

# Utjecaj litičkih polisaharidnih monooksigenaza na nanocelulozu

---

**Anđelini, Magdalena**

**Undergraduate thesis / Završni 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:159:194006>

*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**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Magdalena Anđelini**  
7928/BT (0058216971)

**UTJECAJ LITIČKIH POLISAHARIDNIH  
MONOOKSIGENAZA NA NANOCELULOZU**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biokemijsko inženjerstvo

**Mentor:** prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Utjecaj litičkih polisaharidnih monooksigenaza na nanocelulozu

Magdalena Anđelini, 0058216971

**Sažetak:** Nanoceluloza je prirodan materijal dobiven iz lignoceluloznih sirovina mehaničkim, kemijskim ili enzimskim postupcima. Zbog svojih iznimnih fizikalno-kemijskih svojstava primjenjuje se u proizvodnji kompozitnih materijala i papira te u prehrambenoj, kozmetičkoj i biomedicinskoj industriji. Enzimski katalizirani procesi za dobivanje nanoceluloze imaju brojne prednosti nad kemijskim, a skupina enzima koji su privukli poseban interes su litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO). Ovi enzimi imaju bitnu ulogu u razgradnji lignoceluloze jer djeluju sinergistički s drugim enzimima tako što povećaju dostupnost celuloze za djelovanje celulaza. Kao rezultat njihove C1-oksidacijske aktivnosti, LPMO induciraju slabljenje celuloznih vlakana uvođenjem karboksilnih skupina čime se povećava prinos nanoceluloze. Za mjerenje aktivnosti LPMO-a razvijena je nova metoda koja se temelji na hidrocoerulignonu kao supstratu i vodikovom peroksidu kao kosupstratu, a omogućava pouzdanu detekciju LPMO-a u složenim matricama poput fermentacijskog medija.

**Ključne riječi:** Litičke polisaharidne monooksigenaze, nanoceluloza, mjerenje aktivnosti

**Rad sadrži:** 23 stranice, 4 slike, 5 tablica, 57 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Prof. dr. sc. Tonči Rezić

**Datum obrane:** 7.7.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Effects of lytic polysaccharide monooxygenases on nanocellulose**

**Magdalena Anđelini, 0058216971**

**Abstract:** Nanocellulose is a natural material obtained from lignocellulosic materials by mechanical, chemical or enzymatic processes. Due to its exceptional physico-chemical properties, it is used in the production of composite materials and paper, as well as in the food, cosmetics and biomedical industries. Enzymatically catalyzed processes for the production of nanocellulose have numerous advantages over chemical ones, and the group of enzymes that have attracted special interest are lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO). These enzymes play an important role in the breakdown of lignocellulose because they act synergistically with other enzymes by increasing the availability of cellulose for cellulases. As a result of their C1-oxidizing activity, LPMOs disrupt the cellulose fibers by the introduction of carboxyl groups thus increasing the yield of nanocellulose. A new method has been developed for measuring the LPMO activity based on hydrocoerulignone as substrate and hydrogen peroxide as cosubstrate which allows reliable detection of LPMO in complex matrices like culture media.

**Keywords:** Lytic polysaccharide monooxygenases, nanocellulose, activity measurement

**Thesis contains:** 23 pages, 4 figures, 5 tables, 57 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. Tonči Rezić, PhD

**Thesis defended:** 7.7.2022.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. NANOCELULOZA.....	2
2.2. LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE .....	3
2.2.1. Klasifikacija i mehanizam djelovanja .....	3
2.2.2. Utjecaj strukturnih elemenata LPMO-a na aktivnost.....	5
2.2.3. Utjecaj morfoloških obilježja celuloze na aktivnost LPMO-a.....	7
2.2.4. Izazovi i buduće perspektive .....	10
2.3. PRIKAZ ISTRAŽIVANJA MJERENJA AKTIVNOSTI LPMO-a KORIŠTENJEM 2,6-DIMETOKSIFENOLA (2,6-DMP) I HIDROCOERULIGNONA (HC) .....	11
2.3.1. Uvod.....	11
2.3.2. Praćenje ekspresije <i>NcLPMO9C</i> .....	12
2.3.3. Istraživanje (“screening“) tvari koje inhibiraju LPMO.....	13
2.3.4. Opća pravila primjene metode mjerenja aktivnosti s hidrocoerulignonom .....	17
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>18</b>
<b>4. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>19</b>
<b>5. PRILOZI</b> .....	<b>24</b>
5.1. POPIS KRATICA.....	24

## 1. UVOD

Nanoceluloza je materijal nove generacije dobiven iz celulozne biomase mehaničkim, kemijskim ili enzimskim tretmanima. Zbog svojih iznimnih fizikalnih i kemijskih svojstava, nanoceluloza se koristi u proizvodnji papira, kompozitnih materijala i u prehrambenoj industriji (Börjesson i sur., 2015).

Enzimski katalizirani procesi za pripremu nanoceluloze smatraju se povoljnijima u odnosu na kemijske tretmane jer enzimski kataliziranim procesima ne nastaju toksični produkti koji bi mogli ograničiti upotrebu nanoceluloze u prehrambenoj, medicinskoj i kozmetičkoj industriji. Osim toga, smanjuje se velika potrošnja vode za neutralizaciju, a nakon enzimske pripreme celulozni nanokristali zadržavaju površinske hidroksilne skupine čime se osigurava bolja toplinska stabilnost (Karnaouri i sur., 2022). Najčešće korišteni enzimi su endo- $\beta$ -1,4-glukanaze (EG) koje djeluju nasumično na unutarnjim dijelovima celuloznih lanaca smještenih u amorfnim područjima vlakana (Karnaouri i sur., 2014). S druge strane, endoglukanaze koje pripadaju skupini glikozid-hidrolaza koriste se u pripremi nanokristalne i nanofibrilne celuloze, samostalno ili u kombinaciji s drugim enzimima (Xu i Chen, 2019). Druge celulaze, kao što su celobiohidrolaze, imaju negativan utjecaj na dobivanje nanoceluloze (Bian i sur., 2019). Enzimi koji mogu olakšati razgradnju celuloze uključuju hemicelulaze, posebice endo- $\beta$ -1,4-ksilanaze (EX), lakaze i litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO).

LPMO su enzimi koji su zbog svog načina djelovanja privukli poseban interes za proizvodnju nanoceluloze. Ovi enzimi imaju bitnu ulogu u razgradnji lignoceluloze jer djeluju sinergistički s drugim enzimima tako što povećaju dostupnost celuloze za djelovanje celulaza. Kao rezultat njihove C1-oksidacijske aktivnosti, LPMO induciraju slabljenje celuloznih vlakana uvođenjem karboksilnih skupina čime se povećava prinos nanoceluloze. Osim njihove uloge u pripremi nanostrukture, LPMO su također enzimi za dodatnu obradu i funkcionalizaciju nanoceluloze, a najnovija istraživanja ukazuju da je potrebno provoditi daljnja istraživanja kako bi se razjasnila funkcija LPMO-a u proizvodnji nanoceluloze (Karnaouri i sur., 2022).

Radi optimizacije proizvodnje nanoceluloze enzimski kataliziranim procesima potrebna je pouzdana i osjetljiva metoda za mjerenje enzimske aktivnosti LPMO-a. Takva metoda preduvjet je i za učinkovitu proizvodnju, pročišćavanje i karakterizaciju samih enzima. Nova metoda za mjerenje aktivnosti temelji se na hidrocoerulignonu kao supstratu i vodikovom peroksidu kao kosupstratu, a omogućava pouzdanu detekciju LPMO-a u složenim matricama poput fermentacijskog medija (Breslmayr i sur., 2019).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. NANOCELULOZA

Nanoceluloza je materijal dobiven iz celuloze s barem jednom dimenzijom u nanometarskoj veličini. Ovisno o uvjetima proizvodnje, koji utječu na dimenzije, sastav i svojstva, nanoceluloza se može podijeliti u tri skupine: celulozni nanokristali (CNC), celulozna nanovlakna (CNF) i bakterijska nanoceluloza (BNC) koju sintetizira bakterija *Gluconacetobacter xylinus* (Sharma i sur. 2019).

Nanoceluloza se pokazala kao ekološki prihvatljiv materijal s iznimnim mehaničkim svojstvima zahvaljujući svojoj strukturi. Bez obzira na vrstu nanoceluloze, pokazuje hidrofilnost, relativno veliku specifičnu površinu, veliku tlačnu čvrstoću i fleksibilnosti te dobra električna i toplinska svojstva. Klasificirana je kao siguran materijal za rukovanje i konzumaciju, a velika biokompatibilnost i biorazgradivost čini ju obećavajućim materijalom u biomedicinskoj primjeni (Börjesson i sur., 2015).

Celulozni nanokristali (CNC) pretežno se dobivaju primjenom anorganskih kiselina kao što su  $H_2SO_4$  ili  $HCl$ . Iako su postupci kiselinske hidrolize jednostavni, imaju brojne nedostatke kao što su velika potrošnja vode, korozija opreme i velika količina otpada. Također, dugotrajna izloženost celuloznih materijala anorganskim kiselinama može smanjiti kristaliničnost i uzrokovati promjenu strukture konačnog proizvoda (Trache i sur., 2017). Celulozna nanovlakna (CNF) dobivaju se raznim kemijsko-mehaničkim tretmanima koji generalno zahtijevaju velik utrošak energije. Potrošnja energije može se smanjiti za 30-50% ako mehaničkoj obradi prethodi kemijski ili enzimski predtretman (Naderi i sur., 2015).

Enzimski katalizirani procesi za pripravu nanoceluloze imaju brojne prednosti nad kemijskim tretmanima zbog manjeg utroška vode i energije te većeg prinosa nanoceluloze. U ove svrhe koriste se pojedinačni enzimi ili kombinacije endoglukanaza (EG), endoksilanaza (EX), lakaza i litičkih polisaharidnih monooksigenaza (LPMO) (Karnaouri i sur., 2022) o kojima će biti riječ u nastavku.

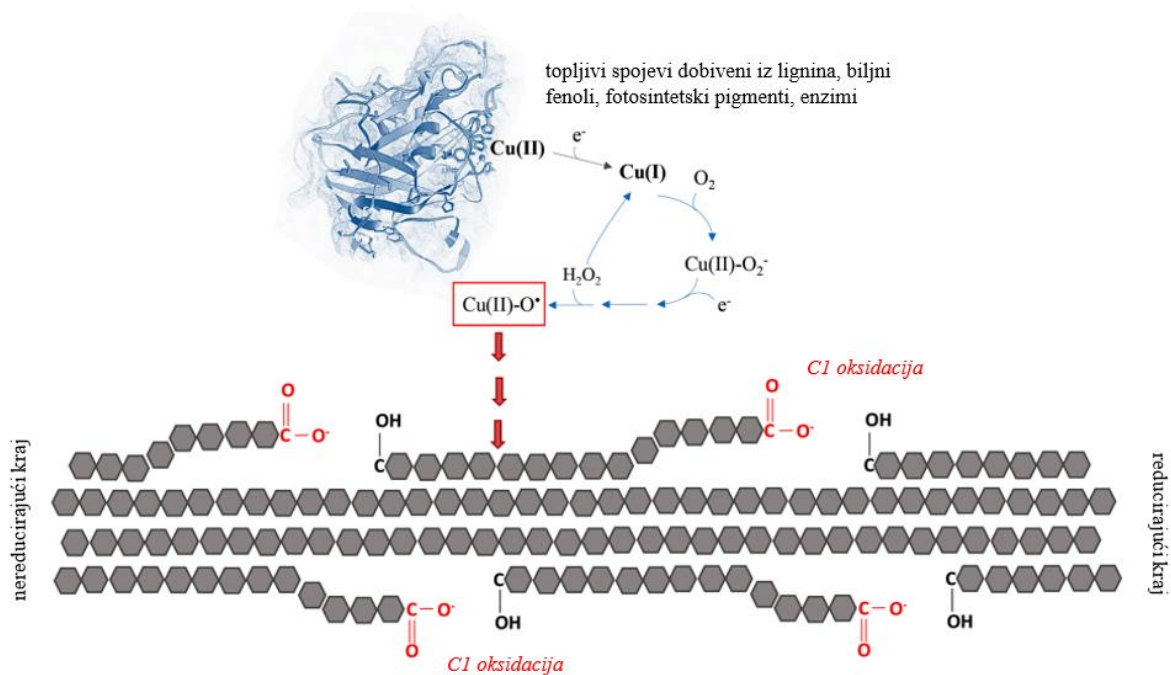
## 2.2. LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE

### 2.2.1. Klasifikacija i mehanizam djelovanja

Litičke polisaharidne monooksigenaze otkrivene su 2010. godine (Vaaje-Kolstad i sur., 2010) i od tada su provedena mnoga istraživanja vezana uz karakterizaciju i primjenu ovih enzima. U prirodi su LPMO rasprostranjeni u većini carstava živih organizama, uključujući gljive, životinje, protiste, arheobakterije i eubakterije. Na temelju sličnosti u slijedu aminokiselina, LPMO su u bazi podataka CAZy razvrstani u skupinu pomoćnih enzima (AA) (Lombard i sur., 2014) te u 6 podskupina (AA9, AA10, AA11, AA13, AA14 i AA15). Supstrati za ove enzime su polisaharidi, kao što su celuloza, hitin, škrob, pektin i topljivi oligosaharidi. Članovi podskupina AA9, AA10, AA15 i AA16 oksidiraju celulozu, podskupine AA9 i AA14 djeluju na hemicelulozu (Bissaro i sur., 2018; Couturier i sur., 2018), dok je supstrat za AA17 pektin u staničnoj stijenci (Sabbadin i sur., 2021).

Prva istraživanja o djelovanju LPMO-a pokazuju da se kataliza odvija redukcijom bakra i aktivacijom kisika, dok elektrone osigurava vanjski donor (Meier i sur., 2018; Quinlan i sur., 2011). Kasnije se pokazalo da ovi enzimi mogu djelovati i kao peroksigenaze i koristiti vodikov peroksid (Bissaro i sur., 2017). Donori elektrona mogu biti različiti organski spojevi kao što su cistein, askorbinska kiselina, fenoli, spojevi izvedeni iz lignina, enzimi i fotokatalitički sustavi (Haddad i sur., 2021; Muraleedharan i sur., 2018; Frommhagen i sur., 2018; Frommhagen i sur., 2016; Loose i sur., 2016). Njihova sposobnost doniranja elektrona je u korelaciji s njihovim redoks potencijalom, budući da svi spojevi s vrijednošću redoks potencijala nižom ili približno jednakom onoj aktivnog mjesta LPMO-a mogu donirati elektrone. Većina dosad karakteriziranih LPMO-a ima redoks potencijal od oko +150-350 mV u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu (SHE) zbog čega mogu primiti elektrone od mnogih spojeva (Muraleedharan i sur., 2018; Garajova i sur., 2016; Kracher i sur., 2016;. Borisova i sur., 2015).





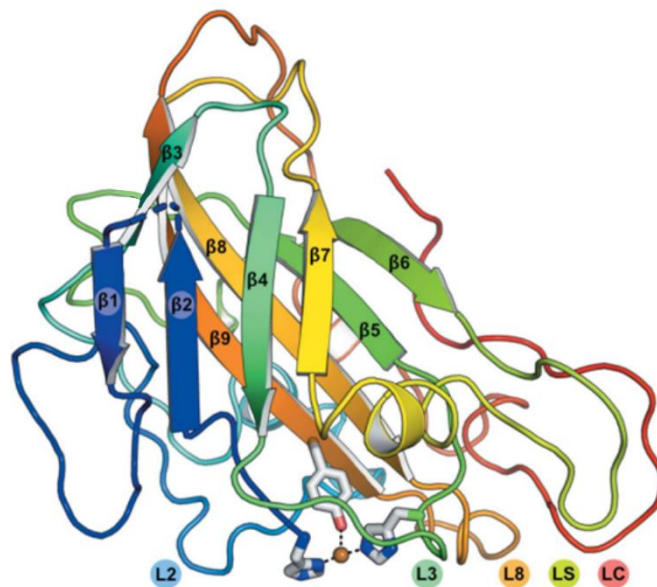
**Slika 1.** Shematski prikaz C1-oksidacijskog katalitičkog ciklusa LPMO-a (prema Karnaouri i sur., 2022)

Katalitički ciklus LPMO-a (slika 1) uključuje nekoliko koraka prijenosa elektrona počevši od redukcije Cu(II) u Cu(I) u aktivnom mjestu enzima pomoću vanjskog donora elektrona (Kim i sur., 2014). Nakon redukcije, Cu(I) stupa u interakciju s molekulom kisika tvoreći Cu(II)-superokso intermedijer, koji nakon nekoliko reakcija tvori oksilni radikal Cu(II)-O. Redukcija bakra odvija se zajedno s aktivacijom kisika pomoću LPMO-a (aktivnost monooksigenaze), nakon čega slijedi vezanje LPMO-a na supstrat (Zhang, 2020). Oksilni radikal napada vodik na C1 ili C4 atomu  $\beta$ -1,4-glikozidne veze supstrata te apstrahira atom vodika uzrokujući destabilizaciju glikozidne veze i njeno cijepanje (Phillips i sur., 2012; Beeson i sur., 2012). Oksidativnim cijepanjem glikozidne veze se, ovisno o regioselektivnosti LPMO-a, kao produkt dobiva aldonska kiselina (C1-oksidacijom), ketoaldoza (C4-oksidacijom) ili njihova kombinacija (C1/C4-oksidacijom). U slučaju interakcije enzima u Cu(I) stanju s vodikovim peroksidom (aktivnost peroksigenaze), hidroksilni radikali nastaju kemijskim mehanizmom sličnim Fentonovoj reakciji, što dovodi do nespecifične oksidacije supstrata (Hangasky i sur., 2018).

### 2.2.2. Utjecaj strukturnih elemenata LPMO-a na aktivnost

Heterologna ekspresija LPMO-a omogućila je korištenje metoda genetičkog inženjerstva s ciljem poboljšanja njihovih svojstava i određivanja strukturnih elemenata važnih za oksidaciju supstrata i termostabilnost enzima. Heterologna proizvodnja LPMO-a zabilježena je u eukariotskom ekspresijskom sustavu domaćina kvasca *Pichia pastoris*, koji ima mogućnost posttranslacijske glikozilacije. Međutim, ovaj sustav nema mogućnost N-terminalne metilacije koja je tipična za LPMO gljivičnog podrijetla (Quinlan i sur., 2011). Različita istraživanja opisuju ekspresiju LPMO-a u filamentoznim gljivama, kao što su *Trichoderma reesei* (Zhang i sur., 2019), *Aspergillus niger* (Calderaro i sur., 2020) i *Aspergillus oryzae* (Petrović i sur., 2018), te upućuju na veću stabilnost metiliranih proteina u odnosu na nemetilirane. Metilacija smanjuje oksidativnu samoinaktivaciju enzima čime se poboljšava ukupna učinkovitost enzima. Iako je dizajniranje mutanata LPMO-a još uvijek u ranoj fazi, napravljeno je nekoliko uspješnih pokušaja usmjerenom evolucijom i genetičkim inženjerstvom čime su dobiveni LPMO s poboljšanom katalitičkom učinkovitošću, termostabilnošću, većim afinitetom prema supstratu, ciljanom regioselektivnošću i specifičnošću prema supstratu i visokom tolerancijom na vodikov peroksid. Visoka tolerancija na vodikov peroksid važna je iz razloga što LPMO koriste peroksid kao kosupstrat u svom katalitičkom ciklusu, pa je poželjno da mogu tolerirati koncentraciju peroksida koja je nužna za postizanje maksimalne brzine reakcije bez denaturacije enzima (Müller i sur., 2018). Povećanje termostabilnosti enzima ima industrijske i ekonomske prednosti. Prema Tangheu i sur. (2017), dodavanje disulfidnih mostova radi otpornosti na toplinsku inaktivaciju rezultiralo je povećanjem temperature denaturacije za 12 °C. Najčešća strategija za provedbu mutacija je supstitucija aminokiselina, te su Lo Leggio i sur. (2018) pokazali da LPMO protein supstituiran s 4 aminokiseline ima temperaturu denaturacije 7 °C višu od nativnog proteina. Najizazovniji aspekt u uvođenju mutacija LPMO-a je mijenjanje regioselektivnosti enzima i omjera C1/C4-oksidiranih produkata. Izgledno je da aromatske aminokiseline odgovorne za prepoznavanje i vezanje supstrata (petlje L2, L3, LS, L8 i LC) (slika 2) imaju ključnu ulogu u oksidaciji supstrata, budući da su mutanti LPMO-a sa supstitucijama na tim mjestima pokazali različitu selektivnost prema C1 ili C4-oksidaciji (Danneels i sur., 2017; Mazurkewich i sur., 2021). Vu i sur. (2014) pokazali su da je duljina L2 petlje od velike važnosti za regioselektivnost LPMO-a iz AA9 podskupine. Nakon skraćivanja L2 petlje za 12 aminokiselina u C1/C4-oksidacijskom LPMO-u, detektirani su samo produkti C1-oksidacije.

Slični rezultati uočeni su za petlju L3, gdje je skraćenje dovelo do nemogućnosti korištenja ksiloglukana kao supstrata (Laurent i sur., 2019). Ove petlje tvore ravnu površinu tipičnu za LPMO koji djeluju na kristalne supstrate, a mutacije koje rezultiraju zakrivljenim aktivnim mjestima pokazuju smanjenu aktivnost enzima, čime se potvrđuje da je ravna površina bitna za depolimerizaciju kristalnog supstrata (Frandsen i sur., 2016).



**Slika 2.** Struktura *McAA9F* s naznačenim petljama L2, L3, LS, L8 i LC koje sudjeluju u formiranju ravne površine tipične za LPMO koji djeluju na kristalne supstrate (Mazurkewich i sur., 2021)

Posebna pažnja posvećena je ulozi modula za vezanje ugljikohidrata (CBM) na LPMO te je dokazano da enzim bez CBM-a ima slabiju aktivnost vezanja supstrata (Laurent i sur., 2019), a dodavanje CBM-a stabilizira enzim na supstratu (Courtade i sur., 2018). Mutacije se uvode i s ciljem poboljšanja katalitičke učinkovitosti enzima koja je postignuta točkastom mutacijom što je rezultiralo poboljšanom razgradnjom lignocelulozne biomase. Guo i sur. (2020) navode da je supstitucija arginina u leucin u području blizu L2 petlje u AA9 LPMO-u promijenila interakciju vodikovih veza sa susjednim aminokiselinama i supstratom što je rezultiralo većom katalitičkom učinkovitošću enzima za pretvorbu biomase.

### 2.2.3. Utjecaj morfoloških obilježja celuloze na aktivnost LPMO-a

Sinergističke reakcije između LPMO-a i celulaza na razgradnju lignocelulozne biomase u literaturi su dokumentirane već više od desetljeća. LPMO su sastavni dio komercijalnih enzimskih pripravaka za industrijsku upotrebu (Karnaouri i sur. 2019). Istraživanja o učinku LPMO-a na morfologiju vlakana otkrila su da enzimi djeluju na celulozne lance koji se nalaze na površini vlakana, a njihov oksidativni način djelovanja dovodi do odvajanja vlakana, čime nastaju tanje strukture (Eibinger i sur., 2014; Ladevèze i sur., 2017). Utjecaj LPMO-a na vlakna i sinergijski učinci između LPMO-a i celulaza ovise o kristaliničnosti supstrata i ukupnom broju mjesta koja su dostupna za vezanje enzima. U istraživanju iz 2019., Valenzuela i sur. proučavali su celulozne supstrate različite kristaliničnosti kako bi procijenili aktivnost *Sam*LPMO10 te su pokazali da se ona razlikuje ovisno o konformaciji vlakana i proporcionalno je povezana s indeksom kristaliničnosti celuloze. Također, regioselektivnost enzima bitan je čimbenik u cjelokupnom oksidativnom procesu (Tokin i sur., 2020).

Integracija koraka tretmana s LPMO u proizvodnji nanoceluloze patentirana je 2015. godine (Cathala i sur., 2015) i dokumentirana je u nedavnim istraživanjima, što je sažeto u tablici 1. Osim djelovanja LPMO-a na kristalna područja supstrata čime slabi struktura vlakana (Eibinger i sur. 2014) i olakšava se djelovanje celulaza (Tokin i sur., 2020), LPMO se u izolaciji nanoceluloze koristi i za uvođenje karboksilnih skupina C1-oksidacijom koje potiču defibrilaciju zbog elektrostatskog odbijanja (Koskela i sur., 2019). Ovo svojstvo LPMO-a implicira da njihovo korištenje u izolaciji nanoceluloze može poslužiti kao korak predobrade prije mehaničke dezintegracije ili ultrazvuka za pripremu celuloznih nanovlakana (CNF) i celuloznih nanokristala (CNC), kao i za karakterizaciju ugradnjom karboksilnih skupina. Prisutnost karboksilnih skupina utječe na međumolekularne vodikove veze jer dolazi do elektrostatskog odbijanja između sličnih naboja čime se pospješuje odvajanje vlakana na sličan način kao i interakcijom nabijenih skupina uvedenih nakon tretmana kiselinom. Glavna razlika je ipak u tome što, u usporedbi s kiselinom, LPMO utječu na razgradnju kristalnih područja.

Uporaba LPMO u kombinaciji s drugim hidrolitičkim enzimima pogoduje izolaciji nanoceluloze. Enzimska predobrada s LPMO-om u kombinaciji s endoglukanazom i endoksilanazom uspješno je primijenjena prije ultrazvuka za proizvodnju CNF-a od pulpe tvrdog drva dobivene Kraft postupkom (Hu i sur., 2018). Kombinirana aktivnost dvaju hidrolitičkih endo-enzima povećala je dostupnost kristalnog supstrata, što je dovelo do povećanja aktivnost LPMO-a. LPMO je uveo mjesta cijepanja na vlaknu i potaknuo defibrilaciju ugradnjom karboksilnih skupina. Upotreba celulaza i LPMO-a kao međutretmana

također poboljšava izolaciju i prinos nanoceluloze, zamjenjuje korake alkalne obrade i kiselinske hidrolize te skraćuje cikluse izbjeljivanja potrebne za dobivanje konačnog proizvoda, što je dokazano na brezi prethodno obrađenoj organskim otapalima (organosolv predtretman) poput metanola, etanola, acetona, etilen glikola i tetrahidrofurfuril alkohola (Muraleedharan i sur., 2021). Postupkom su dobivene koloidne suspenzije s visokim udjelom karboksila i poboljšanom termostabilnošću.

**Tablica 1.** Pregled istraživanja u kojima je korišten LPMO tijekom proizvodnje nanoceluloze (prema Karnaouri i sur., 2022)

Sirovina	Učinak LPMO-a na izolaciju nanoceluloze	LPMO korišten u istraživanju	Tip nanoceluloze	Referenca
Breza tretirana organosolv predtretmanom	Tretman LPMO-om omogućio je skraćenje ciklusa izbjeljivanja i izostavljanje alkalne obrade i kisele hidrolize	<i>Mt</i> LPMO9H (C1/C4 aktivnost), <i>Pc</i> LPMO9D (C1-aktivnost)	CNC	Muraleedharan i sur. (2021)
Mikrokristalna celuloza	Tretman LPMO-om rezultirao je izolacijom CNC-a bez kiselinske obrade	<i>Nc</i> LPMO9E (C1-aktivnost), <i>Nc</i> LPMO9F (C1-aktivnost)	CNC	Koskela i sur. (2021)
Lanena pulpa	LPMO je djelovao zajedno s celulazama u izolaciji CNF-a	<i>Sam</i> LPMO10C (C1-aktivnost)	CNF	Valenzuela i sur. (2019)
Pamučni linteri	LPMO je djelovao zajedno s celulazama u izolaciji CNF-a	<i>Sam</i> LPMO10C (C1-aktivnost)	CNF	Valls i sur. (2019)
Delignificirana vlakna mekog drva	Tretman s LPMO poboljšao je izolaciju CNF-a nakon mehaničke obrade	<i>Nc</i> LPMO9E (C1-aktivnost), <i>Nc</i> LPMO9F (C1-aktivnost)	CNF	Koskela i sur. (2019)
Kraft pulpa izbijeljene breze	Tretman s LPMO poboljšao je izolaciju CNF-a nakon mehaničke obrade	<i>Pa</i> LPMO9E (C1-aktivnost)	CNF	Moreau i sur. (2019)
Kraft pulpa tvrdog drveta	LPMO je djelovao zajedno s endoglukanazom i endoksilanazom u izolaciji CNF-a	<i>Ta</i> LPMO9 (C1/C4 aktivnost)	CNF	Hu i sur. (2018)

Kraft pulpa izbijeljenog mekog drva	Tretman s LPMO poboljšao je izolaciju CNF-a nakon mehaničke obrade	<i>Pa</i> LPMO9H (C1/C4 aktivnost)	CNF	Villares i sur. (2017)
---	--	---------------------------------------	-----	---------------------------

CNC – celulozni nanokristali, CNF – celulozna nanovlakna

Nanofibrilacija lanene pulpe provedena je pomoću *Sam*LPMO10 iz *Streptomyces ambofaciens* i egzoglukanaze (EG). Usporedbom proizvoda nano-veličine, pokazalo se da je kombinacija oba enzima rezultirala većim prinosom (24,3%) u odnosu na slučaj u kojem je primijenjen samo LPMO (12,7%) (Valenzuela i sur., 2019). Rezultati upućuju na sinergijske učinke između EG i LPMO, pri čemu EG povećava ukupnu količinu dostupnih kristalnih područja, dok LPMO dovodi do slabljenja strukture vlakana i nastanka CNF-a. Valls i sur. (2019) izolirali su CNF iz pamučnih lintera, s prinosom od 23%, nakon tretmana sa *Sam*LPMO10 i koktelom celulaza bez promjene stupnja polimerizacije vlakana. LPMO su proučavani kao monoenzimi kako bi se procijenila njihova sposobnost povećanja prinosa CNF-a nakon mehaničke obrade. Većina istraživanja nije pokazala modifikacije ili promjene strukture šećera u supstratu. Međutim, učinak LPMO-a vidljiv je u downstream procesima i odražava se u svojstvima proizvedenih CNF-a (Villares i sur., 2017; Moreau i sur., 2019).

Villares i sur. (2017) pokazali su da predobrada Kraft pulpe izbijeljenog mekog drveta s *Pa*LPMO9H iz gljive *Podospora anserina* može modificirati celuloznu mrežu i potaknuti raslojavanje vlakana, što je cjelokupnu strukturu učinilo osjetljivijom na naknadnu mehaničku obradu za izolaciju CNF-a. Moreau i sur. (2019) tretirali su izbijeljenu Kraft pulpu od breze s *Pa*LPMO9E, pokazujući da vlakna obrađena LPMO-om mogu nakon mehaničke obrade uspješno formirati dobro dispergiranu, stabilnu koloidnu suspenziju, dok se neobrađena vlakna nisu mogla obraditi zbog začepljenja komora homogenizatora. U radu o delignificiranim vlaknima mekog drveta, Koskela i sur. (2019) usporedili su djelovanje dva različita LPMO-a, jedan koji sadrži CBM (modul za vezanje ugljikohidrata) (*Nc*LPMO9E) i jedan bez CBM-a (*Nc*LPMO9F). Iako su oba enzima povećala negativni naboj supstrata bez promjene kristaliničnosti, tretman s LPMO-om bez CBM-a doveo je do tanjih vlakana s većim sadržajem karboksilata. Slični rezultati primijećeni su u nedavnom radu (Koskela i sur., 2021) koji opisuje uspješnu izolaciju CNC-a iz mikrokristalne celuloze pomoću LPMO tretmana, centrifugiranja i blage sonikacije. Tretman s LPMO-om bez CBM domene doveo je do povećanog taloženja karboksilata.

LPMO su također obećavajući enzimi za dodatnu obradu izolirane nanoceluloze s ciljem daljnjeg povećanja sadržaja karboksilata kroz modifikaciju površine, individualiziranje vlakana

ili kristala i poboljšanja koloidne stabilnosti (Karnaouri i sur., 2020; Muraleedharan i sur., 2021). Međutim, budući da LPMO djeluju prvenstveno na kristalna područja celuloze i proizvode ne samo tanje, već i kraće nanočestice, treba uzeti u obzir gubitak prinosa i optimizirati uvjete reakcije kako bi se spriječila produljena degradacija supstrata. Uloga C4-oksidacije u nanofibrilaciji celuloze još nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, vjerojatno je da će stvaranje 4-ketoaldoza nastalih C4-oksidacijom imati suprotan učinak od karboksilata dobivenih C1-oksidacijom, jer dovodi do pojačanja međumolekularnih vodikovih veza i posljedično povećanja kristaliničnosti vlakana. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se objasnio utjecaj C4-oksidacije i mogući sinergistički učinci s C1-oksidirajućim LPMO-ima u pogledu proizvodnje nanoceluloze.

#### 2.2.4. Izazovi i buduće perspektive

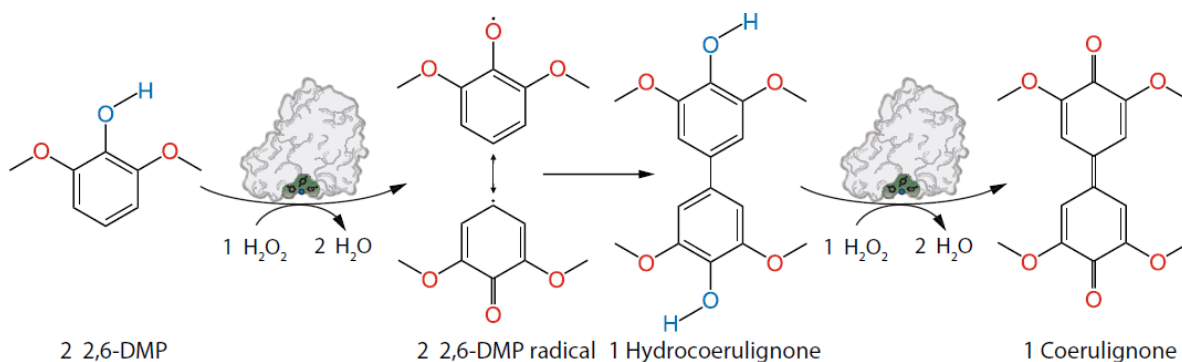
U procesu dobivanja nanoceluloze iz lignocelulozne biomase, enzimi imaju ključnu ulogu i izravno utječu na prinos i svojstva konačnog proizvoda. Međutim, cijena enzima i dalje je relativno visoka i trenutno dostupni biokatalizatori ne mogu postići visoke prinose bez primjene koraka predobrada. Kako bi se smanjili troškovi, korištenje jeftinih izvora za fermentaciju s ciljem proizvodnje enzima, kao i primjena enzimskog inženjerstva, preduvjeti su za povećanje ukupne učinkovitosti procesa. Nakon enzimskih procesa s lignoceluloznim supstratima dobivaju se heterogene mješavine spojeva, stoga je potrebno nekoliko koraka odvajanja i pročišćavanja kako bi se dobile frakcije spojeva sa specifičnim karakteristikama, što povećava cijenu. Konvencionalne tehnike filtracije, centrifugiranja i dijalize obično se koriste za dobivanje pročišćenog i koncentriranog nanoceluloznog proizvoda. Nadalje, izolacija celuloznih nanovlakana iz lignoceluloze u većini slučajeva gotovo da nije izvediva bez oštećenja vlakana ili gubitka prinosa. Razlozi su brojne vodikove veze koje povezuju vlakna i prisutnost drugih sastojaka biomase, kao što su lignin i ksilan. Stoga je obećavajuća i integracija proizvodnje nanoceluloze u okviru biorafinerija, jer će omogućiti valorizaciju svih frakcija biomase i proizvodnju različitih vrijednih spojeva.

Jedan od izazova je i razvoj metoda za mjerenje aktivnosti LPMO-a u heterogenim i kompleksnim matricama, stoga je u nastavku rada opisana metoda mjerenja aktivnost LPMO-a korištenjem 2,6-dimetoksifenola (2,6-DMP) i hidrocoerulignona (HC).

## 2.3. PRIKAZ ISTRAŽIVANJA MJERENJA AKTIVNOSTI LPMO-a KORIŠTENJEM 2,6-DIMETOKSIFENOLA (2,6-DMP) I HIDROCOERULIGNONA (HC)

### 2.3.1. Uvod

Istraživanje je provela grupa autora (Breslmayr i sur.) te je rad objavljen u časopisu *Biotechnology for Biofuels* 2019. godine. U radu je prikazan razvoj metode za određivanje aktivnosti LPMO-a korištenjem 2,6-dimetoksifenola (2,6-DMP) i hidrocoerulignona (HC) koja omogućava pouzdano mjerenje aktivnosti LPMO-a u kompleksnim matricama. Reakcija oksidacije prikazana je na slici 3.



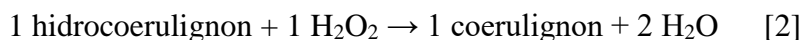
**Slika 3.** Oksidacija 2,6-dimetoksifenola i dobivanje kromofora coerulignona (Breslmayr i sur., 2019)

Coerulignon je kromoforna molekula, te se mjerenjem promjene apsorbancije pomoću spektrofotometra može izmjeriti aktivnost LPMO-a. Veća aktivnost LPMO-a očituje se kao povećanje vrijednosti apsorbancije. Također, za uspješno provođenje reakcije potrebno je koristiti vodikov peroksid koji se kao kosupstrat reducira. Stehiometrijske reakcije prikazane su u nastavku.

Hidrocoerulignon je prvi produkt LPMO-om katalizirane konverzije 2,6-dimetoksifenola (2,6-DMP) u coerulignon (jednadžba 1),

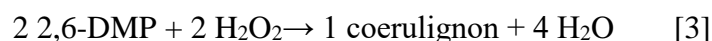


nakon koje slijedi reakcija opisana jednadžbom 2:





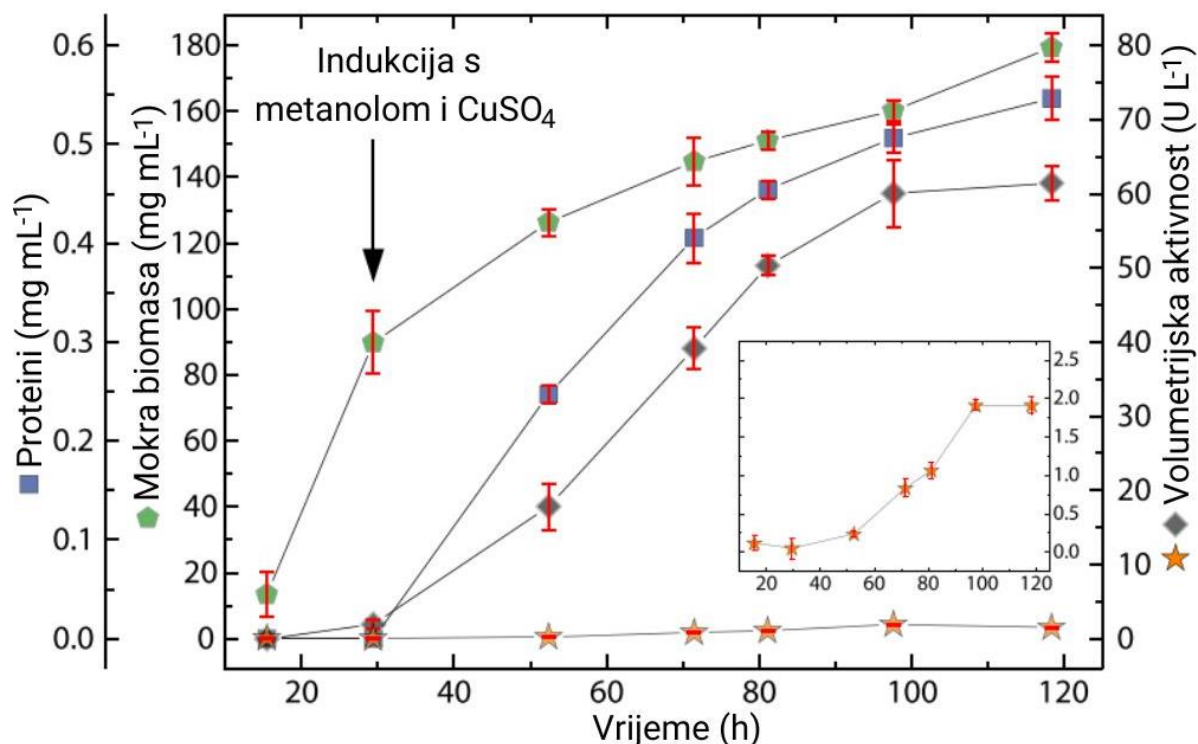
Ukupna reakcija (jednadžba 3) glasi:



Molarni apsorpcijski koeficijent hidrocoerulignona pri 280 nm iznosio je  $16,260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Brzina reakcije LPMO-a s HC-om je oko 15 puta veća nego s 2,6-DMP-om. Razlog bi mogao biti bolje vezanje supstrata u aktivnom mjestu LPMO-a, što je vidljivo iz niže prividne  $K_M$  vrijednosti za HC (oko 3.6 mM) nego za 2,6-DMP (oko 100mM) i iz nižeg redoks potencijala HC-a.

### 2.3.2. Praćenje ekspresije *NcLPMO9C*

Primjenjivost metode za mjerenje aktivnosti LPMO-a na praćenje ekspresije rekombinantnog proteina *NcLPMO9C* testirana je pomoću *P. pastoris*. Za mjerenje aktivnosti eksprimiranog *NcLPMO9C* u supernatantu korištena je metoda mjerenja aktivnosti pomoću hidrocoerulignona kao supstrata, te metoda s 2,6-DMP-om kao supstratom (slika 4). Ekspresija LPMO-a inducirana je metanolom 29 sati nakon početka šaržnog uzgoja i dodan je bakrov (II) sulfat do koncentracije od  $100 \mu\text{M}$  kao izvor bakra za aktivno mjesto LPMO-a. Neposredno nakon dodatka bakrova (II) sulfata uzet je uzorak radi utvrđivanja njegovog utjecaja te je zaključeno da je utjecaj dodanog bakra zanemariv. Nakon indukcije koncentracija ekstracelularnog proteina i njegova izmjerena aktivnost rasle su tijekom narednih 90 sati. Aktivnost je mjerena izravno u centrifugiranom supernatantu. Mjerenja s 2,6-DMP-om pokazala su nisku volumetrijsku aktivnost. S druge strane, mjerenja s hidrocoerulignonom pokazala su znatno veću volumetrijsku aktivnost korištenjem manjeg volumena supernatanta, što ovu metodu čini mnogo osjetljivijom metodom za mjerenje aktivnosti LPMO-a. Mjerenja su pokazala nelinearnost između korištenog volumena supernatanta i izmjerene enzimske aktivnosti, dok veći volumeni daju proporcionalno manje volumetrijske aktivnosti. Ovo je ispitano dodavanjem pročišćenog *NcLPMO9C* u medij za ugoj, što je rezultiralo 25% nižom aktivnošću LPMO-a izmjerenom metodom s hidrocoerulignonom i 63% nižom aktivnošću izmjerenom s 2,6-DMP-om. Rezultati ukazuju na utjecaj fermentacijskog medija na sam postupak mjerenja aktivnosti.



**Slika 4.** Ekspresija rekombinantnog proteina *NcLPMO9C* pomoću *P. pastoris* (prema Breslmayr i sur., 2019).

Na slici 4 prikazano je praćenje ekspresije rekombinantnog proteina *NcLPMO9C* u supernatantu fermentacijskog medija. Zeleni peterokuti pokazuju vlažnu biomasa, plavi kvadrati pokazuju ekstracelularnu koncentraciju proteina, crni dijamanti pokazuju aktivnost mjerenu sa 500 µM HC-a kao supstrata, a narančaste zvijezde pokazuju aktivnost s 1000 µM 2,6-DMP-a. Aktivnost 2,6-DMP je prikazana je na uvećanom umetku, koji ima iste jedinice kao X-os i desna Y-os. Sva mjerenja aktivnosti provedena su tijekom 300 s pri 30 °C dodatkom 100 µM vodikovog peroksida. Svi podaci izraženi su kao srednje vrijednosti tri neovisna mjerenja.

### 2.3.3. Istraživanje (“screening“) tvari koje inhibiraju LPMO

Matrica, npr. fermentacijski medij, može inhibirati reakciju, zbog čega je provedeno istraživanje tvari koje mogu otežati određivanje LPMO-a u supernatantu tijekom fermentacije. Za ovo istraživanje primijenjene su metode mjerenja aktivnosti s 2,6-DMP-om i HC-om u 100 mM natrij-acetatnom puferu pH 6,0. Različite komponente koje se obično koriste u mediju za

fermentaciju, kao što su kvašćev ekstrakt, YNB (“yeast nitrogen base“), kazein pepton i mesni pepton, testirane su u dvije relevantne koncentracije (1 i 10 g L<sup>-1</sup>, odnosno 9 g L<sup>-1</sup> za YNB). Rezidualna aktivnost je aktivnost enzima izmjerena nakon dodatka različitih komponenti medija u reakcijsku smjesu. Izražava se u postocima, a predstavlja enzimsku aktivnost uzoraka s dodatkom komponenata medija u odnosu na prethodno određenu specifičnu aktivnost LPMO-a (138 U g<sup>-1</sup> određena metodom s HC-om, odnosno 23 U g<sup>-1</sup> određena metodom s 2,6-DMP-om). Pri mjerenju rezidualne aktivnosti s HC-om korišten je 500 μM HC i 0.3 μM *NcLPMO9C*, a pri mjerenju 2,6-DMP metodom 2000 μM 2,6-DMP i 2 μM *NcLPMO9C*. Uz navedeno, u 100 mM natrij-acetatni pufer pH 6,0 dodan je 100 μM vodikov peroksid. Rezultati mjerenja izraženi su u tablici 2 kao srednje vrijednosti (± standardna devijacija) tri neovisna mjerenja.

Pod istim uvjetima, kod obje metode mjerenja aktivnosti zabilježena je smanjena peroksidogenazna aktivnost LPMO-a pri višim koncentracijama komponenti medija. Najslabija inhibicija uočena je za YNB (75% rezidualne aktivnosti pri 1 g L<sup>-1</sup>), a najjača inhibicija za kvašćev ekstrakt (30-50% rezidualne aktivnosti pri 1 g L<sup>-1</sup>). Dodatak 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta gotovo u potpunosti inhibira aktivnost LPMO-a u obje metode.

**Tablica 2.** Utjecaj komponenata medija na aktivnost enzima *NcLPMO9C* (prema Breslmayr i sur., 2019)

	Rezidualna aktivnost (%)			
	Hidrocoerulignon		2,6-DMP	
Koncentracija (g L <sup>-1</sup> )	1.0	10.0	1.0	10.0
YNB	78.8 ± 3.2	29.0 ± 3.9	85.3 ± 3.9	40.1 ± 3.7
Mesni pepton	52.6 ± 1.3	23.2 ± 1.5	68.5 ± 5.0	10.9 ± 2.4
Kazein pepton	51.8 ± 3.3	12.8 ± 1.0	62.6 ± 2.3	15.6 ± 1.9
Kvašćev ekstrakt	29.9 ± 1.5	13.8 ± 1.5	50.9 ± 1.8	4.4 ± 0.8

Kako bi se specificirale komponente medija koje inhibiraju peroksidogenaznu aktivnost LPMO-a, analizirane su komponente fermentacijskih medija: svih 20 aminokiselina, različiti kationi i anioni te karboksilne kiseline koje se pojavljuju u supernatantu tijekom fermentacije ili ih oslobađaju kvasci tijekom rasta. Aminokiseline s terminalnom karboksilnom skupinom na pobočnom lancu uzrokuju smanjenje aktivnosti za najmanje 50% (tablica 3). *NcLPMO9C* pokazuje zanemarivu aktivnost ako su u mediju prisutni histidin ili cistein. Aromatske

aminokiseline također znatno inhibiraju enzim čak i pri nižoj koncentraciji od ostalih aminokiselina (45 mM). Tirozin je, zbog njegove još manje topljivosti, mjereno pri koncentraciji od 2 mM koja pokazuje inhibiciju od oko 10%.

**Tablica 3.** Utjecaj aminokiselina na aktivnost enzima *NcLPMO9C* (prema Breslmayr i sur., 2019)

	Rezidualna aktivnost (%)	
	Hidrocoerulignon	2,6-DMP
Arg (R)	43.9 ± 0.7	34 ± 3.1
His (H)	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Lys (K)	53.5 ± 2.7	36.0 ± 3.7
Asp (D)	39.9 ± 3.3	50.8 ± 1.5
Glu (E)	57.4 ± 2.0	46.5 ± 4.8
Ser (S)	19.1 ± 0.9	34.6 ± 1.2
Thr (T)	13.0 ± 0.5	18.5 ± 1.6
Asn (N)	10.8 ± 0.4	10.6 ± 0.7
Gln (Q)	25.2 ± 0.9	35.9 ± 1.6
Cys (C)	3.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Gly (G)	49.1 ± 1.2	44.0 ± 3.4
Pro (P)	48.5 ± 1.6	37.1 ± 1.1
Ala (A)	39.9 ± 1.7	62.5 ± 0.3
Val (V)	23.3 ± 2.3	42.4 ± 2.2
Ile (I)	35.5 ± 0.9	47.9 ± 3.2
Leu (L)	38.6 ± 1.1	49.1 ± 0.8
Met (M)	12.0 ± 0.6	21.7 ± 1.7
Phe (F)	7.5 ± 0.4	14.9 ± 0.1
Tyr (Y)	81.5 ± 3.6	91.8 ± 8.3
Trp (W)	3.5 ± 0.4	16.2 ± 2.3

Soli imaju vrlo mali ili nikakav učinak na aktivnost LPMO-a (tablica 4.). Jedina je iznimka sulfat koji smanjuje aktivnost *NcLPMO9C* na 30-39% rezidualne aktivnosti što se može objasniti interakcijom između oksoaniona i bakra u aktivnom mjestu enzima. Snažan inhibicijski učinak uočen je za karboksilne kiseline, posebno oksalnu kiselinu, a razlog bi moglo biti bidentatno vezanje oksalne kiseline na bakar u aktivnom mjestu LPMO-a (tablica 5).

**Tablica 4.** Utjecaj soli na aktivnost enzima *NcLPMO9C* (prema Breslmayr i sur., 2019)

	Rezidualna aktivnost (%)	
	Hydrocoerulignon	2,6-DMP
NaF	65.9 ± 10.0	74.0 ± 2.1
NaCl	105.0 ± 2.6	92.2 ± 0.6
KCl	80.4 ± 0.8	91.6 ± 2.8
MgCl <sub>2</sub>	94.8 ± 5.7	103.5 ± 2.8
CaCl <sub>2</sub>	84.0 ± 1.4	107.2 ± 2.3
NaI	n.m.	86.7 ± 25.3
KBr	84.5 ± 5.5	84.5 ± 6.2
NaNO <sub>3</sub>	82.8 ± 1.2	97.2 ± 2.7
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30.2 ± 4.5	38.8 ± 3.4

n.m. - nije mjereno zbog jakog utjecaja na metodu mjerenja

**Tablica 5.** Utjecaj karboksilnih kiselina na aktivnost enzima *NcLPMO9C* (prema Breslmayr i sur., 2019)

	Specifična aktivnost (U g <sup>-1</sup> )					
	Hydrocoerulignon			2,6-DMP		
Koncentracija (mM)	30	100	300	30	100	300
Metanska kiselina	243 ± 15	186 ± 4	175 ± 15	36 ± 1	31.3 ± 0.3	17 ± 1
Etanska kiselina	226 ± 17	138 ± 12	69 ± 10	33 ± 2	23 ± 1	13 ± 1
Etan-dikarboksilna kiselina	4 ± 1	2 ± 1	0.4 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
1.3-Propandioična kiselina	24 ± 2	9 ± 1	3 ± 1	3.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Butandionska kiselina	84 ± 3	n.m.	n.m.	15.3 ± 0.4	11.8 ± 0.1	10 ± 1
Hidroksibutanedioična kiselina kiselina	66 ± 7	28 ± 5	12 ± 2	12.6 ± 0.1	5.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1
2,3-dihidroksi butandionska kiselina	106 ± 5	46 ± 3	19 ± 0.4	18 ± 1	9 ± 1	3.5 ± 0.3
cis-butenedioična kiselina	55 ± 4	6 ± 3	0.2 ± 0.1	9.8 ± 0.1	4.6 ± 0.1	2.9 ± 0.2
3-karboksi-3-hidroksipentanedionska kiselina	11 ± 1	4 ± 1	0.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1

n.m. - nije mjereno zbog jakog utjecaja na metodu mjerenja

#### 2.3.4. Opća pravila primjene metode mjerenja aktivnosti s hidrocoerulignonom

Dobiveni podatci o inhibirajućim supstancijama korišteni su za optimizaciju mjerenja aktivnosti LPMO-a metodom s hidrocoerulignonom. Cilj je bilo poboljšanje specifičnosti, točnosti i osjetljivosti ove metode u različitim matricama. Čimbenici koje je bitno prilagoditi kako bi se povećala osjetljivost metode su sljedeći: vrsta pufera (puferi s bi- i tridentatnim anionima te karboksilnim kiselinama mogu smanjiti aktivnost LPMO-a), ionska jakost (povećanjem jakosti pufera aktivnost LPMO-a generalno opada), pH-vrijednost (povećanjem pH eksponencijalno se povećava peroksidazna aktivnost LPMO-a) i koncentracije supstrata i kosupstrata (povećanjem koncentracija HC-a do 500  $\mu\text{M}$  i vodikovog peroksida do 100  $\mu\text{M}$  povećava se aktivnost LPMO-a). Bitno je napomenuti da se LPMO dobiven iz drugih izvora može razlikovati od *NcLPMO9C*, stoga navedene čimbenike treba razmatrati za svaki enzim posebno.

### 3. ZAKLJUČAK

1. Enzimska predobrada lignocelulozne biomase prilikom izolacije nanoceluloze ima brojne prednosti u odnosu na kemijske metode.
2. Litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) djeluju sinergistički sa drugim enzimima koji djeluju na lignocelulozu i uzrokuju slabljenje celuloznih vlakana uvođenjem karboksilnih skupina kao rezultat njihove C1-oksidacijske aktivnosti, čime se povećava prinos nanoceluloze. LPMO se koriste i za dodatnu obradu i funkcionalizaciju nanoceluloze.
3. Na aktivnost LPMO-a utječe struktura samog enzima i morfološka obilježja celuloze. Usmjerenom evolucijom i enzimskim inženjerstvom moguće je dobiti enzime poboljšanih svojstava koji imaju industrijske i ekonomske prednosti.
4. Metoda za mjerenje aktivnosti LPMO-a pomoću hidrocoerulignona (HC) je brža i osjetljivija od metode s 2,6-dimetoksifenolom, a potrebno je provesti daljnja istraživanja o inhibitorima LPMO-a radi njezine optimizacije.

#### 4. POPIS LITERATURE

- Beeson, W.T., Phillips, C.M., Cate, J.H.D., Marletta, M.A. (2012). Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2), 890-892.
- Bian, H., Dong, M., Chen, L., Zhou, X., Ni, S., Fang, G. i sur. (2019). Comparison of mixed enzymatic pretreatment and post-treatment for enhancing the cellulose nanofibrillation efficiency. *Bioresource Technology*, 293, 122171.
- Bissaro, B., Røhr, Å.K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M. Forsberg, Z. i sur. (2017). Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nature Chemical Biology*, 13 (10), 1123–1128.
- Bissaro, B., Várnai, A., Røhr, Å.K., Eijsink, V.G.H. (2018). Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82, 4.
- Borisova, A.S., Isaksen, T., Dimarogona, M., Kognole, A.A., Mathiesen., G., Varnai, A. (2015). Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (38), 22955-22969.
- Börjesson, M. i Westman, G. (2015). Crystalline Nanocellulose—Preparation, Modification, and Properties. Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends, *IntechOpen*, London, 162-163.
- Breslmayr, E., Daly, S., Požgajčić, A., Chang, H., Rezić, T., Oostenbrink, C., Ludwig, R. (2019). Improved spectrophotometric assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 283.
- Calderaro, F., Keser, M., Akeroyd, M., Bevers, L.E., Eijsink, V.G.H, Varnai, A. i sur. (2020). Characterization of an AA9 LPMO from *Thielavia australiensis*, TausLPMO9B, under industrially relevant lignocellulose saccharification conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 13 (1), 195.
- Cathala, B., Villares, A., Moreau, C., Berrin, J.G. 2015. Procedure for the fabrication of nanocellulose from a cellulosic substrate. Patent FR 2015/1555049.
- Courtade, G., Forsberg, Z., Heggset, E.B., Eijsink, V.G.H., Aachmann, F.L. (2018). The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monooxygenase promote localized cellulose oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (34), 13006-13015.
- Couturier, M., Ladevèze, S., Sulzenbacher, G. i sur. (2018). Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature Chemical Biology*, 14 (3), 306–310.
- Danneels, B., Tanghe, M., Joosten, H.-J., Gundinger, T., Spadiut, O., Stals, I., i sur. (2017). A quantitative indicator diagram for lytic polysaccharide monooxygenases reveals the role of aromatic surface residues in H<sub>1</sub>LPMO9A regioselectivity. *PLOS ONE* 12(5), e0178446.



- Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D. i sur (2014). Cellulose Surface Degradation by a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and its Effect on Cellulase Hydrolytic Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (52), 35929-35938.
- Frandsen, K.E.H., Simmons, T.J., Dupree, P., Poulsen, J.-C., Hemsworth, G.R., Ciano, L. i sur. (2016). The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 12 (4), 298–303.
- Frommhagen, M., Koetsier, M.J., Westphal, A.H., Visser, J., Hinz, S.W.A., Vincken, J.-P. i sur. (2016). Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 186.
- Frommhagen, M., Westphal, A.H., van Berkel, W.J.H., Kabel, M.A. (2018). Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monooxygenases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1080.
- Garajova, S., Mathieu, Y., Beccia, M.R., Bennati-Granier, C., Biaso, F., Fanuel, M. i sur. (2016). Single domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose. *Scientific Reports*, 6, 28276.
- Guo, X., An, Y., Chai, C., Sang, J., Jiang, L., Lu, F. i sur. (2020). Construction of the R17L mutant of MtC1LPMO for improved lignocellulosic biomass conversion by rational point mutation and investigation of the mechanism by molecular dynamics simulations. *Bioresource Technology*, 317, 124024.
- Haddad, M., Fredslund, F., Bissaro, B., Raji, O., Vuong, T.V., Meier, S. i sur. (2021). Discovery of fungal oligosaccharide-oxidising flavo-enzymes with previously unknown substrates, redox-activity profiles and interplay with LPMOs. *Nature Communications* 12 (1), 2132.
- Hangasky, J.A., Iavarone, A.T., Marletta, M.A. (2018). Reactivity of O<sub>2</sub> versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with polysaccharide monooxygenases. *PNAS*, 115 (19), 4915-4920.
- Hu, J., Tian, D., Renneckar, S., Saddler, J.N. (2018). Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Scientific Reports*, 8 (1), 3195.
- Karnaouri, A., Antonopoulou, I., Zerva, A., Dimarogona, M., Topakas, E., Rova, U. i sur. (2019). Thermophilic enzyme systems for efficient conversion of lignocellulose to valuable products: Structural insights and future perspectives for esterases and oxidative catalysts. *Bioresource Technology*, 279, 362-372.
- Karnaouri, A., Choroziyan, K., Zouraris, D., Karantonis, A., Topakas, E., Rova, U., i sur. (2022). Lytic polysaccharide monooxygenases as powerful tools in enzymatically assisted preparation of nano-scaled cellulose from lignocellulose: A review. *Bioresource Technology*, 345, 126491.
- Karnaouri, A., Jalvo, B., Moritz, P., Matsakas, L., Rova, U., Höfft O. i sur. (2020). Lytic polysaccharide monooxygenase-assisted preparation of oxidized-cellulose nanocrystals with a high carboxyl content from the tunic of marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 8 (50), 18400-18412.

- Karnaouri, A.C., Topakas, E. & Christakopoulos, P. (2014). Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 231–242.
- Kim, S., Stahlberg, J., Sandgren, M., Paton, R.S., Beckham, G.T. (2014). Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxy, oxygen-rebound mechanism. *PNAS*, 111 (1), 149-154.
- Koskela, S., Wang, S., Fowler, P., Tan, F., Zhou, Q. (2021). Structure and Self-Assembly of Lytic Polysaccharide Monooxygenase-Oxidized Cellulose Nanocrystals. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9 (34), 11331-11341.
- Koskela, S., Wang, S., Xu, D., Yang, X., Li, K., Berglund, L. i sur. (2019). Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres. *Green Chemistry*, 21, 5924-5933.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A.K.G., Breslmayr, E., Preims, M., Haltrich, D. i sur. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 352, 1098-1101.
- Ladevèze, S., Haon, M., Villares, A., Cathala, B., Grisel, S., Herpoël-Gimbert, I. i sur. (2017). The yeast *Geotrichum candidum* encodes functional lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 215.
- Laurent, C.V.F.P., Sun, P., Scheiblbrandner, S., Csarman, F., Cannazza, P., Frommhagen, M. i sur. (2019). Influence of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Active Site Segments on Activity and Affinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (24), 6219.
- Lo Leggio, L., Weihe, C.D., Poulsen, J.N., Sweeney, M., Rasmussen, F., Lin, J. i sur. (2018). Structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* and an engineered thermostable variant. *Carbohydrate Research*, 469, 55-59.
- Lombard, V., Ramulu, H.G., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acid Research*, 42, 490-495.
- Loose, J.S.M., Forsberg, Z., Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Ludwig, R., Eijsink, V.G.H. i sur. (2016). Activation of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases with cellobiose dehydrogenase. *Protein Science*, 25, 2175-2186.
- Mazurkewich, S., Seveso, A., Hüttner, S., Brändén, G., Larsbrink, J. (2021). Structure of a C1/C4-oxidizing AA9 lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. *Acta Crystallographica Section D*, 77 (Pt 8), 1019-1026.
- Meier, K.K., Jones, S.M., Kaper, T., Hansson, H., Koetsier, M.J., Karkehabadi, S. i sur. (2018). Oxygen Activation by Cu LPMOs in Recalcitrant Carbohydrate Polysaccharide Conversion to Monomer Sugars. *Chemical Reviews*, 118 (5), 2593-2635.
- Moreau, C., Tapin-Lingua, S., Grisel, S., Gimbert, I., Le Gall, S., Meyer, V. i sur. (2019). Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 156.

- Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B. i sur. (2018). The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 209.
- Muraleedharan, M.N., Karnaouri, A., Piatkoca, M., Ruiz-Caldas, M.X., Matsakar, L., Liu, B. i sur. (2021). Isolation and modification of nano-scale cellulose from organosolv-treated birch through the synergistic activity of LPMO and endoglucanases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 101-109.
- Muraleedharan, M.N., Zouraris, D., Karantonis, A., Topakas, E., Sandgren, M., Rova, U. i sur. (2018). Effect of lignin fractions isolated from different biomass sources on cellulose oxidation by fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 296-311.
- Naderi, A., Lindström, T., & Sundström, J. (2015). Repeated homogenization, a route for decreasing the energy consumption in the manufacturing process of carboxymethylated nanofibrillated cellulose. *Cellulose*, 22(2), 1147–1157.
- Petrović, D.M., Bissaro, B., Chylenski, P., Skaugen, M., Sørli, M., Jensen, M.S. i sur. (2018). Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation. *Protein Science*, 27 (9), 1636-1650.
- Phillips, C.M., Beeson, W.T., Cate, J.H., Marletta, M.A. (2012). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 6 (12), 1399-1406.
- Quinlan, R.J., Sweeney, M.D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.C.N., Johansen, K.S. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *PNAS*, 108, 15079-15084.
- Sabbadin, F., Urresti, S., Henrissat, B., Avrova, A.O., Welsh, L.R.J., Lindley, P.J., i sur. (2021). Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. *Science*, 373 (6556), 774-779.
- Sharma, C., Bhardwaj, N.K. (2019). Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. *Materials Science and Engineering:C*, 104, 109963.
- Tanghe, M., Danneels, B., Last, M., Beerens, K., Stals, I., Desmet, T. (2017). Disulfide bridges as essential elements for the thermostability of lytic polysaccharide monooxygenase LPMO10C from *Streptomyces coelicolor*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 30 (5), 401–408.
- Tokin, R., Ipsen, J.Ø., Westh, P. i sur. (2020). The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. *Biotechnology Letters*, 42, 1975–1984.
- Trache, D., Hussin, M. H., Haafiz, M. K. M., Thakur, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. *Nanoscale*, 9(5), 1763–1786.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S.J., Liu, Z.L., Zhai, H., Sørli, M. i sur. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330, 219-222.

- Valenzuela, S.V., Valls, C., Schink, V., Sánchez, D., Roncero, M.B., Diaz, P. i sur. (2019). Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 207, 59-67.
- Valls, C., Pastor, F.I.J., Roncero, M.B. i sur. (2019). Assessing the enzymatic effects of cellulases and LPMO in improving mechanical fibrillation of cotton linters. *Biotechnology for Biofuels* 12, 161.
- Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X. i sur. (2017) Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Scientific Reports*, 7, 40262.
- Vu, V.V., Beeson, W.T., Phillips, C.M., Cate, J.H., Marletta, M.A. (2014). Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2), 562-565.
- Xu, J.T., Chen, X.Q. (2019). Preparation and characterization of spherical cellulose nanocrystals with high purity by the composite enzymolysis of pulp fibers. *Bioresource Technology*, 291, 121842.
- Zhang, R. (2020). Functional characterization of cellulose-degrading AA9 lytic polysaccharide monooxygenases and their potential exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 3229–3243.
- Zhang, R., Liu, Y., Zhang, Y. i sur. (2019). Identification of a thermostable fungal lytic polysaccharide monooxygenase and evaluation of its effect on lignocellulosic degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 5739–5750.

## 5. PRILOZI

### 5.1. POPIS KRATICA

2,6-DMP	2,6-dimetoksifosfat
AA	skupina pomoćnih redoks enzima u razgradnji ugljikohidrata (“Auxiliary Activities“)
BNC	bakterijska nanoceluloza
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes Database
CBM	modul za vezanje ugljikohidrata (“carbohydrate binding module“)
CNC	celulozni nanokristali
CNF	celulozna nanovlakna
EG	endo- $\beta$ -1,4-glukanaze
EX	endo- $\beta$ -1,4-ksilanaze
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sumporna kiselina
HC	hidrocoerulignon
HCl	klorovodična kiselina
LPMO	litičke polisaharidne monooksigenaze
<i>NcLPMO9C</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz <i>Neurospora crasse</i>
<i>NcLPMO9E</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz <i>Neurospora crasse</i>
<i>NcLPMO9F</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz <i>Neurospora crasse</i>
<i>PaLPMO9E</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz gljive <i>Podospora anserina</i>
<i>PaLPMO9H</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz gljive <i>Podospora anserina</i>
<i>SamLPMO10</i>	litička polisaharidna monooksigenaza iz <i>Streptomyces ambofaciens</i>
SHE	standardna vodikova elektroda (“standard hydrogen electrode“)
YNB	“yeast nitrogen base“

## Izjava o izvornosti

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

*Anđelini*

---

Vlastoručni potpis