

# Utjecaj promjene koncentracije vodikovog peroksida i askorbinske kiseline na operacijsku stabilnost litičke polisaharidne monooksigenaze

---

Radić, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:638764>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Ines Radić

**Utjecaj promjene koncentracije  
vodikovog peroksida i askorbinske  
kiseline na operacijsku stabilnost  
litičke polisaharidne monooksigenaze**

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojem mentoru, prof. dr. sc. Tončiju Reziću na ugodnoj suradnji i stručnoj pomoći, te prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki i kolegama u laboratoriju na pomoći i savjetima pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Također, zahvaljujem svojoj braći, prijateljima i kolegama koji su dijelili sve sretne i manje sretne trenutke sa mnom tijekom cijelog studiranja. Bez vas bi studiranje bilo puno manje zabavno.*

*Najveće hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i podržavali me do samoga kraja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za Biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Bioproceno inženjerstvo

UTJECAJ PROMJENE KONCENTRACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA I ASKORBINSKE  
KISELINE NA OPERACIJSKU STABILNOST LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE

*Ines Radić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210850

**Sažetak:** U ovom radu ispitivan je utjecaj dodatka askorbinske kiseline i  $H_2O_2$ , te njihov sinergijski utjecaj i utjecaj dodatka celuloze na operacijsku stabilnost litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO). Operacijska stabilnost se određivala nakon inkubacije enzima sa spomenutim komponentama kao preostala aktivnost pri 30 °C, u natrijevom fosfatnom puferu pH vrijednosti 6 tijekom 250 min. Stabilnost LPMO ne mijenja se povećanjem koncentracije vodikovog peroksida te iznosi 69 % početne aktivnosti bez prisustva celuloze. Utjecaj askorbinske kiseline na aktivnost LPMO veći je od utjecaja  $H_2O_2$ , te veća koncentracija uzrokuje i veću inaktivaciju. Dodatak askorbinske kiseline i  $H_2O_2$  uzrokuje inaktivaciju enzima u većoj mjeri nego te dvije komponente zasebno. Dodatak celuloze stabilizira LPMO u svim ispitivanim slučajevima. Reakcija deaktivacije u ispitivanim slučajevima opisana je pomoću programskog paketa *Scientist* modelom n-tog reda.

**Ključne riječi:** *operacijska stabilnost, LPMO, peroksidacija reducensa, lignocelulozna biomasa*

**Rad sadrži:** 47 stranica, 25 slika, 14 tablica, 64 literaturnih navoda, 6 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. prof. dr. sc. Tonči Rezić
3. prof. dr. sc. Jasna Novak
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 30. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering,**  
**Industrial Microbiology and Brewing**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

THE IMPACT OF CHANGING THE CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND  
ASCORBIC ACID ON OPERATIONAL STABILITY OF LYTIC POLYSACCHARIDE  
MONOOXYGENASE

*Ines Radić*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210850

**Abstract:** In this thesis addition of ascorbic acid, hydrogen peroxide, their synergistic impact and the addition of cellulose on operational stability of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO) was tested. Operational stability was determined after addition of mentioned components as remaining activity at 30 °C in sodium phosphate buffer pH 6 for 250 minutes. Stability of LPMO does not change upon increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and it amounted 69 % of initial activity in absence of cellulose. The effect of ascorbic acid on operational stability of LPMO was greater than effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adding of higher concentration caused higher inactivation. The addition of both ascorbic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused greater inactivation than these two components separately. The addition of cellulose stabilizes LPMO in all tested cases. The deactivation reaction in the investigated cases was described using the *Scientist* program with the n-th order model.

**Keywords:** *operational stability, LPMO, reductant peroxidase reaction, lignocelulosic biomass*

**Thesis contains:** 47 pages, 25 figures, 14 tables, 64 references, 6 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Tonči Rezić, PhD

**Reviewers:**

1. Božidar Šantek, PhD, Full professor
2. Tonči Rezić, PhD, Full professor
3. Jasna Novak, PhD, Full professor
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor

**Thesis defended:** September 30<sup>th</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. ENZIMI U RAZGRADNJI CELULOZNIH SIROVINA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. CAZy KLASIFIKACIJA ENZIMA .....</b>	<b>5</b>
2.3.1. Enzimi s pomoćnom aktivnošću (AA) .....	7
2.3.2. Klasifikacija LPMO.....	7
<b>2.4. KARAKTERISTIKE I STRUKTURA LPMO.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5. AKTIVNOST LPMO.....</b>	<b>9</b>
2.5.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ili O <sub>2</sub> kao kosupstrat .....	10
2.5.2. Operacijska stabilnost enzima.....	12
2.5.3. Popratne reakcije i inaktivacija LPMO.....	12
2.5.4. Mjerenje aktivnosti LPMO .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>16</b>
3.1.1. Enzim.....	16
3.1.2. Kemikalije.....	16
3.1.3. Otopine i puferi .....	16
3.1.4. Aparatura i oprema.....	17
<b>3.2. ANALITIČKE METODE.....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Određivanje aktivnosti LPMO .....	17
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina.....	18
3.2.3. Uklanjanje metalnih iona iz celuloze.....	19
3.2.4. Liofilizacija celuloze .....	19
<b>3.3. STABILNOST LPMO .....</b>	<b>19</b>
3.3.1. Ispitivanje utjecaja vodikovog peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) / askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO .....	19
3.3.2. Ispitivanje sinergijskog utjecaja vodikovog peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) i askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO .....	20
3.3.3. Ispitivanje utjecaja celuloze na stabilnost LPMO .....	21
3.3.4. Ispitivanje utjecaja celuloze i dodatka H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / AscA .....	21
3.3.5. Ispitivanje dodatka celuloze i sinergijskog učinka vodikovog peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) i askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO .....	22
<b>3.4. OBRADA PODATAKA.....</b>	<b>22</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Utjecaj različitih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na stabilnost NcLPMO .....</b>	<b>24</b>

4.2.1. Stabilnost <i>NcLPMO</i> pri fiksnoj koncentraciji $H_2O_2$ uz varijaciju koncentracije AscA .....	27
4.2.2. Stabilnost <i>NcLPMO</i> pri fiksnoj koncentraciji AscA uz varijaciju koncentracije $H_2O_2$ .....	30
<b>4.3. Utjecaj različitih koncentracija celuloze na stabilnost <i>NcLPMO</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. Utjecaj različitih koncentracija <math>H_2O_2</math> i AscA uz celulozu na stabilnost <i>NcLPMO</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5. Sinergijski utjecaj <math>H_2O_2</math> i AscA na stabilnost <i>NcLPMO</i> uz celulozu .....</b>	<b>37</b>
4.5.1. Stabilnost <i>NcLPMO</i> uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji $H_2O_2$ te uz varijaciju koncentracije AscA .....	37
4.5.2. Stabilnost <i>NcLPMO</i> uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji AscA te uz varijaciju koncentracije $H_2O_2$ .....	39
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>43</b>



# 1. UVOD

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

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

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija vodikovog peroksida (kao kosupstrata) i askorbinske kiseline (kao donora elektrona) te njihovog međusobnog utjecaja s ili bez dodatka supstrata celuloze na operacijsku stabilnost LPMO izolirane iz gljive *Neurospora crassa* (NcLPMO). Operacijska stabilnost enzima određivala se mjerenjem preostale aktivnosti jednostavnim spektrofotometrijskom metodom prema Breslmayr i suradnicima iz 2019. godine, a udio enzima vezanog na supstrat mjerenjem koncentracije enzima u supernatantu reakcijske smjese Bradfordovom metodom.

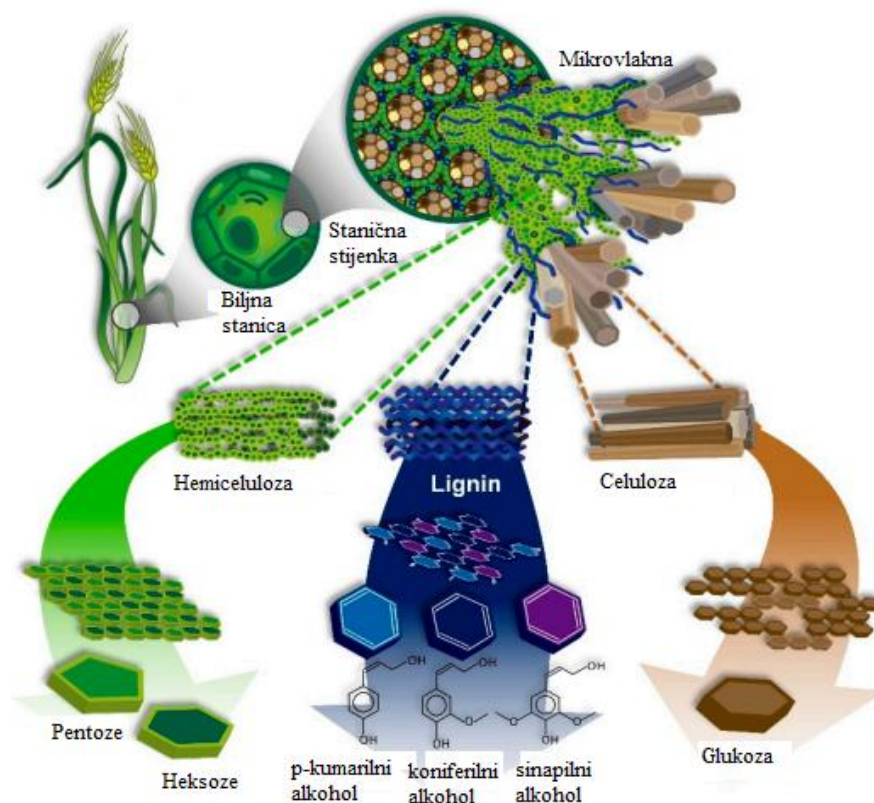
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA

Prema Zakonu o izmjenama i dopunama Zakona o biogorivima za prijevoz (NN 52/2021), „lignocelulozni materijal je materijal koji se sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze, poput biomase dobivene iz šuma, drvenih energetskih kultura i šumskih industrijskih ostataka i otpada“. Osim navedenih, ove sirovine mogu sadržavati i pektin, dušikove spojeve te anorganske tvari, a razlikuju se prema podrijetlu, udjelu spomenutih makromolekula te načinu njihovog međusobnog povezivanja (Rezić i sur., 2021). Udjeli makromolekula u lignoceluloznoj (LC) biomasi variraju od sirovine do sirovine, a iznose oko 25 - 50 % za celulozu, 20 - 40 % za hemicelulozu te 5 - 35 % za lignin, ovisno o ekološkim i genetskim faktorima (Sluiter i sur., 2010). U staničnim stijenkama stanica biljaka, celulozna vlakna formiraju kostur okružen hemicelulozom te ligninom, kao što je prikazano na slici 1 (Ioelovich i Morag, 2012). S biotehnološkog gledišta, najvrjedniji dio lignoceluloznih sirovina su celuloza i hemiceluloza s obzirom na to da sadrže fermentabilne šećere (heksoze i pentoze).

Celuloza je linearni homopolimer koji se sastoji od jedinica D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom. Ponavljajuća jedinica celuloze - celobioza je disaharid u kojem se dvije molekule glukoze jedna u odnosu na drugu nalaze pod kutom od  $180^\circ$ . Celulozne jedinice tvore mikrovlakna čije hidroksilne skupine omogućavaju njihovo međusobno povezivanje vodikovim vezama, a stabilizaciji pridonose i van der Waalove veze (Rezić i sur., 2021). Te dvije vrste veza omogućavaju stvaranje kristalne strukture koja čini 40 – 60 % ukupne celuloze zbog koje nije topljiva ni podložna enzimskoj razgradnji. Frakcije kristalne strukture isprekidane su manje uređenom, amorfnom strukturom (Horn i sur., 2012).

Hemiceluloza je razgranati polisaharid s kratkim pobočnim lancima čiji se kemijski sastav i strukturalna svojstva razlikuju ovisno o vrsti biljke, tipu i vrsti biljnog tkiva te njegovom razvojnom stadiju. (Demiragona i sur., 2013). Najčešći monomeri koji grade hemicelulozu su D-manoza i D-ksiloza. U sastav ulaze i D-glukoza, D-galaktoza, L-arabinoza, kiseline poput D-glukuronske i D-galakturonske međusobno povezane  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,3 glikozidnim vezama (Rezić i sur., 2021).



**Slika 1.** Sastav lignocelulozne biomase (prema Hernández-Beltrán i sur., 2019)

Ksilan je dominantan polisaharid u hemicelulozi većine biljaka, a okosnicu čine monomeri ksiloze povezane  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama dok na bočnim lancima mogu biti vezane različite skupine. Enzimaska razgradnja hemiceluloze lakša je u usporedbi s celulozom, no razgradnja može biti otežana zbog acetilacije bočnih lanaca i kompleksnih grananja nekih oligomernih struktura (Horn i sur., 2012).

Lignin je polifenolni heteropolimer trodimenzionalne strukture, a njegova je glavna funkcija osigurati strukturnu potporu, nepropusnost i onemogućiti biološku razgradnju lignoceluloznih sirovina (Rezić i sur., 2021). Vezan je na celulozu i hemicelulozu preko glukuronske kiseline eterskim ili esterskim vezama (Horn i sur., 2012), a prekursori za njegovu sintezu su koniferilni, sinapilni i p-kumarilni alkohol.

## 2.2. ENZIMI U RAZGRADNJI CELULOZNIH SIROVINA

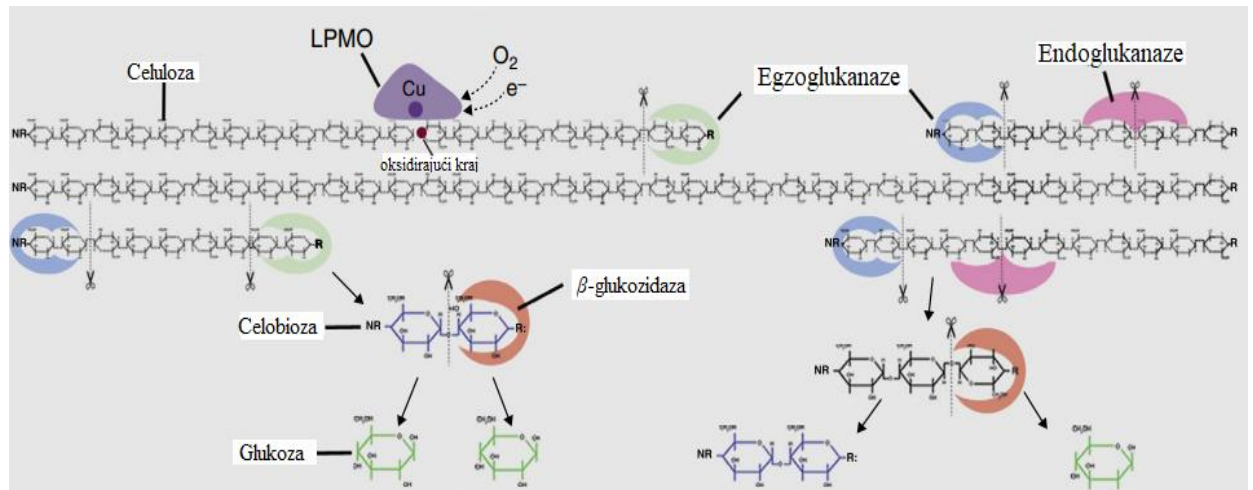
Uspješnost biološke razgradnje celuloze ovisi o njenim fizikalnim svojstvima kao što su veličina čestica, udjel kristalinične strukture u odnosu na amorfnu, stupanj polimerizacije te površina celuloze dostupne za hidrolizu (Rezić i sur., 2021). Biološku razgradnju provode različite gljive pomoću hidrolitičkih i oksidoreduktivnih enzima koji su klasificirani u bazu enzima s aktivnošću na kompleksne ugljikohidrate i glikokonjugate (CAZy) (Borisova i sur.,

2015). Sposobnost gljiva da učinkovito razgrađuju LC sirovine slična je rastu micelija u kojem gljive transportiraju hranjive tvari poput izvora dušika i željeza u lignocelulozni supstrat kao izvor ugljika siromašan spomenutim tvarima, s time da najbržu i najučinkovitiju razgradnju provode gljive iz klase bazidomiceta. Gljive imaju dva tipa razgradnih sustava: intracelularni te egzocelularni sustav enzima koji uključuje hidrolitičke enzime zadužene za razgradnju polisaharida te oksidativne enzime koji razgrađuju lignin (Sánchez, 2009). Podjela tih gljiva se vrši na osnovu mehanizma razgradnje te sadržaju enzima u tri osnovne grupe: gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje svih komponenti LC sirovina, a gljive koje se uzgajaju za dobivanje enzimskih pripravaka su askomicete poput *Aspergillus niger* te *Trichoderma reesei*. Gljive smeđeg truljenja pripadaju klasi bazidomiceta, razgrađuju celulozu i hemicelulozu, no puno slabije razgrađuju lignin. Mehanizam njihovog djelovanja moguće je objasniti Fentonovim mehanizmom uz posredovanje kompleksa željeza. Fentonov mehanizam označava stvaranje radikala kisika te oksidativnu razgradnju LC sirovina bez direktnog djelovanja enzima. Gljive mekog truljenja uključuju djelovanja enzima lakaze i oksidoreduktaze na polisaharide površine biljaka, prilikom čega dolazi do njihovog tamnjenja i omekšavanja. Gljive mekog truljenja koje se koriste za razgradnju LC sirovina uglavnom pripadaju klasi askomiceta, te rodovima *Neurospora* i *Aspergillus* (Andlar i sur., 2018). Pokazalo se da se korištenjem enzimskih pripravaka izdvojenih iz podloge nakon uzgoja gljiva postiže brža i selektivnija razgradnja nego korištenjem kompletne podloge što je razlog korištenja enzimskih pripravaka u industrijskom mjerilu (Silva i sur., 2010).

Biokonverzija lignocelulozne biomase u određene proizvode uključuje nekoliko koraka: predtretman koji može biti mehanički, kemijski ili biološki, a odnosi se na usitnjavanje biomase i uklanjanje lignina, zatim razgradnja polimera do šećera heksoza i pentoza, korištenje dobivenih šećera za mikrobn rast ili proizvodnju kemijskih tvari te izdvajanje i pročišćavanje konačnog proizvoda. Biokonverzijom LC sirovina proizvodi se bioetanol i biodizel (Sánchez, 2009), papir i karton, supstrat za uzgoj jestivih gljiva ili hrana za životinje, ali se također mogu dobiti sirovine za proizvodnju prehrambenih aditiva (Horn i sur., 2012; Meier i sur., 2018; Sagarika i sur., 2022).

Enzimi koji sudjeluju u razgradnji celuloze uglavnom imaju katalitičku domenu i domenu za vezanje supstrata (Andlar i sur., 2018). Razgradnja celuloze uključuje djelovanje tri klase enzima: endoglukanaze (endo-1,4-( $\beta$ )-glukanaze; EC 3.2.1.4), egzoglukanaze (EC 3.2.1.91) i  $\beta$ -glukozidaze (EC 3.2.1.21). Mehanizam djelovanja prikazan je na slici 2. Endoglukanaze djeluju na amorfne dijelove celuloze tako da cijepaju  $\beta$ -1,4 glikozidnu vezu pri čemu nastaju reducirajući i nereducirajući krajevi celuloznog lanca na koje zatim mogu djelovati

egzoglukanaze koje s krajeva lanaca odcjepljuju dimer celobiozu. Endoglukanaze se prema supstratu koji se koristi za određivanje njihove aktivnosti nazivaju karboksimetilcelulazama (CMC), a egzoglukanaze se zbog svoje aktivnosti nazivaju još i celobiohidrolaze (CBH) (Dimarogona i sur., 2012).  $\beta$ -glukozidaze hidroliziraju celobiozu, ali i neke gluko-oligosaharide do glukoze (Horn i sur., 2012).



**Slika 2.** Mehanizam razgradnje celuloze sinergističkim utjecajem celulaza i LPMO (prema Cragg i sur., 2015) \* NR-nereducirajući kraj, R-reducirajući kraj

Celulolitički enzimski sustavi često sadržavaju nekoliko egzo- i endoaktivnih enzima koji mogu imati različiti afinitet prema različitim oblicima celuloze (kristalinična u odnosu na amorfnu celulozu). Ta pojava djelomično je posljedica vezanja različitih nekatalitičkih modula za vezanje ugljikohidrata (engl. *carbohydrate binding modules*, CBM) na katalitičku domenu celulolitičkih enzima (Borisova i sur., 2015). Uloga ovih modula je da prepoznaju supstrat te omogućuju interakciju enzima i supstrata kojom dolazi do reakcije (Boraston i sur., 2004).

Osim hidrolitičkih enzima, pokazalo se da i oksidativni enzimi sudjeluju u razgradnji polisaharida biljne biomase. Ti enzimi klasificirani su u CAZy bazi kao „pomoćni enzimi“ (AA) te u sinergiji s hidrolitičkim enzimima značajno pospješuju razgradnju lignoceluloznih sirovina. Posebnu pažnju privukle su litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) zbog mogućnosti da direktno oksidiraju kristaliničnu celulozu čime se značajno ubrzava i povećava učinkovitost razgradnje LC sirovina (Andlar i sur., 2018).

### 2.3. CAZy KLASIFIKACIJA ENZIMA

Klasifikacija enzima s aktivnošću na kompleksne ugljikohidrate i glikokonjugate (engl. *Carbohydrate-Active EnZymes*, CAZymes), za razliku od sistematizacije Međunarodne unije

biokemije i molekularne biologije (IUBMB) koja za klasifikaciju koristi mehanizam djelovanja enzima, za sistematizaciju koristi sličnost slijeda aminokiselinskih sekvenci u enzimu, smatanje proteina te mehanizam djelovanja enzima, a ti se podaci od 1998. godine uvode i ažuriraju u CAZy bazu. CAZYmes su odgovorni za sintezu i razgradnju glikokonjugata, oligo- i polisaharida, često su uključeni u imunološke interakcije između domaćina i patogena te su uključeni u razvoj ljudskih bolesti te bolesti agrokultura. Glikokonjugati, oligo- i polisaharidi imaju ne samo strukturnu ulogu ili ulogu skladištenja energije već sudjeluju u mnogim unutarstaničnim i međustaničnim sustavima prepoznavanja. CAZymes imaju važnu ulogu u biosintezi i razgradnji stanične stijenke biljaka koja predstavlja najbogatiji izvor ugljika na Zemlji te se stoga ti enzimi smatraju ključnima za proizvodnju biogoriva. Oko 1 do 5 % gena živućih organizama se odnosi na gene koji kodiraju upravo za ove enzime. Do 2013. godine CAZy baza imala je 300 različitih kategorija podijeljenih u 5 klasa: glikozid hidrolaze (engl. *glycoside hydrolases*, GH), glikozil transferaze (engl. *glycosyl transferase*, GT), polisaharidne liaze (engl. *polysaccharide lyases*, PL), esteraze ugljikohidrata (engl. *carbohydrate esterases*, CE) i nekatalitičke module za vezanje ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-binding modules*, CBM) (Levasseur i sur., 2013). 2013 godine uvedena je nova klasa enzima naziva „enzimi s pomoćnom aktivnošću“ (engl. *auxiliary activities*, AA) te trenutno broji i preko 400 kategorija enzima (CAZy, 2022).

GH su najbrojnija klasa enzima te se prema podacima dostupnim u CAZy-u (CAZy, <http://www.cazy.org>) dijele u 173 potklase. GH kataliziraju hidrolizu glikozidne veze između dva ugljikohidrata ili ugljikohidrata i drugih molekula (Rezić i sur., 2021). Enzimi ove klase pokazuju različitu aktivnost ovisno o vrsti supstrata i njegovim fizikalno kemijskim karakteristikama, a prema mjestu djelovanja dijelimo ih na GH koji djeluju na krajeve, odnosno na središnji dio polimernih ugljikohidratnih lanaca. GT kataliziraju formiranje glikozidne veze između šećernih skupina i određene akceptorske molekule. S obzirom na prostorni raspored molekula supstrata i reakcijskog produkta, GT mogu biti klasificirani kao enzimi koji mijenjaju odnosno ne mijenjaju optičku aktivnost produkta u odnosu na supstrat (Sinnot, 1990). Polisaharidne liaze (EC 4.2.2.) kataliziraju  $\beta$ -eliminaciju polisaharidnog lanca koji sadrže uronske kiseline prilikom čega nastaje nezasićena heksenuronska kiselina te novi reducirajući kraj na polisaharidnom lancu. Esteraze ugljikohidrata kataliziraju O ili N acetilaciju esterske veze supstituiranih šećera. CE kategorija enzima koristi dvije klase supstrata: klasa u kojoj se šećer ponaša kao kiselina (poput metiliranog pektina), te klasa u kojoj se šećer ponaša kao alkohol (poput acetiliranog ksilana). Nekatalitički moduli za vezanje ugljikohidrata definirani su kao aminokiselinske sekvence u sklopu aktivnog enzima s funkcijom vezanja ugljikohidrata.

Potreba za CBMovima kao zasebnim modulima unutar većih enzima razlikuje ih od drugih nekatalitičkih proteina koji vežu ugljikohidrate kao što su lektini ili transportni proteini.

### 2.3.1. Enzimi s pomoćnom aktivnošću (AA)

Enzimi s pomoćnom aktivnošću (AA) je zadnja kategorija dodana u CAZy bazu. Enzimi koji pripadaju u ovu kategoriju također su svrstani u nju prema sličnosti proteinskih sekvenci s jednom ili više biokemijski okarakteriziranih enzima „osnivača“ kategorije (CAZy, 2022) (Rezić i sur., 2021). Stoga, AA kategorija obuhvaća širok spektar enzima koji nisu striktno ograničeni na jedan mehanizam katalitičke reakcije ili na specifični supstrat, a uključuje lakaze, celobioza dehidrogenaze, oksidaze i druge enzime koji provode reakcije oksidacije i redukcije (Andlar i sur., 2018). Potreba za dodavanjem nove kategorije nastala je otkrićem da su enzimi CBM33 i GH61 zapravo polisaharidne litičke monooksigenaze (engl. *lytic polysaccharide mono-oxygenases*, LPMO), a s obzirom na to da se lignin gotovo uvijek nalazi s polisaharidima u staničnoj stijenci, nova kategorija uključuje LPMO i oksidoreduktivne enzime uključene u razgradnju lignina. AA kategorija enzima uključuje 9 potkategorija ligninolitičkih enzima te 8 potkategorija LPMO.

### 2.3.2. Klasifikacija LPMO

Od 1950-ih postoji ideja o hidrolizi celuloze (Reese i sur., 1950) prilikom koje određena, nehidrolitička komponenta remeti strukturu polimera čineći ga dostupnijim za hidrolitičke enzime. Spomenuta komponenta otkrivena je 1992. godine prilikom izrade banke DNA gljive *Agaricus bisporus* (Raguz i sur., 1992), ali se tek 2005. godine otkrio njezin učinak na hitin (Vaaje-Kolstad i sur., 2005), odnosno 2007. godine na celulozu (Merino i Cherry, 2007). 2010. godine otkrilo se da joj je funkcija drukčija od GH enzima, odnosno da je to potpuno nova skupina enzima (Vaaje-Kolstad i sur., 2010), a 2013. godine LPMO enzimi su svrstani u novu kategoriju u CAZy bazi. Trenutno su LPMO enzimi kategorizirani u osam grupa (AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15, AA16 i AA17). Grupa AA9 uključuje enzime iz gljiva koji su prvotno bili kategorizirani u grupu GH61, grupa AA10 enzime prvotno kategorizirane u grupu CBM33, te enzime identificirane u različitim organizmima poput eukariota, arheja i bakterija. Grupi AA11 i AA13 pripadaju LPMO izolirani iz gljiva, a AA14 grupi pripadaju enzimi koji razgrađuju ksilan te oksidiraju atom ugljika na položaju C1. Grupa AA15 formirana je prema istraživanju Sabbadina i suradnika iz 2018. godine u kojem su proučavali djelovanje enzima animalnog podrijetla izoliranih iz *Thermobia domestica*, beskrlnog četinaša koji se hrani ugljikohidratima poput škrobi. Grupa AA16 formirana je nakon istraživanja Filiatrault-Chastela

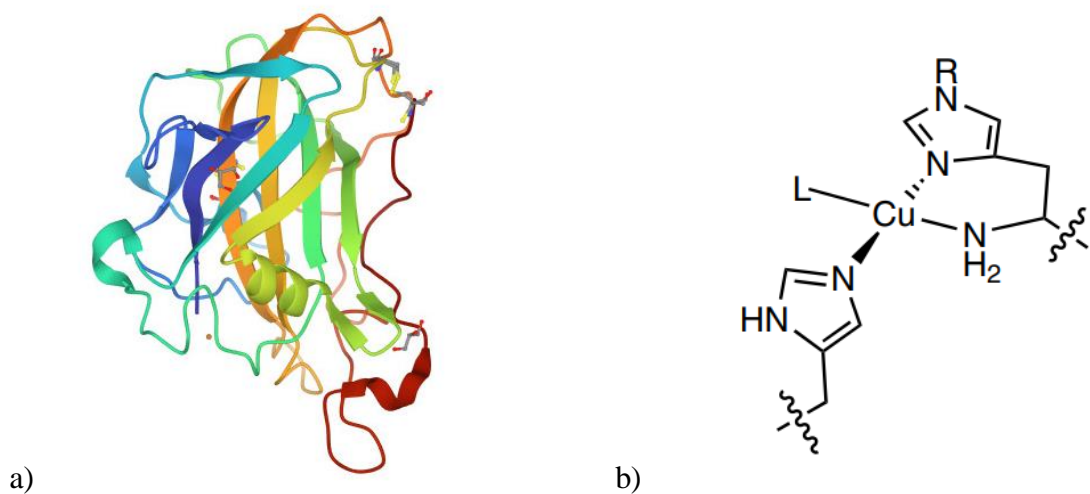
i suradnika iz 2019. godine u kojem su izolirali i karakterizirali enzim iz gljive *Aspergillus aculeatus*. Zadnje dodana grupa AA17 formirana je također nakon istraživanja Sabbadina i suradnika, karakterizacijom enzima izoliranih iz *Phytophthora infestans* koja je u 19 stoljeću u Irskoj uzrokovala bolest krumpira i glad (Sabbadin i sur., 2021). Prisutnost ovog enzima u različitim (mikro)organizmima koji razgrađuju ugljikohidrate ukazuje na njegovu važnost i potencijal za korištenje u dobivanju obnovljive energije. Broj gena koji kodiraju za LPMO varira od organizma do organizma, a iznosi od nekoliko pa do 40 gena. Transkripcija i ekspresija tih gena ovisi o uvjetima rasta (mikro)organizama te je pretpostavka da je regulirana u ovisnosti o sastavu lignocelulozne biomase (Rezić i sur., 2021).

## 2.4. KARAKTERISTIKE I STRUKTURA LPMO

Iako postoje varijacije u strukturi između različitih grupa LPMO, svima im je zajednička  $\beta$ -sendvič struktura tipična za imunoglobuline koju čini 8-10 antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča koje su povezane s petljama s različitim brojem  $\alpha$ -uzvojnica (slika 3A). Domene LPMO obično sadrže 200 – 250 aminokiselina kao i kod imunoglobulina, a konačan broj ovisi o dužini petlji koje povezuju  $\beta$ -strukture. U strukturi LPMO prisutne su i disulfidne veze, obično dvije ili tri (Span i sur., 2015). Aktivno mjesto LPMO enzima nalazi se u središtu ravne površine, izloženo djelovanju otapala, za razliku od glikozid hidrolaza koje imaju tunele i utore za vezanje supstrata. Aktivno mjesto sadrži bivalentni ion bakra koordiniran s tri atoma dušika, jedan iz imidazolnog prstena, drugi iz N-terminalne skupine jednog histidina, te treći iz imidazolnog prstena drugog histidina koji tvore T-strukturu koja se naziva „histidinska brana“ (slika 3b) (Ciano i sur., 2018). Pokazalo se da i molekula tirozina (odnosno fenilalanina u grupama AA10 i AA15 koji razlažu hitin) ima ulogu u katalizi (Vaaje-Kolstad i sur., 2017). U fungalnim LPMO N-terminalna skupina histidina je posttranslacijski metilirana. Pretpostavlja se da metilacija nema katalitičku ulogu, već pruža zaštitu od autooksidacijske inaktivacije LPMO (Petrović i sur., 2018).

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





**Slika 3.** a. Struktura *NcLPMO9C* (Borisova i sur., 2015) b. „Histidinska brana“ (Ciano i sur., 2018)

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

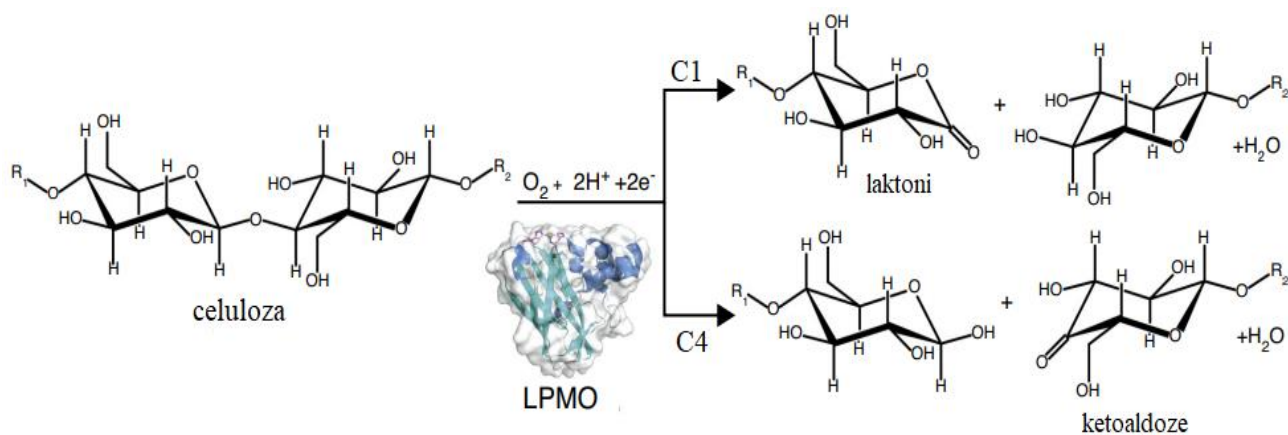
## 2.5. AKTIVNOST LPMO

Dosad otkriveni LPMO pokazuju aktivnost samo na  $\beta$ -1,4 i  $\alpha$ -1,4- glikozidnim vezama polisaharida. Supstrati na koje LPMO djeluju mogu biti netopljivi poput kristalinične celuloze, hitina i škroba (Harris i sur., 2014; Beeson i sur., 2015; Vu i sur., 2019) ili djelomično odnosno potpuno topljivi poput hemiceluloze, ksilana, ksiloglukana i beta-glukana (Agger i sur., 2014).

LPMO enzimi cijepaju glikozidne veze oksidativnim mehanizmom u prisutnosti kisika (bilo da on dolazi iz molekule kisika ili vodikovog peroksida) te vanjskog elektron-donora (Berka i sur., 2011). Prvi korak katalize je redukcija bivalentnog atoma bakra Cu (II) u aktivnom mjestu u Cu (I) pomoću donora elektrona te aktivacija molekularnog kisika/vodikovog peroksida. LPMO prihvaća elektrone raznih reducensa, bilo da su oni dodani (poput askorbinske ili galne kiseline), da dolaze iz supstrata (fenolni spojevi nastali razgradnjom lignoceluloze) ili da dolaze

iz enzima koji djeluju sinergistički s LPMO poput celobioza dehidrogenaze, ali i formaldehid oksidoreduktaza, polifenol oksidaza i lakaza (Wang i sur., 2021). Redukcija bakra u aktivnom mjestu uzrokuje male konformacijske promjene LPMO (Aachmann i sur., 2012; Kracher i sur. 2018) čime se povećava njegov afinitet prema supstratu. Ovako katalitički aktivan LPMO „izdvaja“ vodik iz glikozidne veze u supstratu (s C1 ili C4 ugljikovog atoma) čime dolazi do disbalansa elektrona glikozidne veze, a naposljetku i do njenog cijepanja reakcijom eliminacije (Phillips i sur., 2011). Trenutno nije razjašnjen mehanizam kojim LPMO aktivira O<sub>2</sub> ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te cijepa C – H vezu. Tome pridonosi i vjerojatnost da različite kategorije LPMO iskazuju različite oksidativne mehanizme tijekom cijepanja (Ciano i sur., 2018).

S obzirom na primarnu strukturu te na specifičnost prema supstratu LPMO enzime je moguće podijeliti na tri tipa (slika 4): LPMO-1 tip enzima koji oksidira C1 atom ugljika što dovodi do formiranja laktona koji spontano hidroliziraju u aldonske kiseline, LPMO-2 tip koji djeluje na C4 atom ugljikovih spojeva prilikom čega nastaju ketoaldoze koje u vodenim otopinama hidroliziraju u gem-diole. LPMO-3 tip je slabije specifičan pa djeluje i na C1 i na C4 atome ugljikovih spojeva (Dimarogona i sur., 2012). Pretpostavlja se i postojanje drugih tipova LPMO, poput C6-oksidirajućih (Quinlan i sur., 2011).

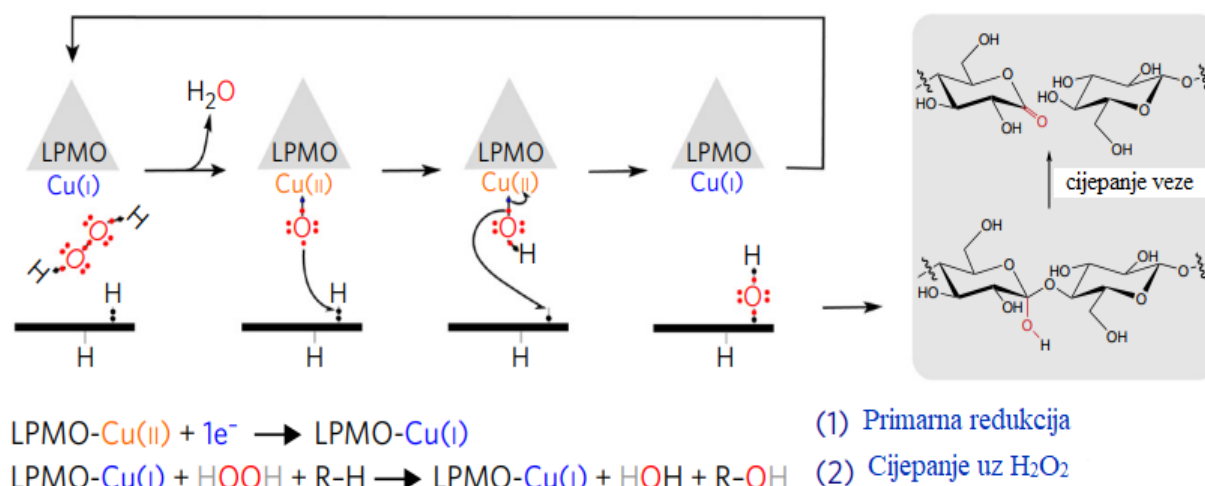


**Slika 4.** Produkti C1- i C4 oksidacije celuloznih supstrata (prema Vaaje-Kolstad i sur., 2017)

### 2.5.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub> kao kosupstrat

Ekperimentom Erikssona i suradnika iz 1974. (Eriksson i sur., 1974) godine dokazana je važnost kisika i oksidativnog procesa u razgradnji celuloze, te se stoga od otkrića LPMO mehanizam razgradnje opisuje kao monooksigenazna reakcija u kojoj molekula kisika služi kao akceptor elektrona. Istraživanjem Bissaro i suradnika iz 2017. godine pokazalo se da LPMO preferira H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao kosupstrat (Bissaro i sur., 2017). Dokazali su da u odsutnosti supstrata dolazi do sinteze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao produkta reakcije između kisika i reducensa, dok u prisutnosti supstrata nije moguće detektirati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Razlog tome je korištenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao kosupstrata za reakciju

oksidacije. Kinetička istraživanja bakterijskih LPMO i LPMO iz gljiva pokazala su da su konstanta specifičnosti ( $k_{cat}$ ) prividni afinitet enzima prema supstratu ( $K_m$ ) te katalitička učinkovitost s  $H_2O_2$  kao kosupstratom ( $k_{cat}/K_m$ ) duplo veći nego s  $O_2$  kao kosupstratom (Kuusk i sur., 2018). Ove zaključke dodatno podupiru istraživanja redoks parova koji generiraju  $H_2O_2$  (Bissaro i sur., 2017; Kracher i sur., 2020). Navedeno ne isključuje mogućnost da pravi mehanizam ovisi o biološkim uvjetima reakcije razgradnje te o dostupnosti supstrata odnosno kosupstrata. Predloženi mehanizam reakcije s  $H_2O_2$  kao kosupstratom prikazan je na slici 5. Bakar (Cu(II)) u aktivnom mjestu LPMO reducira u Cu(I) u koraku koji se naziva primarna redukcija, a zatim reagira s  $H_2O_2$  u prisustvu supstrata. Ova reakcija rezultira eliminacijom molekule vode te stvaranjem Cu(II)-oksil intermedijera (ili Cu(III)-okso intermedijera) koji može izdvojiti atom vodika iz supstrata.



**Slika 5.** Mehanizam oksidativnog cijepanja glikozidne veze polisaharida uz  $H_2O_2$  kao kosupstrat (prema Bissaro i sur. 2017)

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

Ključna razlika u korištenju  $H_2O_2$  i  $O_2$  kao kosupstrata je potreba za reducensom. U monooksigenanim reakcijama količina reducensa stehiometrijski odgovara količini formiranog produkta, dok je u peroksigenanim reakcijama potrebna samo primarna redukcija, a kasnije samo povremeno nakon reoksidacije LPMO (Forsberg i sur., 2019).

### 2.5.2. Operacijska stabilnost enzima

Inaktivacija biokatalizatora (enzima) neizbježna je pojava, a ovisi o vrsti enzima i inaktivacijskim uvjetima. Konformaciju enzima održava pet vrsti veza: vodikove veze između polarnih aminokiselina i između peptidnih veza, hidrofobne interakcije između nepolarnih aminokiselina, ionske veze između suprotno nabijenih aminokiselinskih ostataka te kovalentne veze između aminokiselinskih ostataka cisteina, tzv. disulfidni mostovi (Filip i sur., 2016). S obzirom na to da su sve navedene veze osim kovalentnih slabe, može se zaključiti da su enzimi osjetljivi na promjene pH, temperature, ionske jakosti te je stoga potrebno voditi računa o reakcijskim uvjetima u kojima se koriste.

Stabilnost enzima definirana je kao ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog vremena, a moguće je razlikovati operacijsku stabilnost (engl. *operational stability*) i stabilnost u uvjetima skladištenja (engl. *storage stability*). Stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o uvjetima skladištenja, fizikalnom stanju enzima, o dodatku supstrata, efektoru, inhibitora ili stabilizatora te o temperaturi na kojoj se čuva. Operacijska stabilnost je stabilnost enzima tijekom kontinuirane uporabe koja se često izražava kao vrijeme poluraspada enzima ( $t_{1/2}$ ), odnosno kao vrijeme potrebno da se početna aktivnost enzima snizi na polovinu početne vrijednosti. Osim vremena poluraspada, za definiranje operacijske stabilnosti može se koristiti i vrijednost konstante deaktivacije,  $k_d$ . Operacijska stabilnost biokatalizatora ovisi o: tipu procesa, postupku pripreme biokatalizatora, početnoj koncentraciji supstrata, koncentraciji produkta, konverziji i akumulaciji supstrata, mediju u kojem se provodi reakcije, temperaturi i vremenu rada (Findrik, 2017).

### 2.5.3. Popratne reakcije i inaktivacija LPMO

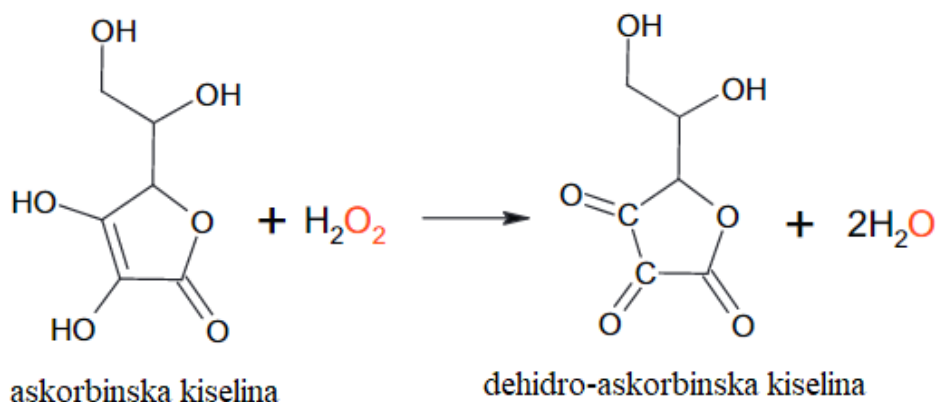
Atom bakra u aktivnom mjestu stabilizira LPMO strukturu, no osim toga malo je poznato o strukturnoj stabilnosti LPMO. Uzimajući u obzir vrlo snažne redoks spojeve koji nastaju u aktivnom mjestu LPMO, moguće je da je zaštita od destruktivnih oksidativnih popratnih reakcija bila pokretačka snaga u evoluciji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

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

Iako visoke koncentracije  $H_2O_2$  dokazano ubrzavaju reakciju LPMO, previsoke

koncentracije u (odnosu na koncentracije enzima i supstrata) uzrokuju oksidativna oštećenja histidina u aktivnom mjestu, odnosno inaktivaciju enzima (Bissaro i sur., 2017). Također, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u bilo kojoj reakcijskoj otopini može uzrokovati oksidacijska oštećenja Fentonovim mehanizmom (Eijsink i sur., 2019). Popratna reakcija LPMO koja rezultira generiranjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz reducens i kisik, a u odsutnosti supstrata, ima dva predložena mehanizma: u prvom se molekularni kisik reducira u aktivnom mjestu LPMO, otpušta se nastali superoksid koji zatim spontano prelazi u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Drugi mehanizam opisuje nastajanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u aktivnom mjestu enzima. Prvo dolazi do redukcije molekularnog kisika, nakon čega slijedi dodatna redukcija drugim elektronom te adicija dva protona kako bi se superoksid reducira u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Iako ova popratna reakcija generalno doprinosi aktivnosti LPMO (jer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> djeluje kao kosupstrat), akumulacijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može doći do spomenutog oksidativnog oštećenja aktivnog mjesta LPMO, odnosno do njegove inaktivacije (Hegnar i sur., 2018). Do generiranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi i reakcijom molekularnog kisika s reducensom uz ione bakra kao katalizatora čak i kada je on dodan u mikromolarnim koncentracijama (Stepnov i sur., 2021a).

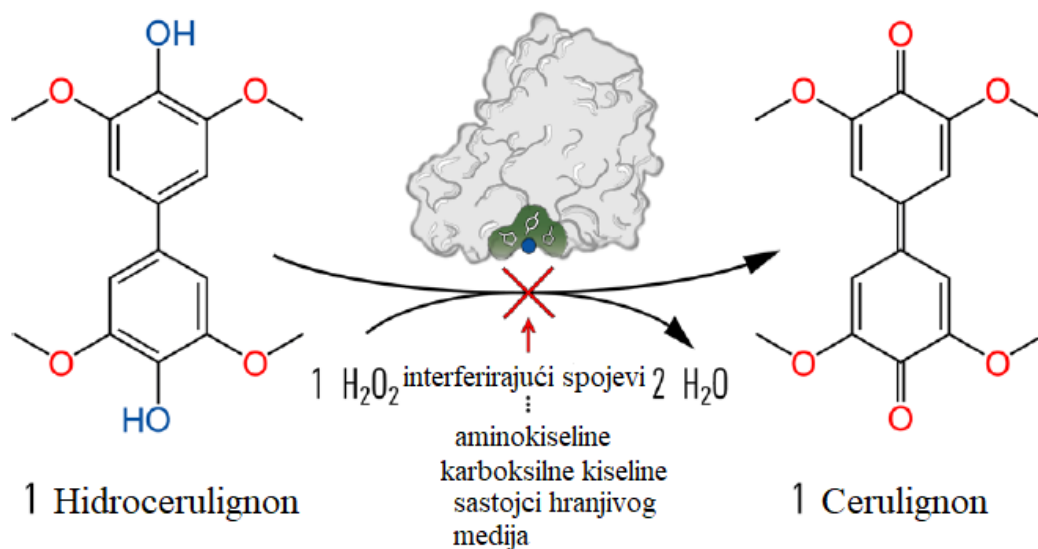
Dodatak različitih koncentracija reducensa također ima utjecaj na aktivnost LPMO (Kuusk i sur., 2018). Ukoliko LPMO nije vezan na supstrat, on može posredovanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz aktivne LPMO-Cu (I) forme oksidirati u LPMO-Cu (II). Potonje rezultira stehiometrijskom oksidacijom reducensa (na slici 6 prikazana reakcija oksidacije askorbinske kiseline) te se ta reakcija naziva reakcija peroksidacije reducensa (Kuusk i Väljamäe, 2021). Aktivnost ovako oksidiranog reducensa dovodi do ireverzibilne inaktivacije enzima (Bissaro i sur., 2017). Utjecaj reakcije peroksidacije reducensa na inaktivaciju enzima raste smanjenjem koncentracije supstrata.



**Slika 6.** Reakcija peroksidacije reducensa (askorbinske kiseline) (prema Kuusk i Väljamäe, 2021)

#### 2.5.4. Mjerenje aktivnosti LPMO

Posljednjih godina razvijene su razne metode za detekciju i istraživanje aktivnosti LPMO, uključujući kromatografiju, masenu spektrometriju te brze metode detekcije pogodne za razne primjene. Iako su enzimi veoma različiti, postoji nekoliko pravila koja vrijede za sve testove. Vremenski ovisna konverzija supstrata u produkt mora biti mjerljiva odabranim testom. Koncentracija produkta direktno je povezana sa smanjenjem koncentracije supstrata, stoga njegovo smanjenje može biti mjera reakcije. Problemi mjerenja su pogreške mjernog instrumenta, utjecaj matrice te pogreške izazvane ljudskim faktorom.. Također je važno da samo analit izaziva odziv, stoga je potrebno voditi računa o mjerenju slijepih proba. Najjednostavniji način za praćenje reakcije su spektrofotometrijske metode. Spektrofotometrijsku metodu za mjerenje aktivnosti LPMO razvili su 2019. godine Breslmayr i suradnici (Breslmayr i sur. 2019). Njihova metoda bazira se na peroksidnoj aktivnosti LPMO koja ovisi o početnoj redukciji Cu(II) u aktivnom mjestu u Cu(I) uz hidrocerulignon (HC) kao supstrat, te naknadnom vezanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prilikom čega dolazi do otpuštanja vode i formiranja obojenog spoja cerulignona (slika 7). Stehiometrija reakcije iznosi 1:1, a apsorbanacija cerulignona mjeri se pri 469 nm.



**Slika 7.** Reakcijska shema oksidacije hidrocerulignona (prema Breslmayr i sur., 2019)

S obzirom na to da se aktivno mjesto LPMO nalazi na ravnoj površini izloženoj djelovanju otpala, dokazan je inhibirajući efekt aminokiselina, karboksilnih kiselina te nekih sastojaka hranjive podloge na aktivnost LPMO. Kako bi se povećala robusnost i osjetljivost metode, potrebno je prilagoditi metodu, pri čemu u razmatranje treba uzeti četiri faktora: (1) na aktivnost LPMO može utjecati sposobnost formiranja kompleksa pufera s aktivnim mjestom LPMO-a (2)

povećanjem ionske jakosti pufera smanjuje se aktivnost LPMO, (3) viša pH vrijednost eksponencijalno povećava peroksidaznu aktivnost LPMO, (4) povećana koncentracija supstrata hidrocerulignona i kospustrata  $H_2O_2$  povećava aktivnost LPMO. Postoje granične koncentracije pri kojima dolazi do autooksidacije hidrocerulignona odnosno do deaktivacije LPMO s  $H_2O_2$ , a one iznose  $500 \mu M$  za HC te  $100 \mu M$  za  $H_2O_2$  (Breslmayr i sur., 2019).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Enzim

Enzim korišten u mjerenjima je polisaharidna litička monooksigenaza izolirana iz gljive *Neurospora crassa* (NcLPMO).

#### 3.1.2. Kemikalije

- Albumin goveđeg seruma (BSA), Honeywell Fluka, Sjeverna Karolina, SAD
- Askorbinska kiselina,  $C_6H_8O_6$ , Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Celuloza (Avicel), Merck, Darmstadt Njemačka
- Commssie Brilliant Blue G-250 (CBB), Honeywell Fluka, Sjeverna Karolina, SAD
- Demineralizirana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- EDTA, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- Etanol, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Hidrocerulignon (HC), MP Biomedicals, Irvine, California, SAD
- Natrijev acetat, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Octena kiselina,  $w(C_2H_4O_2) = 99,5 \%$ , AnalaR, UK
- Ortofosforna kiselina,  $w(H_3PO_4) = 88 \%$ , T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- TRIS (hidroksimetil) aminometan, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, SAD
- Ultra čista voda (dobivena koristeći Mili-Q sustv, Millipore, El passo, Teksas, SAD)
- Vodikov peroksid,  $w(H_2O_2) = 30 \%$ , Gram Mol, Zagreb, Hrvatska

#### 3.1.3. Otopine i puferi

- Bradfordov reagens  
Commassie Brilliant G-250 (100 mg)  
Otopina 95 % etanola (50 mL) i 85 % ortofosforne kiseline (100 mL)  
Ultračista voda (do 1000 mL)
- Natrijev acetatni pufer (NaAc) (100 mM, pH = 6)  
Octena kiselina,  $w(C_2H_4O_2) = 99,5 \%$  (do pH 6)  
Natrijev acetat (1,6496 g)  
Ultračista voda (200 mL)



- Natrijev fosfatni pufer (50 mM, pH = 6)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
NaOH 0,1 mol/dm<sup>3</sup> (do pH 6)
- Otopina 10 mM EDTA u 10mM Tris pH = 8  
Tris (0,12 g u 100 mL ultračiste vode)  
EDTA (0,292 g u 100 mL ultračiste vode)
- Testna otopina za mjerenje aktivnosti  
5 mM otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µL)  
25 mM otopina HC u DMSO (7,65 mg HC u 1 mL DMSO) (20 µL)  
100 mM NaAc pufer (760 µL/940 µL multi uzorak)

#### 3.1.4. Aparatura i oprema

- Analitička vaga, *AUW120*, Shimadzu, Kyoto, Japan
- Centrifuga *Universal 320R*, Hettich, Westphalia, Njemačka
- Homogenizator *MX-S*, DLab, Peking, Kina
- Laboratorijski pribor (ependorffice s filtrom (engl. *Ultra centrifugal filter device*), čaše, menzure, automatske pipete, ependorffice, stalak za kivete, stalak za ependorffice, špatule, kvarcne kivete)
- Liofilizator *FreeZone 1*, Labconco, Kansas, SAD
- Magnetna miješalica *EcoStir*, DLab, Peking, Kina
- pH metar, *Lab 860*, Schott Instruments, Mainz, Njemačka
- Stolna centrifuga *Combi - Spin FVL – 2400N*, BioSan, Riga, Latvija
- Termostatirana tresilica *Thermo Shaker TS-100*, BioSan, Riga, Latvija
- UV spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*, Shimadzu, Kyoto, Japan

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje aktivnosti LPMO

Za mjerenje aktivnosti enzima korištena je metoda prema Breslmayr i suradnicima (2019). Sastav testa naveden je u tablici 1. Komponente testne otopine stabilne su tijekom 12 h. Prije mjerenja aktivnosti i dodatka uzorka testna otopina zagrijava se na termostatiranoj tresilici pri 30 °C tijekom 5 minuta, a potom se prebacuje u kvarcnu kivetu zapremine 1 mL.

**Tablica 1.** Sastav testa za mjerenje aktivnosti LPMO

Komponenta	Koncentracija u testu	Temeljna otopina	V [ $\mu$ L] za nulti uzorak	V [ $\mu$ L]
NaAc pufer pH 6		100 mM	940	760
HC	500 $\mu$ M	25 mM u DMSO	20	20
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 $\mu$ M	5 mM u H <sub>2</sub> O	20	20
uzorak			20	200

\*HC-hidrocerulignon; NaAc pufer-natrij acetatni pufer

Dodatkom uzorka enzima u testnu otopinu započinje se s mjerenjem promjene apsorbancije u vremenu ( $\Delta ABS/\Delta t$ ) spektrofotometrijski pri 436 nm tijekom 200 s (300 s u eksperimentima s celulozom).

### 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je spektrofotometrijskom metodom prema Bradfordu (Bradford, 1976). Reagens za određivanje proteina pripremljen je miješanjem 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250, 50 mL 95 %-tnog etanola i 100 mL ortofosforne kiseline te dodatkom ultračiste vode do volumena 1000 mL. Dobivena smjesa se višestruko filtrira kroz 0,45  $\mu$ m šprica filter do smeđe boje te se čuva u boci omotanoj folijom u hladnjaku na 4 °C. Reagens je prije upotrebe potrebno temperirati na sobnu temperaturu laganim miješanjem na magnetskoj miješalici.

Radi određivanja nepoznate koncentracije proteina u uzorku potrebno je izraditi baždarni dijagram. Pripremi se temeljna otopina BSA u ultračistoj vodi koncentracije 0,1 mg/mL, a iz nje standardne otopine koncentracija 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L u tri paralelne probe. U plastične kivete kojima je prethodno izmjerena apsorbancija s ultračistom vodom dodaje se 500  $\mu$ L uzorka i 500  $\mu$ L reagensa prilikom čega nastaje plavo obojenje. Nakon miješanja na miješalici te po završetku inkubacije u trajanju 10 min na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija uzorka pri valnim duljinama  $\lambda = 450$  nm i  $\lambda = 595$  nm. Za svaku vrijednost koncentracije albumina od tri uzorka uzeta je srednja vrijednost apsorbancije na temelju čega je konstruiran baždarni pravac opisan jednadžbom  $A = f(c)$  (prilog 1). Ispitivanje koncentracije proteina uzorka u ovom radu određivana je u supernatantu reakcijske otopine u eksperimentima s celulozom kako bi se odredio udio enzima koji se veže na celulozu. Koncentracija proteina u uzorku određivana je istim postupkom kao i koncentracija BSA u standardnim otopinama te je izračunata pomoću baždarnog dijagrama.

### 3.2.3. Uklanjanje metalnih iona iz celuloze

Postupak uklanjanja metalnih iona iz celuloze proveden je prema radu Konta i suradnika (2020). U plastične kivete izvagano je 0,4 g celuloze u koju je dodano po 10 mL 10 mM EDTA u 10 mM Tris pH 8 te je smjesa stavljena na izmućkavanje na tresilici pri sobnoj temperaturi preko noći. Kivete s navedenom suspenzijom su potom centrifugirane radi uklanjanja EDTA, supernatant je izlijevan, a celuloza je isprana tri puta s ultračistom vodom.

### 3.2.4. Liofilizacija celuloze

Celuloza iz koje su uklonjeni metalni ioni je stavljena na 10 minuta na zamrzavanje na temperaturu  $-69\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim u liofilizator Labconoco FreeZone1 gdje je sušena pri temperaturi od  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 12 sati. Ustaljeni tlak na kraju liofilizacije iznosi 0,04 mbar.

## 3.3. STABILNOST LPMO

### 3.3.1. Ispitivanje utjecaja vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) / askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO

Ispitivan je utjecaj različitih početnih koncentracija vodikovog peroksida i askorbinske kiseline na stabilnost LPMO. Stabilnost se ispitala pri koncentracijama navedenima u tablici 2. Za ispitivanje stabilnosti korištene su 10 mM i 1000 mM otopina  $\text{H}_2\text{O}_2$  u ultračistoj vodi (kako bi se smanjio volumen otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  u odnosu na ukupni volumen) i 10 mM otopina AscA u ultračistoj vodi.

**Tablica 2.** Ispitivane koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  i AscA na aktivnost LPMO

$c_0 (\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mM}$	$c_0 (\text{AscA})/\text{mM}$
1	0,1
5	0,3
10	0,5
	1

AscA-askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid*)

Za ispitivanje stabilnosti enzima (9 mg/mL) je najprije bilo potrebno razrijediti u 50 mM natrijevom fosfatnom puferu (NaP) pH vrijednosti 6 u eppendorf kiveti tako da koncentracija u ukupnom volumenu iznosi 0,09 mg/mL. Volumen pufera dobiven je određivanjem razlike ukupnog volumena (1 mL) i volumena otopine vodikovog peroksida odnosno otopine askorbinske kiseline. Prije dodavanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , odnosno AscA potrebno je uzeti nulti uzorak volumena 20  $\mu\text{L}$  te odrediti aktivnost na spektrofotometru pri  $\lambda = 436\text{ nm}$  u vremenskom

intervalu od 200 s.

Nakon mjerenja nulte točke, u reakcijsku smjesu se dodaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odnosno AscA čime se započinje s mjerenjem vremena. Eppendorf kivetu s reakcijskom otopinom potrebno je miješati na termostatiranoj tresilici pri 1400 okretaja/min i 30 °C. Uzorci volumena 20 µL uzimani su u eppendorficu s filtrom te se centrifugiraju na 14 000 okretaja/min tijekom 10 min pri temperaturi 4 °C kako bi se enzim odvojio od ostatka reakcijske smjese. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima ovisno o početnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odnosno AscA i očekivanom utjecaju na aktivnost enzima. Enzim koji je nakon centrifugiranja zaostao na filtru otopi se dodatkom 300 µL 100 mM NaAc pufera pH 6 te se 200 µL otopljenog enzima koristi za mjerenje aktivnosti postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1.

### 3.3.2. Ispitivanje sinergijskog utjecaja vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO

Ispitivanje sinergijskog utjecaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA provodilo se u 2 slučaja: u prvom slučaju je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> držana konstantnom, a koncentracija AscA je mijenjana, dok je u drugom slučaju koncentracija AscA držana konstantnom, a koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je mijenjana. Stabilnost je ispitivana pri koncentracijama navedenima u tablici 3. Za ispitivanje stabilnosti korištena je 10 mM otopina AscA u ultračistoj vodi u oba slučaja, 1000 mM otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ultračistoj vodi za prvi slučaj, te 10, 50 i 1000 mM otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ultračistoj vodi (kako bi se smanjio volumen otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na ukupni volumen) za drugi slučaj.

**Tablica 3.** Ispitivane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA za ispitivanje sinergijskog utjecaja na aktivnost LPMO

Stalna koncentracija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 10 mM	Stalna koncentracija AscA = 0,5 mM
<i>c</i> <sub>0</sub> (AscA)/mM	<i>c</i> <sub>0</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/mM
0,1	0,1
0,5	0,5
1	1
	10

Ispitivanje stabilnosti enzima u oba slučaja provedeno je na način identičan kao u poglavlju 3.3.1. U eksperimentima u kojima se mjerio sinergijski utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na aktivnost enzima, praćena je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mjerenjem apsorbancije reakcijske otopine pri 240 nm.

### 3.3.3. Ispitivanje utjecaja celuloze na stabilnost LPMO

Ispitivan je utjecaj 2 različitih koncentracija celuloze na stabilnost LPMO, 50 mg/mL i 100 mg/mL. Postavljanje pokusa identično je kao u poglavlju 3.3.1. sa sljedećim razlikama: mjerenje vremena od početka reakcije započinje dodatkom otopine enzima u puferu u celulozu, koncentracija enzima je povećana na 0,18 mg/mL zbog pretpostavke da će doći do vezanja određenog udjela enzima na celulozu (Filandr i sur., 2020). Prije izuzimanja uzorka eppendorf kivetu s cjelokupnom reakcijskom smjesom potrebno je centrifugirati na stolnoj centrifugi 2 minute da bi se omogućilo izuzimanje bistrog uzorka. Od ukupnog volumena enzima otopljenog u NaAc puferu (300  $\mu$ L) 200  $\mu$ L otopljenog enzima koristi za mjerenje aktivnosti postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1., a preostalih 100  $\mu$ L se koristi za određivanje koncentracije proteina prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. radi određivanja udjela enzima koji se veže na celulozu. Celulozu koja je korištena u eksperimentima bilo je potrebno pripremiti, odnosno ukloniti metalne ione te je liofilizirati postupcima opisanima u poglavlju 3.2.3. i 3.2.4. Na temelju podataka o aktivnosti enzima te njegovoj koncentraciji, računa se specifična aktivnost enzima ( $A_S$ ) prema jednadžbi 1.

$$A_S = \frac{A}{c_{LPMO}} \quad [1]$$

Prije određivanja koncentracije proteina uzorke je potrebno adekvatno razrijediti kako bi mjerenja ušla u područje mjerenja određeno Bradfordovom metodom.

### 3.3.4. Ispitivanje utjecaja celuloze i dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / AscA

Ispitivan je utjecaj celuloze uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odnosno AscA na stabilnost LPMO. Koncentracija celuloze iznosila je 100 mg/mL, dok su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA dodavani u obliku 50, 100 i 1000 mM otopine (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (kako bi se smanjio volumen otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na ukupni volumen), odnosno 10 mM otopine (AscA). U tablici 4 navedene su ispitivane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA.

**Tablica 4.** Ispitivane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA uz dodatak celuloze (100 mg/mL) na aktivnost LPMO

$c_0$ (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/mM	$c_0$ (AscA)/mM
0,5	0,1
1	0,3
10	0,5
	1

AscA-askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid*)

Mjerenje stabilnosti i koncentracije enzima provodi se kao u poglavlju 3.3.3., s time da se s mjerenjem vremena počne dodatkom celuloze i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odnosno AscA.

### 3.3.5. Ispitivanje dodatka celuloze i sinergijskog učinka vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i askorbinske kiseline (AscA) na stabilnost LPMO

Ispitivan je utjecaj celuloze uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na stabilnost LPMO. Ispitivanje sinergijskog utjecaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA provodilo se u 2 slučaja uz 100 mg/mL celuloze: u prvom slučaju je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> držana konstantnom, a koncentracija AscA je mijenjana, dok je u drugom slučaju koncentracija AscA držana konstantnom, a koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je mijenjana. Stabilnost je ispitivana pri koncentracijama navedenima u tablici 5. Za ispitivanje stabilnosti korištena je 10 mM otopina AscA u ultračistoj vodi u oba slučaja, 1000 mM otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ultračistoj vodi za prvi slučaj, te 50, 250 i 1000 mM otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ultračistoj vodi (kako bi se smanjio volumen otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na ukupni volumen) za drugi slučaj.

**Tablica 5.** Ispitivane koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA za ispitivanje sinergijskog utjecaja na aktivnost LPMO uz 100 mg/mL celuloze

100 mg/mL celuloze	
Stalna koncentracija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 10 mM	Stalna koncentracija AscA = 0,5 mM
<i>c</i> <sub>0</sub> (AscA)/mM	<i>c</i> <sub>0</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/mM
0,1	0,5
0,3	5
0,5	10

Mjerenje stabilnosti provodi se kao u poglavlju 3.3.3., s time da se s mjerenjem vremena počne dodatkom celuloze, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA.

## 3.4. OBRADA PODATAKA

Za opisivanje deaktivacije enzima korišteni su matematički modeli deaktivacije 1. reda (jednadžba 2), 2. reda (jednadžba 3) i n-tog reda (jednadžba 4).

$$\frac{dA}{dt} = k_d \cdot A \quad [2]$$

$$\frac{dA}{dt} = k_d \cdot A^2 \quad [3]$$

$$\frac{dA}{dt} = k_d \cdot A^n \quad [4]$$

gdje je  $k_d$  konstanta brzine deaktivacije,  $A$  aktivnost enzima,  $n$  vrijednost reda deaktivacije. Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist*. Na temelju pretpostavljenih modela deaktivacije i eksperimentalnih podataka procjenjuju se parametri modela te se provodi simulacija. Potrebni parametri procjenjuju se nelinearnom regresijom simpleks metodom ili metodom najmanjih kvadrata koje pronalaze minimalni zbroj kvadrata greške između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela. Simpleks metoda se koristi prilikom određivanja približne vrijednosti parametara, odnosno kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti. Za određivanje vrijednosti parametara prikladnija je metoda najmanjih kvadrata. Nakon procjene parametara slijedi provođenje simulacije rješavanjem diferencijalnih jednadžbi modela. Numeričke metode za rješavanje diferencijalnih jednadžbi sustava *Scientist* su Euler-ova metoda, Runge-Kutta metoda četvrtog reda, Bulirsch-Stoer metoda i EPISODE algoritam. Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta brzine deaktivacije te red reakcije deaktivacije. Navedeni parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje preostale aktivnosti enzima u ispitivanim uvjetima. U svrhu statističke usporedbe modela korišteni su kriteriji koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te *MSC* (engl. *Model Selection Criterion*) (jednadžba 5).

$$MSC = \left( \frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - \overline{Y_{exp}})^2}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (Y_{exp,i} - Y_{rač,i})^2} \right) - \frac{2 \cdot p}{n} \quad [5]$$

Gdje je:  $n$  broj ponavljanja,  $w_i$  težinski faktor,  $Y_{exp,i}$  vrijednost eksperimentalnih podataka,  $\overline{Y_{exp}}$  srednja vrijednost podataka,  $Y_{rač,i}$  vrijednost izračunatih podataka,  $p$  razina signifikantnosti.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

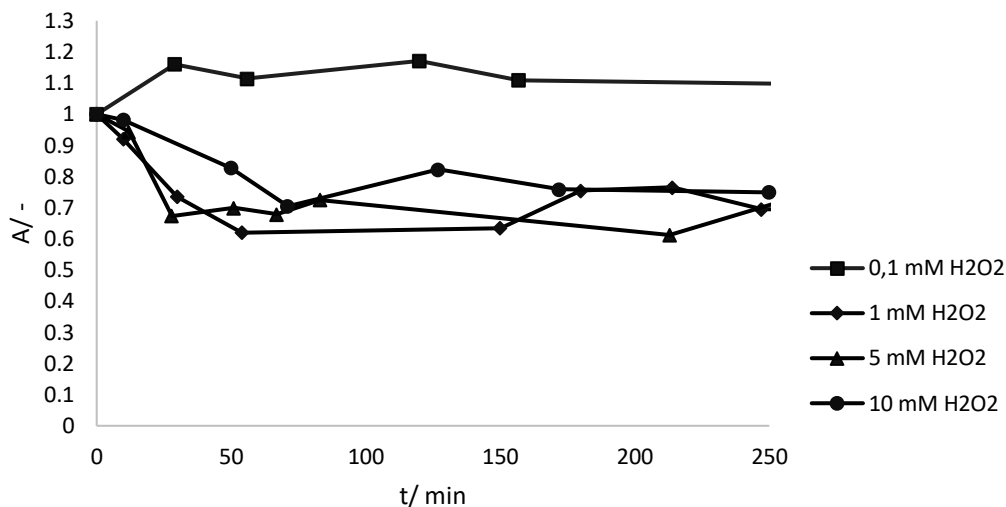
Određeni LPMO enzimi imaju komercijalnu primjenu u enzimskim pripravcima za razgradnju lignoceluloznih sirovina stoga je bitno poznavati kako reakcijski uvjeti utječu na njegovu operacijsku stabilnost. U ovom radu prvotno je ispitana aktivnost i stabilnost *NcLPMO* pri 30 °C i pH 6 tijekom 3 dana. Pokazalo se da je enzim u navedenim uvjetima stabilan, odnosno ne dolazi do gubitka aktivnosti. Nakon toga se pristupilo ispitivanju utjecaja različitih početnih koncentracija vodikovog peroksida i askorbinske kiseline, njihovog sinergističkog utjecaja na aktivnost i stabilnost te utjecaj dodatka celuloze (supstrata) na stabilnost u oba navedena slučaja pri identičnim uvjetima tijekom 250 min. Potom je pomoću programskog paketa *Scientist* određen model reakcije deaktivacije za sve ispitane slučajeve. Određivanje modela ispitivanih reakcija deaktivacije nije provedeno u dosad objavljenim istraživanjima.

### 4.1. Utjecaj različitih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na stabilnost *NcLPMO*

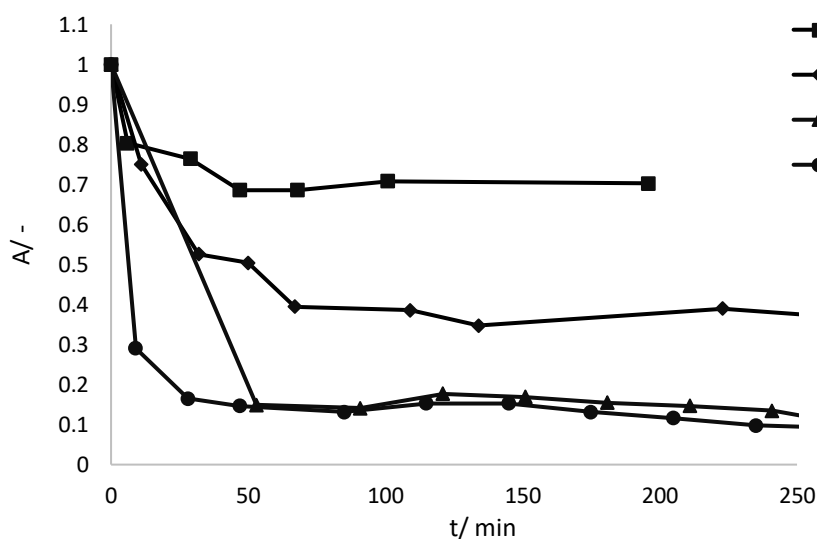
Na slici 8 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti *NcLPMO* pri različitim koncentracijama vodikovog peroksida, a na slici 9 rezultati pri različitim koncentracijama AscA. Stabilnost se ispitivala mjerenjem preostale aktivnosti enzima u vremenu prilikom njegove inkubacije s određenom koncentracijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odnosno AscA. Pri koncentraciji od 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zapažen je porast stabilnosti jer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> djeluje kao kosupstrat (Prilog 2, Slika 1), a porastom koncentracije dolazi do deaktivacije zbog oksidacije histidinskih ostataka u aktivnom mjestu. Pri koncentracijama većim od 1 mM ne dolazi do značajnog pada stabilnosti. Utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na stabilnost enzima izražen je tijekom prvih 60 minuta, a nakon toga poprima otprilike stalnu vrijednost.

Povećanjem koncentracije dodane AscA dolazi do brže inaktivacije enzima te je enzim inaktiviran u većoj mjeri kod dodatka većih koncentracija AscA u odnosu na manje koncentracije. Ovo može biti posljedica poznate popratne reakcije u kojoj LPMO uz reducens i kisik, a u odsustvu supstrata generira H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ukoliko dođe do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on više ne djeluje kao kosupstrat već inaktivira enzim. Do istog zaključka su došli i Stepnov i suradnici u istraživanju iz 2021. godine (Stepnov i sur, 2021b) u koje su ispitivali utjecaj različitih reducensa na katalitičku učinkovitost LPMO. Također, do inaktivacije brže dolazi pri većim koncentracijama AscA (0,5 mM i 1 mM) u odnosu na manje koncentracije. Usporedbom preostale aktivnosti enzima pri dodatku AscA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može se zamijetiti da dodatak AscA uzrokuje znatno veću deaktivaciju *NcLPMO*. U dosad objavljenoj literaturi nema dostupnih podataka o utjecaju askorbinske kiseline i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na stabilnost LPMO bez dodatka supstrata.





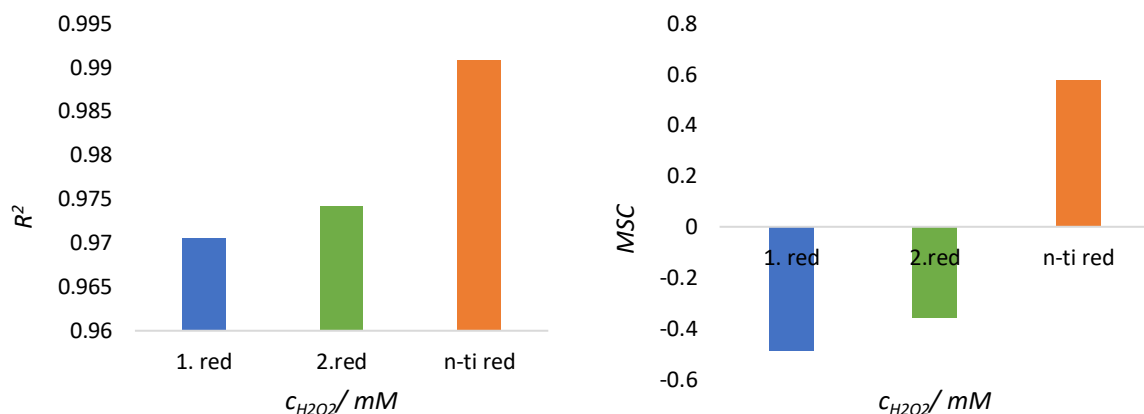
**Slika 8.** Stabilnost *NcLPMO* pri različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; temperatura 30 °C,  $V_{reaktora} = 1$  mL,  $c_{LPMO} = 0,09$  mg/mL u 50 mM NaP puferu pH 6 (radni uvjeti)



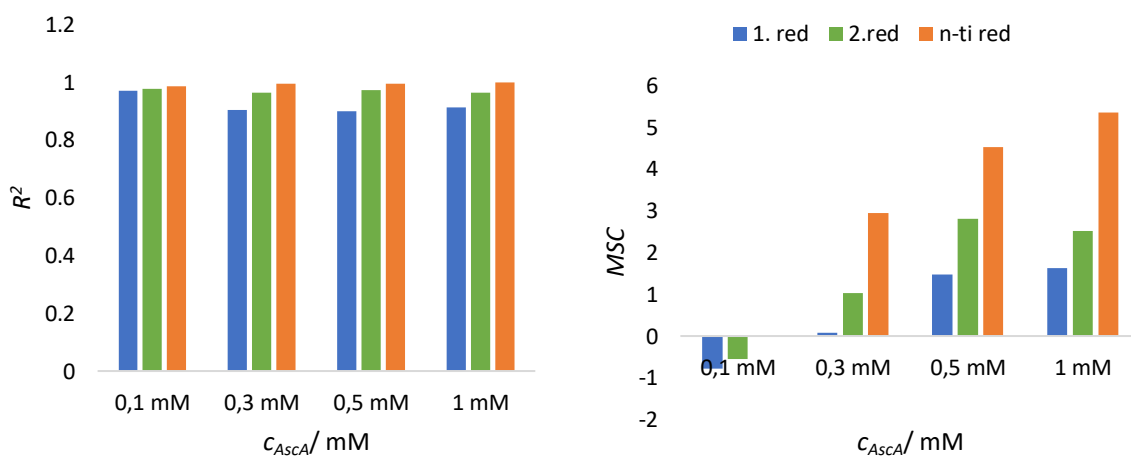
**Slika 9.** Stabilnost *NcLPMO* pri različitim koncentracijama AscA pri radnim uvjetima

Za opisivanje dobivenih rezultata korištena su tri matematička modela inaktivacije enzima: model 1. reda (jedn. 2), model 2. reda (jedn. 3) i model n-tog reda (jedn. 4). Kako povećanjem koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iznad 1mM nije došlo do značajnog pada aktivnosti, napravljena je jedna simulacija za sve 3 ispitivane koncentracije (Prilog 2, Slika 2). Preostala aktivnost za sve tri koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iznosi 69 % početne aktivnosti. Grafička usporedba modela za svaku ispitivanu koncentraciju AscA nalazi se u prilogu 2 (Slika 3). U sklopu statističke usporedbe modela korišteni su kriteriji koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) te *MSC* (Slika 10). Vrijednost  $R^2$  se najčešće primjenjuje u statistici u svrhu procjene prilagodbe modela regresijske jednadžbe.

Veća vrijednost  $R^2$  označava bolje slaganje s modelom. Vrijednost  $R^2$  najveća je za model n-tog reda kod svih ispitivanih koncentracija  $H_2O_2$  i AscA. Kao dio programskog paketa *Scientist* vrijednost  $MSC$  se koristi za prihvaćanje ili odbacivanje modela. Veća vrijednost  $MSC$  označava bolje slaganje s modelom. Vrijednosti  $MSC$  za zajedničku simulaciju najviše su za model n-tog reda, a isti se trend javlja i kod ispitivanih koncentracija AscA (Slika 11).



**Slika 10.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri različitim koncentracijama  $H_2O_2$  u radnim uvjetima



**Slika 11.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri različitim koncentracijama AscA u radnim uvjetima

Prema grafovima iz priloga 2 te prema statističkim analizama prikazanim na slikama 10 i 11 zaključujemo da se inaktivacija *NcLPMO* dodatkom  $H_2O_2$  može opisati pomoću modela n-tog reda, dok inaktivaciju dodatkom AscA najbolje opisuje model n-tog reda, ali i model 2. reda daje dobre rezultate.

Korištenjem programskog paketa *Scientist* procijenjene su konstante brzine inaktivacije za kinetike 1., 2. i n-tog reda ( $k_d$ ), a za model n-tog reda određen je i red reakcije deaktivacije ( $n$ ) (tablica 6 i 7). Što je veća konstanta deaktivacije, enzim brže gubi aktivnost, tj. ima manju

stabilnost, stoga je poželjno da te konstante imaju što niže vrijednosti. Konstanta brzine deaktivacije (pri dodatku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) za zajednički model n-tog reda iznosi 0,041201 1/min, a red reakcije inaktivacije 14,68354. Konstanta brzine deaktivacije za model n-tog reda ( $k_{dn}$ ) očekivano raste porastom koncentracije dodane AscA. Povećanjem koncentracije AscA s 0,1 mM na 0,3 mM konstanta deaktivacije poprima pet puta veću vrijednost, a daljnjim povećanjem na 0,5 mM poprima 19 puta veću vrijednost u odnosu na vrijednost pri 0,3 mM. Daljnjim povećanjem na 1 mM AscA konstanta deaktivacije udvostručila vrijednost. Ovisnost može se za model n-tog reda opisati polinomom trećeg stupnja ( $R^2 = 0,9864$ ):

$$k_{dn} = -8,255c_{AscA}^3 + 13,467c_{AscA}^2 - 2,6592c_{AscA} \quad [6]$$

**Tablica 6.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u radnim uvjetima

$c_{H_2O_2}$ / mM	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d$ / 1/min	$k_d$ / 1/min	$k_{dn}$ / 1/min	$n$
zajednička simulacija (1, 5, 10 mM)	0,001718	0,002231	0,041201	14,68354

**Tablica 7.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda deaktivacije pri različitim koncentracijama AscA u radnim uvjetima

$c_{AscA}$ / mM	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d$ / 1/min	$k_d$ / 1/min	$k_{dn}$ / 1/min	$n$
0,1	0,003311405	0,004642545	0,008764105	4,16
0,3	0,009653738	0,017116755	0,051195262	4,16
0,5	0,02216548	0,052841	1	4,16271175
1	0,119836134	0,192806	2,078835	4,162261

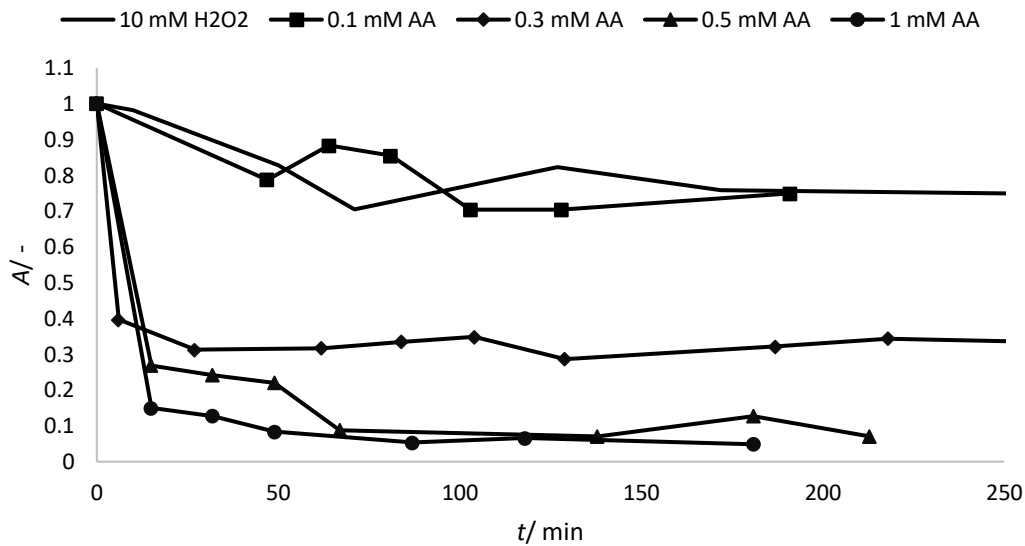
## 4.2. Sinergijski utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na stabilnost NcLPMO

Stabilnost se ispitivala mjerenjem aktivnosti enzima u vremenu prilikom njegove inkubacije s 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i varijacijom koncentracije AscA, odnosno s 0,5 mM AscA i varijacijom koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 4.2.1. Stabilnost NcLPMO pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz varijaciju koncentracije AscA

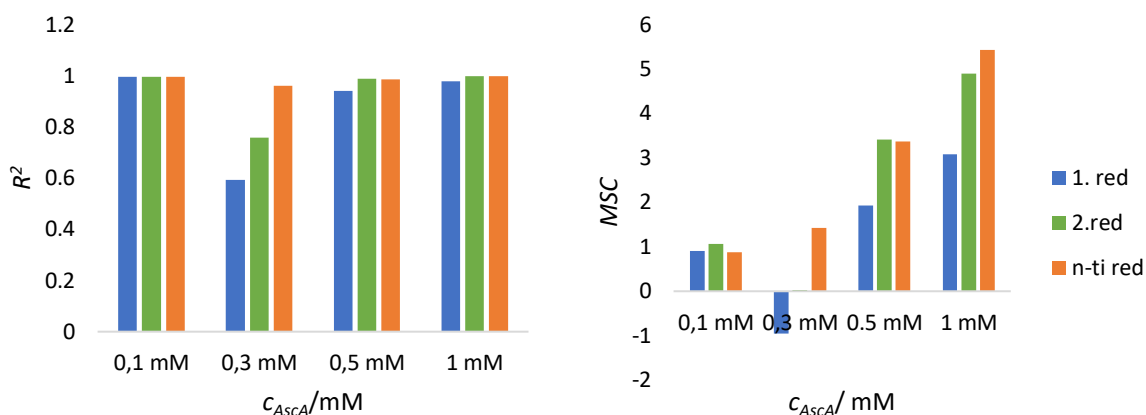
Na slici 12 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti NcLPMO uz fiksnu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 10 mM pri različitim koncentracijama AscA. Povećanje koncentracije AscA uzrokuje jaču inaktivaciju NcLPMO. Dodatak AscA u koncentraciji većoj od 0,1 mM u reakcijsku smjesu s 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pridonosi inaktivaciji u većoj mjeri u odnosu na inaktivaciju bez dodatka

AscA (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na slici 12). Značajan pad aktivnosti pri koncentraciji AscA od 0,3 mM objašnjava literaturni podatak da  $K_m(\text{AscA})$  za LPMO iznosi 100  $\mu\text{M}$  (Kuusk i Väljamäe, 2021). Pri koncentracijama većim od  $K_m(\text{AscA})$  te uz prisutnost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do izražaja dolazi utjecaj reakcije peroksidacije reducensa na inaktivaciju NcLPMO. U dosad objavljenoj literaturi nema podataka o utjecaju različitih koncentracija AscA na stabilnost LPMO pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Slika 12.** Stabilnost NcLPMO pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te uz varijacije koncentracije AscA pri radnim uvjetima

Za opisivanje dobivenih rezultata korištena su tri matematička modela inaktivacije enzima (model 1., 2. i n-tog reda), a simulacije modela na osnovu podataka za svaku ispitivanu koncentraciju nalaze se u prilogu 3 (Prilog 3, Slika 1). Radi statističke usporedbe modela reakcije inaktivacije korišteni su kriteriji koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te  $MSC$  (slika 13). Pri koncentracijama od 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM AscA vrijednosti  $R^2$  približno su jednake za sve modele, odnosno sva tri modela podjednako dobro opisuju sustav, dok se pri koncentraciji od 0,3 mM AscA kao najbolji ističe model n-tog reda. S obzirom na  $MSC$ , razlike između modela su izraženije nego s obzirom na  $R^2$  te se za koncentracije od 0,3 mM i 1 mM AscA model n-tog reda pokazao najboljim, a za ostale koncentracije model 2. reda.



**Slika 13.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri fiksnoj koncentraciji  $H_2O_2$  i različitim koncentracijama AscA u radnim uvjetima

Na temelju grafičke (Prilog 3, Slika 1) i statističke analize (slika 13) može se zaključiti da reakciju inaktivacije *NcLPMO* dodatkom AscA uz fiksnu koncentraciju  $H_2O_2$  najbolje opisuje model n-tog reda, za sve koncentracije osim za 0,5 mM AscA koju najbolje opisuje model 2. reda. Korištenjem programskog paketa *Scientist* procijenjene su konstante brzine inaktivacije za kinetike 1., 2. i n-tog reda ( $k_d$ ), a za model n-tog reda određen je i red reakcije deaktivacije ( $n$ ) (tablica 8).

**Tablica 8.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri fiksnoj koncentraciji  $H_2O_2$  od 10 mM i različitim koncentracijama AscA u radnim uvjetima

$c_{AscA}/mM$	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d/1/min$	$k_d/1/min$	$k_{dn}/1/min$	$n$
0	0,000185	0,000377	0,007456	7,67331804
0,1	0,002175592	0,002559435	0,004284315	4,82235385
0,3	0,013877648	0,032991671	0,094169831	4,82235385
0,5	0,057070441	0,126703775	4,33787022	4,82235385
1	0,111540522	0,287746134	42,4072479	4,82235385

Konstante brzine deaktivacije rastu porastom koncentracije AscA kod svih modela. Prema tablici 8 može se zaključiti da pri niskim koncentracijama AscA konstante brzine deaktivacije poprimaju niske vrijednosti, dok povećanjem koncentracije na 0,3 mM i više uzrokuje nagli porast konstante brzine deaktivacije, odnosno nagli pad aktivnosti enzima. Taj pad aktivnosti je značajniji u ovakvom sustavu gdje je dodan  $H_2O_2$  u odnosu na sustav gdje je dodana samo AscA (tablica 9). Dodatkom 0,5 mM AscA  $k_{dn}$  poraste 46 puta u odnosu na  $k_{dn}$  za 0,3 mM AscA, odnosno  $k_{dn}$  uz dodatak 1 mM AscA poraste 9 puta u odnosu na  $k_{dn}$  s 0,5 mM AscA. Ova ovisnost može se za model n-tog reda opisati jednadžbom: ( $R^2 = 0,9978$ )

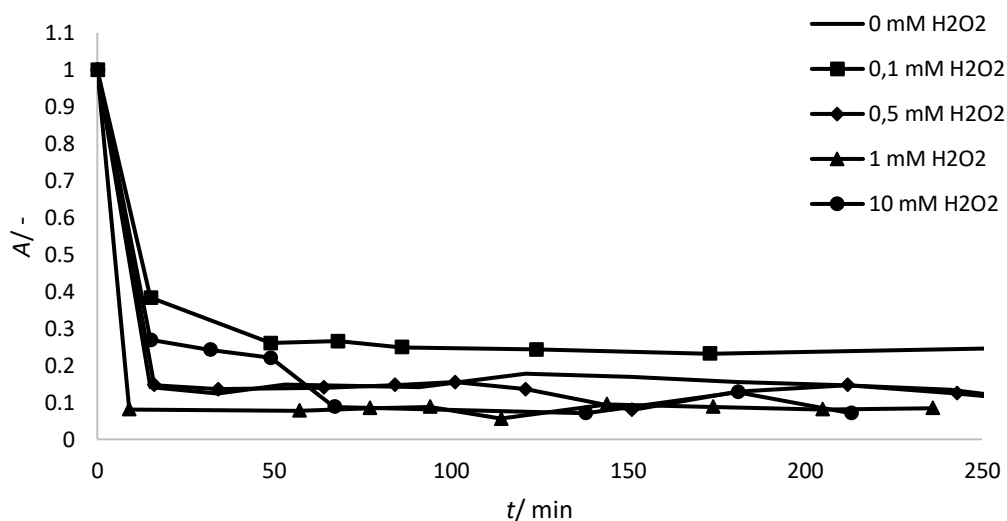
$$k_{dn} = 39,817c_{AscA}^{4,1284} \quad [7]$$

**Tablica 9.** Preostala aktivnost enzima pri različitim koncentracijama AscA i uz dodatak 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

$c_{AscA}/ \text{mM}$	Preostala aktivnost-samo AscA/ %	Preostala aktivnost- AscA + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / %
0	100	71
0,1	71	72
0,3	38	29
0,5	15	11
1	11	7

#### 4.2.2. Stabilnost NcLPMO pri fiksnoj koncentraciji AscA uz varijaciju koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Na slici 16 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti NcLPMO uz fiksnu koncentraciju AscA od 0,5 mM pri različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Povećanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iznad 0,5 mM ne uzrokuje značajne promjene deaktivacije enzima. Dodatak 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zapravo uzrokuje malo povećanje aktivnosti NcLPMO u odnosu na aktivnost bez dodatka H<sub>2</sub>O (0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na slici 14).

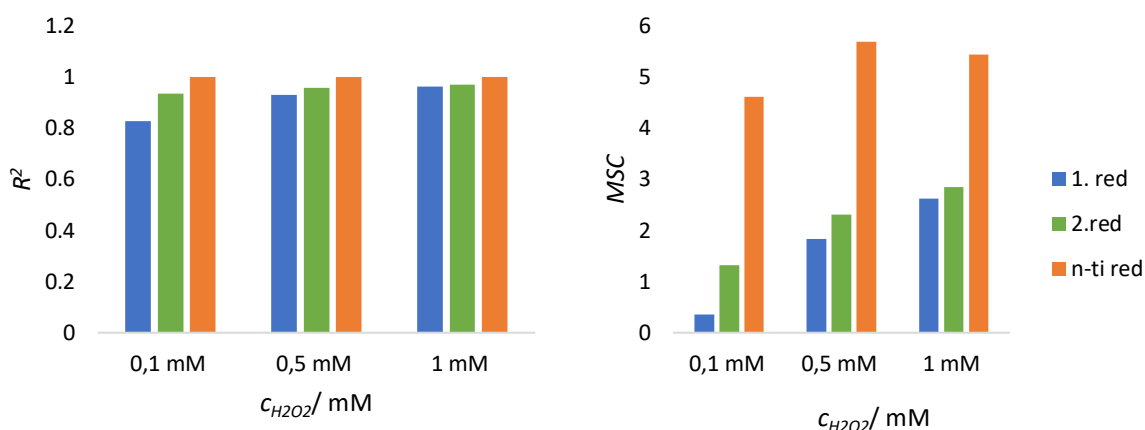


**Slika 14.** Stabilnost NcLPMO pri fiksnoj koncentraciji AscA te uz varijacije koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri radnim uvjetima

Ovo se može objasniti činjenicom da njegov dodatak u koncentraciji 0,1 mM nije uzrokovao smanjenje aktivnosti u eksperimentu gdje se ispitivao njegov utjecaj na aktivnost, odnosno da je navedena koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovoljno mala da ne uzrokuje deaktivaciju LPMO, već djeluje kao kosupstrat. Preostala aktivnost enzima pri ispitivanim koncentracijama AscA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> manja

je nego kada su komponente dodavane zasebno (Prilog 6, Tablice 1 i 2). Razlog tome je sinergistički utjecaj ovih dviju komponenti na aktivnost *NcLPMO* koji rezultira inaktivacijom *NcLPMO* u većoj mjeri nego ove dvije komponente zasebno. U dosad objavljenoj literaturi nema podataka o utjecaju različitih koncentracija  $H_2O_2$  na stabilnost *LPMO* pri fiksnoj koncentraciji *AscA*.

Reakcija inaktivacije opisana je trima modelima kao i u prethodnim slučajevima, a simulacije na osnovu podataka za svaku ispitivanu koncentraciju nalaze se u prilogu 3 (Prilog 3, Slika 2). Radi statističke usporedbe modela reakcije inaktivacije korišteni su parametri  $R^2$  te  $MSC$  (slika 15). Model  $n$ -tog reda se s obzirom na oba statistička parametra pokazao najboljim za opisivanje reakcije deaktivacije *NcLPMO* u ispitivanim uvjetima. Od ove pojave odstupa reakcija pri najvećoj koncentraciji vodikovog peroksida koju bolje opisuje model 2. reda. S obzirom na to da razlika nije značajna može se zaključiti da reakciju deaktivacije *NcLPMO* pri fiksnoj koncentraciji *AscA* te uz varijacije koncentracije  $H_2O_2$  najbolje opisuje model reakcije  $n$ -tog reda.



**Slika 15.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri fiksnoj koncentraciji *AscA* i različitim koncentracijama  $H_2O_2$  u radnim uvjetima

Pomoću programskog paketa *Scientist* procijenjene su konstante brzine inaktivacije za kinetike 1., 2. i  $n$ -tog reda ( $k_d$ ), a za model  $n$ -tog reda određen je red reakcije deaktivacije ( $n$ ) (tablica 10). Sukladno povećanju koncentracije  $H_2O_2$ , raste i vrijednost  $k_{dn}$  i to 3, 160 odnosno 2584 puta u odnosu na reakciju bez dodatka  $H_2O_2$ . Prema tablici 10  $k_{dn}$  pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$  poprimaju niske vrijednosti, no više su od konstanti brzine deaktivacije pojedinačnih koncentracija *AscA* i  $H_2O_2$ . Ovisnost se može za model  $n$ -tog reda opisati eksponencijalnom jednadžbom ( $R^2 = 0,9989$ ):

$$k_{dn} = 2,1949e^{7,3457c_{H_2O_2}} \quad [8]$$

**Tablica 10.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri fiksnoj koncentraciji AscA od 0,5 mM i različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u radnim uvjetima

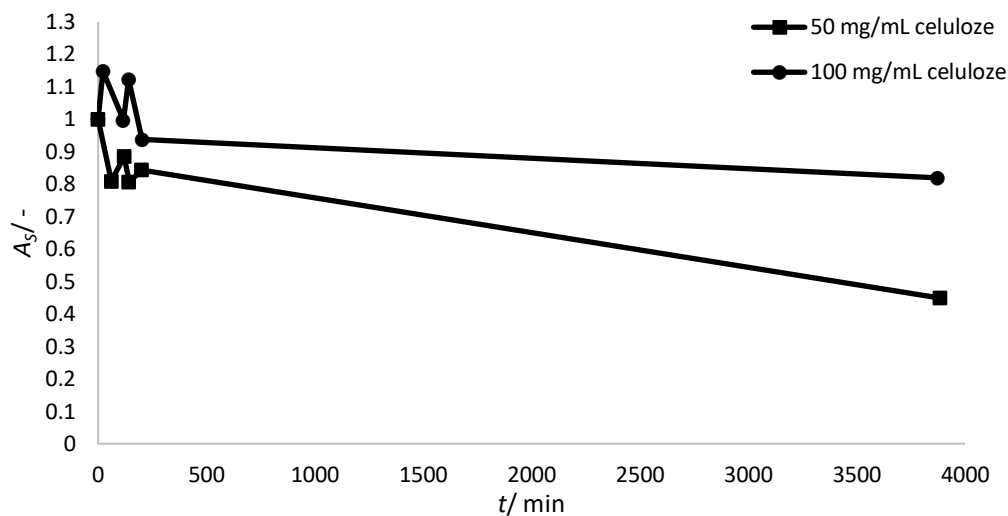
$c_{H_2O_2}$ / mM	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d$ / 1/min	$k_d$ / 1/min	$k_{dn}$ / 1/min	$n$
0	0,02216548	0,05284077	1	4,162711
0,1	0,023547292	0,050180065	3,245948850	6,483401
0,5	0,118981248	0,213782604	160,279439	6,483401
1	0,279664908	0,783571654	2584,23004	6,483401

### 4.3. Utjecaj različitih koncentracija celuloze na stabilnost NcLPMO

Na slici 16 nalaze se rezultati ispitivanja aktivnosti NcLPMO pri 2 različite koncentracije celuloze: 50 mg/mL i 100 mg/mL. Stabilnost se ispitivala mjerenjem aktivnosti enzima u vremenu prilikom njegove inkubacije s određenom koncentracijom celuloze. Radi vezanja enzima na celulozu, u svim eksperimentima s celulozom mjerila se koncentracija vezanog enzima te određivala specifična aktivnost prema jednadžbi 1. U prisutnosti veće koncentracije celuloze enzim je stabilniji te nakon 2,8 dana preostala specifična aktivnost NcLPMO iznosi 82 %, a kod koncentracije 50 mg/ml oko 45 %. Isti trend dobiven je u eksperimentu iz 2021. godine u kojem je ispitivana stabilnost LPMO uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri različitim koncentracijama bakterijske mikrokristalinične celuloze (engl. *bacterial microcrystalline cellulose*, BMCC). Vrijeme poluživota LPMO je veće pri većim koncentracijama BMCC (Kuusk i Våljamäe, 2021).

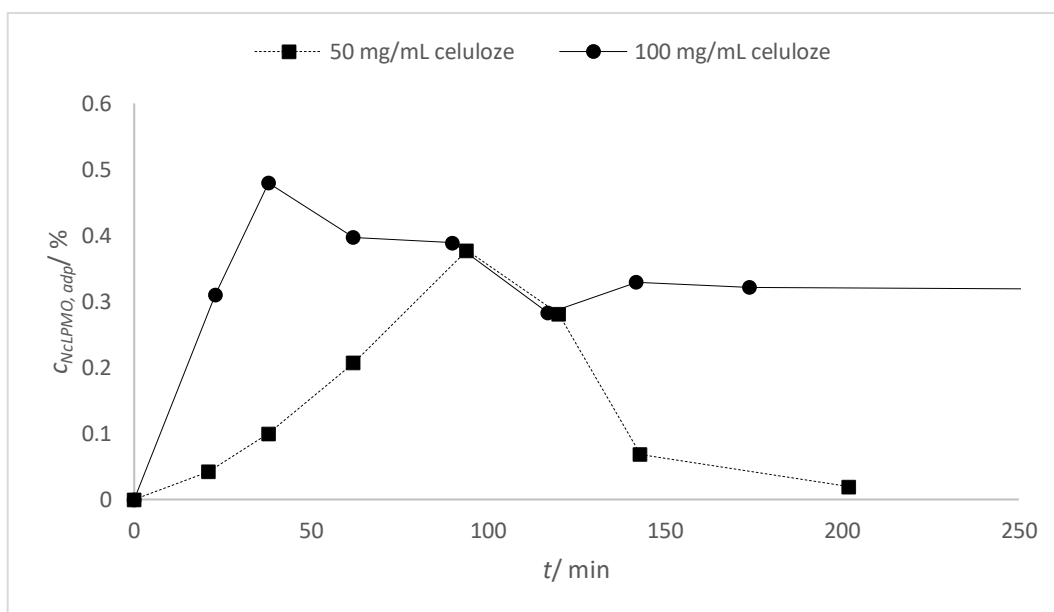
Dodatkom celuloze kao supstrata, određeni dio enzima se adsorbira na supstrat. Udio enzima adsorbiranog na supstrat određen je mjerenjem koncentracije proteina u supernatantu reakcijske smjese u odnosu na koncentraciju proteina u puferu prije dodatka celuloze. S obzirom na rastući i padajući trend (slika 17), može se zaključiti da je adsorpcija reverzibilna, a pri većoj koncentraciji celuloze više se enzima i adsorbira. Kod koncentracije celuloze od 100 mg/mL maksimalna adsorpcija je postignuta nakon 38 minuta nakon čega konstantno opada, a pri 50 mg/mL u 94oj minuti nakon čega opada. S obzirom na navedene rezultate, za daljnje eksperimente s celulozom odabrana je koncentracija od 100 mg/mL.





\* $A_s$ -specifična aktivnost NcLPMO

**Slika 16.** Stabilnost NcLPMO pri ispitivanim koncentracijama celuloze (temperatura 30 °C,  $V_{reaktora} = 1$  mL,  $c_{LPMO} = 0,18$  mg/mL u puferu 50 mM NaP pH 6 (radni uvjeti u eksperimentima s celulozom)).

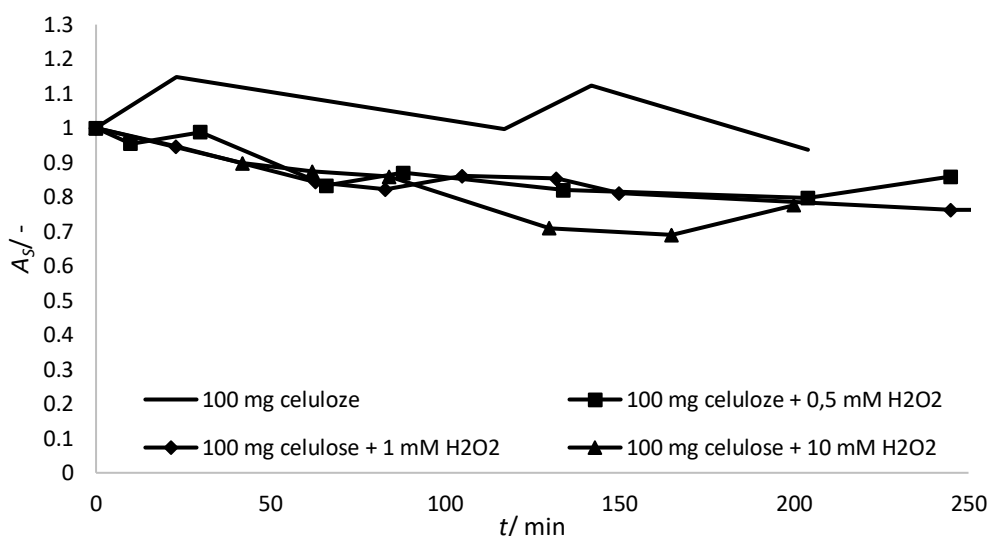


\* $C_{NcLPMO, ads}$ -udio adsorbiranog NcLPMO

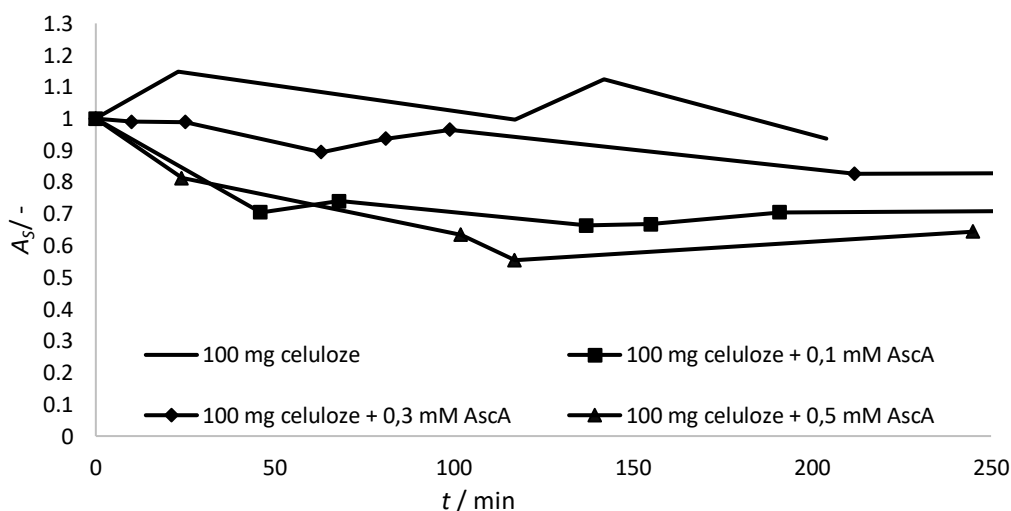
**Slika 17.** Udio adsorbirane NcLPMO pri različitim koncentracijama celuloze

#### 4.4. Utjecaj različitih koncentracija $H_2O_2$ i AscA uz celulozu na stabilnost NcLPMO

Na slici 18 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti NcLPMO pri različitim koncentracijama vodikovog peroksida u prisutnosti celuloze, a na slici 19 rezultati pri različitim koncentracijama AscA u prisutnosti celuloze. Stabilnost se ispitivala mjerenjem aktivnosti enzima u vremenu prilikom njegove inkubacije s određenom koncentracijom  $H_2O_2$  i 100 mg celuloze, odnosno AscA i 100 mg celuloze.



**Slika 18.** Stabilnost NcLPMO pri različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz celulozu pri radnim uvjetima



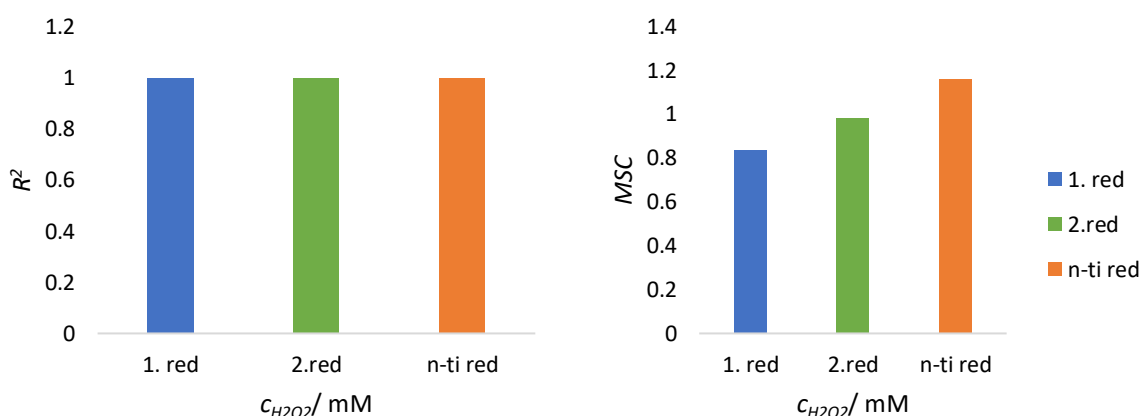
**Slika 19.** Stabilnost NcLPMO pri različitim koncentracijama AscA uz celulozu pri radnim uvjetima

Prema slici 18 može se zaključiti da pri svim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivnost enzima opada s vremenom te da koncentracija dodanog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nema utjecaj na mjeru inaktivacije enzima, isto kao i u eksperimentu bez celuloze (slika 8). U usporedbi s eksperimentom bez dodatka celuloze (Prilog 6, Tablica 2) vidljivo je da je enzim stabilniji kada je u eksperiment dodan supstrat. Razlog tome je smanjeni utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na deaktivaciju enzima, jer se pretpostavlja da je uključen u reakciju oksidacije celuloze kao kosupstrat. Literaturnih podataka za LPMO iz carstva gljiva ne postoje, no istraživanjem iz 2017. godine Bissaro i suradnici ispitivali su utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na bakterijsku LPMO. Rezultati su pokazali da do reakcije oksidacije kristalinične celuloze ne dolazi ukoliko u reakciji ne postoji reducens (Bissaro i sur., 2017).

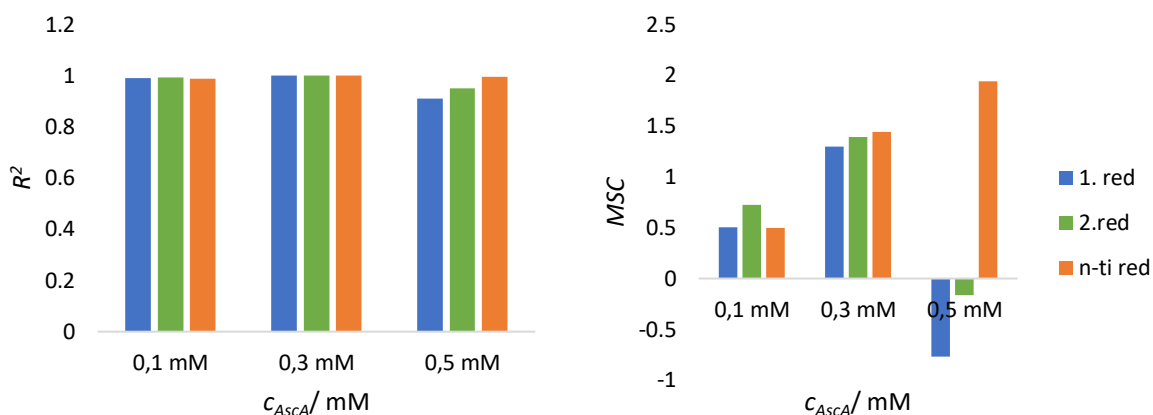
Odstupanja eksperimentalnih podataka od podataka iz literature mogu biti rezultat korištenja deset puta veće koncentracije supstrata čiji razgradni proizvodi nastali oksidacijskim oštećenjem zbog dodatka  $H_2O_2$  mogu služiti kao donori elektrona pa do reakcije ipak dolazi.

Dodatkom AscA u koncentraciji 0,1 mM u prisustvu celuloze dolazi do veće inaktivacije enzima nego dodatkom 0,3 mM. Pretpostavka je da je manjim koncentracijama reakcija peroksidacije reducensa dominantnija jer je  $K_m(AscA)$  0,1 mM (kao elektron donor koristi se i kisik), dok je pri 0,3 mM AscA reakcija oksidacije celuloze dominantnija u odnosu na reakciju peroksidacije reducensa što pridonosi većoj stabilnosti enzima. Pri koncentracijama većim od 0,3 mM utjecaj reakcije peroksidacije reducensa dolazi do izražaja. Stabilnost enzima je generalno veća u eksperimentu s celulozom nego bez nje (Prilog 6, Tablica 1), pa se kao i u prethodnom eksperimentu može zaključiti da supstrat pridonosi stabilizaciji enzima. Rezultati eksperimenta se ne slažu s rezultatima iz literature (Müller i sur., 2018). Literaturni podaci ukazuju da povećanjem koncentracije AscA dolazi do povećanja aktivnosti LPMO. Ovo odstupanje može biti posljedica korištenja enzimskog celulolitičkog koktela sa samo 15 % w/w LPMO, stoga se stvaran učinka LPMO ne može sa sigurnošću utvrditi. Ovakvo značajno odstupanje potrebno je ispitati u zasebnom istraživanju.

Za opisivanje dobivenih rezultata korištena su tri matematička modela inaktivacije enzima: model 1. reda (jedn. 2), model 2. reda (jedn. 3) i model n-tog reda (jedn. 4). Kako povećanje koncentracije  $H_2O_2$  ne utječe na mjeru inaktivacije, napravljena je jedna simulacija za sve 3 ispitivane koncentracije (Prilog 4, Slika 1). Grafička usporedba modela za svaku ispitivanu koncentraciju AscA nalazi se u prilogu 4 (Prilog 4, Slika 2). Radi statističke usporedbe modela reakcije inaktivacije korišteni su parametri  $R^2$  i  $MSC$  (slike 20 i 21).



**Slika 20.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri različitim koncentracijama  $H_2O_2$  uz celulozu u radnim uvjetima



**Slika 21.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* pri različitim koncentracijama AscA uz celulozu u radnim uvjetima

Model n-tog reda se s obzirom na oba statistička parametra pokazao najboljim za opisivanje reakcije deaktivacije *NcLPMO* uz celulozu te koncentracije AscA od 0,3 mM i 0,5 mM. Iako se model 2. reda pokazao boljim za opisivanje deaktivacije pri 0,1 mM AscA, zbog malih razlika može se zaključiti da se deaktivacija najbolje opisuje modelom n-tog reda.

Korištenjem programskog paketa *Scientist* procijenjene su konstante brzine inaktivacije za kinetike 1., 2. i n-tog reda ( $k_d$ ), a za model n-tog reda određen je i red reakcije deaktivacije ( $n$ ) (tablice 11 i 12). Konstanta brzine reakcije deaktivacije pri dodatku  $H_2O_2$  te uz celulozu za zajednički model n-tog reda iznosi 0,003375 1/min, a red reakcije inaktivacije 6,867017.  $K_{dn}$  za AscA uz celulozu prati trend stabilnosti enzima u ovisnosti o koncentraciji AscA, odnosno, inaktivacija je manja pri 0,3 mM AscA, nego pri 0,1 mM AscA, da bi pri 0,5 mM opet bila veća u odnosu na obje  $k_{dn}$ .

**Tablica 11.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri različitim koncentracijama  $H_2O_2$  uz celulozu u radnim uvjetima

$c_{H_2O_2}/mM$	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d/1/min$	$k_d/1/min$	$k_{dn}/1/min$	$n$
Sve zajedno	0,001599626	0,001837	0,003375	6,867017

**Tablica 12.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri različitim koncentracijama AscA uz celulozu u radnim uvjetima

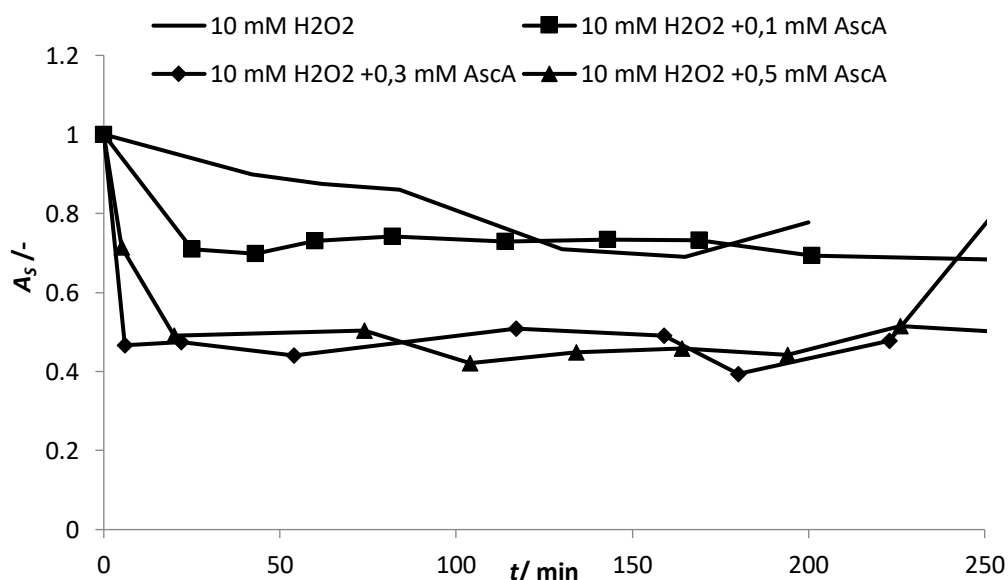
$c_{AscA}/mM$	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d/1/min$	$k_d/1/min$	$k_{dn}/1/min$	$n$
0,1	0,003196	0,003988	0,018455	9,06898295
0,3	0,00098	0,001094	0,00225	9,06898295
0,5	0,001247	0,003155	0,035425	8,92175285

#### 4.5. Sinergijski utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i AscA na stabilnost NcLPMO uz celulozu

Stabilnost se ispitivala mjerenjem aktivnosti enzima u vremenu prilikom njegove inkubacije s 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mg celuloze i različitim koncentracijama AscA, odnosno s 0,5 mM AscA, 100 mg celuloze i različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### 4.5.1. Stabilnost NcLPMO uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te uz varijaciju koncentracije AscA

Na slici 22 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti NcLPMO uz celulozu i fiksnu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 10 mM pri različitim koncentracijama AscA. Povećanje koncentracije AscA uzrokuje jaču inaktivaciju NcLPMO, a pri koncentraciji 0,3 mM i većoj ne dolazi do povećanja inaktivacije. Dodatak AscA u reakcijsku smjesu s 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pridonosi inaktivaciji u većoj mjeri u odnosu na inaktivaciju pri istoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bez dodatka AscA (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na slici 22). Značajan pad aktivnosti pri koncentraciji 0,3 mM AscA objašnjava literaturni podatak da  $K_{m(AscA)}$  za LPMO iznosi 100  $\mu$ M (Kuusk i Väljamäe, 2021). Pri koncentracijama većim od  $K_{m(AscA)}$  do izražaja dolazi utjecaj reakcije peroksidacije reducensa na inaktivaciju NcLPMO. Isti se efekt javlja i u reakciji bez celuloze te je pri istim koncentracijama enzim stabilniji u usporedbi s eksperimentima bez celuloze (Prilog 6, Tablica 2).

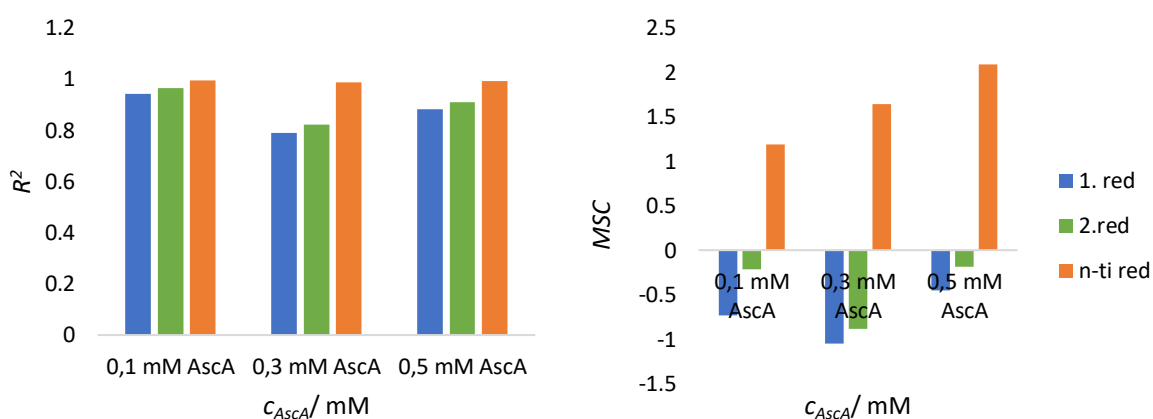


**Slika 22.** Stabilnost NcLPMO uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te različitim koncentracijama AscA pri radnim uvjetima

Drukčiji rezultati dobiveni su u eksperimentu s bakterijskom LPMO te hitinom kao supstratom uz fiksnu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 20  $\mu$ M (Kuusk i sur., 2018) - povećanjem koncentracije AscA dolazi do povećanja aktivnosti LPMO. Razlozi ovakvog odstupanja mogu

biti različiti, od činjenice da su u eksperimentima korištene LPMO iz različitih organizama, da su korišteni različiti supstrati, do činjenice da su ispitivane različite koncentracije AscA, te da je fiksna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u eksperimentima različita. Ovako velika odstupanja također je potrebno ispitati u zasebnom istraživanju.

Za opisivanje dobivenih rezultata korištena su tri matematička modela inaktivacije enzima kao i kod ostalih eksperimenata, a simulacije modela na osnovu podataka za svaku ispitivanu koncentraciju nalaze se u prilogu 5 (Prilog 5, Slika 1). Radi statističke usporedbe modela reakcije inaktivacije korišteni su kriteriji koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te  $MSC$  (slika 23). S obzirom na oba kriterija i simulacije modela, za reakciju deaktivacije ( $NcLPMO$  uz celulozu, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te varijacije koncentracije AscA) najboljim se pokazao model n-tog reda, dok modeli 1. i 2. reda nisu bili prihvatljivi.



**Slika 23.** Statistička analiza modela inaktivacije  $NcLPMO$  uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te različitim koncentracijama AscA pri radnim uvjetima

**Tablica 13.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri fiksnoj koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i različitim koncentracijama AscA uz celulozu u radnim uvjetima

$c_{AscA}/mM$	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d/ 1/min$	$k_d/ 1/min$	$k_{dn}/ 1/min$	$n$
0	0,002297725	0,00264451	0,00877442	10,9135085
0,1	0,002664	0,003069	0,032244267	10,3461005
0,3	0,005051	0,010362	3,39198338	10,9348104
0,5	0,004565	0,008013	1,31746053	10,9348104

U tablici 13 navedene su  $k_d$  za svaki ispitivani model. Pri koncentraciji AscA od 0,1 mM  $k_{dn}$  je 3 puta veći u odnosu na reakciju bez dodatka AscA te 105 puta manji u odnosu na reakciju s

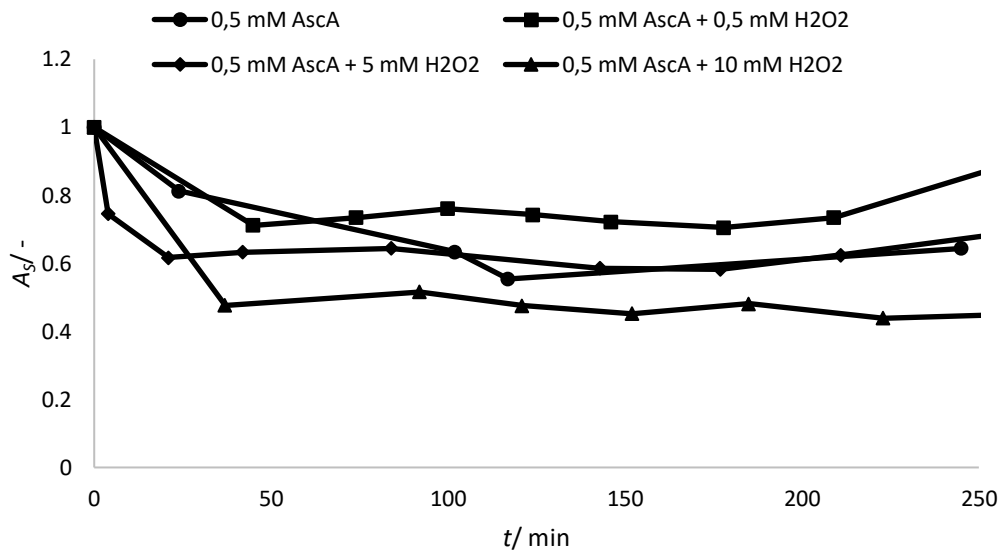
0,3 mM. Pokazalo da porastom koncentracije AscA iznad 0,3 mM ne dolazi do jače inaktivacije pa je sukladno tome i  $k_{dn}$  skoro 3 puta manji pri koncentracij 0,5 mM u odnosu na 0,3 mM AscA. Generalno su  $k_{dn}$  u eksperimentima bez celuloze većih vrijednosti nego u eksperimentima s celulozom.. Ovisnost se za model n-tog reda može opisati polinomom 2. reda ( $R^2 = 0,9594$ )

$$k_{dn} = -25,998c_{AscA}^2 + 16,163c_{AscA} \quad [9]$$

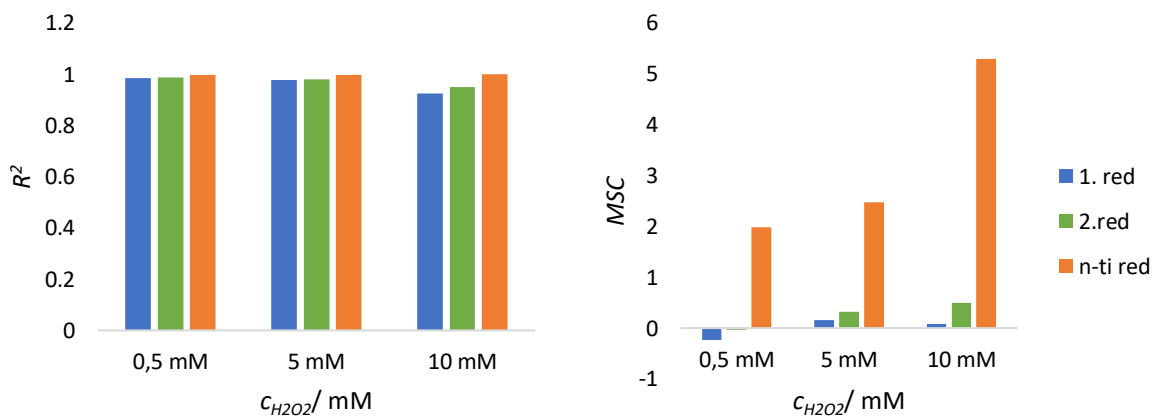
#### 4.5.2. Stabilnost NcLPMO uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji AscA te uz varijaciju koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Na slici 24 prikazani su rezultati ispitivanja stabilnosti NcLPMO uz celulozu i fiksnu koncentraciju AscA (0,5 mM) pri različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Povećanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzrokuje jaču inaktivaciju NcLPMO. Dodatak 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u reakcijsku smjesu s 0,5 AscA i 100 mg celuloze ima manji utjecaj na stabilnost enzima u odnosu na stabilnost pri istoj koncentraciji AscA i celuloze bez dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mg celuloze + 0,5 mM AscA na slici 24). Razlog tome može biti da ovu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzim koristi kao kosupstrat, odnosno ne dolazi do reakcije peroksidacije reducensa (AscA). No, daljnjim povećanjem koncentracije dodanog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi do inaktivacija enzima spomenutom reakcijom. Isti trend dobili su Bissaro i suradnici 2017. godine kada su ispitali dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u rasponu 0 - 1000  $\mu$ M pri stalnoj koncentraciji AscA od 1 mM na stabilnost bakterijske LPMO. Pri nižim koncentracijama (do 300  $\mu$ M) zabilježen je porast stabilnosti, no porastom koncentracije zabilježili su deaktivaciju enzima (Bissaro i sur., 2017). Kuusk i Våljamäe proveli su slično ispitivanje s LPMO iz *Trichoderme reesei* s BMCC te su dobili slične rezultate (Kuusk i Våljamäe, 2021). Kao i u ostalim eksperimentima, pri istim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enzim je stabilniji ukoliko je u prisustvu supstrata (Tablica 2, Prilog 6).

Za opisivanje dobivenih rezultata korištena su tri matematička modela inaktivacije enzima kao i kod ostalih eksperimenata, a simulacije modela na osnovu podataka za ispitivane koncentracije nalaze se u prilogu 5 (Prilog 5, Slika 2). Radi statističke usporedbe modela reakcije inaktivacije korišteni su kriteriji koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te *MSC* (slika 25). S obzirom na oba kriterija, najboljim se pokazao model n-tog reda. U eksperimentu s 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prema *MSC* modeli 1. i 2. reda nisu prihvatljivi za opisivanje reakcije deaktivacije.



**Slika 24.** Stabilnost *NcLPMO* uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji AscA te različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri radnim uvjetima



**Slika 25.** Statistička analiza modela inaktivacije *NcLPMO* uz celulozu pri fiksnoj koncentraciji AscA te različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri radnim uvjetima

U tablici 14 navedene su konstante brzine deaktivacije za svaki ispitivani model. S obzirom na model n-tog reda može se zaključiti da pri niskim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $k_{dn}$  poprimaju niže vrijednosti u odnosu na vrijednosti pri višim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pa je tako  $k_{dn}$  pri 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za red veličine veći u odnosu na reakciju s 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te 64 puta manji u odnosu na  $k_{dn}$  pri 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $K_{dn}$  su generalno manjih vrijednosti u usporedbi s eksperimentima pri istim koncentracijama AscA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bez celuloze. Navedena ovisnost se za model n-tog reda može opisati eksponencijalnom jednadžbom ( $R^2 = 0,9998$ ):

$$k_{dn} = 0,0285e^{0,6842c_{H_2O_2}} \quad [10]$$



**Tablica 14.** Procijenjeni parametri modela 1. reda, 2. reda te n-tog reda inaktivacije pri fiksnoj koncentraciji AscA i različitim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz celulozu u radnim uvjetima

$c_{H_2O_2}$ / mM	Model 1. reda	Model 2. reda	Model n-tog reda	
	$k_d$ / 1/min	$k_d$ / 1/min	$k_{dn}$ / 1/min	$n$
0	0,001247	0,003155	0,035425	8,92175285
0,5	0,002255	0,002787	0,052396255	15,0102501
5	0,003936	0,005334	0,522872747	15,0102501
10	0,004601	0,007894	33,9351606	15,0102501

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Stabilnost *NcLPMO* ne mijenja se povećanjem koncentracije vodikovog peroksida te iznosi 69 % početne aktivnosti bez prisustva celuloze, odnosno 75 % početne aktivnosti uz prisustvo celuloze.
2. Utjecaj askorbinske kiseline na stabilnost *NcLPMO* veći je od utjecaja  $H_2O_2$ , te veća koncentracija uzrokuje i veću inaktivaciju. Dodatkom celuloze enzim je pri istim koncentracijama stabilniji.
3. Dodatak askorbinske kiseline i  $H_2O_2$  uzorkuje inaktivaciju enzima u većoj mjeri nego te dvije komponente zasebno. Razlog tome je sinergistički utjecaj ovih dviju komponenti na aktivnost *NcLPMO* reakcijom peroksidacije reducensa. Iznimka je dodatak 0,1 mM  $H_2O_2$  u 0,5 mM AscA gdje je aktivnost veća u odnosu na dodatak samo AscA. Pretpostavka je da dodatak  $H_2O_2$  u ovoj koncentraciji nije dovoljna za peroksidaciju reducensa, već djeluje kao kosupstrat.
4. Dodatak celuloze u reakciji s askorbinskom kiselinom i  $H_2O_2$  generalno stabilizira enzim u odnosu na stabilnost enzima s ove dvije komponente bez dodatka celuloze. Stabilnost enzima pri koncentraciji 0,5 mM  $H_2O_2$  s 0,5 mM AscA i 100 mg celuloze, veća je nego bez dodatka  $H_2O_2$ , što ukazuje da  $H_2O_2$  u ovoj koncentraciji djeluje kao kosupstrat.
5. Reakcije deaktivacije *NcLPMO* dodatkom askorbinske kiseline,  $H_2O_2$  i celuloze u ispitivanim koncentracijama mogu se opisati modelom n-tog reda.

## 6. LITERATURA

Aachmann FL, Sorlie M, Skjak-Braek G, Eijsink VGH, 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* **109**, 18779–18784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208822109>

Agger JW, Isaken T, Várnai A, Vidal-Melgosa S, Willats WGT, Ludwig R i sur. (2014) Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proc Nat Acad Sci USA* **111**, 6287-6292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323629111>

Andlar M, Rezić T, Marđetko M, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* **18**, 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA (2015) Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annu Rev Biochem* **84**, 923–946. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034439>

Berka RM, Grigoriev IV, Otiillar R, Salamov A, Grimwood J, Reid i sur. (2011) Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnol* **29**, 922-927. <https://doi.org/10.1038/nbt.1976>

Bissaro B, Røhr ÅK, Müller G, Chylenski P, Skaugen M, Forsberg Z (2017) Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nature Chem Biol* **13**, 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2470>

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* **382**, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>

Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, Kognole AA, Mathiesen G, Várnai A i sur. (2015) Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. *J Biol Chem* **290**, 22955–22969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660183>

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Breslmayr E, Daly S, Požgajčić A, Chang H, Rezić T, Oostenbrink C, Ludwig R (2019) Improved spectrophotometric assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol Biofuels*, **12**, 283. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1624-3>

CAZy database (2022) Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N (2022) The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* **50**, D571–D577. <http://www.cazy.org/> Pristupljeno 17. kolovoza 2022.

Ciano L, Davies GJ, Tolman WB, Walton PH (2018) Bracing copper for the catalytic

oxidation of C–H bonds. *Nature Catal* **1**, 571–577. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0110-9>

Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TD, Distel DL, Dupree P i sur. (2015) Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life, *Curr Opin Chem Biol* **29**, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>

Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput Struct Biotechnol J* **2**, e201209015. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209015>

Eijsink VGH, Petrovic D, Forsberg Z, Mekasha S, Røhr AK, Várnai K (2019) On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnol Biofuels* **12**, 58. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1392-0>

Eriksson KE, Pettersson B, Westermark U (1974) Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett* **49**, 282–285. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80531-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80531-4)

Filandr F, Man P, Halada P, Chang H, Ludwig R, Kracher D (2020) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent activity of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase investigated with a turbidimetric assay. *Biotechnol Biofuels*, **13**, 37. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01673-4>

Filiatrault-Chastel C, Navarro D, Haon M, Grisel S, Herpoël-Gimbert I, Chevret D i sur. (2019) AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnol Biofuels* **12**, 55. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1394-y>

Filip M, Stevanović M, Leaković E (2016) Imobilizacija amilaze na nanočestice željezovog (III) oksida. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Findrik Z (2017) Bioreaktori (nastavni tekstovi). Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Forsberg Z, Sørlie M, Petrović D, Courtade G, Aachmann FL, Vaaje-Kolstad G i sur. (2019) Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr Opin Struc Biol* **59**, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.015>

Harris PV, Xu F, Kreel NE, Kang C, Fukuyama S (2014) New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr Opin Chem Biol* **19**, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.015>

Hegnar OA, Petrovic DM, Bissaro B, Alfredsen G, Várnai A, Eijsink VGH (2018) Characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Gloeophyllum trabeum* shows a pH-dependent relationship between catalytic activity and hydrogen peroxide production. *Appl Environ Microb* **85**, e02612-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-18>

Hemsworth GR, Johnston EM, Davies GJ, Walton PH (2015) Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends Biotechnol* **33**, 747–761. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.006>

Hernández-Beltrán JU, Hernández-De Lira IO, Cruz-Santos MM, Saucedo-Luevanos A, Hernández-Terán F, Balagurusamy N (2019) Insight into Pretreatment Methods of

Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. *App Sci* **9**, 3721. <https://doi.org/10.3390/app9183721>

Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B., Eijsink VG (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* **5**, 45. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>

Ioelovich M, Morag E (2012) Study of enzymatic hydrolysis of mild pretreated lignocellulosic biomasses. *Bioresources* **7**. 1040-1052. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.7.1.1040-1052>

Kont R, Bissaro B, Eijsink VGH, Våljamäe P (2020) Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Nat Commun* **11**, 5786. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19561-8>

Kracher D, Andlar M, Furtmüller PG, Ludwig R (2017) Active-site copper reduction promotes substrate binding of fungal lytic polysaccharide monooxygenase and reduces stability. *J Biol Chem* **293**, 1676–1687. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000109>

Kracher D, Forsberg Z, Bissaro B, Gangl S, Preims M, Sygmond C i sur. (2020) Polysaccharide oxidation by lytic polysaccharide monooxygenase is enhanced by engineered cellobiose dehydrogenase. *FEBS J* **287**, 897–908. <https://doi.org/10.1111/febs.15067>

Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørli M, Bissaro B i sur. (2018) 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA118.006196>

Kuusk S, Våljamäe P (2021) Kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven catalysis by a lytic polysaccharide monooxygenase from the fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* **297**, 101256. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101256>

Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD (2011) Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and Glycoside Hydrolase 61. *Appl Environ Microb* **77**, 7007 - 7015. <https://doi.org/10.1128/AEM.05815-11>

Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels*, **6**, 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>

Loose JS, Forsberg Z, Kracher D, Scheiblbrandner S, Ludwig R, Eijsink VGH i sur. (2016) Activation of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases with cellobiose dehydrogenase. *Protein Sci* **25**, 2175-2186. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3043>

Meier KK, Jones SM, Kaper T, Hansson H, Koetsier MJ, Karkehabadi S. i sur. (2018) Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars. *Chem. Rev* **118**, 2593–2635. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00421>

Merino ST, Cherry J (2007) Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. U: Olsson, L (ured.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 95-120.

Monlau F, Barakat A, Trably E, Dumas C, Steyer JP, Carrère H (2013) Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* **43**, 260–322. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>

Müller G, Chylenski P, Bissaro B, Eijnsink VGH, Horn SJ (2018) The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol Biofuels* **11**, 209. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1199-4>

Narodne novine (2021) Zakon o izmjenama i dopunama zakona o biogorivima za prijevoz. Narodne novine 52, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2021\\_05\\_52\\_10\\_55.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2021_05_52_10_55.html) Pristupljeno 16. kolovoza 2022.

Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen JCN, Johansen K S i sur. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 15079–15084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>

Petrović DM, Bissaro B, Chylenski P, Skaugen M, Sørli M, Jensen MS i sur. (2018). Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation. *Protein Sci* **27**, 1636–1650. <https://doi.org/10.1002/pro.3451>

Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA (2011) Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem Biol* **6**, 1399–1406. <https://doi.org/10.1021/cb200351y>.

Raguz S, Yaguea E, Wood DA, Thurston CF (1992) Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. *Gene* **119**, 183–190. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90270-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90270-Y)

Reese ET, Siu RGH, Levinson HS (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* **59**, 485–497. <https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950>

Rezić T, Trontel A, Pavlečić M, Novak M, Herceg Z, Ivančić Šantek M i sur. (2021) Nove spoznaje u biološkoj razgradnji lignoceluloznih sirovina. U: Šubarić D, Miličević B (ured.) Neke mogućnosti korištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 3, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, str. 1-24

Sabbadin F, Hemsworth GR, Ciano L, Henrissant B, Dupree B, Tryfona P i sur. (2018) An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nat Commun* **9**, 756. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03142-x>

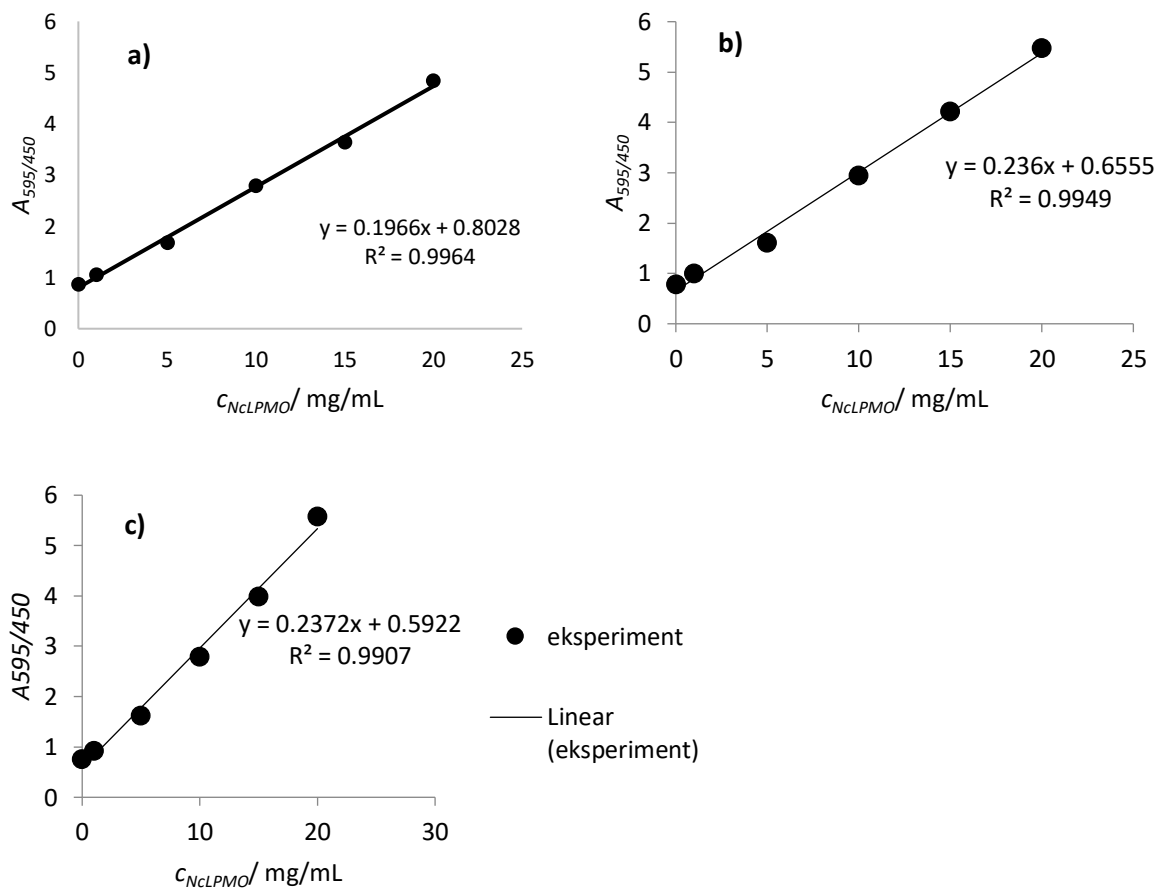
Sabbadin F, Urresti S, Henrissant B, Avrova AO, Welsh L, Lindley PJ i sur. (2021) Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. *Science* **373**, 774–779. <https://doi.org/10.1126/science.abj1342>

Sagarika MS, Parameswaran C, Senapati A, Barala J, Mitra D, Prabhukarthikeyan SR i sur. (2022) Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) producing microbes: A novel approach for rapid recycling of agricultural wastes. *Sci total environ* **806**, 150451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150451>

- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* **27**, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sinnott ML (1990) Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem Rev* **90**, 1171-1202. <https://doi.org/10.1021/cr00105a006>
- Silva IS, Menezes CR, Franciscon E, Santos EC, Durrant LR (2010) Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under microaerobic conditions. *Braz Arch Biol Tech* **53**, 693-699. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300026>
- Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks, 1. Review and description of methods. *J Agr Food Chem* **58**, 9043–9053. <https://doi.org/10.1021/jf1008023>
- Span EA, Marletta MA (2015) The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry. *Curr Opin Struc Biol* **35**, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.002>
- Stepnov AA, Forsberg Z, Sørli M, Nguyen GS, Wentzel A, Røhr AK i sur. (2021a) Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics. *Biotechnol Biofuels* **14**, 28. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01879-0>
- Stepnov AA, Christensen IA, Forsberg Z, Aachmann FL, Courtade G, Eijsink VGH (2021b) The impact of reductants on the catalytic efficiency of a lytic polysaccharide monooxygenase and the special role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett* **596**, 53-70. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14246>
- Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH (2005) The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. *J Biol Chem* **280**, 28492–28497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørli M, Eijsink VGH (2010) An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, **330**, 219–222. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1192231>
- Vaaje-Kolstad G, Forsberg Z, Loose JS, Bissaro B, Eijsink VG (2017) Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr Opin Struc Biol* **44**, 67–76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012>
- Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA (2014) Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *J Am Chem Soc* **136**, 562-565. <https://doi.org/10.1021/ja409384b>
- Walton PH, Davies GJ (2016) On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. *Cur Opin Chem Biol* **31**, 195–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.001>
- Wang D, Li Y, Zheng Y, Hsieh YSY (2021) Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Front Chem* **9**(653754), <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.653754>

# PRILOZI

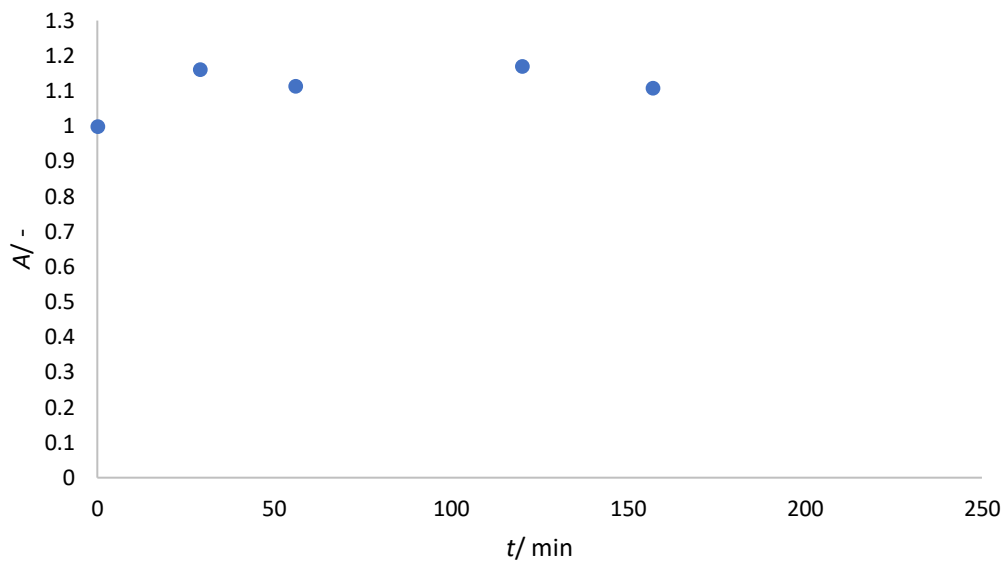
## Prilog 1



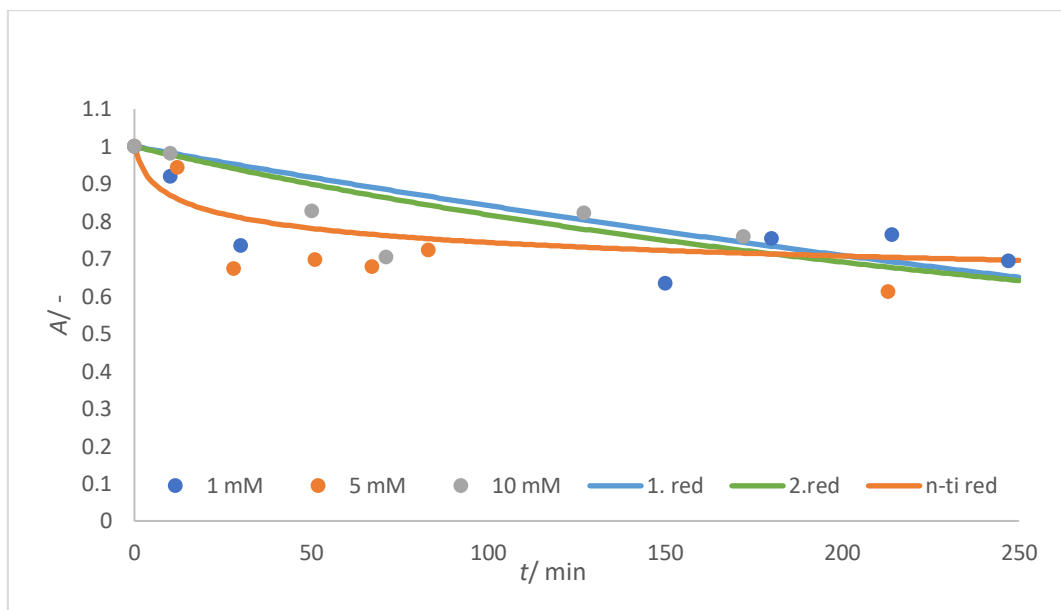
**Slika 1.** Baždarni pravci za Bradford metodu određivanja koncentracije enzima: (a) izrađeno 29.06.2022, (b) izrađeno 18.03.2022, (c) izrađeno 16.02.2022.



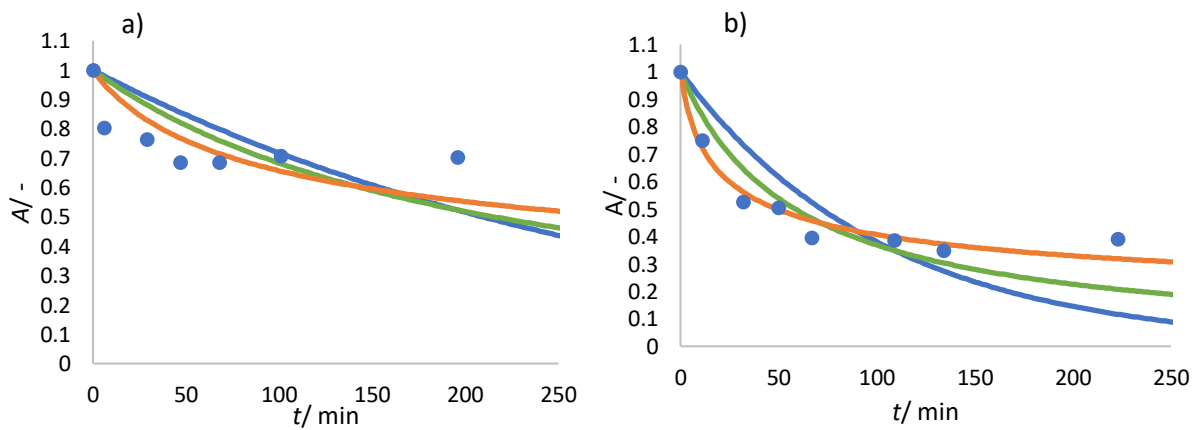
## Prilog 2

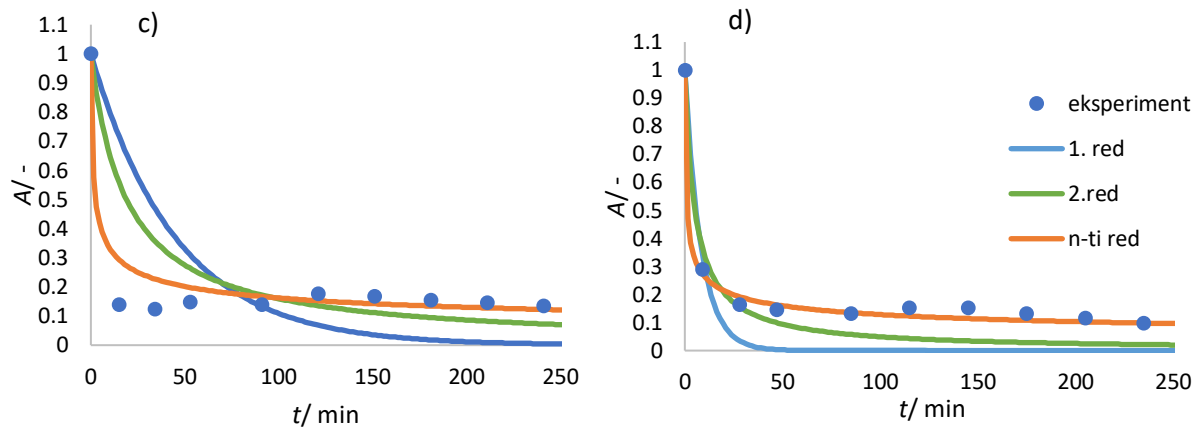


**Slika 1.** Stabilnost *NcLPMO* pri koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $0,1 \text{ mM}$



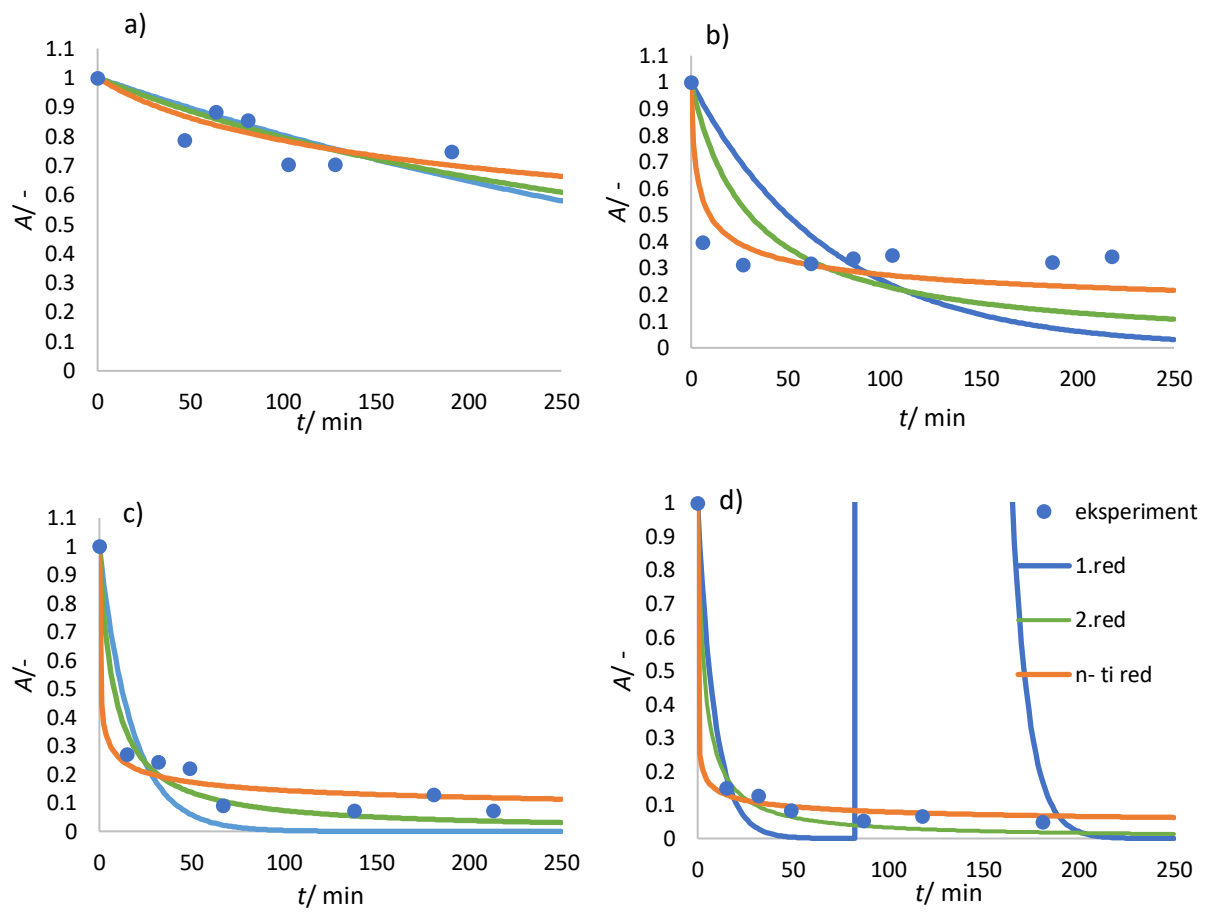
**Slika 2.** Simulacija ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* o različitim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$



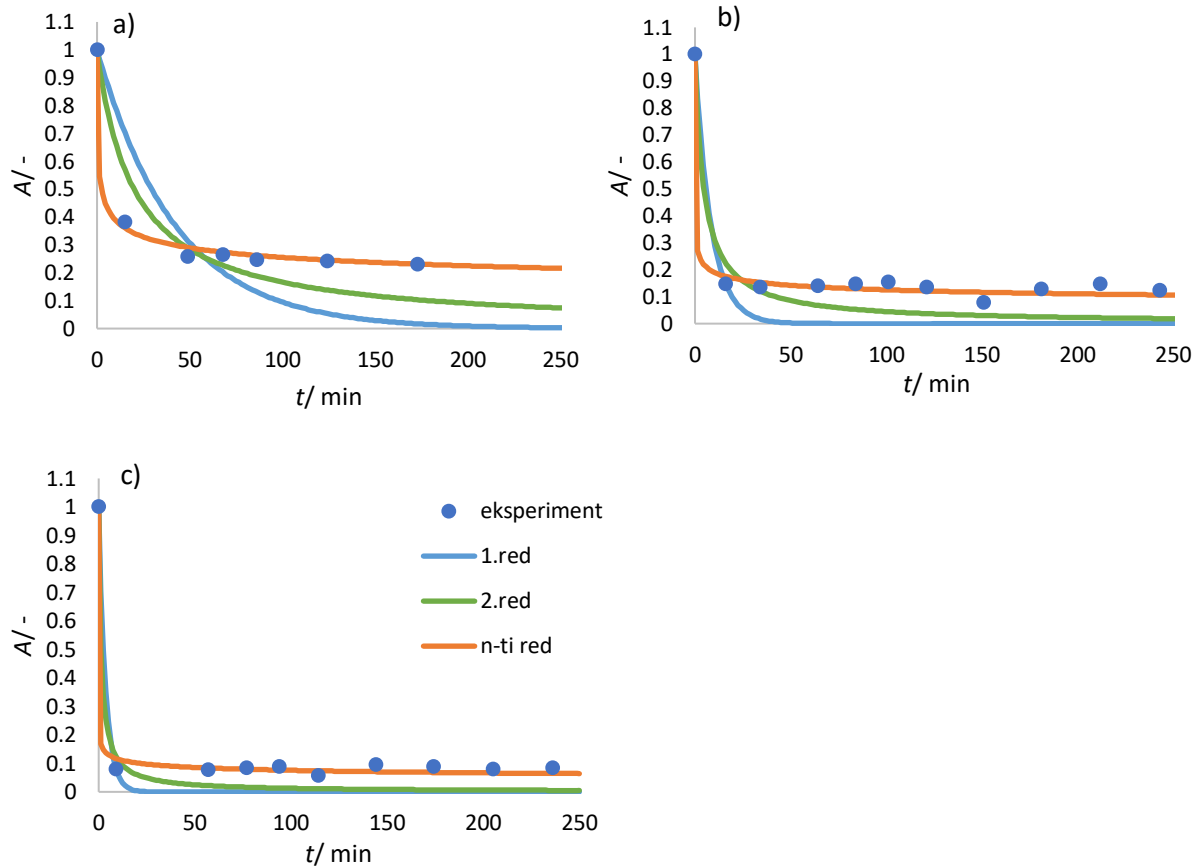


**Slika 3.** Simulacije ovisnosti preostale aktivnosti  $NcLPMO$  o različitim koncentracijama AscA: a) 0,1 mM AscA, b) 0,3 mM AscA, c) 0,5 mM AscA, d) 1 mM AscA

### Prilog 3

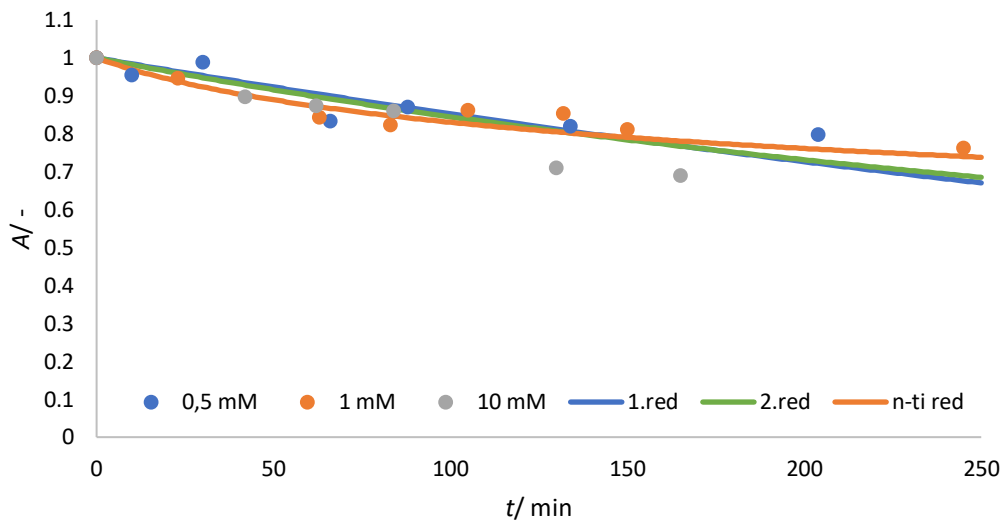


**Slika 1.** Simulacije ovisnosti preostale aktivnosti  $NcLPMO$  pri 10 mM  $H_2O_2$  o različitim koncentracijama AscA: a) 0,1 mM AscA, b) 0,3 mM AscA, c) 0,5 mM AscA, d) 1 mM AscA

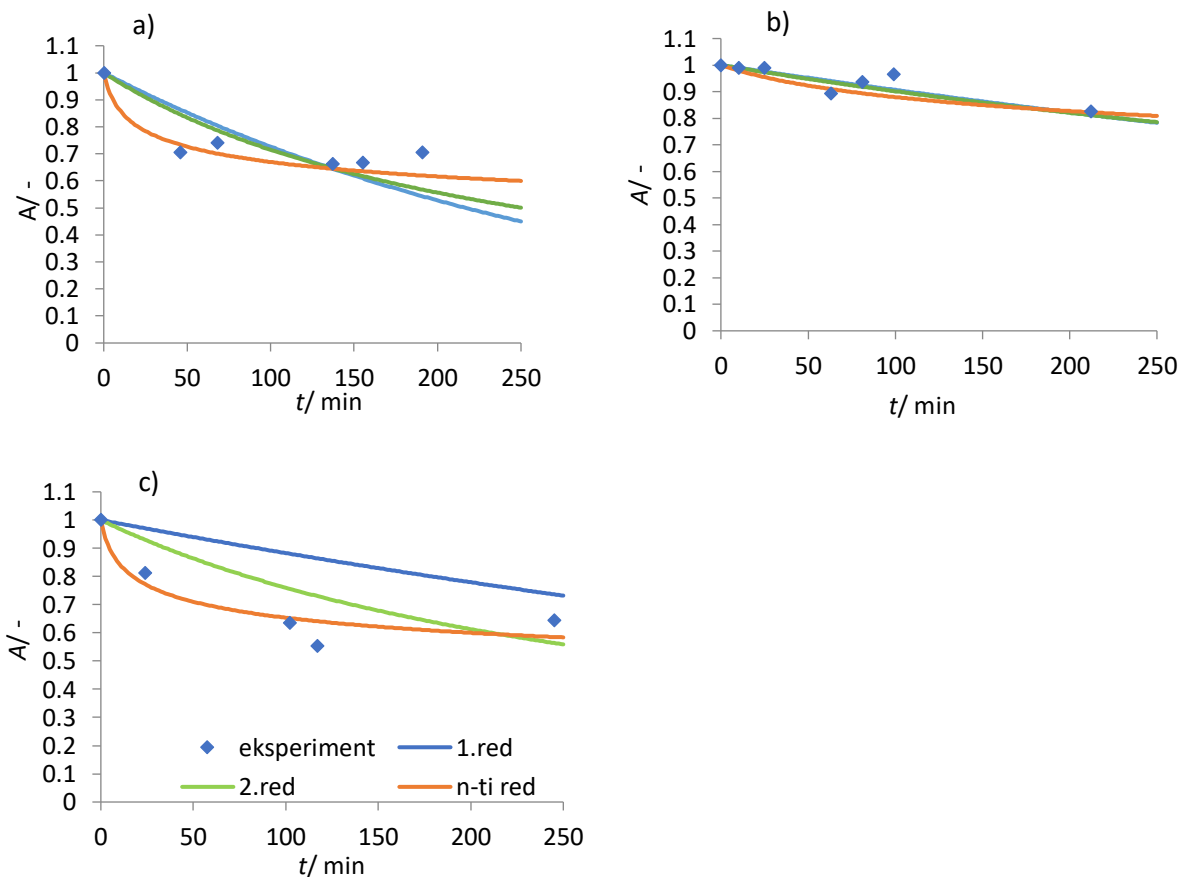


**Slika 2.** Simulacije ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* pri  $0,5 \text{ mM AscA}$  o različitim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ : a)  $0,1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ , b)  $0,5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ , c)  $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  (za  $10 \text{ mM}$  vidjeti Prilog 2, Slika 1 c))

## Prilog 4

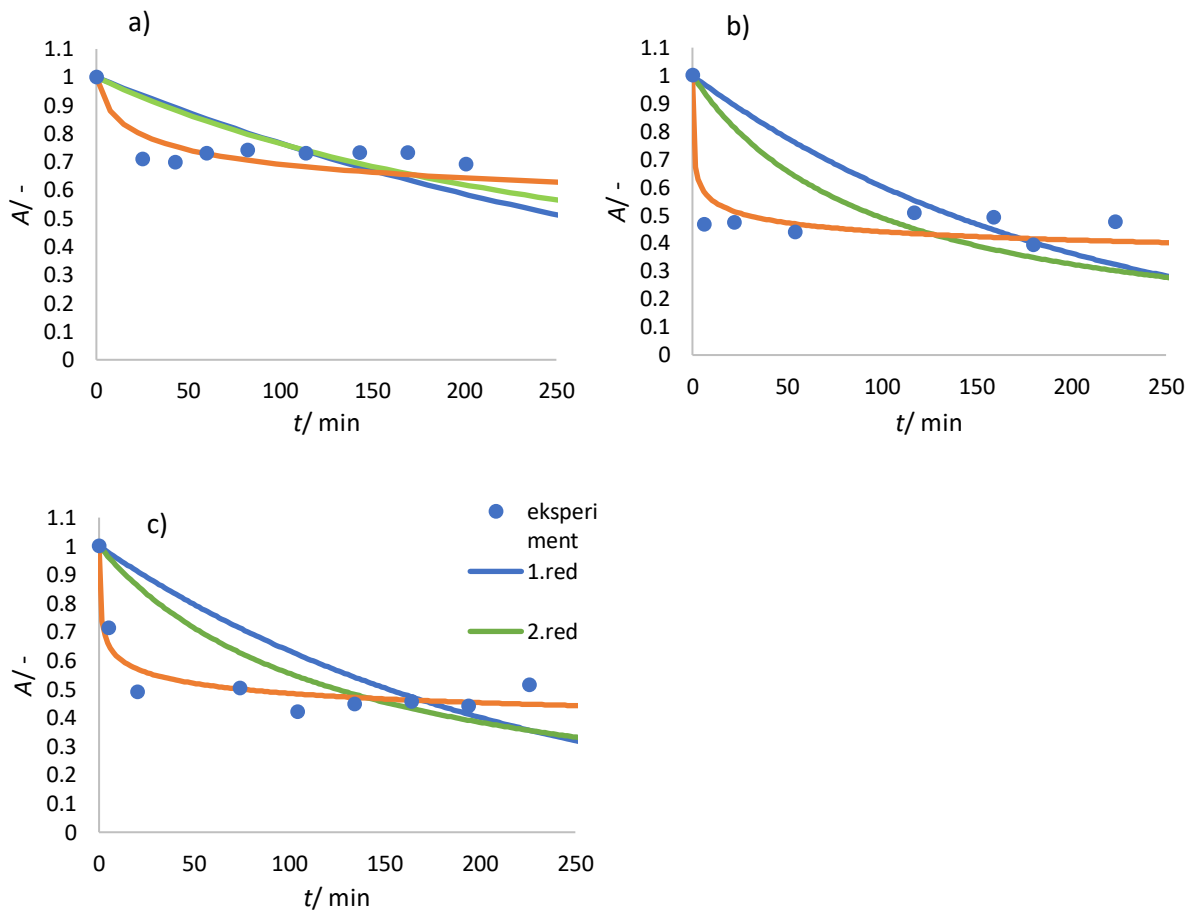


**Slika 1.** Simulacija ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* uz 100 mg celuloze o različitim koncentracijama  $H_2O_2$

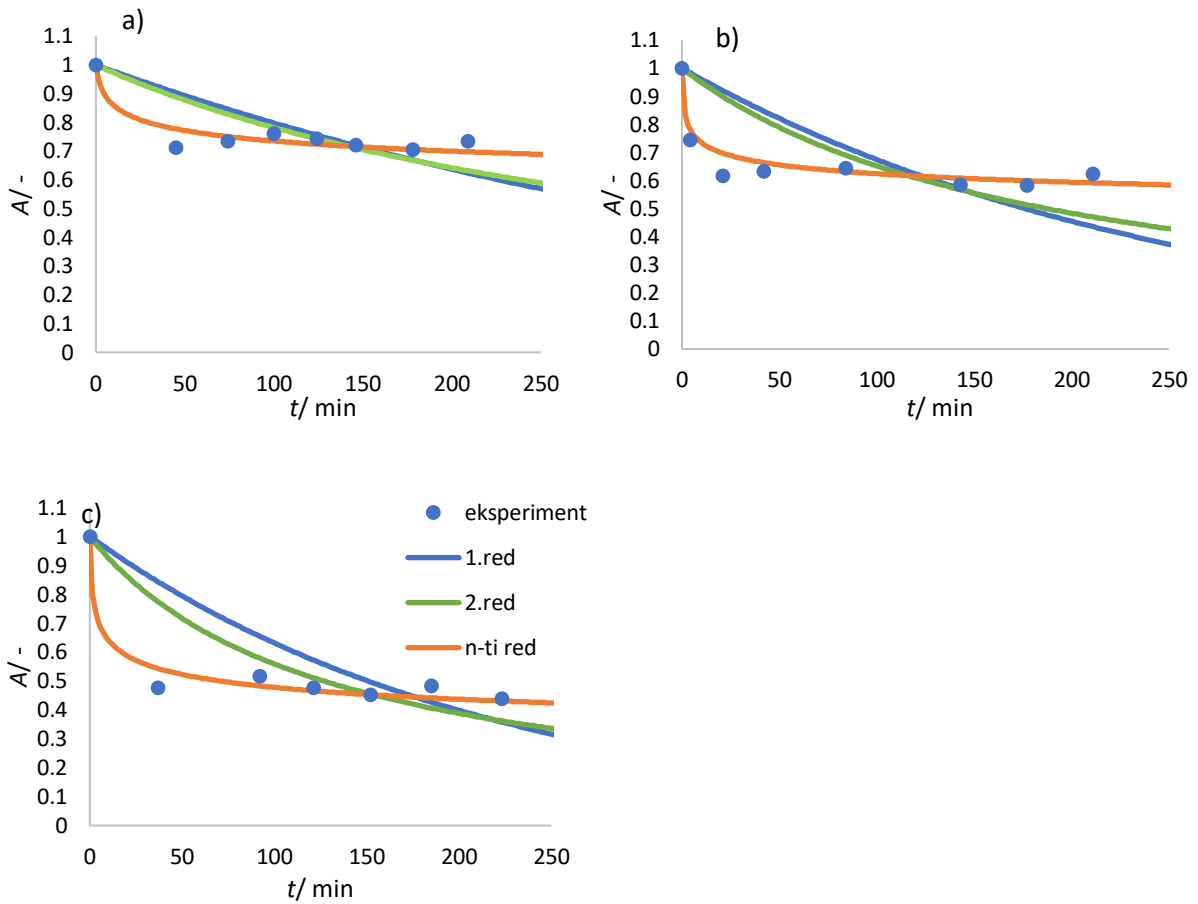


**Slika 2.** Simulacija ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* uz 100 mg celuloze o različitim koncentracijama AscA: a) 0,1 mM AscA, b) 0,3 mM AscA, c) 0,5 mM AscA

## Prilog 5



**Slika 1.** Simulacije ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* uz celulozu pri 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  o različitim koncentracijama AscA: a) 0,1 mM AscA, b) 0,3 mM AscA, c) 0,5 mM AscA



**Slika 2.** Simulacije ovisnosti preostale aktivnosti *NcLPMO* uz celulozu pri 0,5 mM AscA o različitim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ : a) 0,1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , b) 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , c) 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Prilog 6

**Tablica 1.** Usporedba preostale aktivnosti pri 100 mg celuloze, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i varijaciji *c*<sub>AscA</sub>

<i>c</i> <sub>AscA</sub> / mM	Preostala aktivnost/ %	Preostala aktivnost AscA + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - bez celuloze/ %	Preostala aktivnost AscA + 100 mg celuloze-bez H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / %	Preostala aktivnost samo AscA/ %
0	72	71	92	100
0,1	71	72	67	71
0,3	46	29	81	38
0,5	47	11	62	15
1		7		11

**Tablica 2.** Usporedba preostale aktivnosti pri 100 mg celuloze, 0,5 mM AsA i varijaciji *c*<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>

<i>c</i> <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> / mM	Preostala aktivnost/ %	Preostala aktivnost – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 0,5 mM AscA bez celuloze/ %	Preostala aktivnost H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 100 mg celuloze - bez AscA/ %	Preostala aktivnost – samo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / %
0	62	15		100
0,1		23		100
0,5	72	12	79	
1		9	78	71
5	61			68
10	47	11	72	71



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Ines Radić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis