx K_i$ (Teugjas ja Väljamäe, 2013b).

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{[S] + K_M}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (\text{võrrand 3})$$

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (\text{võrrand 4})$$

Esmalt uuriti transglükosüleerimise produkti inhibitsiooni CBH-le *HjeCel7A*, kuna *HjeCel7A* on enim uuritud ning peamine tööstuses kasutatav CBH. Transglükosüleerimise produkt inhibeeris CBH-d *HjeCel7A* IC_{50} väärtusega $84,6 \pm 6 \mu\text{M}$, samas kui IC_{50} väärtus tsellobioosi korral oli $18,2 \pm 1 \mu\text{M}$. Seega on transglükosüleerimise produkt ligikaudu 5 korda nõrgem *HjeCel7A* inhibiitor kui tsellobioos (joonis 6A).

Kuna transglükosüleerimisreaktsiooni viidi läbi kasutades *AtBG*-d, siis uuriti ka transglükosüleerimise produkti inhibitsiooni *AtCel7A* suhtes. Transglükosüleerimise produkt inhibeeris *AtCel7A* aktiivsust MUL substraadil IC_{50} väärtusega $81,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$. Võrreldes IC_{50} väärtusega tsellobioosi jaoks, mis leiti $51,4 \pm 1 \mu\text{M}$ ilmnes, et transglükosüleerimise produkt on *AtCel7A* jaoks tsellobioosiga võrreldes umbes 1,5 korda nõrgem inhibiitor (joonis 6B).

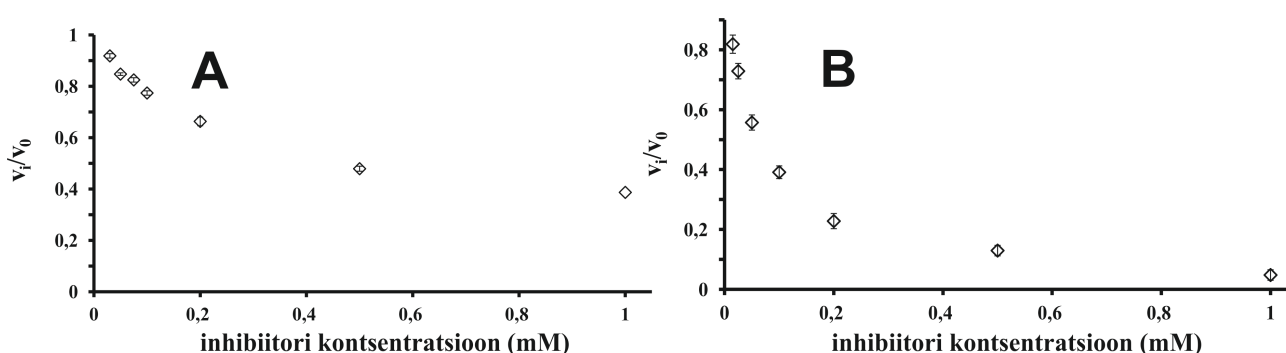


Joonis 6. Tsellobioosi ja transglükosüleerimise produkti inhibitsioon ensüümidele *AtCel7A* ja *HjeCel7A* MUL substraadil. A) CBH, *HjeCel7A*, ja B) CBH, *AtCel7A*. MUL hüdrolyüsi algkiirused mõõdeti inhibiitori puudumisel (v_0) ja inhibiitori juuresolekul (v_i). Inhibiitoriks oli tsellobioos (□) või transglükosüleerimise produkt (◇). Katsed teostati 25°C juures 50 mM pH 5 NaAc puhvrts, mis sisaldas 0,1 g/l BSA-d. Veajooned põhinevad kolmel paralleelsel mõõtmisel.

Kuna võrrandid 3 ja 4 kehtivad ainult konkurentse inhibitsiooni korral, otsustati kontrollida, kas transglükosüleerimise produkt on ensüümile Cel7A konkurentne inhibiitor. Selleks uuriti inhibitsiooni, lisaks eelnevale madalale substraadi kontsentratsioonile, ka kõrgel substraadi kontsentratsioonil. Kasutati 2 mM pNPL substraati (*HjeCel7A* K_M pNPL substraadil on 0,5 mM). Kui inhibitsioon on konkurentne siis võrrandist 4 on näha, et K_M -st kõrgem substraadi kontsentratsioon ($[S]$) suurendab IC_{50} väärtust. Ebakonkurentse inhibitsiooni korral kehtib IC_{50} väärtuse leidmiseks aga võrrand 5 ning selle puhul substraadi kontsentratsiooni tõstmine hoopis alandab IC_{50} väärtust.

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \quad (\text{võrrand 5})$$

Inhibitsioonitüübi määramiseks kasutati ensüümi *HjeCel7A*, sest inhibiitorite mõju sellele on tugevam kui *AtCel7A* puhul. Referentsina kasutati tsellobioosi inhibitsiooni määramist, mille puhul on varasemalt teada, et tegemist on konkurentse inhibiitoriga (Teugjas ja Väljamäe, 2013b). Transglükosüleerimise produkt inhibeeris *HjeCel7A* aktiivsust 2mM pNPL-il IC₅₀ väärtusega 390 ± 20 µM, mis on umbes 4,6 korda tugevam inhibitsioon kui 5 µM MUL substraadil. Referentsina kasutati inhibitsioonitüübi määramist tsellobioosile samadel tingimustel (joonis 7b). Tsellobioos inhibeeris CBH-d *HjeCel7A* IC₅₀ väärtusega 64 ± 5 µM, mis on 3,5 korda kõrgem kui 5 µM MUL substraadil. (joonis 7a). Kuna IC₅₀ väärtus substraadi kontsentratsiooni kasvades suurenes, võib lähtudes võrrandist 4 öelda, et transglükosüleerimise produkt on *HjeCel7A* konkurentne inhibiitor.



Joonis 7. Transglükosüleerimise produkti ja tsellobioosi inhibitsioon ensüümile *HjeCel7A* pNPL substraadil. pNPL (2mM) hüdrolüüsi algkiirused mõõdeti inhibiitori puudumisel (v_0) ja inhibiitori juuresolekul (v_i). Inhibiitoriks oli transglükosüleerimise produkt (A) või tsellobioos (B). Katsed teostati 25°C juures 50 mM pH 5 NaAc puhvris. Veajooned põhinevad kolmel paralleelsel mõõtmisel.

Sarnaselt tsellobioosile, inhibeeris transglükosüleerimise produkt CBH-d *AtCel7A* nõrgemini kui CBH-d *HjeCel7A*. Tsellobioos on aga üks tugevamaid seni uuritud CBH-de inhibiitoreid ning antud tööst selgus, et ka transglükosüleerimise produkt ei suuda ületada tsellobioosi inhibitsiooni tugevust (Murphy et al., 2013; Teugjas ja Väljamäe, 2013a). Seetõttu ei ole võrreldes tsellobioosiga transglükosüleerimise produkti roll olulisem vahetus *Cel7A* inhibitsioonis kõrgel tsellobioosi kontsentratsioonil. Siiski võib transglükosüleerimise produkti kogunemisel ja transglükosüleerimisaktiivsusel olla mõni muu, seni uurimata põhjus.

Üheks võimalikuks põhjuseks võib olla, et transglükosüleerimise produkt küll ei inhibeeriks CBH-sid *HjeCel7A* ja *AtCel7A*, kuid võib olla inhibiitoriks mõnele teisele tsellulaasile, mida kavatakse tulevikus edasi uurida.

Teise võimalusena ei saa ka välistada, et transglükosüleerimise produkt, sisenedes transporteri vahendusel rakku, inhibeerib tsellulaase geeni tasandil.

KOKKUVÕTE

Enda bakalaureuse töös uurisin *Acremonium thermophilum* β -glükosidaasi transglükosüleerimise produkti inhibeerivat mõju kahe organismi *Hypocrea jecorina* ja *Acremonium thermophilum*-i CBH Cel7A aktiivsusele.

Transglükosüleerimise produkt saadi inkubeerides tsellobioosi *A. thermophilum* BG-ga ning puhastati HPLC-l. Järgnevalt viidi läbi inhibitsiooni tugevuse määramine CBH-dele *HjeCel7A* ja *AtCel7A*. Inhibitsiooni tugevus määrati nii transglükosüleerimise produkti kui tsellobioosiga ning inhibitsiooni tugevust väljendati IC_{50} väärtuse kaudu. Esmalt otsustati määrata IC_{50} väärtus tööstuses kõige laiemalt kasutatavale *HjeCel7A* ensüümile, mida transglükosüleerimise produkt inhibeeris IC_{50} väärtusega $84,6 \pm 6 \mu\text{M}$ ning tsellobioos IC_{50} väärtusega $18,2 \pm 1 \mu\text{M}$. Seejärel näidati, et transglükosüleerimise produkt inhibeeris CBH-d *AtCel7A* IC_{50} väärtusega $81,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$, samas kui tsellobioos IC_{50} väärtusega $51,4 \pm 1 \mu\text{M}$. Seega oli transglükosüleerimise produkt *HjeCel7A* puhul 5 korda ja *AtCel7A* puhul 1,5 korda nõrgem inhibiitor kui tsellobioos, mis on üks tugevamaid seini kirjeldatud CBH-de inhibiitorid. Seejärel otsustati kontrollida ka inhibitsioonitüüpi, et teha kindlaks, kas tegemist on ikka konkurentse inhibitsiooniga. Inhibitsioonitüübi määramisel kasutati referentsina tsellobioosi inhibitsioonitüübi määramist, mille puhul on teada, et tegemist on CBH-dele konkurentse inhibiitoriga. Inhibitsioonitüübi määramisel selgus, et sarnaselt tsellobioosile on siiski ka transglükosüleerimise produkt *HjeCel7A* konkurentne inhibiitor.

Töös kasutati kahe mikroorganismi CBH-sid ning selgitati välja, et transglükosüleerimise produkt on uuritud CBH-dele palju nõrgem inhibiitor kui tsellobioos. Seega ei pidanud paika hüpotees, mille kohaselt on transglükosüleerimise produkti sünteesi bioloogiliseks rolliks tselluloosi hüdroolüüsi võtmeensüümi Cel7A inhibeerimine olukorras kus tselluloosi laguprodukti tsellobioosi on keskkonnas palju. Töö tulemus ei välista võimalust, et transglükosüleerimise produkt võiks olla tugev inhibiitor teistele tsellulaasidele ning seda plaanitakse tulevikus edasi uurida. Samuti võib transglükosüleerimise produktil olla hoopis inhibeeriv funktsioon geeni ekspressiooni tasandil. Transglükosüleerimisreaktsiooni toimimisel võib olla ka muid põhjuseid, mida antud töös ei käsitletud ning seega jääb ruumi edasiseks uurimistööks.

The impact of β -glucosidase transglycosylation products to the activity of cellulase Cel7A

Ragnar Viikoja

SUMMARY

Increasing need for fuels and decreasing amount of fossil fuels has led to a need for renewable and green energy source. Reasonable solution is 2nd generation bioethanol, where ethanol production is based on enzymatic hydrolysis of cellulose-based biowaste. 2nd generation bioethanol production is a three step process: pretreatment of biomass, hydrolysis of cellulose and fermentation of glucose to ethanol. The hydrolysis step is very important as full degradation of cellulose demands synergistic cooperation of different enzymes called cellulases. Cellulases, specially cellobiohydrolases (CBH), are known to be inhibited by their product, cellobiose and glucose. Cellobiose is a substrate for β -glucosidases (BG), which completes the cellulose hydrolysis by releasing glucose molecules and therefore helps to relieve the inhibition. At high substrate (cellobiose) concentration the hydrolysis of cellobiose is decreased and the reason for that is a parallel reaction called transglycosylation, where a product, trisaccharide, is formed.

In this study we analysed the impact of BG transglycosylation products to the activity of cellulases. We used CBH Cel7A from two different microorganisms: *Acremonium thermophilum* and *Hypocrea jecorina*. We proposed that transglycosylation product might be stronger CBH inhibitor than cellobiose.

Transglycosylation product was prepared by incubating cellobiose with *A. thermophilum* BG followed by the purification with HPLC. The strength of inhibition was evaluated by calculating IC_{50} values for both enzymes *At*Cel7A and *Hje*Cel7A. First we calculated the IC_{50} value of transglycosylation product for CBH *Hje*Cel7A, which is the most widely used enzyme in cellulose hydrolysis, and it was $84,6 \pm 6 \mu\text{M}$ whereas IC_{50} of cellobiose inhibition was $18,2 \pm 1 \mu\text{M}$ on methylumbelliferyl-lactoside (MUL) model substrate. Therefore, transglycosylation product was 4,6 times weaker inhibitor for *Hje*Cel7A than cellobiose. Transglycosylation product was also a weaker inhibitor than cellobiose for CBH *At*Cel7A acting on MUL, IC_{50} value was $81,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ whereas IC_{50} value of cellobiose was $51,4 \pm 1 \mu\text{M}$. Thus, transglycosylation product was about 1,5 times weaker inhibitor for *At*Cel7A than cellobiose, one of the most potent inhibitor of CBH-s described so far. We also tested the inhibition type of transglycosylation product for CBH. Results

confirmed that both transglycosylation product and cellobiose were competitive inhibitors for CBH.

These results rule out the inhibition of cellulose hydrolysis by Cel7A CBH-s as primary biological rationale for the production of transglycosylation product in the conditions of high cellobiose concentrations which is indicative to the surplus of cellulose hydrolysis products.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agger J. W., Isaksen T., Várnai A., Vidal-Melgosa S., Willats W. G. T., Ludwig R., Westereng B. (2014). **Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), 6287–6292.
- Anastasia P., Henning S. (2013). **Influence of high temperature and ethanol on thermostable lignocellulolytic enzymes.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(5), 447–456.
- Bohlin C., Praestgaard E., Baumann M. J., Borch K., Praestgaard J., Monrad R. N., Westh P. (2012). **A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 159–169.
- Brown Jr R. M., Saxena I. M. (2000). **Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 57–67.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009). **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), 233–238.
- Dan S. (2000). **Cloning, Expression, Characterization, and Nucleophile Identification of Family 3, *Aspergillus niger* beta -Glucosidase.** *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4973–4980.
- Divne C., Ståhlberg J., Teeri T. T., Jones T.A. (1998). **High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** *Journal of Molecular Biology*, 275(2), 309–325.
- Davies G., Henrissat B. (1995). **Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.** *Structure (London, England : 1993)*, 3(9), 853–859.
- Galazka J. M., Tian C., Beeson W. T., Martinez B., Glass N. L., Cate J. H. D. (2010). **Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production.** *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 84–86.
- Hakansson B. U. L. F., Fagerstam L. G., Pettersson L. G. (1979). **A 1, 4-p-Glucan Glucanohydrolase from the Cellulolytic Fungus *Trichoderma viride* QM 9414.** *Biochemistry*, 179, 141–149.
- Henrissat B., Vegetales M., Grenoble F. (1991). **A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid.** *Biochemistry*, 280, 309–316.
- Himmel M. E., Ding S.-Y., Johnson D. K., Adney W. S., Nimlos M. R., Brady J. W., Foust T. D. (2007). **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), 804–807.
- Hon D. N.-S. (1994). **Cellulose: a random walk along its historical path.** *Cellulose*, 1(1), 1–25.

- Kipper K., Väljamäe P., Johansson G. (2005). **Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as “burst” kinetics on fluorescent polymeric model substrates.** *The Biochemical Journal*, 385(Pt 2), 527–535.
- Krogh K. B. R. M., Harris P. V, Olsen C. L., Johansen K. S., Hojer-Pedersen J., Borjesson J., Olsson L. (2010). **Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-glucosidase from *Penicillium brasilianum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 143–154.
- Kurasawa T., Yachi M., Suto M., Kamagata Y., Takao S., Tomita F. (1992). **Induction of Cellulase by Gentiobiose and Its Sulfur-Containing Analog in *Penicillium purpurogenum*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 106–110.
- Lynd L. R., Laser M. S., Bransby D., Dale B. E., Davison B., Hamilton R., Wyman C. E. (2008). **How biotech can transform biofuels.** *Nature Biotechnology*, 26(2), 169–172.
- Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Isak S., Pretorius I. S. (2002). **Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology,** *Microbiology and molecular biology reviews* 66(3), 506-577.
- Iguchi M., Yamanaka S., Budhino A. (2000). **Bacterial cellulose — a masterpiece of nature’ s arts.** *Journal of Materials Science*, 35, 261–270.
- Mandels M., Parrish F. W., Reese E. T. (1961). **Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*.** *Journal of bacteriology*, 83(2), 400–408.
- Mandels M., Reese E. T. (1960). **Induction of cellulase in fungi by cellobiose.** *Journal of Bacteriology*, 79(6), 816–26.
- Murphy L., Bohlin C., Baumann M. J., Olsen S. N., Sørensen T. H., Anderson L., Westh P. (2013). **Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 163–169.
- Nakazawa H., Kawai T., Ida N., Shida Y., Kobayashi Y., Okada H., Ogasawara W. (2012). **Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion.** *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 92–99.
- Pei J., Pang Q., Zhao L., Fan S., Shi H. (2012). ***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase : a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose.** *Biotechnology for Biofuels*, 5(31), 1–10.
- Atalla R. H. (1990). **The Structures of Cellulose.** *The Structures of Cellulose*, 197, 89–98.
- Rabinovich M. L., Melnick M. S., Bolobova A. V. (2002). **The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes.** *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(8), 850–871.
- Rahman Z., Shida Y., Furukawa T., Suzuki Y., Okada H., Ogasawara W., Morikawa Y. (2009). **Application of *Trichoderma reesei* Cellulase and Xylanase Promoters through Homologous Recombination for Enhanced Production of Extracellular β -Glucosidase I.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5), 1083–1089.

- Rantwijk F. Van, Oosterom M. W., Sheldon R. A. (1999). **Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides.** *Journal of Molecular Catalysis*, 6, 511–532.
- Riou C., Salmon J. M., Vallier M. J., Günata Z., Barre P. (1998). **Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3607–3614.
- Seidle H. F., Huber R. E. (2005). **Transglucosidic reactions of the *Aspergillus niger* Family 3 -glucosidase: Qualitative and quantitative analyses and evidence that the transglucosidic rate is independent of pH.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(2), 254–264.
- Singhania R. R., Patel A. K., Sukumaran R. K., Larroche C., Pandey A. (2013). **Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production.** *Bioresource Technology*, 127, 500–507.
- Ståhlberg J., Divne C., Koivula A., Piens K., Claeysens M., Teeri T. T., Jones T. A. (1996). **Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** *Journal of Molecular Biology*, 264(2), 337–349.
- Suto M., Tomita F. (2001). **Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 305–311.
- Teeri T. T. (1996). **Crystalline cellulose degradation : new insight into the function of cellobiohydrolases G3.** *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167.
- Teugjas H., Väljamäe P. (2013a). **Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates.** *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 104–118.
- Teugjas H., Väljamäe P. (2013b). **Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification.** *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 105–118
- Tong C. C., Cole A. L., Shepherd M. G. (1980). **Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*.** *The Biochemical Journal*, 191(1), 83–94.
- Vaheri M., Leisola M., Kauppinen V. (1978). **Transglukosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei*.** *Biotechnology Letters*, 1(1), 41–46.
- Zhang Y.-H. P., Lynd L. R. (2004). **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolases

Lihthtsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ RAGNAR VIIKOJA _____,

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 20.08.1991 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthtsentsi) enda loodud teose

β -glükosidaaside transglükosüleerimise produktide mõju tsellulaas Cel7A aktiivsusele _____,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja(d) on _____ RIIN KONT , PRIIT VÄLJAMÄE _____,

(*juhendaja(te) nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihthtsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega

isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014 (*kuupäev*)