

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

***Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariidi monooksügenaasi *TrAA9A*  
toimemehhanismi kineetiline iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Alexander Rannar

Juhendajad: PhD Riin Kont

PhD Priit Väljamäe

TARTU 2020

## **Infoleht**

### ***Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariidi monooksügenaasi TrAA9A toimemehhanismi kineetiline iseloomustamine**

Hiljuti avastatud polüsahhariide lagundavad lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO-d) on redoksensüümid, mis katalüüsivad polüsahhariidses substraadis oksüdatiivseid lõikeid ning on võimelised lagundama kristallilist tselluloosi. LPMO-de rakendamine lignotselluloosse biomassi lagundamisel on tekitanud nende toimemehhanismi kirjeldamise vastu palju huvi ning 2017. aastal tehtud avastus, et tegu võib olla hoopis peroksügenaasidega tõstis jällegi nõudlust LPMO-de peroksügenaasse toimemehhanismi kineetika uurimiseks. Selles töös iseloomustati tselluloosaktiivse LPMO TrAA9A peroksügenaasset aktiivsust kasutades erinevaid mudelsubstraate ja mõõtes nii lahustuvaid kui ka mittelahustuvaidprodukte.

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

**CERCS:** P310; Proteiinid, ensümoloogia

### **Kinetic characterization of the mode of action of the *Trichoderma reesei* cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase TrAA9A**

Recently discovered crystalline polysaccharide degrading redox enzymes, lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), have generated considerable interest as components of lignocellulosic biomass degrading enzyme mixtures. Moreover, recent discoveries indicating LPMO's use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the preferred co-substrate has increased demand for kinetic characterization of the peroxygenase reaction of LPMOs. Here we characterize the peroxygenase activity of TrAA9A using different model substrates and by measuring both soluble- and insoluble reaction products.

**Keywords:** Hydrogen peroxide, lytic polysaccharide monooxygenase, *Trichoderma reesei*, cellulose-active, mode of action

**CERCS:** P310; Proteins, enzymology

## Sisukord

Infoleht.....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Tselluloos .....	6
1.2 Tselluloosi ensümaatilise lagundamine.....	7
1.2.1 Eksoglükanaasid.....	8
1.2.2 Endoglükanaasid.....	8
1.2.4 Oksüdüreduktaasid.....	9
1.2.5 Sünergism .....	9
1.3 LPMO .....	11
1.3.1 Levik looduses ja klassifikatsioon .....	12
1.3.2 LPMO struktuur .....	13
1.3.3 LPMO toimemehhanism.....	15
1.3.4 LPMO-de iseloomustamine .....	17
1.3.5 <i>TrAA9A</i> iseloomustus.....	18
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Substraadid.....	20
2.2.2 Ensüümid ja kasutatud reagentid .....	20
2.2.3 <i>TrAA9A</i> vasega küllastamine .....	21
2.2.4 AA-BMCC valmistamine.....	21
2.2.5 C1 lõigete määramine glükoonhappe testiga.....	22
2.2.6 C4 lõigete lahustuvate ja mittelahustvate redutseerivate otste määramine.....	23
2.2.7 <sup>14</sup> C-BMCC LPMO-ga lagundamine.....	24
2.3 Tulemused .....	25
2.3.1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sõltuv BMCC lagundamine .....	29
2.3.2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sõltuv AA-BMCC lagundamine .....	31
2.3.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sõltuv <sup>14</sup> C-BMCC lagundamine.....	34
2.4 Arutelu .....	35
Kokkuvõte .....	38
Summary .....	39
Kirjanduse loetelu .....	41
Kasutatud veebiaadressid.....	49
Lihtlitsents.....	50

## Kasutatud lühendid

<sup>14</sup>C-BMCC - <sup>14</sup>C-ga ühtlaselt märgistatud bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos

6-PGDH - 6-fosfoglükonaat dehüdrogenaas

AA - antraniilhape

AA-BMCC - redutseerivast otsast antraniilhappega derivatiseeritud bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos

AscA - askorbiinhape

BC - bakteriaalne tselluloos

BCA - bitsinkoniinhape

BG - β-glükosidaas

BMCC - bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos

CAZy - süsivesikaktiivsete ensüümide andmebaas

CB - tsellobioos

CBH - tsellobiohüdrolaas

DG - D-glükoonhape

DP - polümerisatsiooniaste

DTT - ditiotreitol

EDTA - etüleendiamiintetraetaanhape

EG - endoglükanaas

GCK - glükonaatkinaas

GH - glükosiidi hüdrolaas

Glceq - glükoosiekvivalent

IRG - mittelahustuvad redutseerivad otsad

LPMO - lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas

MBTH - 3-metüül-2-bensotiasolinoon hüdrasoon

*N. crassa* - *Neurospora crassa*

RGsol - lahustuvad redutseerivad otsad

*T. reesei* - *Trichoderma reesei*

## Sissejuhatus

Seoses kasvava nõudlusega jätkusuutlike ning loodussõbralike energiaallikate järele on kasvamas huvi biokütuste vastu. Bioetanool oleks üks potentsiaalne vastus nõudlusele ning mõnes riigis on see juba esimese generatsiooni bioetanooli kujul olemas. Siiski osutub probleemseks sellise bioetanooli lähtematerjal, nimelt suhkruroog, mais ja suhkrupeet. Kuna konkurents toiduainetööstusega kasutatava tooraine ja põllumaa üle tekitab küsimusi esimese generatsiooni bioetanooli jätkusuutlikuse suhtes, on hakatud üle minema teise generatsiooni biokütustele. Teise generatsiooni biokütused toodetakse lignotselluloosest biomassist, mis on laialdaselt kättesaadav ning odav (Aditiya *et al.*, 2016).

Kahjuks on lignotselluloosne biomass raskesti lagundatav ning lagundamise kõrge hind on tehnoloogia juurdumist raskendav. Siiski leidub looduses organisme, kes suudavad taimset biomassi edukalt lagundada ning tööstuslik lähenemine lignotselluloosse biomassi lagundamisele põhineb nende mikroorganismide ensüümide süsteemi kasutamisel (Coughlan ja Ljungdahl, 1988). Lignotselluloosse biomassi töötlemise protsess jaotub nelja põhietappi: eeltöötlus, hüdrolyüs, fermentatsioon ja destillatsioon (Aditiya *et al.*, 2016).

Hüdrolyüsi etapi läbiviimiseks on levinud lignotselluloosse biomassi lagundamine ensüümisegudega. Tõhusa ja säästliku hüdrolyüsi läbiviimiseks on vaja valmistada erinevatest ensüümidest koosnev ensüümisegu, mille komponendid võimendavad üksteise võimet lagundada tselluloosi sünergismi läbi (Henrissat *et al.*, 1985). 2010. aastal avastati uus ensüümide grupp, mis on võimelised oksüdeerides lagundama polüsahhariide (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO) on praeguseks veel väheuuritud vask-sõltuvad redoksensüümid. Hiljuti avastati ka LPMO-de võime kasutada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-e kosubstraadina, mis on O<sub>2</sub> mehhanismiga võrreldes märkimisväärselt tõhusam (Bissaro *et al.*, 2017; Kuusk *et al.*, 2018). LPMO-d omavad suurt potentsiaali ensüümisegude komponendina, kuid nende tõhususe tagamiseks tuleb LPMO-de toimemehhanismi ja kineetikat täpsemalt uurida.

Siinse töö eesmärk on iseloomustada *Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse LPMO TrAA9A toimemehhanismi kineetikat ensüümi poolt teostatud oksüdatiivsete lõigete alusel.

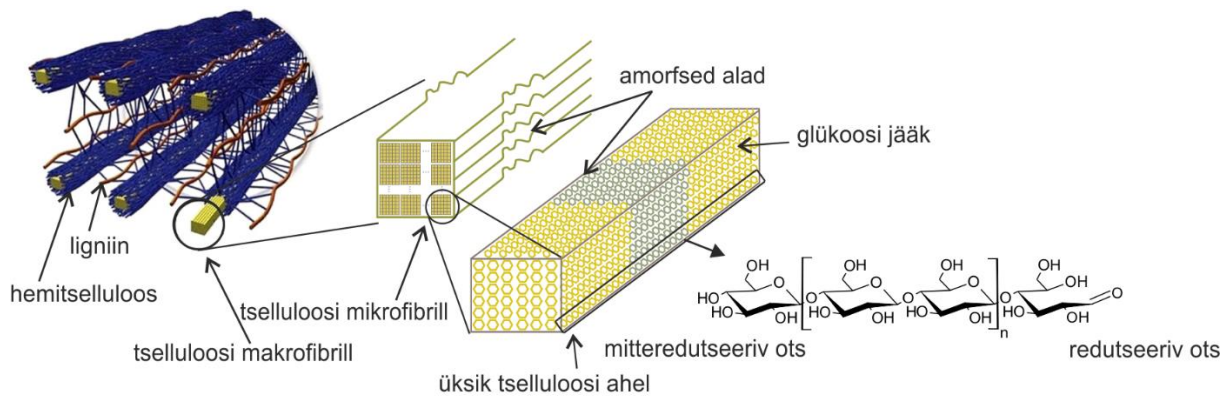
# 1 KIRJANDUSE ÜLEVADE

## 1.1 Tselluloos

Tselluloos on Maal levinuim orgaaniline polümeer. See on homopolümeer, mis koosneb  $\beta$ -1,4 glükosiidsete sidemetega ühendatud  $\beta$ -D-glükoosi jääkidest. Polümeeri korduv ühik on disahhariid tsellobioos (Kolpak ja Blackwell, 1976). Tselluloosi ahelad on lineaarsed ning omavad ühes otsas redutseerivat otsa ja teises mitteredutseerivat otsa. Tselluloosi sünteesivad nii soontaimed kui ka mitmed vetikad, osad bakterid ning loomad (McNamara *et al.*, 2015). Soontaimedes on tselluloosi süntees keskse tähtsusega. Taime rakkude plasmamembraanides leiduvad tselluloosi süntaasi kompleksid sünteesivad taime kasvuks ja arenguks vajalikku tselluloosi. Süntaasi kompleksid esinevad membraanidel kuue tselluloosi süntaasi trimeeri rosetina (Guerriero *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2014).

Tselluloosi tähtsus taime rakuseina komponendina tuleneb osaliselt selle võimest moodustada stabiilseid kristallilisi struktuure. Sünteesi käigus valminud ahelad moodustavad vesiniksidemete ja van der Waalsi jõudude abil esmalt mikrofibrille ning seejärel makrofibrillidest kristalle, mis koos hemitselluloosi ja ligniiniga moodustavad taime rakuseina maatriksi. Tselluloosi struktuuris leidub kõrge kristallilisusega ja ka lahtisema struktuuriga amorfseid alasid (Joonis 1) (Brown Jr, 1996; Guerriero *et al.*, 2010). Tselluloos esineb neljas põhilises kristallilises vormis; nimelt tselluloos I, II, III ja IV. Need vormid erinevad omavahel olenevalt erinevustest ahelate inter- ja intramolekulaarsete vesiniksidemete vahel. Põhiline looduses esinev tselluloos I esineb I $\alpha$  ja I $\beta$  vormides, millest I $\beta$  esineb rohkem taimedes ning I $\alpha$  rohkem bakterites ja vetikates (Kolpak ja Blackwell, 1976; Atalla ja Vanderhart, 1984; Hill *et al.*, 2014). Kuigi kristallilisus on vajalik tselluloosi sünteesivate organismide oluliste füsioloogiliste vajaduste tagamiseks on see omadus materjali lagundamist ning bioenergiaks kasutamist raskendav (Hill *et al.*, 2014).

Tselluloosi kui polümeeri omadused sõltuvad osaliselt ahelate keskmisest polümerisatsioonist (glükoosijääkide keskmisest arvust tselluloosi ahelas). On teada, et tselluloosi oligomeerid, mis on suurema polümerisatsioonistmega kui 6 – 8, ei ole enam vesikeskkonnas lahustuvad (Brown Jr, 1996). Sellest sõltuvalt tuleb tselluloosi uurides mõõta eraldi lahustuvat ja mittelahustuvat fraktsiooni.



**Joonis 1:** Skeemil on näha tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini maatriksit rakuseinas. Tselluloosi mikrofibrillid on pakitud makrofibrillideks, milles esineb madalama kristallilisusega amorfseid alasid. Mikrofibrillid koosnevad van der Waalsi jõudude ja vesiniksidemetega seotud tselluloosiahelatest. Tselluloosi lineaarne glükoosi jääkidest koosnev ahel omab üht redutseerivat ja teist mitteredutseerivat otsa. Joonis saadi Riin Konti käest ja kasutatakse tema loal (Velleste *et al.*, 2010).

## 1.2 Tselluloosi ensümaatilise lagundamine

Looduses tegelevad lignotselluloosse biomassi ja seega ka tselluloosi lagundamisega ennekõike seened ja bakterid (Wood ja Garcia-Campayo, 1990). Nende organismide võime lagundada kompleksseid polüsahhariide erinevate ensüümide abil on ka inspiratsiooniks tööstusliku lignotselluloosse biomassi lagundamise arengule. Tselluloosi lagundavaid mikroorganisme leidub paljudes keskkondades ning esineb suuri erinevusi aeroobsete ja anaeroobsete organismide tselluloosi lagundamise viisis. Näitseks kasutavad anaeroobsed mikroorganismid tselluloosi lagundamisel membraanseoselist tselluloosoomi kompleksi. Samas kasutavad aeroobid tselluloosi lagundamisel mittekomplekseerunud süsteeme, vabastades tsellulaase otse keskkonda (Coughlan ja Ljungdahl, 1988; Bayer *et al.*, 1998).

Sarnaselt looduslikele süsteemidele kasutatakse lignotselluloosse biomassi lagundamisel erinevaid ensüümisegusid. Kuigi kommertsiaalsete segude täpsed koostised pole avalikud on teada, et nende põhilised komponendid on tsellobiohüdrolaasid (CBH), endoglükanaasid (EG) ja  $\beta$ -glükosidaasid (BG), mis on CAZy andmebaasis jaotatud erinevatesse glükosiidi hüdrolaasi (GH) perekondadesse (Joonis 2) (Merino ja Cherry, 2007). Suur osa biomassi hüdrolyüsiks kasutatavatest ensüümidest on mesofiilse seene *Trichoderma reesei* produktid (Merino ja Cherry, 2007). Üldiselt jagatakse tsellulolüütilised ensüümid eksoglükanaasideks ja endoglükanaasideks. Esimesed lagundavad tselluloosi ahelaid otstest ning teised on võimelised tegema lõikeid ahelate sees (Wood ja Garcia-Campayo, 1990).

### 1.2.1 Eksoglükanaasid

Eksoglükanaasid ehk tsellobiohüdrolaasid (CBH) lagundavad tselluloosi ahelaid protsessiivselt, alustades kas redutseerivast või mitteredutseerivast otsast. *Trichoderma reesei*-l leidub kaks CBH-d, CBH I (*TrCel7A*) ja CBH II (*TrCel6A*) (Barr *et al.*, 1996). CBH koosneb väiksest süsivesikut-siduvast moodulist (CBM, carbohydrate-binding module) ja suurest katalüütilisest domeenist (catalytic domain), mis on omavahel seotud glükosüleeritud linkerpeptiidiga (Reinikainen *et al.*, 1992). Kuigi täpsemad katalüütiliste domeenide vahelised struktuurid ja mehhanismid erinevad on neil tunnelikujuline reaktsioonitsentri struktuur. Tunnel sisaldab järjestikuseid anhüdrolükoosi ühikute seostumiskohti. CBH I tunnel on 50 Å pikk ning moodustub  $\beta$ -võileiva ja nelja lingu kõrvalahelatest. CBH II tunnel on 20 Å pikk ning moodustub seitsme paralleelse ahela  $\alpha/\beta$  tünni ja kahe suure lingu kõrvalahelatest. Mõlemad sisaldavad mitmeid süsivesikutega interakteeruvaid aminohappeid, näiteks sisaldab CBH I tunnel nelja Trp jääki ja CBH II tunnel kolme Trp jääki (Rouvinen *et al.*, 1990; Divne *et al.*, 1994). CBH I kasutab katalüüsil topelt-asendusmehhanismi ja vabastatud tsellobioosi anomeerne süsinik säilib  $\beta$  konfiguratsioonis. CBH II kasutab katalüüsil ühekordset-asendusmehhanismi ning vabastatud tsellobioosi anomeerse süsiniku konformatsioon muutub (Rouvinen *et al.*, 1990; Divne *et al.*, 1994). Polüsahhariidi ahel saab siseneda otsapidi tunnelisse, kus katalüütiline domeen seondub substraadiga vesiniksidemete ja hüdrofoobse virnastamise (stacking) abil. Ensüüm lõikab substraadi tsellobioosiks (CB), ning lagundab tselluloosi ahelat protsessiivselt kuni dissotsieerub (Teeri *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Endoglükanaasid

Endoglükanaasid (EG) hüdrolüüsivad tselluloosi ahelates leiduvaid  $\beta$ -1,4 glükosiidseid sidemeid tekitades ahelasiseseid lõikeid. Endoglükanaasid mõjuvad põhiliselt amorfsele tselluloosile. *T. reesei* produtseerib seitset erinevat EG-d, millest arvukaimad on EG I (*TrCel7B*) ja EG II (*TrCel5A*). Enamus *T. reesei* EG-d on CBH-dele sarnase modulaarse struktuuriga, vaid EG III-l (*TrCel12A*) puudub süsivesikut-siduv moodul ja linkerpeptiid (Suominen *et al.*, 1993; Saloheimo *et al.*, 1997; Druzhinina ja Kubicek, 2017). Võrreldes CBH-dega on EG-de reaktsioonitsentril lahtisem lõhega topoloogiaga, mis võimaldab ensüümil teostada katalüüsi tselluloosi ahelate kesksetel aladel. Lisaks võimaldab lahtisem katalüütiline domeen kasutada substraadina ka näiteks karboksümetüültselluloosi ja hüdroksümetüültselluloosi. Kuigi EG-de ja CBH-de katalüütilistel domeenidel esineb palju sarnasusi seisneb nende põhiline struktuuriline erinevus muutustes tunneleid moodustavates lingudes (Spezio *et al.*, 1993; Teeri *et al.*, 1998;

Davies *et al.*, 2000). Nii EG I kui ka EG II kasutavad katalüüsiks topelt-asendusmehhanismi ja produktis säilib anomeerse süsiniku  $\beta$  konfiguratsiooni (Claeyssens *et al.*, 1990; Claeyssens ja Henrissat, 1992; Gebler *et al.*, 1992).

### 1.2.3 $\beta$ -glükosidaasid

*T. reesei*  $\beta$ -glükosidaasid kuuluvad CAZy andmebaasi järgi glükosiidi hüdrolaaside perekondadesse 1 ja 3.  $\beta$ -glükosidaasid lagundavad oligosahhariide mitteredutseerivast otsast monosahhariidideks. Sekreteeritavad *T. reesei*  $\beta$ -glükosidaasid kuuluvad GH 3 perekonda. Enamus *T. reesei*  $\beta$ -glükosidaasest aktiivsusest tuleneb  $\beta$ -glükosidaasist *TrCel3A* (Withers, 2001; Chauve *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2016). *TrCel3A* omab paljudele GH3 perekonna  $\beta$ -glükosidaasidele omast kolme domeeniga struktuuri, kus reaktsioonitsenter asub esimese ja teise domeeni vahelises vaos. GH 3 perekonna  $\beta$ -glükosidaasid nagu ka *TrCel3A* kasutavad katalüüsiks topelt-asendusmehhanismi ja vabastatud glükoosi anomeerse süsiniku algne konformatsioon säilib (Withers, 2001). *TrCel3A* aktiivsus on optimaalne pH 5-el ja 90% aktiivsusest säilib pH 4-7 vahemikus (Chen *et al.*, 2011).

### 1.2.4 Oksüdoreduktaasid

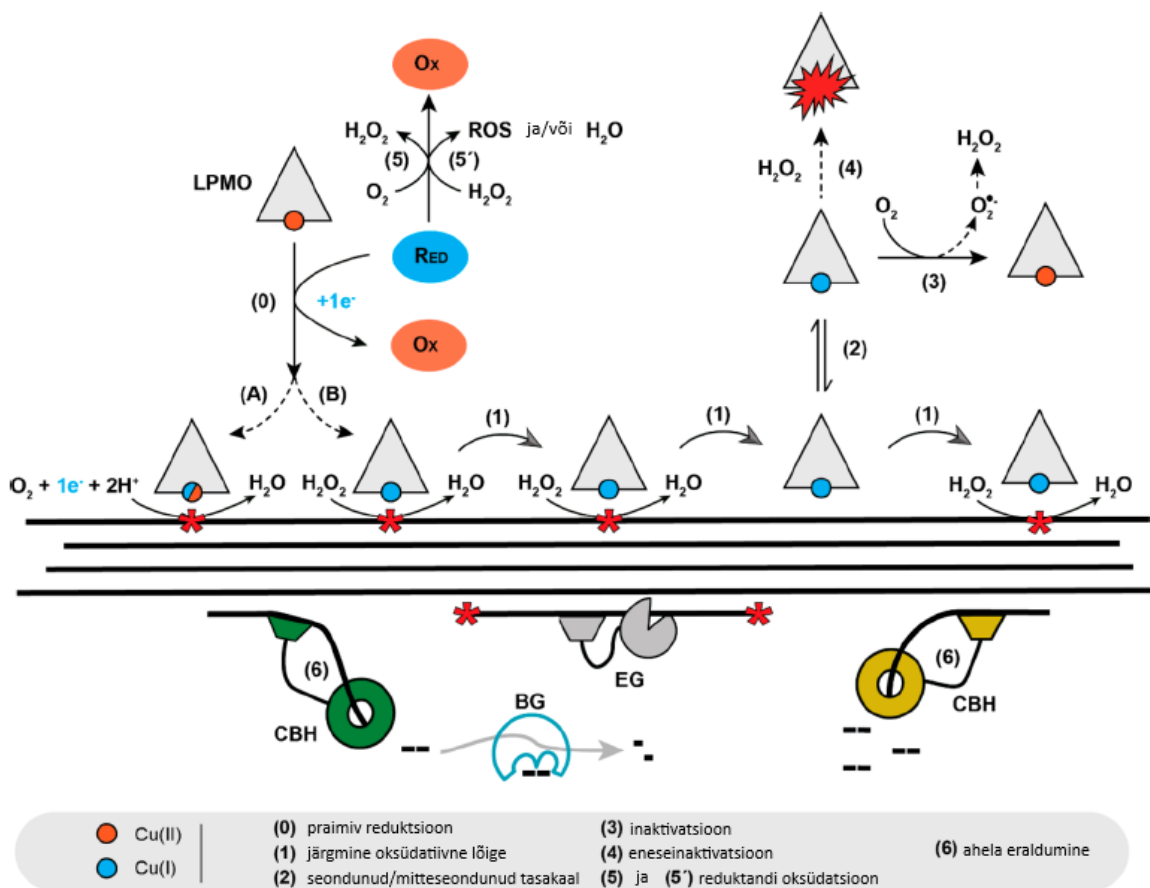
Taimede rakukesta lagundamisel osaleb ka mitmeid erinevaid redoksensüüme, millest valdav enamus vahendavad ligniini lagundamist (Bissaro *et al.*, 2018). Viimasel ajal on aga tähelepanu pälvinud hiljuti avastatud polüsahhariide lagundavad lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO-d). LPMO-d on vask-sõltuvad redoksensüümid, mis katalüüsivad polüsahhariidses substraadis oksüdatiivseid lõikeid ning on võimelised lagundama kristallilist tselluloosi atakeerides glükosiidset sidet moodustavaid süsinikke (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Langston *et al.*, 2011). LPMO reaktsioonitsenter asub ensüümi pinnal tasasel alal, ning sisaldab LPMO-de vahel kõrgelt konserveerunud histidiini jääkidest koosnevat histidiini klambri struktuuri, mis seob ensüümi funktsiooniks vajalikku vase iooni. LPMO-des leidub ka konserveerunud  $\beta$ -võileib struktuur (Joonis 3) (Aachmann *et al.*, 2012; Horn *et al.* 2012). Võrreldes varem nimetatud ensüümidega on LPMO-d vähem uuritud, kuid omavad suurt potentsiaali kasutamiseks lignotselluloosse biomassi lagundamisel.

### 1.2.5 Sünergism

Tselluloosi lagundavate ensüümide vaheline sünergism on lisanduv produktiivsus, mis tuleneb erinevate ensüümide vahelisest koostööst. Tselluloosi säästlikuks lagundamiseks tuleb tagada optimaalsed ensüümide suhted ning keskkonnatingimused, mis võimaldavad sünergismil võimalikult tugevalt väljenduda. Laialdaselt võib tselluloosi lagundamisel toimuva

sünergismi jagada eksoglükanaaside vaheliseks sünergismiks ning eksoglükanaaside ja endoglükanaaside vaheliseks sünergismiks (Henrissat *et al.*, 1985; Barr *et al.*, 1996). *T. reesei* CBH I ja CBH II lagundavad tselluloosi ahelaid erinevatest otstest ja on seega koos lagundades tõhusamad. Lisaks vabastavad CBH-d erinevaid regioone lagundades uusi katalüüsisaita. Leidub ka näiteks avatuma reaktsioonitsentriga CBH-sid nagu näiteks *Thermomonospora fusca* CBH E4, mis suudab lagundada ka karboksümetüültselluloosi (Barr *et al.*, 1996). CBH-de ja EG-de vaheline sünergism arvatakse tulevat EG-de võimest teha tsellobiohüdrolaasidele uusi katalüüsisaita. EG-de katalüüsitud lõiked tselluloosi ahelate keskel tekitavad vabu tselluloosi otsi mida CBH-d saavad kasutada protsessiivse lagundamise alustamiseks. Lisandub sünergismimehhanism, kus CBH-d saavad vältida protsessiivse katalüüsi aeglustumist, sest EG-d lagundavad liikumist takistavat amorfset tselluloosi (Väljamäe *et al.*, 1999; Jalak *et al.*, 2012).  $\beta$ -glükosidaasid lagundavad CBH ja EG poolt vabastatud oligosahhariidid ning tsellobioosi glükoosiks.  $\beta$ -glükosidaasne aktiivsus omab erilist tähtsust kuna tsellobioosi kogunemine reaktsioonikeskkonda inhibeerib tsellulaaside aktiivsust ning kuigi ka glükoos omab inhibeerivat mõju on see tsellobioosi omast madalam (Nidetzky *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 2004). Kuna *T. reesei* tsellulaas segude  $\beta$ -glükosidaasne aktiivsus on väike, tuleb tõhusamaks ja täielikuks biomassi lagundamiseks lisada *T. reesei* ensüümisegudesse  $\beta$ -glükosidaasi preparaate teistelt seeneliikidelt nagu näiteks *Aspergillus niger*-ilt (Kubicek, 1981; Xiao *et al.*, 2004).

On teada, et kristallilisema substraadi lagundamisel langeb traditsiooniliste tsellulaaside sünergism (Väljamäe *et al.*, 1999; Jeoh *et al.*, 2006). Seega oleks ensüümisegudele vaja lisada kristallilisemal substraadil töötavaid ensüüme, mis võimaldaks katalüüsi järel traditsioonilistel tsellulaasidel atakeerida kristallilist substraati. LPMO-d on võimelised seda rolli täitma ning nende võime töötada sünergistlikult CBH-dega on katseliselt demonstreeritud (Langston *et al.*, 2011). Siiski osaleb tselluloosi lagundamisel veel ka palju teisi ensüüme, mida pole siin mainitud ja mille täpseid mehhanisme veel täpselt ei mõisteta. Seega on sellealased teadmised ja info vähetuntud LPMO-de kohta paljudele huvi pakkuv.



**Joonis 2:** Joonise ülemisel poolel on näha LPMO reaktsioone tselluloosi lagundamisel ja alumisel poolel on näidatud tsellulaase tselluloosi lagundamas. LPMO reaktsioon algab vase aatomi reduktsiooniga (0), millele järgneb  $O_2$  (rada A) või  $H_2O_2$  (rada B) põhine reaktsioon (1).  $H_2O_2$  põhise reaktsiooni puhul on Cu(I) olekus LPMO võimeline katalüüsima rea oksüdatiivseid ahela katkemisi ilma, et toimuks vaseaatomite oksüdeerimine Cu(II) vormi (1). On esile toodud ka ensüümi vabanemine substraadilt (2) ning ensüümi vase aatomi oksüdatsioon  $O_2$  poolt, mis genereerib  $H_2O_2$  (3). On näidatud ka redutseeritud ensüümi inaktivatsioon  $H_2O_2$ -ga reageerides tekkinud oksüdatiivse kahjustuse tõttu (4). Lisaks on näha redutseerija võimet genereerida (5) või kulutada (5')  $H_2O_2$ -d. Tselluloosi alumisel küljel on näha erinevaid tsellulaase tselluloosi lagundamas. CBH-d lagundavad ahelaid protsessiivselt olenevalt ensüümi otspetsiifikast, EG tekitab ahelasiseid lõikeid ning BG lagundab teiste ensüümide toodetud tsellobioosi glükoosiks. Punased tärnid tähistavad substraadil tekitatud oksüdeeritud rühmi. Joonis pärineb artiklist Chylenski *et al.*, 2019.

### 1.3 LPMO

Kuigi alles 2010. aastal avastati LPMO-d olevat polüsahhariide hüdrolyüsivatest ensüümidest erinevalt mittehüdrolyütilised ensüümid, tunti neid algselt juba 1974. aastast (Eriksson *et al.*, 1974). Eriksson *et al.* näitasid, et tselluloosi lagundavate seente ensüümisegu oli aeroobsetes tingimustes efektiivsem, mille tõttu oletati võimalikke tselluloosi lagundamisega seotud oksüdatiivsete protsesside olemasolu. 1998 avastati kitiin-seonduv

valk 21 (CBP21) (Suzuki *et al.*, 1998), mille omadus võimendada hüdrolüütiliste kitiini lagundavate ensüümide efektiivsust avastati 2005. aastal (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005). Seejärel avastati 2008. aastal struktuuriline sarnasus CBP21 ja GH61 perekonna valkude vahel ning 2010 avastati ka GH61 valkude võime tõsta tsellulaaside efektiivsust (Karkehabadi *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2010). Aastal 2010 tegid Vaaje-Kolstad *et al.* murrangulise avastuse ning näitasid, et CBP21 on LPMO (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Järgneva intensiivse uurimise käigus on avastatud palju erinevaid LPMO-sid, mis kasutavad erinevaid substraate ning mis pärinevad erinevatest eluslooduse taksonitest (Voshol *et al.*, 2017).

### 1.3.1 Levik looduses ja klassifikatsioon

LPMO gene on enim leitud bakterite ja seente genomidest kuid ka vähemal määral teistest organismidest. Enamus seente LPMO-dest pärinevad Ascomycota ja Basidiomycota hõimkondadest, nagu näiteks Ascomycota hõimkonna esindajad *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ja ka *Trichoderma reesei* (Voshol *et al.*, 2017). Bakterite seas leidub palju LPMO-sid hõimkondadest Proteobacteria, Actinobacteria ja Firmicutes. Vaid bakteritele kuuluvas LPMO AA10 (auxiliary activity 10) perekonnas leidub mitmeid perekondade *Streptomyces*, *Bacillus* ja *Vibrio* esindajaid. AA10 LPMO-de seast leiduvad enamus (94%) tselluloosiga seonduva mooduliga Actinobacteria hõimkonnas ning enamus (95%) kitiiniga seonduva valguga pärinevad Proteobacteria ja Firmicutes hõimkondadest (Book *et al.*, 2014). AA10 LPMO-sid esineb nii maismaal (74%) kui ka vees (61%) leiduvatest kitiini lagundavates bakteritest (Bai *et al.*, 2016). Ka protistide hulgas leidub LPMO-sid ning valdav enamus neist pärinevad taimepatogeenide perekonnast *Phytophthora*. Vähemal määral leidub LPMO-sid ka molluskite, mereanemoonide ning korallide hulgas (Voshol *et al.*, 2017).

LPMO-d olid esialgselt jaotatud GH61 ja CBM33 perekondadesse ning need tuli peale Vaaje-Kolstad *et al.* avastusi ümber süstematiseerida (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). LPMO-d on jaotatud CAZy andmebaasis auxiliary activity (AA) perekondadesse, mis koosnevad glükosiid hüdrolaase polüsahhariidide lagundamisel abistavatest ensüümidest. Täpsemalt aitavad AA perekondade ensüümid teistel ensüümigruppidel nagu GH-del pääseda paremini ligi tihedalt pakitud struktuurides leiduvatele polüsahhariidi ahelatele. Algselt perekonda GH61 kuuluvad LPMO-d pandi AA9 perekonda, kuhu kuuluvad tselluloosi pinda lagundavad enamasti seente LPMO-d. CBM33 valgud nimetati ümber AA10 perekonnaks, mille esindajad võivad lagundada kas kitiini või tselluloosi. AA10 LPMO-d esinevad paljudes organismides kuid on enim

esindatud bakterite seas. (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005; Forsberg *et al.*, 2011; Levasseur *et al.*, 2013).

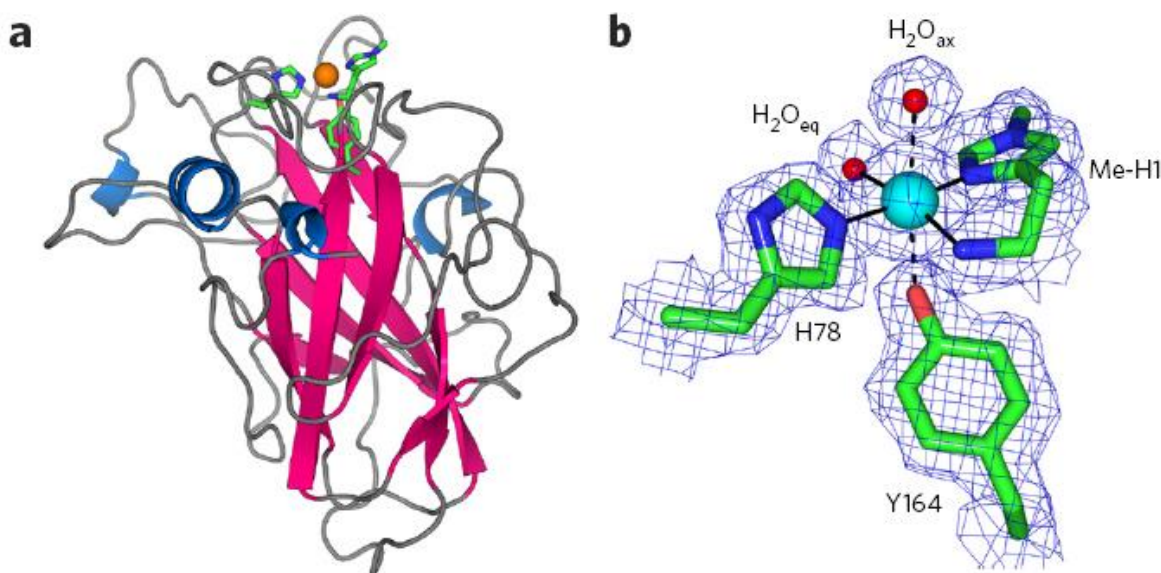
Praeguseks on koostatud AA perekonnad 9, 10, 11, 13, 14, 15 ning 16 (Levasseur *et al.*, 2013; Hemsworth *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2014; Sabbadin *et al.*, 2018; Couturier *et al.*, 2018; Filiatrault-Chastel *et al.*, 2019). AA11 LPMO-d avastati 2014. aastal *Aspergillus oryzae*-st ning on morfoloogiliselt sarnased perekondade AA9 ja AA10 ensüümidele. AA11 LPMO-d lagundavad kitiini ning on eelnevatest perekondadest fülogeneetiliselt erinevad (Hemsworth *et al.*, 2014). AA13 perekonna LPMO-d avastati samal aastal ning osad neist on võimelised lagundama tähtsust C1 süsiniku oksüdatsiooni läbi (Vu *et al.*, 2014). AA14 ensüümid erinevad eelnevatest LPMO-dest struktuurselt ja fülogeneetiliselt ning osadel neist on demonstreeritud võimet lagundada ksülaani C1 süsiniku oksüdatsiooni läbi (Couturier *et al.*, 2018). AA15 LPMO-d avastati esmalt liigist *Thermobia domestica* ning need esinevad ka mitmetes putukates ja ka oomütseetides, protistides ning vetikates. AA15 LPMO-d lagundavad kitiini, kuid on oletatud ka võimalikke tselluloosi lagundavate AA15 LPMO-de olemasolu (Sabbadin *et al.*, 2018). AA16 perekonna LPMO-d esinevad seentes ja oomütseetides ning osad neist on võimelised oksüdeerima tselluloosi C1 süsinikku (Filiatrault-Chastel *et al.*, 2019). Erinevate LPMO-de täpsel nimetamisel kasutatakse formaati XxLPMOnX ning XxAAnX. „Xx“ viitab organismile, millest ensüüm pärineb (nt Nc viitab *Neurospora crassa*-le). LPMO-le või AA-le järgnev „n“ viitab CAZy andmebaasis ensüümile määratud AA perekonna numbrile ning viimane „X“ näitab täpselt, mis geeni valguga on tegu. Lisaks jagatakse ensüüme substraadispetsiifilisuse ning oksüdeeritavate süsinikkude järgi (Bissaro *et al.*, 2018). Siiski leitakse jätkuvalt uusi LPMO-sid ning olemasolevaid ensüüme ja ensüümperekondasid uuritakse ja iseloomustatakse aktiivselt edasi. Siinses peatükis esitatud perekondade kirjeldused on vaid üldistused mitmekesisest ensüümperekondadest.

### 1.3.2 LPMO struktuur

LPMO-de seas leidub lai struktuuriline mitmekesisus, nii põhilise katalüütilise domeeni erinevuste kui ka sellele lisanduvate moodulite kujul. Paljud LPMO-d omavad süsivesikut-siduvat moodulit, mis tagab ensüümi efektiivsuse võimaldades tugeva seondumise kristallilisele substraadile. Samas võivad substraadile seonduda ka ühedomeensed mittelühenduvat substraati lagundavad LPMO-d. On näidatud, et süsivesikut-siduva mooduli lühendamise vähendab ensüümi töövõimet (Kittl *et al.*, 2012; Borisova *et al.*, 2015; Forsberg *et al.*, 2016). Lisaks leidub ka osadel LPMO-del mooduleid, mille täpne funktsioon pole veel

teada. Näiteks *Vibrio cholerae* LPMO VcLPMO10B omab lisaks katalüütilisele domeenile ja kitiinile-seondumise domeenile ka kaht rakuseintele seondumisega seotud moodulit (Horn *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012).

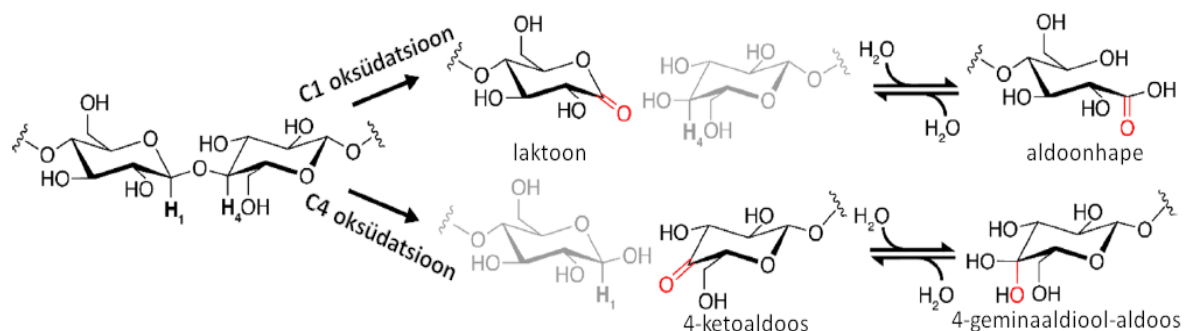
LPMO-del on levinud konserveerunud  $\beta$ -võileib struktuur. Lisaks on konserveerunud enamasti lameda topoloogiaga reaktsioonitsentri ümbritsev ala, mis võimaldab seondumist kristallilise substraadiga (Joonis 3) (Aachmann *et al.*, 2012; Lo Leggio *et al.*, 2015; Courtade *et al.*, 2016). Siiski leidub ka erinevusi, nagu näiteks väikse vaoga AA13 perekonna tärklis lagundavad LPMO-d. Ka lahustuvat substraati või madala kristallilisusega substraati lagundavad LPMO-d omavad muidu lameda reaktsioonitsentri ümbrisel alal võimalikke reaktsiooni ja substraadispetsiifilisust tagavaid moodustisi nagu näiteks kõrgendikke või kontuure (Lo Leggio *et al.*, 2015; Frandsen *et al.*, 2016). LPMO reaktsioonitsenter sisaldab kaht konserveerunud histidiini jääki, millest üks on N-terminaalne. N-terminaalne aminogrupp ning histidiinide kõrvalahelad koordineerivad vaseiooni ning moodustavad LPMO-dele omase histidiini klambri (Quinlan *et al.*, 2011). Vase koordinatsioonisfääri struktuur sõltub kindla LPMO iseärasustest. AA9, -11 ja -13 perekondade LPMO-del koordineerivad Cu(II)iooni kuus ligandit oktaeedrilise konfiguratsiooniga ning AA 10 ensüümide Cu(II)iooni koordineerivad viis ligandit trigonaalse bipüramidaalse konfiguratsiooniga (Gudmundsson *et al.*, 2014; Gregory *et al.*, 2016).



Joonis 3: LPMO *LsAA9A* struktuur: (a) LPMO *LsAA9A* struktuur lintvaates, Cu(I) on märgitud oranži kerana, ning selle ümber on näha koordineeriv histidiiniklambr. Ensüümi  $\beta$ -võileib struktuur on märgitud roosana. (b) Madalal röntgenkiirgusel mõõdetud reaktsioonitsentri elektrontihedus. Cu(II) on märgitud helesinise kerana, mille ümber on näha koordineerivat histidiiniklambr. Joonis pärineb artiklist Frandsen *et al.*, 2016.

### 1.3.3 LPMO toimemehhanism

Tselluloosaktiivsed LPMO-d saavad vastavalt spetsiifikale oksüdeerida glükosiidset sidet moodustavaid süsinikke C1 ja/või C4 (Joonis 4) (Forsberg *et al.*, 2014; Isaksen *et al.*, 2014). C1 oksüdatsiooni puhul laguneb hüdroksüülitud produkt esmalt laktooniks ning saavutab seejärel tasakaalu hüdraatunud vormi aldoonhappega. C4 oksüdatsiooni järel laguneb hüdroksüülitud produkt 4-ketoaldoosiks, mis saavutab järgnevalt tasakaalu oma hüdraatunud vormi 4-geminaaldiool-aldoosiga (Langston *et al.*, 2011; Forsberg *et al.*, 2014).



Joonis 4: LPMO-ga tselluloosi lagundamisel tekkivad erinevad oksüdatsiooniproduktid. C1 ja C4 oksüdatsiooni esmased produktid laktoon ja 4-ketoaldoos on oma hüdraatunud vormidega, aldoonhappe ja 4-geminaaldiool-aldoosiga, tasakaalus. Joonis pärineb artiklist Chylenski *et al.*, 2019.

Kuna LPMO-d vajadid efektiivseks toimimiseks hapnikuga keskkonda peeti nende kosubstraadiks  $O_2$ -e (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2015). Hiljem avastati, et LPMO-d on võimelised kasutama kosubstraadina ka  $H_2O_2$ -e (Bissaro *et al.*, 2017). Kuigi fakt, et katalaasi ja superoksiidi dismutaasi lisamine reaktsioonikeskkonda ei inhibeerinud reaktsiooni, viitas  $O_2$ -e kosubstraadina eelistamisele, näitasid järgnevad matemaatilised analüüsid ja erinevad katsed, et  $H_2O_2$  on ensüümi eelistatud kosubstraat (Bissaro *et al.*, 2017; Kuusk *et al.*, 2018). Hapnikupõhise mehhanismi vajadus suure redutseerija koguse järgi tekitas katsetes olukorra, kus toimus  $H_2O_2$  in situ genereerimine, kas siis redutseeria ja  $O_2$  vahelises reaktsioonis või  $Cu(I)$  LPMO reaktsioonis  $O_2$ -ga. On näidatud, et LPMO reaktsioon konkurentses katses koos mädarõika peroksüdaasiga, hapniku ja redutseerijaga reaktsioonikeskkonnas, on suurel määral inhibeeritud, mis viitab peroksügenaasse mehhanismi kasutamisele (Bissaro *et al.*, 2020).

LPMO reaktsioonile eelneb vaseiooni redutseerimine  $Cu(II)$ -st  $Cu(I)$ -ks. LPMO-de reaktsioonide läbiviimiseks on võimalik kasutada paljusid erinevaid redutseerijaid. Askorbiinhape on väikeste molekulaarsete redutseerijate seast laialt levinud ning esineb ka

ensümaatilisi süsteeme kus kasutatakse näiteks tsellobioosi dehüdrogenaasi LPMO reaktsioonitsentri vaseiooni redutseerimiseks (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2011; Kracher *et al.*, 2016). Lisaks võivad redutseerija rolli täita ka erinevad fenoolid (Aguiar ja Ferraz., 2007; Hu *et al.*, 2014). Võrreldes peroksügenaasse mehhanismiga vajab oksügenaasne mehhanism palju rohkem redutseerijat, kuna iga glükosiidse sideme katkemise jaoks on vajalik kahe elektroni ülekanne, seega on vaja LPMO vaseioon peale igat oksüdatsioonireaktsiooni uuesti redutseerida (Joonis 5). Peroksügenaasne reaktsioonimehhanism vajab redutseerijat vaid algul ensüümi aktiveerimiseks, aga oksüdatsiooni läbi viies saadakse elektroni ekvivalendid  $H_2O_2$ -st ning iga katalüüsi jaoks pole uut redutseerijat vaja (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Bissaro *et al.*, 2017).

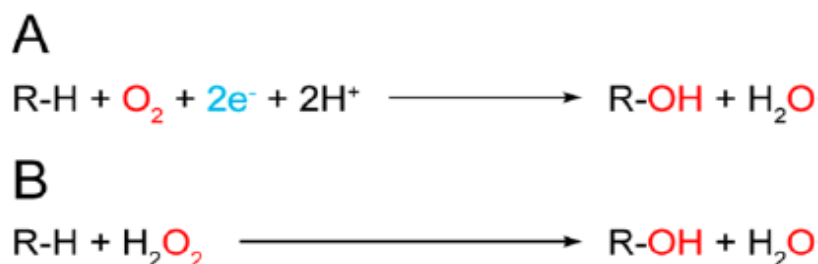
Aktiveeritud (redutseeritud vase ioniga) LPMO on võimeline läbima substraadi lagundamise asemel ka mitteproduktiivseid kõrvalreaktsioone (Joonis 2). Redutseerija olemasolul substraadita keskkonnas võib LPMO käituda oksüdaasina, mille käigus redutseerija oksüdeeritakse ning  $O_2$  redutseeritakse  $H_2O_2$ -ks. Ka substraadiga keskkonnas mitteseondunud aktiivsed LPMO-d on võimelised  $H_2O_2$ -e sünteesima ja seeläbi reaktsiooni kiirendama (Kittl *et al.*, 2012; Isaksen *et al.*, 2014). Oksüdasse reaktsiooni vältimiseks võib kasutada hapnikuvaba keskkonda. Peale selle esineb aktiveeritud substraadiga mitteseondunud LPMO-del ka oksüdatiivne eneseinaktivatsioon. Oksüdatiivne eneseinaktivatsioon põhjustab oksüdatiivseid vigastusi reaktsioonitsentri histidiini jääkidele ning seega kaotab ensüüm töövõime (Bissaro *et al.*, 2017). Eneseinaktivatsiooni saab vältida lisades reaktsioonisegusse piisavalt substraati, et saaks toimuda substraadiga seondumine ja oksüdatiivse reaktsiooni katalüüs. Lisaks peab kontrollima ka redutseerija hulka, et vältida ensüümi aktiveerumist substraadita keskkonnas, näiteks hoiustamisel. Tahtmatu aktiveerumise vältimiseks saab lisaks ka eemaldada ensüümilt vaseiooni, ilma milleta oksüdatiivne eneseinaktivatsioon toimuda ei saa. Viimaks on osadel LPMO-del tuvastatud ka peroksüdaasne reaktsioonivõime lahustunud substraadil, mis võimaldab uurida, kui suur osa LPMO-st on seotud substraadiga ning ka temperatuurist tulenevat LPMO inaktivatsiooni (Breslmayr *et al.*, 2018).

Varasemalt nimetatud kõrvalreaktsioonid muudavad LPMO-de reaktsioonide kineetika uurimise keeruliseks. Oksüdaasne ja peroksüdaasne aktiivsus võivad vähendada redutseerija hulka reaktsioonisegus ning muudata  $H_2O_2$  hulka. Oksüdatiivne eneseinaktivatsioon vähendab töövõimelise ensüümi hulka ning vabastab lahusesse vaseioone, mis võivad reaktsioonisegus tekitada kõrvalreaktsioone (Scott *et al.*, 2016).  $H_2O_2$

üledoseerimine võib põhjustada ensüümi inaktivatsiooni ja seeläbi mõjutada mõõtmistulemusi (Müller *et al.*, 2018). Lisanduvad ka komplikatsioonid siirdemetallidega ja redutseerijaga kontamineeritud substraadist ning tsellulaasidega kontamineeritud ensüümisegudest, mis omakorda raskendavad täpsete mõõtmiste tegemist (Scott *et al.*, 2016; Eijsink *et al.*, 2019).

#### **1.3.4 LPMO-de iseloomustamine**

Üldiseks LPMO kineetiliseks iseloomustamiseks analüüsitakse substraadi ning redutseerijaga inkubeeritud LPMO reaktsioonijärgseidprodukte. MALDI-TOF MS võimaldab hinnata LPMO C1, C4 või C1/C4 oksüdatsiooni produkte. C1 ja C4 oksüdatsiooniproduktid on eristatavad aduktioonide põhised ning ka C1/C4 oksüdatsioon on tuvastatav (Westereng *et al.*, 2009; Westereng *et al.*, 2017). MS analüüsi saab kasutada koos teiste meetoditega erinevatel substraatidel nagu tselluloosil, hemitselluloosil ja kitiinil (Forsberg *et al.*, 2011; Agger *et al.*, 2014; Loose *et al.*, 2014). HPLC meetodid on töö poolest mahukamad kuid võimaldavad detekteerida oksüdeeritud tselluloosi oligomeere ning määrata C1, C4 ja C1/C4 oksüdatsiooniprodukte (HPAEC-PAD) (Westereng *et al.*, 2013). Kuna eelnevad meetodid on kasutatavad vaid lahustuva produkti mõõtmiseks tuleb mittelahustuvate lõigete mõõtmiseks, kasutada lisanduvaid meetodeid. LPMO tekitatud mittelahustuvate oksüdeeritud lõigete mõõtmiseks on kasutatud kolorimeetrilisi kui ka fluorofooripõhiseid meetodeid (Vuong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Mittelahustuvaid oksüdeeritud otsi saab ka mõõta kui LPMO töödeldud polümeer lagundatakse glükosiidi hüdrolaasidega ära ning saadud lahustuvast produktist määratakse lahustuvad oksüdeeritud otsad. Seega nõuab LPMO reaktsiooni kineetika täpne kirjeldamine mitme erineva produkti mõõtmise läbiviimist ning lisaks tuleb arvestada ka varem mainitud arvukaid kõrvalreaktsioone ja võimalikke saastatuse allikaid. Selle keerukuse tõttu on LPMO-de kineetika uurimine olnud piiratud ning sellealane info paljudele huvipakkuv.



Joonis 5: LPMO reaktsiooniskeemid kosubstraadi O<sub>2</sub>(A) ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(B) puhul. (A) Vaaje-Kolstad *et al.* 2010. aastal välja pakutud monooksügenaasne reaktsioonimehhanism. Igaks oksüdatsioonireaktsiooniks vajatakse uut redutseerijat. (B) 2017. aastal Bissaro *et al.* välja pakutud peroksügenaasne reaktsioonimehhanism. Ensüümi vaseioon säilitab redutseeritud oleku ka peale reaktsiooni läbiviimist ning võib ilma uue redutseerijata reaktsiooni uuesti läbi viia. Joonis pärineb artiklist Chylenski *et al.*, 2019.

### 1.3.5 TrAA9A iseloomustus

TrAA9A/TrLPMO9A (varem tuntud kui TrCel61A) on seenest *Trichoderma reesei* (ka *Hypocrea jecorina*) pärinev LPMO, mis on võimeline oksüdeerima tselluloosi ning tsellooligosahhariide C1 ja C4 positsioonidelt. On näidatud, et TrAA9A on võimeline sünergistlikult võimendama eksoglükanaaside ja endoglükanaaside töövõimet ning on ka näidatud, et tsellulaasid lagundavad TrAA9A-ga töödeldud substraati efektiivsemalt kui töötlemata substraati (Pierce *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018).

TrAA9A on modulaarne ning koosneb katalüütilisest domeenist, linkerpeptiidist ning süsivesikut-siduvast moodulist. Katalüütiline domeen koosneb aminohappe jääkidest 1-220 ning omab kaheksast β-ahelast koosnevat β-võileiva struktuuri. N-terminaalne His-1 ja His-86 koordineerivad reaktsioonitsentri Cu(II) iooni histidiiniklambris. Jääkidest 221-288 koosnev linkerpeptiid sisaldab palju Ser ja Thr jääke, millest paljud on glükosüleeritud. Võrreldes teiste sarnaste ensüümidega on TrAA9A linkerpeptiid pikem ning moodustab pikema katalüütilist domeeni ümbritseva ala. TrAA9A perekond üks CBM1 domeen sisaldab paljusid Tyr jääke ning aromaatsid jääke substraadiga seondumiseks. CBM-i eemaldamine langetab ensüümi võimet seonduda substraadiga rohkem kui kahekümnekordselt, kuid ei mõjuta C1/C4 oksüdatsiooni regioselectiivsust (Hansson *et al.*, 2017).

TrAA9A suudab läbi viia C1, C4 ja C1/C4 oksüdatsiooni. Song *et al.* näitasid ensüümi võimet vabastada lahustuvaid di- ja trimeere ning Silva *et al.* demonstreerisid MALDI-TOF abil lahustuvate tri-, tetra- ja pentameeride vabanemist ning UHPLC-ESI-MS abil lahustuvate di-, tri- ja tetrameeride vabanemist (Song *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). AFM

(aatomjõumikroskoopia) analüüsil on näidatud, et *TrAA9A* seondub juhuslikult tselluloosi fibrillile ning on võimeline liikuma risti ja pikki fibrilli. Enamus ajast tselluloosile seonduna oli LPMO liikumattu. Demonstreeriti *TrAA9A* võime siseneda fibrillide sügavikkudesse ning lagundada fibrille tsellulaasidele kättesaadavateks väiksema läbimõõduga ahelateks. Nähti ka *TrAA9A* võimet tekitada vagusid fibrillide pinnale (Song *et al.*, 2018). Siiski leidub *TrAA9A* kineetika ja toimemehhanismi kohta vähe materjali ning kuna *TrAA9A* on juba kasutusel osades ensüümisegudes, pakub selle toimemehhanism substraadi eeltötluse ja ensüümisegude optimeerimise vaatenurgast huvi (Banerjee *et al.*, 2010).

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Minu bakalaureusetöö eesmärk oli iseloomustada *Trichoderma reesei* tselluloosaktiivse LPMO TrAA9A toimemehhanismi kineetikat ensüümi poolt teostatud oksüdatiivsete lõigete alusel.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Substraadid

**Bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos** (BMCC) saadakse bakteriaalse tselluloosi mõõdukal happehüdrolüüsil soolhappega töödeldes. Loodusliku tselluloosiga võrreldes on BMCC struktuur homogensem ning kõrgema kristallilisusega, seetõttu on BMCC hea substraat tselluloosaktiivsete ensüümide uurimiseks (Chanzy *et al.*, 1983; Gilkes *et al.*, 1992). BMCC valmistas Jürgen Jalak bakteri *A. xylinum* BC-st vastavalt Velleste *et al.* 2010 avaldatud protokollile.

**AA-derivatiseeritud bakteriaalne mikrokristalliline tselluloos** (AA-BMCC) on BMCC mille redutseerivad otsad on antraniilhappega derivatiseeritud. Antraniilhappe märgistus võimaldab fluorestsentsi abil tundlikult mõõta ensüümi redutseeriva otsa initsatsiooni spetsiifikat (Velleste *et al.*, 2010).

**<sup>14</sup>C-BMCC** on radioaktiivse <sup>14</sup>C-ga ühtlaselt märgistatud BMCC. <sup>14</sup>C-BMCC kasutamine substraadina võimaldab kiirelt ja täpselt mõõta LPMO tegevusest tekkinud lahustuvate produktide kontsentratsiooni, teades radioaktiivse substraadi eriaktiivsust. <sup>14</sup>C-BMCC tehti <sup>14</sup>C-BC baasil, mis saadi <sup>14</sup>C glükoosi lisamisel söötmesse bakteriaalse tselluloosi tootmisel (Teugjas ja Väljamäe, 2013).

#### 2.2.2 Ensüümid ja kasutatud reagentid

TrAA9A produtseeriti *Trichoderma reesei*-s ning puhastati anioonivahetuskromatograafia ning hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia abil (Kont *et al.*, 2019). Ensüüm saadi VTT-st ja selle eest tänane Dr Nina Aro ja Dr Kaisa Marjamaad. Celluclast® ensüümisegu osteti Sigma-Aldrichist®. β-glükosidaas puhastati antud töö raames Novozymes®-i N188 preparaati, kasutades suuruseralduskromatograafia ningioonvahetuskromatograafiat (Sipos *et al.*, 2010).

Etüleendiamiintetraetaanhape (EDTA), vasksulfaatpentahüdraat (CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O), boorhape (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), naatrium-tsüaanoboorhüdriid (NaBH<sub>3</sub>CN), Tris ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>), naatriumhüdroksiid

(NaOH), D-glükoonhape, ditiotreitol (DTT), ammooniumraud(III) sulfaat dodekahüdraat ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), naatriumkarbonaat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), naatriumvesinikkarbonaat ( $\text{NaHCO}_3$ ), L-Seriin, antraniilhappe ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)(\text{CO}_2\text{H})$ ), askorbiinhape ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), 3-metüül-2-bensotiasolinoon hüdrasoon (MBTH) ja sulfaamhape on ostetud Sigma-Aldrichist®.  $\text{H}_2\text{O}_2$  osteti Fisher Scientificust®. Bitsinkoniinhape (BCA) osteti Honeywellist®. Glükoonhappe määramiseks kasutati Megazyme®-i „D-GLUCONIC ACID/D-GLUCONO- $\delta$ -LACTONE“ komplekti ensüümisegusid, puhvreid ja reagente.

### 2.2.3 TrAA9A vasega küllastamine

TrAA9A aktiveerimiseks tuleb ensüümi reaktsioonitsenter varustada vaseiooniga. 200  $\mu\text{l}$  ensüümi preparaadile (130  $\mu\text{M}$ ) lisati 7,9  $\mu\text{l}$  10 mM vasksulfaadi vesilahust ja inkubeeriti üleöö toatemperatuuril. Järgmisel päeval puhastati vasega varustatud ensüüm lahuses olevast vabast vasest Toyopearl® – HW40 kolonnil ( $V_{\text{kolonn}} = 2,5 \text{ ml}$ ). Kolonn oli eelnevalt veega tasakaalustatud. Fraktsioone koguti ~200  $\mu\text{l}$  kaupa. Fraktsioonide valgusisaldust mõõdeti lainepikkusel 280 nm NanoDrop™ ND-2000c spektrofotomeetriga kasutades molaarset ekstinktsioonikoefitsienti  $54360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.4 AA-BMCC valmistamine

Esmalt pesti 50 mg BMCC-d 50 ml-ses keeratava korgiga plastikkatsutis kaks korda veega lõppruumalas 25 ml ning tsentrifuugiti (10 min, 4000 rpm). 20 ml supernatanti eemaldati ning tselluloos suspendeeriti. Valmistati 45 ml derivatsioonisegu, mis sisaldas 0,5 M naatrium tsüanoborohüdriidi, 50 mM antraniilhapet ja puhverdatud metanooli (4% naatriumatsetaat (NaAC) puhver, 2% boorhape metanoolis, pH 5). 5 ml tselluloosi vesisuspensioonile lisati 20 ml derivatsioonisegu ja inkubeeriti 80°C juures pimedas 2h. Seejärel peatati reaktsioon proovide jahutamisega jää.

Vaba antraniilhappe eemaldamiseks pesti tselluloos veega kasutades korduvat tsentrifuugimist/resuspendeerimist (10 min, 3500 rpm, kokku kolm tsükli) ning viimase pesuga kanti tselluloos ümber uude anumasse. Mittespetsiifilise märke eemaldamiseks inkubeeriti tselluloosi 1h 0,2 M NaOH-ga. Seejärel pesti tselluloos kaks korda veega ja kaks korda 10mM Tris-HCl puhvriga pH 8. Järgnes üleöö töötlus 10 mM EDTA-ga 10 mM Tris-HCl pH 8 puhvri keskkonnas, et eemaldada tselluloosilt metallioone. Järgmisel päeval pesti tselluloosi veel veega, kuni EDTA kontsentratsioon oli alla 1 nM ning viidi 50 mM NaAc pH 5 puhvri keskkonda. Substraati AA-BMCC hoiustati pimedas, +4°C juures.

### 2.2.5 C1 lõigete määramine glükoonhappe testiga

Glükoonhappe testi läbiviimisel kasutatakse ensüümi glükonaatkinaasi, et ATP (adenosiintrifosfaat) abil fosforüülda glükoonhappe 6-fosfoglükonaadiks. Tekivad 6-fosfoglükonaat ning ADP (adenosiindifosfaat). NADP<sup>+</sup> (nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat) juuresolekul dekarboksüleerib 6-fosfoglükonaat dehüdrogenaas 6-fosfoglükonaadi ning tekkib redutseeritud NADPH. Tekkinud NADPH hulk on stõhhiomeetriline LPMO reaktsiooni jooksul tekkinud aldoonhappe hulgaga ning NADPH kontsentratsioon on mõõdetav lainepikkusel 340 nm kasvava neeldumise järgi.

C1 lõigete määramiseks viidi läbi BMCC ja AA-BMCC töötlemine *TrAA9A*-ga 50mM pH 5 NaAc puhvris 25°C juures. Reaktsioonisegu lõppruumala oli 1,8 ml ning see sisaldas ensüümi *TrAA9A* lõppkontsentratsioonil 0,2 µM, substraati AA-BMCC/BMCC lõppkontsentratsioonil 1 g/l, askorbiinhapet lõppkontsentratsioonil 100 µM ning vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioonil 50 µM. Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, substraat, ensüüm ja seejärel askorbiinhape. Varem valmistatud 50 mM askorbiinhappe vesilahust hoiustati oksüdatsiooni vältimiseks 100 µl kaupa 1,5 ml katsutitesse jagatuna -20°C juures. 30 s peale askorbiinhappe lisamist käivitati reaktsioon vesinikperoksiidiga. Reaktsioon peatati 1 min, 2 min, 5 min ja 10 min möödudes. Reaktsiooni peatamiseks võeti reaktsioonisegust välja 300 µl ning segati 33 µl 1M naatriumhüdroksiidiga. Taustaproovi jaoks lisati puhvri, tselluloosi ja *TrAA9A* vesilahusele 33 µl 1M NaOH-d enne askorbiinhappe ja vesinikperoksiidi lisamist.

Proovid tsentrifugeeriti (2 min, 10000 rpm) ja lahustuvat produkti sisaldav supernatant eemaldati eraldi katsutisse ning säilitati külmikus. Lahustumatute produktide määramiseks pesti sadet kaks korda veega ja kaks korda 50mM NaAc pH 5 puhvriga, lõppruumala viidi sama puhvriga 300 µl-ni. Puhvriga pesemise järel inkubeeriti mittelahustuvat produkti Celluclastiga® (0,2 g/l) ja β-glükosidaasiga (10 nM) ruumalas 300 µl, temperatuuril 50°C üleöö. Järgmisel päeval lisati reaktsiooni peatamiseks lahusele 33 µl 1 M NaOH ning tsentrifugeeriti (2 min, 10000 rpm).

Glükoonhappe määramine viidi läbi Megazyme® komplektiga kaasas oleva protokolliga järgi. Märgistamiseks võeti 210 µl proovi, mis kanti 96 MicroWell™ plaadile. Proovile lisati esmalt 20 µl Megazyme®-i D-glükoonhappe komplekti puhvrit, 20 µl NADP<sup>+</sup>/ATP lahust ja 2 µl 6-PGDH lahust. 5 min pärast 6-PGDH lahuse lisamist mõõdeteti lahuse neelduvus lainepikkusel 340 nm ning seejärel lisati reaktsiooni alustamiseks 2 µl GCK lahust. Neelduvust mõõdeti

uuesti samal lainepikkusel 10 min peale reaktsiooni algust. LPMO C1 aktiivsusest tekkinud karboksüülrühmade kontsentratsioon määrati 0 - 100  $\mu\text{M}$  D-glükoonhappe kaliibri vastu.

### 2.2.6 C4 lõigete lahustuvate ja mittelahustvate redutseerivate otste määramine

C4 lõigete määramiseks viidi läbi BMCC ja AA-BMCC töötlemine *TrAA9A*-ga 50mM pH 5 NaAc puhvis 25°C juures. Reaktsioon viidi läbi askorbiinhappe kontsentratsioonil 100  $\mu\text{M}$  ja ka kontsentratsioonil 8  $\mu\text{M}$ . Reaktsioonisegu lõppruumala oli 4,4 ml ning see sisaldas ensüümi *TrAA9A* lõppkontsentratsioonil 0,2  $\mu\text{M}$ , substraati AA-BMCC/BMCC lõppkontsentratsioonil 1 g/l, askorbiinhapet lõppkontsentratsioonil 100  $\mu\text{M}$  või 8  $\mu\text{M}$  ning  $\text{H}_2\text{O}_2$  lõppkontsentratsioonil 50  $\mu\text{M}$ . Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, substraat, ensüüm ja seejärel askorbiinhape. Varem valmistatud 50 mM askorbiinhappe vesilahust hoiustati oksüdatsiooni vältimiseks 100  $\mu\text{l}$  kaupa 1,5 ml katsutitesse jagatuna -20°C juures. 30 s peale askorbiinhappe lisamist käivitati reaktsioon vesinikperoksiidiga. Reaktsioon peatati 1 min, 2 min, 5 min ja 10 min möödudes. Reaktsiooni peatamiseks võeti reaktsioonisegust välja 800  $\mu\text{l}$  ning pipeteeriti 200  $\mu\text{l}$ -le 1M NaOH-le. Taustaproovi jaoks lisati puhvri, tselluloosi ja *TrAA9A* vesilahusele 200  $\mu\text{l}$  1M NaOH-d enne askorbiinhappe ja vesinikperoksiidi lisamist.

Järgnevalt tsentrifuugiti (2 min, 10000 rpm) proovid ja eraldati 900  $\mu\text{l}$  supernatanti. AA-BMCC töötlemisel vabanenud lahustuvad antraniilhappega märgistatud redutseeritud otste kontsentratsioon määrati fluorestsentsi abil enne MBTH märgistuse läbiviimist. AA-BMCC supernatandi fluorestsents mõõdeti Hitachi™ F-4500 fluorimeetril ergastuslainepikkusel 330 nm ja emissioonlainepikkusel 425 nm. Fluorestsentsi intensiivsuse ja antraniilhappe kontsentratsiooni vaheline suhe oli eelnevalt kalibreeritud.

MBTH meetodiga lahustuvate redutseerivate otste märgistamise jaoks võeti 500  $\mu\text{l}$  supernatanti. MBTH meetodi käigus liitub kaks MBTH molekuli redutseeriva otsa C1 süsinikuga läbi kaheastmelise reaktsiooni, mille tulemusena saab määrata lahustuvate redutseerivate otste kontsentratsiooni neeldumise abil (Sawicki *et al.*, 1961). MBTH märgistamise jaoks valmistati vesilahused B ja C vahetult enne reaktsiooni. Lahus B sisaldas 3 g/l MBTH-d, 6,4 mM DTT-d. Lahus C sisaldas 0,5% sulfaamhapet, 0,5% ammoniumraud(III) sulfaat dodekahüdraati ja 1,25 mM soolhapet. Proovidele lisati 100  $\mu\text{l}$  lahust B ning järgnevalt inkubeeriti proove 15 min 80°C juures. Seejärel lisati proovidele 450  $\mu\text{l}$  lahust C ja lasti 1 h toatemperatuuril jahtuda. Proove tsentrifuugiti (2 min, 10000 rpm) ja supernatandi neeldumine mõõdeti lainepikkusel 620 nm spektrofotomeetril Shimadzu™ UV-1601 PC. Lahustuvate redutseerivate otste kontsentratsiooni määrati 0 - 50  $\mu\text{M}$  tsellobioosi kaliibri alusel (Anthon ja Barrett, 2002).

LPMO tekitatud mittelahustuvate redutseerivate otste mõõtmiseks kasutati BCA meetodit. BCA meetodi käigus redutseerivad vabad redutseerivad otsad Cu(II) Cu(I)-ks ning Cu(I) moodustab kahe BCA molekuliga värvuva kompleks, mis võimaldab neeldumise abil mõõta redutseerivate otste kontsentratsiooni mittelahustuvas fraktsioonis (Mopper ja Gindler, 1973). LPMO töödeldud tselluloosipesti kaks korda, esialgselt veega ja seejärel NaAc 50mM pH 5 puhvriga. Pesu jooksul viidi ruumala 1 ml-ni ja pesu järel oli ka lõppruumala 1 ml. Pestud proovist võeti 500 µl supernatanti mittelahustuvate redutseerivate otste märgistamiseks (Kongruang *et al.*, 2004). BCA lahus segati kokku 1:1 suhtes vesilahusest A, mis sisaldas 1,94 g/l BCA reaktiivi, 54,28 g/l naatriumkarbonaati, 24,2 g/l naatriumvesinikkarbonaati, ja vesilahusest B, mis sisaldas 1,25 g/l vasksulfaatpentahüdraati, 1,26 g/l L-Seriini. Proovidele lisati 500 µl A ja B lahuste segu ning proove inkubeeriti 30 min 75°C juures. Jahtunud proovid tsentrifuugiti (2 min, 10000 rpm) ning supernatandi neelduvust mõõdeti lainepikkusel 560 nm spektrofotomeetriga. Mittelahustuvate redutseerivate otste kontsentratsiooni määrati 0 - 50 µM tsellobioosi kaliibri alusel.

### 2.2.7 <sup>14</sup>C-BMCC LPMO-ga lagundamine

<sup>14</sup>C-BMCC lagundamine *TrAA9A*-ga viidi läbi 50mM pH 5 NaAc puhvris 25°C juures. Reaktsioon viidi läbi askorbiinhappe kontsentratsioonil 100 µM ja ka kontsentratsioonil 8 µM. Reaktsioonisegu lõppruumala oli 1,1 ml ning see sisaldas ensüümi *TrAA9A* lõppkontsentratsioonil 0,2 µM, substraati <sup>14</sup>C-BMCC lõppkontsentratsioonil 1 g/l, askorbiinhapet lõppkontsentratsioonil 100 µM ja 8 µM ning vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioonil 50 µM. Reaktsioonisegusse lisati komponendid järgnevas järjekorras: puhver, substraat, ensüüm ja seejärel askorbiinhape. Varem valmistatud 50 mM askorbiinhappe vesilahust hoiustati oksüdatsiooni vältimiseks 100 µl kaupa 1,5 ml katsutitesse jagatuna -20°C juures. 30 s peale askorbiinhappe lisamist käivitati reaktsioon vesinikperoksiidiga. Reaktsioon peatati 1 min, 2 min, 5 min ja 10 min möödudes. Reaktsiooni peatamiseks võeti reaktsioonisegust välja 200 µl ning pipeteeriti 20 µl 1M NaOH-le. Taustaproovi jaoks lisati puhvri, tselluloosi ja *TrAA9A* lahusele 1M NaOH-d enne askorbiinhappe ja vesinikperoksiidi lisamist.

Järgnevalt proovid tsentrifuugiti (2 min, 10000 rpm). 120 µl supernatanti lisati 4 ml stsintillatsiooniseguga mõõteviaalidesse ning segati. Et mõõta proovide radioaktiivset lagunemist minutis (DPM) kasutati vedelik-stsintillatsiooni analüsaatorit (Tri-Carb 2800TR). Reaktsiooniproductide kontsentratsioon väljendati glükoosi ekvivalentides (Glceq), mis

arvutati supernatandist mõõdetud DPM-ide alusel kasutades  $^{14}\text{C}$ -BMCC eriaktiivsust  $6.4 \times 10^5$  DPM/mg.

### 2.3 Tulemused

*TrAA9A* aktiivsuse kirjeldamiseks on vaja kvantitatiivselt mõõta LPMO aktiivsusest tulenevate lahustuvate ja mittelahustuvate produktide teket ajas. Üldiselt saab LPMO kiireks iseloomustamiseks kasutada lahustuvaidprodukte kuid põhjalikuma analüüsi jaoks tuleb mõõta ka mittelahustuvaidprodukte. Kuna LPMO võib oksüdeerida tselluloosis C1 ja/või C4 süsinikke, siis saab seda aktiivsust iseloomustada erinevate oksüdatsiooniproduktide järgi. Näiteks on levinud MALDI-TOF MS ja HPAEC-PAD abil mõõta C4 oksüdatsioonist tekkivaid lahustuvaid 4-ketoaldoosi ja 4-geminaaldiool-aldoosiprodukte ning C1 oksüdatsioonil tekkivaid lahustuvaid laktooni ja aldoonhappeprodukte (Silva *et al.*, 2020). Paraku nõuavad eeltoodud meetodid eriaparatuuri olemasolu ja nende rakendamine on töömahukas. Lisaks on kromatograafiliste meetodite puuduseks kommertsiaalselt kättesaadavate standartide (erineva polümerisatsiooniastmega ja erineva C aatomi juurest oksüdeeritud suhkrute) puudumine.

Selle töö raames kasutati substraatidena bakteriaalset mikrokristallilist tselluloosi (BMCC) ja tema redutseerivast otsast fluorestesentsmärgitud derivaati (AA-BMCC) ning ühtlaselt  $^{14}\text{C}$  märgistatud ( $^{14}\text{C}$ -BMCC) derivaate. Produktide määramiseks kasutati MBTH meetodit (lahustuvad redutseerivad rühmad, RGsol), BCA meetodit (mittelahustuvad redutseerivad rühmad, IRG), Megazyme<sup>®</sup>-i glükoonhappe testi (lahustuvad ja mittelahustuvad C1 oksüdeeritud suhkrud) ja fluorestsentsi mõõtmist (Joonis 6). Lisaks uuriti *TrAA9A* aktiivsust  $^{14}\text{C}$ -BMCC lagundamisel lahustuvate produktide radioaktiivsuse järgi.

Sõltuvalt sellest, millises tselluloosiahela osas toimub *TrAA9A* katalüüsitud glükosiidse sideme oksüdatiivne katkemine on võimalik erinevate lahustuvate ja mittelahustuvate produktide teke (Joonis 6). Järgnevalt jaotame ahela katkemise positsioonid kolmeks piirjuhtumiks: 1) ahela katkemine toimub tselluloosiahela mitteredutseeriva otsa lähedal ehk lahustuv produkt vabaneb mitteredutseerivast otsast, 2) ahela katkemine toimub selle keskosas nii, et lahustuvat produkti ei vabane, 3) ahela katkemine toimub tselluloosiahela redutseeriva otsa lähedal ehk lahustuv produkt vabaneb redutseerivast otsast. Olenevalt sellest, millisest kolmest positsioonist LPMO tselluloosiga seondub (ja toimub glükosiidse sideme katkemine) ja kas LPMO oksüdeerib C1 või C4 süsinikku, tekib valik erinevate meetoditega määratavaid lahustuvaid ja mittelahustuvaidprodukte (Joonis 6).

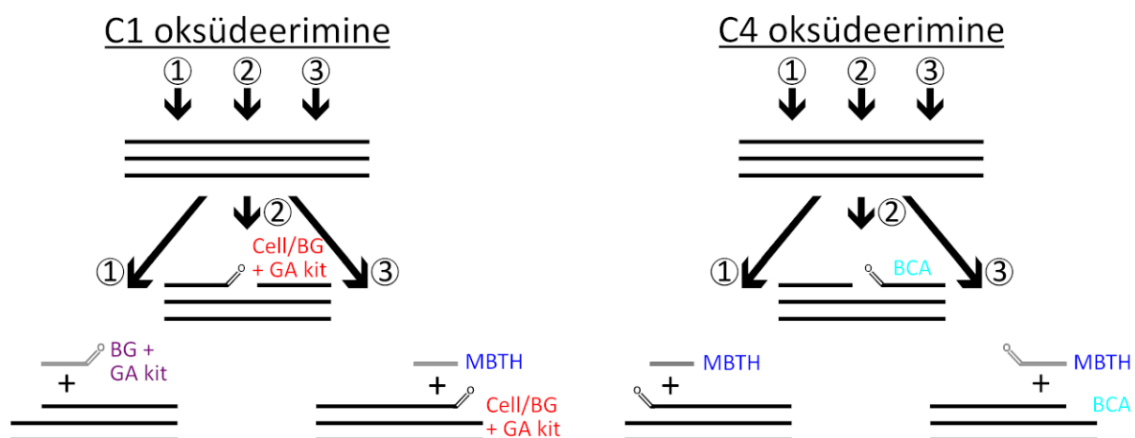
C1 oksüdatsiooni korral tekkivad mitteredutseeriv ots ja laktoon, mis üldjuhul hüdraatub aldoonhappeks (Joonis 4). Siinjuhul kasutati C1 oksüdatsiooniproduktide määramiseks aldoonhappe märgistamist Megazyme®-i glükoonhappe testiga. C1 süsiniku oksüdeerimine positsioonis 1 põhjustab lahustuva aldoonhappe vabanemise tselluloosi ahela mitteredutseerivast otsast, mille kontsentratsiooni on võimalik glükoonhappe testiga mõõta. Kuna glükoonhappe test on spetsiifiline just glükosist lähtuva aldoonhappe suhtes, siis tuleb proove eelnevalt töödelda  $\beta$ -glükosidaasiga, ensüümiga mis katalüüsib tsellooligosahhariidide hüdrolyüsi glükosiks. Paraku antud töö raames lahustuvat fraktsiooni BG-ga ei töödeldud ja seega oli detekteeritav ainult LPMO poolt vabastatud glükoonhappe. C1 süsiniku oksüdeerimine positsioonides 2 ja 3 põhjustab mittelahustuva aldoonhappe tekke, mille kontsentratsiooni on võimalik glükoonhappe testiga mõõta. Mittelahustuva produkti määramiseks tuleb produkti esmalt Celluclastiga® töödelda, et LPMO töötlemisel tekkinud aldoonhappe oleks lahustuv. Ning sarnaselt lahustuvale produktile, tuleb Celluclastiga® lahustuvaks tehtud aldoonhappe produkti töödelda  $\beta$ -glükosüdaasiga, et tekkinud aldoonhappe oleks mõõdetav glükoonhappe testiga. Lisaks tekkib C1 oksüdatsioonil 3. positsioonis ka lahustuv produkt, mis on BMCC puhul määratav redutseeriva otsa abil MBTH meetodiga ning AA-BMCC puhul määratav otsamärgistuse fluorestsentsi abil (Joonis 6).

C4 oksüdatsiooni korral tekkivad redutseeriv ots ja 4-ketoaldoos, mis on tasakaalus oma hüdraatunud vormi 4-geminaaldiool-aldoosiga (Joonis 4). Selles töös kasutati C4 oksüdatsiooni määramiseks C4 süsinike oksüdatsioonil tekkivaid redutseerivaid otsi. Positsioonis 1 toimival C4 oksüdatsioonil tekkib MBTH meetodiga määratav lahustuv redutseeriv ots (Anthon ja Barrett, 2002). Positsioonide 2 ja 3 C4 oksüdatsioonil tekib mittelahustuv redutseeritud ots, mis on mõõdetav BCA meetodiga (Johnston *et al.*, 1998). Erinevus AA-BMCC ja BMCC vahel seisneb faktis, et AA-BMCC redutseerivatele otstele on seotud antraniilhappe (2-amino bensoehape). Antraniilhappe on seotud substraadis leiduvate redutseeritud otstega, mis tekitaks muidu BCA meetodi läbiviimisel kõrgema tausta ja raskendaks seeläbi mõõtmist. BMCC redutseerivaid otsi võib ka vaigistada redutseerimise teel kuid seeläbi poleks osa lahustavast produktist võimalik MBTH meetodiga mõõta. C4 oksüdatsioonil 3. positsioonis vabastab BMCC lagundamisel MBTH-ga mõõdetava lahustuva produkti ning AA-BMCC lagundamisel vabaneb fluorestsentsi abil mõõdetav lahustuv produkt.

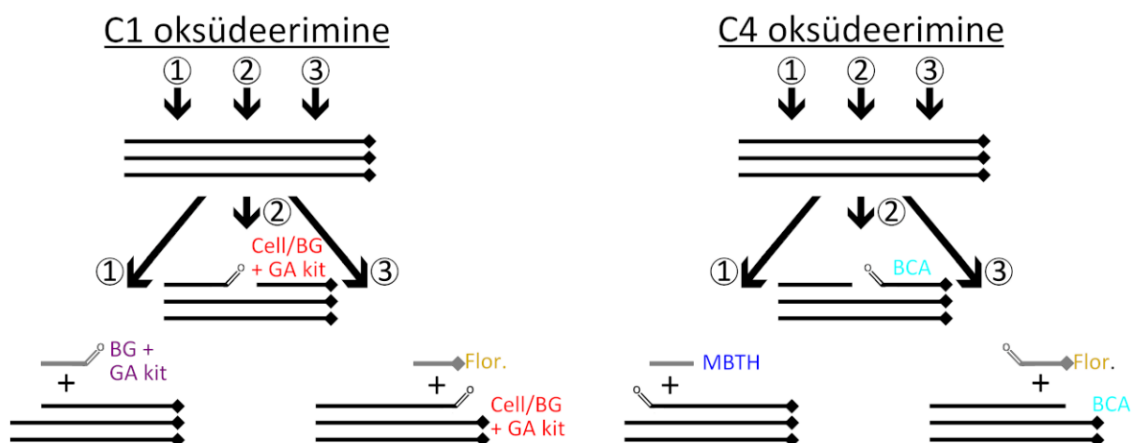
Lisaks oksüdeeritavale substraadile vajavad LPMO-d oma toimimiseks redutseerija ja  $H_2O_2$  olemasolu. Käesolevas töös kasutati redutseerijana askorbiinhapet (AscA), mis on seni

uuritustest üks efektiivsemaid LPMO redutseerijaid (Kuusk 2019). Töö algfaasis kasutati substraadina bakteriaalset tselluloosi (BMCC kõrge polümerisatsiooniastmega analoog). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga „varustamise“ suhtes otsustati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ genereerimise kasuks. Lihtsaima võimaluse selleks pakub AsCA autooksüdatsioon. Paraku ostus AsCA autooksüdatsioon liiga aeglaseks (isegi 50°C juures) ja ei võimaldanud reaktsiooniproductide usaldusväärset detekteerimist MBTH ega ka glükoonhappe testi kasutades. Kontrollkatsed näitasid, et AsCA ei seganud MBTH meetodit ega ka glükoonhappe testi. Reaktsiooni kiirendamiseks otsustati järgmisena tekitada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-d glükoos glükoosi oksüdaas reaktsioonis, mida on varasemalt rakendatud LPMO uuringutes (Bissaro 2017, Kuusk 2018). Kuna glükoosi oksüdaasi kasutamine ei võimalda määrata LPMO tekitatud lahustuvaid produkte kasutades MBTH ja glükoonhappe testi määrati siin ainult mittelahustuvaid produkte. Paraku ei õnnestunud detekteerida ka mittelahustuvaid produkte. Lisaks glükoonhappe testile prooviti rakendada ka hiljuti välja töötatud mittelahustuvate C1 oksüdeeritud rühmade fluorestsentsmärgistamist (Vuong *et al.*, 2017) 7-amino-1,3-naftaleen-disulfoonhappe monokaaliumisoola monohüdraadiga (ANDA) kuid ka need katsed ei andnud usaldusväärset tulemust. Kiirendamaks LPMO reaktsiooni läbiviimist otsustati töö edasises osas loobuda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ genereerimisest ja viidi katsed läbi kasutades 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> algkontsentratsiooni. Lahustuvate produktide tekke tõenäosuse suurendamiseks võeti bakteriaalse tselluloosi asemel kasutusele BMCC ja tema derivaadid. Kuna BMCC polümerisatsiooniaste on bakteriaalse tselluloosiga võrreldes madalam on võrdes koguse (g/l) BMCC lagundamisel kõrgem tõenäosus LPMO-l seonduda alaga (positsioonid 1 ja 3) (Joonis 6), kust oksüdeerudes vabaneks lahustuv produkt.

## (A) BMCC



## (B) AA-BMCC



BG + - Megazyme glükoonhappe testiga mõõdetav  
GA kitlahustuv produkt

Cell/BG - Megazyme glükoonhappe testi ja Celluclastiga  
+ GA kit mõõdetav mittelahustuv produkt

MBTH- MBTH meetodiga mõõdetav lahustuv produkt

Flor.- fluorestsentsi abil mõõdetav lahustuv produkt

BCA- BCA meetodiga mõõdetav mittelahustuv  
produkt

— - tselluloos

◆ - antraniilhappe märgistus

— - LPMO lahustuvad produktid

— - LPMO mittelahustuvad produktid

Joonis 6: Potentsiaalne produktide muster sõltub nii substraadist kui ka LPMO katalüüsi regioselectiivsusest. *TrAA9A* potentsiaalsed seundumissaidid on märgistatud numbritega 1 (mitteredutseeriv ots), 2 (tselluloosi ahela keskosa) ja 3 (redutseeriv ots). On esile toodud C1 ja C4 oksüdatsiooni erinevad produktid (mustad – mittelahustuvad; hallid – lahustuvad) ning ka nendele produktidele vastavad analüüsi meetodid. Reaktsiooniproduktid on välja toodud nii BMCC substraadile kui ka AA-BMCC substraadile (mille redutseerivad otsad on antraniilhappet derivatiseeritud).

### 2.3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sõltuv BMCC lagundamine

TrAA9A (0.2 μM) katalüüsitud BMCC lagundamisel vabanevate redutseerivate otste kontsentratsiooni sõltuvus ajast on näidatud joonisel 7. Nii 100 μM kui ka 8 μM AscA keskkonnas tehtud katsel on näha reaktsiooni kiiret algfaasi ning hilisemat produktide kontsentratsiooni lähenemist platoole. Kogutud andmete põhjal koostatud graafik on kooskõlas varasemalt kitiini lagundamisel saadud tulemustega (Kuusk *et al.*, 2018; Kuusk *et al.*, 2019). Ajakõvera täpsemaks kirjeldamiseks oleks vaja kasutada integreeritud Michaelis-Menteni võrrandit kuid LPMO kineetika esialgse analüüsi jaoks on esimest-järku reaktsiooni võrrand (Võrrand 1) piisav lähendus (Kuusk 2018).

$$[P] = [P]_{max} (1 - e^{-k^{obs}t}) \quad (\text{Võrrand 1})$$

$[P]$  on reaktsiooni produkti kontsentratsioon (μM) ning  $[P]_{max}$  tähistab produkti kontsentratsiooni platood (μM). Lisandub  $k^{obs}$ , mis tähistab reaktsiooni kiiruskonstanti (min<sup>-1</sup>) ning  $t$  ehk aeg (min). Võrrand 1 parameetrite  $[P]_{max}$  ning  $k^{obs}$  arväärtuste leidmiseks lähendati katseandmeid võrrandile 1 kasutades programmi Statistica® mittelineaarset regressioonanalüüsi. Kuna kiire reaktsioon ei võimaldanud ajakõvera lineaarsel faasil põhinevate algkiiruste ( $v_0$ ) määramist, määrati  $v_0$  väärtused lähtudes  $[P]_{max}$  ja  $k^{obs}$  väärtustest (võrrand 2).

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_{(t \rightarrow 0)} = [P]_{max} k^{obs} \quad (\text{Võrrand 2})$$

Teades koguensüümi kontsentratsiooni ( $[TrAA9A]_{tot}$ ) ja algkiirust on võimalik hinnata reaktsiooni näilist katalüütilist konstanti ( $k_{cat}^{app}$ ) (võrrand 3).

$$k_{cat}^{app} = \frac{v_0}{[TrAA9A]_{tot}} \quad (\text{Võrrand 3})$$

Näiline katalüütiline konstant 100 μM askorbiinhappe korral on  $4,5 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$  ning 8 μM askorbiinhappe korral on  $k_{cat}^{app}$   $1,7 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ . Seega on näha, et 8 μM askorbiinhappe korral on  $v_0$  ning  $k_{cat}^{app}$  võrreldes 100 μM askorbiinhappe katsega üle kahe korra väiksemad. Võrreldes 100 μM ja 8 μM askorbiinhappe tulemusi on näha, et mõlemates katsetes jõutakse sarnase  $[P]_{max}$  väärtuseni kuid 8 μM askorbiinhappe juures on  $k^{obs}$  ning  $v_0$  palju madalamad ning seega saavutatakse  $[P]_{max}$  aeglasemalt (Tabel 1 ja 2). Kuna peroksügenaasne reaktsioon järgib stöhhiomeetriat 1 oksüdatiivne lõige 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kohta, siis saab  $[P]_{max}$  järgi näha, et kõik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on kulunud lahustuva produkti tekkeks. Kahjuks ei õnnestunud BMCC puhul C1 oksüdatsiooni produkti täpselt mõõta kuna glükoonhappe testi tulemuste signaal ei olnud taustaga võrreldes

oluline. BMCC-s leiduvad mittelahustuvad redutseerivad otsad andsid BCA meetodiga määramisel liiga suure tausta, mille tõttu polnud saadud andmed usaldusväärsed.

Tabel 1: TrAA9A kineetika parameetrite väärtused erinevatel substraatidel. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja AscA kontsentratsioonid olid vastavalt 50 μM ja 100 μM.

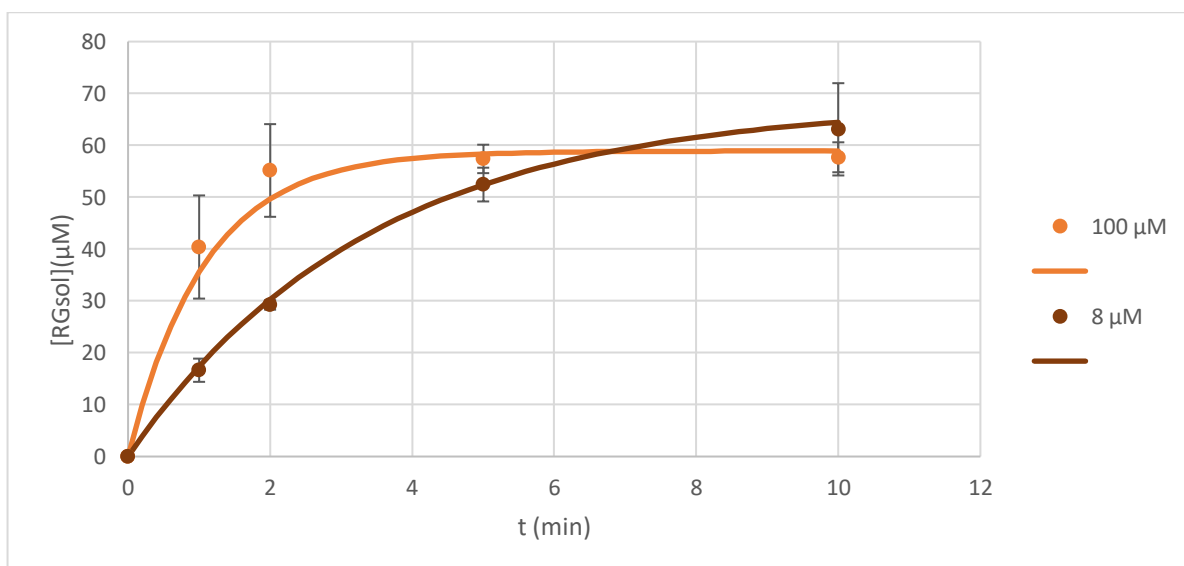
Substraat	[P] <sub>max</sub> (μM)	k <sup>obs</sup> (s <sup>-1</sup> )	v <sub>0</sub> (μM s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> <sup>app</sup> (s <sup>-1</sup> )
BMCC (RGsol <sup>1</sup> )	59 ± 2	0,015 ± 0,003	0,91 ± 0,20	4,5 ± 1,0
AA-BMCC (RGsol <sup>1</sup> )	54 ± 5	0,016 ± 0,003	0,85 ± 0,16	4,2 ± 0,8
AA-BMCC (AA <sup>1</sup> )	2,5 ± 0,3	0,018 ± 0,001	0,04 ± 0,004	0,2 ± 0,02
AA-BMCC (IRG <sup>1</sup> )	3,4 ± 1,4	0,023 ± 0,016	0,08 ± 0,031	0,4 ± 0,16
<sup>14</sup> C-BMCC(Glceq <sup>1</sup> )	90 ± 7	0,009 ± 0,001	0,79 ± 0,07	4,0 ± 0,4

<sup>1</sup> – sulgudes olev lühend näitab seda, millise produkti määramisest parameetrite väärtused tulenevad.

Tabel 2: TrAA9A kineetika parameetrite väärtused erinevatel substraatidel. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja AscA kontsentratsioonid olid vastavalt 50 μM ja 8 μM.

Substraat	[P] <sub>max</sub> (μM)	k <sup>obs</sup> (s <sup>-1</sup> )	v <sub>0</sub> (μM s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> <sup>app</sup> (s <sup>-1</sup> )
BMCC (RGsol <sup>1</sup> )	68 ± 12	0,005 ± 0,001	0,33 ± 0,08	1,7 ± 0,4
AA-BMCC (RGsol <sup>1</sup> )	66 ± 11	0,007 ± 0,002	0,47 ± 0,11	2,4 ± 0,6
AA-BMCC (AA <sup>1</sup> )	2,5 ± 0,1	0,009 ± 0,001	0,02 ± 0,003	0,1 ± 0,02
AA-BMCC (IRG <sup>1</sup> )	3,2 ± 1,5	0,021 ± 0,021	0,07 ± 0,061	0,3 ± 0,26
<sup>14</sup> C-BMCC (Glceq <sup>1</sup> )	76 ± 10	0,005 ± 0,002	0,40 ± 0,11	2,0 ± 0,6

<sup>1</sup> – sulgudes olev lühend näitab seda, millise produkti määramisest parameetrite väärtused tulenevad.



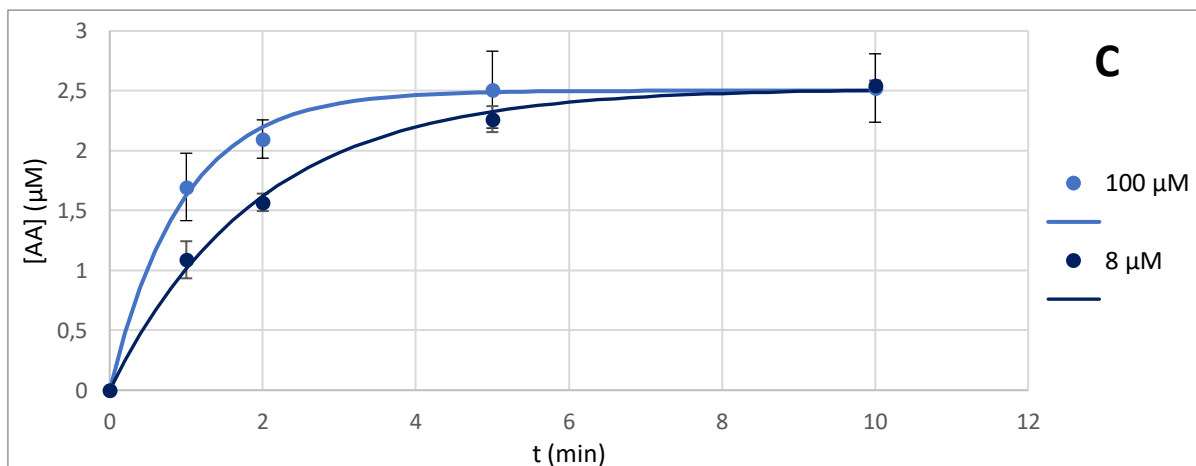
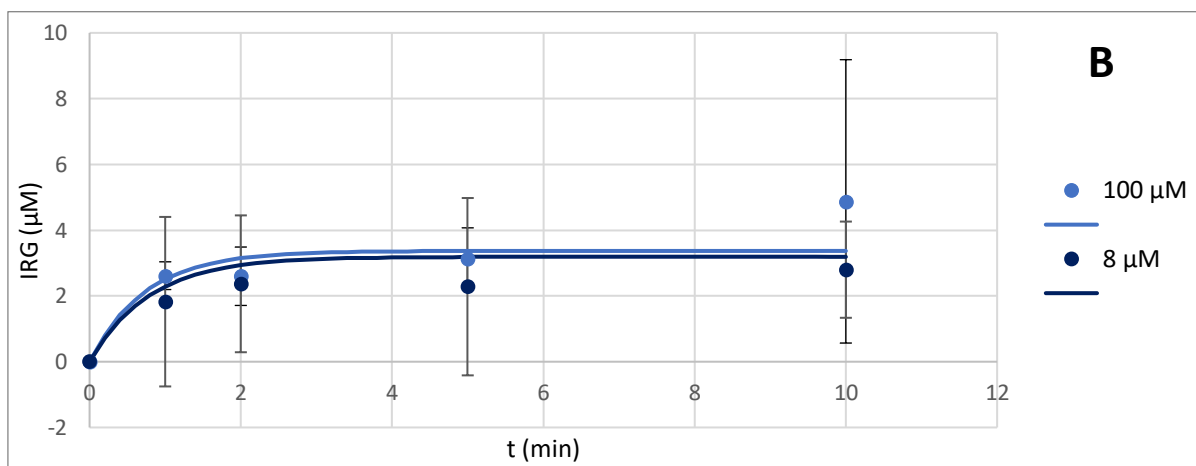
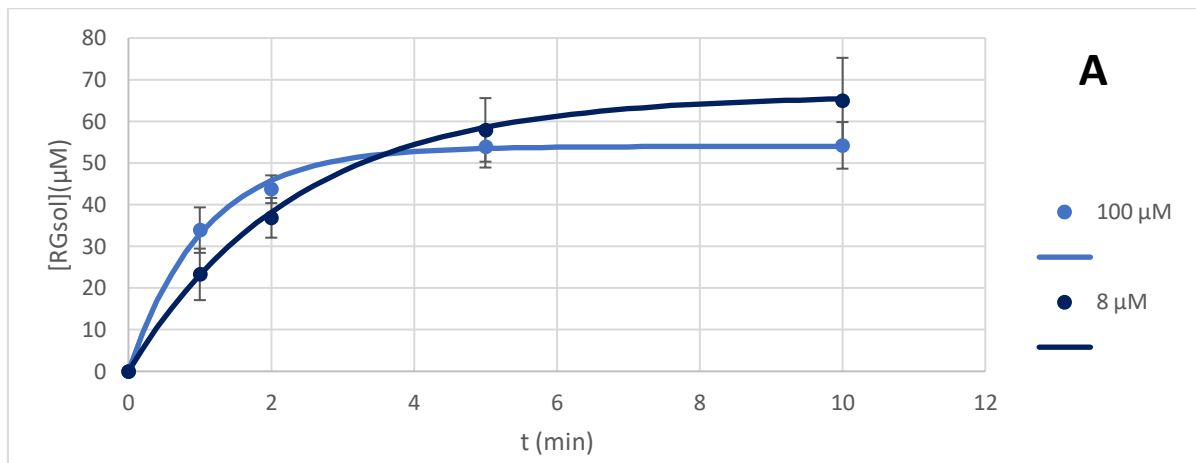
Joonis 7: TrAA9A katalüüsitud lahustuvate redutseerivate otste (RGsol) vabanemine BMCC-lt ajas. Katse teostati 50mM NaAc puhvris pH 5 ning 25°C juures. TrAA9A kontsentratsioon oli 0,2 µM, BMCC kontsentratsioon oli 1 g/l ning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon oli 50 µM. RGsol kontsentratsioon määrati MBTH meetodiga. Joonisel on näidatud AscA kontsentratsioon ning pidevad jooned põhinevad katsetulemuste lähendamisel võrrandile 1 saadud andmetest. Katsed viidi mõlema AscA kontsentratsiooni juures läbi kolmes korduses.

### 2.3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sõltuv AA-BMCC lagundamine

Kuna BMCC-l läbi viidud BCA mõõtmiste andmed polnud kõrge tausta tõttu kasutatavad viidi katsed läbi ka antraniilhappega derivatiseeritud substraadil AA-BMCC-l. AA-BMCC valmistati BMCC redutseerivate otste antraniilhappega derivatiseerimisel. BCA meetodi läbiviimisel tausta vähendamisele lisaks võimaldab AA-BMCC määrata redutseeriva otsa lähedalt vabanevaid antraniilhappega märgistatud lahustuvaidprodukte kasutades antraniilhappe fluorestesentsi mõõtmist. Ka AA-BMCC puhul ebaõnnestus glükoonhappe testiga lahustuvate ja mittelahustuvate aldoonhappe produktide mõõtmine.

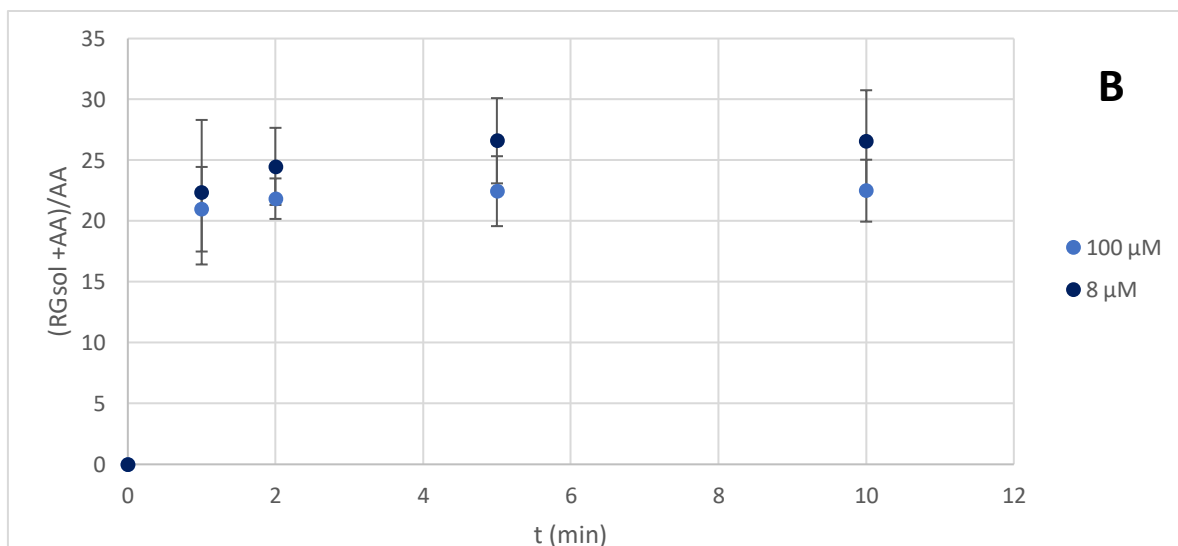
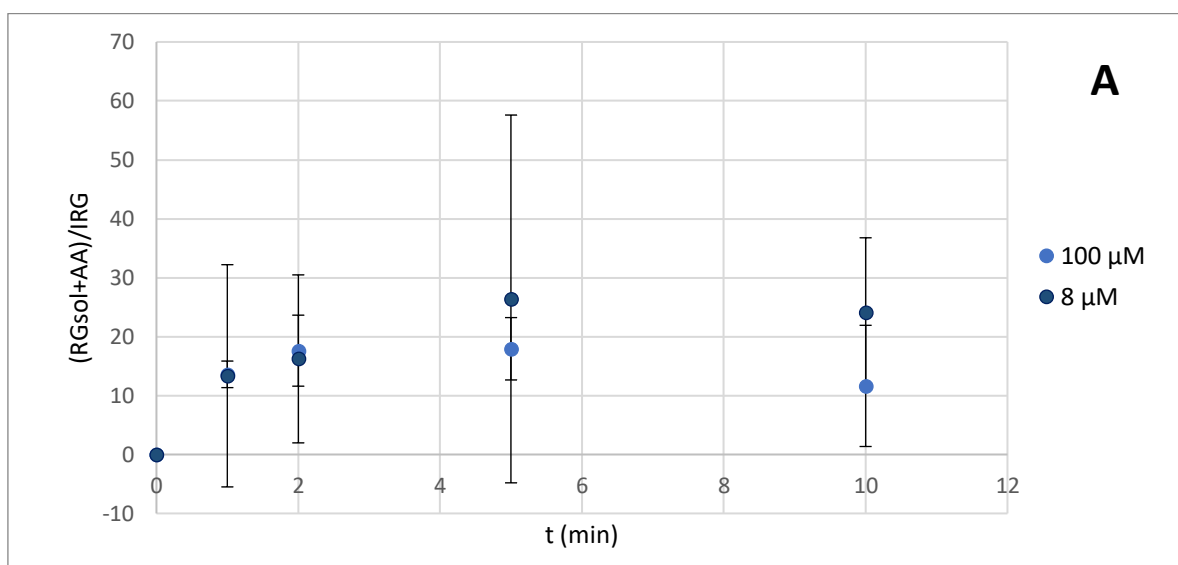
TrAA9A (0,2 µM) katalüüsitud AA-BMCC lagundamisel vabanevate redutseerivate otste (Joonis 8: A), mittelahustuvate redutseerivate otste (Joonis 8: B) ja vabaneva antraniilhappe märgistusega produkti (Joonis 8: C) kontsentratsiooni sõltuvus ajast on näidatud joonisel 8. Sõltumata määratavast produktist on näha reaktsiooni kiiret algfaasi ning hilisemat produktide kontsentratsiooni lähenemist platoole. AA-BMCC redutseerivate otste tekke ning antraniilhappe märgistusega produkti vabanemise  $[P]_{max}$ ,  $k^{obs}$ ,  $v_0$  ning  $k_{cat}^{app}$  arväärtused arvutati sarnaselt BMCC lagundamise tulemustele (Tabel 1 ja 2).

MBTH meetodiga mõõdetud lahustuvate redutseerivate otste tulemuste (Joonis 8: A) põhjal lähendati 100 µM askorbiinhappe puhul  $k_{cat}^{app}$  väärtus  $4,2 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$  ning 8 µM askorbiinhappe puhul  $2,4 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ . On näha, et AA-BMCC MBTH tulemused sarnevad BMCC tulemustega. BCA tulemuste puhul oli viga suur (Joonis 8: B) kuid võrreldes BMCC BCA tulemustega oli viga mitu korda väiksem.  $[P]_{max}$  on mõlema AscA kontsentratsioonil sarnane. BCA meetodil mõõdetud mittelahustuvate redutseerivate otste ja AA märgistusega produkti  $[P]_{max}$  on lahustuva produktiga (RGsol) võrreldes tühine (Joonis 8).



Joonis 8: *TrAA9A* katalüüsitud AA-BMCC lagundamine. Katsed teostati 50mM NaAc puhvris pH 5 ning 25°C juures. *TrAA9A* kontsentratsioon oli 0,2 μM, AA-BMCC kontsentratsioon oli 1 g/l ning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon oli 50 μM. Joonisel on näidatud *TrAA9A* katalüüsitud lahustuvate redutseerivate otste (RGsol, paneel A), mittelahustuvate redutseerivate otste (IRG, paneel B), antraniilhappega märgistatud suhkrute (AA, paneel C) moodustumine ajas. RGsol kontsentratsioon määrati MBTH meetodiga, IRG kontsentratsioon määrati BCA meetodiga ja AA kontsentratsioon määrati lahuse fluorestsentsi läbi. Joonisel on näidatud *AscA* kontsentratsioon ning pidevad jooned põhinevad katsetulemuste lähendamisel võrrandile 1 saadud andmetest. Katsed viidi mõlema *AscA* kontsentratsiooni juures läbi kolmes korduses.

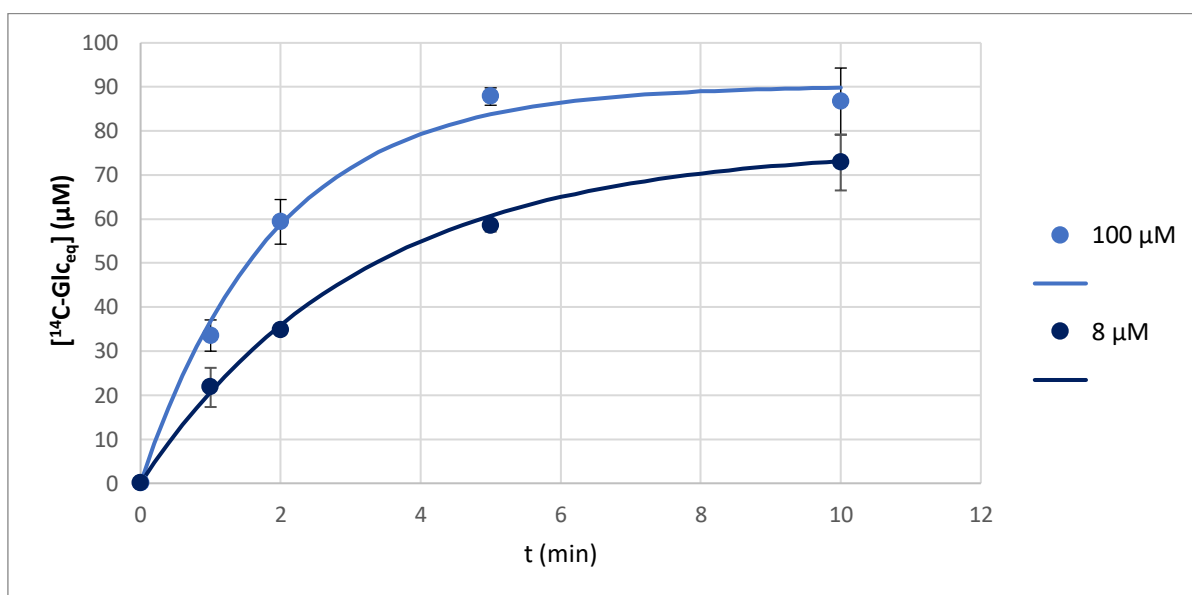
AA-BMCC lagundamisel saadud RGsol, IRG ja AA tekke tulemused võimaldavad hinnata *TrAA9A* näilist protsessiivsust ehk keskmiselt mitu järjestikust katalüütilist reaktsiooni viiakse läbi protsessiivse katalüüsi initsiatsiooni kohta. Kasutades lahustuvate produktide ja mittelahustuvate produktide suhet ((RGsol+AA)/IRG) (Joonis 9: A) ning ka lahustuvate produktide ja antraniilhappe otsmürgistusega produkti suhet (RGsol +AA)/AA) (Joonis 9: B) on näha, et näiline protsessiivsus on üle 20 ja ajasõltumatu. On näha, et BCA tulemustega koostatud suhte (Joonis 9: A) viga on kordades suurem tulenevalt BCA tulemuste kõrgest veast.



Joonis 9: AA-BMCC lagundamisel tekkinud erinevate produktide suhe viitab *TrAA9A* näilisele protsessiivsusele. Katsed teostati 50mM NaAc puhvrts pH 5 ning 25°C juures. *TrAA9A* kontsentratsioon oli 0,2 μM, AA-BMCC kontsentratsioon oli 1 g/l ning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon oli 50 μM. Paneelil A on toodud lahustuvate ja mittelahustuvate produktide suhet. Paneelil B on toodud lahustuvate ja redutseerivast otsast vabastatud produktide suhe. RGsol, IRG ja AA kontsentratsioonid on võetud vastavalt joonis 8 paneelidelt A, B ja C.

### 2.3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sõltuv <sup>14</sup>C-BMCC lagundamine

<sup>14</sup>C-BMCC lagundamisel tekkiva lahustuva produkti kontsentratsiooni mõõdetakse tselluloosis ühtlaselt leiduva <sup>14</sup>C süsiniku vabanemise järgi. Need mõõtmised on täpsed ning kiired ja võimaldavad detekteerida kõiki lahustuvaid produkte, seega nii C1 kui ka C4 oksüdatsiooni produkte. TrAA9A (0,2 μM) katalüüsitud <sup>14</sup>C-BMCC lagundamisel vabaneva lahustuva produkti kontsentratsiooni sõltuvus ajast on näidatud joonisel 10. <sup>14</sup>C-BMCC lagundamisel tekkiva lahustuva produkti  $[P]_{max}$ ,  $k^{obs}$ ,  $v_0$  ning  $k_{cat}^{app}$  arväärtused 100 μM ja ka 8 μM Asca keskkonnas arvutati sarnaselt BMCC lagundamise juures kirjeldatule (Tabel 1 ja 2).



Joonis 10: TrAA9A katalüüsitud lahustuvate produktide (<sup>14</sup>C-Glceq) vabanemine <sup>14</sup>C-BMCC-lt. Katse teostati 50mM NaAc puhvris pH 5 ning 25°C juures. TrAA9A kontsentratsioon oli 0,2 μM, <sup>14</sup>C-BMCC kontsentratsioon oli 1 g/l ning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon oli 50 μM. Lahustuvate produktide kontsentratsioon määrati radioaktiivsuse järgi ja väljendati glükoosi ekvivalentides (<sup>14</sup>C-Glceq). Joonisel on näidatud Asca kontsentratsioon ning pidevad jooned põhinevad katsetulemuste lähendamisel võrrandile 1 saadud andmetest. Katsed viidi mõlema Asca kontsentratsiooni juures läbi kolmes korduses.

<sup>14</sup>C-BMCC lagundamisel mõõdetud  $k_{cat}^{app}$  100 μM askorbiinhappe puhul on  $4,0 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$  ning 8 μM askorbiinhappe puhul  $2,0 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$  (Tabel 1 ja 2). Eeldades, et iga oksüdatiivne lõige viib lahustuva produkti tekkeni võib hinnata (Glceq  $[P]_{max}/[H_2O_2]$ ), et keskmiselt vabastati 100 μM askorbiinhappes keskkonnas  $1,8 \pm 0,1$  ja 8 μM askorbiinhappe keskkonnas  $1,5 \pm 0,2$  glükoosi ekvivalenti ühe oksüdatiivse lõike kohta. Lisaks saab ka glükoosi ekvivalentide  $[P]_{max}$  (Tabel 1 ja 2) ning lahustuvate redutseerivate otste  $[P]_{max}$  järgi hinnata lahustuva produkti keskmist polümerisatsiooniastet (DP), mis 100 μM askorbiinhappes katses BMCC-ga on  $1,5 \pm$

0,1 ja AA-BMCC-ga on  $1,7 \pm 0,2$ . 8  $\mu\text{M}$  askorbiinhappega katses BMCC-ga on lahustuva produkti DP  $1,3 \pm 0,2$  ning AA-BMCC lagundamisel on DP  $1,4 \pm 0,2$ . Seega on TrAA9A reaktsiooni tulemusel vabanenud lahustuv produkt madala keskmise polümerisatsiooniastmega.

## 2.4 Arutelu

Kuigi LPMO-d avastati 2010. aastal, muutis 2017. aasta avastus  $\text{H}_2\text{O}_2$ -st kui võimalikust kosubstraadist arusaama LPMO-de katalüüsivõimest (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Bissaro *et al.*, 2017). LPMO-de katalüüsivõimet on peetud üldiselt madalaks ning oksügenaasse mehhanismi jaoks avaldatud näilised  $k_{cat}$  väärtused jäävad alla  $1,0 \text{ s}^{-1}$  (Bissaro *et al.*, 2018). Uued peroksügenaasse mehhanismi kineetika uuringud on näidanud, et võrreldes oksügenaasse reaktsiooniga on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga varustatud reaktsioon kordades kiirem ja seda nii polüsahhariidi oksüdeerimisel (Bissaro 2017, Kuusk 2018, Hangasky 2018) kui ka vaba LPMO-Cu(I) reoksüdeerimisel (Bissaro 2020, Jones 2020). Seega on LPMO-de aktiivsust alahinnatud ning LPMO-de peroksügenaasse mehhanismi kineetika uurimine paljudele huvi pakkuv.

Tulenevalt LPMO kineetika analüüsi keerukusest on kineetiliste parameetrite väärtuste kohta väga vähe informatsiooni. Seni on avaldatud ainult kaks tõelist, glükosiidse sideme oksüdatsiooni jaoks mõõdetud, katalüütilise konstandi väärtust. Hangasky ja Marletta määrasid  $k_{cat}$  väärtuse  $17 \text{ min}^{-1}$  ( $0,28 \text{ s}^{-1}$ )  $\text{O}_2$  vahendatud tselloheksaosi oksüdeerimise jaoks *Myceliophthora thermophila* LPMO9E poolt (Hangasky and Marletta, 2018). Seni ainus  $\text{H}_2\text{O}_2$  vahendatud reaktsiooni  $k_{cat}$  väärtus  $6.7 \text{ s}^{-1}$  on avaldatud kitiini oksüdeerimise jaoks SmAA10A poolt (Kuusk *et al.*, 2018). Käesolevas töös mõõdetud näiline  $k_{cat}$  on esimene tselluloolüütilist peroksügenaasset lagundamist iseloomustav  $k_{cat}$  väärtus. Tselluloosaktiivse TrAA9A näiline katalüütiline konstant (Tabel 1) on varasema  $\text{O}_2$  reaktsiooni  $k_{cat}$   $0,21 \text{ s}^{-1}$  võrreldes suurusjärgu võrra kõrgem (Gusakov *et al.*, 2017). BMCC lagundamisel oli TrAA9A näiline katalüütiline konstant  $4,5 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$  ja AA-BMCC lagundamisel oli see  $4,2 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$  (Tabel 1 ja 2). Seega on näha, nagu ka kitiinaktiivse SmAA10A puhul, et  $\text{H}_2\text{O}_2$  kosubstraadina kasutamine  $\text{O}_2$  asemel tõstab LPMO katalüüsivõimet märkimisväärselt. Kuigi madalamal 8  $\mu\text{M}$  askorbiinhappe kontsentratsioonil lagundatakse substraate aeglasemalt on  $[P]_{max}$  platoo 100  $\mu\text{M}$  askorbiinhappe katsega võrreldes sarnane (Tabel 1 ja 2). See tulemus on kooskõlas varem avaldatud tulemustele redutseeria rolli kohta  $\text{H}_2\text{O}_2$  vahendatud kitiini lagundamisel SmAA10A poolt (Kuusk *et al.*, 2019). Asjaolu, et 8  $\mu\text{M}$  askorbiinhape võimaldas 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ära reageerimist (ja RGsol teket (Tabel 2)) pakub kinnitust peroksügenaassele reaktsioonile kuna

O<sub>2</sub> reaktsioonis tarbitakse redutseeriat produkti tekkega võrreldes stöhhiomeetriliselt (Joonis 5). Tuleb märkida, et MBTH meetodil mõõdetud RGsol  $[P]_{max}$  väärtused olid teatud määral kõrgemad kui kogu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioon (Tabel 1 ja 2). Kas eeltoodud ebakõla tuleneb katsega kaasnevast juhuveast või MBTH meetodiga seotud võimalikust süstemaatilisest veast vajab edasist uurimist.

AA-BMCC MBTH, AA ja BCA tulemuste põhjal arutati näiline protsessiivsuse hinnang (Joonis 9), mis oli ajasõltumatu ning üle 20 lõike lähedal. Nii BMCC kui ka AA-BMCC katsetes oli  $[P]_{max}$  järgi näha (Tabel 1), et enamuse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-st kulus lahustuvate produktide tekkeks, mis võib viidata *TrAA9A* protsessiivsusele kuna mitteprotsessiivsed endoensüümid (ensüüm, mis initsieerib katalüüsi ahela keskelt) tekitaks hoopis rohkem mittelahustuvaidprodukte (Kurasin ja Väljamäe, 2011). Siiski võib ka mitteprotsessiivne eksoensüüm (ensüüm, mis alustab katalüüsi ahela otsast) tekitada palju lahustuvaid ning vähe mittelahustuvaidprodukte, sest tselluloosi otstest lagundades vabaneb esimese lõike järel „tavaline“ lahustuv produkt ja protsessiivse tsükli lõpuks mittelahustuvaid redutseerivaid otsi juurde ei teki. Tselluloosil leiduvate redutseerivate otste märgistamine võimaldab mõõta katalüüsi initsieerimist ahelate redutseeriva otsa juurest, mis lubab sellisel substraadil täpsemini hinnata protsessiivsust kuna mitteprotsessiivsel lagundamisel oleks oodata rohkem otsmärgise vabastamist kui protsessiivsel lagundamisel (Kipper *et al.*, 2005). AA-BMCC lagundamise andmetest arvatud lahustuvate produktide (RGsol + AA) ning AA märgistusega redutseeritud otste (AA) suhte (Joonis 9: B) põhiselt näib protsessiivsus olevat sama, mis lahustuvate ja mittelahustuvate produktide suhte kohaselt hinnatult. Kuna tselluloosiahela minimaalne kordusühik on tsellobioos, võib eeldada, et protsessiivsel lagundamisel vabaneb palju lahustuvat tsellobioosi. Lahustuvate produktide madal keskmine polümerisatsiooniaste (BMCC (1,5 ± 0,1) ja AA-BMCC (1,7 ± 0,2)) viitab tsellobioosi vabanemisele protsessiivse lagundamise jooksul. <sup>14</sup>C-BMCC lagundamise katsetel selgus ka, et iga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kulul vabanes (Glceq ja RGsol baasil leitud  $[P]_{max}$  väärtuste suhe (Tabel 1)) 100 µM askorbiinhappega keskkonnas lahusesse 1,8 ± 0,1 glükoosi ekvivalenti. Ka varasemad *TrAA9A* uuringud on näidanud madala polümerisatsiooniastmega produktide (DP 2-4) vabanemist kuigi üldiselt on tselluloosaktiivsete LPMO-de lahustuva produkti polümerisatsiooniaste kõrgem (DP 6-7) (Isaksen *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). Madala DP-ga lahustuvate produktide teke võib ka viidata *TrAA9A* võimele lagundada oligosahhariide.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et *TrAA9A* näiline katalüütiline konstant  $\text{H}_2\text{O}_2$  kosubstraadiga ( $k_{cat}^{app}$ ) (Tabel 1) on seni  $\text{O}_2$  reaktsiooni jaoks avaldatud väärtustega võrreldes suurusjärgu võrra kõrgem ning ensüümi katalüüsivõimet on alahinnatud. Lisaks viitasid andmed *TrAA9A* võimalikule protsessiivsusele (Joonis 9). Kuna töö jooksul jäi C1 oksüdatsiooni glükoonhappe testiga mõõtmisel lahustuv produkt  $\beta$ -glükosidaasiga töötlemata, oleks vaja läbi viia vastavad täpsustavad katsed C1 produkti tekke mõõtmiseks.

## Kokkuvõte

Looduses leiduva taimse biomassi ja seega ka taimedes leiduva tselluloosi ensümaatiline lagundamine on keskne protsess nii loodusliku aineriingi kui ka majandusliku jätkusuutlikuse seisukohast. Selles protsessis mängivad olulist rolli hiljuti avastatud lüütilised polüsahhariidi monooksügenaasid (LPMO-d). LPMO-d on redoksensüümid, millest mõned on võimelised lagundama tõrksat kristallilist tselluloosi. LPMO-de tegevus võimaldab ka teistel tselluloosi lagundavatel ensüümidel töötada sünergismi abil tõhusamalt.

2017. aastal selgus, et LPMO-d on võimelised reaktsiooni läbi viima, lisaks molekulaarsele hapnikule, ka vesinikperoksiidi abil. Seetõttu on kasvanud huvi vesinikperoksiidi kasutava reaktsiooni kineetika uurimiseks. Siiski osutub LPMO kineetika uurimine keeruliseks kuna reaktsiooni jooksul tekkivad erinevad lahustuvad ja mittelahustuvad produktid tuleb erinevate meetodite abil mõõta. Antud töös kasutati tselluloosaktiivse LPMO *TrAA9A* toimemehhanismi kineetiliseks iseloomustamiseks erinevaid mudelsubstraate (näiteks fluorestsentsmärgistatud- ja radioaktiivselt märgistatud tselluloosi) ning võimalike produktide mõõtmiseks erinevaid meetodeid.

Tulemused näitasid, et valdav enamus produktist on lahustuv ning tselluloosi ahelat moodustavate glükoosijääkide C4 süsiniku oksüdatsiooni produkt. Produkti keskmine polümerisatsiooniaste on madal ( $DP = \sim 1,6$ ) ning esines võimalikke viiteid protsessiivsusele. *TrAA9A* näiline katalüütiline konstant ( $\sim 4 \text{ s}^{-1}$ ) vesinikperoksiidiga reaktsioonis on varem molekulaarset hapnikku kasutavas reaktsioonis mõõdetud tulemusest ( $\sim 0,2 \text{ s}^{-1}$ ) suurusjärgu võrra kõrgem. Antud *TrAA9A* näiline katalüütiline konstant on esimene avaldatud katalüütilise konstandi hinnang tsellulolüütilise peroksügenaasse reaktsiooni jaoks. *TrAA9A* toimemehhanismi ja kineetika täpsemaks kirjeldamiseks on vaja teha täpsustavaid uuringuid.

# Kinetic characterization of the mode of action of the *Trichoderma reesei* cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase *TrAA9A*

Alexander Rannar

## Summary

The growing demand for sustainable energy has driven the development of various biofuels. Of these, bioethanol is one of the most well-known examples. The production of first-generation biofuels relies on the use of maize, sugar cane, and sugar beet as feedstock and competes with the food and feed industries. An alternative, in the form of second-generation biofuels, has garnered increasing attention due to its use of renewable lignocellulosic biomass as feedstock. Though abundant and cheap, the recalcitrant nature of lignocellulosic biomass makes it a challenging substrate for enzyme-aided hydrolysis. Many organisms can degrade crystalline polysaccharides using a myriad of different enzymes working in a synergistic manner. Having been inspired by these natural systems, a huge push has been made toward developing synergistic enzyme mixtures for the cost-efficient degradation of lignocellulosic biomass. This task assumes a detailed understanding of the mode of action and the kinetics of individual enzymatic components.

Recently, a new type of polysaccharide degrading redox enzymes has been discovered. These enzymes, called lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO), have the ability to catalyze oxidative breaks in various crystalline polysaccharide substrates. Although well characterized in terms of structure, little is known about the kinetic properties of LPMOs. The scarcity of kinetic data is best exemplified by the recent discovery, that hydrogen peroxide may be the true co-substrate of LPMOs instead of molecular oxygen. Due to the reaction of LPMOs involving both soluble and insoluble products and numerous side reactions, kinetic studies thereof have been scarce.

As a consequence of the complexity of LPMOs reaction, the kinetics of the hydrogen peroxide using peroxygenase reaction isn't thoroughly studied. In this study, various cellulosic model substrates, such as fluorescence and radioactively labeled cellulose, were used in combination with various methods for measuring soluble and insoluble products for kinetic characterization of the LPMO. The LPMO chosen for kinetic characterization was *TrAA9A*. This auxiliary activity family 9 LPMO is cellulose-active and found in the soft-rot fungus *Trichoderma reesei*.

The results showed that the vast majority of the product generated by *TrAA9A* action on the substrates was soluble and resulted from the oxidation of C4 carbons of cellulose chains. The soluble product had a low degree of polymerization (DP = ~1,6) and there were possible signs of processivity. The apparent catalytic constant of the *TrAA9A* peroxygenase reaction ( $\sim 4 \text{ s}^{-1}$ ) was an order of magnitude higher than what has been observed for the oxygenase reaction ( $\sim 0,2 \text{ s}^{-1}$ ). The apparent catalytic constant of *TrAA9A* given here is the first published approximation for a catalytic constant of a cellulolytic peroxygenase reaction. Further research is needed for a more detailed analysis of *TrAA9A*'s mode of action and kinetics.

## Kirjanduse loetelu

- Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H. ja Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:18779–18784.
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H. ja Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 66:631–653.
- Agger, J. W., Isaksen, T., Várnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Ludwig, R., Horn, S. T., Eijsink, V. G. H. ja Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(17):6287-92.
- Aguiar, A. A. de ja Ferraz, A. (2007). Fe(3+)- and Cu(2+)-reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions. *Chemosphere* 66(5):947-54.
- Anthon, G. E. ja Barrett, D. M. (2002). Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Biochem.* 305:287–289.
- Atalla, R. H. ja Vanderhart, D. L. (1984). Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223:283–285.
- Bai, Y., Eijsink, V. G. H., Kielak, A. M., van Veen, J. A. ja de Boer, W. (2016). Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria. *Environ. Microbiol.* 18:38–49.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J. S., Borrusch, M. S. ja Walton, J. D. (2010). Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnol. Biofuels.* 3:22.
- Barr, B. K., Hsieh, Y. L., Ganem, B. ja Wilson, D. B. (1996). Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35:586–592.
- Bayer, E. A., L. J. Shimon, Y. Shoham ja R. Lamed. (1998). Cellulosomes—structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.* 124:221–234.
- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nat. Chem. Biol.* 13:1123–1128.
- Bissaro, B., Streit, B., Isaksen, I., Eijsink, V. G. H., Beckham, G. T., DuBois, J. L. ja Rohr, A. K. (2020). Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117:1504–1513.
- Bissaro, B., Várnai, A., Røhr, Å. K. ja Eijsink, V. G. H. (2018). Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82:e00029-18.
- Bohrn, R., Potthast, A., Schiehser, S., Rosenau, T., Sixta, H. ja Kosma, P. (2006). The FDAM Method: Determination of Carboxyl Profiles in Cellulosic Materials by Combining Group-Selective Fluorescence Labeling with GPC. *Biomacromolecules* 7:1743–1750.
- Book, A. J., Yennamalli, R. M., Takasuka, T. E., Currie, C. R., Phillips, G. N. ja Fox, B. G. (2014). Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnol. Biofuels* 7:109.

- Borisova, A. S., Isaksen, T., Dimarogona, M., ... Eijsink, V. G. H. (2015). Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* 290:22955–22969.
- Breslmayr, E., Hanžek, M., Hanrahan, A., Leitner, C., Kittl, R., Šantek, B., Oostenbrink, C. ja Ludwig, R. (2018) A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol. Biofuels* 11:79.
- Brown Jr, R. M. (1996). The Biosynthesis of Cellulose. *J. Macromol. Sci. A* 33:1345–1373.
- Chanzy, H., Henrissat, B., Vuong, R. ja Schiilein, M. (1983). The action of 1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase on Valonia cellulose microcrystals. *FEBS Lett.* 153:113–118.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F. ja Lopes Ferreira, N. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3:3.
- Chen, P., Fu, X., Ng, T. B. ja Ye, X.-Y. (2011). Expression of a secretory  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnol. Lett.* 33:2475–2479.
- Chylenski, P., Bissaro, B., Sørli, 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 Catal.* 9:4970–4991.
- Claeysens, M. ja Henrissat, B. (1992). Specificity mapping of cellulolytic enzymes: Classification into families of structurally related proteins confirmed by biochemical analysis. *Protein Sci.* 1:1293–1297.
- Claeysens, M., van Tilbeurgh, H., Kamerling, J. P., Berg, J., Vrsanska, M. ja Biely, P. (1990). Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM 9414. Substrate specificity and transfer activity of endoglucanase I. *Biochem. J.* 270:251–256.
- Coughlan, M. ja Ljungdahl, L. (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. *FEMS Symp.* 11–30.
- Courtade, G., Wimmer, R., Røhr, Å. K., ... Aachmann, F. L. (2016). Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with  $\beta$ -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113:5922–5927.
- Couturier, M., Ladevèze, S., Sulzenbacher, ... Berrin, J.-G. (2018). Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nat. Chem. Biol.* 14:306–310.
- Davies, G. J., Brzozowski, A. M., Dauter, M., Varrot, A. ja Schülein, M. (2000). Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. *Biochem. J.* 348:201–207.
- Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., Teeri, T. T. ja Jones, T. A. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265:524–528.
- Druzhinina, I. S. ja Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* 10:1485–1499.
- 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). *Biotechnol. Biofuels* 12:58.

- Eriksson, K. E., Pettersson, B. ja Westermark, U. (1974). Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett.* 49:282–285.
- Filiatrault-Chastel, C., Navarro, D., Haon, M., ... Berrin, J.-G. (2019). AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnol. Biofuels* 12:55.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. ja Eijsink, V. G. H. (2014). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:8446–8451.
- Forsberg, Z., Nelson, C. E., Dalhus, B., Mekasha, S., Loose, J. S. M., Crouch, L. I., Rohr, A. K., Gardner, J. G., Eijsink, V. G. H. ja Vaaje-Kolstad, G. (2016). Structural and Functional Analysis of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Important for Efficient Utilization of Chitin in *Cellvibrio japonicus*. *J. Biol. Chem.* 291:7300–7312.
- Forsberg, Z., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Bunæs, A. C., Stenstrøm, Y., MacKenzie, A., Sorlier, M., Horn, S. J. ja Eijunsk, V. G. H. (2011). Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Sci.* 20:1479–1483.
- Frandsen, K. E. H., Simmons, T. J., Dupree, ... Walton, P. H. (2016). The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 12:298–303.
- Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeysens, M., Wilson, D. B., Béguin, P., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Miller, R. C., Warren, R. A. ja Withers, S. G. (1992). Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* 267:12559–12561.
- Gilkes, N. R., Jervis, E., Henrissat, B., Tekant, B., Miller, R. C., Warren, R. A. ja Kilburn, D. G. (1992). The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 267:6743–6749.
- Gregory, R. C., Hemsworth, G. R., Turkenburg, J. P., Hart, S. J., Walton, P. H. ja Davies, G. J. (2016). Activity, stability and 3-D structure of the Cu(II) form of a chitin-active lytic polysaccharide monooxygenase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Dalton Trans.* 45:16904–16912.
- Gudmundsson, M., Kim, S., Wu, M., ... Sandgren, M. (2014). Structural and Electronic Snapshots during the Transition from a Cu(II) to Cu(I) Metal Center of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase by X-ray Photoreduction. *J. Biol. Chem.* 289:18782–18792.
- Guerriero, G., Fugelstad, J. ja Bulone, V. (2010). What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants?. *J. Integr. Plant Biol.* 52:161–175.
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y. ja Nozaki, K. (2016). Comparison of catalytic properties of multiple  $\beta$ -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:4959–4968.
- Gusakov, A. V., Bulakhov, A. G., Demin, I. N. ja Sinitsyn, A. P. (2017). Monitoring of reactions catalyzed by lytic polysaccharide monooxygenases using highly-sensitive fluorimetric assay of the oxygen consumption rate. *Carbohydr. Res.* 452:156–161.
- Hangasky, J. A., Iavarone, A. T., and Marletta, M. A. (2018). Reactivity of O<sub>2</sub> versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115:4915–4920.

- Hangasky, J. A. ja Marletta, M. A. (2018). A Random-Sequential Kinetic Mechanism for Polysaccharide Monooxygenases. *Biochemistry* 57:3191–3199.
- Hansson, H., Karkehabadi, S., Mikkelsen, ... 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. *J. Biol. Chem.* 292:19099–19109.
- Harris, P. V., Welner, D., McFarland, ... 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* 49:3305–3316.
- Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N. E., Kang, C. ja Fukuyama, S. (2014). New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19:162–170.
- Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J. ja Walton, P. H. (2014). Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 10:122–126.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. ja Schülein, M. (1985). Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose. *Nat. Biotechnol.* 3:722–726.
- Hill, J. L., Hammudi, M. B. ja Tien, M. (2014). The Arabidopsis Cellulose Synthase Complex: A Proposed Hexamer of CESA Trimers in an Equimolar Stoichiometry. *Plant Cell* 26:4834–4842.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. ja Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5:45.
- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., Gourlay, K. ja Saddler, J. N. (2014). Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.* 7:2308–2315.
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F., Agger, J., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijsink, V. ja Horn, S. (2014). A C4-oxidizing Lytic Polysaccharide Monooxygenase Cleaving Both Cellulose and Cello-oligosaccharides. *J. Biol.* 289:2632-2642.
- Jalak, J., Kurašin, M., Teugjas, H. ja Väljamäe, P. (2012). Endo-exo Synergism in Cellulose Hydrolysis Revisited. *J. Biol. Chem.* 287:28802–28815.
- Jeoh, T., Wilson, D. B. ja Walker, L. P. (2006). Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. *Biotechnol. Prog.* 22:270–277.
- Johnston, D. B., Shoemaker, S. P., Smith, G. M. ja Whitaker, J. R. (1998). Kinetic Measurements of Cellulase Activity on Insoluble Substrates Using Disodium 2,2' Bicinchoninate. *J. Food Biochem.* 22:301–319.
- Jones, S. M., Transue, W. J., Meier, K. K., Kelemen, B. ja Solomon, E. I. (2020). Kinetic analysis of amino acid radicals formed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven Cu(I) LPMO reoxidation implicates dominant homolytic reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 294:1516-1528.
- 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. *J. Mol. Biol.* 383:144–154.
- Kipper, K., Väljamäe, P. ja Johansson, G. (2005). Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as „burst“ kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochem. J.* 385:527–535.

- Kittl, R., Kracher, D., Burgstaller, D., Haltrich, D. ja Ludwig, R. (2012). Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnol. Biofuels* 5:79.
- Kolpak, F. J. ja Blackwell, J. (1976). Determination of the Structure of Cellulose II. *Macromolecules* 9:273–278.
- Kongruang, S., Han, M. J., Breton, C. I. G. ja Penner, M. H. (2004). Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113:213–231.
- Velleste, R., Teugjas, H. ja Väljamäe, P. (2010). Reducing end-specific fluorescence labeled celluloses for cellulase mode of action. *Cellulose*. 17(1):125-138.
- 125–138. Kont, R., Pihlajaniemi, V., Borisova, A. S., Aro, N., Marjamaa, K., Loogen, J., Büchs, J., Eijsink, V. G. H., Kruus, K. ja Väljamäe, P. (2019). The liquid fraction from hydrothermal pretreatment of wheat straw provides lytic polysaccharide monooxygenases with both electrons and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> co-substrate. *Biotechnol. Biofuels* 12:235.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K. G., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G. H. ja Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science* 352:1098–1101.
- Kubicek, C. P. (1981). Release of carboxymethyl-cellulase and  $\beta$ -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13:226–231.
- Kurasin, M. ja Väljamäe, P. (2011). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *J. Biol. Chem.* 286:169–177.
- Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H., Sørli, M., ja Väljamäe, P. (2018). Kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 293:523–531.
- Kuusk, S., Kont, R., Kuusk, P., Heering, A., Sørli, M., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H. ja Väljamäe, P. (2019). Kinetic insights into the role of the reductant in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 294:1516–1528.
- Langston, J. A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E. ja Sweeney, M. D. (2011). Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and Glycoside Hydrolase 61. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7007–7015.
- 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. *Biotechnol. Biofuels* 6:41.
- Lo Leggio, L., Simmons, T. J., Poulsen, J.-C. N., ... Walton, P. H. (2015) Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nat. Commun.* 6:5961.
- Loose, J. S. M., Forsberg, Z., Fraaije, M. W., Eijsink, V. G. H. ja Vaaje-Kolstad, G. (2014). A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monooxygenase. *FEBS Lett.* 588:3435–3440.
- McNamara, J. T., Morgan, J. L. W. ja Zimmer, J. (2015). A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 84:895–921.

- Merino S.T. ja Cherry J. 2007. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization, p. 95-120. *In* L. Olsson (eds), *Biofuels. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol.108. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mopper, K. ja Gindler, E. M. (1973). A new noncorrosive dye reagent for automatic sugar chromatography. *Anal. Biochem.* 56:440–442.
- Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H. ja Horn, S. J. (2018). The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol. Biofuels* 11:209.
- Müller, G., Várnai, A., Johansen, K. S., Eijsink, V. G. H. ja Horn, S. J. (2015). Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. *Biotechnol. Biofuels* 8:187.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M. ja Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.* 298:705–710.
- Phillips, C. M. T., Beeson, W. T., Cate, J. H. D. ja Marletta, M. A. (2011). Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* 12:1399–1406.
- Pierce, B. C., Agger, J. W., Wichmann, J. ja Meyer, A. S. (2017). Oxidative cleavage and hydrolytic boosting of cellulose in soybean spent flakes by *Trichoderma reesei* Cel61A lytic polysaccharide monooxygenase. *Enzyme Microb. Tech.* 98:58–66.
- Pierce, B. C., Agger, J. W., Zhang, Z., Wichmann, J. ja Meyer, A. S. (2017). A comparative study on the activity of fungal lytic polysaccharide monooxygenases for the depolymerization of cellulose in soybean spent flakes. *Carbohydr. Res.* 449:85–94.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Leggio, L. L., ... Walton, P. H. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:15079–15084.
- Reinikainen, T., Ruohonen, L., Nevanen, T., Laaksonen, L., Kraulis, P., Jones, T. A., Knowles, J. K. ja Teeri, T. T. (1992). Investigation of the function of mutated cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Proteins* 14:475–482.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. ja Jones, T. A. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249:380–386.
- Sabbadin, F., Hemsworth, G. R., Ciano, ... McQueen-Mason, S. J. (2018). An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nat. Commun.* 9:756.
- Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., Tenkanen, M. ja Penttilä, M. (1997). cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast, *Eur. J. Biochem.* 249:584–591.
- Sawicki, Eugene., Hauser, T. R., Stanley, T. W. ja Elbert, Walter. (1961). The 3-Methyl-2-benzothiazolone Hydrazone Test. Sensitive New Methods for the Detection, Rapid Estimation, and Determination of Aliphatic Aldehydes. *Anal. Chem.* 33:93–96.

- Scott, B. R., Huang, H. Z., Frickman, J., Halvorsen, R. ja Johansen, K. S. (2016). Catalase improves saccharification of lignocellulose by reducing lytic polysaccharide monoxygenase-associated enzyme inactivation. *Biotechnol. Lett.* 38:425–434.
- Silva, C. de O. G., Teixeira, T. S., Rodrigues, K. B., Souza, A. A., Monclaro, A. V., Mendes, T. D., Ribeiro, J. A. A., Siqueira, F. G., Fávoro, L. C. L. ja Abdelnur, P. V. (2020). Combination of MALDI-TOF MS and UHPLC-ESI-MS for the characterization of lytic polysaccharide monoxygenase activity. *Anal. Methods* 12:149–161.
- Sipos, B., Benko, Z., Dienes, D., Réczey, K., Viikari, L. ja Siika-aho, M. (2010). Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161:347–364.
- 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 monoxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. *Biotechnol. Biofuels* 11:41.
- Spezio, M., Wilson, D. B. ja Karplus, P. A. (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry* 32:9906–9916.
- Suominen, P. L., Mäntylä, A. L., Karhunen, T., Hakola, S. ja Nevalainen, H. (1993). High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Molec. Gen. Genet.* 241:523–530.
- Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N. ja Watanabe, T. (1998). Chitin Binding Protein (CBP21) in the Culture Supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:128–135.
- Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C. ja Jones, T. A. (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *clae Biochem. Soc. Trans.* 26:173–178.
- Teugjas, H. ja Väljamäe, P. (2013). Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels* 6:104.
- Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J. S., Bissaro, B. ja Eijsink, V. G. (2017). Structural diversity of lytic polysaccharide monoxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44:67–76.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Aalten, D. M. F. van, Synstad, B. ja Eijsink, V. G. H. (2005). The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. *J. Biol. Chem.* 280:28492–28497.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. ja Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* 330:219–222.
- Väljamäe, P., Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G. ja Johansson, G. (1999). Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *Eur. J. Biochem.* 266:327–334.
- Velleste, R., Teugjas, H. ja Väljamäe, P. (2010). Reducing end-specific fluorescence labeled celluloses for cellulase mode of action. *Cellulose* 17:125–138.

- Voshol, G. P., Vijgenboom, E. ja Punt, P. J. (2017). The discovery of novel LPMO families with a new Hidden Markov model. *BMC Res. Notes* 10:105.
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D. ja Marletta, M. A. (2014). Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* 136:562–565.
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Span, E. A., Farquhar, E. R. ja Marletta, M. A. (2014). A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:13822–13827.
- Vuong, T. V., Liu, B., Sandgren, M. ja Master, E. R. (2017). Microplate-Based Detection of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Activity by Fluorescence-Labeling of Insoluble Oxidized Products. *Biomacromolecules* 18:610–616.
- Wang, D., Li, J., Wong, A. C. Y., Aachmann, F. L. ja Hsieh, Y. S. Y. (2018). A colorimetric assay to rapidly determine the activities of lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnol. Biofuels* 11:215.
- Westereng, B., Agger, J. W., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Aachmann, F. L., Stenstrøm, Y. H. ja Eijsink, V. G. H. (2013). Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases. *J. Chromatogr. A* 1271(1):144-52.
- Westereng, B., Arntzen, M. Ø., Agger, J. W., Vaaje-Kolstad, G. ja Eijsink, V. G. H. (2017). Analyzing Activities of Lytic Polysaccharide Monooxygenases by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 1588:71-92.
- Westereng, B., Coenen, G. J., Michaelsen, T. E., Voragen, A. G. J., Samuelsen, A. B. C., Schols, H. A. ja Knutsen, S. H. (2009). Release and characterization of single side chains of white cabbage pectin and their complement-fixing activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 53(6):780-9.
- Westereng, B., Ishida, T., Vaaje-Kolstad, G., Wu, M., Eijsink, V. G. H., Igarashi, K., Samejima, M., Ståhlberg, J., Horn, S. J. ja Sandgren, M. (2011). The Putative Endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* Is a Metal-Dependent Oxidative Enzyme that Cleaves Cellulose. *PLoS ONE* 6(11):e27807.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polymers* 44:325–337.
- Wong, E., Vaaje-Kolstad, G., Ghosh, A., Hurtado-Guerrero, R., Konarev, P. V., Ibrahim, A. F. M., Svergun, D. I., Eijsink, V. G. H., Chatterjee, N. S. ja Aalten D. M. F. (2012). The *Vibrio cholerae* Colonization Factor GbpA Possesses a Modular Structure that Governs Binding to Different Host Surfaces. *PLoS Pathog.* 8:e1002373.
- Wood, T. M. ja Garcia-Campayo, V. (1990). Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1:147–161.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J. ja Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 115:1115–1126.
- Zhang, S., Irwin, D. C. ja Wilson, D. B. (2000). Site-directed mutation of noncatalytic residues of *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. *Eur. J. Biochem.* 267:3101–3115.

**Kasutatud veebiaadressid**

<http://www.cazy.org/> - vaadatud 14.05.2020

<https://www.megazyme.com/d-gluconic-acid-d-glucono-delta-lactone> - vaadatud 26.03.2019

## **Lihtlitsents**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, **Alexander Rannar**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose  
**„Trichoderma reesei tselluloosaktiivse lüütilise polüsahhariidi monooksügenaasi TrAA9A  
toimemehhanismi kineetiline iseloomustamine“**,

mille juhendajad on **Riin Kont** ja **Priit Väljamäe**,

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

2. 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 3.0, mis lubab autorile viidates teost  
reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja  
kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

*Alexander Rannar*

**08,06,20**