



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2018 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Hovedveileder Morten Sørli

# Ligninvalorisering ved bruk av enzymatiske cocktails

Lignin valorization by the use of enzymatic cocktails

**Susann Trondsen**

Master Bioteknologi

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)



## Forord:

Denne masteroppgaven ble utført ved Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM) ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) i perioden fra august 2017 til mai 2018. Oppgaven har vært en del av et større forskningsprosjekt ved Bioorganisk forskningsgruppe under ledelse av Morten Sørлие.

Jeg ønsker først og fremst å takke min hovedveileder Professor Morten Sørлие for god veiledning, oppfølging og oppmuntring i løpet av arbeidet med masteroppgaven. Takk for at du har trodd på meg hele veien, og alltid hatt nye løsninger på lur når ting ikke har fungert helt som det skulle. Videre vil jeg også gi en stor takk til min medveileder Dr. Anne Grethe Hamre, som med sine råd og forslag har vært til stor hjelp for meg i denne perioden. Jeg setter virkelig pris på all tiden du har satt av til å hjelpe meg med å fullføre dette prosjektet, både på laben og via korrespondanse på mail.

Jeg vil også takke Dr. Bastien Bisarro, Dr. Åsmund Røhr Kjendseth og stipendiat Ida Synnøve Aarum for at dere har vært tilgjengelige til å besvare spørsmål om hva enn jeg måtte lure på.

I tillegg vil jeg takke mine medstudenter Rim Al-Sadawi og Helene Bjølgerud, samt resten av Bioorganisk forskningsgruppe, for å ha gitt meg et godt studiemiljø og sosialt miljø gjennom hele forløpet. Det har vært fantastisk fint å få være del av et så inkluderende fellesskap, og det har gitt meg mange gode minner og verdifulle erfaringer.

Til slutt vil jeg takke venner og familie for all støtte og oppmuntring underveis i dette femårige studieløpet. En ekstra stor takk går til mine foreldre Rikke Vangen Trondsen og Henning Trondsen. Uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag!

Susann Trondsen

Ås, Mai 2018

## Sammendrag:

Planters biomasse består i hovedsak av cellulose, hemicellulose og lignin, der lignin utgjør 15-40 % av plantens tørrvekt. Lignin er den nest mest forekommende polymeren på landjorda. Den er svært heterogen, avledet fra oksidativ kobling av de aromatiske monolignolenhetene p-koumaryl-, koniferyl- og sinapylalkohol. På grunn av det sterkt forgrenede nettverket er lignin svært motstandsdyktig mot degradering. I tillegg lar den planter generere rigide strukturer og gir beskyttelse mot hydrolyse av cellulose og hemicellulose. Omdanningen av lignocellulosisk biomasse danner grunnlaget for produksjonen av etanol, karbohydrater, og aromatiske produkter. Lignin blir underutnyttet i disse prosessene med omtrent 60 % mer lignin generert enn det som forbrennes for å dekke produksjonens interne energibehov. Det er derfor nødvendig med nye prosesser som kan generere verdifulle produkter fra ligninet. Denne oppgaven er en del av et større forskningsprosjekt der målet er å utvikle en enzymatisk cocktail av bakterielle enzymer som effektivt kan degradere lignocellulose.

Den termofile jordbakterien *Thermobifida fusca* er en effektiv nedbryter av lignocellulosisk biomasse, og i denne oppgaven ble det forsøkt å uttrykke og rense en dye decolorizing peroksidase (*TfDyP*), en katalase (*TfKat*) og en LPMO (*TfLPMO-E7*) fra denne bakterien, med hensikt om å bruke disse til degradering av lignocellulosisk biomasse. Dette viste seg å være en utfordrende prosess, og det ble ikke mulig å benytte disse enzymene i degraderingsforsøk i løpet av arbeidet med denne oppgaven.

Sakkarifisering av lignocellulosisk biomasse i form av dampeksplodert bjørk ble i stedet gjennomført med kommersielle cellulolytiske og ligninolytiske enzymer. Tørrstoffinnholdet i den dampeksploderte bjørka ble bestemt til å være ca. 40 %. De første reaksjonene ble utført med cellulasecocktailen Celluclast<sup>®</sup> og en  $\beta$ -glukosidase. Det ble deretter testet hvorvidt vasking av substratet for å fjerne inhibitoriske forbindelser ville ha en positiv effekt på utbyttet av reaksjonen, og konkludert med at dette ikke hadde signifikant innvirkning på mengden glukose produsert. De kommersielle ligninolytiske enzymene MnP, LiP og Laccase, samt den kitinaktive LPMO-en CBP21 ble etter hvert tilsatt den enzymatiske cocktailen. Analyser av cellulose- og ligninprodukter på HPLC og GC/MS ble gjennomført for å undersøke effekten av dette. Analysene på HPLC viste at tilstedeværelsen av de ligninaktive enzymene førte til lavere utbytte av glukose. Det ble funnet spor av to ligninprodukter under analysen på GC/MS, men utilstrekkelig forbehandling av substratet gjorde at disse resultatene ikke var reproducerbare. Videre arbeid er nødvendig for å kunne identifisere og kvantifisere mulige ligninprodukter fra

degraderingen. Dette vil blant annet innebære vasking av substratet med organisk løsemiddel, etterfulgt av oppmaling for å øke homogeniteten til substratet. For å kvantifisere ligninprodukter vil det være nødvendig med tilsetning av internstandard før analyse på GC/MS.

## Summary:

Plant biomass is mainly composed of lignin, cellulose, and hemicellulose, where lignin makes up 15-40 % of the plant's dry weight. Lignin is nature's second most abundant polymer. It is a highly heterogeneous polymer derived from oxidative coupling of the aromatic monolignol units *p*-coumaryl, coniferyl, and synapyl alcohol. Due to the highly branched network, lignin is rather inert towards degradation. In addition, it enables plants to generate rigid structures and provides protection against hydrolysis of cellulose and hemicellulose. The conversion of lignocellulosic biomass forms the basis to produce ethanol, carbohydrates, and aromatic products. However, lignin is underutilized in these processes with about 60 % more lignin generated than the amount combusted to cover the internal energy needs of the production process. Therefore, new processes are needed to generate value-added products from lignin. This thesis is part of a larger research project where the goal is to develop an enzymatic cocktail of bacterial enzymes that will efficiently degrade lignocellulose.

The thermophilic soil bacterium *Thermobifida fusca* is an efficient degrader of lignocellulosic biomass, and in this thesis, attempts were made to express and purify a dye decolorizing peroxidase (*TfDyP*), a catalase (*TfKat*), and an LPMO (*TfLPMO-E7*) from this bacterium, with the intention of using these for the degradation of lignocellulosic biomass. This proved to be a challenging process, and it was not possible to use these enzymes in degradation assays during the work on this thesis.

Saccharification of lignocellulosic biomass in the form of steam exploded birch was instead conducted with commercial cellulolytic and ligninolytic enzymes. The dry matter content of the steam exploded birch was determined to be approximately 40 %. The first reactions were conducted with the cellulase cocktail Celluclast<sup>®</sup> and a  $\beta$ -glucosidase. It was then tested whether washing the substrate to remove inhibitory compounds would have a positive effect on the reaction yield and concluded that it did not have a significant impact on the amount of glucose produced. The commercial ligninolytic enzymes MnP, LiP and Laccase, and the chitin active LPMO CBP21 was subsequently added to the enzymatic cocktail. Analyses of cellulose- and lignin products were conducted on HPLC and GC/MS to study the effects of this. The analyses on HPLC showed that the presence of the lignin active enzymes resulted in a lower yield of glucose. Traces of two lignin products were found under the analysis on GC/MS, but insufficient pre-treatment of the substrate made these results non-reproducible.

Further work is necessary to be able to identify and quantify possible lignin products from the degradation. This will among other things include washing of the substrate with organic solvent, followed by milling to increase the homogeneity of the substrate. To quantify lignin products, the addition of an internal standard before analysis on GC/MS will be necessary.

# Innholdsfortegnelse

Forord: .....	I
Sammendrag: .....	II
Summary: .....	IV
Innholdsfortegnelse .....	VI
Forkortelser .....	1
1. Innledning.....	4
1.1 Lignocellulosisk biomasse.....	5
1.2 Cellulose .....	8
1.3 Lignin – struktur og funksjon.....	9
1.4 Forbehandling av lignocellulosisk biomasse .....	11
1.5 Utfordringer ved foredling av lignin .....	13
1.6 Produkter av lignin, reelle og potensielle.....	14
1.7 Hvilke organismer bryter ned lignin? .....	15
1.8 Ligninaktive enzymer.....	16
1.8.1 Heme-peroksidaser .....	16
1.8.2 Ligninperoksidaser (LiP).....	18
1.8.3 Manganavhengige peroksidaser (MnP).....	20
1.8.4 Dye decolorizing peroksidaser (DyP) .....	21
1.8.5 Katalaser med peroksidaseaktivitet .....	23
1.8.6 Laccaser (Lac).....	25
1.8.7 Lytiske polysakkarid monooxygenaser (LPMOer).....	26
1.9 Mål med oppgaven.....	27
2. Materialer.....	29
2.1 Laboratoriestyr.....	29
2.2 Programvarer til analyse .....	33
2.3 Kjemikalier .....	33
2.4 Kit.....	35
2.5 Enzymer/proteiner, substrater og bakteriestammer .....	36
2.5.1 Enzymer/proteiner .....	36
2.5.2 Substrater .....	37
2.5.3 Bakteriestammer .....	37
2.6 Medier, løsninger og buffere.....	37
2.6.1 Ferdiglagde medier.....	37
2.6.2 Selvlagde medier .....	38
2.6.3 Løsninger .....	38



2.6.4	Selvlagde løsninger og buffere .....	39
3.	Metode .....	42
3.1	Kloning .....	42
3.1.1	Transformering av konstrukter .....	43
3.1.2	Dyrking av transformanter .....	45
3.1.3	Tillaging av frysestocker .....	45
3.2	Uttrykking av enzymene fra <i>Thermobifida fusca</i> .....	46
3.2.1	Induksjonstest for enzymer fra Genscript .....	46
3.2.2	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) .....	47
3.2.3	Spesifikk induksjonstest av enzymer fra Genscript .....	49
3.2.4	Overekspresjon av <i>TfDyP</i> og <i>TfLPMO-E7</i> .....	50
3.2.5	Overekspresjon av <i>TfLPMO-E7</i> fra frysestock – isolering av plasmid til sekvensering .	51
3.2.6	Overekspresjon av <i>TfLPMO-E7</i> fra frysestock - Bestemmelse av DNA-konsentrasjon ved bruk av Qubit® fluorometer .....	53
3.2.7	Overekspresjon av <i>TfLPMO-E7</i> fra frysestock – Sekvensering av isolert plasmid .....	54
3.2.8	Overekspresjon av <i>TfLPMO-E7</i> fra frysestock – Transformering inn i BL21 celler .....	54
3.2.9	Overekspresjon av <i>TfDyP</i> (med His-tag) .....	54
3.2.10	Overekspresjon av <i>TfKat</i> (med His-tag) .....	56
3.3	Uttrykking av CBP21 fra <i>Serratia marcescens</i> .....	56
3.4	Klargjøring av enzymer til rensing .....	57
3.4.1	Periplasmatisk ekstrakt .....	57
3.4.2	Lysering av <i>TfDyP</i> og <i>TfLPMO-E7</i> .....	58
3.4.3	Lysering av celler fra <i>TfDyP</i> (med His-tag) .....	59
3.4.4	Lysering av celler fra <i>TfKat</i> (med His-tag) .....	60
3.5	Rensing av enzymer .....	61
3.5.1	Rensing av <i>TfDyP</i> – lonebyttekromatografi (IEC) på sterk anionbytter .....	61
3.5.2	Rensing av <i>TfDyP</i> – Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) .....	62
3.5.3	Rensing av <i>TfDyP</i> – Oppkonsentrering .....	64
3.5.4	Rensing av <i>TfDyP</i> – Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) .....	64
3.5.5	Rensing av <i>TfDyP</i> – Varmedenaturering .....	66
3.5.6	Rensing av <i>TfDyP</i> – Ammoniumsulfatutfelling .....	66
3.5.7	Rensing av <i>TfDyP</i> – lonebyttekromatografi på sterk kationbytter .....	67
3.5.8	Rensing av <i>TfDyP</i> – Filtrering med 50 kDa porefilter .....	68
3.5.9	Rensing av <i>TfLPMO-E7</i> og CBP21– Affinitetskromatografi .....	69
3.6	Oppkonsentrering og bytte av buffer .....	71
3.7	Måling av enzymkonsentrasjon .....	72

3.8	Kobber(II)metting av CBP21 .....	73
3.9	Degradering av dampeksplodert bjørk.....	74
3.9.1	Bestemmelse av konsentrasjon ved bruk av Bradfordmetoden .....	75
3.9.2	Bestemmelse av tørrstoffinnhold i dampeksplodert bjørk .....	76
3.9.3	Degradering av dampeksplodert bjørk med celluloseaktive enzymer.....	77
3.9.4	Degradering av vasket dampeksplodert bjørk .....	78
3.9.5	Degradering av Avicel <sup>®</sup> og PASC.....	78
3.9.6	Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast <sup>®</sup> , $\beta$ -glukosidase og ulike konsentrasjoner av LiP .....	79
3.9.7	Degradering av dampeksplodert bjørk med MnP, LiP og CBP21 .....	80
3.9.8	Degradering av dampeksplodert bjørk med kommersielle enzymer, Celluclast <sup>®</sup> og $\beta$ -glukosidase .....	82
3.10	Analyse og databehandling .....	83
3.10.1	Analyse ved bruk av høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC).....	83
3.10.2	Databehandling av HPLC-resultater .....	84
3.10.3	Forbehandling av prøver til GC/MS.....	85
3.10.4	Analyse ved bruk av gasskromatografi tilkoblet massespektrometri (GC/MS).....	86
4.	Resultater og diskusjon .....	89
4.1	Overuttrykk av proteiner – induksjonstester .....	89
4.1.1	<i>TfDyP</i> .....	89
4.1.2	<i>TfKat</i> .....	90
4.1.3	<i>TfLPMO-E7</i> .....	91
4.1.4	<i>TfDyP</i> og <i>TfKat</i> (med His-tag) .....	93
4.2	Rensing av Proteiner .....	96
4.2.1	<i>TfDyP</i> .....	96
4.2.2	CBP21.....	104
4.2.3	<i>TfLPMO-E7</i> .....	106
4.3	Degradering av dampeksplodert bjørk.....	108
4.3.1	Bestemmelse av tørrstoffinnholdet i dampeksplodert bjørk.....	108
4.3.2	Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast <sup>®</sup> og $\beta$ -glukosidase .....	109
4.3.3	Degradering av vasket og uvasket dampeksplodert bjørk .....	109
4.3.4	Degradering av av Avicel <sup>®</sup> , PASC og dampeksplodert bjørk.....	111
4.3.5	Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast <sup>®</sup> , $\beta$ -glukosidase og ulike konsentrasjoner av LiP .....	112
4.3.6	Analyse av degraderingsprodukter med HPLC.....	114
4.3.7	Analyse av degraderingsprodukter med GC/MS.....	117
5.	Veien videre.....	121

6. Referanser .....	122
7. Vedlegg.....	131

## Forkortelser

A<sub>280</sub> – Absorbans ved bølgelengde 280 nm

AA – Auxilliary activities

BSA – Bovine Serum Albumin

C-1 – Karbon 1

C-4 – Karbon 4

CAZy – Carbohydrate active enzymes

CBP21 – Chitin binding protein 21

Da – Dalton

DH – dehydrogenase

dH<sub>2</sub>O – Sterilt vann av milli-q kvalitet

DNA – Deoksyribonukleinsyre

DTT - Dithiothreitol

DyP – Dye-decolorizing peroxidase

EDTA – Etylendiamintetraeddiksyre

EtOH – Etanol

FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

G – Koniferylalkohol

GC – Gasskromatografi

GC/MS – Gasskromatografi tilkoblet massespektrometri

H – p-koumarylalkohol

HIC – Hydrofob interaksjonskromatografi

His – Histidin

HMF – Hydroksymetylfurfural

HPLC – Høypresisjons væskekromatografi

IEC – Ionebytterkromatografi

IPTG – Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid

Kat – Katalase

$k_{cat}$  – Katalytisk hastighetskonstant

Lac – Laccase

LB – Lysogeny broth (Luria Bertani)

LiP – Lignin peroksidase

LOD – Loss on drying

LPMO – Lytisk polysakkarid monooksygenase

MES – 2-(N-morfolin) etansvovelsyre

MnP – Manganavhengig peroksidase

MOPS – 3-(N-morfolin) propansvovelsyre

MS – Massespektrometri

OD – Optisk tetthet

PASC – Phosphoric acid swollen cellulose

PBS – Phosphate-buffered saline

RF – Radiofrekvens

RNA – Ribonukleinsyre

ROS – Reaktive oksygen species

RI – Brytningsindeks

rpm – Antall omdreininger per minutt

RT – Romtemperatur

S – Sinapylalkohol

SDS – Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE – Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese

SDVB – Sulfonert styren divinylbenzen

SEC – Størrelseseksklusjonskromatografi/Gelfiltrering

SOC – Super optimal broth with catalyte repression

TB – Terrific broth

*Tf* – *Thermobifida fusca*

Trp – Tryptofan

VA – Veratryl alcohol

Val – Valin

VP – Allsidige peroksidaser

UV – Ultrafiolett lys

Å - Ångstrøm

## 1. Innledning

Petroleumsindustrien, og spesielt bruk av fossile brensler, har gitt det moderne samfunnet mange fordeler i form av blant annet økonomisk vekst, redusert energifattigdom, og mobil arbeidskraft. Bruken av fossilt brensel er svært utbredt, og en rekke produkter som allmennheten benytter seg av i hverdagen og industrien er petroleumsbaserte. I 2016 ble over 80 % av det fossile karbonet i USA brukt i transportsektoren (U.S. Energy Information Administration 2018). Den gjenværende delen benyttes blant annet til jordbruk, industri, medisin og kosmetikk. Men den store anvendelsen av petroleumsbaserte produkter er problematisk, særlig på grunn av klimatiske hensyn. Det ble slått fast i Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) sin femte hovedrapport i 2013 at «CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen har økt med 40 prosent siden før-industriell tid, først og fremst på grunn av fossile brensler...» (Stocker et al. 2013 s. 9) og at «Fortsatte utslipp av klimagasser vil føre til ytterligere oppvarming og endringer i alle deler av klimasystemet. For å begrense klimaendringene kreves det betydelige og vedvarende reduksjoner av klimagassutslippene.» (Stocker et al. 2013 s.17). Derfor er det nødvendig å fase ut bruken av fossilt brensel både som energikilde og som råstoff i industriell produksjon. Biomasse fra planter i form av ulike organiske polymerer har presentert seg som en attraktiv alternativ kilde til karbonbaserte produkter (de Gonzalo et al. 2016).

Mens utvinning og anvendelse av karbohydrater som cellulose til produksjon av papir, biodrivstoff og andre produkter er en allerede utbredt praksis på flere bioraffinerier, blir den aromatiske polymeren lignin, som er den nest mest forekommende biopolymeren på jorda, underutnyttet. I celluloseutvinnende bioraffinerier blir det generert om lag 60 % mer lignin enn det som er nødvendig for å dekke det interne energiforbruket ved forbrenning (Ragauskas et al. 2014). En viktig problemstilling for fremtiden er derfor hvordan denne ressursen kan utnyttes til å skape verdifulle kommersielle og industrielle produkter. Siden lignin er polymeren som gir stabilitet og rigid struktur til plantene, er det svært forgrenet og motstandsdyktig mot degradering. Sammensetningen og strukturen til lignin varierer også fra organisme til organisme, og denne heterogeniteten bidrar til at det er vanskelig å utvinne produkter fra råstoffet. Ligninmodifisering i planter har blitt undersøkt med mål om å kunne modifisere og/eller inkorporere atypiske komponenter som reduserer motstandsdyktigheten til celleveggen og forenkler utvinning og omdannelse av lignin (Ragauskas et al. 2014). Ved å degradere lignin vil også tilgjengeligheten til cellulose i biomassen øke. Et mål er å kunne skape en enzymatisk cocktail som gir mono- og oligomerer fra begge forbindelsene som så kan utnyttes i industrien.

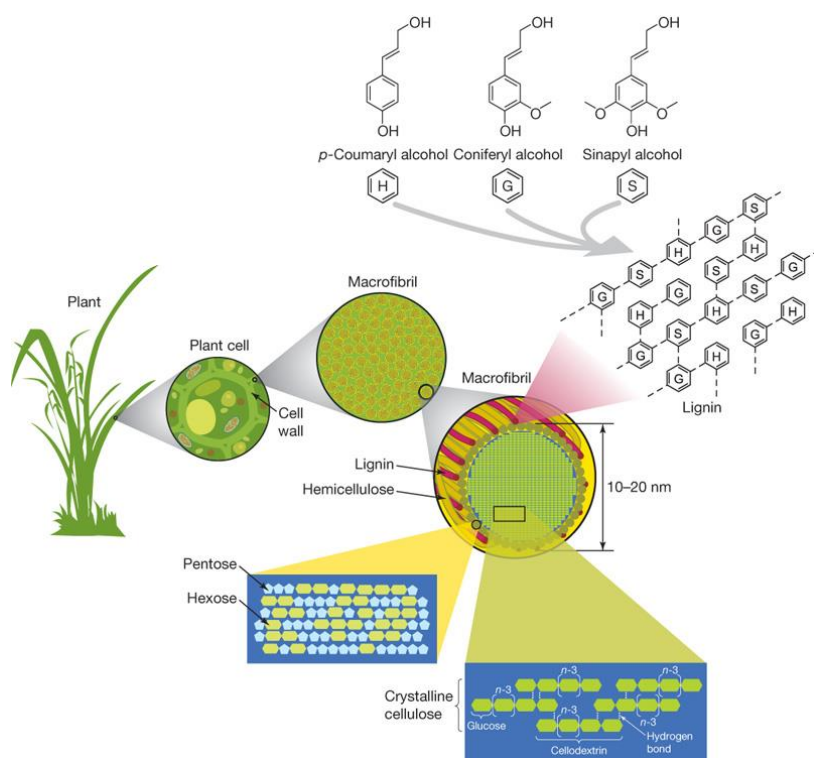
I naturen benytter sopp og bakterier seg av tilpassede enzymer for å metabolisere lignocellulosisk biomasse og anvende lignin-deriverte karbonkilder. Blant disse enzymene finner vi ulike typer heme-peroksidaser, samt laccaser, superoksid-dismutaser (SOD), katalaser, og andre ligninaktive enzymer som lipoamiddehydrogenase (DH). I tillegg har det blitt påvist at lytiske polysakkarid monooksygenaser (LPMOer) kan bruke lignin som elektrondonor for sine enzymatiske reaksjoner (Westereng et al. 2015) som kan tyde på at disse enzymene også har en rolle i degraderingen av lignin. Sammen danner disse enzymene et godt utgangspunkt for utarbeidelse av en enzymcocktail for nedbrytning av lignin og lignocellulosisk biomasse som er et nøkkelement for å kunne anvende denne kilden til karbonbaserte produkter i fremtidens voksende grønne industri.

I denne innledningen vil det fokuseres på struktur og forekomst av lignocellulosisk biomasse og den motstandsdyktige, aromatiske polymeren lignin, dernest utfordringer ved degradering og potensiale for å anvende lignin i ulike produkter, før det vil gis en oversikt over de ulike gruppene av ligninolytiske enzymer og deres rolle i nedbrytningen av polymeren. *Thermobifida fusca*, en termofil bakterie kjent for å degradere lignocellulosisk biomasse, presenteres også. Bakterien ble brukt som kilde til noen av de lignin-degraderende enzymene som ble benyttet i dette prosjektet.

## 1.1 Lignocellulosisk biomasse

Landlevende planter er i hovedsak bygget opp av lignocellulosisk biomasse. Lignocellulosisk biomasse består av de tre hovedkomponentene cellulose, hemicellulose og lignin; der mengden av hver enkelt komponent varierer mellom ulike arter (Ragauskas et al. 2014). Cellulose, hemicellulose og lignin danner strukturer kalt mikrofibriller, som videre organiseres til makrofibriller som regulerer plantenes strukturelle stabilitet (Rubin 2008). I den lignocellulosiske matriksen er cellulose omringet av lignin og hemicellulose, og er derfor et lite tilgjengelig substrat for degradering. De to andre polymerene, spesielt lignin, er svært resistente mot degradering, og i sum gjør dette at biomassen er vanskelig å bryte ned. En skjematisk fremstilling av oppbygningen av lignocellulosisk biomasse er vist i figur 1.1.1.





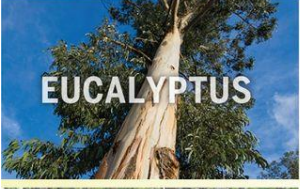





Figur 1.1.1 Skjematisk fremstilling av oppbygningen til lignocellulosisk biomasse. Figuren er hentet fra Rubin (2008).

Den viktigste strukturelle komponenten i planters cellevegg er cellulose, en lang kjede av glukosemolekyler bundet sammen ved hjelp av  $\beta$ -1,4-bindinger. Hydrogenbindinger mellom de ulike lagene av polysakkarider gir en tettpakket struktur og bidrar til cellulosens motstandsdyktighet mot degradering (Rubin 2008). Hemicellulose i planter er kryssbundet, og består av flere ulike polysakkarider med en lavere polymeriseringsgrad enn cellulose. Hemicellulose fungerer normalt som en «filler» mellom cellulose og lignin, og består av ulike 5- og 6-karbonsukkerer som glukose, arabinose, mannose, xylose og galaktose (Reddy & Yang 2005; Rubin 2008). Siste komponent er lignin, en amorf, tredimensjonal polymer av fenypropanoidenheter som er involvert i kryssbindinger med de andre komponentene (Datta et al. 2017) og tilfører ekstra styrke, rigiditet og stivhet til celleveggen. Lignin består i hovedsak av tre fenoliske hovedkomponenter: p-koumarylalkohol (H), koniferylalkohol (G), og sinapylalkohol (S), hvis fordeling varierer mellom ulike planter og plantevevsstrukturer (de Gonzalo et al. 2016). Polymerens struktur vil beskrives i detalj i avsnitt 1.3. Lignin beskytter plantecellene mot enzymatisk hydrolyse og andre ulike stressforhold i miljøet, og den komplekse strukturen til polymeren gjør den særs motstandsdyktig mot degradering (Datta et al. 2017).

Som nevnt varierer fordelingen av de tre hovedkomponentene i lignocellulosisk biomasse mellom ulike arter. Figur 1.1.2 viser en oversikt over den relative andelen av lignin og plantepolysakkarider i flere viktige agroenergiplanter og treverksressurser.

Plant resource	% Hemicellulose	% Cellulose	% Lignin*
 <b>MISCANTHUS</b>	24-33	45-52	9-13
 <b>SWITCHGRASS</b>	26-33	37-32	17-18
 <b>CORN STOVER</b>	31	37	18
 <b>POPLAR</b>	16-22	42-48	21-27
 <b>EUCALYPTUS</b>	24-28	39-46	29-32
 <b>PINE</b>	23	46	28

\*Typical aromatic polymer containing:

**Syringyl**

Cc1cc(Cc2cc(C)cc2)c(O)c1

**Guaiacyl**

Cc1cc(Cc2cc(O)c(O)c2)c(O)c1

**Hydroxyphenyl**

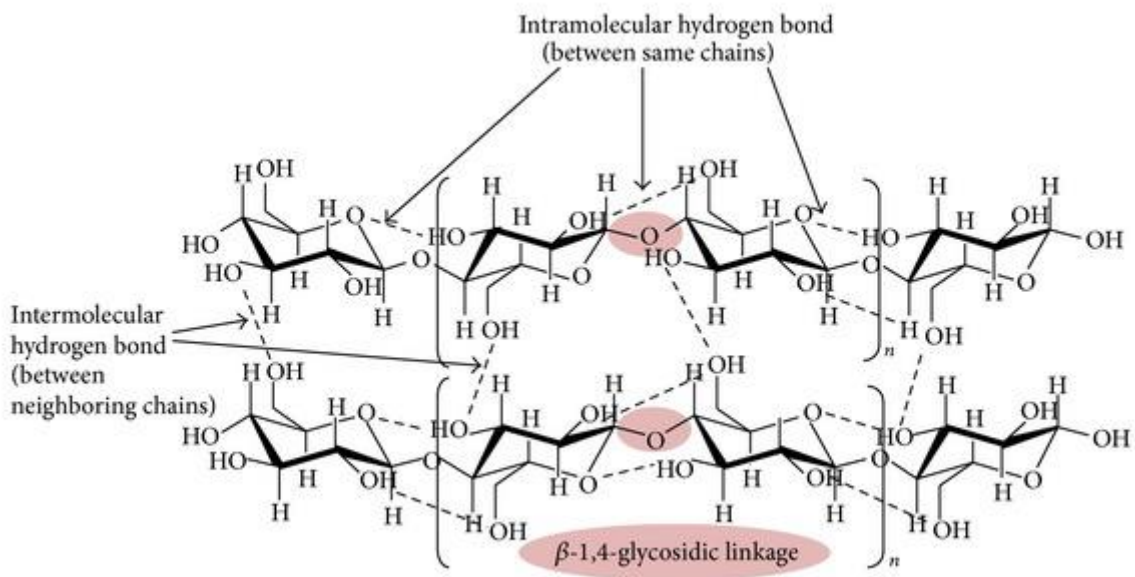
Oc1ccc(Cc2cc(O)c(O)c2)cc1

Depending on the bioresource and isolation methodology, molecular weights for native lignin have been reported from 78,400 [in spruce (118)] to 8300 [in Miscanthus (119)] g mol<sup>-1</sup>, which are derived from C9 monolignols as described in Fig. 2.

Figur 1.1.2 Andel av typiske biomassekomponenter i utvalgte planteressurser. Figuren er hentet fra Ragauskas et al. (2014).

## 1.2 Cellulose

Cellulose, en lineær polymer av  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) bundne D-glukopyranoseenheter, er den biopolymeren det forekommer mest av i biosfæren (O'sullivan 1997). Hver monomer i molekylet er rotert 180° i forhold til den forrige, som gjør dimeren cellobiose til den minste repeterende enheten. Pyran-ringen befinner seg vanligvis i en stolkonformasjon, hvilket medfører at hydroksylene ligger i ekvatorial posisjon og hydrogenene i aksial posisjon (O'sullivan 1997). Nærliggende cellulosekjeder kan dermed bruke hydrogenbindinger mellom hydroksylene til å danne nettverk som resulterer i dannelsen av «ark» i en todimensjonal struktur, vist i figur 1.2.1. Dette skjer fordi oligomerene, som består av glykankjeder med mer enn åtte enheter, har større affinitet for hverandre enn den omkringliggende vandige forbindelsen (Brown 2004). I tillegg til hydrogenbindingene holdes cellulosekjedene sammen av van der Waals interaksjoner mellom hydrogen som står vinkelrett på planet. Dette gjør at cellulosekjedene kan organiseres parallelt i mikrofibriller (Beckham et al. 2011).



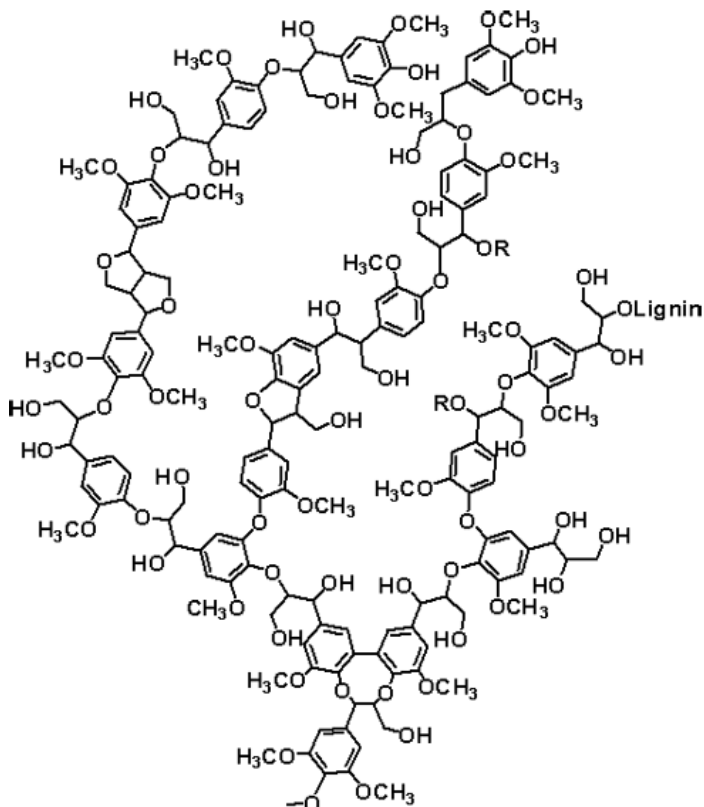
Figur 1.2.1 Illustrasjon av grunnstrukturen til cellulose som viser nettverket av intra- og intermolekulære hydrogenbindinger mellom arkene i den todimensjonale strukturen. Figuren er hentet fra Lee et al. (2014).

Enzymatisk hydrolyse av cellulose utføres av enzymer kalt glykosylhydrolaser. For å oppnå fullstendig hydrolyse av cellulose er det nødvendig med tre typer glykosylhydrolaser: (1) eksoaktive cellulaser starter nedbrytning fra enden av cellulosekjeden og frigjør cellobioseenheter, (2) endoaktive cellulaser kløyver cellulosekjeden internt på tilfeldige steder, og danner dermed frie ender som eksoglukanasene kan depolymerisere, (3)  $\beta$ -glukosidase

katalyserer hydrolysen av glykosidbindinger i  $\beta$ -D-glukosider og oligosakkarider, og frigjør glukose. Enzymet forhindrer også opphopning av cellobiose som fungerer som en hemmer av eksoaktive cellulaser (Henrissat et al. 1985).

### 1.3 Lignin – struktur og funksjon

Lignin er naturens dominerende aromatiske polymer, og den nest mest forekommende biopolymeren på landjorda. Den finnes i landlevende planter, og utgjør vanligvis 15-40 % av plantens tørrvekt (Ragauskas et al. 2014). Ligninets hovedrolle er å bidra med strukturell integritet og rigiditet til planten. I tillegg gjør ligninets upolare grupper celleveggen vanntett, som muliggjør transport av vann og oppløste stoffer gjennom plantens sirkulasjonssystem, og spiller en viktig rolle i beskyttelsen av planter mot insekter og patogener (Boerjan et al. 2003). Et eksempel på en ligninstruktur er vist i figur 1.3.1.

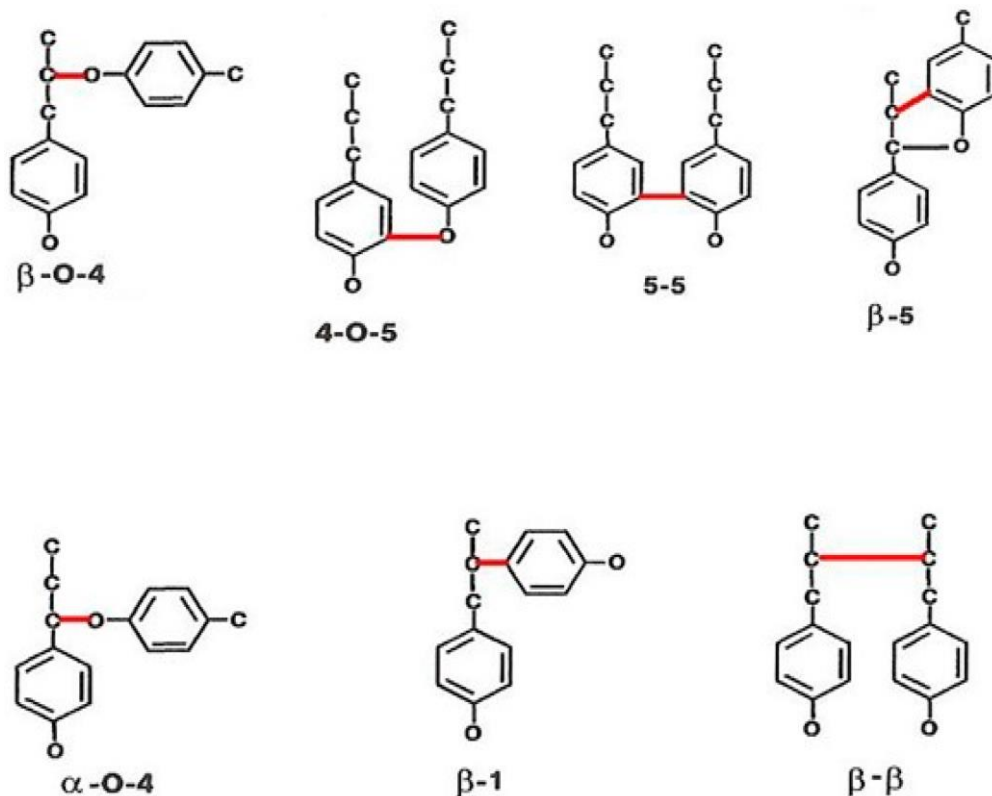


Figur 1.3.1 Et eksempel på et ligninfragment som inneholder de mest kjente bindingsmønstrene. Figuren er hentet fra Lignoworks (2016).

Som nevnt består lignin i hovedsak av ulike kombinasjoner av de tre monolignolene p-koumaryl alkohol, koniferyl alkohol og sinapyl alkohol. Disse monolignolene produserer enhetene p-hydroksyfenyl, guaiakyl og syringyl, respektivt, når de inkorporeres i ligninmolekylet (Boerjan et al. 2003). Strukturen til disse enhetene er vist i figur 1.1.2. Komposisjonen av lignin varierer mellom ulike planter. Nakenfrøede planter som furu består i hovedsak av G-monomeren, har svært lave nivåer av H-monomeren og mangler S-monomeren, mens tofrøbladete planter som bjørk består i hovedsak av G- og S-enheter (Ragauskas et al. 2014; Weng & Chapple 2010). Resultatet av mangel på S-enheter er at nakenfrøede planter generelt har mer forgrenet lignin enn tofrøbladete planter, som er rike på  $\beta$ -O-aryl eterbindinger og kryssbundet til polysakkarider i celleveggen (Ragauskas et al. 2014).

De fleste ligninmolekyler inneholder enheter som er produkter av ufullstendig monolignolsyntese eller andre sidereaksjoner som foregår under denne synteseprosessen. Det er derfor ikke helt riktig å si at lignin kun er avledet fra de tre monolignolene nevnt tidligere. Et eksempel er acetylerede ligninenheter, som trolig er avledet fra acetylerede monolignoler. Siden acetylerede ligninenheter kan utgjøre en signifikant andel av ligninmolekylet, burde disse komponentene også ha status som «ekte» ligninmonomerer (Boerjan et al. 2003).

Lignin er en svært forgrenet polymer, og de tre monolignolene er i hovedsak kryssbundet via ulike eter- og karbon-karbonbindinger (de Gonzalo et al. 2016). De fleste foretrukne bindinger inkluderer  $\beta$ -karbonet. Den vanligste bindingen mellom to monolignoler er en  $\beta$ -O-4 binding (Boerjan et al. 2003), der  $\beta$ -karbonet til den ene monomeren er bundet til oksygenet på det fjerde karbonet hos neste monomer. Dette er også den bindingen der enklest å kløyve enzymatisk (Boerjan et al. 2003). I et gjennomsnittlig ligninmolekyl utgjør denne bindingstypen 40-60 % av alle bindingene i polymeren (Ghaffar & Fan 2013). Andre vanlige bindinger mellom monolignolene er  $\beta$ - $\beta$  bindinger,  $\alpha$ -O-4 bindinger, 4-O-5 bindinger, 5-5 bindinger,  $\beta$ -1 bindinger, og  $\beta$ -5 bindinger. Eksempler på disse bindingstypene er vist i figur 1.3.2



Figur 1.3.2 Eksempler på vanlige bindingstyper i lignin. De vanligste bindingene er ulike karbon-karbon- og eterbindinger. Figuren er hentet fra (Datta et al. 2017).

Dannelsen av lignin initieres av laccaser og/eller planteperoksidaser (de Gonzalo et al. 2016) og starter vanligvis under dannelsen av den sekundære celleveggen (Cassan-Wang et al. 2013). Dimerisering katalyseres ved at monolignolene oksideres til sine respektive fenoliske radikaler. Deretter dannes polymeren ved hjelp av enkeltelektronoksidasjoner katalysert av ulike enzymer (de Gonzalo et al. 2016). Lignin ser ut til å bli syntetisert uten nøyte biokjemisk kontroll, ved at de fenoliske radikalene inngår i koblingsreaksjoner som i hovedsak er kombinatoriske (Boerjan et al. 2003).

#### 1.4 Forbehandling av lignocellulosisk biomasse

Det er nødvendig med forbehandling av den lignocellulosiske biomassen for å separere cellulosen fra de andre polymerene i matrisen slik at den blir lettere å foredle. Fraksjonering av biomassen gir også et godt utgangspunkt for potensiell foredling av lignin og hemicellulose. Det har blitt utviklet flere ulike forbehandlingsteknikker for å oppnå denne separeringen.



Bruk av konsentrerte eller fortynnede syrer kan endre den fysiske og kjemiske strukturen til lignin og bryte ned hemicellulose til mindre sukkermolekyler som gjør cellulosen mer tilgjengelig for enzymatisk hydrolyse (Brodeur et al. 2011; Ragauskas et al. 2014). Etter dette befinner mesteparten av ligninet seg i det faste reststoffet. På grunn av problemer med etsing er det nødvendig med en reaktor som kan motstå de nødvendige reaksjonsbetingelsene i disse tilfellene. I tillegg må syrerestene fjernes ved bruk av omfattende avgiftningsprosesser. Et annet problem er dannelsen av inhibitorer som furfural og HMF (hydroksymetylfurfural), som reduserer effektiviteten til både metoden og videre prosessering av materialet (Brodeur et al. 2011).

Andre metoder bruker høy pH i form av hydroksidioner eller ammoniakk for å gjøre biomassen mer tilgjengelig for enzymer (Brodeur et al. 2011; Ragauskas et al. 2014). Basisk forbehandling kan fragmentere og løse opp lignin, slik at det kan utvinnes fra produktstrømmen underveis i produksjonen av for eksempel biodrivstoff (Brodeur et al. 2011). Betingelsene er ikke like strenge som ved syrebehandling, men det er en tidkrevende prosess.

Organosolv-forbehandling behandler biomassen med en blanding av vann og organiske forbindelser, som etanol, sammen med en katalysator ved 140-200 °C. Ved denne typen forbehandling kløyves lignin-karbohydratbindinger og  $\beta$ -O-4 bindinger, som fører til at lignin løses i det organiske løsemiddelet. Deretter kan ligninet utvinnes fra løsemiddelet ved utfelling. Organosolv-lignin har lite karbohydratkontaminering og er fritt for giftige komponenter som svovel (Ragauskas et al. 2014).

I tillegg finnes forbehandlingsprosesser som dampeksplasjon, der både fysiske og kjemiske teknikker benyttes for å bryte bindinger i den lignocellulosiske biomassen. Dampeksplasjon utsetter substratet for høyt trykk og temperatur i korte tidsintervaller (vanligvis 1-10 minutter), for deretter å raskt senke trykket i systemet som delvis ødelegger strukturen til fibrillene og øker cellulose-tilgjengeligheten (Brodeur et al. 2011; Kumar et al. 2009). Den høye temperaturen (190-270 °C) forårsaker degradering av hemicellulose og redistribusjon av lignin (Brodeur et al. 2011). Dannelsen av eddiksyre under dampeksplasjonen fremmer hydrolyse av hemicellulosen, mens redistribusjonen av lignin er et resultat av smelting og depolymeriserings-/repolymeriseringsreaksjoner (Kumar et al. 2009). Dampeksplasjon blir sett på som en av de mest kostnadseffektive forbehandlingsprosessene for løvtrær og rester fra jordbruket, men er mindre effektivt for batrær (Brodeur et al. 2011).

## 1.5 utfordringer ved foredling av lignin

De fleste bioraffinerier som utnytter polysakkarider fra planter har brent lignin for å generere energien som er nødvendig for å transformere biomassen effektivt. Bioraffinerier som omdanner cellulose fra lignocellulosisk biomasse til flytende biodrivstoff vil generere mye mer lignin enn det som trengs for å drive prosessen. Derfor er det nødvendig å finne en måte å omdanne den resterende ligninen til verdifulle produkter.

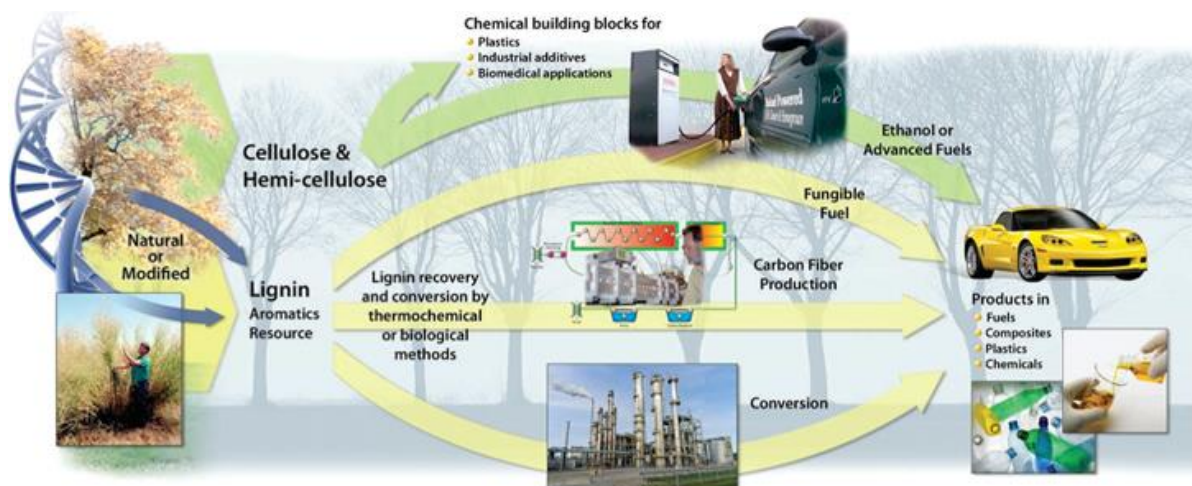
Det er i hovedsak fem årsaker til at lignin er såpass utfordrende å omdanne til verdifulle produkter: (1) C-C bindinger og C-O bindinger, som er de hyppigst forekommende bindingstypene i ligninmolekylet, kan ikke kløyves hydrolytisk, og regnes derfor som kjemisk inerte. Dermed kreves det gjerne uvanlige kjemiske og biokjemiske teknikker for å bryte ned lignin. (2) Naturlig lignin fra biomasse, samt flere typer forbehandlet lignin, er vanskelig å løse i både vandige og organiske løsninger. Dermed blir bruk av både kjemiske og enzymatiske katalysatorer utfordrende. (3) Den uensartede strukturen til polymeren er utfordrende for enzymene, da de gjerne er selektive for ett spesifikt substrat. I tillegg er lignin høstet ved bruk av industrielle prosesser ofte svært fortettet, noe som gjør det mer kjemisk inert. (4) Ligninfragmenter som dannes ved oksidativ spalting av polymeren har en tendens til å repolymerisere til forbindelser med høyere molekylvekt. Disse polymeriseringsreaksjonene katalyseres av radikale intermediater som dannes under nedbrytningen. (5) Prosessering av lignin resulterer i en svært kompleks sammensetning av aromatiske produkter med lav molekylvekt, og det er nødvendig å utvikle prosesser som forenkler denne sammensetningen (Bugg & Rahmanpour 2015).

Bioteknologiske prosesser for å omdanne ligninstruktur og/eller inkorporere atypiske komponenter har vist seg som et lovende hjelpemiddel for utvinning og kjemisk modifisering av lignin under forholdene tilstede i bioraffineriet. Både undersøkelse av genetiske varianter i populasjoner av avlinger og direkte genetisk manipulasjon av biosyntetiske reaksjonsveier har produsert ligninråstoff med unike egenskaper for produktutvikling. I tillegg er det viktig at valorisering av lignin ikke skjer på bekostning av effektiv utnyttelse av cellulose (Ragauskas et al. 2014).



## 1.6 Produkter av lignin, reelle og potensielle

Foredling av lignin vil si å omdanne polymeren til produkter av høy verdi. Mulighetene er mange, både innenfor materialindustrien og produksjon av kjemikalier og biodrivstoff. Valorisering av lignin er lite utbredt per i dag, men foregår blant annet på Borregaard sitt bioraffineri i Sarpsborg; samt deres bedrift LignoTech i Sør-Afrika. Her produseres blant annet ligninprodukter som benyttes i betong og keramikk, som smakstilsetninger (f.eks. vanillin), og som additiver i produkter som hindrer spredning av støvpartikler fra grusveier, landingsstriper for fly og lignende (Borregaard Lignotech u.å.). Et potensial for å produsere produkter som er vesentlig mer verdifulle er tilstede. En oversikt over potensielle produkter fra ligninforedling er vist i figur 1.6.1.



Figur 1.6.1 Oversikt over potensielle produkter fra ligninforedling. Figuren er hentet fra (Ragauskas et al. 2014).

Et eksempel er produksjon av karbonfiber, et materiale som nå blir etterspurt for å kunne utvikle energi-effektive lettvektkjøretøy. Designbaserte modeller har vist at 40-50 % av stålet i kjøretøy kan erstattes med karbonfiber, men produksjonskostnadene må kraftig ned for at dette skal kunne komme ut på markedet. Lignin fra bioraffinerier kan bli den ideelle forløperen til karbonfiber. Plantederiverte plast- og komposittmaterialer er et annet alternativ, da syntesen av plast, polymere membraner og termoplastiske elastomerer fra lignin, med samme egenskaper som oljebaserte produkter, har blitt rapportert (Ragauskas et al. 2014).

Ikke alle ligninfraksjoner er forventet å være brukbare til materialproduksjon, men de kan fortsatt omdannes til verdifulle kjemikalier eller biodrivstoff. Eksempler på kjemikalier avledet

fra lignin er vanillin, 1,4-butandiol og adipinsyre. Ved produksjon av kjemikalier fra lignin kan kravet til renhet av kjemikaliene derimot være en utfordring. En av de største utfordringene ved ligninforedling er hvorvidt det finnes en økonomisk måte å konvertere lignin til verdifulle produkter og kjemikalier (Ragauskas et al. 2014).

### 1.7 Hvilke organismer bryter ned lignin?

Lignindegradering involverer både depolymerisering og kløyving av aromatiske ringer. Ekstracellulære enzymer oksiderer lignin i følgende trinn (Datta et al. 2017): (1) Oksidasjon av  $\beta$ -O-4 bindinger til arylglyserolforbindelser, (2) kløyving av aromatiske ringer ved bruk av  $\beta$ -ketoacidveien (3) Kløyving av aromatiske ringer parert med  $\beta$ -O-4 oksidering fører til dannelse av sykliske karbonatstrukturer.

I naturen kan sopp og bakterier som vokser på lignocellulosisk biomasse bryte ned lignin ved hjelp av sekresjon av enzymatiske cocktailer. Hvitråtesopp er de mest effektive nedbryterne av lignocellulosisk biomasse, og produserer en rekke ekstracellulære enzymer som angriper lignin, cellulose og hemicellulose direkte. Brunråtesopp er mindre effektive, og deres lignindegradering involverer i hovedsak ikke-enzymatiske oksidasjonsreaksjoner som produserer hydroksidradikaler. Bakteriell lignindegradering er lite undersøkt, men det er kjent at jordbakterier som *Actinomycetes* klarer å modifisere lignin og ligninrelaterte forbindelser. Flere typer kløyvinger i ligninmolekyler, som demetylering, oksidasjon og kløyving av aromatiske ringer, katalyseres av bakterielle enzymer (Datta et al. 2017).

Disse enzymene genererer svært reaktive aromatiske radikaler, som spalter bindinger i ligninmolekylet gjennom ikke-enzymatiske reaksjoner og produserer oksygenerte aromater. Dette har bidratt til at mikrober har utviklet katabolske reaksjonsveier og mekanismer som benytter aromatiske forbindelser siden de har stor tilgang på disse fra naturen. Aerobe bakterier bruker sine øvre reaksjonsveier (upper pathways) til å omdanne aromatiske forbindelser til sentrale intermediære metabolitter som katekol. Deretter spaltes de aromatiske ringene ved bruk av ringåpnende dioksygenaser. Produktene av spaltingen konverteres enzymatisk gjennom bakteriens nedre reaksjonsveier (lower pathways) til ulike karbon- og energikilder som kan benyttes i den sentrale karbonmetabolismen (Beckham et al. 2016).

*Thermobifida fusca* er en termofil, filamentøs jordbakterie som tilhører *Actinobacteria*. Denne aerobe, grampositive bakterien er en effektiv nedbryter av lignocellulosisk biomasse, og har

blitt brukt som modellorganisme for studier av sekreerte, termostabile cellulaser (Lykidis et al. 2007). Bakterien vokser godt på oppvarmet organisk materiale som råttent høy, kompost, gjødselhauger og vekstmedium for sopp – og kan vokse på de fleste enkle sukkerer og karboksylsyrer. *T. fusca* er spesielt interessant fordi den kan produsere flere termostabile enzymer involvert i degraderingen av lignocellulose (NCBI u.å.).

En nylig proteomikkstudie brukte flere ulike typer lignocellulosisk biomasse som substrater for *T. fusca* med mål om å kartlegge hvilke lignocellulolytiske enzymer som ble produsert i de ulike tilfellene (Adav et al. 2012). Undersøkelsene ble utført ved 55 °C for å hjelpe til å løsne strukturen til lignocellulosen slik at de ulike komponentene ble mer tilgjengelige for bakterien. Studien fant overuttrykk av flere *T. fusca* enzymer på ligninrikt substrat, blant annet *TfDyP*, en dye decolorizing peroksidase. Dette enzymet har senere fått påvist aktivitet på Kraft-lignin og en lignin-modellforbindelse (Rahmanpour et al. 2016). Andre overuttrykte enzymer inkluderte *TfKat*, en katalase med peroksidaseaktivitet, og *TfSOD*, en superoksid-dismutase, med flere. Med utgangspunkt i profilen av lignocellulolytiske enzymer som denne artikkelen danner, kan aktuelle enzymer velges ut og undersøkes nærmere med mål om å identifisere hvilke enzymer som er essensielle for lignindegradering.

## 1.8 Ligninaktive enzymer

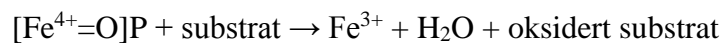
Lignindegraderende sopp og bakterier kan produsere flere ekstracellulære enzymer, inkludert lignin peroksidase (LiP), manganavhengige peroksidaser (MnP), allsidige peroksidaser (VP), laccaser og Dye decolorizing peroksidaser (DyP). Av disse er det kun laccaser og DyP som kan uttrykkes i bakterier. I tillegg finnes det andre hjelpeenzymer som på ulike måter bidrar til nedbrytningen av polymeren, for eksempel superoksid-dismutaser (SOD) og dehydrogenaser (DH). I dette avsnittet vil noen av de viktigste ligninaktive enzymene presenteres.

### 1.8.1 Heme-peroksidaser

Heme-peroksidaser er heme-avhengige enzymer som bruker hydrogenperoksid som elektronakseptor for å katalysere en rekke oksidative reaksjoner. De fleste heme-peroksidaser følger følgende reaksjonsmønster (P = redusert porfyrinring, P' = oksidert porfyrinring):



Ligning 1-3



Den katalytiske syklusen er basert på tre påfølgende redoksreaksjoner som involverer de høyvalente intermediatene Forbindelse I og Forbindelse II. Disse er ansvarlige for oksidasjonen av substratet. Reduksjonspotensialet til de tre redoksparene Forbindelse I/ $\text{Fe}^{3+}$ , Forbindelse I/Forbindelse II og Forbindelse II/ $\text{Fe}^{3+}$  påvirker derfor termodynamikken og kinetikken i den katalytiske syklusen. De to siste redoksparene har spesielt høyt reduksjonspotensiale, og dette kontrollerer den oksidative kraften til heme-peroksidaser. Reduksjonspotensialet til redoksparet  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  er også viktig for å holde jernforbindelsen i en stabil tilstand under fysiologiske forhold, slik at den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -kontrollerte oksidasjonen av jern(III) til forbindelse I kan gjennomføres (Battistuzzi et al. 2010).

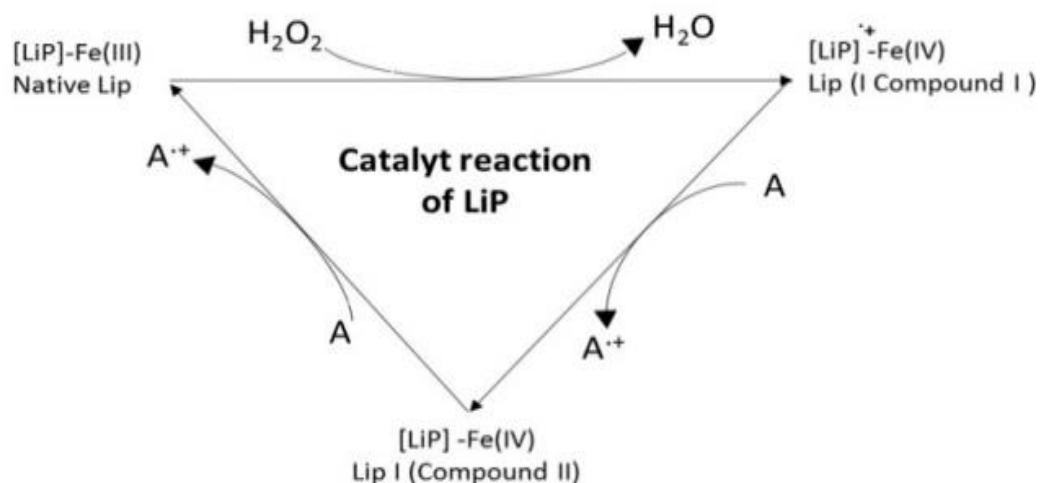
Heme-peroksidaser inkluderer to superfamilier: en som finnes i dyr, og en som finnes i planter, sopp og bakterier. Sistnevnte kan beskrives som bestående av tre hovedklasser (Welinder 1992): Klasse I, intracellulære peroksidaser, inneholder enzymer fra både bakterier, planter og sopp – for eksempel enzymet katalase peroksidase, som er assosiert med degradering av lignocellulose (de Gonzalo et al. 2016). Klasse II består av sekretoriske peroksidaser fra sopp, som ligninperoksidaser (LiP) og manganavhengige peroksidaser (MnP). Disse er monomere glykoproteiner involvert i degraderingen av lignin, og har fire konserverte disulfidbroer og to konserverte kalsiumbindingssteder (Battistuzzi et al. 2010). Klasse III består av sekretoriske planteperoksidaser, monomere glykoproteiner som har en rekke vevsspesifikke funksjoner som fjerning av  $\text{H}_2\text{O}_2$  fra kloroplaster og cytosol, oksidering av giftige forbindelser, og polymerisering av komponenter i celleveggen (Passardi et al. 2005). Disse har også fire konserverte disulfidbroer og to konserverte kalsiumbindingssteder hvor plasseringen i proteinet er forskjellig fra klasse II (Battistuzzi et al. 2010).

I tillegg til de nevnte har vi også dye-decolorizing peroksidaser, en familie heme-peroksidaser med unike karakteristikk som skiller dem fra andre peroksidaser.

## 1.8.2 Ligninperoksidaser (LiP)

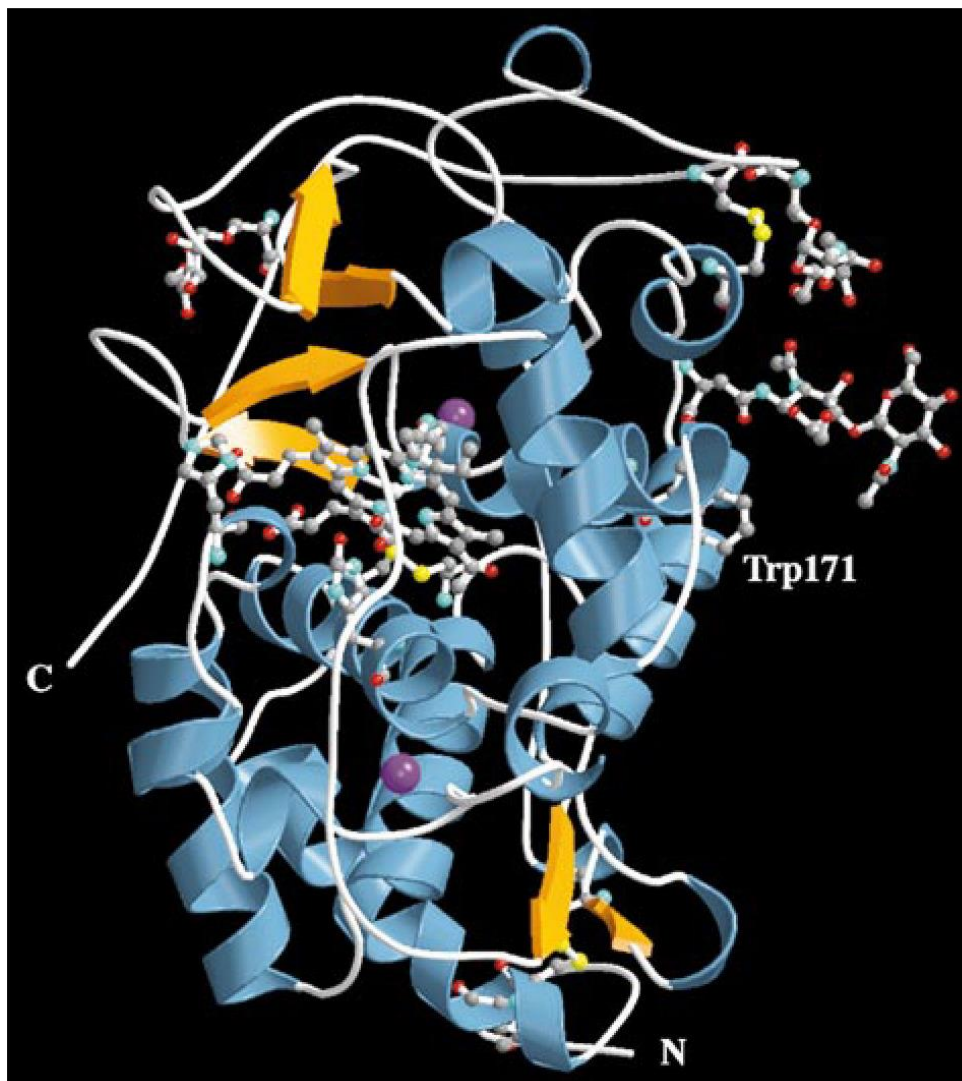
Ligninperoksidaser (LiP) er glykoproteiner som produseres av mange ulike typer sopp, f.eks. hvitråtesoppen *Phanerochaete chrysosporium*. Enzymet ble først oppdaget (under navnet ligninase) i denne soppen tidlig i 1980-årene, og det ble observert at det kunne degradere  $\beta$ -1 og  $\beta$ -O-4 bindinger i modellforbindelser av lignin ved tilstedeværelse av  $H_2O_2$  (Tien & Kirk 1984). LiP fjerner elektroner fra de aromatiske delene av lignin, som etterfølges av en katalytisk spalting av for eksempel  $\beta$ -O-4-bindingen og forskjellige C-C-bindinger, inkludert aromatisk ringåpning (Lundell et al. 1993). Den har lav substratspesifisitet som forenkler nedbrytning av heterogene molekyler som lignin (Tien & Kirk 1984). LiP fra *P. chrysosporium* eksisterer som en familie av isozymer, og alt fra seks til femten ulike varianter av LiP har blitt isolert avhengig av forholdene i bakteriekulturen (Lundell et al. 1993).

Den katalytiske syklusen til LiP består av ett oksidasjons- og to reduksjonstrinn (figur 1.8.1): (1) En to-elektronoksidasjon av [LiP]-Fe(III) utført av hydrogenperoksid danner [LiP]-Fe(IV) (Forbindelse I), et okso-ferryl intermediat; (2) Reduksjon av Forbindelse I til Forbindelse II utføres av det ikke-fenoliske aromatiske substratet (A i figur 1.8.1); (3) Oksidasjonssyklusen avsluttes når Forbindelse II returneres til utgangstilstanden ved å motta enda et elektron fra A (Datta et al. 2017).



Figur 1.8.1 Illustrasjon av den katalytiske syklusen til ligninperoksidase (LiP). Figuren er hentet fra Datta et al. (2017).

Figur 1.8.2 viser krystallstrukturen til LiP fra *P. chrysosporum* ved 1.78 Å oppløsning. LiP er kuleformet og heme-gruppen er begravd i proteinet med en tilgjengelighet via to små kanaler. En monomer av LiP består av åtte store alfa-helikser og åtte mindre og folden fullføres av tre veldig korte, antiparallelle  $\beta$ -plater. Som nevnt i avsnitt 1.8.1 har enzymet fire disulfidbroer og to kalsiumbindingssteder. Begge bindingssetene ligger bak histidin-residuene i det aktive setet og er koordinert av 7-8 oksygenatomer. Residuet Trp171 er konserververt i alle kjente LiP-sekvenser, som indikerer at det er et essensielt residue. Trp171 er redoksaktivt og omringet av sure residuer, og antas derfor å være et bindingssete for aromatiske substrater (Choinowski et al. 1999).



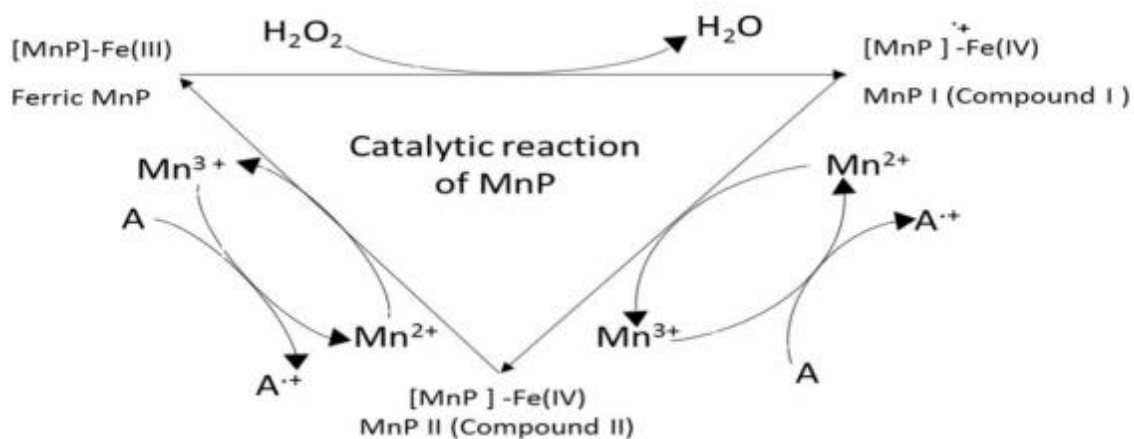
Figur 1.8.2 Krystallstrukturen til LiP fra *P. chrysosporum*. Alfa-helikser er angitt i blått og  $\beta$ -plater i oransje. Hemet med det proximale og distale histidinet og de to distale vannmolekylene, de to kalsiumionene (lilla), His82 ved inngangen til kanalen til det aktive setet, fire karbohydratmolekyler, Trp171 og disulfidbroene (S atomer som gule sfærer) er vist som kulepinnemodeller. Figuren er hentet fra Choinowski et al. (1999).



### 1.8.3 Manganavhengige peroksidaser (MnP)

Manganavhengig peroksidase (MnP) er den mest vanlige ligninmodfiserende peroksidasen, og produseres av nesten alle ved-koloniserende basidiomycetes og flere jord-koloniserende søppelnedbrytende sopp. Den sekreseres vanligvis av ligninolytisk sopp for å oksidere  $Mn^{2+}$  ioner til svært reaktive  $Mn^{3+}$ , som stabiliseres ved chelatering av organiske syrer som oksalsyre. Chelatert  $Mn^{3+}$  fungerer som en diffunderende redoks-mediator som angriper fenolstrukturer i lignin og fører til dannelsen av ustabile frie radikaler som desintegrerer spontant (Hofrichter 2002).

Glykoproteinet ble oppdaget i soppen *Phanerochaete chrysosporium* for over 30 år siden av to internasjonale forskningsteam (Glenn & Gold 1985; Paszczyński et al. 1985), men fikk til å begynne med lite oppmerksomhet på grunn av fokus på et annet enzym fra samme bakterie, lignin peroksidase. Enzymet er avhengig av tilstedeværelse av Mn(II) og hydrogenperoksid for å være aktivt, og mangan(II) ionet er løst bundet til enzymet under reaksjonen (Glenn & Gold 1985). Wariishi et al. viste i 1991 at MnP kan oppnå betydelig nedbrytning av syntetisk lignin. Bruk av ren MnP fra *P. chrysosporium*, med malonsyre som chelator, oppnådde delvis degradering av fire ulike typer syntetisk lignin (Wariishi et al. 1991). Både strukturen og den katalytiske syklusen til MnP ligner LiP. Den katalytiske syklusen til MnP er vist i figur 1.8.3.



Figur 1.8.3 Illustrasjon av den katalytiske syklusen til manganavhengig peroksidase (MnP). Figuren er hentet fra Datta et al. (2017).

Den katalytiske syklusen initieres ved at  $H_2O_2$  binder seg til enzymet og danner et jernperoksidkompleks (Hofrichter 2002). Kløyving av peroksidets oksygen-oksygen binding krever en overføring av to elektroner fra hemet, som resulterer i dannelsen av MnP Forbindelse I (Datta et al. 2017). MnP oksiderer Mn (II) til Mn (III), som deretter chelateres av en organisk syre (Datta et al. 2017). Det chelaterte Mn (III)-syre komplekset oksiderer fenoliske forbindelser i lignin til fenoksyradikaler (Datta et al. 2017).

#### 1.8.4 Dye decolorizing peroksidaser (DyP)

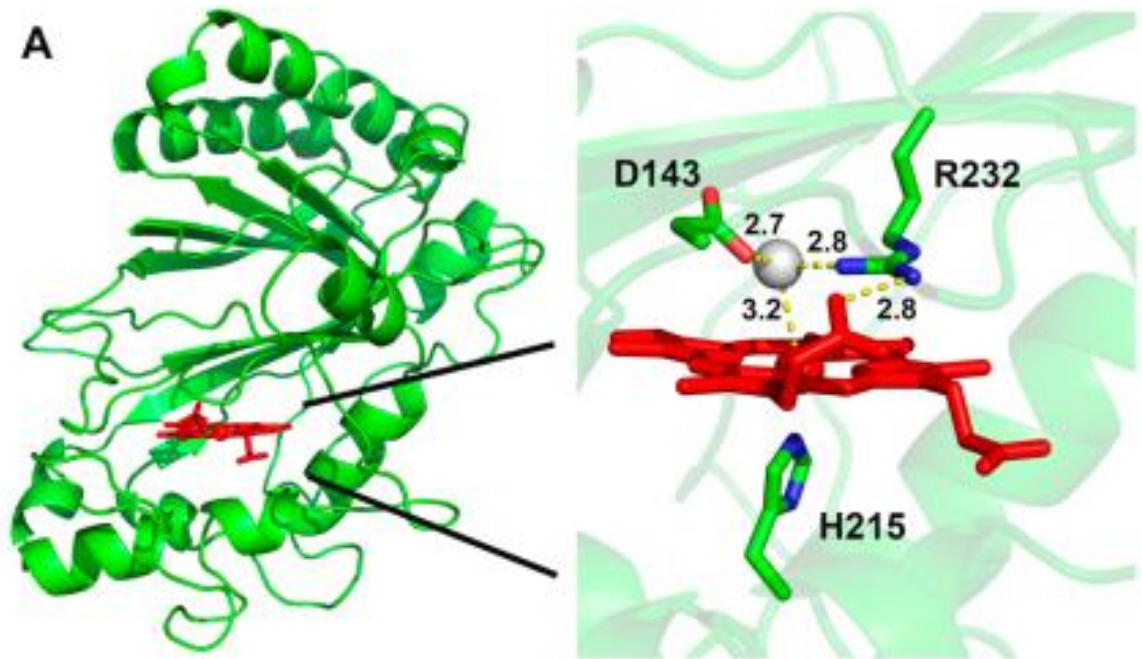
Dye decolorizing peroksidaser er bifunksjonelle enzymer som både viser oksidativ og hydrolytisk aktivitet (Sugano 2009). De ble først oppdaget i sopp, og navngitt etter deres evne til å degradere en rekke ulike fargestoffer (Colpa et al. 2014). Nylige sekvensanalyser av genomer avslørte at disse enzymene er mest vanlige hos bakterier, mens kun et lite antall finnes i sopp og høyere eukaryoter (Colpa et al. 2014). Den fysiologiske funksjonen til majoriteten av DyP-type peroksidaser er foreløpig uklar, men det er vist at flere bakterielle varianter er involvert i degraderingen av lignin (de Gonzalo et al. 2016). I tillegg til lignin kan DyP-type peroksidaser også oksidere syntetiske fargestoffer som anthraquinon og azofarger, ikke-fenoliske metoksylerede aromater, og  $Mn^{2+}$  (Datta et al. 2017).

DyPer har en protomervekt på 40-60 kDa, og flere ulike oligomerer har blitt observert (Colpa et al. 2014). Alle DyP-type peroksidaser inneholder et såkalt GXXDG motiv i sin primærsekvens, som er en del av den heme-bindende regionen (Sugano 2009). Dette motivet er viktig for peroksidaseaktiviteten fordi å erstatte den konserverte asparaginsyren med alanin eller asparagin inaktiverer enzymet, mens binding til heme ikke blir påvirket (Colpa et al. 2014). Det har derfor blitt foreslått at denne aminosyren fungerer som et katalytisk residue, og dermed erstatter det distale histidinet som finnes hos planteperoksidasene; samt at den er ansvarlig for at DyP-type peroksidaser har lavt pH-optimum (Colpa et al. 2014; Shrestha et al. 2017). DyP-type peroksidaser har lav sekvenslikhet, men deres strukturelle topologi er svært konserverert (Colpa et al. 2014).

Strukturen til DyP fra *Enterobacter lignolyticus* er vist i figur 1.8.4. DyP-type peroksidaser består av to domener som inneholder  $\alpha$ -helikser og antiparallele  $\beta$ -plater og har en ferredoksinlignende folding (Shrestha et al. 2017). Slik dannes en kløft til det aktive setet, med heme-kofaktoren klemt mellom domenene. Det heme-bindende motivet inneholder et høyt



konserverte histidin i enzymets C-terminale domene, som virker å være en viktig heme-ligand (Colpa et al. 2014). For å teste rollen til dette histidinet som en heme-ligand, ble det forsøkt erstattet med alanin i *TfDyP* fra *Thermobifida fusca* (van Bloois et al. 2010). Dette resulterte i tap av heme, som tydelig viser at dette residuet er en viktig heme-ligand i DyP-type peroksidaser.



Figur 1.8.4 Krystallstrukturen til *Enterobacter lignolyticus* DyP, fullstendig (venstre) og aktivt sete (høyre). Katalytiske enheter, heme og vannmolekyl 288 er representert som grønne pinner, røde pinner og en grå ball, respektivt. Bildet er hentet fra (Shrestha et al. 2017).

På bakgrunn av sekvenskarakteristikk er DyPer delt inn i fire klasser i PeroxiBase databasen (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Proteinene funnet i klasse A-C finnes hovedsakelig i bakterier, mens klasse D tilhører sopp. Enzymene i klasse A, som DyP fra *T. fusca*, har vanligvis en Tat-signalsekvens og blir derfor sekretet, mens enzymene i klasse B og C er intracellulære enzymer (Colpa et al. 2014; de Gonzalo et al. 2016). Oksidasjonsmekanismen til DyP-type peroksidaser ligner mekanismen til MnP og allsidige peroksidaser (VP) (Datta et al. 2017).

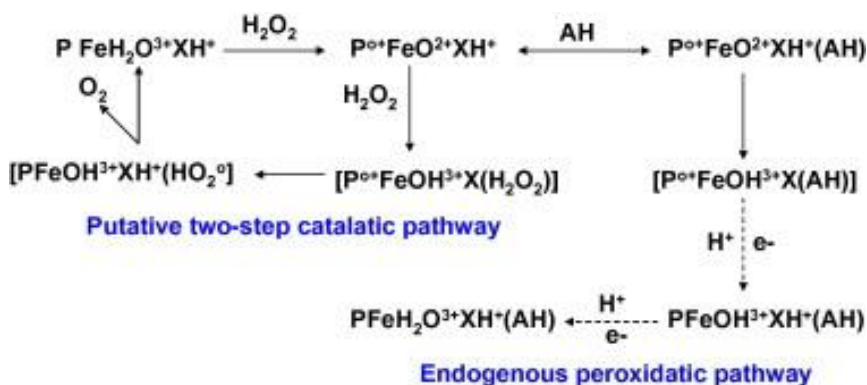
### 1.8.5 Katalaser med peroksidaseaktivitet

Katalaser er svært vanlige enzymer som finnes i nesten alle levende organismer som eksponeres for oksygen. Denne enzymklassens hovedoppgave er å katalysere disproporsjoneringen av hydrogenperoksid til vann og molekylært oksygen:



Katalasene kan deles inn i tre underklasser: de klassiske heme-enzymene, en liten gruppe manganavhengige enzymer og katalase peroksidaser – heme-enzymene som også inneholder en kovalent triplett av distale sidekjeder. Katalase peroksidaser katalyserer både peroksidase- og katalase reaksjoner, og har en annen mekanisme enn de typiske heme-enzymene (Nicholls 2012).

En skjematisk fremstilling av en mulig enzymatisk mekanisme for katalase peroksidase er vist i figur 1.8.5.

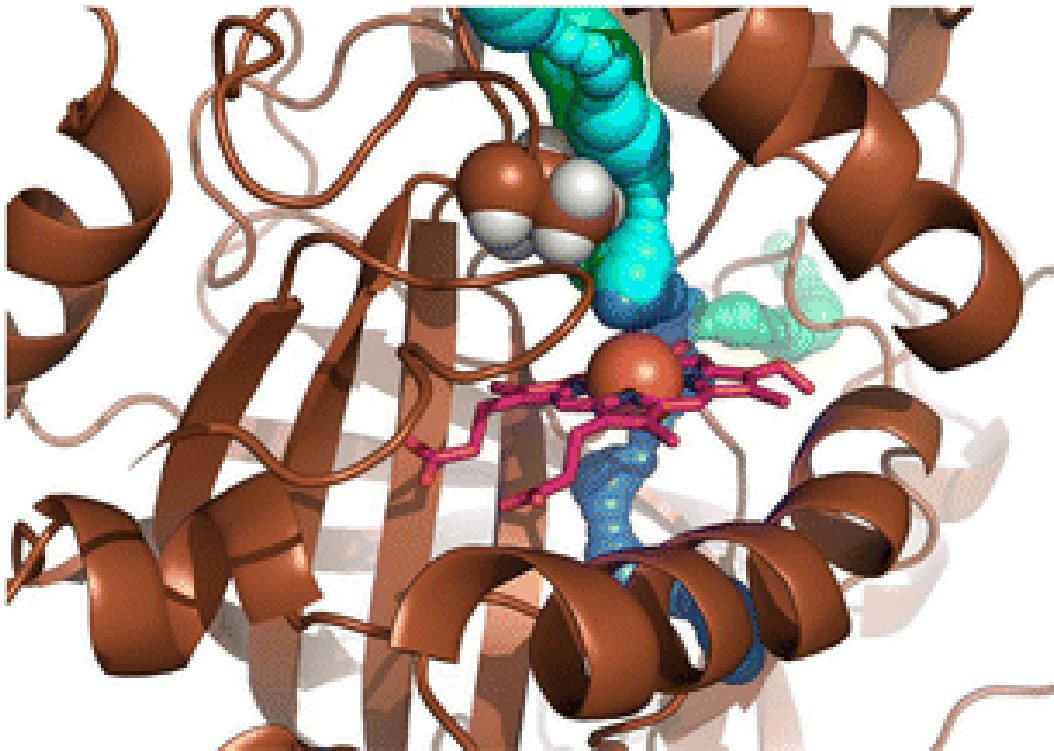


Figur 1.8.5. Skjematisk fremstilling av en mulig katalasemekanisme. Forkortelser: P - porfyrin ring,  $P^{o+}$  -  $\pi$ -kation radikal, Fe – heme-jern, X/ $XH^+$  - antatt protondonor, AH – én-elektron endogen donor. Forbindelser i klammeparentes [ ] indikerer de antatte, forbigående protonerte, jerntilstandene. Figuren er hentet fra Nicholls (2012).

Heme-bundet enzym reagerer først med et molekyl  $H_2O_2$  og produserer dimolekylært oksygen som biprodukt. Over hemet er det en ekstern H-bundet posisjon som kan okkuperes av enten det andre peroksidmolekylet eller et svakt syremolekyl (AH). Før videre elektronoverføring skjer det en protonoverføring til det jernbundne oksygenet. Den peroksidaseaktive prosessen generer så en stabil forbindelse II. Den katalaseaktive prosessen genererer en forbindelse som ligner på forbindelse II med et flyktig superoksid som raskt donerer et proton og elektron for å frigjøre oksygen og returnere enzymet til sin opprinnelige jerntilstand. Synkron overføring av

begge de reduserende ekvivalentene (proton pluss hydrid-ion ekvivalent) er et mulig alternativt trinn (Nicholls 2012).

Som nevnt i avsnitt 1.7, var en katalase med peroksidaseaktivitet et av enzymene det ble funnet overuttrykk av når *T. fusca* vokste på ligninsubstrat (Adav et al. 2012). Dette enzymet, *TfKat*, kunne i tillegg til å disproporsjonere  $H_2O_2$  også katalysere oksidasjon av fenoliske forbindelser. Denne katalasen har et bredt aktivitetsområde, men viser mest fremtredende peroksidase- og katalaseaktivitet ved basiske forhold (pH 8-10) (Lončar & Fraaije 2015). Foreløpig er substratområdet der det er funnet aktivitet av *TfKat* ganske smalt, og begrenset til katekol, 2,6-dimetoksyfenol, og andre små fenoler (Lončar & Fraaije 2015). En modell av strukturen til *TfKat* er vist i figur 1.8.6

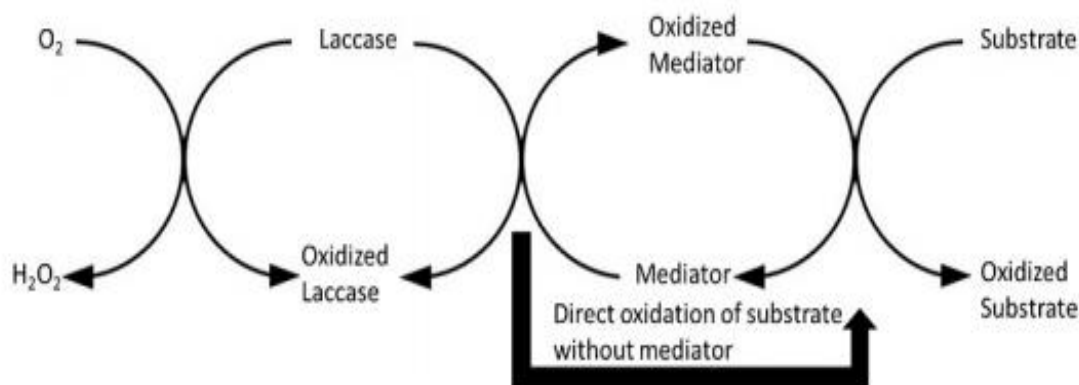


Figur 1.8.6 Modell av strukturen til enzymet *TfKat* - nærbilde av det aktive setet med heme-kofaktoren som lilla pinner, der jern er den kobberfargede sfæren. Tunneler som leder fra overflaten til det aktive setet og innsnevringen av tunnelene forårsaket av Val166 er fremhevet ved å vise de forventede tunnelene og Val166 sidekjedeatomer som sfærer. Figuren er hentet fra Lončar og Fraaije (2015)

Effektiv peroksidaseaktivitet hos katalaser ser ut til å kun være mulig når substratet kan nærme seg hemet i det aktive setet. I modellstrukturen til *TfKat* foreslås det at det finnes flere tunneller som leder fra overflaten til det aktive setet, men det er også innsnevring i tunellene forårsaket av residuet Val166 (figur 1.8.6). Potensialet for å øke peroksidaseaktiviteten ved å bruke enzymteknikk og mutasjoner til å utvide disse tunnelene er stort (Lončar & Fraaije 2015).

### 1.8.6 Laccaser (Lac)

Laccaser (Lac) er kobberenzymmer tilhørende oksidoreduktasegruppen, som oksiderer en rekke organiske og uorganiske substrater (Viswanath et al. 2014). Lac ble oppdaget allerede på slutten av 1800-tallet, da Yoshida, ifølge Viswanath et al. (2014), utvant enzymet fra treet *Rhus vernicifera*. Laccaser er svært utbredte enzymer, og finnes i både insekter, planter, sopp og bakterier. Den katalytiske syklusen til laccaser er vist i figur 1.8.7



Figur 1.8.7 Illustrasjon av den katalytiske syklusen til laccase. Figuren er hentet fra Datta et al. (2017).

Lac har lavt reduksjonspotensial (450-800 mV) sammenlignet med LiP (>1 V), og man trodde derfor først at laccaser bare kunne oksidere fenoliske forbindelser, men det viste seg at de også kunne oksidere en rekke andre forbindelser ved tilstedeværelse av en mediator (Datta et al. 2017). Mediatorer er forbindelser med lav molekylvekt som lett oksideres av laccasen til intermediater med høyt redokspotensiale, og senere blir redusert av substratet. Substratet kommer ikke i kontakt med det aktive setet hos enzymet på grunn av dets størrelse, og mediatorer fungerer derfor som transportører av elektroner fra enzym til substrat (Datta et al. 2017; de Gonzalo et al. 2016). Dette gjør at Lac kan oksidere mange ulike substrater som difenoler, polyfenoler, benzenthionol, og aromatiske og alifatiske aminer (Viswanath et al. 2014). Hos lignin angriper laccasen kun de fenoliske subenhetene, noe som fører til C $\alpha$ -oksidasjon, og kløyving av C $\alpha$ -C $\beta$ - og aryl-alkyl bindinger (Viswanath et al. 2014).

Laccaser har et kluster av fire kobberatomer i strukturen sin som kan klassifiseres i tre grupper (T1, T2 og T3) basert på UV/synlig lys- og EPR spektroskopi. Gruppe T3 inneholder to kobberatomer, mens de andre gruppene har ett. Gruppene T2 og T3 sitter nært hverandre og

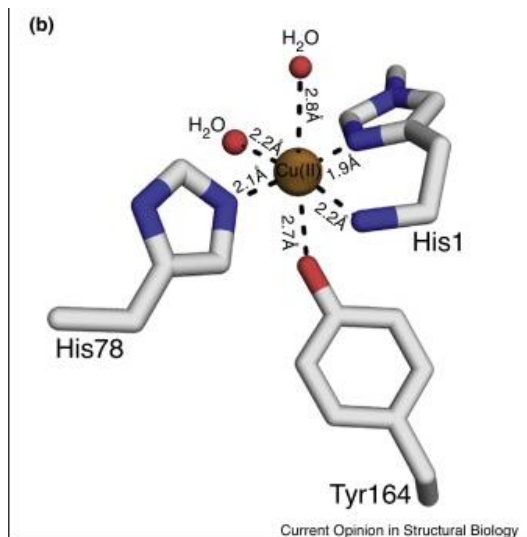
danner et trinukleært senter som er involvert i den katalytiske mekanismen til enzymet. De er med på ett-elektronoksidering av mediatorene ved bruk av molekylært oksygen, som reduseres til to vannmolekyler (Viswanath et al. 2014).

#### 1.8.7 Lytiske polysakkarid monooksygenaser (LPMOer)

Lytiske polysakkarid monooksygenaser (LPMOer) er redoksreaktive, kobberavhengige enzymer som bruker hydrogenperoksid (foretrukket) eller molekylært oksygen og en ekstern elektron donor til å øke degraderings hastigheten til hydrolytiske enzymer på krystallinske substrater (Bissaro et al. 2017; Vaaje-Kolstad et al. 2010). LPMOer kan oksidere karbon 1 (C-1), karbon 4 (C-4) på sukkerringen, eller en kombinasjon av begge (Vaaje-Kolstad et al. 2017). C-1 oksidasjon fører til dannelse av en aldonsyre på den reduserende enden, mens C-4 oksidasjon gir en ketoaldose på den ikke-reduserende enden av polymeren (Vaaje-Kolstad et al. 2017). LPMOer klassifiseres i CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)), en database for karbohydrataktive enzymer, under hjelpeenzymer (auxiliary activities, AA). AA-familiene inneholder redoks enzymer som arbeider synergistisk med karbohydrataktive enzymer. Hjelpeenzymene inndeles per 2018 i fem ulike klasser ifølge CAZy-databasen: AA9, AA10, AA11, AA13 og AA14. AA9, AA11, AA13 og AA14 består i all hovedsak av fungale enzymer, mens AA10 for det meste inneholder bakterielle enzymer.

Felles for alle LPMOer er en tertiærstruktur med en  $\beta$ -sandwich som ligner strukturen til fibronektiner og immunoglobiner og består av to  $\beta$ -plater sammensatt av sju eller åtte  $\beta$ -tråder totalt. Strukturen består også av loops og  $\alpha$ -helikser i varierende størrelse som bidrar til LPMOers diversitet. Det aktive setet befinner seg på en jevn bindingsoverflate som interagerer med den rette overflaten til krystallinske substrater som cellulose (Vaaje-Kolstad et al. 2017).

Det aktive setet hos LPMOer består av to fullt konserverte histidiner, hvorav det ene er N-terminalt (Vaaje-Kolstad et al. 2017). De to histidinene og en N-terminal aminogruppe koordinerer et kobber-ion med en T-formet geometri kalt en histidine brace (figur 1.8.8). LPMOer benytter kun ett kobberatom som skiller dem fra andre kobber-monooksygenaser, da de typisk benytter to eller tre kobberatomer (Hemsworth et al. 2013). Under den enzymatiske reaksjonen sirkulerer kobberet mellom to tilstander, kobber(I) og kobber(II), for å aktivere molekylært oksygen eller hydrogenperoksid (Bissaro et al. 2017; Westereng et al. 2015).



Figur 1.8.8 Det aktive setet til en LPMO9 (LsLPMO9A) i sin oksiderte tilstand, med oktahedral geometri. Kulepinnemodeller, der aminosyresidekjedene er vist som grå pinner og den gullfargede sfæren representerer kobber(II) ionet. Figuren er hentet fra Vaaje-Kolstad et al. (2017).

LPMO-aktivitet er avhengig av en elektronkilde. Reduksjonen av LPMOer kan skje med mange ulike reduserende agenter, for eksempel askorbinsyre, gallussyre, redusert glutation, resveratrol, katekin, koffeinsyre, sinapinsyre og hydrokinon (Westereng et al. 2015). Det er også indikasjoner som tyder på at lignin kan fungere som elektrondonor for LPMOer, og det har blitt demonstrert at en kombinasjon av lignin med lav molekylvekt (LMWL) og lignin med høy molekylvekt (HMWL) gir like høy LPMO-aktivitet som ved bruk av andre effektive reduktanter (Kracher et al. 2016; Westereng et al. 2015).

## 1.9 Mål med oppgaven

Denne oppgaven er todelt. Proteomikkstudien av den termofile bakterien *Thermobifida fusca* har vist at bakterien er et godt utgangspunkt som modellorganisme for bakteriell enzymatisk nedbrytning av lignocellulosisk biomasse (Adav et al. 2012). Blant enzymene som viste overuttrykk i den aktuelle studien ble det valgt ut en dye decolorizing peroksidase (*TfDyP*), en katalase med peroksidaseaktivitet (*TfKat*) og en LPMO (*TfLPMO-E7*). Disse ble forsøkt uttrykt og rensset i den første delen av denne oppgaven. Målet var å senere kunne bruke disse enzymene i de enzymatiske degraderingsforsøk av et naturlig lignocellulosesubstrat som utgjør andre del av oppgaven. I så henseende er det viktig å bemerke at *TfLPMO-E7* er aktiv på cellulose og dermed kan katalysere oksidasjon av både lignin og cellulose. For å ha tilgang til en LPMO som ikke

oksidierer cellulose var et mål å produsere en LPMO som har kitin som substrat; CBP21 (*SmLPMO10A*) fra *Serratia marcescens*.

Chylenski et al. har tidligere satt opp en metode for sakkarifisering av lignocellulosisk biomasse ved bruk av en kommersiell cellulose-cocktail og en  $\beta$ -glukosidase (Chylenski et al. 2017). I andre del av oppgaven har denne metoden vært utgangspunkt for enzymatiske forsøk der cellulaser, lytiske polysakkarid monooksygenaser (LPMO) og ligninmodifiserende enzymer har blitt brukt til å bryte ned lignocellulosisk substrat i form av dampeksplodert bjørk. Målet var å komme nærmere et svar på hvilke enzymer som sammen kan utgjøre en minimalistisk cocktail for effektiv nedbrytning av lignocellulosisk biomasse.

## 2. Materialer

### 2.1 Laborieutstyr

Laborieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>96-brønnersplater</b>		VWR
<b>Autoklavteip</b>	12 mm 18 mm	VWR
<b>Automatpipetter</b>	Finnpipetter	Thermo scientific
<b>Avtrekkskap</b>	Mc6	Waldner
<b>Blåkorkflasker</b>	1 L 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL	VWR
<b>Blåkorkrør</b>	Cellstar® tubes 15 mL 50 mL	Greiner Bio-One
<b>Bordsentrifuge</b>	Sigma 1-14	LABEX
<b>Cryorør</b>	2 mL	Sarstedt
<b>Dyrkningskolber</b>	250 mL 1 L 2 L	Nalgene
<b>Eksikator med hygroskopisk tørkemiddel</b>	Kimble™ vakuum eksikator m/hals 250 x 330	Fisher Scientific
<b>Elektroforeseutstyr</b>	Gelkjøringskammer Spenningskilde	VWR
<b>Eppendorfrør</b>	1,5 mL Axygen 5 mL	VWR Sigma Aldrich
<b>Filter</b>	Steritop 0,22 µm Teflonfilter FH 0,5 µM	Millipore
<b>Filterplate, 96 brønner</b>	0,22 µm	Millipore
<b>Fryser (-20°C)</b>		Bosch Whirlpool



Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Fryser (-80°C)</b>		SANYO
<b>Frysetørker</b>	Alpha 2-4 LO plus	Christ
<b>Gasskromatograf (GC)</b>	AI 1310 Autosampler Trace 1310 GC ISQ QD singel kvadrupol Massespektrometer (MS) detektor	Thermo Scientific
<b>GC kolonne</b>	TG-1701M S 60cm x 0,25 mm x 25 µM	Thermo Scientific
<b>GC-rør og lokk</b>	Fixed insert vial Cap alu cl 11 mm	Thermo Scientific
<b>Gelfoto</b>	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad
<b>Glassutstyr</b>		Schott- Duran/VWR
<b>HiLoad™16/60 Superdex™ 75 Pregrade</b>		GE Healthcare
<b>HiTrap Phenyl HP, 5 mL</b>		GE Healthcare
<b>HiTrap Q HP, 5 mL</b>		GE Healthcare
<b>HiTrap SP HP, 5 mL</b>		GE Healthcare
<b>HPLC-forkolonne</b>	SecureGuard Carbo-H <sup>+</sup> 4 x 3.0 mm	Phenomenex
<b>HPLC-kolonne</b>	Rezex ROA-Organic Acid H <sup>+</sup> (8 %), 300 mm lengde x 7,8 mm indre diameter	Phenomenex
<b>HPLC-rør og lokk</b>	Microvials PP 11 mm Snap Ring Cap	VWR
<b>Høypresisjonsvæskeskromatograf (HPLC)</b>	Dionex Ultimate 3000 Autoinjektor RI detektor	Thermo Scientific
<b>Inkubator</b>		Termaks
<b>Isbitmaskin</b>	KF 145	PORKKA
<b>Kanyler</b>	0,8 mm x 40 mm	BD Microlanc ™ 3

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Kjøleskap (4 °C)</b>		Whirlpool
<b>Kulturrør Grønn kork</b>	15 mL	VWR
<b>Kyvette</b>	1 x 1 cm	VWR
<b>LP-kromatografisystem</b>	BioLogic LP system BioFrac Fraction Collector Kolonner Stempel	Bio-Rad
<b>Magnetrorer</b>	Hotplate/Stirrer	VWR
<b>Mikrobølgeovn</b>	L17MSB13E	Logik
<b>Mikrovekt</b>	Sartorius CP-2P	VWR
<b>Oppkonsentreringsrør</b>	Macrosep® Advance 30 K  Amicon® Ultra-15 10 K Amicon® Ultra-15 50 K	PALL corporation  Millipore
<b>Parafilm</b>	5 cm	VWR
<b>Plastpipetter</b>	5 mL	VWR
<b>PD Midi-Trap G-25 kolonne</b>		GE Healthcare
<b>Petrisåler</b>	9 cm	Heger
<b>pH-meter</b>	FiveEasy Plus	Mettler Toledo Sentron
<b>Pipettespisser</b>	«Next Generation Tip Refill»	VWR
<b>Qubit® fluorometer</b>		Life Technologies
<b>Ristebrett</b>	PS-3D Sunflower minishaker	Grant Bio
<b>Risteinkubator</b>	Multitron HT	Infors
<b>Roterende stativ</b>	Multi RS-60	Biosan

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Sentrifuger</b>	Avanti™ J-25 Sentrifuge- 5430R	Beckmann Eppendorf
<b>Sentrifugerotorer</b>	JA10 JA14 JA25-50 5430/5340 R	Beckmann  Eppendorf
<b>Sentrifugerør</b>	250 mL 50 mL	Nalgene
<b>Sonikator</b>	Vibracell	Sonics
<b>Sonikatorbad</b>	Transonic 460/H	Elma
<b>Spektrofotometer</b>	WPA CO8000 Cell Density Meter AG Biophotometer	Biochrom  Eppendorf
<b>Sprøytefilter</b>	Filtropur 0,20 µm Duapore Membrane 0.45 µm	Sarstedt Millipore
<b>Sprøyter</b>	1 mL 2,5 mL 5 mL 10 mL 20 mL 50 mL	BD-Plastipak
<b>Tannpirkere</b>		
<b>Sterilskap</b>	AV-100	TelStar
<b>Teflonfilter</b>	FH 0,5 µM	Millipore
<b>Termomikser</b>	Comfort	Eppendorf
<b>Uvette</b>	1x1 cm	Eppendorf
<b>Vakuumpumpe</b>		GAST
<b>Vannbad</b>	Eco Temp TW12 Typ 1004	Julabo GFL
<b>Varmebløkk</b>		Stuart Scientific
<b>Veieskip</b>		VWR

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Vekt</b>	LC621P	Sartorius Basic
<b>Vortex</b>	Vortex-2 Genie	Scientific Industries

## 2.2 Programvarer til analyse

Programområde	Bruksområde	Leverandør
<b>Chromelon</b>	HPLC	Chromeleon
<b>Chromatography Studio</b>	GC	
<b>ExPASy ProtParam tool</b>	Kalkulering av $\epsilon$	ExPASy
<b>Geldoc EZ imager</b>	Gelvisualisering	Bio-Rad
<b>LP Data view</b>	LP-kromatografisystem	Bio-Rad
<b>Origin 7.0</b>	Databehandling	MicroCal

## 2.3 Kjemikalier

Kjemikalie		Leverandør
<b>1,2 -dikloreten</b>	$C_2H_4Cl_2$	Sigma-Aldrich
<b>5-aminolevulinsyre</b>	$C_5H_9NO_3$	Sigma-Aldrich
<b><math>\alpha</math>-D-Glukose</b>	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich
<b>Agar agar</b>		Merck Millipore
<b>Ammoniakk</b>	$NH_3$	Sigma-Aldrich
<b>Ammoniumsulfat</b>	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Ampicillin natriumsalt</b>	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Sigma-Aldrich
<b>Bio-Rad Protein Assay Fargereagens</b>		Bio-Rad
<b>Coomassie® Brilliant Blue R-250</b>		Bio-Rad
<b>D- (+)-Cellobiose</b>	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma-Aldrich

Kjemikalie		Leverandør
<b>Destillert vann, dH2O (Milli-Q kvalitet)</b>		Merck Millipore
<b>Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Eddiksyre</b>	CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich
<b>Etanol</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	VWR
<b>Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)</b>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Formsyre</b>	HCOOH	Sigma-Aldrich
<b>Fosforsyre</b>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Gjærekstrakt</b>		Merck Millipore
<b>Glyserol</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	VWR
<b>Hydrogenklorid</b>	HCl	Sigma-Aldrich
<b>Hydrogenperoksid</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Isopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG)</b>		Sigma-Aldrich
<b>Kitinkuler</b>	I 20 % EtOH	BioLabs
<b>Kobbersulfat</b>	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>L-arabinose</b>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich
<b>L-askorbinsyre</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Magnesiumklorid</b>	MgCl <sub>2</sub>	VWR
<b>Mangansulfat</b>	MnSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Natriumacetat trihydrat</b>	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Natriumdihydrogenfosfat monohydrat</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Natriumhydroksid</b>	NaOH	VWR
<b>Natriumklorid</b>	NaCl	Sigma-Aldrich
<b>Nitrogengass</b>	N <sub>2</sub>	AGA
<b>NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mmx 10 brønner</b>		Life Technologies
<b>NuPAGE® Prøvebuffer (4x)</b>		Life Technologies
<b>NuPAGE® Reduserende agent (10x)</b>		Life Technologies
<b>Protease inhibitor cocktail tablets</b>		Sigma-Aldrich

Kjemikalie		Leverandør
<b>Streptomycinsulfat</b>	$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ * 1.5 $H_2SO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Svovelsyre</b>	$H_2SO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Trizma base</b>	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
<b>Trypton</b>		Merck Millipore
<b>Veratrylalkohol</b>	$C_9H_{12}O_3$	Sigma-Aldrich

## 2.4 Kit

Kit	Innhold	Leverandør
<b>E.N.Z.A. ® Plasmid Mini Kit I</b>	<p><b>Løsning I</b> (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A)</p> <p><b>Løsning II</b> (200 mM NaOH, 1% SDS)</p> <p><b>Løsning III</b> (4,2 M Guanidine-HCl, 0,9 M kaliumacetat pH 4,8)</p> <p><b>Ekvibreringsbuffer</b> (3 M NaOH)</p> <p><b>HBC Buffer</b> (5 M Guanidine-HCl, 30% isopropanol)</p> <p><b>DNA vaskebuffer</b> (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% etanol)</p> <p><b>Elueringsbuffer</b> (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)</p> <p><b>HiBind™ DNA minikolonner</b></p> <p><b>Oppsamlingsrør</b> (2 mL)</p>	Omega BIO-TEK
<b>Qubit® dsDNA BR Assay Kit</b>	<p><b>Qubit® dsDNA BR reagent</b> (Dimetyl sulfoksid, x200)</p> <p><b>Qubit® dsDNA BR Buffer</b> (Tris-EDTA, buffer)</p> <p><b>Qubit rør</b></p>	Life Technologies

## 2.5 Enzymer/proteiner, substrater og bakteriestammer

### 2.5.1 Enzymer/proteiner

Enzym/protein	Spesifikasjon	Leverandør
<b>BenchMark™ Protein Ladder</b>		Life Technologies
<b>CBP21 (<i>Sm</i>LPMO10A)</b>	Fra <i>Serratia marcescens</i>	Selvrenset, frysestock fra Anne Grethe Hamre
<b>Celluclast® 1.5 L</b>	CCN03115	Novozymes
<b>Dye decolorizing peroxidase</b>	<i>Tf</i> DyP	GenScript
	kodonoptimalisert <i>Tf</i> DyP (med His-tag)	Gecco
<b>Katalase</b>	<i>Tf</i> Kat,	GenScript
	kodonoptimalisert + ikke-kodonoptimalisert <i>Tf</i> Kat (med His-tag)	Gecco
<b>Laccase</b>	Fra <i>Trametes versicolor</i>	Sigma-Aldrich
<b>Ligninperoksidase (LiP)</b>	Fra <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sigma-Aldrich
<b>LPMO-E7</b>	<i>Tf</i> LMPO-E7,	GenScript
	kodonoptimalisert <i>Tf</i> LPMO-E7	Frysestock fra Zarah Forsberg
	<i>Tf</i> LPMO-E7	Plasmid fra Zarah Forsberg
<b>Lysozym</b>		Sigma-Aldrich
<b>Manganavhengig peroksidase (MnP)</b>	Fra <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sigma-Aldrich
<b>β-glukosidase</b>	DCN00208	Novozymes

## 2.5.2 Substrater

Bakteriestamme	Spesifikasjon	Leverandør
<b>Avicel® PH-101, cellulose mikrokrySTALLINSK</b>		Sigma-Aldrich
<b>DampeksploDert bjørk</b>	220 °C, 10 min	Tillaget av tidligere postdoktor Dayanand Kalyani
<b>Phosphoric acid swollen cellulose (PASC)</b>	12 g/L	Tillaget av postdoktor Bastien Bissaro

## 2.5.3 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Spesifikasjon	Leverandør
<b><i>Escherichia coli</i> One Shot® BL21 Star™ (DE3)</b>	Kjemisk kompetente celler til proteinekspresjon	Life Technologies
<b><i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10</b>	Celler med høy transformasjonseffektivitet	Life Technologies

## 2.6 Medier, løsninger og buffere

### 2.6.1 Ferdiglagde medier

Medium	Innhold	Leverandør
<b>SOC medium</b>	2 % tryptone 0,5 % gjærekstrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM glukose	Life Technologies



### 2.6.2 Selvlagde medier

Medium	Innhold
<b>LB-medium</b>	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L. Autoklaveres.
<b>LB-medium med agar agar</b>	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g NaCl 15 g agar agar Løses i dH <sub>2</sub> O til et sluttvolum på 1 L. Autoklaveres. Fordeles i petriskåler etter autoklaving.
<b>TB medium</b>	12 g trypton 24 g gjærekstrakt 5 mL glycerol Løses i dH <sub>2</sub> O til et totalvolum på 900 mL. Autoklaveres Før bruk tilsettes 100 mL saltløsning, pH 7,4.

### 2.6.3 Løsninger

Løsning	Leverandør
<b>NuPAGE® MOPS SDS Running buffer (20x)</b>	Life Technologies
<b>NuPAGE® MES Running buffer (20x)</b>	Life technologies

## 2.6.4 Selvlagde løsninger og buffere

Buffer/løsning	Innhold
<b>10 % Streptomycinsulfat (w/v)</b>	1 g streptomycinsulfat løses i 10 mL dH <sub>2</sub> O pH justeres til pH 7,0 med 2,5 % NH <sub>3</sub> .
<b>1x PBS</b>	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> løses i 800 mL dH <sub>2</sub> O, pH-justeres til pH 7,40, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 1 L.
<b>3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	99,11 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> løses i 250 mL dH <sub>2</sub> O.
<b>Ammoniakk 2,5 %</b>	25 % NH <sub>3</sub> fortynnes 10 ganger i dH <sub>2</sub> O.
<b>Ammoniumacetat 5 mM pH 5.8</b>	0,19 g ammoniumacetat løses i ca. 450 mL dH <sub>2</sub> O, sterilfiltreres. pH-justeres til pH 5,8, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 500 mL.
<b>Ammoniumacetat 5 mM pH 5.0</b>	0,19 g ammoniumacetat løses i 450 mL dH <sub>2</sub> O, sterilfiltreres. pH-justeres til pH 5,0, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 500 mL.
<b>Ammoniumformat 5 mM pH 3.0</b>	0,16 g ammoniumformat løses i ca. 450 mL dH <sub>2</sub> O, sterilfiltreres. pH-justeres til pH 3,0, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 500 mL.
<b>Ammoniumformat 5 mM pH 4.5</b>	0,16 g ammoniumformat løses i 450 mL dH <sub>2</sub> O, sterilfiltreres. pH-justeres til pH 4,5, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 500 mL.
<b>Ampicillin 100 mg/mL</b>	1 g ampicillin løses i 10 mL dH <sub>2</sub> O, filtreres med 0,2 µm sprøytefilter.

Buffer/løsning	Innhold
<b>Arbeidsløsning SDS-PAGE</b>	1 mL NuPAGE® prøvebuffer (4x) 400 µL NuPAGE® reduserende agent (10x), tilsettes 600 µL dH <sub>2</sub> O, vortexes.
<b>Avfargingsløsning SDS-PAGE</b>	100 mL etanol 75 mL eddiksyre fortynnes til 1 L i dH <sub>2</sub> O.
<b>Buffer A Phenyl HP/Buffer A affinitetskromatografi</b>	1 L 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tilsettes 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH-justeres til pH 8,0.
<b>Buffer A Q HP/Buffer B Phenyl HP</b>	1 M Tris-HCl pH 8,0 fortynnes 20 ganger i dH <sub>2</sub> O. Dette gir 50 mM Tris-HCl pH 8,0.
<b>Buffer B Q HP</b>	1 L 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tilsettes 1 M NaCl, pH justeres til pH 8,0.
<b>Buffer HiLoad Superdex</b>	1 M Tris-HCl pH 8,0 fortynnes 50 ganger i dH <sub>2</sub> O. Dette gir 20 mM Tris-HCl pH 8,0. 1 L av denne tilsettes 0,2 M NaCl og pH-justeres til pH 8,0.
<b>Eddiksyre 0.2 M</b>	11,55 mL konsentrert eddiksyre fortynnes i dH <sub>2</sub> O til 1 L.
<b>Fargeløsning SDS-PAGE</b>	0,5 g comassie blue 200 mL etanol 50 mL eddiksyre fortynnes til 0,5 L i dH <sub>2</sub> O.
<b>IPTG 1 M</b>	2,38 g IPTG fortynnes til 10 mL i dH <sub>2</sub> O.
<b>Kaliumfosfatbuffer pH 8,0, 0.5M NaCl</b>	47 mL 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 mL 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 1 L. pH-justeres til pH 8,0.

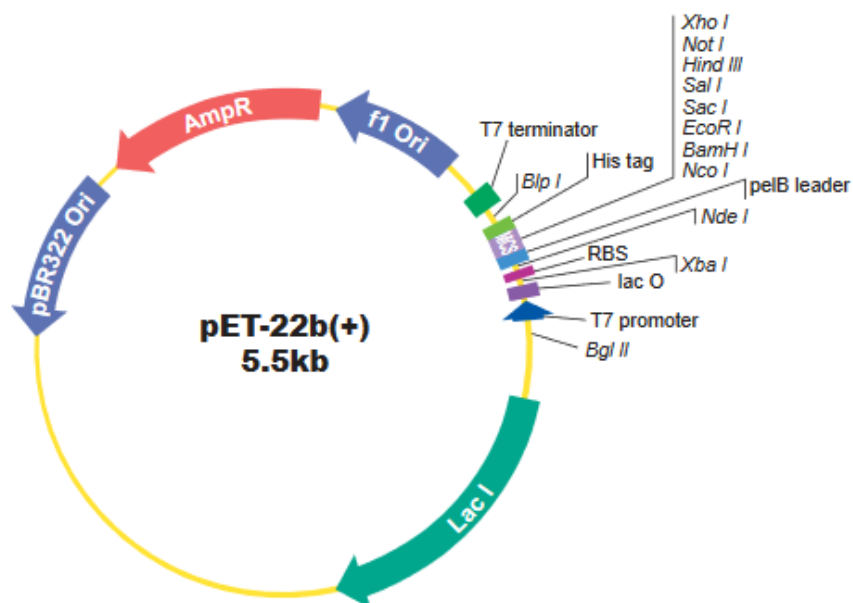
Buffer/løsning	Innhold
<b>Lysisbuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 8,0 0,3 mg/mL lysozym 1 mM EDTA 1 tablett proteasehemmer dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 60 mL.
<b>Natriumacetat 0.2 M</b>	27,2 g natriumacetat (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O) løses i dH <sub>2</sub> O til 1 L.
<b>Natriumacetatbuffer 0.1 M pH 5.0</b>	148 mL 0,2 M eddiksyre 352 mL 0,2 M natriumacetat fortynnes til 1 L i dH <sub>2</sub> O.
<b>Running buffer SDS-PAGE (1x MES)</b>	20x MES fortynnes i dH <sub>2</sub> O til ønsket konsentrasjon.
<b>Running buffer SDS-PAGE (1x MOPS)</b>	20x MOPS fortynnes i dH <sub>2</sub> O til ønsket konsentrasjon.
<b>Saltløsning pH 7,4</b>	22 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 94 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 1 L. Autoklaveres.
<b>Spheroplastbuffer</b>	10 mL Tris-HCl pH 8.0 1M 17,1 g sukrose 100 µL 0,5 M EDTA pH 8,0 1 tablett proteasehemmer dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 100 mL.
<b>Tris-HCl 1M pH 8.0</b>	121,14 g trizma base løses i ca 800 mL dH <sub>2</sub> O, pH justeres til pH 8,0, dH <sub>2</sub> O tilsettes til et totalvolum på 1 L. Autoklaveres.

### 3. Metode

#### 3.1 Kloning

Gene som kodet for *TfDyP* (Uniprot ID: Q47KB1), *TfKat* (Q47PD5) og *TfLPMO-E7* (Uniprot ID: Q47QG3) ble kodonoptimalisert og klonet inn i en pET-22b(+) vektor av Genscript (<http://www.genscript.com>). Aminosyre- og nukleotidsekvensene til de respektive enzymene kan finnes i vedlegg 7.1-7.6. Dersom enzymene hadde signalpeptid ble dette fjernet, i tillegg ble genskvensene deres kodonoptimalisert for *Escherichia coli*. Grunnen til at dette ble gjort er at det vil øke sannsynligheten for at enzymene uttrykkes i cytoplasma. For *TfKat* ble også en ikke-kodonoptimalisert utgave av konstruktet bestilt.

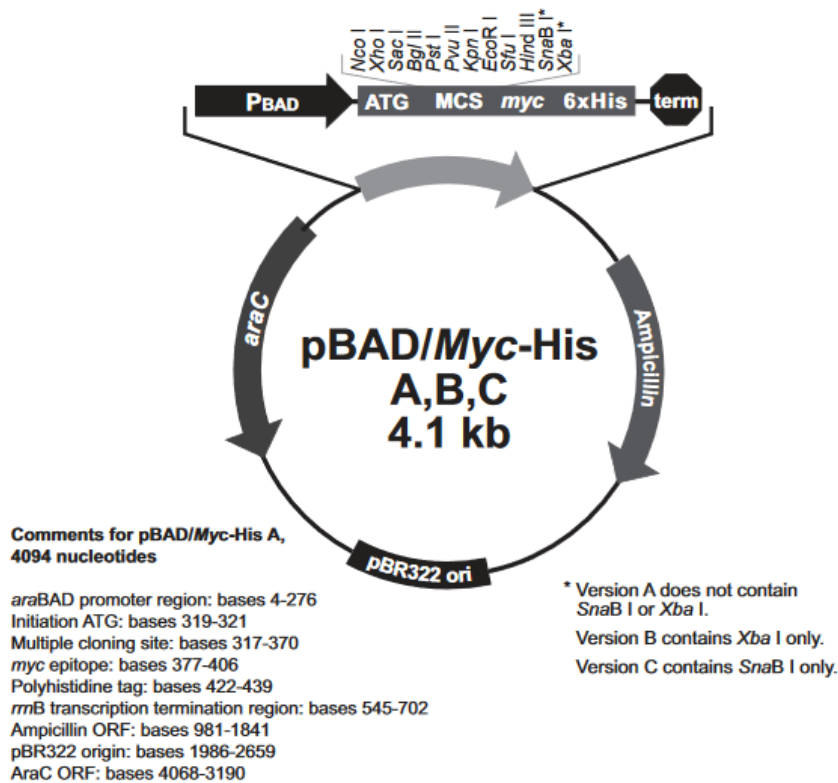
Vektorkartet til vektoren pET22b(+) er vist i figur 3.1.1. I denne vektoren, nærmere bestemt i det multiple kloningssetet mellom NdeI og HindIII, ble genene til de ulike enzymene satt inn.



Figur 3.1.1. Vektorkart for pET22b(+). Figuren er hentet fra GeneScript (2016).

I tillegg til disse genkonstruktene, ble det senere bestilt ferdig rensede plasmider av *TfDyP* og *TfKat* fra firmaet Gecco. Disse skilte seg fra konstruktene fra Genscript ved at de hadde en annen vektor, pBAD/Myc-His A, og ved at de hadde en C-terminal His-tag med 6 histidiner

(Invitrogen 2010). En His-tag (også kalt polyhistidin tag) er et aminosyremotiv som vanligvis består av 6-14 histidinresiduer plassert på enten N-terminal eller C-terminal ende for å gjøre det enklere å rense proteinet (Roche 2013). Vektoren er vist i figur 3.1.2.



Figur 3.1.2 Oversikt over egenskapene til pBAD/Myc-His vektoren. Figuren er hentet fra Invitrogen (2010).

Konstruktene fra Gecco vil heretter bli referert til som *TfDyP* (med His-tag) og *TfKat* (med His-tag), mens konstruktene fra Genscript vil refereres til som *TfDyP*, *TfKat* og *TfLPMO-E7*.

### 3.1.1 Transformering av konstrukter

Genkonstruktene ble transformert inn i celler egnet for overekspressjon av proteiner. Det ble benyttet kjemisk kompetente *E. coli* celler, One Shot® BL21 Star™ (DE3), levert av Life Technologies. Cellene er bærere av *rne131*, et mutert *rne*-gen som koder for et RNase E enzym som mangler evnen til å degradere RNA, noe som fører til høyere mRNA-stabilitet. De to proteasene *lon* og *OmpT* er ikke tilstede i denne celledammen, og dette reduserer degradering av heterogene proteiner uttrykt i cellene (Life Technologies 2010).

For enzymene fra Gecco ble også transformering inn i One Shot® TOP10 celler, levert av Life Technologies, utført. Disse cellene har høy transformasjonseffektivitet og er godt egnet til å ta opp fremmed DNA. Cellene er bærere av *recA1*, som reduserer antall tilfeller av ikke-spesifikk rekombinasjon i klonet DNA (Life Technologies 2013).

Begge vektorene inneholder genet AmpR, som gir ampicillinresistens, og dette ble brukt som en seleksjonsmarkør for å kunne identifisere vellykkede transformanter.

#### Materialer:

- LB-agarplater med ampicillin 100 µg/mL
- One Shot® BL21 Star™ (DE3) kjemisk kompetente *E. coli* celler/ One Shot® TOP10 kjemisk kompetente *E. coli* celler
- Plasmid DNA fra GenScript: *TfDyP*, *TfKat* og *TfLPMO-E7*
- Plasmid DNA fra Gecco: *TfDyP* (med His-tag) og *TfKat* (med His-tag)
- SOC-medium

#### Metode:

De kjemisk kompetente One Shot® BL21 Star™ (DE3)/One Shot® TOP10 cellene ble tint på is. Imens ble konstruktene løst i autoklavert dH<sub>2</sub>O. Cellene ble tilsatt 5-10 ng plasmid før de ble inkubert på is i 30 minutter. Videre ble reaksjonene varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder før de ble inkubert på is i 2 minutter. Til slutt ble det tilsatt 250 µL forvarmet SOC-medium (42 °C) til hver reaksjon., og rørene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm i 1 time. Etter endt inkubasjon ble 25 og 100 µL cellekultur platet ut på LB-agarplater med 100 µg/mL ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

### 3.1.2 Dyrking av transformanter

Transformantene ble dyrket over natt i flytende LB-medium. Ampicillin ble tilsatt mediet for å hindre vekst av uønskede bakterier.

Materialer:

- Ampicillin 100 mg/mL
- LB-agarplater med transformanter (jf. avsnitt 3.1.1)
- LB-medium

Metode:

I sterilskap ble 4 mL LB-medium og 2  $\mu$ L 100 mg/mL ampicillin overført til sterile reagensrør. Enkeltkolonier ble inokulert i mediet ved at de ble plukket fra platene med en steril tannpirker. Cellekulturene ble deretter inkubert over natt ved 200 rpm og 37 °C.

### 3.1.3 Tillaging av frysestocker

Det ble laget frysestocker av noen av cellekulturene fra avsnitt 3.1.2. Dette gjør langtidsoppbevaring ved -80 °C mulig.

Materialer:

- Cellekultur (jf. avsnitt 3.1.2)
- Glyserol 87 %

Metode:

525  $\mu$ L cellekultur ble blandet med 225  $\mu$ L autoklavert glyserol i et kryorør. Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.



## 3.2 Uttrykking av enzymene fra *Thermobifida fusca*

Vektoren pET22b(+) med gener som kodet for de ulike enzymene var blitt transformert inn i kjemisk kompetente One Shot<sup>®</sup> BL21 Star<sup>™</sup> (DE3) celler fra *E. coli* (jf. avsnitt 3.1.1). pET22b(+) har et T7-basert ekspresjonssystem med en T7 lac promotor. Nedstrøms for T7 lac promotoren ligger en lac operator (*lacO*), mens det oppstrøms ligger en lac inhibitor (*lacI*), som er en repressor (jf. figur 3.1.1). Dette ekspresjonssystemet avhenger av laktose. Dersom laktose ikke er tilstede er lac repressoren *lacI* bundet til *lacO*-sekvensen i T7 lac promotoren. Dette hindrer transkripsjon av det ønskede genet ved at T7 RNA-polymerase ikke får bundet seg til promotoren. De kjemisk kompetente One Shot<sup>®</sup> BL21 Star<sup>™</sup> (DE3) cellene fra *E. coli* har et DE3 lysogen, der genet for T7 RNA-polymerase er under kontroll av en *lacUV5* promotor. Dersom laktose ikke er tilstede, hindrer *lacI* også transkripsjonen av dette genet. Ved induksjon med IPTG løsner *lacI* fra både operatoren og promotoren og sørger for at transkripsjon av T7 RNA-polymerase begynner. Deretter kan RNA-polymerasen transkribere det ønskede genet i pET22b(+)-vektoren. I motsetning til laktose, vil IPTG ikke kunne brytes ned av  $\beta$ -galaktosidase, og konsentrasjonen vil derfor holde seg konstant etter induksjon (Hansen et al. 1998; Life Technologies 2010).

### 3.2.1 Induksjonstest for enzymer fra Genscript

Induksjonstesten utføres for å undersøke om bakteriekulturene gir overuttrykk av det ønskede proteinet ved induksjon med IPTG.

Materialer:

- Ampicillin 100 mg/mL
- Cellekultur av transformanter (jf. avsnitt 3.1.2)
- IPTG 1M
- LB-medium
- TB-medium tilsatt saltløsning pH 7,4

Metode:

Sterile reagensrør ble tilført 1 mL TB- eller LB-medium, samt 1  $\mu$ L 100 mg/mL ampicillin. I mediet ble det inokulert 1 mL av ønsket cellekultur. Deretter ble reagensrørene inkubert ved 200 rpm og 30 °C i 2,5 time. Etter endt inkubering ble rørene avkjølt til romtemperatur (RT) og tilsatt IPTG til sluttkonsentrasjon 0,5 mM, før videre inkubering ved 200 rpm og 25 °C over natt. Til slutt ble 100  $\mu$ L fra hvert reagensrør overført til hvert sitt eppendorfrør og spunnet ned ved 4722 x g i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet, og pelleten ble oppbevart på is.

### 3.2.2 Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

Hensikten med å bruke SDS-PAGE er å separere proteinene i en løsning etter størrelse. Slik kan størrelsen til de ulike proteinene i løsningen, samt løsningsrensing undersøkes. Før den aktuelle proteinløsningen settes på gelen, må den denatureres. Prøvene blir tilsatt natriumdodecylsulfat (SDS) og dithiothreitol (DTT), og varmebehandles deretter ved 70-100 °C. SDS er en negativt ladet, kraftig detergent som binder til proteinets hydrofobe domener og ødelegger de to- og tredimensjonale strukturene. DTT er en sterk reduktant som tilsettes for å redusere disulfidbindinger mellom cysteinresiduer. Tilsetning av SDS og DTT sørger for at proteinet foldes ut, og proteiner av lik størrelse vil nå ha lik form og ladning fordi de alle har bundet like mye SDS. Varmen gjør at denatureringen skjer raskere ved å gi høyere molekylhastighet (Alberts et al. 2015; Caprette 1996).

Løsningen appliseres deretter på gelen, og kobles til et elektrisk felt. På grunn av SDS beveger de nå negativt ladde molekylene seg mot den positive polen i det elektriske feltet. Gelen er en polyakrylamidgel, og nettverket av porer i ulik størrelse vil sørge for at store molekyler ikke diffunderer like raskt gjennom gelen som mindre molekyler. Slik blir proteinene i løsningen separert i klare bånd etter størrelse (Alberts et al. 2015).

For å kunne bedømme størrelsen på proteinene må det påsettes en størrelsesmarkør, også kalt ladder, som består av varierende mengde av proteiner med kjente størrelser (Thermofisher 2014). Fargestoffet Comassie Brilliant Blue brukes til å visualisere proteinene på gelen. Det er et trifenylmetan-molekyl med to svovelatomer som binder til de basiske aminosyrene i proteinet. Mengden fargestoff som binder er proporsjonal med mengden protein. Da

fargestoffet har lavere affinitet for polyakrylamidgelen enn proteinene, kan gelen avfarges slik at bakgrunnen blir transparent og proteinene godt synlige (ThermoFisher u.å.).

Materialer:

- Arbeidsløsning
- BenchMark Protein Ladder
- Cellepellet (jf. avsnitt 3.2.1)
- dH<sub>2</sub>O
- MOPS SDS running buffer (1x)/MES SDS running buffer (1x)\*
- NuPAGE<sup>®</sup> 10% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- SDS-avfargingsløsning
- SDS-fargeløsning

\*Bruken av MOPS vs. MES running buffer ble bestemt av størrelsen på enzymet. Dersom enzymets størrelse var mindre enn 30 kDa ble MES buffer benyttet.

Metode:

Hver cellepellet ble resuspendert i 100 µL arbeidsløsning. Prøvene ble inkubert ved 70 °C i 10 minutter for å denaturere proteinene. Deretter ble de vortexet og spunnet ned ved 16 100 x g i 15 minutter. Ferdigstøpte NuPAGE<sup>®</sup> 10 % Bis-Tris geler ble montert i et gelelektroforesekammer, og kammeret ble fylt med valgt buffer. Det ble applisert 7,5 µL ladder i første brønn og deretter 20 µL denaturert prøve i de øvrige brønnene. Gelelektroforesekaret ble koblet til strøm, og gelen ble påført en spenning på 200 V i 50 minutter. Deretter ble gelen tatt ut av kammeret og tilsatt ca. 1 dL fargeløsning. Gel med fargeløsning ble varmet i mikrobølgeovn i 60 sekunder, før den ble inkubert på ristebrett i 5 minutter. Fargeløsningen ble helt av og ca. 1 dL avfargingsløsning tilsatt. Deretter ble gel med avfargingsløsning varmet i mikrobølgeovn i 60 sekunder, før den ble inkubert på ristebrett i 5-10 minutter. Avfargingstrinnet ble gjentatt til gelen viste klare proteinbånd. Til slutt ble gelen avbildet med en EZ-imager fra Bio-Rad.

### 3.2.3 Spesifikk induksjonstest av enzymer fra Genscript

Det ble utført en ny induksjonstest med transformantene fra avsnitt 3.1.1 for å finne de optimale betingelsene for storskala dyrking. Betingelsene som ble undersøkt var IPTG-konsentrasjon og temperatur for uttrykk. Dyrkning av transformantene ble utført som beskrevet i 3.1.2.

For enzymet *TfKat* ble også heme-induceren 5-aminolevulinsyre tilsatt under induksjonstesten. Grunnen til dette er at *TfKat* som enzym er avhengig av en heme-kofaktor. Å indusere med denne kofaktoren bidrar til å aktivere enzymet. 5-aminolevulinsyre ble valgt som heme-inducer da denne tidligere har blitt brukt ved uttrykk og rensing av *TfKat* (med His-tag) (Lončar & Fraaije 2015).

Materialer:

- 5-aminolevulinsyre 1M\*
- Ampicillin 100 mg/mL
- Cellekultur av transformanter (jf. avsnitt 3.1.2)
- IPTG 1M
- TB-medium tilsatt saltløsning pH 7,4

\*Heme-induceren ble kun tilsatt *TfKat*.

Metode:

Sterile reagensrør ble tilført 1 mL TB-medium samt 1  $\mu$ L 100 mg/mL ampicillin. I mediet ble det inokulert 1 mL av ønsket cellekultur. Det var totalt 16 rør. Deretter ble reagensrørene inkubert ved 200 rpm og 30 °C i 2,5 time. Etter endt inkubering ble rørene avkjølt til RT på isbad og tilsatt IPTG til fire ulike konsentrasjoner, før videre inkubering ved 200 rpm og fire ulike temperaturer over natt. Reagensrørene med *TfKat* ble i tillegg tilsatt 5-aminolevulinsyre til en konsentrasjon på 0.5 mM. De ulike temperaturene og IPTG-konsentrasjonene som ble testet er vist i tabell 3.2.1. Etter endt inkubering ble 100  $\mu$ L fra hvert av rørene spunnet ned ved 4722 x g i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten oppbevart på is. SDS-PAGE ble utført på pelleten som beskrevet i avsnitt 3.2.2 for å kunne identifisere betingelsene som ga størst overuttrykk av proteinet.

Tabell 3.2.1 Oversikt over prøvene tillaget under den spesifikke induksjonstesten av enzymer fra Genscript.

Prøvenummer	IPTG (mM)	Temperatur (°C)
1	-	18
2	-	25
3	-	30
4	-	37
5	0,2	18
6	0,2	25
7	0,2	30
8	0,2	37
9	0,5	18
10	0,5	25
11	0,5	30
12	0,5	37
13	1,0	18
14	1,0	25
15	1,0	30
16	1,0	37

#### 3.2.4 Overekspresjon av *TfDyP* og *TfLPMO-E7*

Dyrkning av transformantene som viste overuttrykk av det ønskede proteinet ble utført i dyrkningskolber. Enzymene hadde ulike betingelser som var optimale for overekspresjon. Disse er vist i tabell 3.2.2.

Tabell 3.2.2 Oversikt over optimale betingelser for overekspresjon av *TfDyP* og *TfLPMO-E7*.

Enzym	<i>TfDyP</i>	<i>TfLPMO-E7</i>
<b>Temperatur (°C)</b>	18	18
<b>IPTG (mM)</b>	0,5	-
<b>Andre betingelser</b>	-	Dagsferske transformanter

Materialer:

- Ampicillin 100 mg/mL
- IPTG 1M
- LB-agarplater med transformanter
- LB-medium
- TB-medium tilsatt saltløsning pH 7,4

Metode:

Det ble tilført 50 mL flytende LB-medium og 50  $\mu$ L ampicillin (100 mg/mL) til en 250 ml dyrkningskolbe. Deretter ble enkeltkolonier inokulert i mediet ved at de ble plukket fra platene med transformanter ved hjelp av en steril tannpirker. Cellekulturene ble inkubert over natt ved 200 rpm og 37 °C.

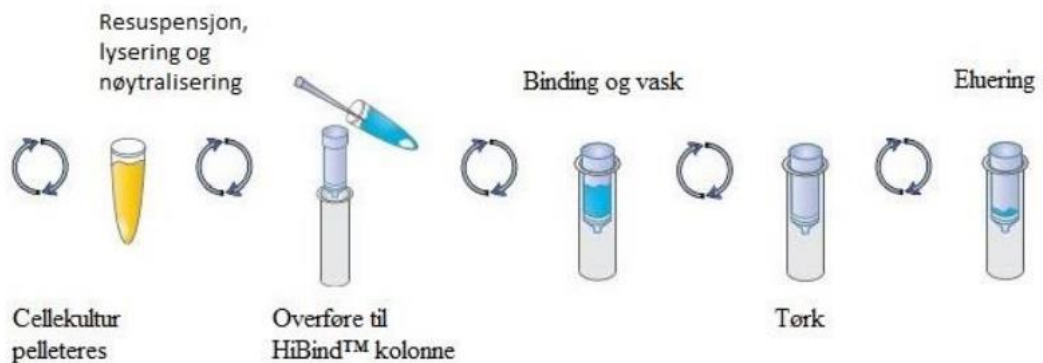
Cellekulturen ble deretter inokulert i 1 L TB-medium tilsatt 1 mL ampicillin (100 mg/mL) i en 2 L dyrkningskolbe. Deretter ble absorbans (OD) målt med et bordspektrofotometer. Rent TB-medium ble brukt som blank. Cellekulturene ble videre inkubert ved 30 °C og 200 rpm til OD<sub>600</sub> var 0,6-0,8. Deretter fulgte induksjon med IPTG til optimal sluttkonsentrasjon og inkubering over natt ved 200 rpm og optimal temperatur (jf. tabell 3.2.2). Cellene ble høstet ved sentrifugering i 20 minutter ved 11 325 x g og 4 °C. Cellepellettene ble oppbevaret ved -20 °C frem til videre opparbeiding.

### 3.2.5 Overekspresjon av *Tf*LPMO-E7 fra frysestock – isolering av plasmid til sekvensering

Parallellt med forsøket på å uttrykke *Tf*LPMO-E7 i Pet22b(+)-vektoren, ble det forsøkt å uttrykke enzymet fra en frysestock tillaget av Postdoktor Zarah Forsberg i 2011. For denne varianten var det benyttet en pRSETB-vektor. Konstruktene var transformert inn i TOP10-celler. Disse cellene ble dyrket opp som beskrevet i avsnitt 3.1.2.

Etter dyrking over natt ble plasmid fra bakteriekulturen isolert ved bruk av E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I. Kitet fungerer ved at cellene først blir alkalisk lysert før DNA bindes spesifikt til en HiBind<sup>®</sup> DNA kolonnematriks. Proteiner, andre cellekomponenter og forurensinger vil ikke binde til kolonnematerialet og vil dermed vaskes ut av kolonnen. Bindingen av DNA til

HiBind® kolonnen er reversibel, og ved bruk av deionisert vann eller en buffer med lav saltkonsentrasjon kan bundet DNA elueres ut (VWR 2016). En oversikt over isoleringsprosessen er vist i figur 3.2.1.



Figur 3.2.1 Illustrasjon av Isolering av plasmid med E.N.Z.A.® Plasmid Mini Kit I. Figuren er hentet fra VWR (2016).

#### Materialer:

- Cellekultur
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I
- NaOH 3M

#### Metode:

Det ble overført 1.5 mL cellekultur til et eppendorfrør, og pelleten ble høstet ved sentrifugering ved 10 000 x g i 1 minutt ved RT. Mediet ble helt av før pelleten ble resuspendert i 250 µL løsning I (tilsatt RNase A) og blandet ved bruk av vortex til det ikke var synlige celleklumper tilstede i løsningen. Deretter ble det tilsatt 250 µL løsning II, og røret ble vendt forsiktig noen ganger til et klart lysat ble dannet. Videre ble det tilsatt 350 µL løsning III før røret umiddelbart ble snudd opp ned og det ble dannet en hvit utfelling. Løsningen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter. Samtidig ble en HiBind® miniprep-kolonne ekvilibrert ved å tilføre 100 µL 3M NaOH for deretter å sentrifugere den i 1 minutt ved 13 000 x g. Den klare supernatanten ble overført til den ferdig ekvilibrerte kolonnen, etterfulgt av sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Oppsamlingsrøret ble tømt før tilsetning av 500 µL HBC buffer for å vaske kolonnen ved sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g. Oppsamlingsrøret ble igjen tømt, og 700 µL DNA vaskebuffer (fortynnet i EtOH) ble tilsatt kolonnen før sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 xg.

Deretter ble den tomme kolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å tørke kolonnematriksen og fjerne rester av etanol. Oppsamlingsrøret ble kastet, kolonnen ble satt i et rent eppendorfrør, og 30 µL elueringsbuffer ble tilsatt. Til slutt ble kolonnen sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g for å eluere ut DNAet. Det rensede plasmidet ble oppbevart ved – 20 °C.

### 3.2.6 Overekspresjon av *Tf*LPMO-E7 fra frysestock - Bestemmelse av DNA-konsentrasjon ved bruk av Qubit® fluorometer

For videre bruk var det nødvendig å vite konsentrasjonen til det rensede plasmidet. Denne ble bestemt ved bruk av Qubit® dsDNA BR Assay Kit og et Qubit® Fluorometer. Metoden er selektiv for dobbelttrådet DNA og kan brukes til å bestemme DNA-konsentrasjoner fra 100 pg/µL til 1000 ng/µL. Forurensinger som salter, nukleotider og frie proteiner har ikke stor innvirkning på analyseresultatet (Life Technologies 2015).

Materialer:

- Isolert plasmid
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit

Metode:

Det ble laget en arbeidsløsning med  $n \times 1 \mu\text{L}$  BR-reagent og  $n \times 199 \mu\text{L}$  BR-buffer der  $n$  er antall prøver. Videre ble  $2 \mu\text{L}$  isolert plasmid og  $198 \mu\text{L}$  arbeidsløsning blandet i et Qubit® analyserør. Prøvene ble vortexet og inkubert ved RT i 2 minutter, før konsentrasjonene ble avlest med et Qubit® fluorometer utfra en tidligere tillaget standardkurve. Det ble analysert tre paralleller av hver prøve.



### 3.2.7 Overekspresjon av *TfLPMO-E7* fra frysestock – Sekvensering av isolert plasmid

Det isolerte plasmidet ble sendt til sekvensering ved GATC Biotech (Konstanz, Tyskland) for å kontrollere at at genssekvensen var intakt. Under sekvenseringen blir nukleotidsekvensen funnet. Den sammenlignes med riktig sekvens for *TfLPMO-E7* ved hjelp av *CLC DNA Workbench*.

Materialer:

- Isolert plasmid (jf. avsnitt 3.2.5)
- Sekvenseringsprimere til pRSETB 5 pmol/ $\mu$ L

Metode:

Til et eppendorfrør ble det tilsatt 2,5  $\mu$ L standard sekvenseringsprimer for pRSETB-vektor, 400-500 ng isolert plasmid og dH<sub>2</sub>O til et totalvolum på 11  $\mu$ L. For hver prøve ble det tillaget to ulike sekvenseringsreaksjoner, én for 5'-3' og en for 3'-5' retning av DNA. Prøvene ble merket og sendt til GATC Biotech for sekvensering.

### 3.2.8 Overekspresjon av *TfLPMO-E7* fra frysestock – Transformering inn i BL21 celler

Transformering av plasmid-DNA fra avsnitt 3.2.5 inn i BL21-celler ble utført ved bruk av metoden beskrevet i avsnitt 3.1.1. I tillegg ble fryst plasmid-DNA, tillaget i 2011, transformert inn i BL21-celler ved bruk av denne metoden.

### 3.2.9 Overekspresjon av *TfDyP* (med His-tag)

pBAD/Myc-His A-vektoren inneholder araBAD operon og det regulatoriske genet araC, som kontrollerer uttrykk av operonet (Invitrogen 2010). Operonet inneholder de strukturelle genene araB, araA og araD, som sammen koder for de tre enzymene AraA (Ribulokinase), AraB (Isomerase) og AraD (Epimerase). Disse er nødvendige for nedbrytningen av femkarbonsukkeret L-arabinose. De tre enzymene katalyserer omdanningen av L-arabinose til D-xylulose-5-fosfat, som er et intermediat i pentosefosfatveien (Schleif 2000).

De strukturelle genene i araBAD operonet transkriberes fra en felles promoter (pBAD), som reguleres av araC. araC produserer det regulatoriske proteinet AraC, som kan kontrollere transkripsjonen av de tre enzymene via interaksjoner med operator (araO<sub>2</sub>) og initiator (araI<sub>1</sub> og araI<sub>2</sub>) regionene til araBAD operonet. AraC fungerer som en homodimer, og hver monomer består av et DNA-bindende domene og et dimeriseringsdomene. Uten arabinose tilstede virker AraC som en repressor ved at én monomer binder seg til araO<sub>2</sub>, mens den andre binder seg til araI<sub>1</sub>. Dette fører til dannelse av en DNA-loop som hindrer RNA-polymerase fra å binde til pBAD. Ved fravær av glukose og tilstedeværelse av arabinose binder sukkeret til dimeriseringsdomenet hos AraC, og forårsaker en konformasjonsendring. Dette fører til at DNA-loopen brytes og dimeren binder seg til araI<sub>1</sub> og araI<sub>2</sub>. Her fungerer den som en aktivator ved at den hjelper til med rekrutteringen av RNA-polymerase (Schleif 2000; Schleif 2003).

*TfDyP* (med His-tag) har tidligere blitt overuttrykt som beskrevet av van Bloois et al. (2010) i artikkelen «A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily». Denne metoden ble derfor benyttet for overuttrykking av *TfDyP* (med His-tag) uten å utføre en induksjonstest på forhånd.

Materialer:

- Ampicillin 100 mg/mL
- Cellekultur av transformanter (jf. avsnitt 3.1.2)
- L-Arabinose 20%
- LB-medium

Metode:

Cellekulturene ble inokulert i 500 mL LB-medium tilsatt 500 µL ampicillin og inkubert ved 200 rpm og 37 °C. Ved OD<sub>600</sub>= 0.1 ble det tilsatt 20% L-Arabinose til en sluttkonsentrasjon på 0,2 %. Kulturen ble dyrket over natt ved 200 rpm og 37 °C. Deretter ble cellene høstet ved sentrifugering ved 4 °C og 5000 x g i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert og pelleten oppbevart ved -20 °C.

### 3.2.10 Overekspresjon av *TfKat* (med His-tag)

*TfKat* (med His-tag) har tidligere blitt overuttrykt som beskrevet av Lončar og Fraaije (2015) i artikkelen «Not so monofunctional – a case of thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity». Denne metoden ble derfor benyttet for overuttrykking av *TfKat* (med His-tag) uten å utføre en induksjonstest på forhånd.

Materialer:

- 5-aminolevulinsyre 1M
- Ampicillin 100 mg/mL
- Cellekultur av transformanter (jf. avsnitt 3.1.2)
- L-Arabinose 20 %
- LB-medium

Metode:

Cellekulturene ble inokulert i 500 mL LB-medium tilsatt 500 µL ampicillin og inkubert ved 200 rpm og 37 °C. Ved OD<sub>600</sub>=1.25 ble det tilsatt L-arabinose og 5-aminolevulinsyre til en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 0,2 % og 0,5 mM. Kulturen ble dyrket i 24 timer ved 180 rpm og 30 °C. Deretter ble cellene høstet ved sentrifugering ved 4 °C og 6000 xg i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert og pelleten oppbevart ved -20 °C.

### 3.3 Uttrykking av CBP21 fra *Serratia marcescens*

I tillegg til enzymene fra *T. fusca*, ble LPMOen CBP21 (*SmLPMO10A*) fra den gramnegative bakterien *Serratia Marcescens* uttrykt og rensert i forbindelse med denne oppgaven. Denne LPMOen hadde allerede blitt transformert over i en *E. coli* -stamme egnet for overuttrykk av Postdoktor Anne Grethe Hamre og var tilgjengelig i form av en frysestock. I dette tilfellet var CBP21 plassert i vektoren pRSETB.

Frysestocker fra celler med det ønskede plasmidet ble dyrket i LB-medium. Ampicillin ble tilsatt mediet for å hindre vekst av uønskede bakterier.

Materialer:

- Ampicillin 100 mg/mL
- Frysestock
- LB-medium

Metode:

500 mL LB-medium og 250  $\mu$ L ampicillin ble overført til en 1L dyrkningskolbe. Mediet ble så inokulert med celler fra frysestocken ved bruk av en steril tannpirker. Cellekulturene ble inkubert ved 200 rpm og 37 °C over natt.

### 3.4 Klargjøring av enzymer til rensing

#### 3.4.1 Periplasmatisk ekstrakt

Periplasma er området mellom den ytre og indre cellemembranen i gramnegative bakterier. CBP21 blir transportert til periplasma etter uttrykk i de kompetente *E. coli*-cellene, og proteinet må ekstraheres herfra for å kunne renses. Til dette benyttes en spheroplastbuffer med høy sukkerkonsentrasjon som cellene kan ta opp. Cellene utsettes deretter for et osmotisk sjokk ved at iskaldt vann og magnesiumklorid tilsettes, noe som gjør at det periplasmatiske ekstraktet frigjøres. Proteasehemmere og den chelaterende agenten EDTA hindrer proteindegradering.

Materialer:

- Cellekultur med CBP21 (jf. avsnitt 3.3)
- dH<sub>2</sub>O, 4 °C
- MgCl<sub>2</sub> 20mM
- Spheroplastbuffer

Metode:

Cellene ble høstet ved å sentrifugere bakteriekulturen ved 11 325 x g og 4 °C i 20 minutter for så å dekantere supernatanten. Cellepelletene ble resuspendert i 25 mL spheroplastbuffer per 500

mL medium og inkubert i 5 minutter på is. Deretter ble løsningen sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 7197 x g. Supernatanten ble dekantert og pelleten inkubert ved RT i 10 minutter. Videre ble cellepelleten resuspendert i 15 mL iskaldt vann (4 °C), inkubert på is i 45 sekunder og tilsatt 1,25 mL 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Løsningen ble nok en gang sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 7197 x g. Supernatanten ble beholdt og filtrert gjennom et 0,22 µm sterilfilter. Det periplasmatiske ekstraktet ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

Det ble utført SDS-PAGE av prøvene for å kontrollere at proteinet var tilstede i løsningen. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med unntak av tillagingen av prøvene. Her ble i stedet 10 µL proteinløsning tilsatt 10 µL arbeidsløsning før prøvene ble varmebehandlet ved 70 °C i ti minutter. Det ble applisert 20 µL prøve i gelbrønnen.

#### 3.4.2 Lysering av *TfDyP* og *TfLPMO-E7*

For å frigjøre proteinene *TfDyP* og *TfLPMO-E7* fra *T. fusca* før rensing av det ønskede enzymet ble lysering av cellene utført. Lysozym ble tilsatt for å bryte ned peptidoglycan i celleveggen til *E. coli*-bakterien. Sonikering ble brukt for å senke løsningens viskositet, og DNAet i supernatanten ble felt ut ved bruk av streptomycinsulfatløsning.

Materialer:

- Cellepellet
- Lysisbuffer
- NH<sub>3</sub> 2,5 %
- Streptomycinsulfat

Metode:

Frossen cellepellet ble resuspendert i lysisbuffer. Til å løse opp cellepellet fra 0,5 L vekstmedium ble det brukt 60-120 mL lysisbuffer. Cellesuspensjonen ble overført til 35 mL sentrifugerør og inkubert på vannbad ved 30 °C i en time. Løsningene ble deretter satt på is og sonikert i 4 minutter hver (5 sekunder på/av) med en amplitude på 33 %. Videre ble løsningene sentrifugert i 30 minutter på 15 000 x g og 4 °C. Etter sentrifugering ble volumet av løsningen avlest ( $V = x$  mL) og en  $x/10$  10 % (w/v) streptomycinsulfatløsning tillaget. pH i denne

løsningsen ble justert til 7 ved bruk av 2,5 % NH<sub>3</sub>. Deretter ble løsningen tilsatt dråpevis til supernatanten over en periode på minst 5 minutter. Prøven ble videre inkubert ved RT i 10 minutter. Til slutt ble prøven sentrifugert i 20 minutter ved 11 325 x g og 4 °C. Supernatanten ble oppbevart ved 4 °C frem til rensing.

Det ble utført SDS-PAGE av prøvene for å kontrollere at lysing var vellykket og om proteinet var tilstede i løsningen. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.4.3 Lysering av celler fra *TfDyP* (med His-tag)

Protokollen for lyseringen av *TfDyP* (med His-tag) er hentet fra van Bloois et al. (2010).

Materialer:

- 1 x PBS buffer
- Cellepellet fra *TfDyP* (med His-tag)
- Lysozym

Metode:

Cellepelletten ble resuspendert i 250 mL iskald (4 °C) 1 x PBS tilsatt 0,5 mg/mL lysozym. Deretter ble cellene satt på is og sonikert i 4 minutter (5 sekunder på/av) med en amplitude på 33 %. Etter sonikering ble cellene sentrifugert ved 15 000 x g i en time. Supernatanten ble dekantert og oppbevart ved 4 °C i påvente av rensing.

Det ble utført SDS-PAGE av prøvene for å undersøke om lysing var vellykket og om proteinet fortsatt var tilstede i løsningen. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

Lysering av *TfDyP* (med His-tag) ble også forsøkt utført ved bruk av metoden beskrevet i avsnitt 3.4.2. I tillegg ble plasmid fra *TfDyP* (med His-tag) ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech i Tyskland (som beskrevet for *TfLPMO-E7* i avsnitt 3.2.7) for å kontrollere at gensekvensen var intakt.

#### 3.4.4 Lysering av celler fra *TfKat* (med His-tag)

Protokollen for lyseringen av *TfKat* (med His-tag) er hentet fra Lončar og Fraaije (2015).

Materialer:

- Kaliumfosfatbuffer 50 mM 0,5M NaCl pH 8,0
- Cellepellet *TfKat* (med His-tag)

Metode:

Cellepelleten ble resuspendert i 200 mL Kaliumfosfatbuffer 50 mM 0,5 M NaCl pH 8,0 og deretter spunnet ned i 10 minutter ved 6371 x g. Supernatanten ble dekantert og pelleten resuspendert i nye 200 mL buffer. Deretter ble cellene lysert ved bruk av sonikator (5 sekunder på/av) med en amplitude på 33 % i fire minutter. Til slutt ble cellene sentrifugert ved 15 000 x g i en time og supernatanten oppbevart ved 4 °C i påvente av rensing.

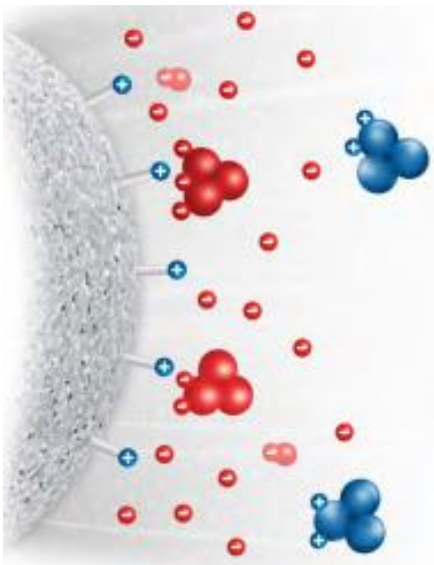
Det ble utført SDS-PAGE av prøvene for å undersøke om lysering var vellykket og om proteinet fortsatt var tilstede i løsningen. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2 med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

Lysering av *TfKat* (med His-tag) ble også forsøkt utført ved bruk av metoden beskrevet i avsnitt 3.4.2. I tillegg ble plasmid fra *TfKat* (med His-tag) ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech i Tyskland (som beskrevet for *TfLPMO-E7* i avsnitt 3.2.7) for å kontrollere at gensekvensen var intakt.

## 3.5 Rensing av enzymer

### 3.5.1 Rensing av TfdyP – Ionebyttekromatografi (IEC) på sterk anionbytter

Ved ionebyttekromatografi separeres proteiner på grunnlag av ulik netto ladning. I første rensesteg ble det benyttet en sterk anionbytter med kvartære ammoniumgrupper, en high performance sepharose kolonne fra GE Healthcare (HiTrap Q HP), med et kolonnevolum 5 mL. Sterke anionbyttere forblir positivt ladet over et stort pH-område. Molekyler med negativ ladning vil binde til de positive gruppene på kolonnematerialet og kan elueres enten ved å endre pH i bufferen eller ved å øke saltkonsentrasjonen (GE Healthcare 2016). Her ble det brukt en gradient med NaCl. Prinsippet for separasjon på sterk anionbytter er illustrert i figur 3.5.1.



Figur 3.5.1 Separasjon av proteiner med ulik nettoladning (rød og blå farge) på en anionbytter. Figuren er hentet fra GE Healthcare (2016).

#### Materialer:

- Buffer A: Tris-HCl 50 mM pH 8,0
- Buffer B: Tris-HCl 50 mM 1M NaCl pH 8,0
- EtOH 20 %
- HiTrap Q HP, kolonnevolum 5 mL
- Lysert proteinprøve (jf. avsnitt 3.4.2)



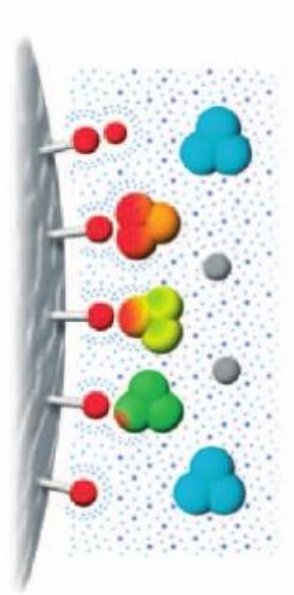
Metode:

Gjennom hele rensingen ble væske påsatt kolonnen med en hastighet lik 4 mL/min. Først ble kolonnen vasket med 20 % EtOH før buffer A ble påsatt til baselinja var stabil. Deretter ble kolonnen vasket med buffer B, før buffer A igjen ble påsatt til baselinja var stabil. Lysert proteinløsning (jf. avsnitt 3.4.2) ble pH-justert til buffer A og deretter applisert på kolonnen. Tre HiTrap Q HP kolonner ble satt i serie for å unngå overbelastning, og 60 mL prøve ble påsatt kolonnen hver runde. Kolonnen ble deretter vasket med buffer A til baselinja igjen var stabil. Proteinet ble eluert med følgende gradient: 0-100 % buffer B over 300 mL. Det ble samlet fraksjoner á 4 mL gjennom hele gradienten. Etter gradienten ble kolonnen vasket med 100 % buffer B til baselinja var stabil, og deretter ble det påsatt 100 % buffer A til baselinja igjen var stabil. Til slutt ble kolonnen vasket med 20 % EtOH.

SDS-PAGE gelelektroforese ble brukt for å kontrollere hvilke fraksjoner som inneholdt ønsket enzym. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.2 Rensing av *TfDyP* – Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

Fraksjonene som inneholdt det ønskede proteinet ble videre renses med en annen high performance sepharose kolonne, HiTrap Phenyl HP, som har et kolonnevolum lik 5 mL. Kolonnen er en hydrofob interaksjonskolonne med fenyylgrupper bundet til kolonnematerialet. Rensingen utføres ved bruk av to buffere – hvorav startbufferen har en høy saltkonsentrasjon. Saltkonsentrasjonen øker interaksjonene mellom kolonnematerialet og de hydrofobe gruppene på enzymet. Ved å senke saltkonsentrasjonen i systemet gradvis, skilles proteinene fra hverandre etter grad av hydrofobisitet, og de mest hydrofobe proteinene vil eluere sist. Prinsippet er illustrert i figur 3.5.2.



Figur 3.5.2 Separasjon av proteiner med ulik hydrofobisitet (illustrert som grad av rødfarge) i en hydrofob interaksjonskolonne. Figuren er hentet fra GE Healthcare (2006).

#### Materialer:

- Ammoniumsulfatløsning 3M
- Buffer A: Tris-HCl 50 mM 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0,
- Buffer B: Tris-HCl 50 mM pH 8,0
- $\text{dH}_2\text{O}$
- EtOH 20%
- Fraksjoner fra ionebyttekromatografi (jf. avsnitt 3.5.1)
- HiTrap Phenyl HP, kolonnevolum 5 mL

#### Metode:

Fraksjonene fra ionebyttekromatografien ble justert til buffer A ved dråpevis tilsetning av 3M ammoniumsulfatløsning under konstant omrøring til en sluttkonsentrasjon lik 1M. Prøven ble deretter sterilfiltrert.

Kolonnen ble påsatt bufferene med en hastighet lik 4 mL/min under hele rensingen. Først ble kolonnen vasket med 20 % EtOH og deretter med  $\text{dH}_2\text{O}$  til baselinja var stabil. Deretter ble buffer A påsatt til baselinja var stabil, før påsetting av 100 % buffer B på kolonnen for å fjerne urenheter. Når baselinja igjen var stabil ble buffer A påsatt for å ekvilibrere kolonnen. Etter ekvilibrering ble prøven applisert på kolonnen, før buffer A igjen ble påsatt til baselinja var

stabil. *TfDyP* ble eluert med følgende gradient: 0-70 % buffer B over 150 mL, deretter 100 % buffer B over 25 mL. Det ble samlet fraksjoner på 4 mL fra begynnelsen av gradienten.

Renheten til de aktuelle fraksjonene ble analysert ved bruk av SDS-PAGE. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.3 Rensing av *TfDyP* – Oppkonsentrering

Dersom renheten av proteinet ikke var tilstrekkelig etter HIC ble størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) benyttet som et tredje rensetrinn. For at prøvene skulle kunne settes på SEC-kolonnen måtte de først oppkonsentreres til et volum på 1-1.5 mL. Macrosep® Advance Centrifugal Devices fra PALL Corporation ble brukt til å oppkonsentrere proteinløsningen. Dette er et 50 mL sentrifugerør med filter som øker konsentrasjonen av det ønskede proteinet og bidrar til å fjerne salter og andre urenheter med lav molekylvekt. Porestørrelsen avgjør hvilke molekyler som går gjennom filteret og ikke. I dette tilfellet ble det brukt et filter med porestørrelse på 30 kDa. Molekyler med en vekt på under 30 kDa vil passere gjennom filteret.

Materialer:

- Macrosep® Advance Centrifugal Devices 30 K
- Proteinløsning

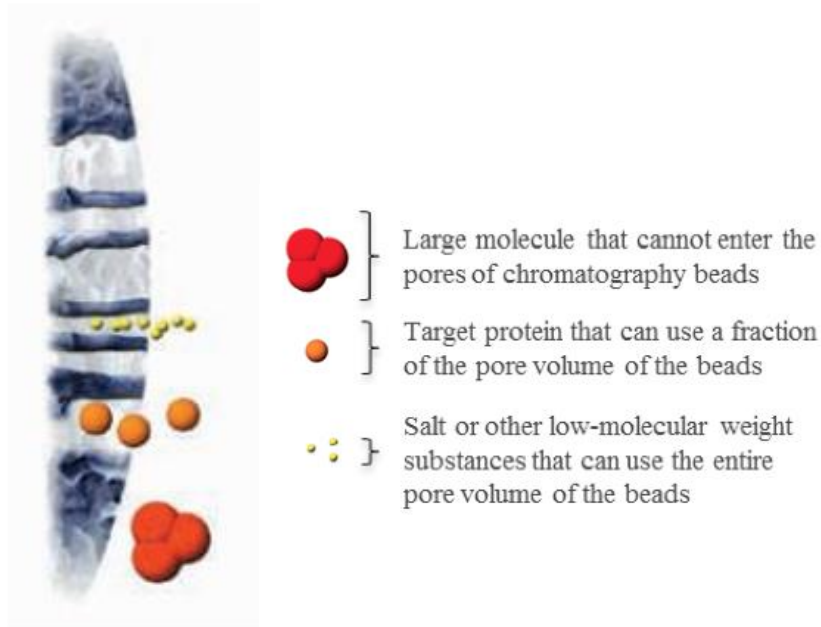
Metode:

Proteinløsningen ble overført til et sentrifugefilter med porestørrelse 30 kDa. Rørene ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til ønsket volum (1-1,5 mL) ble oppnådd.

### 3.5.4 Rensing av *TfDyP* – Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)

Prinsippet for størrelseseksklusjonskromatografi, også kalt gelfiltrering, er at porene i kolonnematerialet vil separere proteinene i løsningen etter størrelse. Små proteiner og molekyler vil diffundere lenger inn i porene enn de større (GE Healthcare 2014). Dermed

eluerer molekylene med høyest molekylvekt først, og vi får en separasjon av molekylene utfra vekt. En illustrasjon av separasjonen er vist i figur 3.5.3.



Figur 3.5.3 Separasjon av proteiner med ulik størrelse på en SEC-kolonne. Figuren er hentet fra GE Healthcare (2014).

#### Materialer:

- EtOH 20% (avgasset)
- Buffer: Tris-HCl 20 mM 0,2 M NaCl pH 8,0 (avgasset)
- HiLoad 16/600 SuperDex 75pg
- Oppkonsentrert og sterilisert proteinløsning (1 mL påsatt per runde)

#### Metode:

Kolonnen ble ekvilibrert med minimum ett kolonnevolum (120 mL) buffer, med en hastighet lik 1 mL/min. Oppkonsentrert proteinløsning ble deretter applisert med en hastighet tilnærmet lik 1 mL/min ved hjelp av en sprøyte. Proteinet ble eluert ut med ett kolonnevolum buffer (120 mL). Det ble samlet fraksjoner på 1 mL fra tidspunktet prøven ble påsatt kolonnen. Renheten til de aktuelle fraksjonene ble analysert ved bruk av SDS-PAGE. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.5 Rensing av *TfDyP* – Varmedenaturering

Varmedenaturering ble forsøkt som et alternativt trinn i renseprosessen. Siden *Thermobifida fusca* er en termofil bakterie, mens *Escherichia coli* er en mesofil bakterie, bør dette tilsi at *TfDyP* kan tåle høyere temperaturer enn flere av proteinene fra *E. coli*, og at varmebehandling dermed kan fungere som et forbehandlingstrinn før rensingen.

Materialer:

- Lysert proteinprøve (jf. avsnitt 3.4.2)

Metode:

Lysert proteinprøve (ca. 10 mL) ble inkubert på vannbad i én time ved fire ulike temperaturer: 50, 55, 60 og 65 °C. Deretter ble prøvene satt på is før sentrifugering i 10 minutter ved 11 325 x g og 4 °C. Supernatanten ble analysert ved bruk av SDS-PAGE for å undersøke effekten av varmebehandlingen. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.6 Rensing av *TfDyP* – Ammoniumsulfatutfelling

Utfelling av proteiner med ammoniumsulfat ble også forsøkt som et alternativt trinn i renseprosessen. Dette er en vanlig metode å benytte ved rensing av proteiner fordi løseligheten til proteiner synker ettersom saltkonsentrasjonen i en løsning stiger. Ammoniumsulfat er ekstremt løselig i vann grunnet sin ioniske natur og kan derfor «salte ut» proteiner ved utfelling. Separeringen av proteiner basert på løselighet kan oppnås ved tilsetning av ammoniumsulfat til løsningen etterfulgt av sentrifugering. Siden utfellingen er et resultat av dårlig løselighet heller enn denaturering, vil proteinet kunne løses i buffer og fortsatt være intakt etter det har blitt utsatt for behandlingen (Wingfield 2001).

Det ble forsøkt ulike konsentrasjoner av ammoniumsulfat for å forsøke å finne ut når *TfDyP* ville felle ut og hvilke andre proteiner som eventuelt ville felle ut og på hvilke tidspunkter. Dersom andre proteiner kan fjernes ved utfelling vil metoden kunne fungere som en mulig forbehandling av den lyserte proteinprøven før rensing.

Materialer:

- Ammoniumsulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Lysert proteinprøve (jf. avsnitt 3.4.2).

Metode:

Ammoniumsulfat ble tilsatt 2 mL eppendorfrør til åtte ulike konsentrasjoner: 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 80 mg/mL og 100 mg/mL. Deretter ble 2 mL lysert proteinprøve tilsatt før løsningene ble blandet forsiktig. Rørene ble inkubert ved RT i 15 minutter før de ble spunnet ned i 10 minutter ved 8000 x g. Supernatanten ble overført til nye rør og senere analysert ved bruk av SDS-PAGE for å undersøke effekten av forbehandlingstrinnet. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i Avsnitt 3.4.1.

### 3.5.7 Rensing av TfdyP – Ionebyttekromatografi på sterk kationbytter

Som et alternativ til bruk av sterk anionbytter, ble det forsøkt å rense TfdyP på sterk kationbytter som første rensetrinn. Kolonnen HiTrap SP HP, som har en sulfopropylgruppe bundet til kolonnen, ble brukt som stasjonærfase. Sulfopropylgruppen forblir negativt ladet over et stort pH-område (GE Healthcare 2016). Prinsippet for separering er det samme som ved bruk av en sterk anionbytter, bortsett fra at det nå er molekyler med sterk positiv ladning som vil binde sterkest til kolonnematerialet. Proteinene kan elueres ut ved endring av saltkonsentrasjon eller pH i mobilfasen.

Materialer:

- Buffer A: Citratbuffer 20 mM pH 3,5 eller 3,0
- Buffer B: Citratbuffer 20 mM 0,1 M NaCl pH 3,5 eller 3,0
- EtOH 20 %
- HiTrap SP HP, kolonnevolum 5 mL
- Lysert proteinprøve (jf. avsnitt 3.4.2)

Metode:

Gjennom hele rensingen ble væske påsatt kolonnen med en hastighet lik 4 mL/min. Først ble kolonnen vasket med 20 % EtOH, og buffer A ble påsatt til baselinja var stabil. Deretter ble kolonnen vasket med buffer B til baselinja var stabil før buffer A igjen ble påsatt. Lysert proteinløsning (jf. avsnitt 3.4.2) ble pH-justert til buffer A og deretter applisert på kolonnen. Det ble påsatt 30 mL prøve på kolonnen hver runde. Kolonnen ble deretter vasket med buffer A til baselinja igjen var stabil. Proteinet ble eluert med følgende gradient: 0-100 % buffer B over 200 mL. Det ble samlet fraksjoner á 4 mL gjennom hele gradienten. Metoden ble forsøkt med buffere pH-justert til både pH 3,5 og pH 3,0.

Etter gradienten ble kolonnen vasket med 100 % buffer B til baselinja var stabil, og deretter ble det påsatt 100 % buffer A til baselinja igjen var stabil.. Til slutt ble kolonnen vasket med 20 % EtOH.

SDS-PAGE gelelektroforese ble brukt for å kontrollere hvilke fraksjoner som inneholdt ønsket enzym. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.8 Rensing av *TfDyP* – Filtrering med 50 kDa porefilter

Siden *TfDyP* er et enzym med en størrelse på ca. 46,9 kDa ble et 50 kDa porefilter forsøkt som et alternativ for å fjerne større bånd etter HIC, før SEC. I teorien vil filteret sørge for at de større båndene blir igjen mens *TfDyP* vil gå gjennom, men størrelsesforskjellen er såpass liten at det også er stor sannsynlighet for at *TfDyP* ikke klarer å passere gjennom filteret.

Materialer:

- Proteinprøve fra HIC, jf. avsnitt 3.5.2
- Amicon® Ultra-15 50 K

Metode:

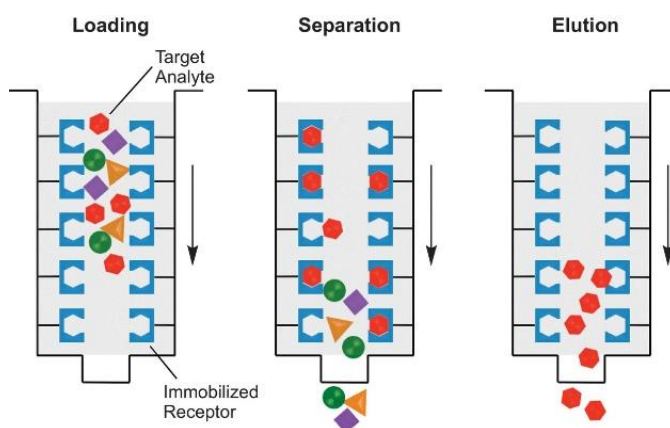
Proteinprøven ble helt over i et sentrifugerør med 50 kDa filter. Rørene ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til det kun var 1-2 mL løsning igjen over filteret. Prøver tatt fra både over og

under filteret ble analysert ved bruk av SDS-PAGE for å undersøke om separasjonen var vellykket. Analysen ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillaging som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.5.9 Rensing av *Tf*LPMO-E7 og CBP21– Affinitetskromatografi

*Tf*LPMO-E7 og CBP21 ble isolert fra proteinløsningen ved bruk av kitinkuler, som er en form for affinitetskromatografi. Affinitetskromatografi er basert på svært spesifikke biologiske interaksjoner mellom to molekyler, slik som interaksjoner mellom antistoff og antigen, reseptor og ligand, eller enzym og substrat. Disse interaksjonene brukes til rensing ved at et av de interagerende molekylene plasseres på en solid matriks for å danne en stasjonærfase. Det andre molekylet, som er tilstede i mobilfasen, vil da binde spesifikt til stasjonærfasen, mens de uønskede komponentene vil eluere ut. Deretter endres pH eller ionestyrke slik at interaksjonen mellom protein og substrat svekkes, og det bundne proteinet kan eluere (Miller 2009). Prinsippet for affinitetskromatografi er illustrert i figur 3.5.4.

Denne metoden fungerer spesielt godt på CBP21 som er et kitinaktivt protein. og dermed har sterk affinitet til kitin. *Tf*LPMO-E7 har svak affinitet til kitin da det er et celluloseaktivt enzym og vil derfor ikke binde like sterkt.



Figur 3.5.4 Illustrasjon av separasjon av proteiner ved bruk av affinitetskromatografi. Figuren er hentet fra Creative Biostructure (2018).



#### Materialer:

- 1 M Tris-HCl pH 8,0
- Ammoniumsulfat 3M
- Buffer A: Tris-HCl 50 mM 1M Ammoniumsulfat pH 8,0
- Eddiksyre 20 mM
- EtOH 20 %
- Kitinkuler
- Proteinløsning (jf. avsnitt 3.4.1 (for CBP21) og 3.4.2 (for *Tj*LPMO-E7))

#### Metode:

Proteinløsningen ble justert til buffer A ved tilsetning av 3 M ammoniumsulfat og 1 M Tris-HCl pH 8,0 til konsentrasjonene i løsningen var henholdsvis 1 M og 50 mM. Kolonnen ble pakket med ca. 15 mL kitinkuler. Mobilfasehastigheten ble satt til 2,5 mL/min, og buffer A ble påsatt til baselinjen var stabil. Deretter ble ca. 30 mL av det periplasmatiske ekstraktet påsatt kolonnen. For å vaske ut proteinene som ikke bandt til kitinkulene ble buffer A applisert til baselinjen igjen var stabil. Til slutt ble 20 mM eddiksyre brukt til å eluere ut proteinet. Kolonnen ble avslutningsvis vasket med 20 % EtOH.

Eluatet ble analysert ved bruk av SDS-PAGE gelelektroforese for å undersøke renhet av enzymet. Den ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.2, med prøvetillagingsom beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### 3.6 Oppkonsentrering og bytte av buffer

Etter rensing ble CBP21 oppkonsentrert jf. avsnitt 3.5.3, ved bruk av Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 10 K filter. Dette er et 50 mL sentrifugerør med filter som øker konsentrasjonen av det ønskede proteinet og bidrar til å fjerne salter og andre urenheter med lav molekylvekt. Porestørrelsen avgjør hvilke molekyler som går gjennom filteret og ikke. I dette tilfellet ble det brukt et filter med porestørrelse på 10 kDa. Molekyler med en vekt på under 10 kDa vil passere gjennom filteret. Før eksperimenter og ved lagring av rensede enzymer kan det være behov for bytte av buffer. Til dette ble også Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 10 K filteret benyttet. Valg av lagringsbuffer var avhengig av forsøket proteinet skulle benyttes i.

Materialer:

- Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 10 K
- Proteinløsning (jf. avsnitt 3.5.9)
- Lagringsbuffer:
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,8
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,0

Renset proteinløsning ble overført til sentrifugefilteret og fylt med lagringsbuffer. Sentrifugefilteret ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til volumet over membranen var 2 til 3 mL. Løsningen som gikk gjennom membranen ble fjernet, og ny lagringsbuffer ble tilsatt over membranen før sentrifugering ved 4300 x g og 4 °C ble gjentatt. Dette trinnet ble gjentatt 4 ganger for å sikre at all buffer ble byttet ut. Til slutt ble proteinløsningen overført til et eppendorfrør og lagret ved 4 °C.

### 3.7 Måling av enzymkonsentrasjon

For å bestemme proteinkonsentrasjon ble absorpsjon ved 280 nm ( $A_{280}$ ) bestemt ved bruk av et spektrofotometer. De aromatiske aminosyrene tryptofan og tyrosin absorberer elektromagnetisk stråling med denne bølgelengden. Beer-Lamberts lov relaterer absorbansen av monokromatisk lys til konsentrasjon, lengden på lysveien gjennom løsningen, og ekstinksjonskoeffisienten til proteinet, og kan benyttes til å bestemme konsentrasjonen til rensset protein:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l c$$

Ligning 5

$A_{\lambda}$  er absorbans ved bølgelengde  $\lambda$ ,  $\epsilon_{\lambda}$  er ekstinksjonskoeffisienten ved bølgelengde  $\lambda$ ,  $l$  er lysveien gjennom løsningen, og  $c$  er løsningskonsentrasjon.

Ekstinksjonskoeffisienten til ulike proteiner kan beregnes ved bruk av ExPASy ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). Ekstinksjonskoeffisienten til CBP21 ble beregnet til  $35\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ .

Materialer:

- Enzym
- Lagringsbuffer:
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,8
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,0

Metode:

En UVette ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  lagringsbuffer og benyttet som blankprøve. Enzymløsningen ble fortynnet 100x i lagringsbuffer, og absorbansen ved 280 nm ble målt slik at  $0 < A_{280} < 1$ . Konsentrasjonen til enzymet ble beregnet med Beer-Lamberts lov.

### 3.8 Kobber(II)metting av CBP21

Kobber er essensielt for aktiviteten til LPMOer, og CBP21 ble derfor mettet med kobber før anvendelse i forsøk. Kolonnen PD MidiTrap™ G-25 ble benyttet for å fjerne overskudd av CuSO<sub>4</sub> etter metningsreaksjonen. Kolonnen inneholder Sephadex™ materiale og har samme virkningsprinsipp som SEC (se avsnitt 3.5.4).

Materialer:

- CBP21 (jf. avsnitt 3.6)
- CuSO<sub>4</sub> 5 mM
- Lagringsbuffer:
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,8
  - Ammoniumacetat 5 mM pH 5,0
- PD MidiTrap™ G-25

Metode:

Først ble 300 µL ren CBP21 inkubert i 30 minutter ved RT med en 3x molarkonsentrasjon av CuSO<sub>4</sub> i forhold til CBP21. Kolonnen ble ekvilibrert tre ganger med 5 mL lagringsbuffer. Deretter ble CBP21-CuSO<sub>4</sub> løsningen applisert på kolonnen, etterfulgt av lagringsbuffer til et totalvolum på 1 mL. Løsningen ble eluert i to fraksjoner. Først ble 1 ml lagringsbuffer applisert på kolonnen. Dette ga fraksjon 1, som ble samlet opp i et eppendorfrør. Deretter ble 500 µl lagringsbuffer applisert. Dette resulterte i fraksjon 2. Kobbermettet CBP21 eluerte i fraksjon 1. Proteinkonsentrasjon ble målt med A<sub>280</sub> (jf. avsnitt 3.7).

### 3.9 Degradering av dampeksplodert bjørk

I dagens industri er lignocellulosisk biomasse underutnyttet som ressurs, i hovedsak fordi lignin er et såpass rigid og forgrenet molekyl at det er vanskelig å bryte ned. Dette minsker også tilgjengeligheten til andre komponenter i biomassen, som cellulose og hemicellulose. I del to av denne oppgaven ble ulike enzymcocktailer benyttet til å degradere dampeksplodert bjørk for å kunne danne et bilde av hvilken enzymkombinasjon som kan gi en mest mulig effektiv nedbrytning av det lignocellulosiske materialet. Metoden som ble benyttet tok utgangspunkt i de enzymatiske hydrolyseforsøkene utført av Chylenski et al. (2017).

Etter degradering ble prøvene fra forsøkene analysert ved å kvantifisere produktene D-glukose og D-cellobiose ved bruk av høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC). Disse er produkter fra nedbrytningen av cellulose, ikke lignin, men siden nedbrytningen av lignin vil tilgjengeliggjøre mer cellulose for degradering, er hypotesen at konsentrasjonen av disse produktene vil kunne brukes som et indirekte mål på nedbrytningen av lignin i substratet. I tillegg er det ønskelig at enzymcocktailen klarer å sakkarifisere cellulose i tillegg til degraderingen av lignin om den skal kunne benyttes i industrien.

Malt bjørketre (*Betula Pubescens*), dampeksplodert ved 220 °C i ti minutter (Vivekanand et al. 2013), ble brukt som substrat i forsøkene hvor kommersielle enzyms effekt på nedbrytningen av lignocellulosisk biomasse ble testet. Forskere ved NMBU har tidligere bestemt sammensetningen av den dampeksploderte bjørken brukt i disse forsøkene (upublisert materiale). Disse verdiene er vist i tabell 3.9.1. I arbeidet med disse forsøkene ble det brukt en antagelse om at 40 % av den dampeksploderte bjørka bestod av cellulose.

Tabell 3.9.1 Sammensetningen til den dampeksploderte bjørka brukt som substrat i degraderingsforsøkene beskrevet i avsnitt 3.9.

Sammensetning (%)						
Bjørk	Arabinan	Galaktan	Mannan	Xylan	Glukan	Klason lignin
Ubehandlet	1,1	1,4	2,8	16,5	36,5	29,2
Dampeksplodert	0,3	0,9	1,7	9,9	43,2	37,5

De første forsøkene ble utført med Celluclast<sup>®</sup>, en kommersiell enzymcocktail fra Novozymes som utelukkende består av cellulaser, for å ha et referansepunkt på hvor mye cellulose som brytes ned ved bruk av denne. Deretter ble enzymet  $\beta$ -glukosidase, også fra Novozymes, tilsatt for å forhindre opphopning av cellobiose under reaksjonen, da dette vil kunne hemme cellulaset i cocktailen. I senere forsøk ble kommersielle lignocellulolytiske enzymer, samt den kitinaktive LPMOen CBP21, tilsatt den enzymatiske cocktailen for å kunne måle effekten av dette og forhåpentligvis komme nærmere en optimal kombinasjon av enzymer.

For å kunne identifisere og kvantifisere ligninprodukter ble det også utført analyse av prøvene ved hjelp av gaskromatografi tilkoblet et massespektrometer (GC-MS).

### 3.9.1 Bestemmelse av konsentrasjon ved bruk av Bradfordmetoden

Konsentrasjonen til Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ble beregnet ved bruk av Bradfordmetoden. Denne metoden baserer seg på et skift i absorpsjonsmaksimum fra 470 nm til 595 nm for fargestoffet Comassie Brilliant Blue når dette bindes til protein (Bio-Rad Laboratories Incorporated 2000). Proteinet Bovine Serum Albumin (BSA) ble brukt som standard.

Metoder som  $A_{280}$  bestemmer konsentrasjon ved bruk av ekstinksjonskoeffisienter som er spesifikke for hvert enzym og er derfor mer nøyaktige enn Bradfordmetoden. Slike metoder kan ikke benyttes på Celluclast<sup>®</sup>, da cocktailen består av flere ulike enzymer og det dermed ikke er mulig å beregne en ekstinksjonskoeffisient.

Det lineære området til Bradfordmetoden ligger mellom 1,25  $\mu\text{g/mL}$  og 10  $\mu\text{g/mL}$  (Bio-Rad Laboratories Incorporated 2000). Dersom det er forventet at konsentrasjonen til det aktuelle enzymet er høyere enn dette, må enzymet fortynnes i bufferløsningen til konsentrasjonen kan måles innenfor det lineære området.

Materialer:

- BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
- Enzymløsning
- Lagringsbuffer:
  - Natriumacetatbuffer 0,1 M pH 5,0
  - Ammoniumacetatbuffer 5 mM pH 5,0

Metode:

Proteinløsning ble fortynnet i lagringsbuffer til et totalvolum lik 800 µL. Tre paralleller ble laget. I tillegg ble det laget en blank prøve med 800 µL buffer. Alle prøvene ble tilsatt 200 µL BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate og deretter blandet ved bruk av vortex. Prøvene ble inkubert ved RT i 5 minutter, før konsentrasjonene ble bestemt ved bruk av et spektrofotometer med en forhåndslaget standardkurve for BSA.

### 3.9.2 Bestemmelse av tørrstoffinnhold i dampeksplodert bjørk

Tørrstoffinnholdet til den dampeksploderte bjørka ble bestemt ved bruk av metoden LOD – «Loss on drying», en empirisk metode som antar at massetap fra prøven, etter tørking, i sin helhet er forårsaket av fordamping av vann (Agger et al. 2014). Metoden er billig og enkel å bruke.

Materialer:

- Dampeksplodert bjørk

Metode:

Cirka 10 g av den dampeksploderte bjørka ble veid ut i triplikater, og prøvene ble tørket over natt ved 105 °C. Prøvene ble deretter avkjølt til RT i en eksikator med hygroskopisk tørkemiddel før de igjen ble veid for å kunne bestemme massetapet.

### 3.9.3 Degradering av dampeksplodert bjørk med celluloseaktive enzymer

Dampeksplodert bjørk ble degradert med den kommersielle cellulasecocktailen Celluclast<sup>®</sup> fra Novozymes. Cocktailen inneholder et bredt spekter av celluloseaktive enzymer fra soppen *Trichoderma reesei* (Rosgaard et al. 2007). I tillegg ble en  $\beta$ -glukosidase fra soppen *Aspergillus niger* (Rosgaard et al. 2007), også levert av Novozymes, benyttet.  $\beta$ -glukosidaser kan bryte ned cellobiose og andre oligomerer til glukose. For høye konsentrasjoner av cellobiose har en inhiberende effekt på de ekso-aktive cellulasete under degradingen. Dette er en form for produktinhibering. Cellobiose forhindrer hydrolysen av cellulose, men har ingen effekt på adsorpsjonen av cellulasete på substratets overflate (Teugjas & Väljamäe 2013; Zhao et al. 2004).

Materialer:

- $\beta$ -glukosidase
- Celluclast<sup>®</sup>
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- Natriumacetatbuffer 0,1 M, pH 5,0

Metode:

I 10 mL glassrør med skrukork ble 5 % dampeksplodert bjørk (tørrstoff w/v) løst i 2 mL buffer. Før tilsetning av enzym ble en 100  $\mu$ L nullprøve tatt ut og blandet med 200  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Deretter ble halvparten av rørene tilsatt Celluclast<sup>®</sup> til en konsentrasjon på 8,0 mg/g tørrstoff. Den gjenværende halvparten ble tilsatt Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase til en totalkonsentrasjon på 8,0 mg/g tørrstoff i størrelsesforholdet 5:1. Rørene ble inkubert ved 38 rpm i et Multi RS-60 roterende stativ ved 50 °C. Prøveuttak ble utført etter 5, 24 og 48 timer. Ved uttak ble rørene vortexet før 100  $\mu$ L ble blandet med 200  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. For å denaturere enzymene og dermed stoppe reaksjonen ble prøvene kokt i 2 minutter. Forsøket ble utført i triplikater. Prøvene ble filtrert gjennom et 0,45  $\mu$ M Duapore Membranfilter og overført til HPLC-rør. Prøvene ble lagret ved -20 °C frem til analyse.



#### 3.9.4 Degradering av vasket dampeksplodert bjørk

Dampekspløsjon av maisplanter har vist seg å produsere svake syrer, furanderivativer og fenoliske forbindelser som har en inhiberende effekt på veksten av soppen *T. reesei* (Hongqiang & Hongzhang 2008). Effekten av å vaske substratet ved RT (20 °C) og 60 °C på tilstedeværelsen av slike inhibitoriske forbindelser ble derfor undersøkt.

Materialer:

- $\beta$ -glukosidase
- Celluclast<sup>®</sup>
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- Natriumacetatbuffer 0,1 M pH 5,0

Metode:

Ca. 20 g dampeksplodert bjørk i 100 mL dH<sub>2</sub>O ble inkubert ved RT eller 60 °C ved 100 rpm i 30 minutter. Deretter ble blandingen sentrifugert ved 4 °C og 6371 x g i 10 minutter før supernatanten ble dekantert. Bjørka ble tilsatt 100 mL dH<sub>2</sub>O og igjen satt til inkubering ved RT eller 60 °C ved 100 rpm i 30 minutter. Sentrifugering ble gjentatt med samme betingelser, og supernatanten ble dekantert. Tørrstoffinnholdet til den vaskede bjørka ble bestemt som beskrevet i avsnitt 3.9.2. Den vaskede bjørka ble deretter degradert under samme betingelser som i avsnitt 3.9.3. Degradering av uvasket bjørk, bjørk vasket ved RT og bjørk vasket ved 60 °C ble utført i triplikater.

#### 3.9.5 Degradering av Avicel<sup>®</sup> og PASC

Degradering av cellulosesubstratene Avicel<sup>®</sup> PH-101 og «Phosphoric acid swollen cellulose» (PASC) ble utført for å kunne sammenligne nedbrytning av ren cellulose med nedbrytning av cellulose i den dampeksploderte bjørka. Avicel<sup>®</sup> PH-101 er ren mikrokrySTALLINSK cellulose i pulverform (Merck 2018), mens PASC er cellulose forbehandlet med 85 % fosforsyre (Hall et al. 2010). PASC ble tillaget fra Avicel<sup>®</sup> av postdoktor Bastien Bissaro.

#### Materialer:

- Avicel<sup>®</sup>
- $\beta$ -glukosidase
- Celluclast<sup>®</sup>
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- Natriumacetatbuffer 0,1 M pH 5,0
- PASC 12 g/L

#### Metode:

I 10 mL glassrør med skrukork ble henholdsvis 40 og 100 mg Avicel<sup>®</sup> løst i 2 mL 0,1 M natriumacetatbuffer pH 5,0, mens PASC ble tilsatt bufferen til en sluttkonsentrasjon lik 1,2 mg/mL. Først ble en 100  $\mu$ L nullprøve tatt ut og blandet med 200  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Deretter ble Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase i forhold 5:1 tilsatt til en totalkonsentrasjon lik 8.0 mg/g tørrstoff. Rørene ble inkubert ved 38 rpm i et Multi RS-60 roterende stativ ved 50 °C. Prøveuttak ble utført etter 1, 2, 3 og 4 timer. Ved uttak ble rørene vortexet før 100  $\mu$ L ble blandet med 200  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. For å stoppe reaksjonen ble prøvene kokt i 2 minutter. Forsøkene ble utført i triplikater. Prøvene ble filtrert gjennom et 0,45  $\mu$ m Duapore Membranfilter og overført til HPLC-rør. Prøvene ble lagret ved -20 °C frem til analyse.

#### 3.9.6 Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast<sup>®</sup>, $\beta$ -glukosidase og ulike konsentrasjoner av LiP

Det ble gjennomført fire timers degraderingsforsøk med dampeksplodert bjørk og det kommersielle lignindegraderende enzymet lignin peroksidase (LiP) fra *P. chrysosporium*. Det ble tilsatt hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) til reaksjonene som kofaktor, da dette ikke blir produsert under reaksjonen. To ulike konsentrasjoner ble brukt for å undersøke hvorvidt mengden enzym ga utslag på degraderingen.

## Materialer:

- $\beta$ -glukosidase
- Celluclast<sup>®</sup>
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 mM)
- LiP fra *P. chrysosporium*
- Natriumacetatbuffer 0,1 M pH 5,0

## Metode:

Forsøket ble gjennomført som beskrevet i avsnitt 3.9.5 (med dampeksplodert bjørk som substrat), med unntak av at LiP og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ble tilsatt til alle parallellene. LiP ble tilsatt til henholdsvis 0,5  $\mu$ M og 1,0  $\mu$ M. Begge forsøkene ble utført i triplikater. Alle paralleller ble tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til en konsentrasjon på 0,2 mM.

### 3.9.7 Degradering av dampeksplodert bjørk med MnP, LiP og CBP21

For å kunne studere eventuelle endringer i substratet som følge av aktiviteten til de kommersielle ligninaktive enzymene MnP og LiP fra *P. chrysosporium*, samt CBP21 fra *S. marcescens*, ble det utført forsøk der kun disse enzymene og deres kofaktorer ble benyttet. Det ble brukt en flyktig buffer med optimal pH for det aktuelle enzymet, slik at resultatene senere kunne analyseres ved bruk av GC/MS.

For CBP21 ble askorbinsyre benyttet som kofaktor, da tilstedeværelsen av denne reduktanten har vist seg å øke effektiviteten til enzymet (Vaaje-Kolstad et al. 2010). Reduktanten er nødvendig for å redusere Cu<sup>2+</sup> i enzymets aktive sete til Cu<sup>+</sup>. Tilstedeværelse av Mn<sup>2+</sup> ioner er nødvendig for å aktivere MnP (Paszczynski et al. 1985), og dette ble tilført reaksjonen i form av MnSO<sub>4</sub>. Den katalytiske syklusen til LiP som beskrevet av Datta et al. (2017) gir ingen indikasjon på at LiP har behov for kofaktor. Det ble derfor valgt å ikke tilsette noen kofaktor til LiP i forbindelse med dette forsøket.

Betingelsene som ble brukt for de ulike enzymene er oppsummert i tabell 3.9.2.

Tabell 3.9.2 Betingelser brukt under degraderingsreaksjonene i avsnitt 3.9.7.

Enzym	LiP	MnP	CBP21
<b>Buffer</b>	Ammoniumformat 5 mM pH 3,0	Ammoniumformat 5 mM pH 4,5	Ammoniumacetat 5 mM pH 5,8
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM)</b>	0.2	0.1	0.2
<b>Annen kofaktor</b>	-	MnSO <sub>4</sub> (0,5 mM)	Askorbinsyre (10 µM)

Materialer:

- Askorbinsyre
- Buffer
- CBP21
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- LiP
- MnP
- MnSO<sub>4</sub>

Metode:

I 10 mL glassrør med skrukork ble 5 % dampeksplodert bjørk (tørrstoff w/v) løst i 2 mL buffer. Før tilsetning av Celluclast<sup>®</sup> ble en 100 µL nullprøve tatt ut og blandet med 200 µL dH<sub>2</sub>O. Deretter ble 1 µM av MnP, LiP eller CBP21, samt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og kofaktor angitt i tabell 3.9.2. Rørene ble inkubert ved 38 rpm i et Multi RS-60 roterende stativ ved 50 °C. Prøveuttak ble utført etter 1, 2, 3 og 4 timer. Ved uttak ble rørene vortexet før 100 µL ble blandet med 200 µL dH<sub>2</sub>O. For å stoppe reaksjonen ble prøvene kokt i 2 minutter. Forsøkene ble utført i triplikater. Prøvene ble filtrert gjennom et 0.45 µm Duapore Membran filter, før halvparten ble overført til HPLC-rør, og den andre halvparten til eppendorfrør. Prøvene ble lagret ved -20 °C frem til videre analyse.

### 3.9.8 Degradering av dampeksplodert bjørk med kommersielle enzymer, Celluclast® og $\beta$ -glukosidase

MnP og LiP fra *P. chrysosporium*, en Laccase fra *Trametes versicolor* samt CBP21 fra *S. marcescens* ble benyttet for å undersøke deres effekt på både cellulose- og lignindelen av den dampeksploderte bjørka. Ettersom reaksjonsproduktene skulle analyseres med GC ble en flyktig buffer benyttet. Det ble benyttet pH 5,0 som er standard pH benyttet for Celluclast®: $\beta$ -glukosidase blandingen (Chylenski et al. 2017). Betingelsene som ble brukt er vist i tabell 3.9.3.

I dette forsøket ble veratrylalkohol benyttet i reaksjonen med LiP, da det ble funnet dokumentasjon som tyder på at denne aromaten blir brukt som en kofaktor av enzymet (Schoemaker & Piontek 1996).

Tabell 3.9.3 Betingelser brukt under degraderingsreaksjonene i avsnitt 3.9.8.

Enzym	LiP	MnP	CBP21	Laccase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0,2 mM	0,1 mM	25 $\mu$ M*	-
<b>Annen kofaktor</b>	Veratrylalkohol (1 mM)	MnSO <sub>4</sub> (0.5 mM)	Ascorbinsyre (10 $\mu$ M)	-

\*Tilsatt hvert kvarter under reaksjonstiden.

Materialer:

- Ammoniumacetat 5 mM pH 5,0
- Ascorbinsyre
- CBP21
- Dampeksplodert bjørk
- dH<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Laccase
- LiP
- MnP
- MnSO<sub>4</sub>
- Veratryl alkohol

Metode:

Forsøket ble utført som beskrevet i avsnitt 3.9.7. For Laccase, MnP og LiP ble 1  $\mu\text{M}$  enzym tilsatt. For CBP21 ble 1  $\mu\text{M}$  enzym først tilsatt sammen med askorbinsyre, Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase, før 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ble tilsatt etter 15 minutter. Nye 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ble tilsatt hvert kvarter under hele reaksjonsforløpet.

### 3.10 Analyse og databehandling

#### 3.10.1 Analyse ved bruk av høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC)

Glukose og cellobiose frigjort under enzymatisk hydrolyse ble kvantifisert med høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av et Dionex Ultimate 3000 system koblet til en brytningsindeks (RI) detektor. Separasjonen av hydrolyseproduktene ble oppnådd med en Rezex ROA-Organic Acid  $\text{H}^+$  (8 %), 300 x 7.8 mm analytisk kolonne utstyrt med en SecureGuard Carbo- $\text{H}^+$  4 x 3.0 mm forkolonne. For å kunne kvantifisere produkter ble topparelene som korresponderte til glukose og cellobiose sammenlignet med en standardkurve med kjente konsentrasjoner av sukkerene (i området 0,1-10,0 mg/mL).

HPLC er en type væskekromatografi som bruker høyt trykk for å føre analyseløsningen gjennom kolonnen. Dette fører til god oppløsning på separeringen av molekylene i løsningen. Prinsippet bak separasjonen er at ulike molekyler har ulik affinitet til stasjonær- og mobilfasen til systemet. Tiden molekylene oppholder seg i hver fase vil dermed variere og følgelig vil retensjonstiden være forskjellig fra forbindelse til forbindelse (Miller 2009)

Sulfonert styren divinylbenzen (SDVB), med  $\text{H}^+$  bundet til seg, er stasjonærfasen i Rezex-kolonnen (Phenomenex 2018). Mobilfasen, svovelsyre, protonerer monomerene og dimerene som skal analyseres, slik at disse kan fungere som  $\text{H}^+$ -ioner og bytte plass med protonene i stasjonærfasen. I hvilken grad molekylene gjør dette vil avgjøre når de eluerer, og dermed separere forbindelsene.

Materialer:

- Mobilfase: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM
- Prøver fra forsøk utført i avsnitt 3.9.3-3.9.8.
- Standarder:
  - Standard 1: 0,1 mg/mL D-(+)-cellobiose og 0,1 mg/mL α-D-glukose
  - Standard 2: 0,5 mg/mL D-(+)-cellobiose og 0,5 mg/mL α-D-glukose
  - Standard 3: 1,0 mg/mL D-(+)-cellobiose og 1,0 mg/mL α-D-glukose
  - Standard 4: 2,5 mg/mL D-(+)-cellobiose og 2,5 mg/mL α-D-glukose
  - Standard 5: 5,0 mg/mL D-(+)-cellobiose og 5,0 mg/mL α-D-glukose
  - Standard 6: 10,0 mg/mL D-(+)-cellobiose og 10,0 mg/mL α-D-glukose

Metode:

Det ble injisert 8 µL prøve på kolonnen. Analyttene ble separert ved 65 °C og en flow lik 0,6 mL/min med 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> som mobilfase. Produktene ble detektert med en RI-detektor. Standarder som inneholdt α-D-glukose og D-(+)-cellobiose i ulike konsentrasjoner ble analysert, og en standardkurve ble laget for å kvantifisere mono- og dimerene i prøvene. Kromatogrammene ble analysert med programvaren Chromeleon.

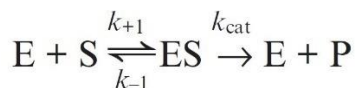
### 3.10.2 Databehandling av HPLC-resultater

Mekanismen og egenskapene til enzymer som modifierer løselige substrater blir vanligvis utledet ved bruk av Michaelis-Menten-kinetikk (Johnson & Goody 2011; Michaelis & Menten 1913), hvis formel er vist i ligning 7.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ligning 7}$$

Her representerer  $V_{max}$  den maksimale raten til systemet dersom det er mettet med substrat, mens  $K_M$  er substratkonsentrasjonen der reaksjonshastigheten er  $\frac{1}{2} V_{max}$ .

Modellen baserer seg på at enzymet (E) binder seg reversibelt til substrat (S) for å danne et enzym-substrat kompleks (ES) som senere frigjør et produkt (P) og regenerer enzymet slik at det kan reagere på nytt (Ligning 8).



Ligning 8

der  $k_{+1}$  (forward rate),  $k_{-1}$  (reverse rate) og  $k_{cat}$  (katalytisk hastighetskonstant) er hastighetskonstantene til de ulike trinnene i reaksjonen.

Michaelis-Menten kinetikk er basert på en rekke antagelser som inkluderer steady-state reaksjonsforhold for enzym-substratkomplekset og et homogent substrat. Ingen av disse antagelsene passer til cellulose som er et heterogent substrat bestående av krystallinske, semikrystallinske og amorfe regioner. Da forventes det at de lett degraderbare regionene brytes ned først, etterfulgt av en gradvis tregere degradering av de mer motstandsdyktige regionene.

Kostylev og Wilson utredet i 2013 en kinetikkmodell for depolymerisering av krystallinske substrater. Denne modellen hadde som mål å kvantifisere de ulike cellulasesenes evne til å overkomme motstandsdyktighet i substratet. Modellen er basert på Michaelis-Menten kinetikk, men med en tidsavhengig aktivitet for enzymet. Modellen er gitt i ligning 9.

$$X = At^b$$

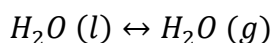
Ligning 9

$X$  er prosent nedbrutt cellulose basert på mengde glukose detektert,  $A$  er et mål på total enzymaktivitet,  $b$  er et mål på enzymets evne til å overkomme hindringer i det krystallinske substratet, og  $t$  er tid (Kostylev & Wilson 2013).

HPLC-dataene ble tilpasset denne modellen. Det ble antatt at det i dampeksplodert bjørk er ca. 40 % cellulose. Hydrolyseutbyttet ble beregnet basert på detektert glukose og uttrykt som en prosentandel av det teoretiske maksimum som ville blitt oppnådd dersom all cellulose ble omdannet til glukose.

### 3.10.3 Forbehandling av prøver til GC/MS

Før GC/MS analyse ble prøvene frysetørket. Prinsippet for frysetørking ligger i at det alltid vil eksistere en likevekt mellom vann i væskeform og vann i gassform (ligning 6):



Ligning 6



Vakuum vil fjerne gassen fra frysetørkeren og likevekten forskyves til høyre (Le Chateliers prinsipp). Isen i prøvene vil da sublimere. Når reaksjonen går mot likevekt vil gassen kondenseres på et kjølerør som holder temperaturen  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dette forhindrer at vannet trekker tilbake inn i prøvene. Prosessen vil fortsette helt til alt vann er fjernet fra prøven.

Materialer:

- 1,2-dikloretan
- Fryste prøver fra 3.9.8 og 3.9.9
- $\text{N}_2$  (g)

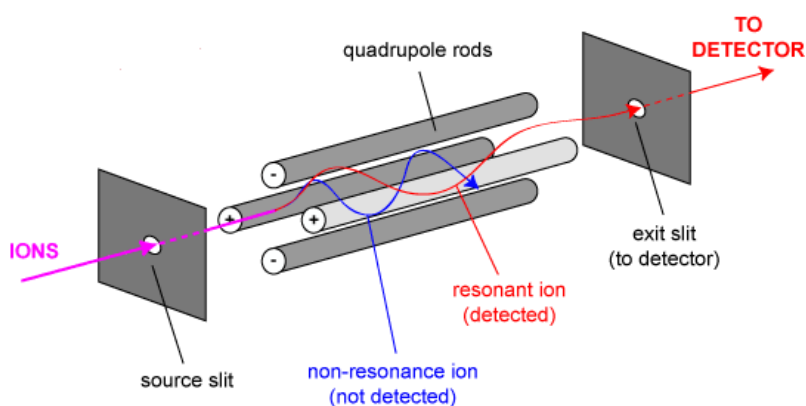
Metode:

Det ble stukket hull i eppendorfrørene med de fryste prøvene for å tillate avdamping. De ble videre plassert i frysetørkeren som er koblet til vakuum og innstilt på  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  og 0,011 mBar frem til de var fullstendig tørre.. De frysetørkede prøvene ble løst i 500  $\mu\text{L}$  1,2-dikloretan og filtrert gjennom et 0,5  $\mu\text{m}$  teflonfilter. Deretter ble væsken dampet av ved bruk av varmeblokk ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) og  $\text{N}_2$  (g), før prøvene ble løst i 100  $\mu\text{L}$  1,2-dikloretan og overført til GC-rør.

#### 3.10.4 Analyse ved bruk av gasskromatografi tilkoblet massespektrometri (GC/MS)

Prøvene preparert i avsnitt 3.10.3 ble analysert ved bruk av gasskromatografi tilkoblet massespektrometri (GC/MS). Gasskromatografi separerer komponenter på bakgrunn av deres kokepunkt, og en bæregass (her helium) benyttes for å forflytte prøven gjennom kolonnen. Prøven injiseres ved høy temperatur ( $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), men vil kondensere inne i kolonnen på grunn av lavere kolonnetemperatur ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). En temperaturgradient vil videre føre til at analyttene gradvis går over i gassfase og eluerer ut av kolonnen. Polare forbindelser har generelt høyere kokepunkt enn upolare forbindelser og vil derfor eluere på et senere tidspunkt. Størrelsen på forbindelsene vil også ha innvirkning på kokepunktet, og forbindelser med høyere molekylvekt vil generelt evaporere senere. I komplekse analyseblandinger vil ikke alle forbindelser skilles fra hverandre på bakgrunn av kokepunkt. Da kan det brukes en kolonne med polar stasjonærfase. Dermed vil forbindelser med polare grupper interagere med stasjonærfasen, mens upolare forbindelser vil eluere raskere. Forbindelsene separeres altså utfra to ulike egenskaper: flyktighet og polaritet (Miller 2009)

Detektoren som ble brukt i denne analysen er et massespektrometer (MS) med en singel kvadrupol. En kvadrupol består av fire parallelle metallstaver som er koblet til to potensialer - en radiofrekvens (RF) som alternerer og en likestrøm som er konstant. Ioner som produseres i ionekilden til instrumentet sendes gjennom kvadrupolen. Banen de beveger seg i vil til enhver tid bestemmes av det elektriske feltet slik at det kun er ioner med en viss  $m/z$  (masse/ladning) ratio som vil passere og nå detektoren. RF varieres for å bringe de ulike ionene til detektoren og danne et massespekter (De Hoffmann & Stroobant 2007). En slik kvadrupol er illustrert i figur 3.10.1.



Figur 3.10.1 Illustrasjon av en singel kvadrupol. Figuren er hentet fra Argoti (2008).

#### Materialer:

- Bæregass: Helium
- Instrumentblank: Heptan
- Prøver fra avsnitt 3.10.3

#### Metode:

Det ble tilført 1  $\mu\text{L}$  evaporert prøve til 10 mL bæregass. Prøven ble injisert med en splitinjektor der 2 mL prøve ble påsatt kolonnen, mens 8 mL prøve ble ventilert ut gjennom split-åpningen på instrumentet. Bæregasshastigheten var satt til 1,2 mL/min under hele analysen. Temperaturen til injektoren var 250 °C, og programmet til GC-ovnen varte i 76,35 minutter. Følgende temperaturprogram ble benyttet under analysen: 50 °C i 15 minutter, etterfulgt av en temperaturstigning på 10 °C/min opp til 130 °C. Deretter var det en temperaturstigning på 2 °C/min frem til 216 °C. Denne temperaturen ble opprettholdt i to

minutter før den økte til 270 °C med en hastighet på 40 °C/min. Den avsluttende temperaturen ble holdt i sju minutter. En instrumentblank ble kjørt på kolonna mellom hver prøve for å unngå forurensing av kolonnen. Programvaren Chromeleon ble brukt til å analysere dataene fra analysen, og MS-spektrene ble matchet opp mot databasen NIST 11 MS Database and MS Search Program (Mikaia et al. 2011) som inneholder et bibliotek av molekulære forbindelser og deres korresponderende massespektre.

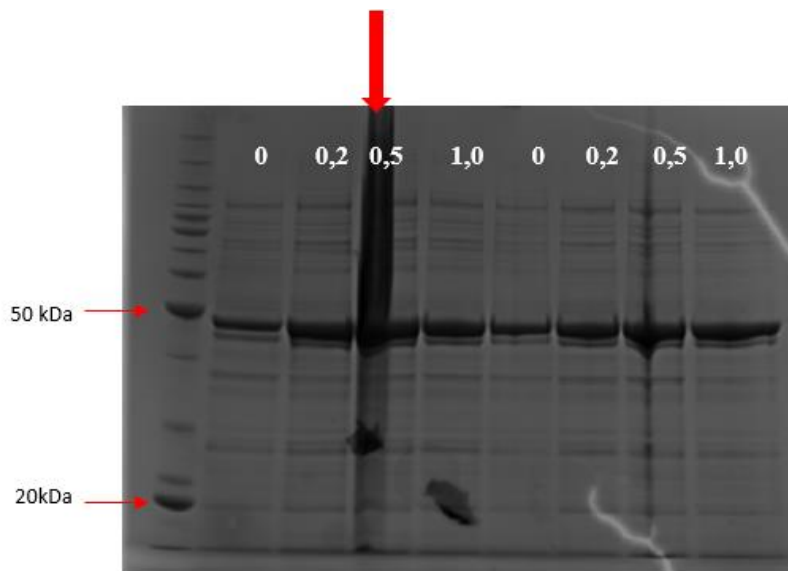
## 4. Resultater og diskusjon

### 4.1 Overuttrykk av proteiner – induksjonstester

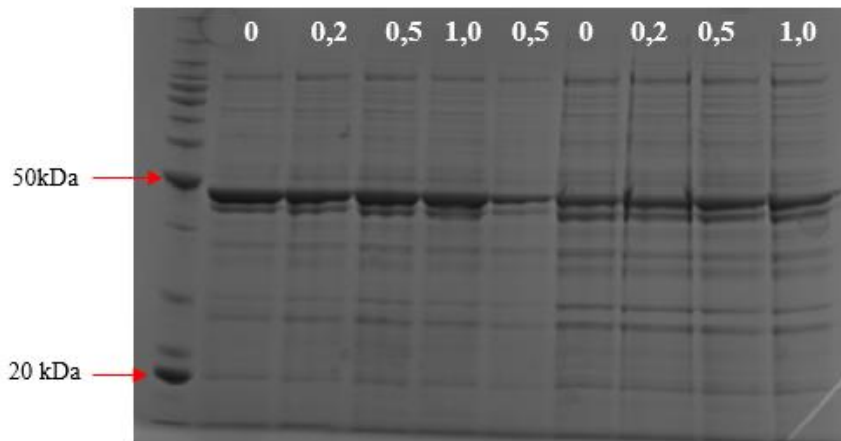
I denne oppgaven ble det forsøkt å uttrykke en dye decolorizing peroksidase, en katalase og en LPMO fra bakterien *Thermobifida fusca*. Dette ble gjort ved å transformere plasmider som inneholdt disse enzymene over i kompetente celler fra *E. coli* og deretter indukere dem med egnet inducer. Dette avsnittet viser resultatene av induksjonstestene i form av SDS-PAGE geler.

#### 4.1.1 *TfDyP*

Etter at genkonstruktet med kodonoptimalisert *TfDyP* fra Genscript ble transformert inn i kompetente One Shot® BL21 Star™ (DE3) celler ble det utført en induksjonstest som beskrevet i avsnitt 3.2.3 for å undersøke om det var overuttrykk av enzymet. Induksjonstesten ble utført ved fire ulike temperaturer og fire ulike konsentrasjoner av IPTG. SDS-PAGE gelene fra induksjonstestene er vist i figur 4.1.1 og 4.1.2. *TfDyP* har en molekylvekt på ca. 47 kDa.



Figur 4.1.1 SDS-PAGE geler fra induksjonstest av *TfDyP* ved 18 og 25 °C. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør. Brønn 2-5 inneholder cellopellet fra induksjon ved 18 °C, mens brønn 6-9 inneholder cellopellet fra induksjon ved 25 °C. Tallet plassert over hver enkelt brønn indikerer konsentrasjonen av IPTG i mM. Betingelsene valgt for videre dyrking er markert med en rød pil.

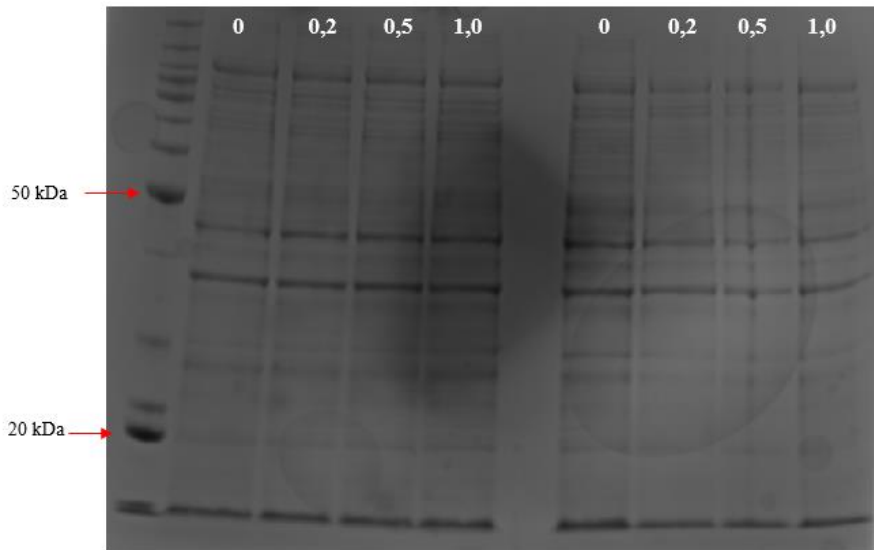


Figur 4.1.2 SDS-PAGE geler fra induksjonstest av *TfDyP* ved 30 og 37 °C. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør. Brønn 2-5 inneholder cellepellet fra induksjon ved 30 °C, mens brønn 7-10 inneholder cellepellet fra induksjon ved 37 °C. Brønn 6 inneholder cellepellet fra induksjon av frysestock med *TfDyP* ved 30 °C. Tallet plassert over hver enkelt brønn indikerer konsentrasjonen av IPTG i mM.

Alle betingelser viste uttrykk av *TfDyP* under induksjonstesten. Generelt ser det ut til at det er størst uttrykk ved lavere temperatur (18 og 25 °C). Både 0,2 og 0,5 mM IPTG gir stort uttrykk av protein. Det ble valgt å benytte betingelsene 18 °C og 0,5 mM IPTG ved storskala dyrking.

#### 4.1.2 *TfKat*

Som for *TfDyP* ble det også utført induksjonstester på *TfKat* som beskrevet i avsnitt 3.2.3. I tillegg til ulike temperaturer og konsentrasjoner av IPTG ble det også forsøkt å tilsette 0,5 mM 5-aminolevulinsyre til alle prøvene under induksjonstestene siden *TfKat* er et enzym som inneholder en heme-gruppe, og dette har blitt benyttet for å uttrykke enzymet i tidligere studier (Lončar & Fraaije 2015). Induksjonstester ble utført på både kodonoptimalisert og ikke-kodonoptimalisert *TfKat*. En SDS-PAGE gel fra en induksjonstest utført ved 18 og 25 °C på kodonoptimalisert *TfKat*, uten tilsetning av 5-aminolevulinsyre er vist i figur 4.1.3. De andre induksjonstestene som ble utført ga samme resultat. *TfKat* har en molekylvekt på ca. 62,5 kDa.

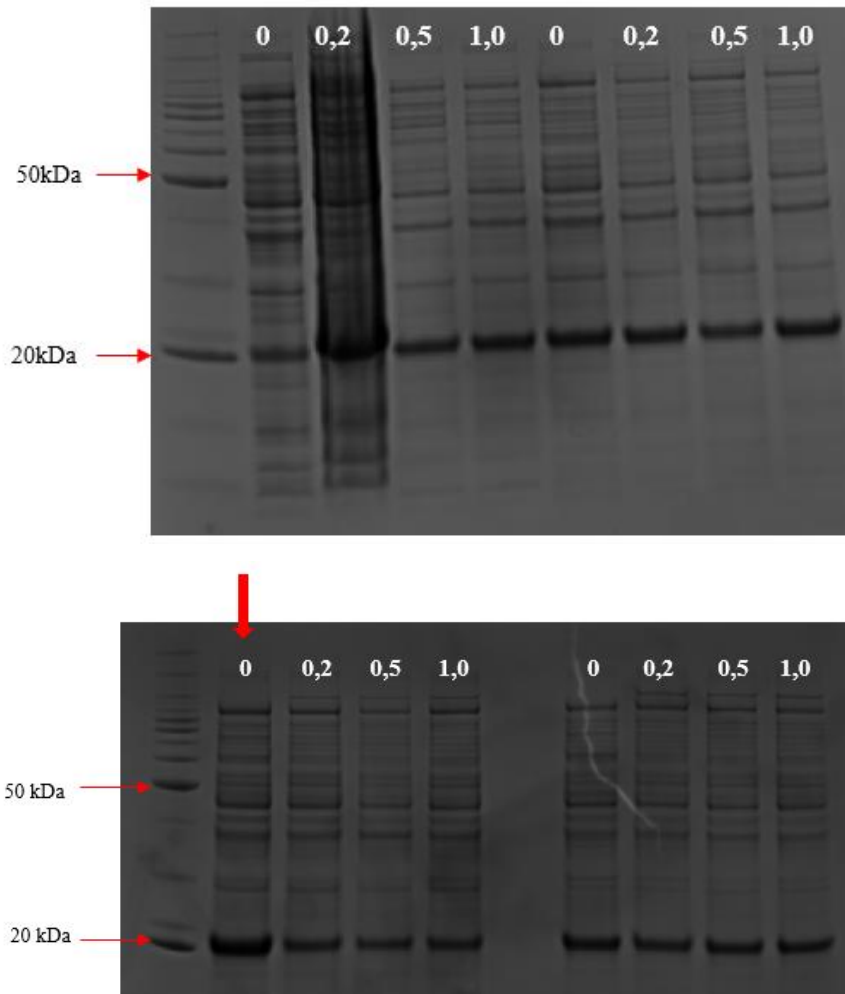


Figur 4.1.3 SDS-PAGE fra induksjonstest av kodonoptimalisert *TjKat* ved 18 (brønn 2-5) og 25 (brønn 7-10) °C uten tilsetning av heme-inducer. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør. Tallet plassert over hver enkelt brønn indikerer konsentrasjonen av IPTG i mM. Det ble ikke observert uttrykk ved noen av betingelsene.

Ingen av betingelsene viste uttrykk av *TjKat*. Grunnen til at konstruktet ikke gir uttrykk er ukjent. Undersøkelse ved bruk av Uniprot (ID: Q47PD5) viser at proteinet har kun ett domene, og derfor burde være enkelt å uttrykke. Uttrykk av rekombinante hemeproteiner i *E. coli* begrenses ofte av at majoriteten av protein som blir produsert mangler heme-gruppe (Varnado & Goodwin 2004). Selv om heme-induceren 5-aminolevulinsyre ble tilsatt under induksjon kan ikke tilstrekkelig inokorporering av heme-gruppe være en årsak til at proteinet ikke uttrykkes. Det ble besluttet å ikke fortsette forsøket på å overuttrykke *TjKat* under arbeidet med denne oppgaven.

#### 4.1.3 *TjLPMO-E7*

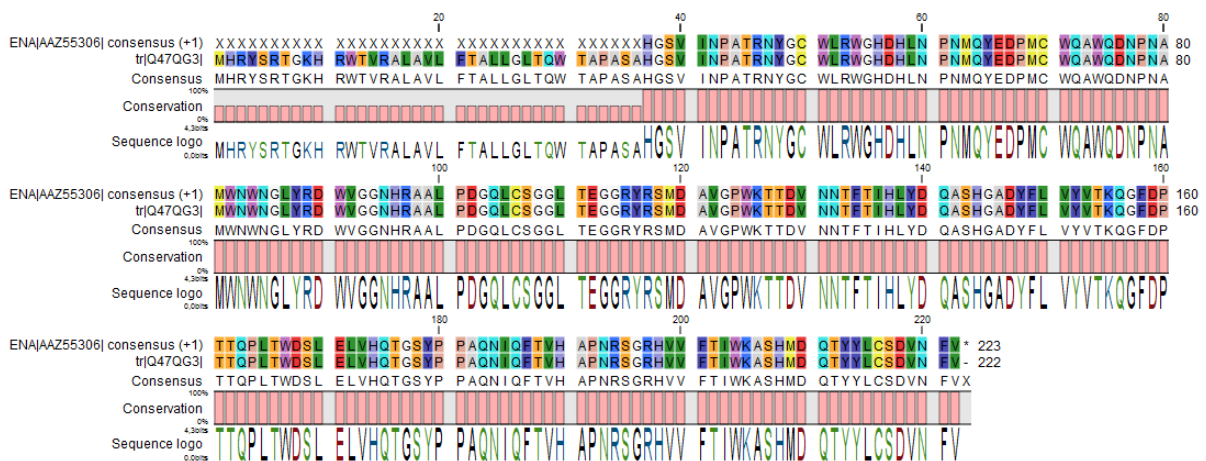
Resultatet av induksjonstester utført på *TjLPMO-E7* fra Genscript er vist i figur 4.1.4. *TjLPMO-E7* har en molekylvekt på ca. 22 kDa.



Figur 4.1.4 SDS-PAGE geler fra induksjonstester av *TflPMO-E7* ved 18, 25 (topp), 30 og 37 (bunn) °C. I begge gelene er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør. Brønn 2-5 på gelen til venstre inneholder cellepellet fra induksjon ved 18 °C, mens brønn 6-9 inneholder cellepellet fra induksjon ved 25 °C. Brønn 2-5 på gelen til høyre inneholder cellepellet fra induksjon ved 30 °C, mens brønn 7-10 inneholder cellepellet fra induksjon ved 37 °C. Tallet plassert over hvert enkelt brønn indikerer konsentrasjonen av IPTG i mM.. Størst uttrykk ble observert ved betingelsene 30 °C og 0 mM IPTG.

Størst uttrykk av *TflPMO-E7* ble observert ved 30 °C uten induksjon med IPTG. Disse betingelsene ble derfor brukt videre ved dyrking av proteinet i storskala. Dyrking ved 30 °C i storskala ga ikke uttrykk av protein. Det ble først forsøkt å redusere dyrkningsvolumet fra 1 til 0,5 L, men dette ga ikke utslag på proteinuttrykket. På grunn av mistanke om dannelse av uløselige proteinaggregater ble det forsøkt å dyrke kulturen ved 18 °C istedenfor 30 °C. Dette er nukleære eller cytoplasmiske aggregater av proteiner som dannes i *E. coli* ved høyt uttrykk av heterologt protein. Dyrking ved 18 °C ga uttrykk av *TflPMO-E7*, men kun ved bruk av dagsferske transformanter. Denne protokollen ble derfor brukt for videre dyrking av *TflPMO-E7*.

På grunn av vanskeligheter med å uttrykke E7 med konstruktet fra Genscript ble det parallelt med dette forsøkt å uttrykke enzymet fra frysestocker og plasmid tillaget i 2011 av postdoktor Zarah Forsberg. Det ble dyrket opp og isolert plasmid fra frysestockene (jf. avsnitt 3.2.5) som senere ble sendt til GATC Biotech i Tyskland for sekvensering. Resultatet viste at sekvensen for *TfLPMO-E7* fortsatt var intakt. Dette er vist i figur 4.1.5. Deretter ble det forsøkt å transformere plasmidene over i One Shot® BL21 Star™ (DE3) celler, men ingen av plasmidene gjennomgikk vellykket transformasjon. Grunnen til at transformasjonen av plasmidene over i kompetente celler ikke fungerte er uvisst. Siden det etter hvert ble utviklet en fungerende protokoll for dyrking av *TfLPMO-E7* fra Genscript i storskala ble det ikke sett på som nødvendig å fortsette forsøket på å få uttrykk av protein fra disse plasmidene.

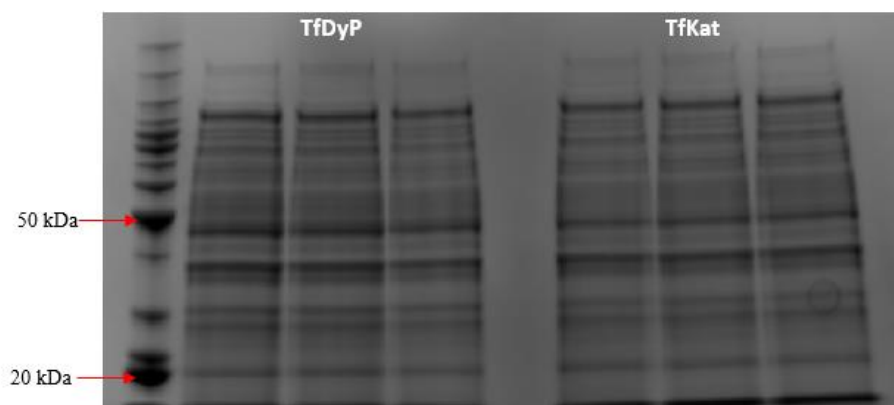


Figur 4.1.5 Sekvenseringsresultater for *TfLPMO-E7*. Bokstavkodene viser at sekvensen matcher sekvensen funnet via Uniprot.

#### 4.1.4 *TfDyP* og *TfKat* (med His-tag)

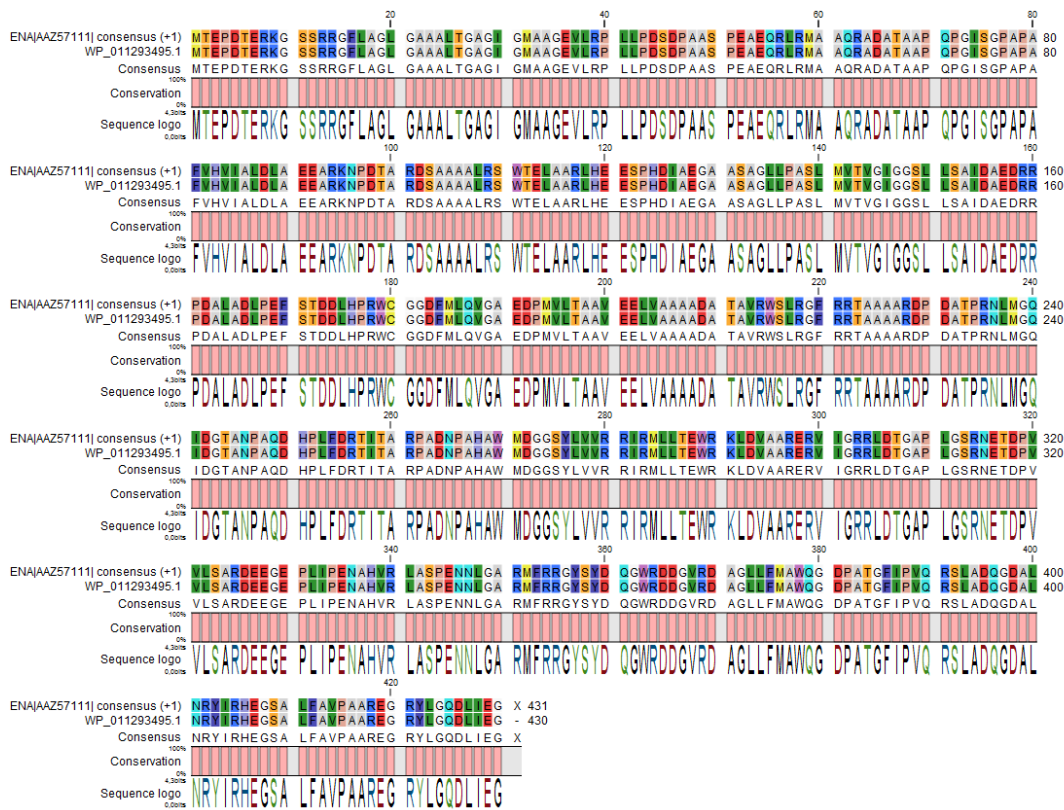
På grunn av manglende overuttrykk av *TfKat* og problemer med å rense *TfDyP* fra Genscript ble det bestilt ferdig rensede plasmider med disse enzymene som inneholdt His-tag fra firmaet Gecco. Protokoller for uttrykk og rensing av disse enzymene er tidligere publisert (Lončar & Fraaije 2015; van Bloois et al. 2010), og derfor var det forventet overuttrykk av disse enzymene. Dyrking av enzymene i storskala ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.9 (*TfDyP* (med His-tag)) og 3.2.10 (*TfKat* (med His-tag)). Etter dyrking og lysing ble lysatene analysert med SDS-PAGE. Resultatet av dette er vist i figur 4.1.6. Ingen av enzymene var tilstede i de respektive lysatene.



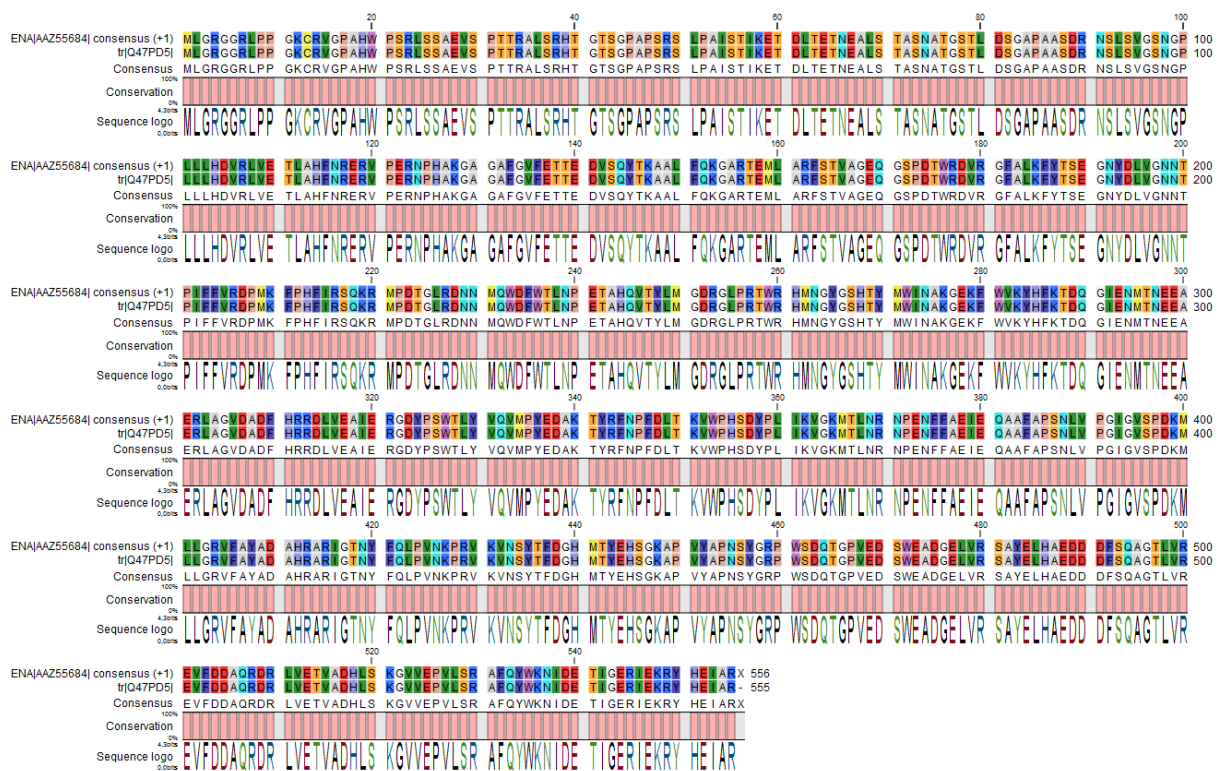


Figur 4.1.6 SDS-PAGE gel av *TfDyP* (med His-tag) (til venstre, brønn nummer 2, 3, 4) og *TfKat* (med His-tag) (til høyre, brønn nummer 7, 8, 9) lysat. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør. Dyrking og lysering av enzymene i storskala ble utført som beskrevet i avsnitt 3.2.9 (*TfDyP*) og 3.2.10 (*TfKat*). Enzymene var ikke uttrykt i noen av lysatene.

Grunnen til at det var problemer med konstruktene er uvisst da forsøk på overekspressjon ble utført som beskrevet i de respektive forskningsartiklene. For å forsikre oss om at det ikke var problemer med konstruktene vi hadde mottatt ble begge plasmidene sendt til sekvensering hos GATC Biotech (som beskrevet for *TfLPMO-E7* i avsnitt 3.2.7). Resultatet av sekvenseringen er vist i figur 4.1.7 (*TfDyP* (med His-tag)) og 4.1.8 (*TfKat* (med His-tag)). DNA-sekvensene til *TfDyP* (med His-tag) og *TfKat* (med His-tag) i konstruktene var intakte. Det ble korrespondert med Nicola Lončar fra Gecco via e-post den 20. februar 2018, men han hadde heller ingen forslag til hva som kunne ha gått galt ved dyrking av proteinene.



Figur 4.1.7 Sekvenseringsresultater for TfDyP (med His-tag). Bokstavkodene viser at sekvensen vår matcher den opprinnelige proteinsekvensen.



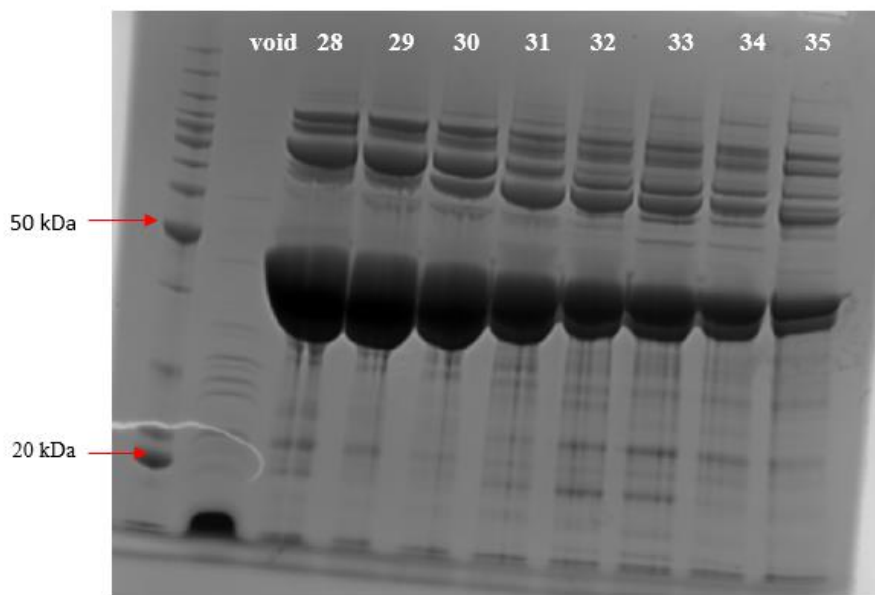
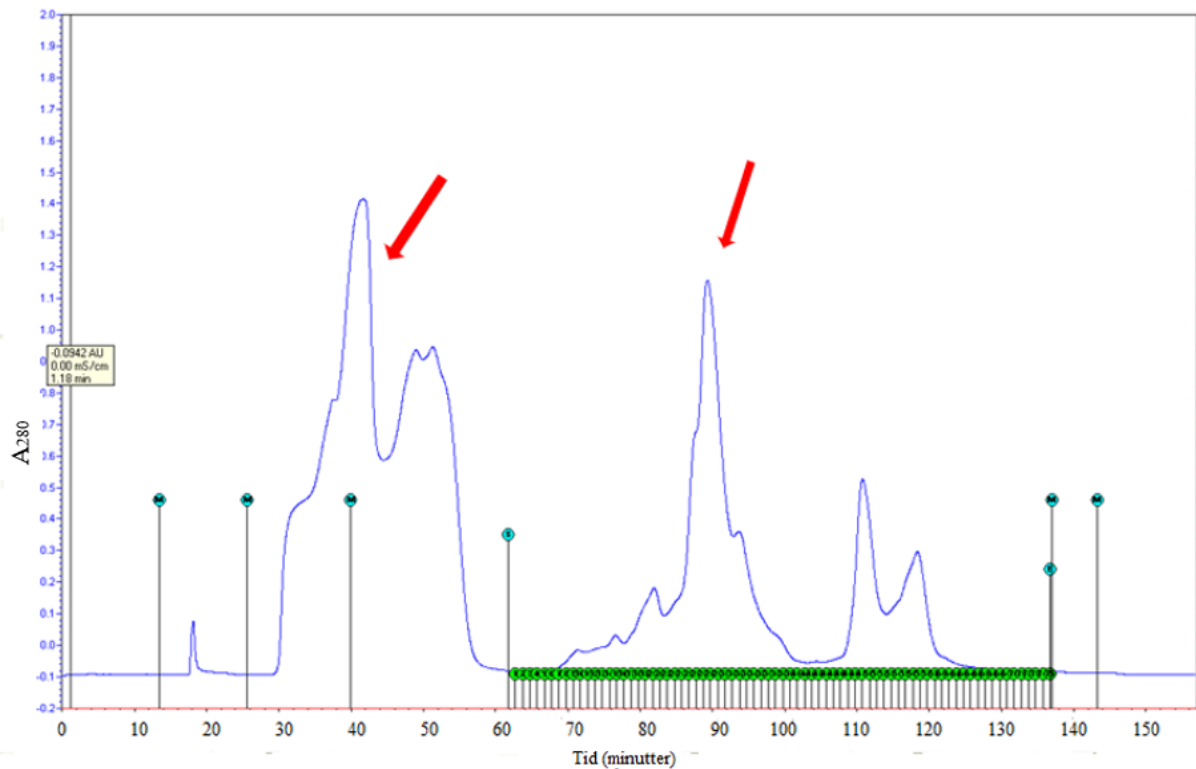
Figur 4.1.8 Sekvenseringsresultater for TfKat (med His-tag). Bokstavkodene viser at sekvensen vår matcher den opprinnelige proteinsekvensen.

## 4.2 Rensing av Proteiner

Celleekstrakt som inneholdt de ulike enzymene ble forsøkt rensset med ulike kromatografiske metoder. CBP21 og *TfLPMO-E7* ble rensset med affinitetskromatografi ved bruk av kitin som tidligere beskrevet for disse proteinene (Forsberg et al. 2014; Vaaje-Kolstad et al. 2005). *TfDyP* ble forsøkt rensset ved bruk av en tre-trinns rensemetode bestående av ionebytterkromatografi (IEC) på en sterk anionbytter, hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) og gelfiltrering (SEC) før en rekke andre teknikker ble forsøkt for å fjerne kontaminerende proteiner. SDS-PAGE ble benyttet for å undersøke renheten til proteinene etter hvert enkelt rensetrinn. Følgende avsnitt viser resultatet av de ulike renseprosessene.

### 4.2.1 *TfDyP*

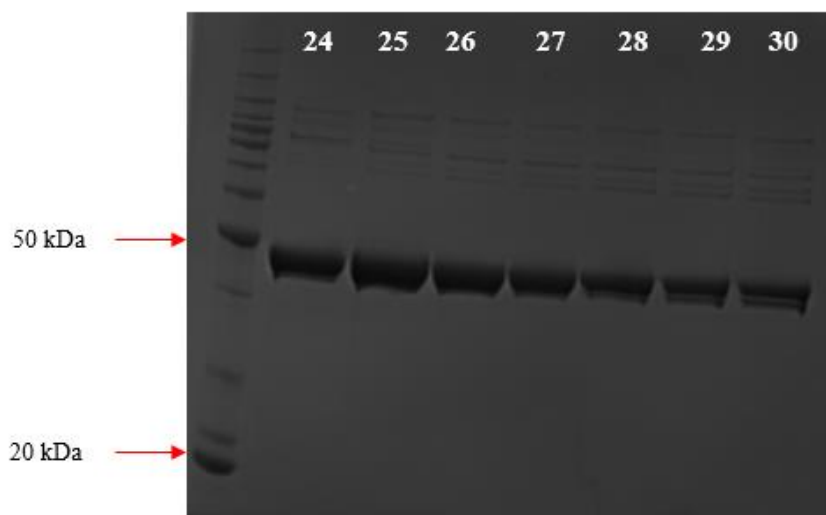
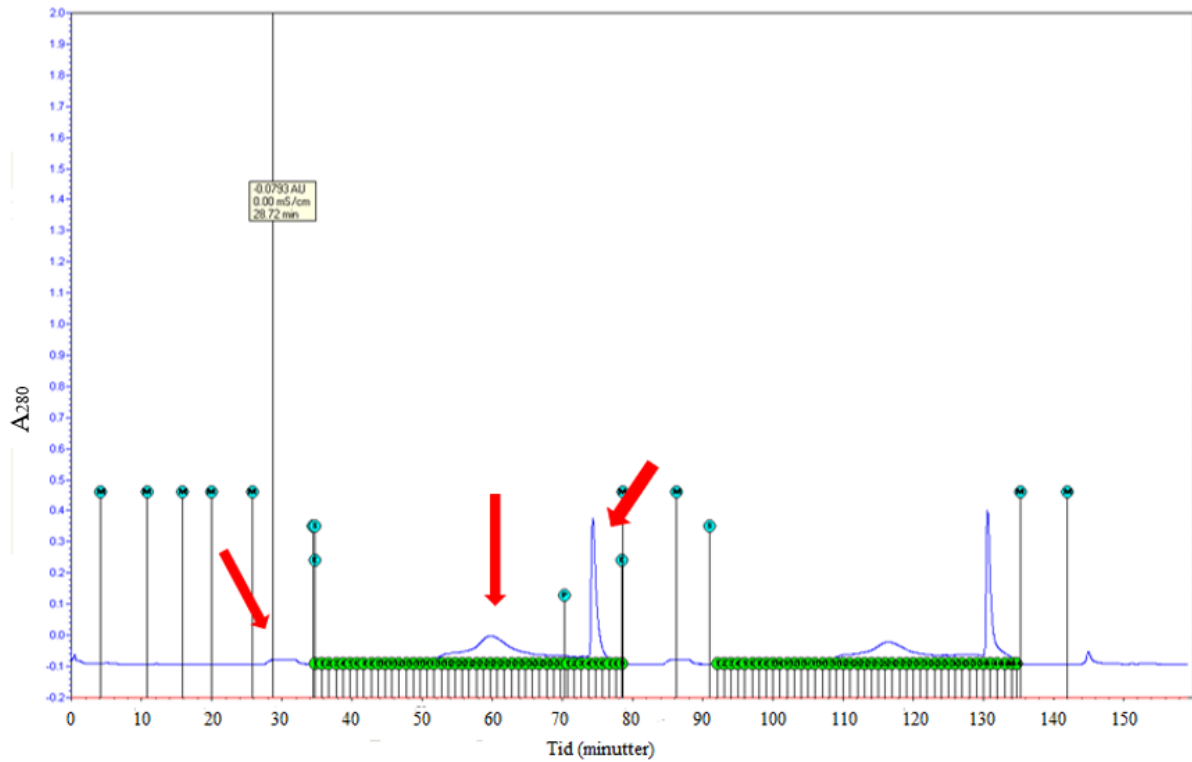
Figur 4.2.1 viser kromatogram og gelbilde fra rensing av *TfDyP* med ionebytterkromatografi på sterk anionbytter. Den første toppen i kromatogrammet er void-toppen med alle proteinene som ikke har bundet til kolonnen. Proteinet ble deretter eluert med en gradient av NaCl, og det ble samlet fraksjoner som beskrevet i avsnitt 3.5.1. *TfDyP* eluerte ved ca.40-45 % NaCl, etter ca. 112-132 mL buffer var påsatt (22-26 kolonnevolum). *TfDyP* har en molekylvekt på ca. 47 kDa.



Figur 4.2.1 Kromatogram (topp) og gel (bunn) fra rensing av *TfDyP* med IEC på sterk anionbytter. Pilene indikerer void-toppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet. Proteinet eluerte ut etter ca. 22-26 kolonnevolum buffer var påsatt. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 er voiden, mens brønn 3-10 inneholder fraksjonene med ønsket protein fra rensingen.

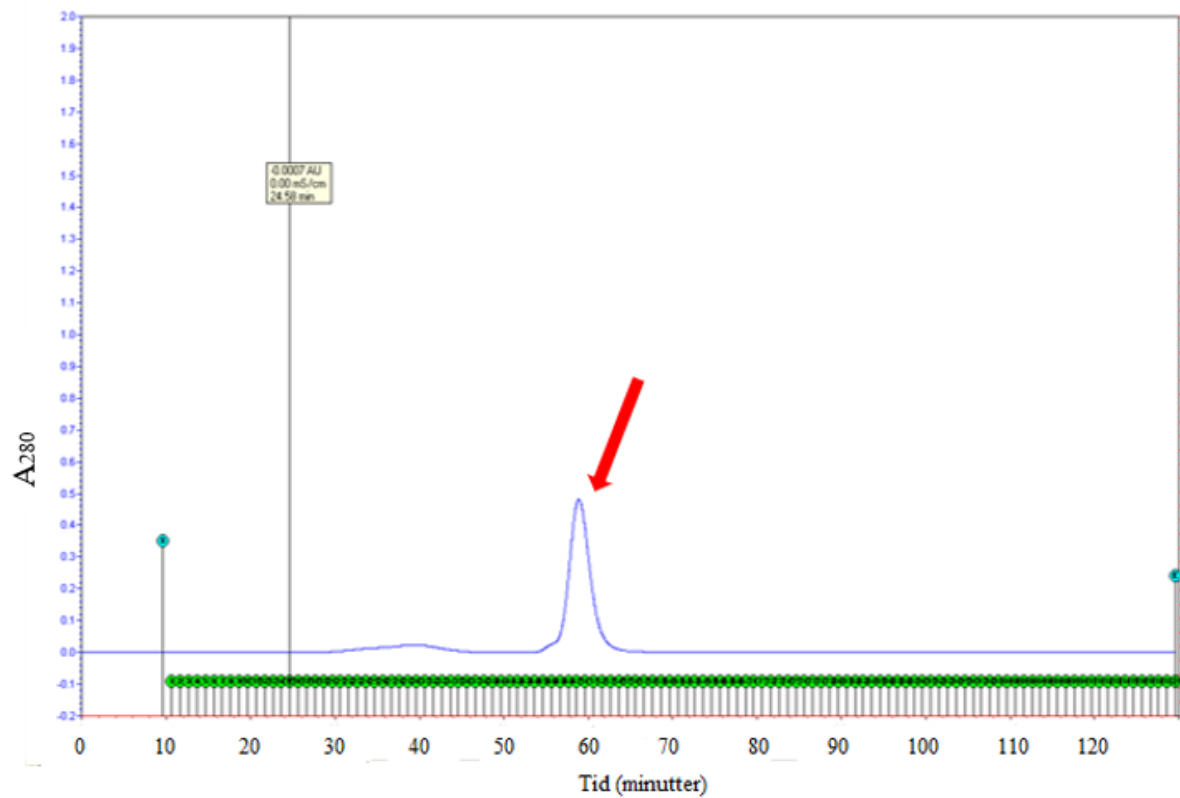
Fraksjonene fra ionebytterkromatografi som som inneholdt *TfDyP* ble slått sammen og rensset med hydrofob interaksjonskromatografi. Figur 4.2.2 viser kromatogram og gelbilde fra rensing av *TfDyP* med HIC. Den første toppen i kromatogrammet er void-toppen. Proteinets ble deretter

eluert med en synkende gradient av  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (jf. avsnitt 3.5.2). Rensingen ble utført i flere runder for å unngå overbelastning av kolonnen. *TfDyP* eluerte ved ca. 55-70 % NaCl, etter ca. 96-120 mL buffer var påsatt (19-24 kolonnevolum).

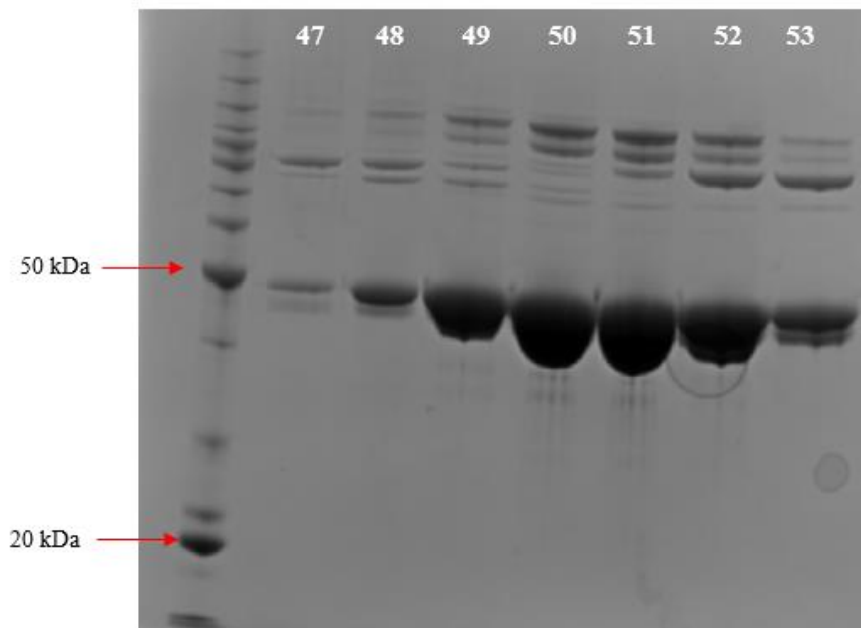


Figur 4.2.2 Kromatogram (topp) og gel (bunn) fra rensing av *TfDyP* med HIC. Pilene indikerer voidtoppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet. Proteinet eluerte ut etter ca. 19-24 kolonnevolum buffer var påsatt. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, mens brønn 2-8 inneholder fraksjonene med ønsket protein fra rensingen.

På grunn av urenhetter etter HIC ble proteinløsningen oppkonsentrert og renset ved bruk av gelfiltrering som beskrevet i avsnitt 3.5.4. Figur 4.2.3 og 4.2.4 viser henholdsvis kromatogram og gelbilde fra rensingen. Toppen som vises i kromatogrammet representerer *TfDyP*. *TfDyP* eluerte etter ca. 48-52 mL buffer var påsatt. Ett kolonnevolum tilsvarer 120 mL.



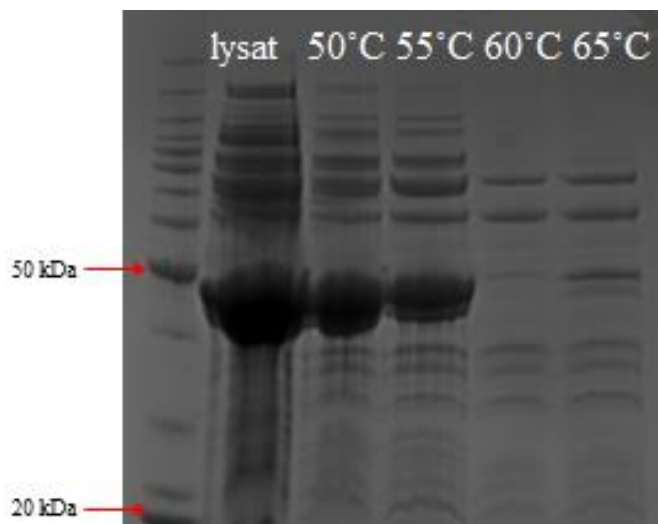
Figur 4.2.3 Kromatogram fra rensing av *TfDyP* med SEC. Toppen i kromatogrammet inneholder det ønskede proteinet. Proteinet eluerte ut etter ca. 48-52 mL buffer var påsatt.



Figur 4.2.4 SDS-PAGE gel fra rensing av TfDyP med SEC. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, mens brønn 2-8 inneholder fraksjonene med ønsket protein fra rensingen. Til tross for tre rensetrinn er det flere urenheter ved 80-100 kDa.

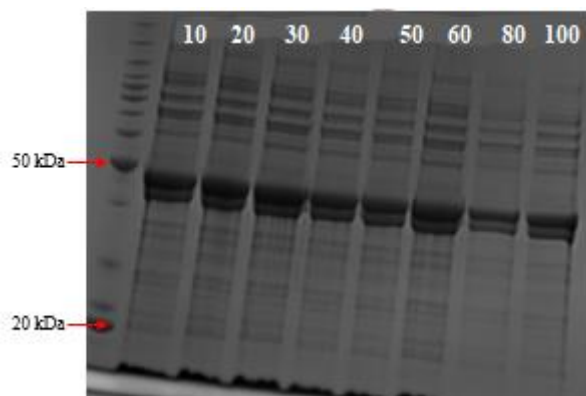
Som vist i figur 4.2.4 var ikke proteinet rent etter de tre rensetrinnene. Båndene ved 80-100 kDa har såpass høy intensitet sammenlignet med TfDyP at de sannsynligvis vil interferere ved bruk av TfDyP i enzymreaksjoner. En årsak til at urenheterne ikke forsvinner på SEC kan være at noen av de større molekylene fortsatt interagerer svakt med SEC-kolonnen. Dersom dette er tilfellet kan de eluere ut samtidig som TfDyP og maskeres i den samme toppen i kromatogrammet. Da vil det være vanskelig å skille molekylene. En annen årsak kan være at TfDyP eksisterer som en multimer i løsningen. I så tilfelle vil multimeren og høyvektsmolekylene også eluere ut samtidig. For å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av en multimer av TfDyP kan bufferløsningen analyseres på en nativ proteingel. Her vil proteinet kjøres på gelen uten først å denatureres, og en evt. multimer vil gi et tydelig bånd ved en høyere molekylvekt. Disse mulige årsakene ble fremlagt av Dr. Åsmund Røhr Kjendseth ved en muntlig samtale den 26. april 2018.

Flere ulike metoder ble forsøkt for å fjerne urenheterne. Først ble varmebehandling av lysatet som beskrevet i avsnitt 3.5.5 forsøkt. Fire ulike temperaturer ble testet, og resultatet er vist i form av en gel i figur 4.2.5. Urenheterne forsvinner ved temperaturer over 60 °C, men ved disse temperaturene denaturerer også TfDyP. Dermed ble det konkludert med at varmebehandling ikke vil gi noen positiv effekt på rensemetoden.



Figur 4.2.5 SDS-PAGE gel fra varmedenaturering av TfdyP lysat. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 lysat fra TfdyP, mens i brønn 3-6 er det påsatt lysat som er varmebehandlet ved henholdsvis 50, 55, 60 og 65 °C. Både interfererende bånd og TfdyP denaturerer ved temperaturer over 60 °C.

Videre ble det forsøkt å fjerne urenheterne ved hjelp av ammoniumsulfatutfelling (jf. avsnitt 3.5.6). Det ble forsøkt åtte ulike konsentrasjoner fra 10-100 mg/mL. Da proteinet har en relativt høy molekylvekt burde det ikke være nødvendig med høye konsentrasjoner av saltet for å få utfelling (Wingfield 2001). Supernatanten ble analysert med SDS-PAGE, og resultatet er vist i figur 4.2.6. Som vist på gelen er både de interfererende båndene og TfdyP fortsatt tilstede i supernatanten ved utfelling med 100 mg/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Dette er altså ikke en egnet metode for å fjerne urenheterne. Det er mulig at oppkonsentrering av lysatet kunne ha hjulpet på utfelling av protein, da kun 2 mL løsning ble benyttet ved testing av denne metoden.

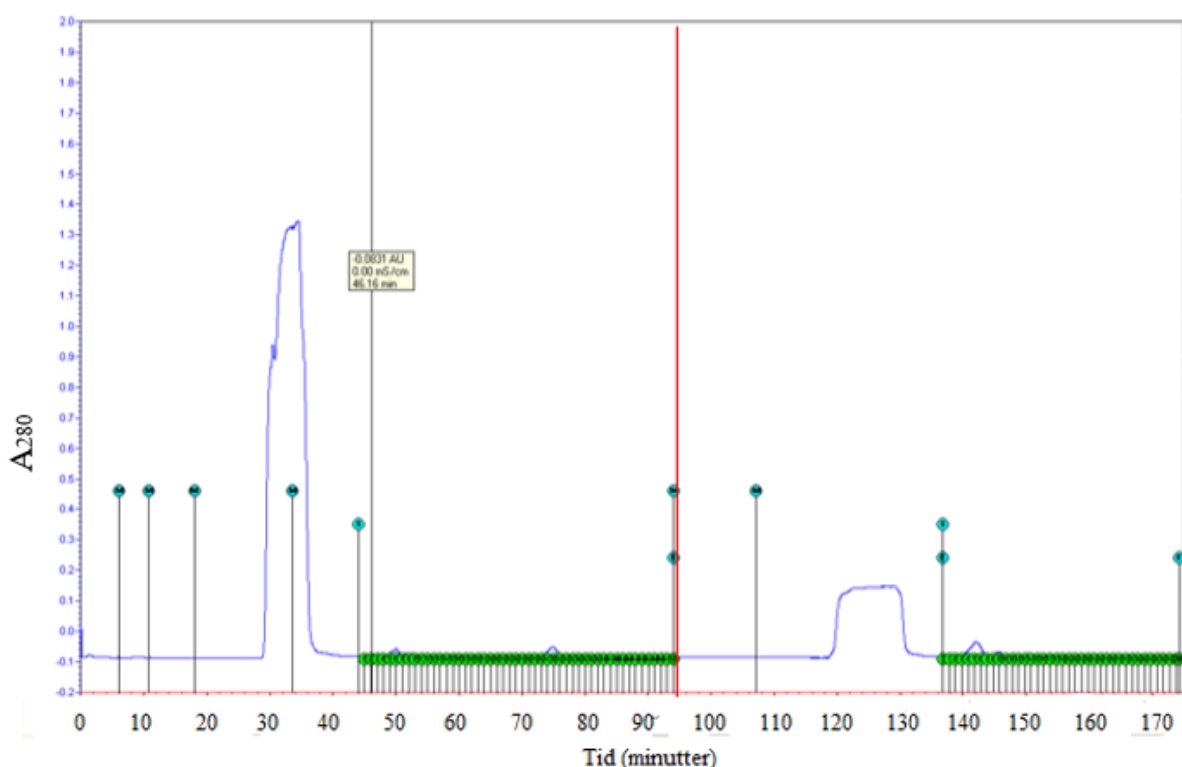


Figur 4.2.6 SDS-PAGE gel fra ammoniumsulfatutfelling av TfdyP lysat. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, mens brønn 2-9 inneholder supernatant fra lysat behandlet med henholdsvis 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 og 100 mg/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Både interfererende bånd og TfdyP er tilstede i supernatanten ved alle saltkonsentrasjoner.

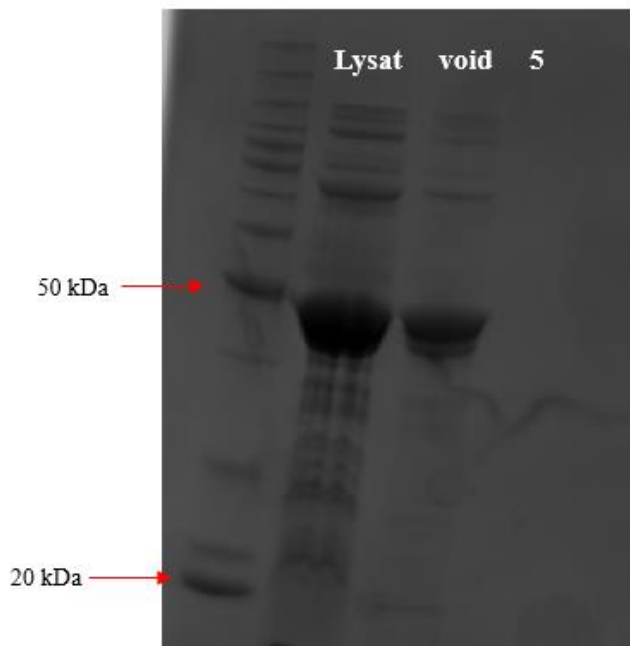


Som et alternativ til rensing med sterk anionbytter ble det i stedet forsøkt å rense *TfDyP* ved bruk av sterk kationbytter (jf. avsnitt 3.5.7). Figur 4.2.7 og 4.2.8 viser henholdsvis kromatogram og gelbilde fra rensingen utført ved pH 3,5. Rensing utført ved pH 3,0 ga et lignende resultat. Venstre side av kromatogrammet viser rensing av *TfDyP* på sterk kationbytter, mens høyre side av kromatogrammet viser rensing av *TfDyP* på sterk kationbytter utført på lysat som ble varmebehandlet ved 55 °C. Dette ble gjort for å undersøke om varmebehandlingen likevel hadde noen innvirkning på utfallet av rensingen. Gelen er fra rensing av lysat som ikke er varmebehandlet, men resultatet for de to fremgangsmåtene var tilnærmet likt. Som vist på gelen eluerte proteinet med voiden, og det ble konkludert med at denne rensemetoden ikke var egnet til å fjerne urenheterne.

pH ble valgt utifra enzymets pI. pI til *TfDyP* ble bestemt til å være 4,99 ved bruk av ExPASy Compute pI/Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Et vanlig utgangspunkt er å velge en buffer pH som er 0,5-1,5 pH-enheter lavere enn proteinets pI. Ettersom rensing ved pH 3,5 ikke fungerte, ble det også forsøkt en enda lavere pH.

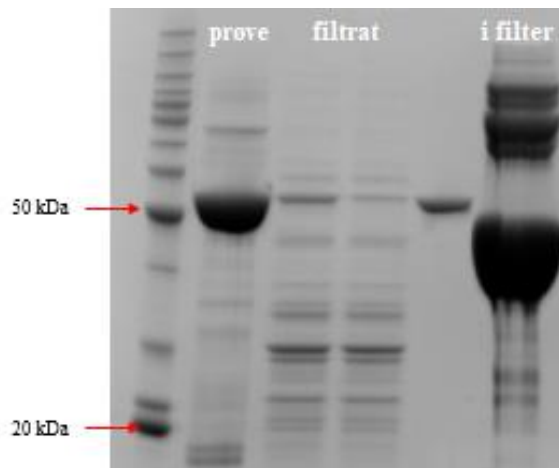


Figur 4.2.7 Kromatogram fra rensing av *TfDyP* med IEC på kationbytter ved pH 3,5. Toppene i kromatogrammet representerer voidtopper for rensing av lysat (til venstre) og rensing av lysat varmebehandlet ved 55 °C (til høyre).



Figur 4.2.8 SDS-PAGE gelbilde fra rensing av TfDyP med IEC på kationbytter ved pH 3.5. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 lysat, i brønn 3 void, mens brønn 4 ble påsatt en av fraksjonene fra gradienten (fraksjon 5). Som vist på gelen var det ikke nok protein tilstede i den aktuelle fraksjonen til at det ga utslag på gelen. All TfDyP eluerte med voiden.

Som et siste forsøk på å få fjernet urenheterne ble lysatet med TfDyP rensert på sterk anionbytter og HIC, etterfulgt av filtrering gjennom et 50 kDa porefilter (jf. avsnitt 3.5.8). Prøver ble tatt fra filtratet på flere tidspunkter underveis i filtreringen samt fra løsningen som ble igjen i selve filteret. Disse prøvene ble analysert med SDS-PAGE, og resultatet er vist i figur 4.2.9. Størrelsen på TfDyP var trolig for nært maksstørrelsen på porene i filteret, og all TfDyP ble derfor sittende igjen i filteret sammen med urenheterne.

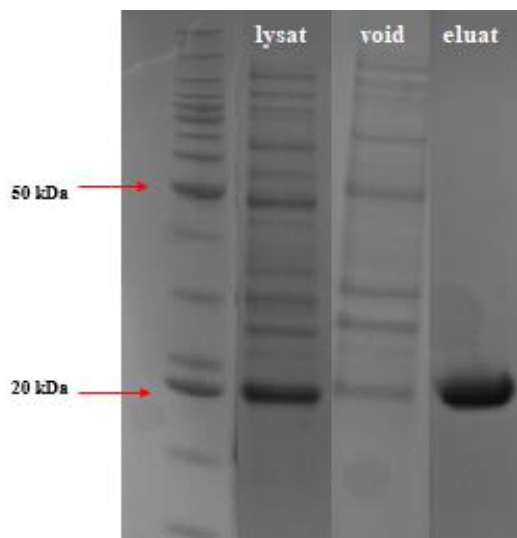
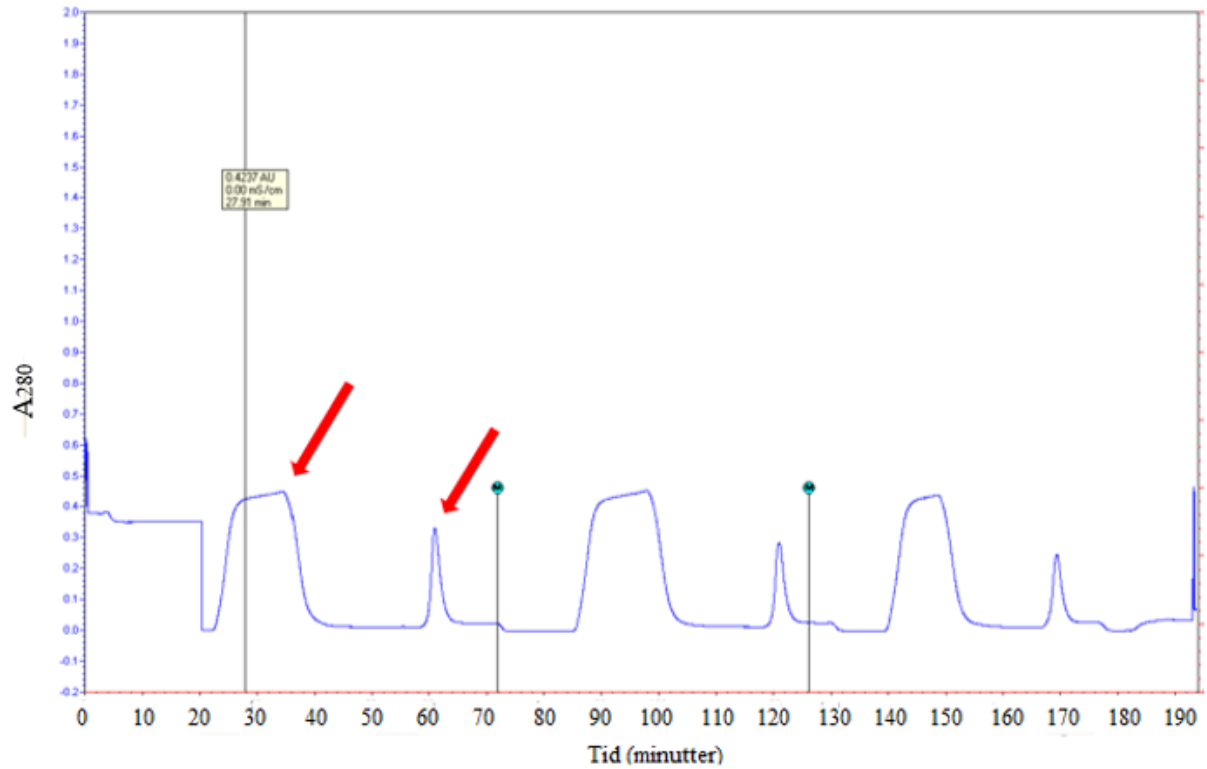


Figur 4.2.9 SDS-PAGE gel fra filtrering av proteinløsning med TfDyP gjennom et 50 kDa porefilter. I brønn 1 er det påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 den opprinnelige prøven før filtrering, i brønn 3-5 filtrat fra ulike tidspunkter underveis i filtreringen (hhv. etter ca. 5 mL løsning har passert gjennom filteret, ved under 5 mL volum gjenstående i filteret og ved under 2 mL volum gjenstående i filteret), mens brønn 6 er påsatt løsningen som var igjen i filteret etter endt filtrering. TfDyP var tilstede i filteret.

Etter dette forsøket ble det enighet om å ikke lenger forsøke å få renset TfDyP under arbeidet med denne oppgaven.

#### 4.2.2 CBP21

Figur 4.2.10 viser kromatogram og gelbilde fra rensing av CBP21 med affinitetskromatografi på kitin. Den første toppen representerer voidtoppen med proteiner som ikke bandt seg til kolonnematerialet. Den andre toppen i kromatogrammet viser eluering av CBP21 ved bruk av eddiksyre som beskrevet i avsnitt 3.5.9. Prøven ble renset i flere runder for å hindre overbelastning av kolonnen. CBP21 har en molekylvekt på ca. 21.6 kDa.

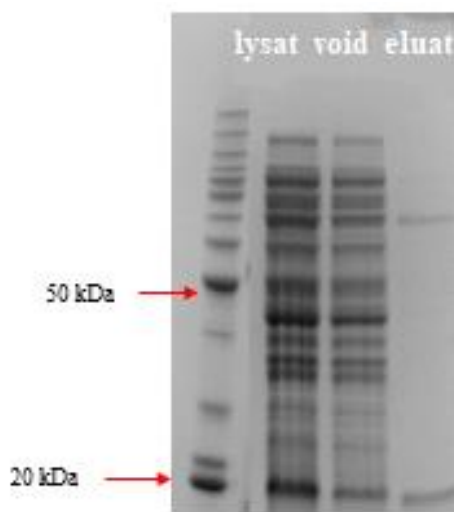
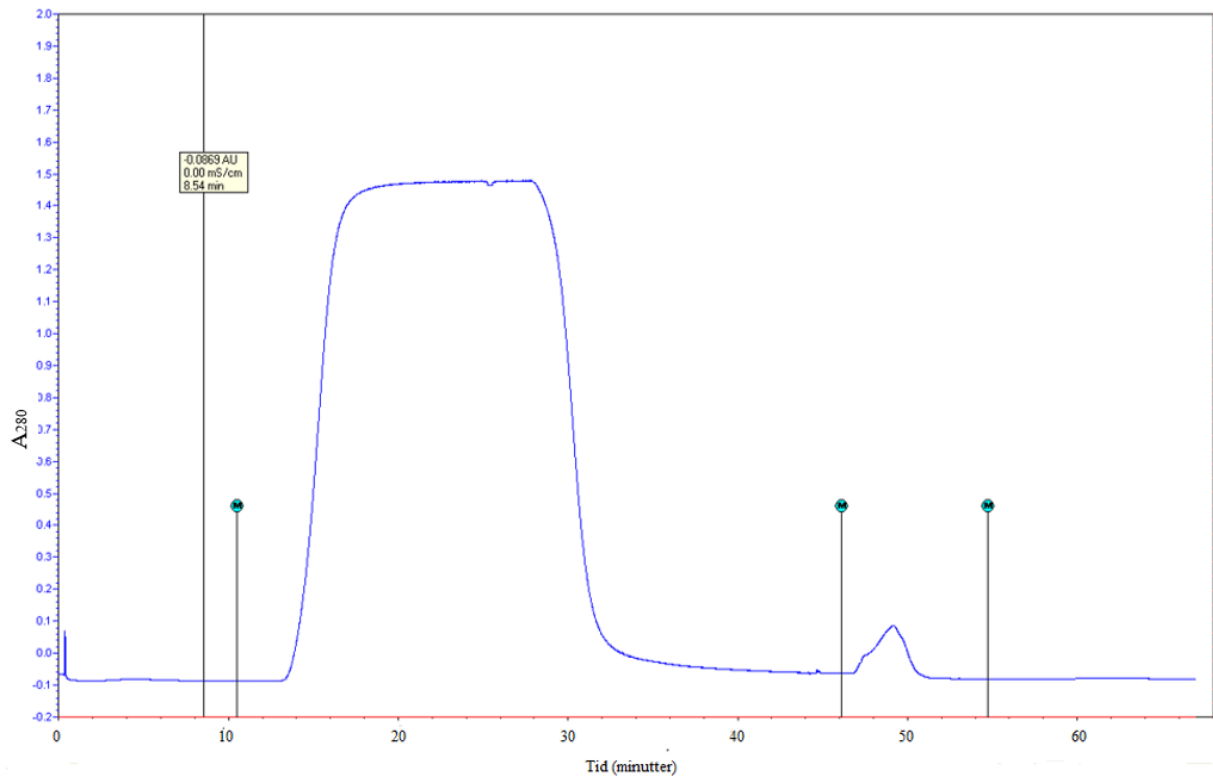


Figur 4.2.10 Kromatogram (topp) og gel (bunn) fra rensing av CBP21 med affinitetskromatografi på kitin. Pilene indikerer voidtoppen og toppen som inneholder det ønskede proteinet. Dette er reproducert to ganger senere i kromatogrammet. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 periplasmatiske ekstrakt, i brønn 3 void og i brønn 4 eluert CBP21.

Etter rensing og oppkonsentrering ble konsentrasjonen av CBP21 bestemt ved bruk av  $A_{280}$ . Det ble totalt dyrket 3 L CBP21, med et utbytte på ca. 4 mg/L kulturmedium.

### 4.2.3 *Tf*LPMO-E7

Figur 4.2.11 viser kromatogram og gelbilde fra rensing av *Tf*LPMO-E7 med affinitetskromatografi på kitin. Den første toppen representerer voidtoppen med protein som ikke bandt seg til kolonnematerialet. Proteinet ble deretter eluert ved bruk av eddiksyre som beskrevet i avsnitt 3.5.9. Den andre toppen i kromatogrammet viser eluering av *Tf*LPMO-E7. *Tf*LPMO-E7 har en molekylvekt på ca. 22 kDa. Gelbildet viser at ikke alt proteinet binder seg til kolonnen ved bruk av denne rensemetoden. Dette er fordi *Tf*LPMO-E7 er et celluloseaktivt protein og dermed ikke binder like godt til kitinkulene som for eksempel CBP21. Denne informasjonen var allerede kjent, da denne metoden tidligere hadde blitt brukt av Forsberg et al. (2014). Båndet ved ca. 70 kDa antas å være en trimer av proteinet. Det ble besluttet å ikke bruke mer tid på å rense *Tf*LPMO-E7 under arbeidet med denne oppgaven, da det ikke var tid til å utvikle en mer effektiv rensemetode. Det er nødvendig med en tidseffektiv rensemetode for å få nok enzym til forsøkene med den dampleksploderte bjørka. Postdoktor Zarah Forsberg meddelte i november 2017 at hun har forsøkt flere ulike IEC metoder uten å ha funnet en optimal metode for rensing. Et annet alternativ for å få nok protein kan være å optimalisere uttrykking av *Tf*LPMO-E7, slik at det vil være nok enzym igjen til reaksjonen selv etter tap av enzym under rensing.



Figur 4.2.11 Kromatogram (topp) og gel (bunn) fra rensing av TjLPMO-E7 med affinitetskromatografi på kitin. Den første toppen i kromatogrammet er voidtoppen, mens den andre toppen er eluering av TjLPMO-E7. På SDS-PAGE gelen er det i brønn 1 påsatt en størrelsesmarkør, i brønn 2 lysat fra TjLPMO-E7, i brønn 3 void og i brønn 4 eluert protein.

### 4.3 Degradering av dampeksplodert bjørk

I siste del av oppgaven ble dampeksplodert bjørk degradert med ulike enzymer for å undersøke effekten på cellulose og/eller ligninfraksjonen i substratet. Dampeksplodning fjerner mye av hemicellulosen slik at substratet er rikt på lignin og cellulose (Kumar et al. 2009). Det ble i utgangspunktet brukt en kommersiell cellulasecocktail (Celluclast<sup>®</sup>) sammen med en  $\beta$ -glukosidase før ulike ligninaktive enzymer deretter ble testet alene eller som et tilskudd til Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase. Forsøkene ble utført basert på en hypotese hvor initell effekt ligninaktive enzymer har på lignindelen av substratet måles ved økt effekt av Celluclast<sup>®</sup> på cellulosenedbrytning grunnet økt tilgjengelighet av cellulosen etterhvert som ligninet brytes ned.

#### 4.3.1 Bestemmelse av tørrstoffinnholdet i dampeksplodert bjørk

Bestemmelse av tørrstoffinnholdet i den dampeksploderte bjørka ble utført som beskrevet i avsnitt 3.9.2. Resultatet av dette er vist i tabell 4.3.1. Tørrstoffinnholdet i bjørka ble estimert til å være ca. 40 %.

Tabell 4.3.1 Bestemmelse av tørrstoffinnhold (%) i dampeksplodert bjørk.

	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
<b>Vekt før tørking (g)</b>	9,886	9,948	9,959
<b>Vekt etter tørking (g)</b>	3,962	3,940	3,977
<b>Tørrstoff (%)</b>	40,1	39,6	39,9

Tørrstoffinnholdet i bjørk vasket ved RT (20 °C) og 60 °C (jf. avsnitt 3.9.4) ble også bestemt ved bruk av LOD. Resultatet er vist i tabell 4.3.2. Tørrstoffinnholdet i den vaskede bjørka ble estimert til å være ca. 16 % uavhengig av temperatur.

Tabell 4.3.2 Bestemmelse av tørrstoffinnhold (%) i dampeksplodert bjørk vasket ved RT og 60 °C.

Vasket ved	60°C	60°C	60°C	RT	RT	RT
Parallell	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
<b>Vekt før tørking (g)</b>	5,047	4,996	5,011	5,006	5,023	5,033
<b>Vekt etter tørking (g)</b>	0,809	0,806	0,791	0,793	0,825	0,794
<b>Tørrstoff (%)</b>	16,0	16,1	15,8	15,8	16,4	15,8

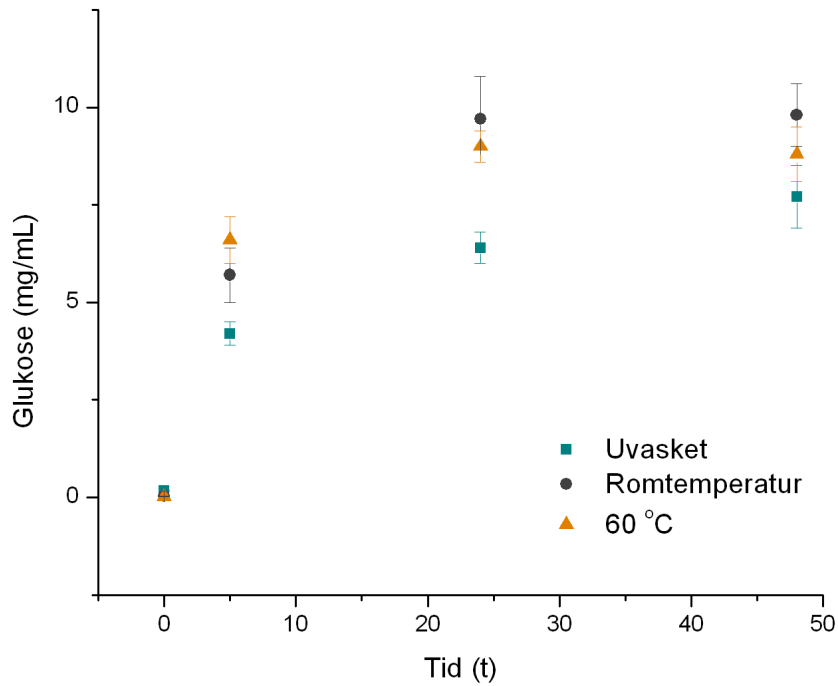
#### 4.3.2 Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast<sup>®</sup> og $\beta$ -glukosidase

Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast<sup>®</sup> ble utført med og uten  $\beta$ -glukosidase. Ved tilsetning av  $\beta$ -glukosidase var det ikke lenger mulig å finne spor av cellobiose i prøven som viser at all cellobiose ble brutt ned til glukose og at tilstrekkelig mengde  $\beta$ -glukosidase er tilsatt.

#### 4.3.3 Degradering av vasket og uvasket dampeksplodert bjørk

Den dampeksploderte bjørka ble vasket ved RT og 60 °C for å undersøke om denne forbehandlingen hadde effekt på mengde glukose dannet under reaksjonen. Forsøket ble gjennomført som beskrevet i avsnitt 3.9.4, og resultatet er presentert i figur 4.3.1.





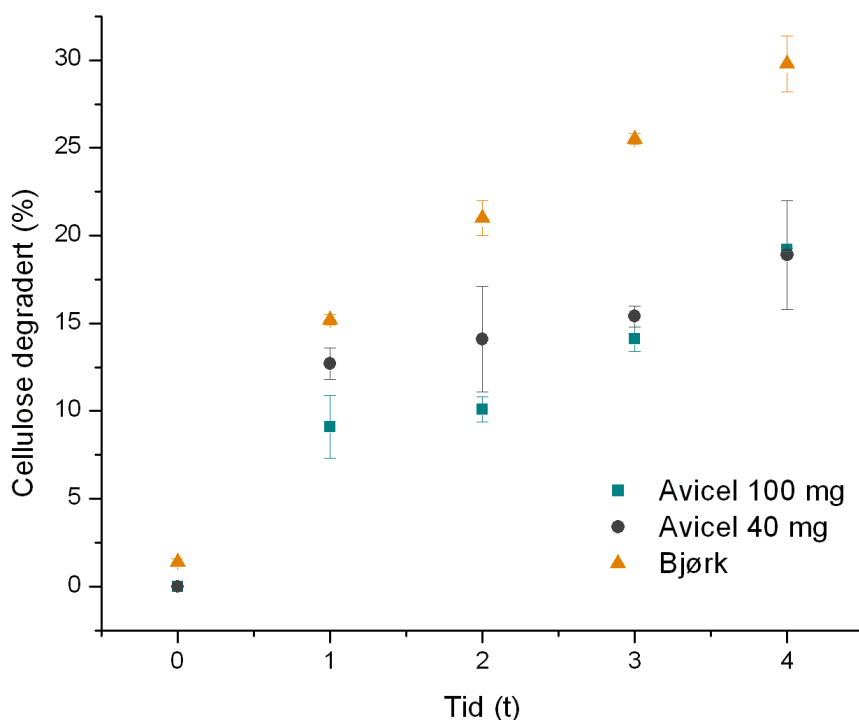
Figur 4.3.1 Glukosekonsentrasjon (mg/mL) med hensyn på tid for uvasket og vasket substrat ved RT og 60 °C. RT tilsvare her 20 °C.

Uvasket substrat har noe lavere produksjon av glukose etter 48 timer enn vasket substrat, men dersom det tas hensyn til standardavvikene er det kun vasking ved RT som gir et lite utslag hva angår økt produksjon av glukose. Denne gevinsten er såpass liten at det ble valgt å ikke vaske substratet før gjennomføring av flere forsøk.

#### 4.3.4 Degradering av Avicel<sup>®</sup>, PASC og dampeksplodert bjørk

Degradering av Avicel<sup>®</sup>, PASC og dampeksplodert bjørk ble utført over fire timer (jf. avsnitt 3.9.5) for å kunne sammenligne effektiviteten av nedbrytningen av cellulose ved ulik grad av kompleksitet i substratet.. Figur 4.3.2 sammenligner mengden cellulose degradert per tidsenhet for Avicel<sup>®</sup> og dampeksplodert bjørk. Ved forsøk gjennomført med PASC ble all cellulose brutt ned innen to timer etter reaksjonsstart.

Det ble tilsatt 100 mg tørrstoff av dampeksplodert bjørk til reaksjonene (5 % av 2 mL). Som vist i tabell 3.9.1, er ca. 40 % av biomassen i den dampeksploderte bjørka cellulose. Forsøket ble derfor gjennomført med to ulike mengder Avicel<sup>®</sup>, 40 og 100 mg, for å både kopiere total mengde tørrstoff og total mengde cellulose i substratet ved sammenligning.



Figur 4.3.2 Prosent cellulose degradert over tid av en enzymatisk cocktail bestående av Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ved bruk av bjørk og ulike mengder Avicel<sup>®</sup> som substrat.

Figuren viser at større mengder cellulose blir nedbrutt ved bruk av dampeksplodert bjørk som substrat sammenlignet med Avicel<sup>®</sup>. Hydrolyseraten til cellulose påvirkes vanligvis mest av hvor tilgjengelig substratet er for enzymet. Tilgjengeligheten til cellulose kan påvirkes av en

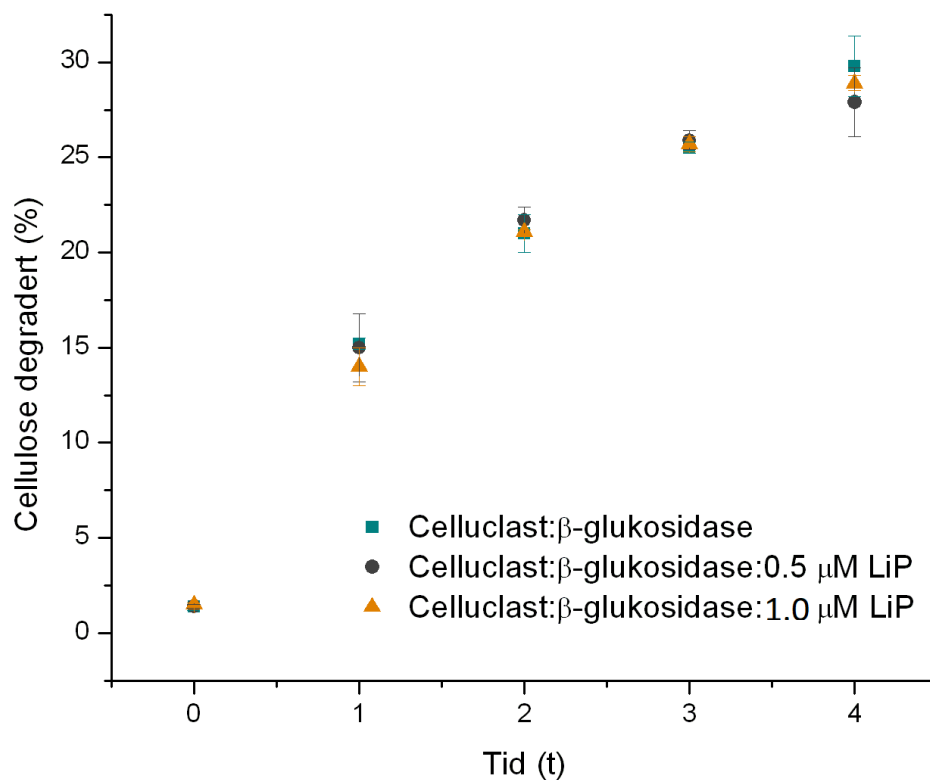
rekke faktorer som partikkelstørrelse, krystallinitet og tilstedeværelse og fordeling av hemicellulose/lignin. Ved bruk av PASC istedenfor Avicel senkes krystalliniteten til cellulosen til tilnærmet 0 %, og degraderingsevnen til enzymene øker betraktelig (Hall et al. 2010).

Krystalliniteten til cellulose varierer betydelig utfra hvilken metode som benyttes for å analysere substratet (Park et al. 2010). Ved bruk av Solid-state  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopi målte Hall et al. (2010) at den gjennomsnittlige krystalliniteten til Avicel<sup>®</sup> var ca. 60 %. Den gjennomsnittlige krystalliniteten til cellulose i ECF-bleket bjørk ble bestemt til å være ca. 41 % av Liitiä et al. (2003) ved bruk av samme metode. Merk at ECF-bleking av substratet fjerner ligninfraksjonen. Det er mulig forbehandlingen har innvirkning på krystalliniteten. Forskjellen i krystallinitet mellom de to substratene kan være årsaken til at degraderingen av den dampeksploderte bjørka er mer effektiv.

Årsaken til at PASC, Avicel<sup>®</sup> forbehandlet med konsentrert fosforsyre, degraderes mer effektivt enn dampeksplodert bjørk er sannsynligvis forskjellen i krystallinitet, kombinert med at tilstedeværelsen av lignin gjør det vanskeligere å bryte ned cellulosen i bjørka. Det er tidligere vist at degradering av PASC med og uten tilsatt lignin viser at hydrolyseraten til cellulasene går ned når det er lignin tilstede (Lu et al. 2016). Årsaken til dette er at cellulasene adsorberes til ligninet, noe som forhindrer hydrolysen av cellulose.

#### 4.3.5 Degradering av dampeksplodert bjørk med Celluclast<sup>®</sup>, $\beta$ -glukosidase og ulike konsentrasjoner av LiP

Et enkelt forsøksoppsett med Celluclast<sup>®</sup>,  $\beta$ -glukosidase og lignin peroksidase (LiP) fra *P. chrysosporium* ble utført som beskrevet i avsnitt 3.9.6. Hensikten var å teste hvorvidt tilsetning av LiP hadde noen effekt på grad av cellulosenedbrytning, og om mengden enzym brukt ga utslag på resultatet. Figur 4.3.3 viser prosent nedbrutt cellulose over tid for degradering med og uten LiP. LiP ble tilsatt i to ulike konsentrasjoner; 0.5 og 1  $\mu\text{M}$ . Resultatene ble tilpasset en kinetikkmodell beskrevet i avsnitt 3.10.2. Eksperimentelle verdier for parameterne  $A$  og  $b$  er vist i tabell 4.3.3.



Figur 4.3.3 Prosent cellulose nedbrutt plottet mot tid for ulike kombinasjoner av Celluclast®, β-glukosidase og LiP.

Tabell 4.3.3 Verdiene av parameterne  $A$  og  $b$ , med innlagt usikkerhet, for enzymatisk degradering av dampeksplodert bjørk med og uten enzymet LiP fra *P. chrysosporium*.

	$A$	$b$
<b>Celluclast: β-glukosidase</b>	$15,0 \pm 0,2$	$0,49 \pm 0,01$
<b>Celluclast: β-glukosidase: 0,5 μM LiP</b>	$15,6 \pm 0,8$	$0,44 \pm 0,04$
<b>Celluclast: β-glukosidase: 1,0 μM LiP</b>	$14,5 \pm 0,5$	$0,51 \pm 0,03$

Som vist i tabell 4.3.3 forble verdien av de to parameterne  $A$  og  $b$  uforandret ved tilsetning av LiP til reaksjonen. Mengden nedbrutt cellulose endret seg ikke. Det kan være flere grunner til dette. Lignin peroksidase er et ligninaktivt enzym og vil derfor ikke bryte ned cellulose direkte. Dette vil si at dersom lignin peroksidase sin modifisering av lignin ikke er tilstrekkelig til å gjøre cellulose mer tilgjengelig for cellulasene vil ikke effekten av enzymet kunne måles ved bruk av denne metoden. Det kan også være at enzymet ikke var aktivt under reaksjonen og at det er derfor vi ikke ser utslag på enzymaktiviteten over tid. Mangel på aktivitet kan skyldes

manglende kofaktor. Lignin peroksidase sitt behov for en kofaktor ved nedbrytning av lignin er noe uklart, og i litteraturen finnes det beskrivelser som både kan tolkes dit hen at LiP fungerer uten kofaktor (Datta et al. 2017) og at enzymet har behov for kofaktor i form av veratrylalkohol (VA) (Schoemaker & Piontek 1996). Det ble ikke tilsatt veratrylalkohol til enzymreaksjonen i dette tilfellet.

#### 4.3.6 Analyse av degraderingsprodukter med HPLC

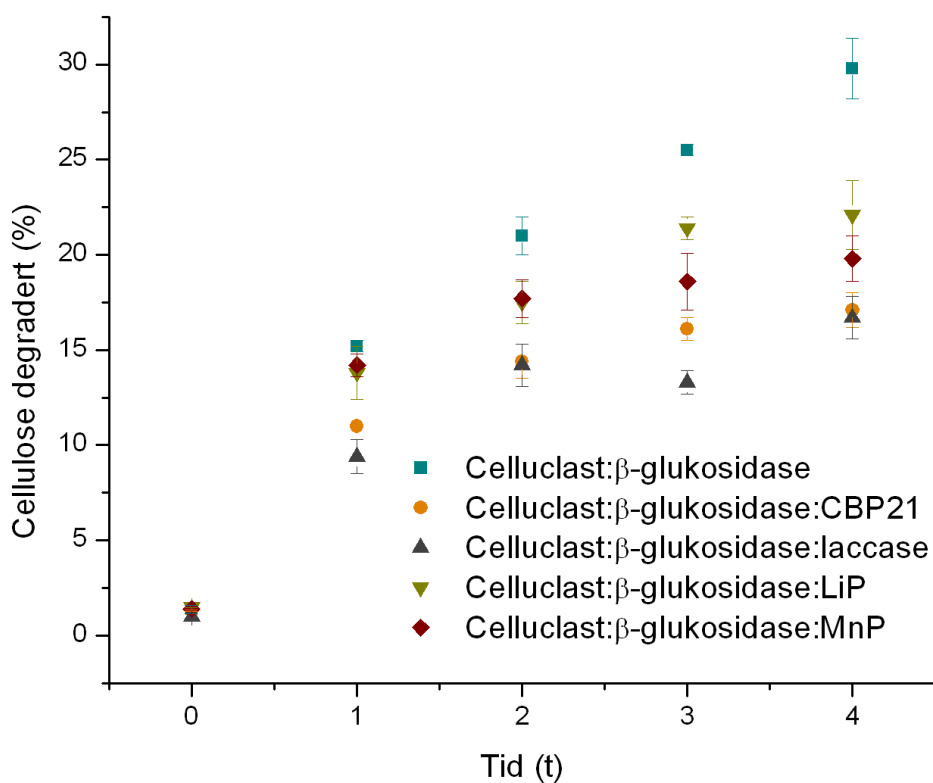
Etter de første forsøkene med LiP, Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ble det besluttet å gjennomføre forsøk med de to kommersielle ligninaktive enzymene LiP og MnP fra *P. chrysosporium* samt den kitinaktive LPMOen CBP21 fra *S. marcescens*, uten tilstedeværelse av de kommersielle cellulosedegraderende enzymene (jf. avsnitt 3.9.7). Dette ble utført for å undersøke om disse enzymene alene ville klare å modifisere den lignocellulosiske biomassen.

Prøvene ble analysert med HPLC for å undersøke om det hadde blitt produsert D-glukose under reaksjonen. Analysene viste ingen tegn til produksjon av glukose under reaksjonen, hverken for LiP, MnP eller CBP21. Dette er ikke overraskende da ingen av disse enzymene er celluloseaktive og dermed ikke vil være i stand til å produsere glukose eller cellobiose som produkter på egenhånd.

Degraderingsforsøk der en enzymcocktail bestående av kommersielle cellulaser (Celluclast<sup>®</sup>) og  $\beta$ -glukosidase ble tilsatt i tillegg til Lip, MnP, CBP21 og en laccase fra *T. versicolor* (jf. avsnitt 3.9.8) ble også utført. I dette forsøket ble det tilsatt veratrylalkohol som kofaktor til enzymreaksjonen med LiP.

Merk at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> her gradvis ble tilsatt til reaksjonen med CBP21, mens i forsøket i avsnitt 3.9.7 ble hele mengden tilsatt ved reaksjonsstart. For høye konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vil kunne føre til selvstendig inaktivering av LPMOen (Bissaro et al. 2017), og dette ble først tatt hensyn til ved utførelsen av dette forsøket. Det var ikke tilstrekkelig tid igjen til å gjennomføre forsøket i avsnitt 3.9.7 på nytt.

Den tidsavhengige produksjonen av glukose ble bestemt ved hjelp av HPLC, og dataene ble deretter tilpasset en kinetikkmodell, som beskrevet i avsnitt 3.10.2. En graf som viser resultatet av forsøkene er vist i figur 4.3.4. Eksperimentelle *A*- og *b*-verdier er vist i tabell 4.3.4.



Figur 4.3.4 Prosent cellulose degradert plottet mot tid for standard enzymcocktail med Celluclast<sup>®</sup> og β-glukosidase, og enzymcocktail tilsatt 1 μM av enzymene CBP21, Laccase, LiP og MnP.

Tabell 4.3.4 Verdien av parameterne A og b med innlagt usikkerhet, for enzymatiske forsøk gjennomført med Celluclast<sup>®</sup>, β-glukosidase og 1,0 μM av LiP, MnP, CBP21 eller Laccase.

	A	b
<b>Celluclast: β-glukosidase</b>	15,0 ± 0,2	0,49 ± 0,01
<b>Celluclast: β-glukosidase: 1,0 μM LiP</b>	13,9 ± 0,7	0,35 ± 0,05
<b>Celluclast: β-glukosidase: 1,0 μM MnP</b>	14,5 ± 0,5	0,23 ± 0,03
<b>Celluclast: β-glukosidase: 1,0 μM CBP21</b>	11,3 ± 0,4	0,31 ± 0,03
<b>Celluclast: β-glukosidase: 1,0 μM Laccase</b>	9,9 ± 1,3	0,36 ± 0,11

Som vist i figur 4.3.4 og tabell 4.3.4 fører tilsetning av LiP, MnP, CBP21 og laccase til ulik grad av cellulosedebrytning. Generelt fører tilsetning av enzym til en nedgang i prosent degradert cellulose, A-verdi og b-verdi sammenlignet med den opprinnelige enzymcocktailen. Nedgangen er størst ved tilsetning av laccase, og enzymaktiviteten på  $9,9 \pm 1,3$  er vesentlig lavere enn aktiviteten til de fire andre enzymkombinasjonene. Endringen i prosent degradert cellulose er minst ved tilsetning av LiP og MnP, men LiP har høyere b-verdi enn MnP. Det kan

være flere grunner til denne trenden. Tilgjengeligheten til substratet er en viktig faktor når det kommer til hydrolysering av lignocellulosisk biomasse. Analysene av substratet undersøkt på GC (se avsnitt 4.3.7 for flere detaljer) viste tilstedeværelse av voks, steroider og andre ekstraktiver i substratet. Disse kan ha interferert med bindingen av enzymene til substratet, og dermed gjort degraderingen av substrat mer utfordrende for enzymene. Dette vil sannsynligvis påvirke både de celluloseaktive og de ligninaktive enzymene, men det er mulig at de ligninaktive enzymene påvirkes i større grad. Dersom dette er tilfellet kan de ligninaktive enzymene som forsøker å binde til substrat, men mislykkes, bli til hinder for cellulasetene i cocktailen, og muligens gi en inhiberende effekt.

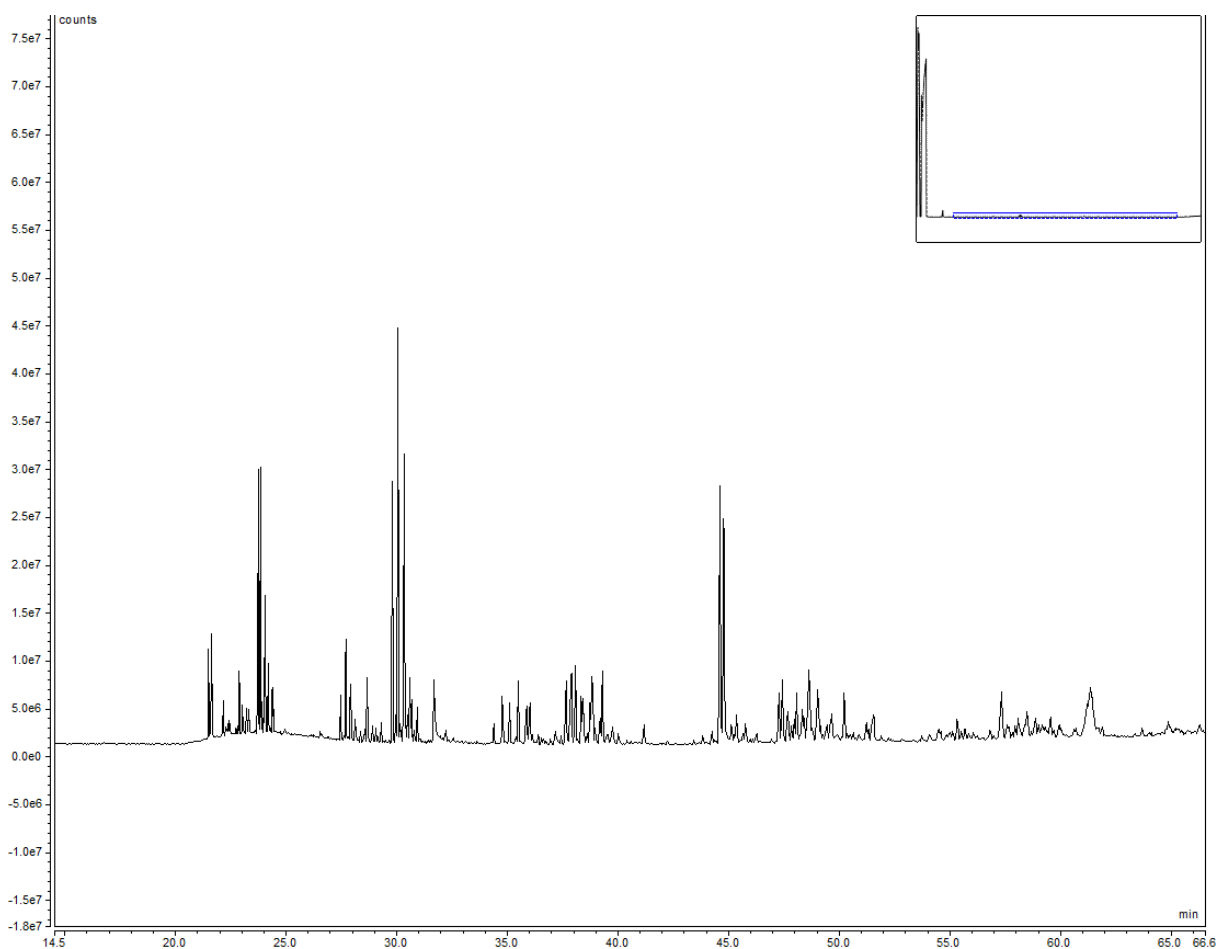
Det er også mulig at de ligninaktive enzymene kan ha modifisert cellulosemolekylet og slik påvirket den enzymatiske hydrolysen av substratet. Dersom modifiserte versjoner av cellulose har blitt produsert som følge av de ligninaktive enzymene, vil ikke disse produktene kunne oppdages med analysemetoden brukt i denne oppgaven. Det har nylig blitt rapportert tilfeller der laccaser med høyt redokspotensial har modifisert overflaten på cellulosemolekyler (Brenelli et al. 2018; Singh et al. 2017), noe som har ført til økt motstandsdyktighet mot degradering. Analyser ved bruk av FT-IR spektroskopi (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) tydet på at behandlingen av substratet med laccase kan ha redusert de frie hydroksylgruppene på cellulosen overflate, eller at hemiacetalbindinger kan dannes mellom fibre og øke motstandsdyktigheten til cellulosen (Brenelli et al. 2018). Det er mulig de andre ligninaktive enzymene også kan påvirke strukturen til cellulose på lignende måter.

Det må også nevnes at forsøket med kun Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ble gjennomført med en annen buffer enn de fire andre forsøkene. For prøvene der ekstra enzym var tilsatt ble det benyttet en flyktig ammoniumacetatbuffer, mens den opprinnelige testen med Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ble gjennomført med en natriumacetatbuffer (jf. avsnitt 3.9.6). Begge buffere hadde en pH på 5,0, og det er ingen grunn til å anta at denne endringen skal utgjøre noen forskjell på resultatet. Allikevel hadde det vært bedre å gjennomføre denne kontrollen på nytt med samme buffer som for de andre forsøkene slik at betingelsene er så like som overhodet mulig. Dersom prøvene utført med 1,0  $\mu$ M LiP for de to ulike bufferne sammenlignes, ser vi at mindre cellulose brytes ned i forsøket utført med flyktig buffer (tabell 4.3.4) enn i forsøket der natriumacetatbuffer benyttes (tabell 4.3.3). I forsøket med ammoniumacetatbuffer ble det tilsatt VA som kofaktor til ligninperoksidasen. Dette kan også være årsaken til endringen i grad av cellulosedegradering da tilgangen på veratrylalkohol kan ha påvirket aktiviteten til ligninperoksidasen.

#### 4.3.7 Analyse av degraderingsprodukter med GC/MS

Senere ble prøver fra forsøkene utført i avsnitt 3.9.7 og 3.9.8 analysert med GC/MS for å undersøke om det var ligninprodukter tilstede. Prøvene fra nullpunkt og endepunkt (4 t) ble analysert.

Figur 4.3.5 viser et kromatogram fra en prøve uten tilsatt enzym analysert med GC/MS. Denne prøven skal fungere som en metodeblank og burde ikke inneholde påvisbare produkter.



Figur 4.3.5 Kromatogram fra GC/MS av substratprøve uten tilsatt enzym. Counts (antall ganger MSen detekterer forbindelsen) er plottet mot tid i minutter.

Figuren viser at det er flere forbindelser tilstede som gir opphav til topper i kromatogrammet. Ved å benytte MS-spekteret til de ulike toppene for å søke opp mot databasen NIST 11 MS Database and MS Search Program (Mikaia et al. 2011) fikk vi treff på forbindelser som kan settes i sammenheng med lange hydrokarbonkjeder, voks, ulike steroider, fett og andre

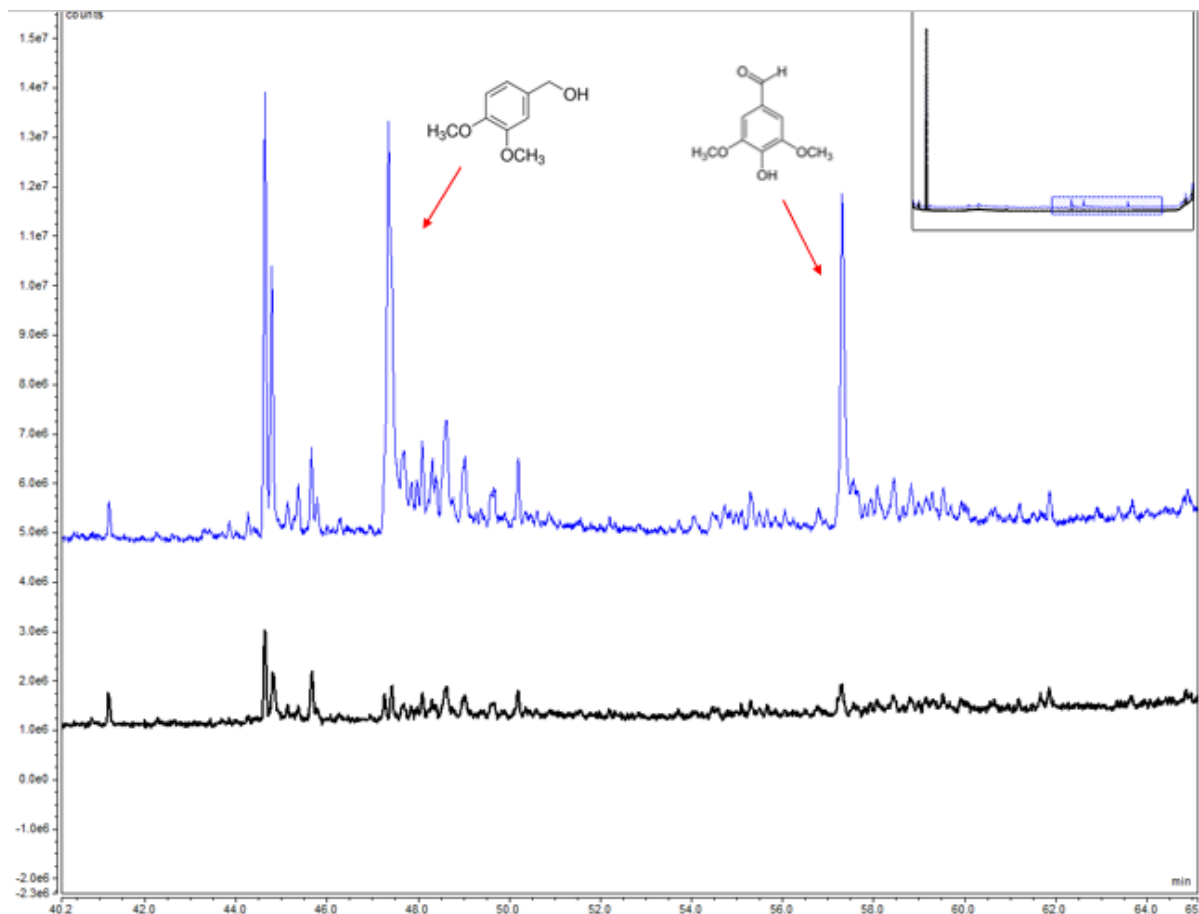


ekstraktiver som normalt forekommer i trær. Tilstedeværelsen av disse komponentene skyldes sannsynligvis mangelfull forbehandling av substratet da ekstraktiver ikke vil ødelegges ved dampekspløsjon. Siden disse forbindelsene også er løselige i 1,2-dikloretan vil de injiseres på kolonnen sammen med resten av prøven fra degraderingsreaksjonen og skape interferens. Mengden ekstraktiver tilstede ved tid null varierte fra prøve til prøve, noe som tyder på at substratet er heterogent. Dette gjør det vanskelig å reproducere resultatene.

Den gjennomgående trenden for alle prøvene som ble analysert er at mengden ekstraktiver i prøven har minket etter fire timer. Upolare molekyler med lav molekylvekt forsvinner fullstendig fra spekteret etter fire timer, og konklusjonen er at de på et eller annet vis brytes ned i løpet av reaksjonstiden. Forbindelsene er ikke substrater som vanligvis degraderes av ligninaktive enzymer, og det er derfor vanskelig å finne årsaken til at mengden synker. Allikevel kan det ikke utelukkes at reaktive oksygen species (ROS) produsert av ligninaktive enzymer kan ha oksidert forbindelsene. Det ser også ut til at mengden ekstraktiver med høyere molekylvekt har minket etter fire timer, men mengden som gjenstår varierer fra prøve til prøve, og det er ikke mulig å kvantifisere nedgangen da det ikke er tilsatt noen internstandard til prøvene.

Tilstedeværelsen av ekstraktiver ser ut til å forhindre effektiv nedbrytning av lignin i biomassen, da det i de fleste prøvene ikke ble detektert noen ligninprodukter etter fire timer. Sannsynligvis skyldes dette at ekstraktivene hindrer enzymene i å bli bundet til substratet og dermed gjør det lite tilgjengelig for degradering. Ekstraktivene kan fjernes ved vasking med et effektivt organisk løsemiddel, for eksempel acetone. Deretter kan substratet males opp for å sørge for en mer homogen prøve. Dette burde gjøre at substratet blir mer tilgjengelig for degradering og at reproduktibiliteten til analysene øker.

Én av prøvene, reaksjonen tilsatt LiP, Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase, hadde topper i kromatogrammet etter 4 timer som skilte seg ut fra de andre prøvene. MS-spekteret til forbindelsene som ga opphav til toppene ble analysert opp mot databasen NIST 11 MS Database and MS Search Program (Mikaia et al. 2011), og ga utslag på to ligninprodukter. Sannsynligvis var dette fordi denne prøven hadde et noe lavere innhold av ekstraktiver enn de andre prøvene siden substratet er heterogent. Figur 4.3.6 viser kromatogrammene fra nullpunkt og endepunkt.



Figur 4.3.6 Kromatogrammer fra nullpunkt (svart) og endepunkt (blå) for prøven tilsatt LiP, celluclast og  $\beta$ -glukosidase. Counts (antall ganger MS detekterer forbindelsen) er plottet mot tid i minutter. Ligninproduktene som ble funnet ved analyse av prøven, og deres korresponderende topper, er vist på figuren.

Produktene som ble dannet under forsøket med LiP, Celluclast<sup>®</sup> og  $\beta$ -glukosidase ble identifisert i databasen som veratrylalkohol (til venstre) og syringylaldehyd (til høyre). Strukturen til de to produktene er vist i figur 4.3.6. VA ble tilsatt reaksjonen med LiP som en kofaktor, og siden det ikke ble tilsatt internstandard vet vi ikke om mengden funnet her tilsvarer at det har blitt produsert mer veratrylalkohol eller ikke. Det er heller ikke mulig å vite om og eventuelt hvor mye av den tilsatte kofaktoren som ble forbrukt under reaksjonen. Som nevnt tidligere er litteraturen noe tvetydig når det kommer til hvorvidt LiP benytter VA som kofaktor eller ikke (Datta et al. 2017; Schoemaker & Piontek 1996). Det hadde vært en fordel å tillage en kontroll der kun veratrylalkohol og ikke LiP ble tilsatt til reaksjonen, og motsatt, for å kunne sammenligne utslagene dette gir på GC/MS. Ved senere forsøk kan også internstandard benyttes for å undersøke hvorvidt det blir produsert VA under reaksjonen.

Det andre produktet, syringylaldehyd, er et vanlig produkt ved nedbrytning av lignin og en bekreftelse på at enzymet har vært aktivt under forsøket. Det er god grunn til å anta at flere

produkter ville vært observert dersom ekstraktivene hadde blitt fjernet fra substratet før degraderingen. Mengden produkt kan ikke kvantifiseres med denne metoden. Tilstedeværelsen av ekstraktivene gjør også at en eventuell kvantifisering av produkt ville gitt en overestimering av den faktiske konsentrasjonen av produkt. Dette fordi ekstraktiver med samme retensjonstid som produktet vil havne under samme topp i kromatogrammet, noe som vil gjøre topparealet større enn det hadde vært dersom kun produktet hadde eluert ved dette tidspunktet.

## 5. Veien videre

Et mål for det videre arbeidet vil være å få uttrykt og rensset de ligninaktive enzymene *TfKat* og *TfDyP*. Det enkleste vil sannsynligvis være å uttrykke og rense variantene med His-tag siden det er publisert materiale på dette tidlige, men ideelt sett ønsker vi å få uttrykt og rensset de opprinnelige konstruktene fra Genscript. For å kunne oppnå dette er det nødvendig å arbeide videre med rensing av *TfDyP* for å forstå hvorfor de gjenværende urenheter ikke kan separeres fra enzymet ved rensing på SEC. Uttrykking av *TfKat* burde forsøkes med et annet ekspresjonssystem. I tillegg til arbeidet med *TfDyP* og *TfKat* burde også uttrykk av *TfLPMO-E7* optimaliseres slik at det er mulig å rense store nok mengder til at proteinet kan brukes i enzymatiske forsøk. Arbeid med å utvikle en mer effektiv rensemethode for dette enzymet vil være fordelaktig.

Generelt ønsker forskningsgruppen å opparbeide et «bibliotek» av ulike bakterielle ligninaktive enzymer. Å gjøre søk etter andre potensielle kandidater som oppfyller disse kriteriene kan være av interesse.

Under analysen med GC/MS ble det oppdaget en rekke ekstraktiver som kan virke inhiberende på enzymene i cocktailen. Den dampeksploderte bjørken brukt under degraderingsforsøkene burde vaskes med organisk løsemiddel for å fjerne disse ekstraktivene, og males opp for å få et mer heterogent substrat. Deretter burde analysene utført i denne oppgaven gjennomføres på nytt for å se om dette har noen effekt på utbytte i form av cellulose- og ligninprodukter. Når en optimal analysemetode har blitt funnet kan det tilsettes en internstandard til prøvene slik at de også kan kvantifiseres på GC/MS.

Dersom dette gir utslag på produktsammensetningen burde degradering med kombinasjoner av de ulike kommersielle enzymene testes for å undersøke om det gir en synergetisk effekt. Det langsiktige målet er å lage en enzymatisk cocktail bestående av bakterielle ligninaktive enzymer fra *Thermobifida fusca*, og derfor bør disse også inkluderes i forsøkene så fort de har blitt uttrykt og rensset.

## 6. Referanser

- Adav, S. S., Cheow, E. S., Ravindran, A., Dutta, B. & Sze, S. K. (2012). Label free quantitative proteomic analysis of secretome by *Thermobifida fusca* on different lignocellulosic biomass. *Journal of Proteomics*, 75 (12): 3694-3706. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.031.
- Agger, J. W., Nilsen, P. J., Eijsink, V. G. & Horn, S. J. (2014). On the determination of water content in biomass processing. *BioEnergy Research*, 7 (1): 442-449. doi: 10.1007/s12155-013-9388-2.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell*. 6 utg.: New York Garland Science. 1342 s.
- Argoti, D. (2008). *Liquid chromatography-mass spectrometry for detection and characterization of DNA biomarkers and reactive metabolites*: Northeastern University. Tilgjengelig fra: <http://hdl.handle.net/2047/d10016740> (lest 17.04.2018).
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A. & Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500 (1): 21-36. doi: 10.1016/j.abb.2010.03.002.
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Peters, B., Bomble, Y. J., Himmel, M. E. & Crowley, M. F. (2011). Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (14): 4118-4127. doi: 10.1021/jp1106394.
- Beckham, G. T., Johnson, C. W., Karp, E. M., Salvachua, D. & Vardon, D. R. (2016). Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Current Opinion in Biotechnology*, 42: 40-53. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.030.
- Bio-Rad Laboratories Incorporated. (2000). *Quick Start™ Bradford Protein Assay*. Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf> (lest 06.11.2017).
- Bissaro, B., Røhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. (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. doi: 10.1038/nchembio.2470.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Reviews Plant Biology*, 54: 519-546. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Borregaard Lignotech. (u.å.). *Industrial applications*. Tilgjengelig fra: <https://www.lignotech.com/Industrial-Applications> (lest 26.02.2018).

- Brenelli, L., Squina, F. M., Felby, C. & Cannella, D. (2018). Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. *Biotechnology for Biofuels*, 11 (1): 10. doi: 10.1186/s13068-017-0985-8.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011: 17. doi: 10.4061/2011/787532.
- Brown, R. M. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42 (3): 487-495. doi: 10.1002/pola.10877.
- Bugg, T. D. & Rahmanpour, R. (2015). Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29: 10-17. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.06.009.
- Caprette, D. R. (1996). *Preparing Protein Samples for Electrophoresis*. Tilgjengelig fra: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/denature.html> (lest 27.09.17).
- Cassan-Wang, H., Goué, N., Saidi, M. N., Legay, S., Sivadon, P., Goffner, D. & Grima-Pettenati, J. (2013). Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 4: 189. doi: 10.3389/fpls.2013.00189.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H. & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle<sup>1</sup>. *Journal of Molecular Biology*, 286 (3): 809-827. doi: 10.1006/jmbi.1998.2507.
- Chylenski, P., Petrović, D. M., Müller, G., Dahlström, M., Bengtsson, O., Lersch, M., Siika-Aho, M., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. (2017). Enzymatic degradation of sulfite-pulped softwoods and the role of LPMOs. *Biotechnology for Biofuels*, 10: 177. doi: 10.1186/s13068-017-0862-5.
- Colpa, D., Fraaije, M. & Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41 (1): 1-7. doi: 10.1007/s10295-013-1371-6.
- Creative Biostructure. (2018). *Custom Affinity Chromatography Service*. Tilgjengelig fra: <https://www.creative-biostructure.com/custom-affinity-chromatography-service-257.htm> (lest 12.01.2018).
- Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R. S. & Formanek, P. (2017). Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. *Sustainability*, 9 (7). doi: ARTN 1163 10.3390/su9071163.

- de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H. & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 236: 110-119. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.011.
- De Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: Principles and Applications*. 3 utg.: Wiley-Interscience. 489 s.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sorlie, M., Rohr, A. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. (2014). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (23): 8446-8451. doi: 10.1073/pnas.1402771111.
- GE Healthcare. (2006). *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography - Principles and Methods*. Tilgjengelig fra: [https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUK Ewii7eOPmuvWAhWGDpoKHa3nATwQFggsMAA&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifesciences.com%2F~%2Fmedia%2Fprotein-purification-ib%2Fdocuments%2Fhandbooks%2Fhydrophobic\\_interaction\\_chromatography.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw2ccdGNB0mFrw2a1EBSaue](https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUK Ewii7eOPmuvWAhWGDpoKHa3nATwQFggsMAA&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifesciences.com%2F~%2Fmedia%2Fprotein-purification-ib%2Fdocuments%2Fhandbooks%2Fhydrophobic_interaction_chromatography.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw2ccdGNB0mFrw2a1EBSaue) (lest 12.10.2017).
- GE Healthcare. (2014). *Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods*. Tilgjengelig fra: <https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUK Ewii7eOPmuvWAhWGDpoKHa3nATwQFggsMAA&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifesciences.com%2F~%2Fmedia%2Fprotein-purification-ib%2Fdocuments%2Fhandbooks%2Fsize-exclusion-chromatography-handbook.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw0kSAZq3oieoL1jUBOtIEB> (lest 12.10.2017).
- GE Healthcare. (2016). *Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods*. Tilgjengelig fra: [https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUK EwiEouj\\_nOvWAhVmCZoKHZDoD\\_cQFggsMAE&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifesciences.com%2F~%2Fmedia%2Fprotein-purification-ib%2Fdocuments%2Fhandbooks%2Fion\\_exchange\\_chromatography.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw2vhi1gwIGz7GgjZXTdxo3T](https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUK EwiEouj_nOvWAhVmCZoKHZDoD_cQFggsMAE&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifesciences.com%2F~%2Fmedia%2Fprotein-purification-ib%2Fdocuments%2Fhandbooks%2Fion_exchange_chromatography.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw2vhi1gwIGz7GgjZXTdxo3T) (lest 27.09.2017).
- GeneScript. (2016). *pET22b(+)* 5.5 kb. Tilgjengelig fra: <https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-22b.pdf> (lest 12.10.2017).
- Ghaffar, S. H. & Fan, M. Z. (2013). Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57: 264-279. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.07.015.
- Glenn, J. K. & Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242 (2): 329-341. doi: 10.1016/0003-9861(85)90217-6.

- Hall, M., Bansal, P., Lee, J. H., Realff, M. J. & Bommarius, A. S. (2010). Cellulose crystallinity—a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *The FEBS journal*, 277 (6): 1571-1582. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x.
- Hansen, L. H., Knudsen, S. & Sørensen, S. J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*, 36 (6): 341-347. doi: 10.1007/s002849900320.
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (5): 660-668. doi: 10.1016/j.sbi.2013.05.006.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. & Schülein, M. (1985). Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nature Biotechnology*, 3 (8): 722-726. doi: 10.1038/nbt0885-722.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00528-2.
- Hongqiang, L. & Hongzhang, C. (2008). Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*, 43 (12): 1447-1451. doi: 10.1016/j.procbio.2008.05.003.
- Invitrogen. (2010). *pBAD/His A, B, and C pBAD/MycHis A, B and C*. Tilgjengelig fra: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pbad\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pbad_man.pdf) (lest 18.02.2018).
- Johnson, K. A. & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 50 (39): 8264-8269. doi: 10.1021/bi201284u.
- Kostylev, M. & Wilson, D. (2013). Two-parameter kinetic model based on a time-dependent activity coefficient accurately describes enzymatic cellulose digestion. *Biochemistry*, 52 (33): 5656-5664. doi: 10.1021/bi400358v.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G. & Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 352 (6289): 1098-1101. doi: 10.1126/science.aaf3165.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (8): 3713-3729. doi: 10.1021/ie801542g.
- Lee, H., Hamid, S. & Zain, S. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *The Scientific World Journal*, 2014. doi: 10.1155/2014/631013.



- Life Technologies. (2010). *BL21 Star™(DE3) One Shot®BL21 Star™(DE3)pLysS OneShot® Chemically Competent Cells* Tilgjengelig fra: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf) (lest 12.10.2017).
- Life Technologies. (2013). *One Shot™ TOP10 Competent Cells*. Tilgjengelig fra: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshottop10\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshottop10_man.pdf) (lest 18.02.2018).
- Life Technologies. (2015). *Qubit® dsDNA BR Assay Kits*. Tilgjengelig fra: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit\\_dsDNA\\_BR\\_Assay\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf) (lest 16.11.2017).
- Lignoworks. (2016). *What is lignin?* Tilgjengelig fra: <http://www.icfar.ca/lignoworks/content/what-lignin.html> (lest 26.02.2018).
- Liitiä, T., Maunu, S. L., Hortling, B., Tamminen, T., Pekkala, O. & Varhimo, A. (2003). Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state NMR spectroscopic methods. *Cellulose*, 10 (4): 307-316. doi: 10.1023/A:1027302526861.
- Lončar, N. & Fraaije, M. W. (2015). Not so monofunctional--a case of thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (5): 2225-2232. doi: 10.1007/s00253-014-6060-5.
- Lu, X., Zheng, X., Li, X. & Zhao, J. (2016). Adsorption and mechanism of cellulase enzymes onto lignin isolated from corn stover pretreated with liquid hot water. *Biotechnology for Biofuels*, 9 (1): 118. doi: 10.1186/s13068-016-0531-0.
- Lundell, T., Wever, R., Floris, R., Harvey, P., Hatakka, A., Brunow, G. & Schoemaker, H. (1993). Lignin peroxidase L3 from *Phlebia radiata*: Pre-steady state and steady-state studies with veratryl alcohol and a non-phenolic lignin model compound 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propane-1,3-diol *The FEBS Journal*, 211 (3): 391-402. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17562.x.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., et al. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *Journal of Bacteriology*, 189 (6): 2477-2486. doi: 10.1128/JB.01899-06.
- Merck. (2018). *Avicel® PH-101*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/11365?lang=en&region=NO> (lest 13.04.2018).
- Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913). *Die Kinetik der Invertinwirkung*: Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg. 34 s.

- Mikaia, A., White, E. V., Zaikin, V., Zhu, D., Sparkman, O. D., Neta, P., Zenkevich, I., Linstrom, P., Mirokhin, Y. & Tchekhovskoi, D. (2011). *NIST Standard Reference Database 1A*. Tilgjengelig fra: <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srd/NIST1a11Ver2-0Man.pdf> (lest 12.04.2018).
- Miller, J. M. (2009). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. 2 utg.: Wiley-Interscience. 520 s.
- NCBI. (u.å.). *Thermobifida fusca (ID 1027)*. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Thermobifida%20fusca> (lest 01.03.2018).
- Nicholls, P. (2012). Classical catalase: ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525 (2): 95-101. doi: 10.1016/j.abb.2012.01.015.
- O'sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3): 173-207. doi: 10.1023/A:1018431705579.
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A. & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3: 10. doi: 10.1186/1754-6834-3-10.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24 (5): 255-265. doi: 10.1007/s00299-005-0972-6.
- Paszczyński, A., Huynh, V.-B. & Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 29 (1-2): 37-41. doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00831.x.
- Phenomenex. (2018). *Rezex: Dependable, Economical Ion-Exclusion Columns*. Tilgjengelig fra: <http://www.phenomenex.com/Products/Part/00H-0138-K0> (lest 07.04.2018).
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., Davison, B. H., Dixon, R. A., Gilna, P., Keller, M., et al. (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science*, 344 (6185): 1246843. doi: 10.1126/science.1246843.
- Rahmanpour, R., Rea, D., Jamshidi, S., Fulop, V. & Bugg, T. D. (2016). Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 594: 54-60. doi: 10.1016/j.abb.2016.02.019.

- Reddy, N. & Yang, Y. (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in Biotechnology*, 23 (1): 22-27. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.11.002.
- Roche. (2013). *cOmpete His-Tag Purification Resin Purify Without Compromises*. Tilgjengelig fra: <http://www.roche-applied-science.com/campaigns/DeveloperTips/protein-purification/his-tag.html> (lest 18.02.2018).
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R. & Meyer, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnology progress*, 23 (6): 1270-1276. doi: 10.1021/bp070329p.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454 (7206): 841-845.
- Schleif, R. (2000). Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in Genetics*, 16 (12): 559-565. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02153-3.
- Schleif, R. (2003). AraC protein: a love–hate relationship. *Bioessays*, 25 (3): 274-282. doi: 10.1002/bies.10237.
- Schoemaker, H. E. & Piontek, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure and Applied Chemistry*, 68 (11): 2089-2096. doi: 10.1351/pac199668112089.
- Shrestha, R., Huang, G., Meekins, D. A., Geisbrecht, B. V. & Li, P. (2017). Mechanistic Insights into Dye-Decolorizing Peroxidase Revealed by Solvent Isotope and Viscosity Effects. *ACS Catalysis*, 7 (9): 6352-6364. doi: 10.1021/acscatal.7b01861.
- Singh, R., Hu, J., Regner, M. R., Round, J. W., Ralph, J., Saddler, J. N. & Eltis, L. D. (2017). Enhanced delignification of steam-pretreated poplar by a bacterial laccase. *Scientific Reports*, 7: 42121. doi: 10.1038/srep42121.
- Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, P. M. (2013). *IPCC, 2013: Summary for Policymakers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*  
Cambridge United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press. 33 s.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (8): 1387-1403. doi: 10.1007/s00018-008-8651-8.
- Teugjas, H. & Väljamäe, P. (2013). Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for biofuels*, 6 (1): 104. doi: 10.1186/1754-6834-6-104.

- ThermoFisher. (2014). *BenchMark™ Unstained Protein Ladder Protocol*. Tilgjengelig fra: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/BenchMarkUnstainedProteinLadder\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/BenchMarkUnstainedProteinLadder_man.pdf) (lest 27.09.2017).
- ThermoFisher. (u.å.). *Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20278> (lest 27.09.2017).
- Tien, M. & Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 (8): 2280-2284. doi: 10.1073/pnas.81.8.2280.
- U.S. Energy Information Administration. (2018). *Petroleum and other liquids: Refinery yield*. Tilgjengelig fra: [https://www.eia.gov/dnav/pet/pet\\_pnp\\_pct\\_dc\\_nus\\_pct\\_a.htm](https://www.eia.gov/dnav/pet/pet_pnp_pct_dc_nus_pct_a.htm) (lest 27.02.2018).
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G. & van Aalten, D. M. (2005). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11313-11319. doi: 10.1074/jbc.M407175200.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222. doi: 10.1126/science.1192231.
- Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J. S., Bissaro, B. & Eijsink, V. G. (2017). Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 44: 67-76. doi: 10.1016/j.sbi.2016.12.012.
- van Bloois, E., Pazmiño, D. E. T., Winter, R. T. & Fraaije, M. W. (2010). A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (5): 1419-1430. doi: 10.1007/s00253-009-2369-x.
- Varnado, C. L. & Goodwin, D. C. (2004). System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 35 (1): 76-83. doi: 10.1016/j.pep.2003.12.001.
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. & Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*, 2014: 21. doi: 10.1155/2014/163242.
- Vivekanand, V., Olsen, E. F., Eijsink, V. G. & Horn, S. J. (2013). Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresource Technology*, 127: 343-349. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.118.

- VWR. (2016). *Nucleic Acid Purification Kits*. Tilgjengelig fra: [https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_US/id/8477994/contents](https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/8477994/contents) (lest 18.02.2018).
- Wariishi, H., Valli, K. & Gold, M. H. (1991). In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176 (1): 269-275. doi: 10.1016/0006-291X(91)90919-X.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2 (3): 388-393. doi: 10.1016/0959-440X(92)90230-5.
- Weng, J. K. & Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187 (2): 273-285. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x.
- Westereng, B., Cannella, D., Wittrup Agger, J., Jorgensen, H., Larsen Andersen, M., Eijsink, V. G. & Felby, C. (2015). Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Scientific Reports*, 5: 18561. doi: 10.1038/srep18561.
- Wingfield, P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13 (1): Appendix 3: Appendix 3F. doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- Zhao, Y., Wu, B., Yan, B. & Gao, P. (2004). Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China Series C: Life Sciences*, 47 (1): 18-24. doi: 10.1360/02yc0163.

## 7. Vedlegg

### Vedlegg 7.1: Aminosyresekvensen til *TfDyP*.

```
>sp|Q47KB1|DYP_THEFY Dye-decolorizing peroxidase Tfu_3078 OS=Thermobifida
fusca (strain YX) GN=Tfu_3078 PE=1 SV=1
MTEPDKTERKGSRRGFLAGLGAAALTGAGIGMAAGEVLRPLLPSDPAASPEAEQRLRMA
AQRADATAAPQPGISGPAPAFVHVIALDLAEEARKNPDTARDSAAAAALRSWTELAARLHE
ESPHDIAEGAASAGLLPASLMVTVGIGGSLLSAIDAEDRRPDALADLPEFSTDDLHPRWC
GGDFMLQVGAEDPMVLTAAVEELVAAAADATAVRWSLRGFRRTAAAARDPDATPRNLMGQ
IDGTANPAQDHPFLFDRITITARPADNPAHAWMDGGSYLVVRRIRMLLLEWRKLDVAARERV
IGRRLDTGAPLGSNETDPVVL SARDEEGEPLIPENAHVRLASPENNLGARMFRRGYSYD
QGWRRDDGVRDAGLLFMAWQGD PATGFIPVQRSLADQGDALNRYIRHEGSALFAVPAAREG
RYLGQDLIEG
```

### Vedlegg 7.2: Nukleotidsekvensen til *TfDyP*, med innsatte restriksjons seter for NdeI (grønn) og HindIII (rød).

```
>ENA|AAZ57111|AAZ57111.1 Thermobifida fusca YX dyp-type peroxidase
CATATGACCGAACCAGACACGGAGCGGAAAGGCTCCTCCC GCCGAGGATTCCTCGCGGGACTG
GGCGCGGCAGCACTCACCGGCGCAGGCATCGGCATGGCGGCAGGAGAAGTCTCCGCCCC
CTGCTGCCCCGACTCCGACCCGGCCGCCTCCCCGGAAGCCGAGCAGCGGCTGCGCATGGCA
GCCCAACGGGCCGACGCCACCGCAGCGCCCCAACCCGGCATCTCCGGCCCAGCACCCGCG
TTCGTTACGTCATCGCGCTCGACCTGGCGGAAGAAGCCCGTAAGAACCCCGACACCGCC
CGCGACAGCGCAGCCGCGCGCTCCGGTCTGGACCGAACTAGCGGCCCGCCTGCACGAG
GAGAGTCCGCACGACATCGCCGAGGGGGCCGCCTCTGCAGGGCTGCTCCCCGCCTCCCTC
ATGGTCACCGTCGGCATCGGAGGCTCCCTGCTCTCCGCGATCGACGCGGAAGACCGCCGA
CCGGACGCGCTCGCCGACCTCCCCGAGTTCTCCACCGACGACCTGCACCCCCGCTGGTGC
GGTGGAGACTTCATGCTCCAAGTCGGTGC GGAAGACCCCATGGTGTCTACCGCGGCCGTG
GAAGAACTCGTCGCCGCGGCCGCGGATGCGACCGCGGTGCGCTGGTCTCTGCGCGGCTTC
CGGCGGACCGCCGACCGCGCGGACCCCGACGCCACCCCGCAACCTCATGGGGCAG
ATCGACGGCACCGCCAACCCCGCCCAGGACCACCCGCTGTTTCGACCGGACCATCACCGCA
CGGCCGGCCGACAACCCCGCGCACGCCTGGATGGACGGCGGCAGCTACCTGGTCTGTCGA
CGGATCCGCATGCTCTTGACCGAATGGCGGAACTGGACGTGGCCGCCCGGGAGCGGGTG
ATCGGCCGCCGCTCGACACGGGAGCACCCCTCGGCAGCCGCAACGAGACCGACCCCGTC
GTGCTCTCGGCCCGCGACGAGGAAGGGGAACCCCTCATCCCCGAGAACGCACACGTGCGC
CTCGCCAGCCCGGAGAACAACCTGGGTGCCCGCATGTTCCGCCGCGGCTACAGCTACGAC
CAGGGGTGGCGCGACGACGGCGTCCGCGACGCCGACTGCTCTTCATGGCCTGGCAAGGC
```

GACCCCGCCACCGGGTTCATCCCGGTGCAGCGCAGCCTCGCCGACCAGGGCGACGCCCTC  
AACCGCTACATCCGGCACGAAGGCAGCGCCCTCTTCGCCGTCCCCGCCCGCCGGGAAGGC  
CGCTACCTGGGACAGGACCTGATCGAAGGATAAGCTT

### Vedlegg 7.3: Aminosyresekvensen til *Tf*Kat

```
>tr|Q47PD5|Q47PD5_THEFY Catalase OS=Thermobifida fusca (strain YX)
GN=Tfu_1649 PE=3 SV=1
MLGRGGRLPPGKCRVGAHWPSSLSSAEVSPTRALSRHTGTSGPAPSRSLPAISTIKET
DLTETNEALSTASNATGSTLDGAPAAADRNSLSVGSNGPLLLHDVRLVETLAHFNRERV
PERNPHAKGAGAFGVFETTEDVSYTKAALFQKGARTEMLARFSTVAGEQGSPTWRDVR
GFALKFYTSEGNLDLVGNNTPIFFVRDPMKFPHFIRSQKRPDTGLRDNNMQWDFWTLNP
ETAHQVTYLMGDRGLPRTWRHMNGYGSHTYMWINAKGEKFWVKYHFKTDQGIENMTNEEA
ERLAGVDADFHRDLVEAIERGDYPSWTLYVQVMPYEDAKTYRFNPFDLTKVWPHSDYPL
IKVGKMTLNRNPNENFFAEIEQAFAFAPSNLVPGIGVSPDKMLLGRVFAYADHRARIGTNY
FQLPVNKPVRVNSYTFDGHMTYEHSGKAPVYAPNSYGRPWSQDQTPVEDSWEADGELVR
SAYELHAEDDDFSQAGTLVREVFDDAQRDRLVETVADHLSKGVVEPVLSTRAFQYWKNI
TIGERIEKRYHEIAR
```

### Vedlegg 7.4: Nukleotidsekvensen til *Tf*Kat med innsatte restriksjonssteder for *Nde*I (grønn) og *Hind*III (rød).

```
>ENA|AAZ55684|AAZ55684.1 Thermobifida fusca YX catalase
CATATGTTGGGAAGAGGTGGGCGCCTCCCTCCGGGGAAGTGTGGGTTGGCCCCGCACATTGG
CCCAGCCGACTCTCGTCCGCTGAGGTGAGCCCCACCACGCGGGCACTGTGCGGCCACACC
GGAACCTCCGGGCGCGCCGTCCCGATCTCTACCAGCCATATCCACGATCAAGGAGACC
GACTTGACCGAGACCAACGAGGCACTGTCCACTGCGAGCAACGCCACGGGCTCCACGCTC
GACTCTGGTGCGCCTGCGGCTAGCGACCGCAACTCGCTGAGCGTGGGCAGCAACGGCCCCG
CTGCTGCTGCACGACGTACGGCTCGTTGAGACGCTCGCCCACTTCAACCGTGAGCGGGTTC
CCCAGCGCAACCCGCACGCCAAGGGCGCCGGTGCCTTCGGTGTCTTCGAAACCACGGAG
GACGTCTCCAGTACACCAAGGCTGCCCTGTTCCAGAAGGGTGCCCGTACCGAGATGCTC
GCCCGGTTCTCCACGGTGTGGTGTGAGCAGGGCTCCCCGGACACCTGGCGGGACGTGCGC
GGTTTCGCTCTGAAGTTCTACACCTCTGAGGGCAACTACGACCTGGTTCGGCAACAACACG
CCGATCTTCTTCGTCCGCGACCCGATGAAGTTCCCGCACTTCATCCGCTCCAGAAGCGG
ATGCCGGACACGGGTCTGCGCGACAACAACATGCAGTGGGACTTCTGGACCCCTCAACCCG
GAGACCGCCACCAGGTACCTACCTCATGGGTGACCGCGCCCTGCCCGGACCTGGCGC
CACATGAACGGCTACGGTTCGCACACCTACATGTGGATCAACGCCAAGGGCGAGAAGTTC
TGGGTCAAGTACCACTTCAAAACCGACCAGGGCATCGAGAACATGACCAACGAGGAAGCC
GAGCGTCTCGCCGGTGTGGACGCCGACTTCCACCGTGTGACCTGGTTCGAGGCCATCGAA
CGCGGGGACTACCCGAGCTGGACCCCTCTACGTGCAGGTTCATGCCGTACGAGGACGCCAAG
```

ACCTACCGGTTCAACCCGTTTCGACCTGACCAAGGTCTGGCCGCACAGCGACTACCCGCTC  
ATCAAGGTTCGGCAAGATGACCTTGAACCGCAACCCGGAGAACTTCTTCGCCGAGATCGAG  
CAGGCCGCGTTTCGCGCCGTGCAACCTGGTCCCGGTATCGGCGTCTCCCGGACAAGATG  
CTGCTGGGCCGCTTTCGCCTACGCGGACGCCACCGGGCCCGGATCGGCACCAACTAC  
TTCCAGCTGCCGGTGAACAAGCCGCGGGTGAAGGTCAACTCCTACACCTTCGACGGGCAC  
ATGACCTACGAGCACTCCGGCAAGGCCCGGTGTACGCGCCAACTCCTACGGCCGTCCC  
TGGTCTGACCAGACCGGCCCGGTTCGAGGACAGCTGGGAGGCCGACGGCGAGCTGGTGCGC  
AGCGCCTACGAGCTGCACGCTGAGGACGACGACTTCTCGCAGGCCGGCACCCCTGGTCCCG  
GAGGTCTTCGACGACGCCAGCGGGACCGGTTCGTGGAGACGGTTCGCCGACCACCTGTCC  
AAGGGTGTGTCGAGCCGGTGTCTCTCCCGGGCCTTCCAGTACTGGAAGAACATCGACGAG  
ACCATCGGCGAGCGGATCGAGAAGCGGTACCACGAGATCGCTCGGTAAGCTT

Vedlegg 7.5: Aminosyresekvens for *TfLPMO E7*. Signalpeptid (blå) ble fjernet og erstattet med startkodon (M).

```
>tr|Q47QG3|Q47QG3_THEFY Putative secreted cellulose-binding protein  
OS=Thermobifida fusca (strain YX) GN=Tfu_1268 PE=1 SV=1  
MHRYSRTGKHRWTVRALAVLFTALLGLTQWTAPASAHGSVINPATRNYGCWLRWGHDLN  
PNMQYEDPMCWQAWQDNPNAMWNWNGLYRDWVGGNHRAALPDGQLCSGGLTEGGRYRSM  
AVGPWKTTDVNNTFTIHLVDQASHGADYFLVYVTKQGFDPPTQPLTWDSLELVHQTGSYP  
PAQNIQFTVHAPNRSGRHVVFVTIWKASHMDQTYYLCSDVNFV
```

Vedlegg 7.6: Nukleotidsekvens for *TfLPMO-E7* med innsatte restriksjons seter for *NdeI* (grønn) og *HindIII* (rød).

CATATGTCCGCCCACGGGTCGGTC  
ATCAACCCCGCGACCCGTAACCTACGGTTGCTGGCTGCGTTGGGGCCACGACCACCTCAAC  
CCCAACATGCAGTACGAAGACCCCATGTGCTGGCAGGCCTGGCAGGACAACCCCAACGCC  
ATGTGGAACCTGGAACGGCCTGTACCGCGACTGGGTTCGGCGGCAACCACCGGGCTGCCCTC  
CCCGACGGCCAGCTGTGCAGCGGTGGCCTCACCGAAGGCGGCCGCTACCGCTCCATGGAC  
GCCGTAGGCCCGTGGAAGACCACCGACGTCAACAACACCTTCACCATCCACCTGTACGAC  
CAGGCCAGCCACGGCGCAGACTACTTCTGGTCTACGTCACCAAGCAGGGCTTCGACCCG  
ACCACCCAGCCGCTGACCTGGGACAGCCTGGAACCTGGTGCACCAGACCGGCAGCTACCCC  
CCGGCCAGAACATCCAGTTCACGGTCCACGCCCCCAACCGCAGCGGCCGCCACGTGGTC  
TTCACCATCTGGAAGGCCTCGCACATGGACCAGACCTACTACCTGTGCAGCGACGTGAAC  
TTCGTC TAAGCTT







**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway