



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Hovedveileder: Morten Sørlie

Uttrykk og karakterisering av en superoksid dismutase og en dihyrolipoamid dehydrogenase fra *Thermobifida fusca*

Expression and characterization of a superoxide
dismutase and a dihyrolipoamide dehydrogenase
from *Thermobifida fusca*

Rim Al-Sadawi

Bioteknologi, retning biokjemi

Forord

Dette masterprosjektet ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås i perioden januar 2017 – mai 2018.

Prosjektleder og hovedveileder Morten Sørliet takkes for muligheten jeg har fått til å skrive masteroppgave hos han. Morten er en intelligent veileder som har oppmuntret og støttet meg underveis i denne oppgaven. Medveileder Anne Grethe Hamre fortjener en stor takk for god hjelp og støtte både praktisk og teoretisk. Mye god kunnskap har blitt høstet gjennom det siste 1.5 året fra deg, Anne Grethe. Bastien Bissaro og Åsmund Røhr Kjendseth takkes for nyttige tips og råd underveis, setter stor pris på at døren deres alltid har vært åpen selv i de travleste dager. Gode samtaler med Ingvild Isaksen og Morten Skaugen har vært av stor betydning gjennom masteren. Takk til alle utgående og nåværende medlemmer av bioorganisk forskningsgruppe for at alle spørsmål, store som små, har blitt besvart etter beste evne.

Medstudenter, stipendiater og ansatte i kjemigangen og PEP gruppa takkes for et godt faglig og sosialt miljø. Medstudent og venninne Helene Bjølgerud takkes for alle gode stunder vi har delt i laboratoriehverdagen og for all hjelp jeg har fått under hektiske dager.

Venner og familie over hele landet takkes for oppmuntring og støtte underveis. Til slutt vil jeg rette en stor takk til mamma som har vist støtte, interesse og engasjement gjennom hele løpet.

شكرا أمي على كل ما قمت به بالنسبة لي!

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2018

Rim Al-Sadawi

Sammendrag

Denne oppgaven er skrevet som en del av et større forskningsprosjekt med et overordnede mål om å tilegne seg kunnskap om lignin nedbrytende enzymer til jordbakterien *Thermobifida fusca*. Lignocellulose består hovedsakelig av karbohydratpolymerer (cellulose og hemicellulose) og en aromatisk polymer (lignin). Etter cellulose er lignin den vanligste biopolymeren i naturen og består av monolignoler som er krysskoblet med eterbindinger eller karbon-karbon bindinger. Cellulose består av sekskarbonsukker, mens hemicellulose er bygd opp av fem – og sekskarbonsukker. I naturen blir lignocellulose brutt ned via enzymkatalysert radikalkjemi. Den gramnegative bakterien *T.fusca* skiller ut flere oppregulerte enzymer som er ligninaktive når den gror på lignocellulose. Dihydrolipoamide dehydrogenase og superoksid dismutase er blant de oppregulerte enzymene.

I denne oppgaven har de to enzymene dihydrolipoamide dehydrogenase og superoksid dismutase fra *T.fusca* blitt karakterisert. Dihydrolipoamide dehydrogenase viste høyest aktivitet ved pH 6.0 og $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Den har to smeltetemperaturer henholdsvis $t = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $t = 88\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved pH 7.5. Superoksid dismutasen viste høyest aktivitet ved pH 7.5 og var stabilt aktiv fra $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Den har en smeltetemperatur lik $78.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved pH 8.0. *Tf*SODs krystallstruktur avslørte jern som kofaktor i det aktive setet, bundet til tre histidiner, en aspartat og to vannmolekyler. Cellepotensialet til *Tf*SOD på 287 mV stemmer overens med redokspotensialet til SODer generelt ($\sim 300\text{ mV}$). En antatt lakkase og hjelpeenzymet E8 fra *T.fusca* ble forsøkt å uttrykkes for videre bruk i en enzymløsning bestående av ulike enzymer med synergisk effekt ved enzymatisk nedbrytning av lignocellulose. Enzymuttrykket ble ikke vellykket.

Summary

This thesis is a minor part of a research project with the main goal to acquiring knowledge of the ligninolytic model system for the soil bacterium *Thermobifida fusca* for the decomposition of lignocellulose. Lignocellulose consist mainly of carbohydrate polymers (cellulose and hemicellulose) and an aromatic polymer (lignin). After cellulose, lignin is the most abundant biopolymer in nature and it consist of monolignols that is cross-linked with ether bonds or carbon-carbon bonds. Cellulose consists of six carbon sugars, meanwhile hemicellulose has six- and five carbon sugars. In nature lignocellulosic biomass is degraded by enzyme catalyzed radical chemistry. The gram-negative bacterium *T.fusca* secrets several upregulated enzymes that are active on lignin when growing on lignocellulose. Dihydrolipoamide dehydrogenase and superoxide dismutase are among the upregulated enzymes.

In this thesis, the two enzymes dihydrolipoamide dehydrogenase and superoxide dismutase from *T.fusca* have been characterized. Dihydrolipoamide dehydrogenase showed highest activity at pH 6.0 and $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. It has two melting points at $t = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $t = 88\text{ }^{\circ}\text{C}$ at pH 7.5 respectively. Superoxide dismutase showed highest activity at pH 7.5 and had stable activity from $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a melting temperature equal to $78.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ at pH 8.0. The crystal structure of *TfSOD* revealed iron as the cofactor in the active site, bound to three histidine residues, an aspartate and two water molecules. The cell potential of *TfSOD* of 287 mV corresponds to the redox value of SOD in general ($\sim 300\text{ mV}$). An assumed laccase and the auxiliary enzyme E8 from *T.fusca* were attempted to be expressed for further use in an enzyme cocktail containing different enzymes with synergic effect towards the degradation of lignocellulose. The attempt failed.

Innholdsfortegnelse

FORORD	II
SAMMENDRAG	III
SUMMARY	IV
INNHOLDSFORTEGNELSE	V
FORKORTELSER	IX
1. INTRODUKSJON	1
1.1. Biomasse	1
1.1.1. Lignin	3
1.2. utfordringer ved ligninnedbrytning	4
1.3. Produkter av lignin, reelle og potensielle	7
1.4. Ligninnedbrytende organismer	8
1.4.1. Thermobifida fusca	9
1.5. Ligninaktive enzymer	10
1.5.1. Peroksidaser	10
1.5.2. Katalaser.....	11
1.5.3. Lakkaser	12
1.5.4. SOD.....	14
1.5.5. Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH)	16
1.5.6. LPMO.....	17
1.6. Mål med oppgaven	19
2. MATERIALER	20
2.1. Laboratorieutstyr	20
2.2. Programvare til analyse	23
2.3. Kjemikalier	24
2.4. Proteiner, enzymer og substrater	25
2.4.1. Proteiner og enzymer	25
2.4.3. Substrater.....	26

2.5.	Bakteriestammer	26
2.6.	Medier, løsninger og buffere	27
2.6.1.	Ferdige medier	27
2.6.2.	Selvlagde medier	27
2.7.	Selvlagde løsninger og buffere	28
3.	METODER	30
3.1.	Kloning	30
3.1.1.	Transformerer av genkonstrukturer	31
3.1.2.	Oppdyrking av transformanter	31
3.1.3.	Tillaging av frysestocker	32
3.2.	Uttrykk av enzymer	32
3.2.1.	Induksjonstest	33
3.2.2.	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)	34
3.2.3.	Overuttrykk av TfSOD og TfDLDH	35
3.2.4.	Lysering av celler	36
3.3.	Rensing av enzymer	37
3.3.1.	Ionebytterkromatografi med en sterk anionbytter (IEC)	37
3.3.2.	SDS-PAGE	38
3.3.3.	Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)	39
3.3.4.	Oppkonsentrering	40
3.3.5.	Gelfiltrering (SEC)	41
3.3.6.	Bufferbytte	43
3.3.7.	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon – A ₂₈₀	43
3.4.	Krystallisering	44
3.6.	Enzymaktivitet	45
3.6.1.	Inhibering av cytochrom c reduksjon med TfSOD	46
3.6.2.	Inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol med TfSOD	47
3.6.3.	Bestemmelse av pH-optimumet til TfSOD ved inhibering av autooksidasjon til pyrogallol	48
3.6.4.	Bestemmelse av temperaturoptimumet til TfSOD ved inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol	49
3.6.5.	Oksidasjon av NADH med TfDLDH	50
3.6.6.	Bestemmelse av temperaturoptimumet til TfDLDH ved oksidering av NADH	51
3.7.	Cellepotensialet til TfSOD	51
3.8.	Elektronparamagnetisk resonans (EPR)	52
3.9.	Enzymatisk nedbrytning av dampeksplodert bjørk katalysert av lakkase	53
3.9.1.	Prøveopparbeidelse	54
3.9.2.	Analyse med gasskromatografi tilkoblet massespektroskopi (GC-MS)	54
4.	RESULTATER OG DISKUSJON	56
4.1.	Motivasjon	56

4.2.	Uttrykk og rensing av TfSOD	56
4.2.1.	Induksjonstest.....	56
4.2.2.	Rensing av TfSOD	56
4.2.3.	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon – A ₂₈₀	59
4.3.	Karakterisering av TfSOD	59
4.3.1.	Enzymaktivitet	59
4.3.2.	Inhibering av cytokrom c reduksjon med TfSOD	60
4.3.3.	Inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol med TfSOD	60
4.3.4.	Bestemmelse av pH-optimimumet til TfSOD	61
4.3.5.	Bestemmelse av temperaturoptimumet til TfSOD	62
4.3.6.	Bestemmelse av smeltepunktet til TfSOD	63
4.4.	Krystalstruktur TfSOD	64
4.5.	Cellepotensialet til TfSOD	66
4.6.	EPR med TfSOD	67
4.7.	Uttrykk og rensing av TfDLDH	69
4.7.1.	Induksjonstest.....	69
4.7.2.	Rensing av TfDLDH	69
4.8.	Karakterisering av TfDLDH.....	73
4.8.2.	Bestemmelse av temperaturoptimumet til TfDLDH	74
4.8.3.	Bestemmelse av smeltepunkt til TfDLDH.....	75
4.9.	Uttrykk av TfPO og Tfe8.....	76
4.10.	GC-MS analyse av dampeksplodert bjørk nedbrutt med lakkase	77
5.	OPPSUMMERING OG VIDERE ARBEID	79
6.	REFERANSER	80
7.	VEDLEGG.....	II
7.1.	Gensekvenser	Feil! Bokmerke er ikke definert.
7.1.1.	DNA-sekvensen til TfSOD	II
7.1.2.	DNA-sekvensen til TfDLDH	III
7.1.3.	DNA-sekvensen til TfPO	III
7.1.4.	DNA-sekvensen til Tfe8	IV
7.2.	Aminosyresekvenser	V
7.2.1.	Aminosyresekvensen til TfSOD.....	V
7.2.2.	Aminosyresekvensen til TfDLDH.....	V
7.2.3.	Aminosyresekvensen til TfPO.....	V
7.2.4.	Aminosyresekvensen til Tfe8	VI

Forkortelser

Benevning	Forklaring
°	Grader
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Da	Dalton
dH ₂ O	Destillert vann av milli-q kvalitet
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Etanol
F.eks.	For eksempel
g	Gram
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi tilkoblet massespektroskopi
HIC	Hydrofob interaksjonskromatografi
IEC	Ionebytterkromatografi
IPTG	Isopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosid
K	Kelvin
k	Kilo
kDa	kilodalton
L	Liter

Benevning	Forklaring
M	Molar (mol/L)
MES	2-(N-morfolin) etansulfonic syre
Mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar (millimol/L)
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-morfolin) propansvovelsyre
MS	Massespektroskopi
mV	Millivolt
ng	Nanogram
nL	Nanoliter
nm	Nanometer
°C	Grader (Celsius)
OD	Optisk tetthet
pI	Isoelektrisk punkt
rpm	Omdreiningar per minutt
SDS-PAGE	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Størrelses eksklusjons kromatografi
t	Temperatur
<i>Tf</i> DLDH	<i>Thermobifida fusca</i> dilipoamid dehydrogenase

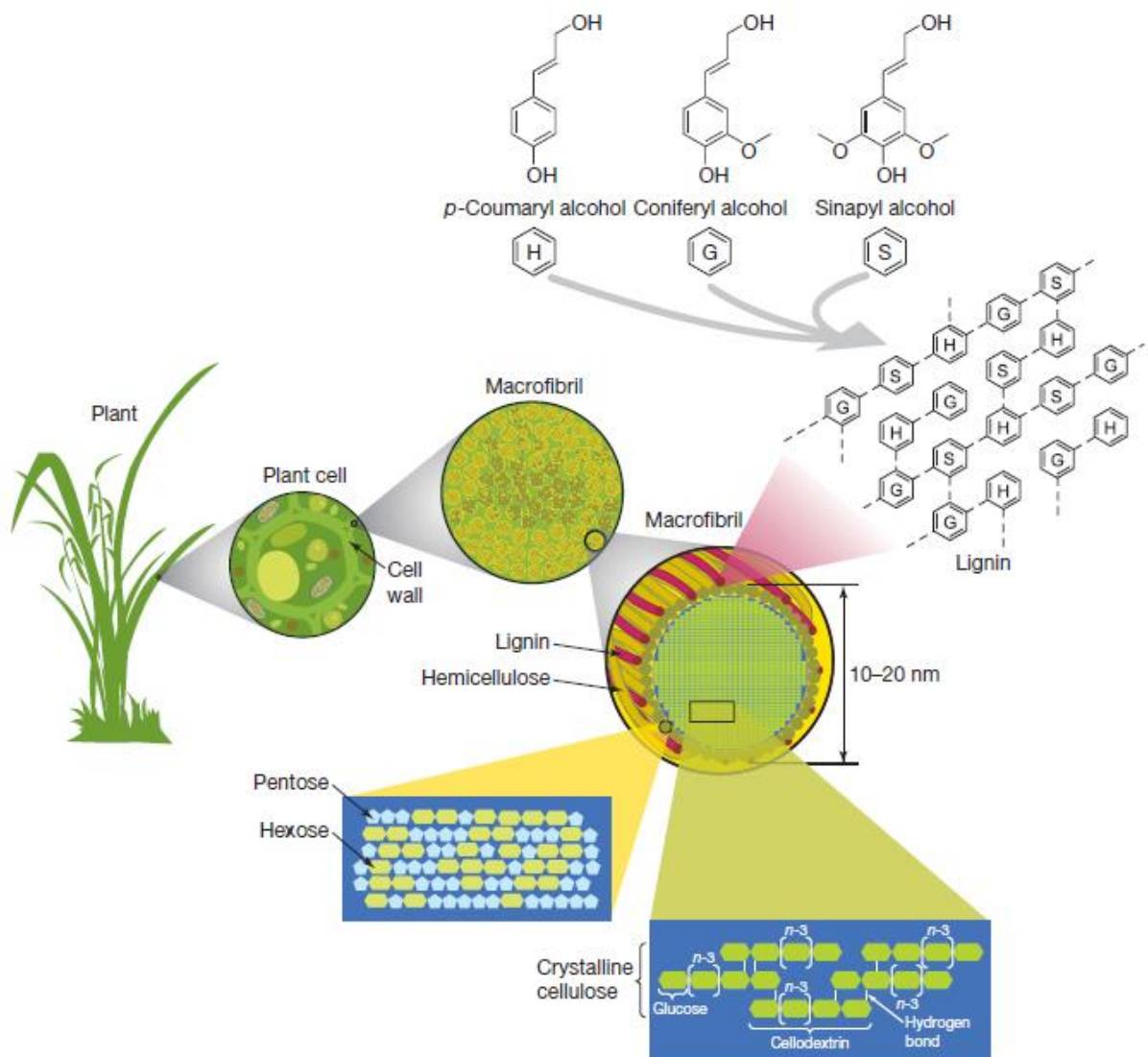
Benevning	Forklaring
<i>TfE8</i>	<i>Thermobifida fusca</i> E8
<i>TfPO</i>	<i>Thermobifida fusca</i> polyphenol oksidase
<i>TfSOD</i>	<i>Thermobifida fusca</i> superoksid dismutase
TMP	N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine
x g	Relative centrifuge force
ε	Ekstinksjonskoeffisienten

1. INTRODUKSJON

1.1. Biomasse

Biomasse er et organisk materiale som stammer fra planter og dyr og det inneholder lagret energi fra sollys. Den eldste energikilden stammer fra biomasse og er fremdeles brukt av store deler av dagens befolkning ettersom forekomsten er tilstrekkelig på jorda. Etterspørselen av energi er stor i verden og det meste av energien blir utvunnet ved forbrenning av plantebiomasse. For å mette energibehovet og samtidig minke drivhusgassutslippene er produksjon av bioenergi fra plantebiomasse en attraktiv løsning siden plantebiomasse er en fornybar ressurs. Produksjon av biodrivstoff fra biomasse som lignocellulose er dermed av interesse i industrien.

Lignocellulose er plantebiomasse med høyt innhold av lignin, cellulose og hemicellulose. Det som skiller lignin fra cellulose og hemicellulose er oppbygningen av polymeren. Cellulose og hemicellulose består hovedsakelig av karbohydrater. Cellulose er bygget opp av glukosemonomerer som er bundet sammen via eterbindinger. Hemicellulose er bygget opp av 5- og 6- sukkermonomerer som arabinose, glukose, mannose og xylose. Lignin er bygget opp av krysskoblede monolignoler via ulike eter og karbon-karbon bindinger (Gonzalo et al., 2016; Jung et al., 2015). Til sammen vil disse tre biopolymerene danne strukturer som kalles mikrofibriler som er videre organisert i strukturer kalt makrofibriler i plantecelleveggen. Disse strukturene gir planter mekanisk styrke og fleksibilitet (figur 1-1) (Rubin, 2008).



Figur 1-1. Skjematisk figur av plantebiomassens innhold av cellulose, hemicellulose og lignin. Cellulose består hovedsakelig av glukosemonomerer bundet sammen via $\beta(1-4)$ -bindinger. Den krystallinske strukturen består av glukosekjeder bundet sammen via hydrogenbindinger (cellobiose). Hemicellulose består av 5 – og 6 – karbon sukkerer som arabinose, glukose, mannose og xylose. Lignin består av monolignolene *p*-kumarylalkohol (H), coniferylalkohol (G) og sinapylalkohol (S). Disse tre polymerene danner strukturer som kalles mikrofibriler som er organisert i makrofibriler som befinner seg i plantecelleveggen (Rubin, 2008).

Andelen av de tre biopolymerene er ulikt fordelt i plantearter (tabell 1-1). I tillegg består lignocellulose av ekstraktiver som proteiner, lipider, pektin, løselige sukker og mineraler. Andelen av ekstraktivene i lignocellulose er omtrent 2-5 % (Gonzalo et al., 2016; Horn et al., 2012).

Tabell 1-1. Prosentandelen av de ulike biopolymerene i ulike plantebiomasser (Bajpai, 2016; Ragauskas et al., 2014).

	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Løvtrær	40-55	24-40	18-25
Bartrær	45-50	25-35	25-35
Hvetepiante	30	50	15
Maisplante	45	35	15
Gress	25-40	35-50	10-30

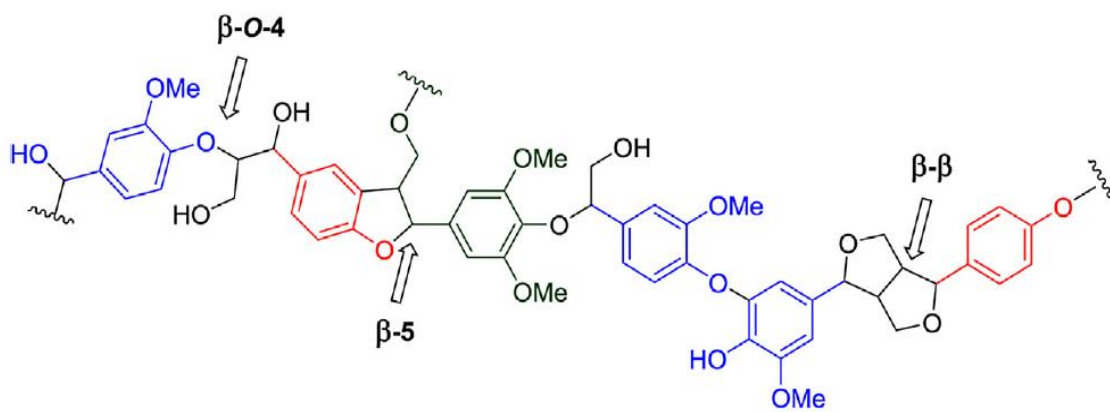
1.1.1. Lignin

Etter cellulose er lignin den biopolymeren det finnes mest av i naturen. Lignin bidrar til beskyttelse av planter mot hydrolyse av cellulose og hemicellulose (Gonzalo et al., 2016). Polymeren gir styrke og stivhet til jordplanter samt beskyttelse mot mikrobielle angrep. I tillegg bidrar den i transporten av vann og næringsstoffer i plantevev siden den er hydrofob og dermed ikke permeabel sammenlignet med cellulose og hemicellulose (Beckham et al., 2016; Boerjan et al., 2003; Oslo, 2018)

Biosyntesen av den aromatiske heteropolymeren skjer via oksidative koblingsreaksjoner initiert av monolignoler som varierer i graden av metoksylering. Dimere katalyseres ved at monolignolene oksideres til deres respektive fenolradikaler som deretter polymeriseres ved 1-elektronoksidasjoner. Polymeriseringen av fenolradikalene katalyseres av peroksidaser og lakkaser. Ligninenhetene kan kobles sammen via ulike bindinger, men bindingene som opptrer mest i polymeren involverer beta-karbonet som β - β , β -O-4 og β -5 bindinger (figur 1-2) (Alejandro et al., 2012; Gonzalo et al., 2016; Ragauskas et al., 2014).

Lignin er bygget opp av de aromatiske alkoholene p-koumarylalkohol (H), coniferylalkohol (G) og sinapylalkohol (S). Disse monolignolene danner henholdsvis p-hydroksyfenyl **H**, guaiacyl **G** og syringyl **S** fenylpropanoid enheter når de inkorporeres i ligninpolymeren. Lignin fra

løvtrær (hardwood) består hovedsakelig av G- og S-enheter med spor av H-enheter, mens lignin fra bartrær (softwood) består hovedsakelig av G-enheter med litt H-enheter (Boerjan et al., 2003; Zakzeski et al., 2010). Økt nedbrytning av lignocellulose er observert hos planter med høyt innhold av S-enheter siden disse er mindre metoksyleret sammenlignet med G- og H-enheter. Flere metoksygrupper betyr mindre tilgjengelige reaktive seter i ligninpolymeren. I tillegg har S-enhet høy andel av β -O-4 bindinger som er enklere å spalte i forhold til β - β og β -5 bindinger (Marriott et al., 2016; Ziebell et al., 2010).



Figur 1-2. Eksempel på et ligninfragment med de mest vanlige bindingene. Monomerene i polymeren er p-hydroksyfenyl H, guaiacyl G og syringyl S fenypropanoid enheter som er fargelagt med rødt, blått og svart henholdsvis (Gonzalo et al., 2016).

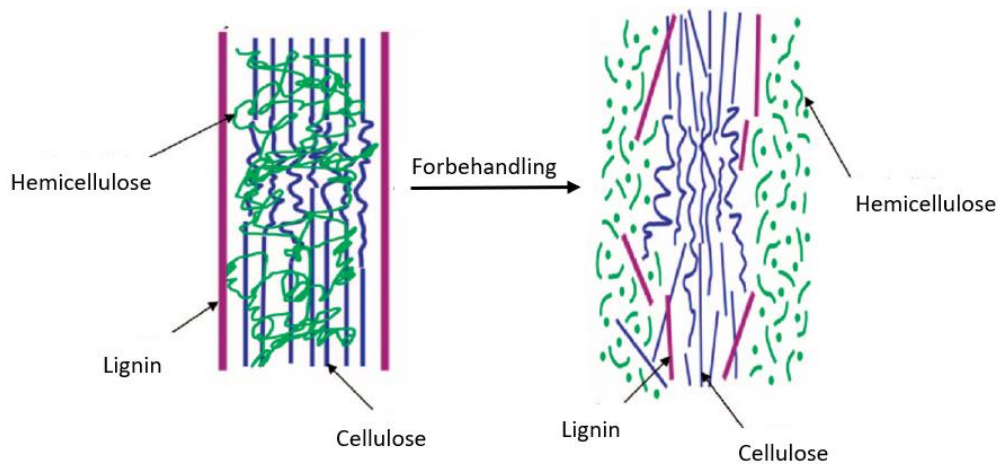
1.2. utfordringer ved ligninnedbrytning

Enzymatisk nedbrytning av lignin er utfordrende som følge av sin heterogene aromatiske oppbygning. Den største utfordringen er tilgjengeligheten til de aromatiske forbindelsene i den forgrenet polymeren. I tillegg er bindingene mellom enhetene som bygger opp ligninpolymeren (β - β , β -O-4 og β -5) generelt motstandsdyktige mot hydrolysering, derfor må lignin forbehandles før enzymatisk nedbrytning. En annen utfordring ved nedbrytning med enzymer er at ligninfragmenter som dannes ved oksidativ spalting har en tendens til å repolymerisere. Repolymeriseringen resulterer i heterogene forbindelser med høyere molekylvekt (Bugg & Rahmanpour, 2015; Rahmanpour et al., 2017; Zakzeski et al., 2010). Flere genetiske modifikasjoner i ligninbiosyntesen har blitt utført med målet om å redusere utfordringer ved

biomasse produksjonen. De mest fremtredende eksemplene er enten å endre mengdeforholdet av monolignoler eller omdirigering av kjemiske bindingstyper via ekspresjon av alternative monolignoler (Beckham et al., 2016). Det har nylig blitt oppdaget at det finnes enzymer som hindrer repolymeriseringen av lignin som enzymet dihydrolipoamid dehydrogenase (Rahmanpour et al., 2017).

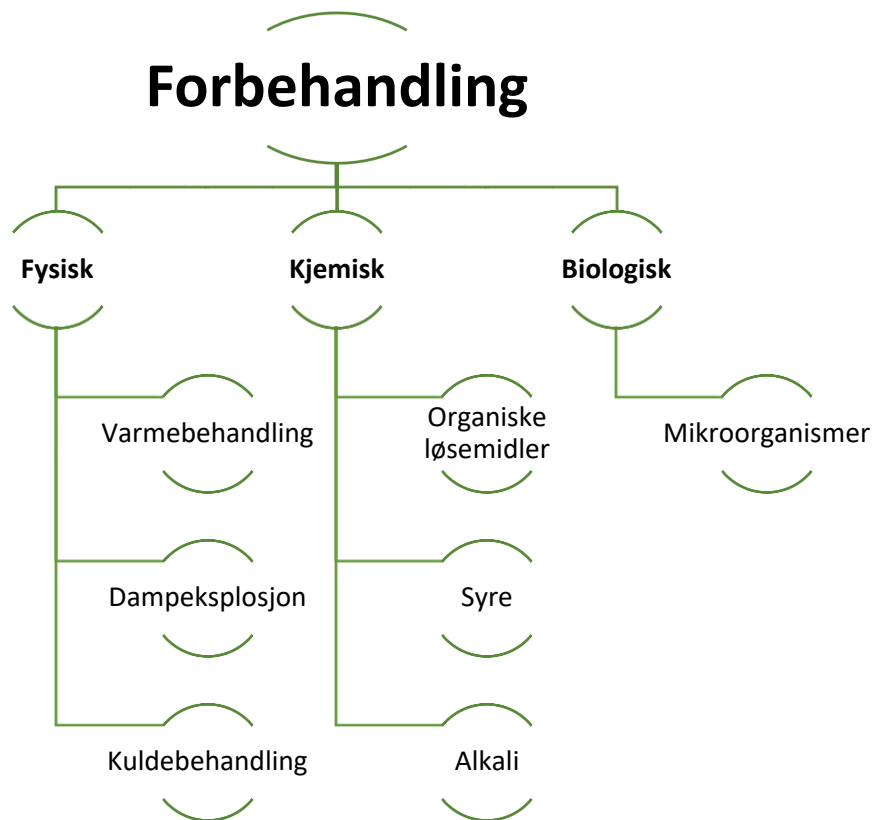
1.2.1. Forbehandling av biomasse

Utfordringene ved enzymatisk nedbrytning av biomasse kan delvis løses ved forbehandling av substratet (figur 1-4). Ved forbehandling er målet å bryte ligninforseglingen og forstyrre den krystallinske strukturen til cellulose (figur 1-3). En forbehandlingsmetode kan inneholde både fysiske og kjemiske trinn. Fysisk forbehandling er en prosess der biomassen gjennomgår en størrelsesreduksjon som vil øke antall enzymtilgjengelige områder. Kjemisk forbehandling er en reduksjons- og modifiseringsprosess av kjemiske hovedkomponenter (f.eks hemicellulose og cellulose) i biomassen som forstyrrer nedbrytningen (Mosier et al., 2005; Zhu & Pan, 2010b). Ulempen ved å benytte seg av disse forbehandlingsmetodene er at de ikke er kostnadseffektive, og kan bidra til økt sekundær forurensing. Det er også mulig å bruke mikroorganismer ved forbehandling som produserer enzymer som bryter ned plantecelleveggen, men denne forbehandlingen er nedprioritert da vekstperioden krever kontrollerte forhold og er tidskrevende (Mupondwa et al., 2017; Su et al., 2018).



Figur 1-3. Skjematisk figur av biomasse før og etter forbehandling (modifisert fra (Kumar et al., 2009)). Målet med forbehandling av biomasse er å bryte ligninforseglingen og forstyrre den krystallinske strukturen til cellulose.

Forbehandlingsprosesser av tremasse omfatter organiske løsemidler, fortynnet syre, dampekspløsjon, og sulfittbehandling for å overvinne motstandsdyktigheten til lignocellulose (SPORL) (Chylenski et al., 2017). Forbehandling av lignin med organiske løsemidler som etanol, metanol, aceton, fenol og etylen glykol blir omtalt som organosolvering (Mabee et al., 2006; Mupondwa et al., 2017). Metoden går utpå at et konsentrert løsemiddel i vann (alt fra 40 % til 75 %) blir tilsatt biomassen under høye temperaturer (~ 140 – 220 °C) over en viss tidsperiode. Ligninutbyttet er høyt ved anvendelse av denne metoden, men det er viktig at biomassen vaskes etter forbehandlingen for å unngå utfelling av lignin (Pan et al., 2006; Zhao et al., 2009). Dampekspløsjon av biomasse er en annen forbehandlingsmetode. Metoden benytter damping under høyt trykk av biomassen, etterfulgt av rask reduksjon av trykket som resulterer i dekompressjon av biomassekomponenten. Lignin blir delvis fjernet eller omfordelt og cellulosen mer tilgjengelig etter dampekspløsjon. En syrekatalysert dampekspløsjon er en forbehandling som bryter ned bindingene mellom hemicellulose- og celluloseenhetene. Ulempen er at metoden gir lavt utbytte av sukkerinnholdet (omtrent 65 %) i biomassen (Auxenfans et al., 2017; Monavari et al., 2009; Zhu et al., 2010a).



Figur 1-4. Oversikt over de vanligste forbehandlingsmetodene av biomasse fra trær. Fysiske, kjemiske og biologiske metoder er mulig å anvende på biomassen for optimalisering av påfølgende enzymatisk nedbrytning.

1.3. Produkter av lignin, reelle og potensielle

Bioteknologiske nedbrytningsmetoder av biomasse gjør det mulig å produsere biodrivstoff og komponenter til bruk i matindustrien samt medisindustrien (figur 1-5) (Borregaard, 2018; Himmel et al., 2007; Kumar et al., 2009). Med få unntak vil de fleste metodene for depolymerisering resultere i heterogene aromatiske forbindelser som avhenger av råstoffet, nedbrytningsmetoden og kontaminanter fra andre biopolymerer. Ved anvendelse av biomassen i drivstoff er det akseptabelt med en heterogen blanding bestående av ulike aromatiske forbindelser. Ved biomasse anvendelse i kjemikalieproduksjon er denne heterogeniteten mindre akseptabel, og utgjør dermed en stor utfordring der renhet og prosent utbytte er av stor betydning (Beckham et al., 2016; Ragauskas et al., 2014; Rubin, 2008).



Figur 1-5. Oversikt over noen av de reelle og potensielle lignin anvendelsene (Baurhoo et al., 2008; Borregaard, 2018; Kubo et al., 1998; Lange et al., 2013; Ragauskas et al., 2014; Vinardell & Mitjans, 2017; Wilkins, 1983). Lignin kan brukes på tvers av ulike industrier ved en kostnad- og tidseffektiv nedbrytningsprosess.

1.4. Ligninnedbrytende organismer

I naturen brytes lignin ned av planter, bakterier og sopp som er anlagt med oksidative enzymer. Sopp deles inn i to grupper, hviteråte- og brunråtesopp, der hviteråtesopp bryter ned lignin i en større grad sammenlignet med brunråtesopp. Dette kommer av at hviteråtesopp benytter seg av ekstracellulære oksidative enzymer, mens brunråtesopp hydrolyserer cellulosekomponentene i lignocellulose samtidig som lignin blir delvis oksidert. Sopp bryter ned lignin mer effektivt enn bakterier, som har en langsommere og mer avgrenset nedbrytning (Beckham et al., 2016; Janusz et al., 2017). Bakterier har likevel flere fordeler ved nedbrytning av biomasse sammenlignet med sopp. Fordelene er blant annet produksjon av multikomplekser bestående av heterologe enzymer som resulterer i høyere aktivitet og forsterket synergi. I tillegg har bakterier høy vekstrate og de kan vokse i ulike miljø og under ekstreme forhold (termofile, acidofile, halofile

osv.) som resulterer i stabile enzymer. Slike enzymer er av industriell interesse da de tåler forholdene som trengs under biomasseomsetningen (Gomez del Pulgar & Saadeddin, 2014).

Som tidligere nevnt vil nedbrytningen av lignin resultere i heterogene produkter. Noen mikroorganismer har gjennom evolusjonen utviklet et reaksjonsforløp omtalt som «biological funneling», der de heterogene produktene kan benyttes i karbonsyklusen. De evolverte metabolske veiene konverterer de heterogene aromatiske forbindelsene via «upper pathways» til sentrale mellomprodukter. Mellomproduktene bearbeides videre via «lower pathways» til utnyttelse i den sentrale karbonmetabolismen. «Biological funneling» kan løse mange utfordringer forbundet med heterogeniteten til lignin om den kan mimikeres *in vitro* til bruk i for eksempel bioraffineri (Beckham et al., 2016; Linger et al., 2014).

1.4.1. *Thermobifida fusca*

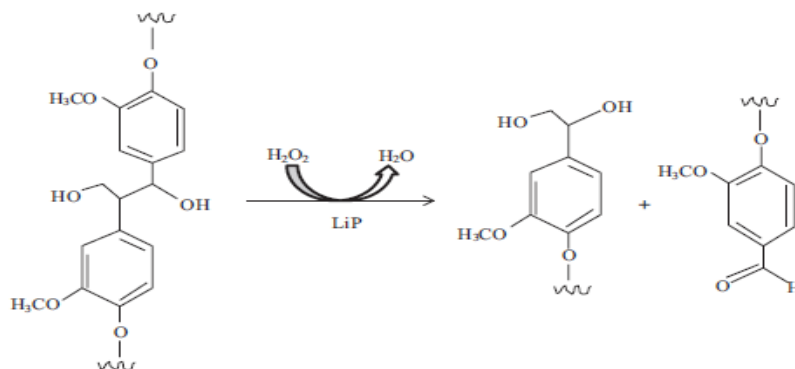
Ligninaktive bakterier deles inn i tre klasser, aktinomyser, α -proteobakterier og γ -proteobakterier (Bugg et al., 2011b). Et eksempel på en ligninaktiv termofil aktinobakterie er *Thermobifida fusca*. Den grampositive bakterien minner om sopp i oppbygging med deres langstrakte celler som strekker og deler seg inn i filamenter som minner om hyfer. Filamentene hjelper organismen i diffusjonen og dekomponeringen av uløselige substrater som lignocellulose. *T. fusca* har en endospore som gjør at den kan overleve i de mest ekstreme miljøer over lengre perioder (Gomez del Pulgar & Saadeddin, 2014; Lykidis et al., 2007). Adav et al. (2012) fant ut at *T. fusca* produserte ligninaktive enzymer som var oppregulert når bakterien vokste på lignocellulose. Dihydrolipoamide dehydrogenase og superoksid dismutase er eksempler på oppregulerte ekstracellulære enzymer som bakterien produserte (Adav et al., 2012). Termofile bakterier er foretrukne kilder til termostabile enzymer som har potensielle industrielle applikasjoner. Enzymer klassifisert som termostabile må ha en høy denatureringstemperatur (T_m) eller et langt halvliv ved en utvalgt høy temperatur (over 55 °C). Termofile enzymer er ofte mer resistente mot inhibitorer, protein detergent, kontamineringer m.m sammenlignet med enzymer isolert fra mesofile (25-50 °C) eller psykrofile (under 25 °C) bakterier (Bhalla et al., 2013; Li et al., 2016; Turner et al., 2007).

1.5. Ligninaktive enzymer

Enzymer involvert i ligninnedbrytning deles inn i to hovedgrupper; ligninmodifiserende enzymer og ligninnedbrytende hjelpeenzymer. Sistnevnte kan ikke degradere lignin på egenhånd, men er nødvendige for nedbrytningsprosessen. Ligninmodifiserende enzymer bryter ned lignin ved generering av frie radikaler som enkelt når deres respektive substrater i ligninpolymeren. Ligninmodifiserende enzymer er ikke-spesifikke og vil dermed bryte ned et bredt spekter av komponenter lignende ligninstrukturen. Ligninnedbrytende hjelpeenzymer bidrar i nedbryting av ligninpolymeren ved å produsere hydrogenperoksid som er nødvendig for reaksjoner katalysert av f.eks. peroksidaser. Denne enzymgruppen består hovedsakelig av oksidaser og dehydrogenaser som arylalkohol oksidase, glyoxaloksidase og glukose 1-oksidas (Falade et al., 2016; Gonzalo et al., 2016; Silva Coelho-Moreira et al., 2013).

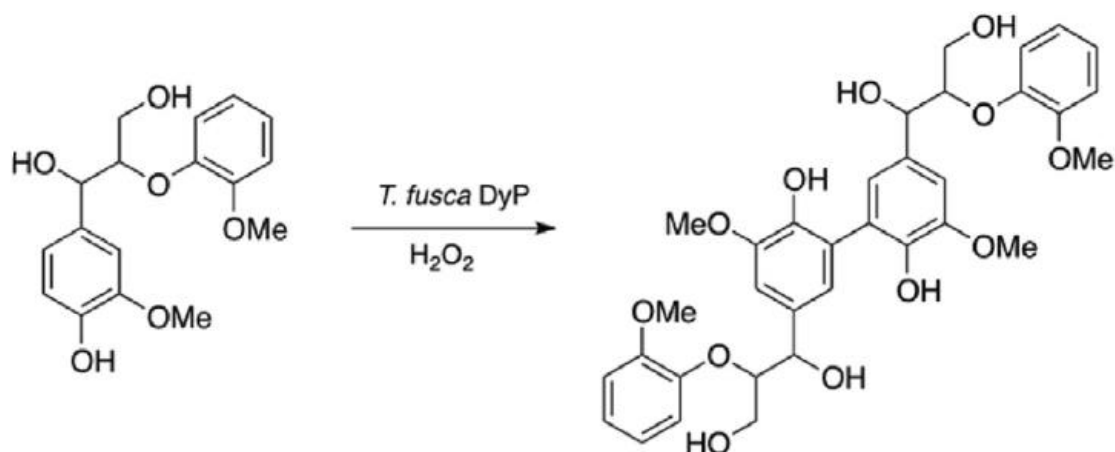
1.5.1. Peroksidaser

Peroksidaser er oksidreduktaser som produseres av planter, dyr og mikroorganismer. Enzymene katalyserer reduksjonen av peroksider som hydrogenperoksid (H_2O_2) samt oksidasjonen av organiske og uorganiske molekyler (Bansal & Kanwar, 2013). Hvitråte sopp produserer ulike peroksidaser med hemgrupper som er ligninaktive som ligninperoksidase (LiP), manganperoksidase (MnP) og versatilperoksidase (VP). Bakterier produserer en annen type peroksidaser som er ligninaktive, disse kalles dye-decolorizing peroksidaser (DyP). DyP er peroksidaser med hemgrupper som deles fylogenetisk inn i fire grupper DyPA-D og er generelt aktive på monofenoler, men noen DyPer har vist aktivitet på ikke-fenoler som veratryl alkohol. Genom og proteomikk analyser avslører ingen homologe sekvenser mellom bakterielle og sopp peroksidaser som er ligninaktive, likevel har de samme katalytiske egenskaper samt likt redokspotensial og reaktivitet (Gonzalo et al., 2016; Rahmanpour et al., 2016; Sugano, 2009). Peroksidaser som stammer fra både bakterier og sopp bryter ned lignin ved oksidering av redoks mellomprodukter (figur 1-6).



Figur 1-6. Oksidativ spalting av β -1 bindingen i lignin katalysert av en lignin peroksidase (LiP). Den generelle reaksjonen er $2S + H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2S_{\text{oks}} + 2H_2O$. Der S= substrat og S_{oks} = oksidert substrat (Falade et al., 2016).

DyPer er utstyrt med bindings seter på overflaten siden de fleste substratene er for store til at de kan nå det aktive setet til enzymene. Ulempen ved anvendelsen av DyPer *in vitro* er at enzymene bidrar til repolymerisering av ligninpolymeren ved fenolradikalkoblinger, og dermed kan de ikke anvendes i industrien (figur 1-7). I naturen observeres ikke dette fenomenet, der vil lignin kun brytes ned via dannelsen av fenolradikaler (Bansal & Kanwar, 2013; Rahmanpour et al., 2016).



Figur 1-7. DyP fra *T. fusca* katalyserer dimeriseringen av vanillin. Oksideringen av vanillin i ligninpolymeren resulterer i et dimerisk produkt (Rahmanpour et al., 2016; Gonzalo, 2016).

1.5.2. Katalaser

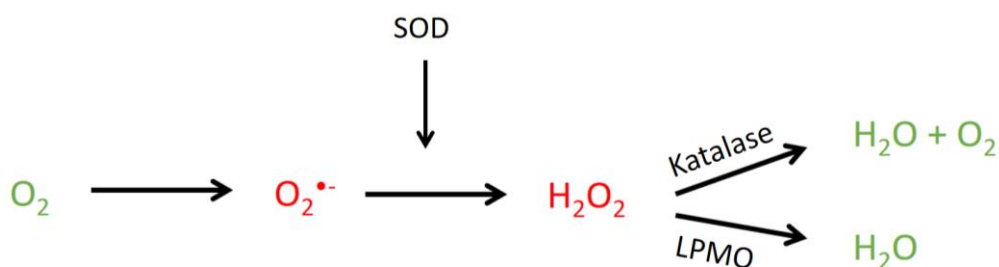
Katalaser er oksidative enzymer som finnes i planter, mennesker og mikroorganismer (Levy et al., 1992; LOEW, 1900). Enzymene beskytter mot oksidativ stress ved å katalysere spaltingen

av hydrogenperoksid til oksygen og vann, ligning 1-1 (Zamocky & Koller, 1999; Zamocky et al., 2008).



Ligning 1-1

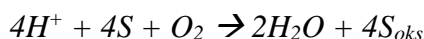
Katalaser deles inn i to grupper, med hemgruppe og uten. Førstnevnte deles videre inn i to undergrupper; typiske (monofunksjonelle) katalaser og katalase-peroksidaser. Katalaser uten hemgruppe har mangan i sitt aktive sete istedenfor jern (Bernroither et al., 2009). Hos begge hovedgruppene er det aktive setet begravd inn i proteinet med en substrat-tunnel som er lang og smal. Substratveien er utstyrt med ulike ladde grupper for å avgrense adgangen av molekyler (Vidossich et al., 2012; Whittaker, 2012). Figur 1-8 viser et eksempel der katalaser kan benyttes som hjelpeenzym i lignin nedbrytning ved at de bryter ned hydrogenperoksid som dannes av andre ligninaktive enzymer som superoksid dismutaser (SODer) (Scott et al., 2016).



Figur 1-8. Eksempel på en reaksjon katalysert av katalase som hjelpeenzym ved nedbrytning av hydrogenperoksid som dannes av ligninaktive enzymer som SODer.

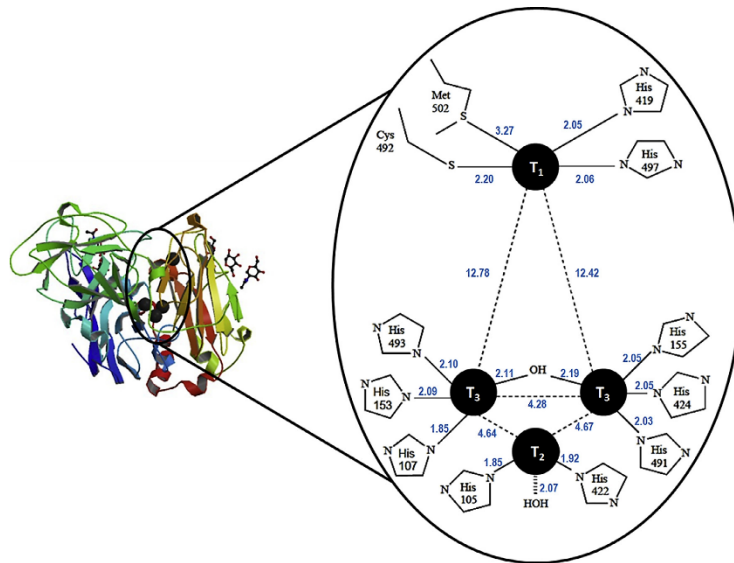
1.5.3. Lakkaser

Lakkaser er multi-kobber oksidaser som utfører 1-elektronoksidasjoner av organiske aromatiske forbindelser til korresponderende radikalforbindelser. I naturen produserer både insekter, planter, sopp og bakterier lakkaser. Disse organismene skiller ofte ut lakkasene som ekstracellulære katalysatorer til utførelse av typiske polymerisering- og depolymeriseringsreaksjoner (Cole et al., 1990; Youn et al., 1995). Den katalytiske reaksjonen til lakkaser er beskrevet i ligning 1-2 der ett oksygenmolekyl (O_2) vil oksidere fire substratmolekyler (S_{oks}) med vann (H_2O) som biprodukt (Solomon et al., 2008).



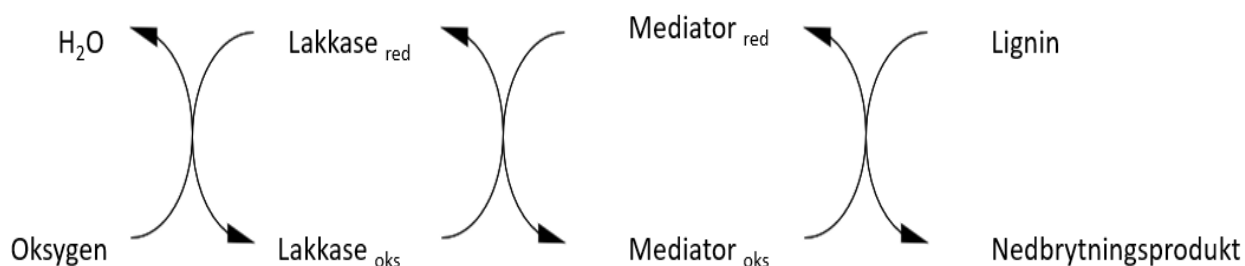
Ligning 1-2

Reaksjonsforløpet til lakkaser er avhengig av de fire konservative kobberioner som er fordelt på tre aktive seter (figur 1-9) (Rivera-Hoyos et al., 2013).



Figur 1-9. Krystallstrukturen til lakkase fra *Coriolus zonatus* med en skjematisk figur av det aktive setet. De tre fire konservative kobberionene er fordelt på de tre aktive setene markert T₁, T₂ og T₃. de tre T₂/T₃ ionene danner et triangel som kordineres av konservative histidinresiduer (Rivera-Hoyos et al., 2013).

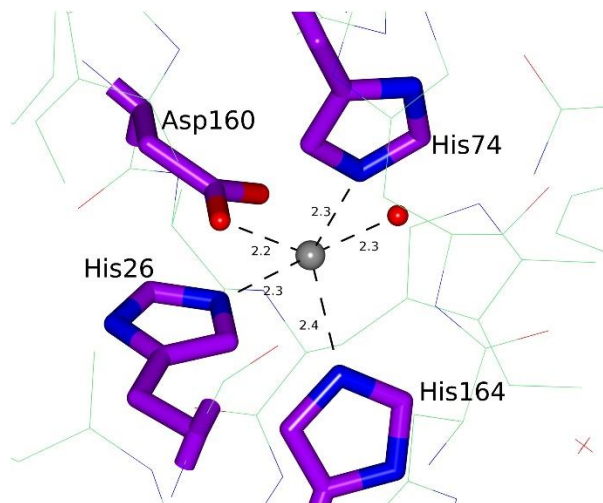
Lakkaser er attraktive i industrien som biokatalysatorer siden de i motsetning til mange oksidoreduktaser ikke krever en kofaktor og ikke er substratspesifikt (Bugg et al., 2011a; Margot et al., 2013). En annen fordel er at de ikke produserer giftig hydrogenperoksid som biprodukt. I dag anvendes lakkaser i et bredt spekter i industrien, alt fra mat -, medisin - og treindustrien til klesindustrien. Ved ligninbrytning vil en effektiv lakkasekatalysert reaksjon kreve små molekyler som kalles for mediatorer. Disse opptrer som redoks-transportører mellom de aktive setene i lakkasen og ligninpolymeren, figur 1-10 (Gonzalo et al., 2016; Majumdar et al., 2014; Munk et al., 2015).



Figur 1-10. Lakkasekatalysert redokssyklus for nedbrytning av ligninpolymeren ved dannelsen av mediatorer. Mediatorene opptrer som redokstransportører mellom de aktive setene i lakkasen og i ligninpolymeren. Oksideringsreaksjonen katalysert av lakkase benytter oksygen som elektronakseptor med dannelsen av vann som biprodukt.

1.5.4. SOD

Superoksid dismutaser (SODer) er metallenzymmer som har en sentral rolle i metaboliseringen av superoksidradikalet ($O_2^{\bullet-}$) til molekylært oksygen (O_2) og hydrogenperoksid (H_2O_2) i en reaksjon omtalt som dismutering (Fridovich, 1995; Lavelle et al., 1973; Miller, 2001). SOD som finnes i mennesker, planter og mikroorganismer deles inn i fire grupper basert på kofaktoren i det aktive setet. Nikkel, mangan, jern eller kobber-sink er metallionene som kan finnes seg i det aktive setet. Jern- og mangan SODer er strukturelt homologe med lik geometri i det aktive setet (figur 1-11) (Li et al., 2016; Sheng et al., 2014). Primitive mikroorganismer med SOD-aktivitet har jern som kofaktor, mens gjennom evolusjonen har moderne mikroorganismer byttet ut jern med mangan som kofaktor (Miller, 2012). Noen Fe/Mn SODer kan fungere optimalt med både Fe- og Mn-ioner og disse kalles «cambialistic» SODer (Lancaster et al., 2004).



Figur 1-11. Skjematisk figur av det aktive setet til Mn-SOD fra *Chaetomium thermophilum*. Mn-ionet (grå runding) er koordinert av residuene His26 og His74 fra N-terminalen og His164 og Asp160 fra C-terminalen, i tillegg til vann eller hydroksidion (rød runding). Dette gir en fem-koordinert triagonal bipyramidal geometri (Haikarainen et al., 2014; Whittaker, 2003).

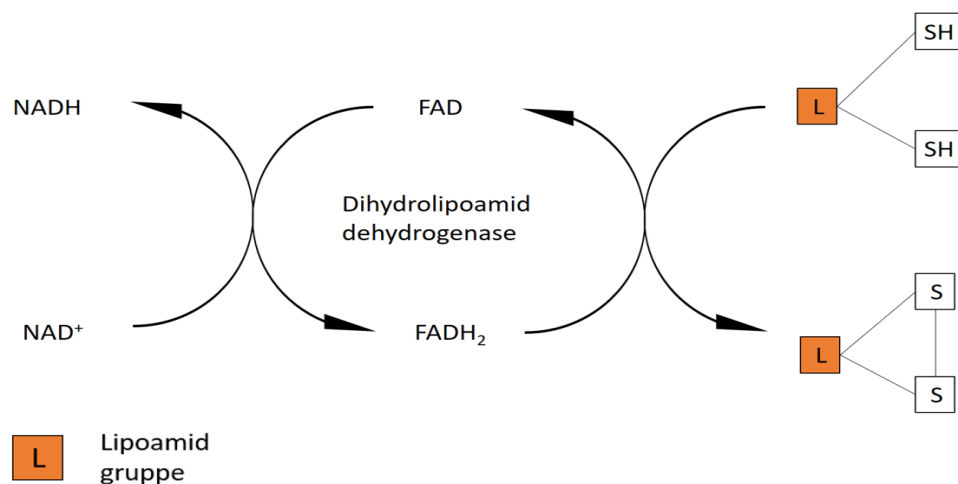
Den generelle mekanismen til superoksid dismutaser består av to halvreaksjoner, der oksidert substrat resulterer i O_2 og redusert metallion, mens redusert substrat resulterer i H_2O_2 og oksidert metallion (ligning 1-3 og 1-4) (Miller, 2012; Sheng et al., 2014).



SODer forhindrer dannelsen av oksiderende kjedereaksjoner som forårsaker omfattende skader i levende organismer (oksidativ stress), i tillegg til å hemme dannelsen skadelige reaktive oksygenforbindelser (ROS). I denne kategorien tilhører både hypokloritt (OCl^-), hydroksylradikal (HO^\bullet) og peroksynitrat (ONO_2^-) (Miller, 2012). Kosmetikk-, jordbruk- og farmasøyt industrien anvender SODer som følge av deres høye tilgjengelighet, affinitet og elimineringen av ROS (Li et al., 2016). Rashid et al. (2015) har demonstrert at SOD med mangan som kofaktor har en oksiderende aktivitet på ligninpolymeren via dannelsen av et hydroksylradikal. Radikalet er et produkt av ytterligere redusering av hydrogenperoksid (Rashid et al., 2015).

1.5.5. Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH)

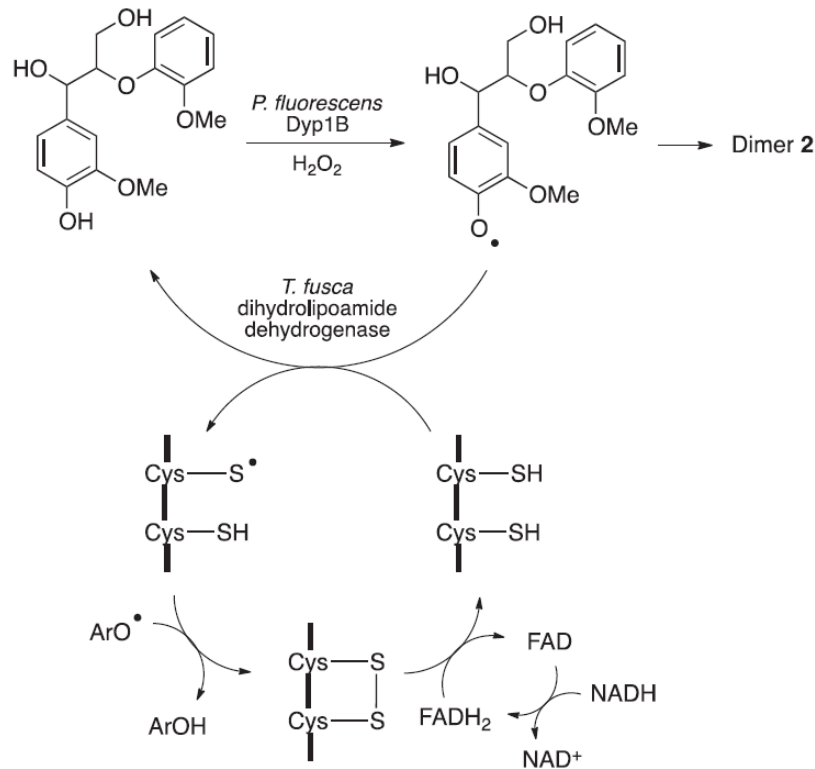
Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH), også kjent som dihydrolipoyl dehydrogenase, er et flavinprotein som er distribuert ulikt i cellene hos alle levende organismer. Den største aktiviteten til enzymet finner vi i mitokondriecellene der enzymet er en del av pyruvat dehydrogenase multikomplekset som omdanner pyruvat til acetyl-CoA (Igamberdiev et al., 2004; Patel et al., 2014; Reed, 1974). Enzymet med flavin adenin dinukleotid (FAD) som kofaktor katalyserer reaksjoner ved reduksjon av et disulfidcystein-par i det aktive setet og er dermed delaktige i raske elektronoverføringer fra dihydrolipoamid til NAD^+ (figur 1-12). Denne delen av det aktive setet er konservert på tvers av ulike arter (Douce et al., 2001; Kim, 2002; Massey et al., 1960; Reed & Hackert, 1990).



Figur 1-12. Katalytisk reaksjonsmekanisme til dihydrolipoamid dehydrogenase med raske elektronoverføringer mellom dihydrolipoamid og NAD^+ .

DLDH er et intracellulært enzym, men i bakterier som *Thermobifida fusca* og *Xanthomas campestris* er det blitt observert som et ekstracellulært enzym (Rahmanpour et al., 2017; Watt et al., 2005). Rhamanpor et al. (2017) har vist at DLDH hindrer repolymerisering av ligninpolymeren. Den foreslåtte reaksjonen er at et reduserte disulfidresidu i det aktive setet reduserer et fenolradikal mellomprodukt via 1-elektronoverføring. Overføringen resulterer i genereringen av et cysteinradikal som et mellomprodukt. Videre skjer det nok en 1-elektron overføring til et fenolradikal resulterende i et oksidert disulfid i det aktive setet. Disulfidet reduseres av FADH_2 til FAD som videre reduseres av NADH (figur 1-13). Hindring av repolymeriseringen av mellomproduktene (fenolradikalene) fører til dannelsen av mange

produkter med lav molekylvekt under enzymatisk ligninnedbrytning. Anvendelsen av DLDH som et tilleggsenzym ved enzymatisk ligninnedbrytning *in vitro* for å hindre repolymerisering vil være av industriell interesse.

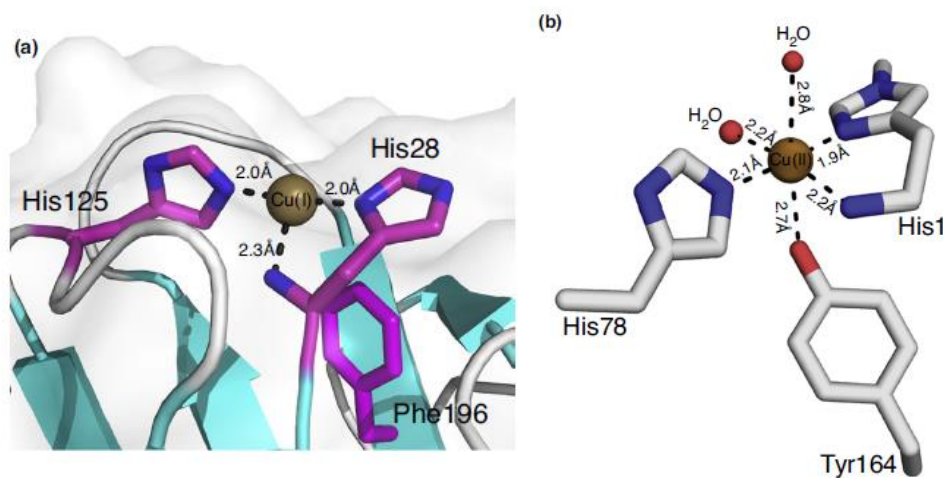


Figur 1-13. Foreslått reaksjonsforløp ved ligninnedbrytning av en hemperoksidase i tillegg til *Tf*DLDH. *Tf*DLDH reduserer fenolradikaler via et disulfid mellomprodukt i det aktive setet. Hindringen av repolymerisering av fenolradikaler fører til dannelsen av flere lavvektmolekyler under ligninnedbrytningen (Rahmanpour et al., 2017).

1.5.6. LPMO

Lytiske polysakkarid monooksygenaser (LPMOer) er en gruppe kobberavhengige enzymer som oksiderer polysakkarider i krystallinske forbindelser som cellulose og kitin (Aachmann et al., 2012a; Quinlan et al., 2011; Vaaje-Kolstad et al., 2010). Enzymene er funnet hos flere organismer, alt fra sopp, bakterier og planter til dyr og virus. LPMOer er klassifisert i fem familier kalt hjelpeenzymer (AA) i CAZy databasen etter substratspesifisitet og reaksjonsmekanisme. AA9, AA11, AA13 og AA14 stammer fra sopp, mens AA10 stammer fra bakterier, virus og noen eukaryote organismer. Nylig har en ny familie blitt oppdaget, AA15,

som stammer fra insekter (Couturier et al., 2018; Sabbadin et al., 2018). De fleste LPMOer er små proteiner med ett enkelt redoksaktivt katalytisk domene, mens noen har i tillegg små karbohydratbindende domener. Det aktive setet til LPMOer har en flat substratbindende overflate og inneholder et kobbersenter som aktiveres av oksygen (Cragg et al., 2015; Levasseur et al., 2013; Vaaje-Kolstad et al., 2010). Kobbersenteret er orientert av to konserverte histidinresiduer i en geometri referert til som «histidine brace» og er illustrert i figur 1-14 (Vaaje-Kolstad et al., 2017).



Figur 1-14. Koordineringen av aktivt setet til LPMOer ved redusert og oksidert tilstand. Det kobberinnholdende aktive setet til LPMOer. A) Kobber i redusert tilstand, her en gullfarget ball. Sidekjedene i aminosyrene er presentert i stavfigurer, der lillafargede delen representerer karbonatomene. Blåfargede delen representerer N-ligander. B) Kobber i oksidert tilstand (gullfarget ball) viser oktaedergeometri. Sidekjedene i aminosyrene er presentert i stavfigurer, der blåfargede delen representerer N-ligander (Aachmann et al., 2012a; Vaaje-Kolstad et al., 2017).

Ved ligninbrytning vil LPMOer oksidere C1 eller C4 bindingene på suktermolekylene som bygger opp polysakkaridene, resulterende i svekking av glykosidbindingen mellom sukkerenhetene. Reaksjonen krever molekylært oksygen og en ekstern elektrondonor som kan stamme fra substratet som gallinsyre eller ligninmolekyler, eller et enzym som jobber synergisk med LPMOet som cellobiose dehydrogenase (CDH). Elektrondonoren kan også tilsettes eksternt som askorbinsyre (Beeson et al., 2015; Dimarogona et al., 2013; Frommhagen et al., 2016). Ligning 1-5 viser den generelle reaksjonen til LPMOer.



Bissaro et al. (2017) fant nylig ut at hydrogenperoksid (H_2O_2) er et kosubstrat til LPMOer ved oksidering av polysakkarider (Bissaro et al., 2017) (ligning 1-6). Dette er et interessant funn som viser at LPMO kan anvendes med for eksempel SOD for en synergisk nedbrytning av lignocellulose.



1.6. Mål med oppgaven

Det overordnede målet er å utvikle et bakterielt ligninolytisk modellsystem som kan bryte ned lignocellulose som f. eks. dampeksplodert bjørk. Nedbrytning av lignocellulose med bakterier er ikke studert like godt som sopp slik at mer kunnskap om bakteriell nedbrytning er av interesse på bakgrunn av fordelene nevnt i avsnitt 1.4. Signifikansen med å studere bakterielle ligninaktive enzymer er at vi i tillegg har mulighet til å få et innblikk i funksjonen til metaller i biologiske systemer. Det blir også mulig å studere forholdet mellom struktur og funksjon hos proteiner. Denne type forskning er ikke bare av teoretisk interesse, men det er også praktisk da det vil føre til miljøvennlige metoder å anvende kjemi på.

Adav et al. (2012) har vist at jordbakterien *Thermobifida fusca* produserer oppregulerte ligninaktive enzymer når den vokser på lignocellulose. To av de oppregulerte enzymene er superoksid dismutase og dihydrolipoamid dehydrogenase. Dermed ble disse enzymene studert i denne oppgaven. Oppgaven er todelt, der første del bestod av uttrykk, rensing og karakterisering av de to førstnevnte enzymene. *TfSOD* ble også krystallisert, mens krystalliseringen av *TfDLDH* pågår enda. Del to omfattet anvendelsen av en kommersiell lakkase fra *Trametes versicolor* på dampeksplodert bjørk. Dette ble gjort for å undersøke effektiviteten av nedbrytningseffekten til lakkasen uten samarbeid med andre enzymer.

2. MATERIALER

2.1. Laborieutstyr

Laborieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Anaerob arbeidsbenk	Whitley A95 TG	DON Whitley Scientific
Autoklavteip	12 mm 18 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	ThermoFischer Scientific
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL 50 mL 25 mL	VWR
Blåkorkrør	Cellstar® tubes 15 mL 50 mL	Greiner Bio-One
Bordsentrifuge	Sigma I-14	LABEX
Cryorør	2 mL	Sarstedt
Dyrkningskolber	0.25 L 1 L 2 L	Nalgene
Elektroforeseutstyr	Gelkjøringskammer Gelspenningskilde	VWR
Eppendorfrør	1.5 mL 2.0 mL	Axygen
Filter	Steritop 0.22 µm Duapore membranfilter 0.45 µm	Millipore
Fryser (-20 °C)		Bosch Whirlpool

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Fryser (-80 °C)	Ultra-low freezer	SANYO
Frysetørker	Alpha 2-4 LDplus	Christ GmbH
Gasskromatografi-kolonne	60 cm TG-1701MS	ThermoFischer Scientific
Gelvisualisering	Gel Doc EZ imager	Bio-Rad
Glassutstyr		Schott-Duran/VWR
HiLoad™ 16/60	120 mL	GE Healthcare
Superdex™ 75 Prepgrade		
HiTrap Phenyl HP	5 mL	GE Healthcare
HiTrap Q HP	5 mL	GE Healthcare
Inkubator		Termaks
Isbitmaskin	KF 145	PORKKA
Kjøleskap (4 °C)		Whirlpool
Kyvetter	1 x 1 cm	VWR
	UV-etter	Eppendorf
LP – kromatografisystem	BioLogic LP system BioFrac Fraction Collector Kolonne Stempel	Bio-Rad
Magnetrører		VWR
Massespektrometer	ISQ QD	ThermoFischer Scientific
Mikrobølgeovn		Logik
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
Oppkonsentreringsrør	Amicon Ultra 0.5 10K Macrosep-10K Macrosep-30K	Merck millipore Pall Corporation Pall Corporation
Parafilm	5 cm	VWR
Pasteurpipetter	Plast, 2 mL Plast, 5 mL	VWR
Petriskåler	9 cm	Heger
pH-meter	FiveEasy Plus	Mettler Toledo

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Pipettespisser	«Next generation Tip Refill»	VWR
Ristebrett	Ps-3D Sunflower minishaker	Grant Bio
Risteinkubator	Multitron HT	Infors
Sentrifuger	Avanti™ J-25 Sentrifuge- 5430R	Beckman Eppendorf
Sentrifugerotorer	JA 10 JA 25.50 5430/5340 R	Beckman Eppendorf
Sentrifugerør	500 mL 30 mL	Nalgene
Sonikator	Vibracell	Sonics
Spektrofotometer	Cary 8454 UV-Vis AG Biophotometer Hitachi U-1900	Agilent Technologies Eppendorf Gemini
Sprøytefilter	0.20 µm	Sarstedt
Sprøyter	1 mL 2 mL 10 mL 20 mL 50 mL	BD plastipak
Sterilskap	Av-100	TelStar
Tannpirker	Sterilisert	Colgate
Teflonfilter	0.5 µm	Sigmaaldrich
Termomikser	Comfort	Eppendorf
Ultralydbad	Transsonic 460/H	Elma
Vakuumpumpe		GAST
Vannbad	Eco Temp TW12	Julabo
Varmeblokk	SBH200D	Stuart Scientific
Veieskip		VWR
Vekt	LC621P	Sartorius basic

Laboratoriestyr	Spesifikasjon	Leverandør
Lokk til GC rør	11 mm alukappe, NKJButyl/TEF	VWR
GC rør	300 uL fixed insert	ThermoFischer Scientific
Vortex	Vortex-2 Genie	Scientific industries
	MS 3 basic	IKA

2.2. Programvare til analyse

Programvare	Bruksområde	Leverandør
845x UV-Visible System	UV-spekter	Bio-Rad
ImageLab	Gelvisualisering	Bio-Rad
LP Data View	LP-kromatografisystem	Bio-Rad
NIST 11 MS Search 2.2	Identifisering av MS- fragmentioner	Life Science
Chromeleon Chromatography studio	Detektering av GC- molekyler	ThermoFischer Scientific
ExpASy	Beregning av pI, molekylvekt, ekstinksjonskoeffisient	ExpASy

2.3. Kjemikalier

Kjemikalie	Formel	Leverandør
1,2-dikloretan 99.8 %	$C_2H_4Cl_2$	Sigma-Aldrich
2-(N-morfolin) etansvovelsyre SDS buffer (20x)		Life Technologies
3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) - SDS buffer (20x)		Life Technologies
Agar		MerckMillipore
Amipicillin – natriumsalt	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Sigma-Aldrich
Ammoniakk 25 % løsnng	NH_3	FERAK
Ammoniumacetat	$(NH_4)CH_3COO$	VWR
Ammoniumformat	HCO_2NH_4	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich
Coomassie® Brilliant Blue R-250		Bio-Rad
Destillert vann, dH ₂ O (Milli-Q kvalitet)		
Dibasisk kaliumfosfat	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich
Eddiksyre	CH_3COOH	Sigma-Aldrich
Etanol	C_2H_5OH	VWR
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich
Gjærekstrakt		MerckMillipore
Glyserol	$C_3H_5O_3$	VWR
Heptan	C_6H_{16}	Sigma-Aldrich
Isopropyl β-D-1- tiogalaktopyranosid (IPTG)		Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenfosfat	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroksid	KOH	Sigma-Aldrich
Kobber(II)klorid	$CuCl_2$	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	$NaOH$	VWR
Natriumklorid	$NaCl$	Sigma-Aldrich
NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1.0 mm x 10 brønner		Life Technologies

Kjemikalie	Formel	Leverandør
NuPAGE® prøvebuffer (4x)		Life Technologies
NuPAGE® reduserende agent (10x)		Life Technologies
Protease inhibitor cocktail tablets		Sigma-Aldrich
Saltsyre	HCl	Sigma-Aldrich
Streptomycinsulfat	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5 H_2SO_4$	Sigma-Aldrich
Trizma base	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
Trypton		MerckMillipore

2.4. Proteiner, enzymer og substrater

2.4.1. Proteiner og enzymer

Protein	Spesifikasjon	Leverandør
BenchMark™ Protein Ladder		Life Technologies
Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH)	<i>Thermobifida fusca</i> Konstruktør ble bestilt fra Genscript	Selvlagd
E8	<i>Thermobifida fusca</i> Konstruktør ble bestilt fra Genscript	
Lakkase	<i>Trametes versicolor</i>	Sigma-Aldrich
Polyfenol oksidase	<i>Thermobifida fusca</i> Konstruktør ble bestilt fra Genscript	
Superoksid dismutase (SOD)	<i>Thermobifida fusca</i> Konstruktør ble bestilt fra Genscript	Selvlagd
Xantin oksidase		Sigma-Aldrich

2.4.3. Substrater

Substrat	Spesifikasjon	Leverandør
Bjørkesubstrat	Dampeksplodert	Tillaget av tidligere postdoktor Dayanand Kalyani ved NMBU
Cytokrom c		Sigma-Aldrich
Lipoamid		Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine (TMP)		Sigma-Aldrich
Pyrogallol		Sigma-Aldrich
Redusert nikotinamid adenin dinukleotid (NADH)	$C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}P_2 \cdot xH_2O$	Roche
Xantin	$C_5H_4N_4O_2$	Sigma-Aldrich

2.5. Bakteriestammer

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

2.6. Medier, løsninger og buffere

2.6.1. Ferdige medier

Medium	Innhold	Leverandør
SOC medium	2 % trypton 0.5 % gjærekstrakt 10 mM natriumklorid 2.5 mM kaliumklorid 10 mM magnesiumklorid 10 mM magnesiumsulfat 20 mM glukose	Life Technologies

2.6.2. Selvlagde medier

Medium	Innhold
Luria-Bertani (LB) medium	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g natriumklorid Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1L Autoklaveres
LB medium med agar og 100 µg/mL ampicillin	10 g trypton 5 g gjærekstrakt 10 g natriumklorid 15 g agar Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L Autoklaveres 1 mL 100 mg/mL ampicillin Fordeles i petriskåler
Terrific Broth (TB) medium	12 g trypton 24 g gjærekstrakt 4 mL glyserol Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 900 mL

Autoklaveres

Tilsettes 100 mL saltløsning før bruk

2.7. Selvlagde løsninger og buffere

Buffer/løsning	Innhold
0.25 M EDTA, pH 8.0	3.65 g EDTA Løses i dH ₂ O til 50 mL pH justeres til 8.0 med NaOH
1 M IPTG	2.38 g IPTG Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 10 mL Oppbevares ved -20 °C
1 M Tris-HCl pH 8.0	121.14 g trizma base Løses i ca. 800 mL dH ₂ O pH justeres til 8.0 med HCl Fortynnes med dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L Autoklaveres
10 % Streptomycinsulfat (w/v)	1 g streptomycinsulfat Løses i 10 mL dH ₂ O pH justeres til 7.0 med 2.5 % NH ₃
3 M Ammoniumsulfat	99.11 g ammoniumsulfat Løses i 250 mL dH ₂ O
50 mM Ammoniumformatbuffer pH 4.5	0.16 g ammoniumformat Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 500 mL pH justeres til 4.5 med formsyre
50 mM Natriumfosfatbuffer pH 7.0	69 g natriumdihydrogenfosfat 89 g dinatriumhydrogenfosfat Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 200 mL pH justeres til 7.0
Ammoniakk 2.5 %	25 % ammoniakk fortynnes i dH ₂ O
Arbeidsløsning SDS-PAGE	5 mL NuPAGE® prøvebuffer (4X)

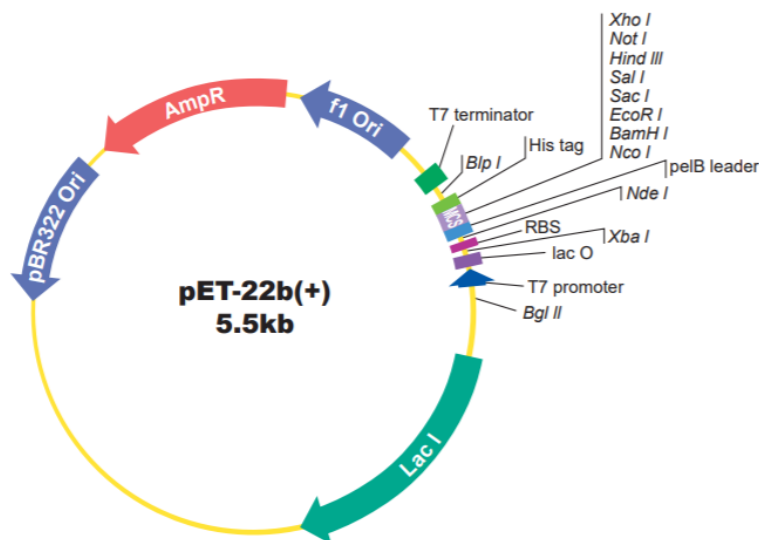
Buffer/løsning	Innhold
	2 mL NuPAGE® reduserende agent (10x) 3 mL dH ₂ O
Buffer B Phenyl HP	50 mM Tris-HCl pH 8.0 1M ammoniumsulfat
Buffer B Q HP	50 mM Tris-HCl pH 8.0 1 M natriumklorid
Buffer HiLoad Superdex	20 mM Tris-HCl pH 8.0 0.2 M natriumklorid
Fargeløsning SDS-PAGE	0.5 g comassie blue 200 mL etanol 50 mL eddiksyre Fortynnes med dH ₂ O til 0.5L
Lysisbuffer	0.3 mg/mL lysozym 1 mM EDTA 1 tablett proteasehemmer Løses i 50 mM Tris-HCl pH 8.0 til 60 mL
Running buffer SDS-PAGE (1x MES)	20x MES fortynnes i dH ₂ O
Running buffer SDS-PAGE (1x MOPS)	20x MOPS fortynnes i dH ₂ O
Saltløsning, pH 7.2	23.1 g kaliumdihydrogenfosfat (0.17 M) 125.4 g dikaliumfosfat (0.72 M) Løses i dH ₂ O til et sluttvolum på 1 L Autoklaveres

3. METODER

3.1. Kloning

Enzymene superoksid dismutase (*TfSOD*), dihydrolipoamid dehydrogenase (*TfDLDH*) og polyfenol oksidase (*TfPO*) fra *Thermobifida fusca* har ikke tidligere blitt uttrykt og rensset ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM), NMBU. E8 (*TfE8*) fra *Thermobifida fusca* har tidligere blitt rensset med tag så i denne oppgaven ble de forsøkt å uttrykke og rensse enzymet uten tag. Prosjektet ble dermed startet med å transformere konstrukter med gener som koder for disse enzymene inn i en bakteriestamme for å overuttrykke dem.

Fra en åpen nettdatabase (<http://www.uniprot.org/>) ble gen- og aminosyresekvensene hentet (vedlegg 7.1 og 7.2). Av de fire enzymene var det kun *TfDLDH* som ikke ble kodonoptimalisert for *E. coli*. Dette kommer av at tidligere erfaring med kloning av flavinproteiner har vist at det ikke er nødvendig. Kondonoptimaliseringen øker sannsynligheten for uttrykk av enzymene. Genkonstrukter for hvert enzym ble bestilt fra GenScript (<http://www.genscript.com/>). Konstruktene ble ligert inn i det multiple kloningssetet, mellom *NdeI* og *HindIII*, i pET-22b(+) vektoren. Vektoren illustrert i figur 3-1 bærer et gen for ampicillinresistens (*AmpR*) som brukes som seleksjonsmarkør (Novagen, 2006).



Figur 3-1. Skjematisk figur av pET-22b(+) vektor (GenScript, 2018). Vektoren har et multipelt kloningssete og i denne oppgaven ble genet som koder for ønsket enzym ligert mellom *NdeI* og *HindIII*.

3.1.1. Transformering av genkonstrukter

Forhåndsbestilte genkonstrukter som koder for enzymene *TfPO*, *TfE8*, *TfSOD* og *TfDLDH* ble transformert inn i bakteriestammen One Shot® BL21 star™ (DE3). Dette er *Escherichia coli* celler som har blitt kjemisk kompetente og er egnet til proteinekspresjon. Disse cellene inneholder DE3 lysogen med genet som koder for T7 RNA polymerase, som optimaliserer proteinuttrykk selv ved lavt kopinummer. I tillegg har de mutasjon i RNaseE genet *me131* som fører til lavere mRNA nedbrytning, resulterende i økt mRNA stabilitet og økt proteinutbytte. Cellene mangler proteasene *Ion* og *OmpT* som reduserer nedbrytningen av heterogene proteiner (Scientific, 2018a).

Materialer:

- One Shot® BL21 star™(DE3) celler
- SOC medium
- Autoklavert dH₂O
- LB-agarplater med 100ug/mL ampicillin
- Genkonstruktene *TfSOD*, *TfDLDH*, *TfE8* og *TfPO*

Metode:

Genkonstruktene ble løst i 50 µL autoklavert dH₂O til en konsentrasjon på 80 ng/µL. One Shot® BL21star (DE3) celler ble tint på is. 1 µL genkonstrukt overført til de tinte cellene før de ble inkubert på is i 30 minutter. Genkonstruktene ble deretter oppbevart ved -20 °C. Cellene ble videre varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder, med påfølgende inkubering på is i 2 minutter. 250 µL forvarmet (42 °C) SOC medium ble tilsatt cellene, før de ble inkubet i 1 time ved 37 °C og 200 rpm. Etter endt inkubasjon ble henholdsvis 25 µL og 150 µL cellekultur platet ut på LB-agarplater før inkubering ved 37 °C over natt.

3.1.2. Oppdyrking av transformanter

Transformerte One Shot® BL21star (DE3) celler (jf. avsnitt 3.1.1) ble dyrket opp før tillagning av frysestocker.

Materialer:

- LB- medium
- Ampicillin (100 mg/mL)
- LB-agarplater med transformanter

Metode:

I kulturør ble 5 mL LB og 5 µL ampicillin blandet. Enkeltkolonier ble plukket fra platene og inokulert i mediet. Cellekulturene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt.

3.1.3. Tillaging av frysestocker

Det ble laget frysestocker av cellekulturene (jf. avsnitt 3.1.2) for lagring ved -80 °C.

Materialer:

- Glyserol
- Cellekultur

Metode:

450 µL glyserol og 1050 µL cellekultur ble blandet i et cryorør. Frysestockene ble oppbevart ved -80 °C.

3.2. Uttrykk av enzymer

Kloning og *in vivo* uttrykk av rekombinante proteiner i *E. coli* kan utføres ved bruk av et pET ekspresjonssystem. pET-22b(+)-vektoren har en T7 *lac* promotor og en *lac* repressor. I *E. coli* cellene er tilgjengeligheten av T7 RNA polymerasesekvensen regulert av *lac* repressoren, *LacI*, som vil binde til *lac* operatoren, *lacUV5*, når laktose er fraværende. Ved tilsetning av IPTG vil den mimikere laktose og en konformasjonsendring vil føre til frigjørelsen av *LacI* repressoren fra operatorsekvensen og transkripsjon av T7 RNA polymerase initieres. Deretter vil det ønskede genet i pET-22b(+)-vektoren transkriberes av T7 RNA polymerasen (Briand et al., 2016; Mierendorf et al., 1998). To fordeler ved bruk av dette ekspresjonssystemet er at RNA

polymerase har høy selektivitet og aktivitet som fører til at alle cellens resurser går til genuttrykk (Mierendorf et al., 1998).

3.2.1. Induksjonstest

Induksjonstesten utføres for å sjekke om bakteriekulturene gir overuttrykk av det ønskede proteinet, samt for å finne optimal IPTG konsentrasjon og temperatur for overuttrykk.

Materialer:

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

Metode:

I kulturrør ble 4 mL LB-medie tilsatt 2 µL ampicillin, og en enkeltkoloni ble inokulert i mediet. Cellekulturene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt. Etter inkubering ble det overført 1 mL cellekultur til to nye rør. Til det ene røret ble det tilsatt 1 mL TB-medium, mens det til det andre ble tilsatt 1 mL LB-medium. I alle rørene ble det tilsatt 1 µL ampicillin før inkubering ved 30 °C og 200 rpm til OD₆₀₀ var mellom 0.6 og 0.8. Da ble cellekulturene induisert med 0.5 mM IPTG (for *TfPO* ble cellekulturene induisert med IPTG og 0.25 mM CuCl₂) og deretter inkubert ved 18 °C og 200 rpm over natt. Induksjonstesten ble utført i triplikater. Overuttrykk ble sjekket med SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.2.2. Ved overuttrykk ble en ny induksjonstest gjennomført hvor IPTG konsentrasjoner (0 mM til 1 mM) og temperaturer (18 °C og 30 °C) ble testet for å finne optimale betingelser for overuttrykk (tabell 3-1).

Tabell 3-1. Oversikt over betingelsene ved utførelse av induksjonstesten. Ulike medier, inkubasjonstemperaturer og IPTG konsentrasjoner ble testet.

Medium	Temperatur	IPTG (Mm)
LB	18 °C	0, 0.1, 0.2, 0.5, 1
LB	30 °C	0, 0.1, 0.2, 0.5, 1
TB	18 °C	0, 0.1, 0.2, 0.5, 1
TB	30 °C	0, 0.1, 0.2, 0.5, 1

3.2.2. Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE gjør det mulig å undersøke om en prøve inneholder ønsket protein samt grad av renhet. Før proteinprøven appliseres på gelen må proteinet denatureres. Til dette benyttes varme og en anionisk detergent som natriumdodecylsulfat (SDS) eller litiumdodecylsulfat (LDS). De anioniske detergentene folder ut proteinet ved å binde seg rundt de hydrofobe endene på aminosyrene og gir dermed en negativ ladning. Den reducerende agenten som kan være dithiothreitol (DTT), β -mercaptoethanol (β -me) eller tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) vil også være med på å folde ut proteinet ved å redusere eventuelle disulfidbindinger. De negative LDS/SDS-proteinkompleksene gjør det mulig å separere proteinene basert på deres størrelse når systemet tilføres spenning. De minste proteinene vil vandre raskere og dermed lengre i gelporene. En størrelsesmarkør, også kalt ladder, benyttes som referanse for identifisering av proteinstørrelse. For visualisering benyttes Coomassie brilliant blue, et blått fargestoff som i sur løsning bindes til basiske aminosyrer med positiv ladning (Scientific, 2018b; Scientific, 2018c; scientific, 2018d).

Materialer:

- Arbeidsløsning SDS-PAGE
- Proteinløsning(er)
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner
- BenchMark™ Protein Ladder
- 1 x MOPS / 1 x MES
- Fargeløsning SDS-PAGE
- Avfargingsløsning SDS-PAGE

Metode:

50 μ L cellepellet fra avsnitt 3.2.1 ble resuspendert i arbeidsløsning til et totalvolum lik 100 μ L før prøvene ble inkubert ved 70 °C i 10 minutter. De ble deretter spunnet ned i 10 minutter ved 16 100 x g. Gelen ble montert i elektroforesekammeret som ble fylt med 1 x MOPS / 1 x MES buffer. Buffervalget er avhengig av proteinstørrelsen og for proteiner mindre enn 30 kDa ble MES benyttet, mens for proteiner større enn 30 kDa ble MOPS benyttet. 20 μ L prøver og 7.5 μ L størrelsesmarkør ble applisert i hver sine brønner. Gelen ble påført 200 V i 50 minutter. Etter endt elektroforese ble gelen farget med SDS-PAGE fargeløsning med påfølgende avfarging med SDS-PAGE avfargingsløsning. For tidssparing ble gelen med fargeløsningen varmet opp i mikrobølgeovn i 1 min og deretter inkubert på ristebrett i 7 minutter. Det samme ble gjort med avfargingssteget som ble gjentatt til gelen viste klare proteinbånd.

3.2.3. Overuttrykk av *TfSOD* og *TfDLDH*

TfSOD og *TfDLDH* viste overuttrykk og ble videre dyrket i storskala ved de optimale betingelsene som ble funnet i induksjonstesten.

Materialer

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

Metode:

En cellekultur bestående av 50 mL LB med 50 μ L ampicillin i 250 mL dyrkningskolbe ble inokulert med enkeltkolonier plukket fra platene. Cellekulturen ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm over natt. Denne cellekulturen ble inokulert i 1L TB medium med 100 μ g/mL ampicillin i en 2 L dyrkningskolbe. Cellekulturene ble inkubert ved 30 °C til OD₆₀₀ var mellom 0.6 og 0.8. Deretter ble cellekulturene induisert med IPTG til ønsket sluttkonsentrasjon (0.5 mM for *TfSOD* og 0.2 mM for *TfDLDH*) før de ble inkubert ved 18 °C og 200 rpm over natt. Cellene ble høstet

ved sentrifugering i 20 minutter ved 11 325 x g og 4 °C. Pelleten ble oppbevart ved -20 °C frem til videre opparbeiding.

3.2.4. Lysering av celler

Frigjøring av målprotein fra cellene krever svekking av celleveggen. Målproteinet kan isoleres og renses med kromatografiske metoder. Lyseringen av *E. coli* cellene ble utført både enzymatisk (lysozym) og ved sonikering. Lysozym bryter ned peptidoglykan i celleveggen til *E. coli*. Sonikeringen vil senke viskositeten, mens streptomycinsulfat vil felle ut DNAet fra supernatanten (Laboratory, 2018; Scientific, 2018g).

Materialer:

- Cellepellet (jf. avsnitt 3.2.3)
- Lysisbuffer
 - 0.3 mg/mL lysozym
 - 1 mM EDTA
 - 1 tablett proteasehemmer
 - Løst i 50 mM Tris-HCl pH 8.0 til 60 mL
- Streptomycinsulfatløsning

Metode:

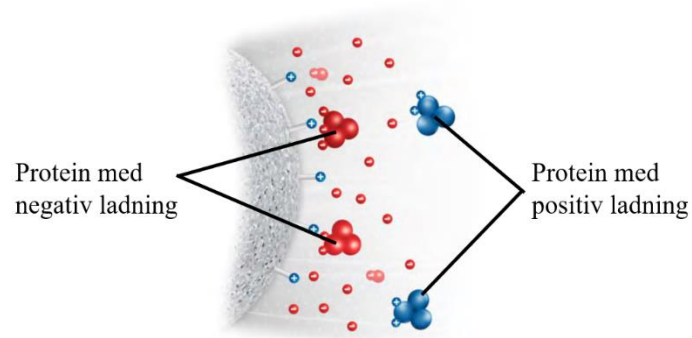
Cellepelleten ble resuspendert i 150 mL lyseringsbuffer under omrøring med magnet. Cellesuspensjonen ble overført til 35 mL sentrifugerør som videre ble inkubert ved 30 °C i 1 time. Etter inkuberingen ble rørene oppbevart på is og sonikert i 4 minutter (5 sekunder på/av) med en amplitude lik 33 %. Cellesuspensjonene ble deretter sentrifugert ved 15 000 x g og 4 °C i 30 minutter. Volumet av supernatanten ble bestemt ($V = x$ mL) og en 10 % (w/v) streptomycinsulfatløsning ble tilsatt dråpevis til supernatanten, under omrøring over en tidsperiode på 5 minutter. Løsningen ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur før den ble sentrifugert ved 11 325 x g og 4 °C i 25 minutter. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0.22 µm sterilfilter før oppbevaring ved 4 °C frem til rensing.

3.3. Rensing av enzymer

Lysatene (avsnitt 3.2.4) inneholder *E. coli* proteiner som må fjernes før videre karakterisering. *TfSOD* og *TfDLDH* har ikke tidligere blitt uttrykt uten His-Tag, og det var derfor nødvendig å utvikle renseprotokoller uten bruk av affinitetskromatografi (Ni-NTA).

3.3.1. Ionebytterkromatografi med en sterk anionbytter (IEC)

Første steget i renseprosessen var ionebytterkromatografi med en high performance sepharose kolonne fra GE Healthcare. Dette er en kolonne som tåler store mengder prøveløsning og høy hastighet. Kolonnen på 5 mL er utstyrt med kvarternære ammoniumgrupper, og er en sterk anionbytter som vil beholde sin positive ladning over et bredt pH-spekter. Negativt ladde proteiner vil binde til de positivt ladde gruppene på kolonnematerialet (figur 3-2), og kan elueres ved å øke konsentrasjon av salt eller ved å endre pH i bufferen. Siden hvert protein har et unikt forhold mellom nettoladning og pH er dette et meget effektivt rensetrinn. I denne oppgaven ble konsentrasjonene av salt økt for eluering av målproteiner.



Figur 3-2. Skjematisk figur som viser prinsippet ved anionbytter. Proteiner med motsatt ladning av matriksen vil bindes til de ioniske gruppene. Proteiner som er nøytrale eller har samme ladning som kolonnematerialet vil elueres uten å binde til kolonnematerialet (modifisert fra (GE Healthcare, 2016)).

Ved bruk av en anionbytter er det viktig å bruke en buffer som har en pH som er større enn proteinets isoelektriske punkt (pI). Om en kationbytter benyttes gjelder det motsatte (GE

Healthcare, 2016; GE Healthcare, 2018a). Proteinets pI ble beregnet med ExPASy ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005).

Tabell 3-1. Teoretisk pI for *Tf*SOD og *Tf*DLDH.

Protein	pI
<i>Tf</i> SOD	5.14
<i>Tf</i> DLDH	5.57

Materialer:

- HiTrap Q HP
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl
- 20 % EtOH
- Lysat (avsnitt 3.2.4) justert til pH 8.0

Metode:

Kolonnen ble først vasket med 20 % EtOH med en hastighet lik 4 mL/min. Denne hastigheten ble benyttet under hele rensingen. Buffer A ble deretter påsatt til baselinjen var stabil før buffer B ble benyttet til å vaske ut eventuelle urenheter. Kolonnen ble deretter ekvilibrert med buffer A. Sterilfiltrert prøveløsning ble deretter applisert. Et volum på ca. 20 mL per rensing ble benyttet for å ikke overbelaste kolonnen. Videre ble kolonnen vasket med buffer A før en gradient fra 0-60 % med Buffer B over 100 mL ble benyttet for å eluere proteinet. Fraksjoner på 4 mL ble samlet opp. Etter endt gradient ble kolonnen vasket med 100 % buffer B og deretter 20 % EtOH. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE (jf. avsnitt 3.3.2).

3.3.2. SDS-PAGE

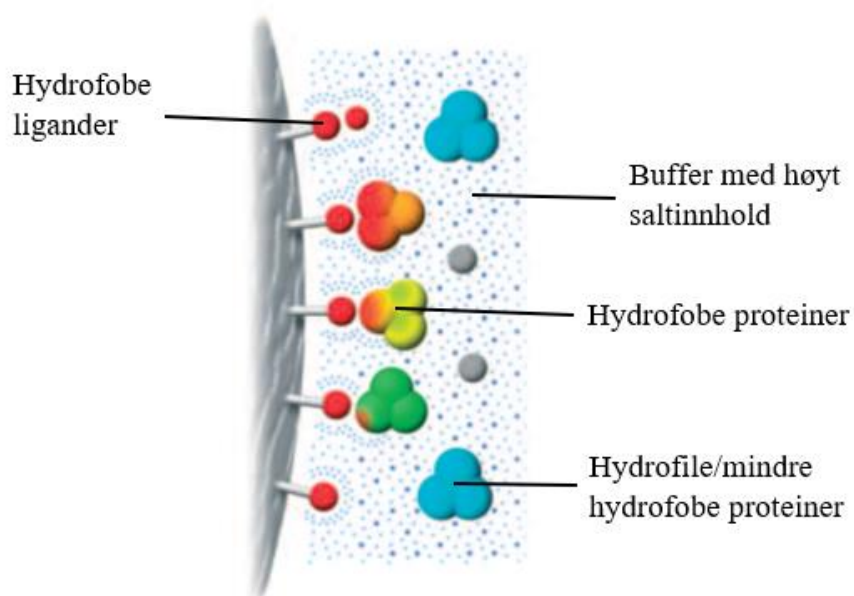
SDS-PAGE ble benyttet for å undersøke hvilke fraksjoner fra ionebytterkromatografi som inneholdt ønsket protein, samt graden av renhet. SDS-PAGE ble utført som beskrevet i avsnitt

3.2.2 med unntak av prøvetillagningen. 10 μ L prøveløsning ble tilsatt 10 μ L arbeidsløsning og inkubert ved 70 °C i 10 minutter.

Fraksjonene som gav et sterkt bånd på gelen ved riktig størrelse ble slått sammen for videre rensing.

3.3.3. Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

Andre steget i renseprosessen var hydrofob interaksjonskromatografi med en phenyl sepharose high performance kolonne fra GE Healthcare. Dette er en kolonne som tåler store mengder prøveløsning og høy hastighet. HIC kolonnen på 5 mL separerer proteiner basert på grad av overflatehydrofobisitet. Kolonnematerialet benyttet ved HIC inneholder hydrofobe ligander som interagerer med den hydrofobe proteinoverflaten. Enkelte salter vil forsterke hydrofobe interaksjoner og tilførelse av disse vil bidra til at proteinene binder til kolonnen. For selektiv eluering blir saltkonsentrasjonen redusert gradvis slik at proteinene eluerer etter graden av hydrofobisitet (figur 3-3). Hydrofobisitetsgraden defineres her som antall hydrofobe aminosyrer på proteinoverflaten (GE Healthcare, 2006; GE Healthcare, 2018b) .



Figur 3-3. Skjematisk figur som viser prinsippet ved hydrofob interaksjonskromatografi. Hydrofobe proteiner binder til de hydrofobe ligandene i matriksen. Proteiner som er hydrofile eller har lav hydrofobisitet vil elueres uten å binde til kolonnematerialet (modifisert fra (GE Healthcare, 2006)).

Materialer:

- HiTrap Phenyl HP
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M (NH₄)₂SO₄
- Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 8.0
- 3 M ammoniumsulfat
- dH₂O
- 20 % EtOH
- Fraksjoner fra IEC (avsnitt 3.3.1)

Metode:

Kolonnen ble først vasket med 20 % EtOH etterfulgt av dH₂O med en hastighet lik 4 mL/min. Dette er hastigheten som ble benyttet under hele renseprosessen. Buffer A ble deretter påsatt til baselinjen var stabil. For å vaske ut eventuelle urenheter ble kolonnen deretter vasket med buffer B, med påfølgende ekvibrering med buffer A. Fraksjonene fra IEC ble justert til buffer A ved dråpevis tilsetning av 3M ammoniumsulfat til en sluttkonsentrasjon lik 1 M. Sterilfiltrert prøveløsning ble deretter applisert. Et volum på ca. 20 mL per rensing ble benyttet for å ikke overbelaste kolonnen. Buffer A ble deretter påsatt for å vaske kolonnen før proteinene ble eluert med en gradient. Gradienten bestod av 0-70 % buffer B over 50 mL, 70-100 % buffer B over 75 mL og til slutt 100 % buffer B over 25 mL. Fraksjoner på 4 mL ble samlet opp. Etter endt gradient ble kolonnen vasket med 100 % buffer B, dH₂O og deretter 20 % EtOH. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE (jf. avsnitt 3.3.2).

3.3.4. Oppkonsentrering

Proteinløsningen ble oppkonsentrert etter rensing for å oppnå høyere konsentrasjon av målprotein. Macrosep® Advance centrifugal Devices fra PALL Corporation ble brukt til dette formålet. Sentrifugefiltrene finnes i ulike porestørrelser (10K/30K) bestående av membraner

laget av ulike materialer. Dette trinnet vil også fjerne uønskede salter og kontamineringer med molekylvekt lavere enn porestørrelsen på membranfiltrene.

Materialer:

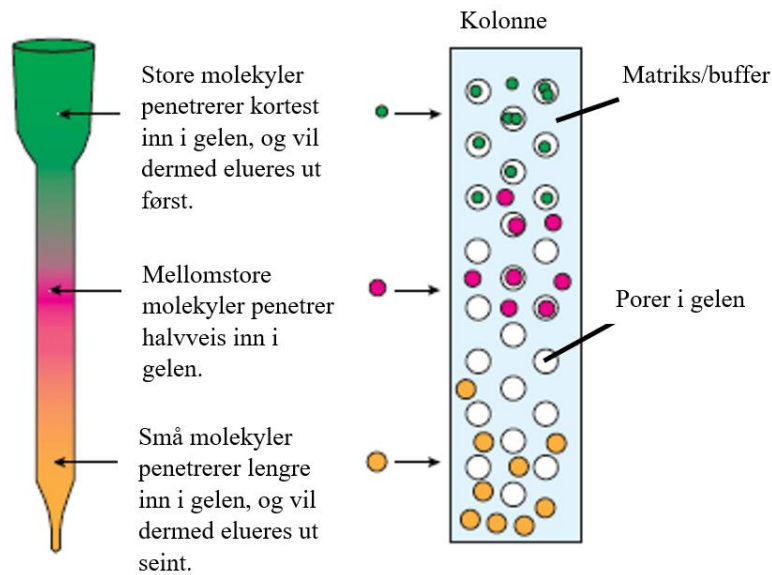
- Macrosep® Advance Centrifugal Devices 10K/30K
- Proteinløsning (jf. avsnitt 3.3.3)

Metode:

Proteinløsningen ble overført til et sentrifugefilter med ønsket porestørrelse. Rørene ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til ønsket volum (1-2 mL) var nådd.

3.3.5. Gelfiltrering (SEC)

Dersom proteinet ikke var rent etter IEC og HIC ble gelfiltrering med en HiLoad Superdex kolonne fra GE Healthcare benyttet. Gelfiltrering, også kalt størrelseseksklusjonskromatografi, baserer seg på separasjon med hensyn til størrelse. Store molekyler vil ikke kunne diffundere like langt inn i porene i kolonnematerialet, som små molekyler (figur 3-4). Desto mindre porer kolonnematerialet har, desto mer separert blir molekylene i prøveløsningen (GE Healthcare, 2010). I denne oppgaven var det kun *Tf*/DLDH som ble rensset med gelfiltrering.



Figur 3-4. Skjematisk figur som viser gelfiltreringsprinsippet. Små molekyler vil trenge lenger inn i kolonnematerialet enn store molekyler. Molekylene som penetrerer kortest vil elueres først (modifisert fra (EDVOTEK, 2018)).

Materialer:

- HiLoad 16/600 superdex 75 pg
- Avgasset 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl
- Oppkonsentrert og sterilfiltrert proteinløsning (maks 2mL)
- Avgasset 20 % EtOH
- Avgasset dH₂O

Metode:

Alle løsninger ble avgasset for å unngå at luftbobler forstyrrer kontakten mellom molekylene og kolonnematerialet. Avgassing ble utført ved inkubering i et ultralydbad i 20 minutter. Kolonnen ble først vasket med dH₂O i et volum tilsvarende halve kolonnelengden med en hastighet lik 1 mL/min. Dette er hastigheten som ble benyttet under hele renseprosessen. Deretter ble kolonnen ekvilibrert med minimum ett kolonnevolum (120 mL) med buffer. Sterilfiltrert og oppkonsentrert proteinløsning ble applisert ved hjelp av en sprøyte, og fraksjoner på 1 mL ble samlet over 120 mL. Etter endt gradient ble kolonnen vasket med dH₂O og deretter 20 % EtOH. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE (jf. avsnitt 3.3.2).

3.3.6. Bufferbytte

Ved lagring av proteiner vil det ofte være nødvendig å bytte buffer slik at proteinet får optimale forhold. Ved bruk av enzymer i forsøk er det ofte viktig at enzymet er løst i forsøksbufferen. Prinsippet er beskrevet i avsnitt 3.3.4.

Materialer:

- Oppkonsentrert proteinløsning fra rensing
- Macrosep® Advance Centrifugal Devices 10K/30K
- Lagringsbuffer
 - 50 mM Tris-HCl pH 8.0, *Tj*SOD
- Buffer til EPR forsøk
 - 20 mM natriumfosfatbuffer pH 7.0, *Tj*SOD
- Buffer til krystallisering
 - 50 mM Tris-HCl pH 7.5, *Tj*SOD

Metode:

Proteinløsningen ble overført til et sentrifugefilter og fylt med lagringsbuffer eller forsøksbuffer. Rørene ble sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C til et volum på 2 mL. Løsning som ble filtrert gjennom membranen ble dekantert, og ny buffer ble tilsatt over membranen og sentrifugert ved 4300 x g og 4 °C. Dette trinnet ble gjentatt 4 ganger for å sikre at all buffer ble byttet. Etter endt bufferbytte ble proteinløsningen overført til et cryorør og lagret ved 4 °C.

3.3.7. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon – A_{280}

Konsentrasjonen av *Tj*SOD og *Tj*DLDH ble bestemt ved absorpsjon ved 280 nm. Ved denne bølgelengden absorberer de aromatiske aminosyrene tyrosin og tryptofan elektromagnetisk stråling. Absorpsjonsverdien kan benyttes for beregning av proteinkonsentrasjonen i en løsning ved anvendelsen av Beer-Lamberts lov (ligning 3-1) (GE Healthcare, 2012; Pace et al., 1995).

$$A = c \times l \times \epsilon$$

Ligning 3-1

A er absorbansen, c er konsentrasjonen, l er lysveien og ϵ er ekstinksjonskoeffisienten (Egeland, 2017). Ekstinksjonskoeffisienten til proteiner kan beregnes ved bruk av ExPASy ProtParam

Tool på bakgrunn av aminosyresekvensen (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005).

Tabell 3-2. Ekstinksjonskoeffisienten til *TfSOD* og *TfDLDH*.

Protein	Ekstinksjonskoeffisienten (ϵ)
<i>TfSOD</i>	51910 M ⁻¹ cm ⁻¹
<i>TfDLDH</i>	27515 M ⁻¹ cm ⁻¹

Materialer:

- Proteinløsning
- Lagringsbuffer
- UVetter

Metode:

Instrumentet ble nullstilt med lagringsbufferen til proteinet. A_{280} ble målt slik at verdien $0 < A_{280} < 1$, og konsentrasjonen ble beregnet ved bruk av ligning 3-1.

3.4. Krystallisering

Enzymene *TfSOD* og *TfDLDH* ble sendt til krystallisering etter vellykket rensing. Nasjonalt senter for strukturbologi (NorStruct) i Tromsø utførte krystalliseringsforsøkene. Krystallisering er nødvendig for å få et innblikk i den tredimensjonale strukturen til proteiner (Durbin & Feher, 1996). Krystallstrukturen gjør det mulig å se strukturen til det aktive setet hos proteiner, og det er dermed mulig å bruke denne informasjonen til å designe inhibitorer eller påvirke proteinet ved å benytte modifiserte kjemiske forbindelser (McPherson, 2004). Ved tillagning av krystallstruktur kan røntgenstråler benyttes på proteinkrystaller, og da vil den beskytte krystallen sende ut diffraksjonsmønstre som rådata. Disse rådataene gjør det mulig med direkte visualisering av makromolekylene og deres komplekser (McPherson & Gavira, 2014). For at krystalliseringen av et protein skal være mulig så må proteinet overmettes. Overmetting av en proteinløsning oppnås ved at løsningen modifiseres til å redusere mediumets

evne til å løse opp proteinet. Det er også mulig å modifisere deler av proteinet for å redusere deres oppløselighet og/eller øke interaksjonene mellom proteinene i løsningen. Overmetting vil fremme dannelsen av en fast tilstand av proteinet som skal krystalliseres (McPherson, 2004).

Oppsettet til krystalliseringsforsøket til *TfSOD* (2.8 mg/mL) i 50 mM Tris-HCl pH 7.5 bestod av at 500 nL protein og 500 nL reservoarløsning ble blandet. Flere krystaller ble dannet og krystallen med best kvalitet ble dyrket i 25 % (w/v) PEG 1500 og 0.1 M dinatriummalonat dihydrat, imidazol og borsyrebuffer ved pH 8.0. Krystallen ble fryst i flytende nitrogen, og røntgenstråling ble utført ved BESSY (Berlin, Tyskland). Alle data ble analysert med egnede dataprogram, og krystallstrukturer ble laget i PyMOL. En homologmodell ble tillaget ved å bruke SOD fra *Propionobacterium freudenreichii* (PDB ID: 1BSM; 73 % sekvenslikhet) og sekvensen til *TfSOD* ved bruk av programmet SWISSMODEL. *TfSOD* strukturen ble løst ved bruk av en monomer fra homologmodellen. Krystalliseringsforsøk på *TfDLDH* pågår enda.

3.5. Bestemmelse av smeltepunkt (T_m)

Informasjon om proteinstabilitet er viktig for å kunne anvende proteinet i termiske prosesser som for eksempel en bioreaktor. Slik informasjon kan brukes til å tilrettelegge proteinmiljøet for å hindre at denaturering av anvendte proteiner oppstår (Bischof & He, 2005).

NorStruct bestemte den termiske stabiliteten til målproteinet ved å bruke et fluorescensbasert forsøksoppsett av termisk stabilitet (Layton & Hellinga, 2010). Forsøksvolumet var på 25 μ L og inkluderte 0.5 mg/mL enzym, 300X SYPRO Orangeløsning og 100 mM buffere med pH fra 5.0 til 10.5. Temperaturgradienten som ble brukt gikk fra 10 °C til 95 °C og økte med 1 °C per minutt.

3.6. Enzymaktivitet

For å undersøke om enzymenes funksjon er intakt kan aktiviteten til enzymene bestemmes. Det er utviklet ulike metoder for å måle aktiviteten avhengig av hvilket enzym som skal undersøkes. I denne oppgaven ble inhibering av cytokrom c reduksjon og inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol benyttet for *TfSOD*, mens oksidasjon av NADH ble benyttet for *TfDLDH*. Aktivitetsforsøkene baserer seg på UV-vis måling siden substratene som brukes har en farge som vil absorbere lys ved en spesifikk bølgelengde.

3.6.1. Inhibering av cytokrom c reduksjon med TjSOD

Aktiviteten til superoksid dismutase kan bestemmes basert på dens evne til å inhibere cytokrom c reduksjonen ved superoksid radikalet ($O_2^{\bullet-}$) tilstede.

Xantin i vann reagerer med oksygen og produserer et $O_2^{\bullet-}$.



Denne reaksjonen katalyseres av Xantin oksidase.

Superoksidradikalet vil redusere cytokrom c, og denne reaksjonen kan måles spektrofotometrisk ved 550 nm:



Superoksid dismutase vil inhibere reduksjonen av cytokrom c ved å konkurrere om superoksidradikalet:



Prosent inhibering kan beregnes fra ligning 3-5 (McCords & Fridovich, 1969; Sigma-Aldrich, 2018).

$$\text{Prosent inhibering} = \frac{(\Delta A_{550} / \text{min } U_{\text{inhibert}} - \Delta A_{550} / \text{min } I_{\text{inhibert}})(100)}{(\Delta A_{550} / \text{min } U_{\text{inhibert}} - \Delta A_{550} / \text{min } B_{\text{blank}})} \quad \text{Ligning 3-5}$$

Materialer:

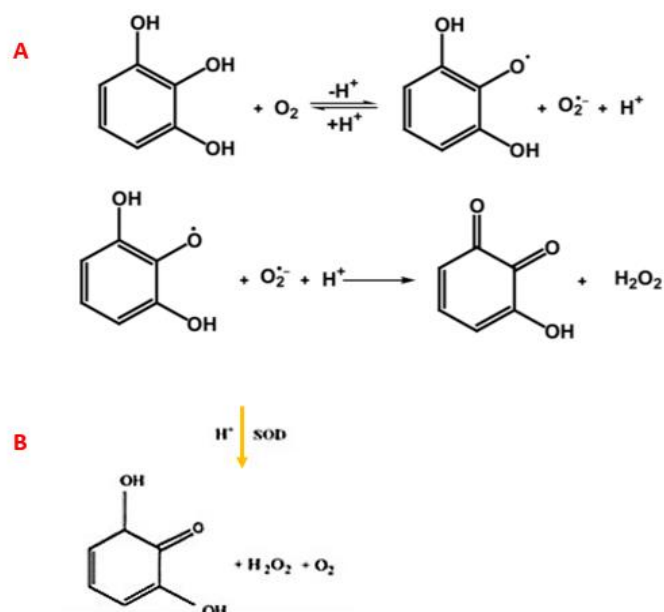
- 216 mM kaliumfosfat buffer pH 7.8
- 10.7 mM EDTA
- 1.1 mM cytokrom c
- 0.108 mM xantin
- 0.05 U/mL xantin oksidase
- 10 μ M TjSOD

Metode:

En 50 mL blanding bestående av kaliumfosfat, EDTA, cytokrom c og xantin ble laget. Løsningen ble pH-justert til 7.8 med KOH eller HCl. Denne blir fra nå referert til som cocktail. Spektrofotometeret ble først nullstilt med 3 mL cocktail. Deretter ble cytokrom c reduksjonen studert ved å analysere en blanding bestående av 2920 μL cocktail og 80 μL 0.05 U/mL xantin oksidase spektrofotometrisk. Til sist ble inhibering av cytokrom c reduksjonen studert ved å følge reaksjonene bestående av 2815 μL cocktail, 80 μL xantin oksidase og 5 μL *Tf*SOD spektrofotometrisk. Forsøket ble gjennomført med tre paralleller og målt ved 550 nm hvert 10. sekund i 2 minutter. Mengden tilsatt xantin oksidase gav en endring tilsvarende 0.025 ± 0.005 per minutt, og tilsatt mengde *Tf*SOD tilsvarte 50 % inhibering av cytokrom c reduksjon.

3.6.2. Inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol med *Tf*SOD

Pyrogallol autooksidierer raskt i alkaliske løsninger, noe som fører til dannelse av hydrogenperoksid og kinoidprodukter i nærvær av oksygen. Figur 3-5 (A) viser autooksidasjonen til pyrogallol med dannede produkter. Rekkefølgen av reaksjonssekvensen er enda usikker.



Figur 3-5. (A) Autooksidasjonen av pyrogallol og dannede produkter. Rekkefølgen av reaksjonssekvensen og endelige sluttprodukter er ikke avdekket enda. Superoksid dismutase inhiberer autooksidasjonen til pyrogallol ved konkurranse om superoksidet (B) (modifisert fra (Liu, Y. et al., 2013)).

Forsøksformålet er å hemme autooksidasjonen av pyrogallol ved konkurranse om superoksidet med superoksid dismutase fra *T. fusca*. Enzymet reduserer superoksidet, hvilket forhindrer superoksidet fra å oksidere pyrogallol (figur 3-4 B). Prosent inhibering kan beregnes fra ligning 3-6. Tilsatt mengde *Tf*SOD tilsvarer 50 % inhibering av pyrogallol autooksidasjon (Liu, Yu et al., 2013; Marklund & Marklund, 1974; Ramasarma et al., 2015).

$$\text{Prosent inhibering} = \frac{(\Delta A_{325} \text{ inhibert})(100)}{(\Delta A_{325} \text{ Uinhibert})} \quad \text{Ligning 3-6}$$

Materialer:

- 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.2
- 250 mM EtDTA
- 15 mM pyrogallol i 10 mM HCl
- 50 μ M *Tf*SOD lagret i Tris-HCl pH 8.0

Metode:

Spektrofotometeret ble nullstilt med 1.2 μ L EDTA og buffer til et totalvolum lik 300 μ L. Deretter ble autooksidasjonen til pyrogallol studert ved å analysere en blanding bestående av 1.2 μ L EDTA 4.0 μ L pyrogallol og buffer til et totalvolum lik 300 μ L spektrofotometrisk. Til sist ble inhiberingen av autooksidasjonen studert ved å følge reaksjonen bestående av 1.2 μ L EDTA, 4.0 μ L pyrogallol, 4 μ L *Tf*SOD og buffer til et totalvolum lik 300 μ L spektrofotometrisk. Forsøket ble utført med tre paralleller og målt ved 325 nm hvert 10. sekund i 4 minutter.

3.6.3. Bestemmelse av pH-optimumet til *Tf*SOD ved inhibering av autooksidasjon til pyrogallol

Forsøket er basert på samme prinsipp som beskrevet i avsnitt 3.6.2.

Materialer:

- Testbuffer
 - 50 mM Tris-HCl buffer pH 6.5

- 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.0
- 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5
- 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0
- 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.5
- 50 mM Tris-HCl buffer pH 9.0
- 250 mM EtDTA
- 15 mM pyrogallol i 10 mM HCl
- 50 μ M *Tf*SOD lagret i Tris-HCl pH 8.0

Metode:

Forsøket ble utført som beskrevet i avsnitt 3.6.2 med unntak av forsøksbufferen. Det ble benyttet ulike buffere med pH fra 6.5 til 9.0.

3.6.4. Bestemmelse av temperaturoptimumet til *Tf*SOD ved inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol

Forsøket er basert på samme prinsipp som nevnt i avsnitt 3.6.2.

Materialer:

- 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.2
- 250 mM EDTA
- 15 mM pyrogallol i 10 mM HCl
- 50 μ M *Tf*SOD lagret i Tris-HCl pH 8.0

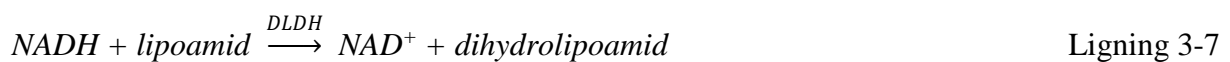
Metode:

Spektrofotometeret ble nullstilt med 1.2 μ L EDTA og buffer til et totalvolum lik 300 μ L. Bufferen ble inkubert i 30 minutter ved forsøksstemperaturen før aktivitetsmåling, og hele forsøket foregikk ved den aktuelle temperaturen. Aktiviteten til enzymet ble analysert ved 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 og 90 °C. En blanding bestående av 3.2 μ L EDTA 10.7 μ L pyrogallol og buffer til et totalvolum lik 800 μ L. ble inkubert ved forsøksstemperaturen. Deretter ble autooksidasjonen til pyrogallol studert spektrofotometrisk ved å analysere et 100 μ L uttak av blandingen. En inhiberingsblanding bestående av 3.2 μ L EDTA, 10.7 μ L pyrogallol, 6.4 μ L

*Tf*SOD og buffer til et totalvolum lik 800 µL ble inkubert ved forsøks temperaturen. Deretter ble inhiberingen av autooksidasjonen studert spektrofotometrisk ved å analysere et 100 µL uttak av inhiberingsblanding. Forsøket ble utført med tre paralleller og målt ved 325 nm hvert minutt i 5 minutter.

3.6.5. Oksidasjon av NADH med *Tf*DLDH

Aktiviteten til *Tf*DLDH kan måles ved oksidasjon av NADH i nærvær av lipoamid (ligning 3-7). Aktiviteten ble målt spektrofotometrisk ved 340 nm, der nedgang i absorbanse gjenspeiler økt enzymaktivitet (Batista et al., 2008).



Ekstinksjonskoeffisienten brukt i utregningene er 6220 M⁻¹ cm⁻¹ (Youn et al., 1998). Tilsatt mengde *Tf*DLDH tilsvarer 50 % oksidering av NADH. Forsøket ble gjennomført ved pH-optimumet til enzymet som er 6.0 ifølge Rahmanpour et al. (2017).

Materialer:

- 10 mM lipoamid løst 1:1 i buffer:etanol
- 10 mM NADH
- 2 µM *Tf*DLDH
- 50 mM natriumfosfatbuffer pH 6.0

Metode:

Spektrofotometeret ble nullstilt med 3 µL NADH og buffer til et totalvolum lik 150 µL. Deretter ble oksidasjonen til NADH studert ved å analysere en blanding bestående av 4.5 µL lipoamid, 3 µL NADH og buffer til et totalvolum lik 150 µL. Til sist ble oksidasjonen til NADH studert ved å analysere reaksjonen bestående av 4.5 µL lipoamid, 3 µL NADH, 5 µL *Tf*DLDH og buffer til et totalvolum lik 150 µL. Forsøket ble gjennomført med tre paralleller og målt ved 340 nm hvert 10. sekund i 2 minutter.

3.6.6. Bestemmelse av temperaturoptimumet til *Tf*DLDH ved oksidering av NADH

Forsøket er basert på samme prinsipp som nevnt avsnitt 3.6.5.

Materialer:

- 10 mM lipoamid løst 1:1 i buffer:etanol
- 10 mM NADH
- 2 μ M *Tf*DLDH
- 50 mM natriumfosfatbuffer pH 6.0

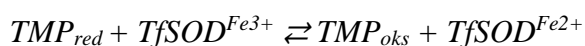
Metode:

Følgende 3 reaksjoner ble analysert ved 30, 40, 50, 60, 70 og 80 °C: i) blank: 2 μ l NADH og buffer til et totalvolum lik 100 μ l, ii) referanse: 24 μ l lipoamid, 16 μ l NADH og buffer til et total volum lik 800 μ l og iii) prøve: 24 μ l lipoamid, 16 μ L NADH, 26.4 μ L *Tf*DLDH og buffer til et totalvolum lik 800 μ L. For hver reaksjon ble løsningene inkubert ved ønsket temperatur i en termomikser. Den totale reaksjonstiden var 5 minutter. Hvert minutt ble 100 μ l prøve tatt ut, overført til en kyvette og analysert spektrofotometrisk ved 340 nm. Forsøket ble gjennomført med tre paralleller.

3.7. Cellepotensialet til *Tf*SOD

For å forstå enzymmekanismen til redoksproteiner og få forståelse for hvordan redoksproteiner kontrollerer reduksjons- og oksidasjonspotensialene er det viktig å bestemme termodynamikken, altså midtpunktsredokspotensialet til disse prosessene. TMP er en mediator som er et radikalt kation i oksidert tilstand. Redoksreaksjonen mellom TMP og *Tf*SOD kan analyseres spektrofotometrisk ved 610 nm. Spektrofotometriske data kan deretter brukes til beregning av midtpunktsredokspotensialet til *Tf*SOD ved bruk av ligningene 3-8, 3-9 og 3-10 (Sørli et al., 2000).

Ved bruk av Beer-Lamberts lov (ligning 3-1, jf. avsnitt 3.3.7) er det mulig å beregne konsentrasjonen av TMP_{oks} , som gjenspeiler konsentrasjonen av *Tf*SOD- Fe^{2+} (Ligning 3-8). ekstinksjonskoeffisienten som brukes er lik $14.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Sørli et al., 2000).



Ligning 3-8

Likevektskonstanten kan så beregnes ved bruk av ligning 3-9.

$$K = \frac{[TMP_{oks}][SOD^{Fe^{2+}}]}{[TMP_{red}][SOD^{Fe^{3+}}]} \quad \text{Ligning 3-9}$$

Forholdet mellom endringen i frienergi (ΔG_r°), likevektskonstanten (K) og cellepotensialet (E°) er beskrevet i ligning 3-10. R er gasskonstanten, T er temperaturen i Kelvin, n er antall elektronoverføringer og F er Faradays konstant (Aachmann et al., 2012a; Aachmann et al., 2012b).

$$\Delta G_r^\circ = -RT \ln K = -nFE^\circ \quad \text{Ligning 3-10}$$

Materialer:

- 70 μM T/SOD
- 200 μM N,N,N',N'-tetrametyl-1,4-fenylendiamin (TMP_{red})
- 50 mM Tris-HCl pH 8.0
- Uvetter

Metode:

Under anaerobe forhold ved 23 °C ble 70 μL TMP_{red} og enzym blandet 1:1. Absorpsjonen ved 610 nm ble deretter målt. Det ble utført 5 paralleller.

3.8. Elektronparamagnetisk resonans (EPR)

Elektronparamagnetisk resonans kan brukes til å studere radikaler i proteiner eller metal-kofaktorer i proteinkomplekser. EPR måler absorpsjon av mikrobølgestråling som gjenspeiler energisplittingen av uparede elektroner i et sterkt magnetisk felt. I et kontinuerlig EPR eksperiment blir en fast mikrobølgefrequens påført systemet, mens magnetfeltet (B_0) varieres. EPR-overgangen skjer når energiseparasjonen mellom de to elektronspinn-tilstandene (spinn-opp/spinn-ned) stemmer overens med den konstante bølgeenergien. Dette omtales som resonansen. I tillegg til varierende magnetfeltet kan systemet justeres for å forbedre signal- til støyforholdet. Dette observeres som den avledende linjen i de fleste EPR spektrum (Linder & Holtebekk, 2018; Sahu et al., 2013; Sahu & Lorigan, 2015).

I dette arbeidet ble EPR anvendt for å studere metallkofaktoren i det aktive setet til *TfSOD*. Forsøket ble utført i samarbeid med Åsmund Røhr Kjendseth.

Materialer:

- Flytende nitrogen
- 500 μM *TfSOD*

Metode:

200 μl *TfSOD* ble fryst i EPR-rør ved bruk av flytende nitrogen. EPR-spekter ble tatt opp ved bruk av en BRUKER EleXsyS 560 SuperX utstyrt med en ER 4122 SHQE SuperX høysensitivitetskammer og en kald-finger avkjølt ved hjelp av flytende nitrogen. Spekteret ble tatt opp ved $-196\text{ }^\circ\text{C}$ med en mikrobølge på 1 mW og en moduleringsamplitude på 10 G.

3.9. Enzymatisk nedbrytning av dampeksplodert bjørk katalysert av lakkase

Lignin er motstandsdyktig mot mikrobiell og enzymatisk nedbrytning som følge av sin heterogene aromatiske oppbygging. Denne utfordringen kan delvis løses ved forbehandling, og i denne oppgaven ble dampekspløsjon benyttet. Dampekspløsjon av bjørken som ble brukt i dette forsøket ble gjennomført på NMBU, Ås, Norge med utstyr designet av Cambi AS, Asker, Norge. Tørrvekten til substratet er 40 %, bestemt av masterstudent Susann Trondsen. Målet var å anvende *TfSOD* til dette forsøket, men grunnet kosubstrat – og tidsbegrensing ble en kommersiell lakkase anvendt til dette forsøket.

Materialer:

- Dampeksplodert bjørk
- Lakkase fra *T. versicolor*
- 50 mM ammoniumformat pH 4.5

Metode:

250 mg dampeksplodert bjørk ble løst i 2 mL buffer. Deretter ble løsningene inkubert ved 38 rpm i et Multi Rs-60 roterende stativ ved $50\text{ }^\circ\text{C}$. En 100 μL nullprøve ble deretter tatt ut og blandet med 200 μL dH_2O . Reaksjonen ble initiert ved å tilsette 1 μM lakkase. Prøver ble tatt etter 1, 2, 3 og 4 timer. 100 μL ble løst i 200 μL dH_2O , og reaksjonen ble stoppet ved at prøven

ble kokt i 2 minutter. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C frem til videre opparbeidelse. Forsøket ble utført i triplikat.

3.9.1. Prøveoppbehandling

For å analysere bjørkeprøvene på GC-MS er det viktig at alt vann er fjernet. Fjerning av vann og andre løsemidler kan utføres ved frysetørking. Prøvevæsken vil fjernes ved sublimasjon fra frossen tilstand. Derfor vil frysetørkingen foregå ved en temperatur og et trykk som er lavere enn trippelpunktet til is (Bissoyi et al., 2016; Morais et al., 2016).

Materialer:

- 1,2-dikloretan
- Teflonfilter 0.5 µM
- Prøver jf. avsnitt 3.9

Metode:

Prøvene ble filtrert gjennom et 0.45 µM Duapore membranfilter. 150 µL ble overført til et eppendorfrør og frysetørket i 72 timer. Prøvene ble resuspendert i 500 µL 1,2-dikloretan og filtrert gjennom et 0.5 µM teflonfilter. Prøvene ble deretter tørket med nitrogen og varme før de ble løst i 100 µL 1,2-dikloretan. Prøvene ble overført til GC-rør og oppbevart ved romtemperatur frem til videre analyse.

3.9.2. Analyse med gasskromatografi tilkoblet massespektroskopi (GC-MS)

GC-MS er en separasjon- og analysemetode som benyttes på flyktige molekyler. GC-kolonnen på 60 cm separerer prøvemolekylene etter polaritet og flyktighet ved interaksjoner mellom kolonnematerialet og analytt. Det benyttes en inert bæregass (aragon, helium eller nitrogen). Detektoren er et massespektrometer der produktmolekyler ioniseres og detekteres som masse til ladning (m/z) (Bocchini, 1995; Scientific, 2018e; Scientific, 2018f). Forsøket ble gjennomført i samarbeid med stipendiat Ida Aarum.

Materialer:

- GC-kolonne: TG-1701MS

- Prøver jf. avsnitt 3.9.1
- Bæregass: Helium
- Heptan

Metode:

Temperaturen i injektoren var 250 °C, og metoden som ble benyttet varte i 76.35 minutter. Temperaturprogrammet startet med 50 °C i 15 minutter med påfølgende stigning på 10 °C/min opp til 130 °C. Videre steg temperaturen 2 °C/minutt frem til 216 °C, temperaturen ble deretter holdt stabil i 2 minutter før en avsluttende økning på 40 °C/min til 270 °C. Sluttemperaturen ble holdt i 7 minutter. Prøvemolekylene ble separert med helium som bæregass. Mellom hver prøve ble GC-kolonnen vasket med heptan. Produktmolekylene ble identifisert med NIST 11 biblioteket med en matchfaktor på 800.

4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.1. Motivasjon

Når *Thermobifida fusca* vokser på ulike lignocellulosesubstrater overuttrykkes en rekke enzymer. Superoksid dismutase og dihydrolipoamid dehydrogenase var blant de oppregulerte enzymene. En bakteriell SOD har tidligere vist å være ligninaktiv, mens en DLDH har vist å hindre repolymerisering av lignin (Rahmanpour et al., 2017; Rashid et al., 2015). Disse egenskapene var bakgrunnen til at enzymene ble valgt ut for kloning og karakterisering i denne oppgaven.

4.2. Uttrykk og rensing av *Tf*SOD

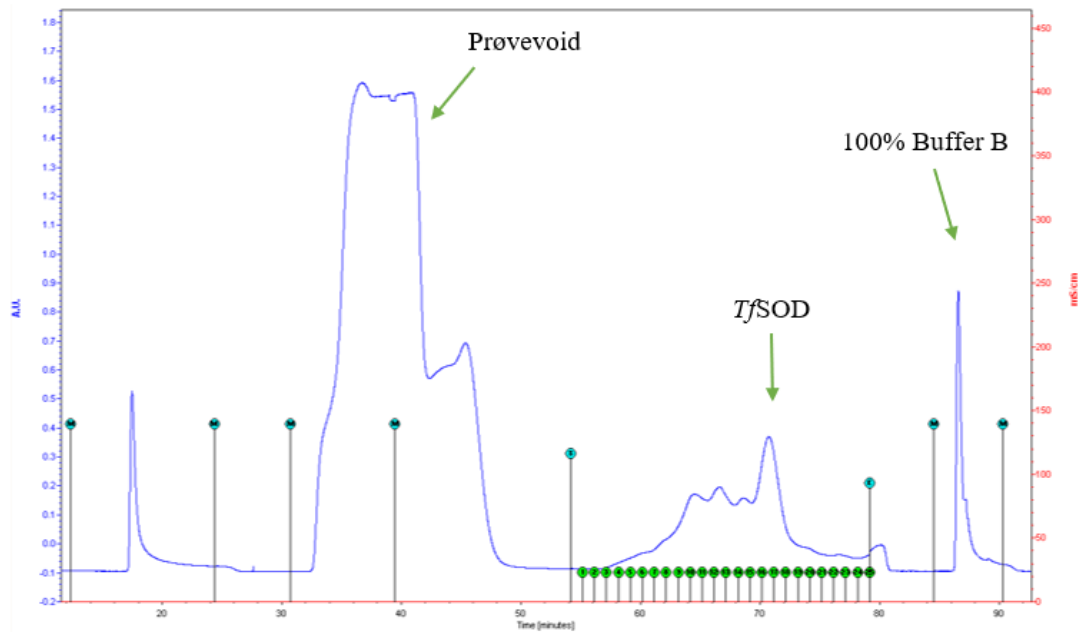
Superoksid dismutase fra jordbakterien *Thermobifida fusca* har ikke tidligere blitt uttrykt. En metode for uttrykk og rensing av dette enzymet ble utviklet i denne oppgaven. Protokollene for denne metoden er beskrevet i delkapittel 4.2 og 4.3.

4.2.1. Induksjonstest

En induksjonstest ble utført etter transformering av enzymkonstruktene for å undersøke om enzymene ble overuttrykt og finne optimale uttrykksbetingelser (jf. avsnitt 3.2.1). Størst uttrykk av *Tf*SOD ble observert ved dyrking i TB medium ved 18 °C og med 0.5 mM IPTG (resultater ikke vist). Disse betingelsene ble derfor brukt ved videre dyrking i storskala.

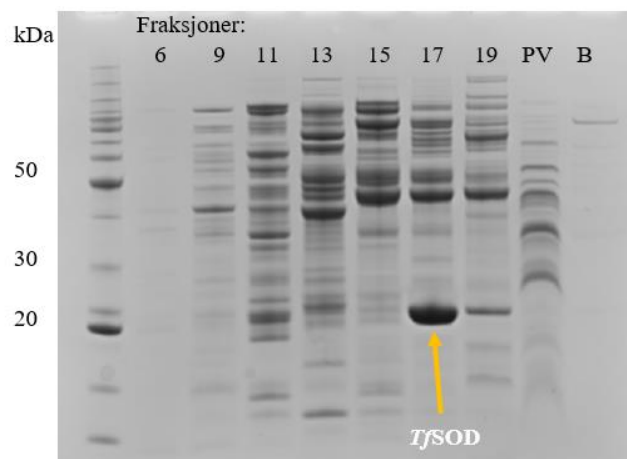
4.2.2. Rensing av *Tf*SOD

Figur 4-1 viser kromatogrammet fra rensingen av *Tf*SOD med sterk anionbytter. Den første toppen er voiden med alle proteinene som ikke har bundet seg til kolonnematerialet. Proteinene ble eluert med en saltgradientgradient bestående av 1M NaCl. Målproteinene ble eluert ved 30 % NaCl som tilsvarer ca. 14 kolonnevolumer.



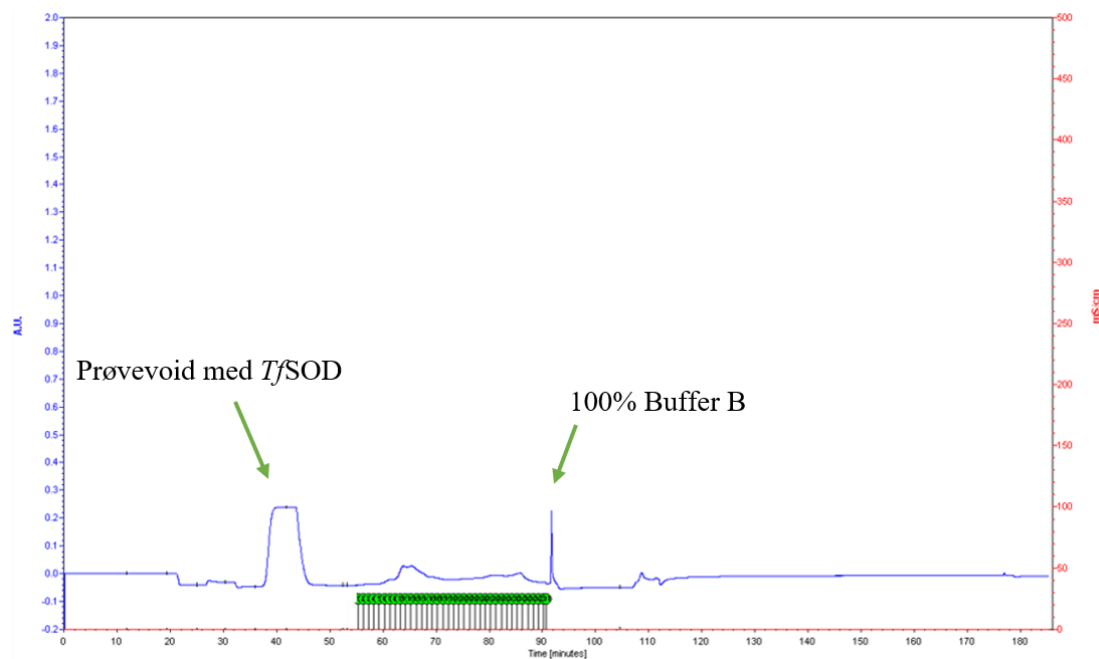
Figur 4-1. Kromatogrammet viser rensingen av *TfSOD* med IEC. Fraksjoner på 4 mL ble samlet og disse er nummerert fra 1 til 25 i figuren.

Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som er vist i figur 4-2. *TfSOD* har en molekylvekt på 22 kDa, og et bånd ved denne størrelsen viser at den aktuelle fraksjonen inneholder det ønskede proteinet.



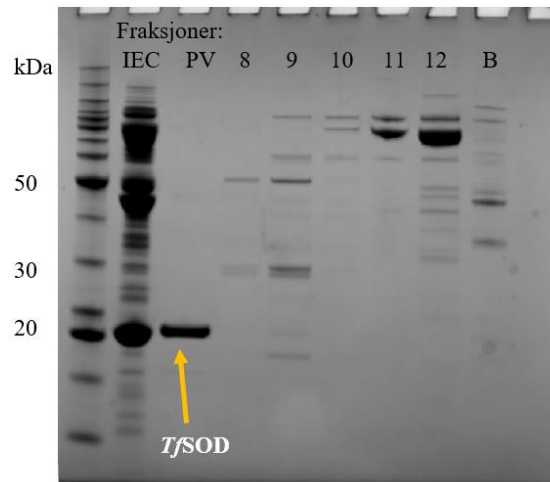
Figur 4-2. SDS-PAGE etter rensing av *TfSOD* med IEC. Første brønn inneholder en størrelsesmarkør, de 7 neste brønnene inneholder fraksjoner fra rensingen, mens de to siste brønnene inneholder henholdsvis prøvevoid (PV) og 100 % buffer B. Et bånd ved ca. 22 kDa er en indikasjon på *TfSOD*.

Fraksjonene som inneholdt *Tf*SOD ble slått sammen og renset med hydrofob interaksjonskromatografi. Kromatogrammet er vist i figur 4-3. Den første toppen er prøvevoiden som inneholdt rent *Tf*SOD. Ved senere rensing ble dermed ikke en saltgradient benyttet.



Figur 4-3. Kromatogrammet viser rensingen av *Tf*SOD med HIC. Fraksjoner på 4 mL ble samlet og disse er er nummerert fra 1 til 31 i figuren.

Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som er vist i figur 4-4. Et enslig bånd ved ca. 22 kDa indikerer et rent enzym i prøvevoiden.



Figur 4-4. SDS-PAGE etter rensing av *TfSOD* med HIC. Første brønn inneholder en størrelsesmarkør, mens nummer 2 inneholder en prøve fra IEC. Brønn nummer 3 inneholder prøvevoid (PV), mens de 5 neste brønnene inneholder fraksjoner fra rensingen og siste brønn inneholder 100 % buffer B. Et enslig bånd ved ca. 22 kDa bekrefter at enzymet er rent.

4.2.3. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon – A_{280}

Etter rensing og oppkonsentrering av *TfSOD* ble konsentrasjonen bestemt ved å måle absorbansen ved 280 nm (jf. avsnitt 3.3.7). Utbyttet var 7 mg/L vekstmedium.

4.3. Karakterisering av *TfSOD*

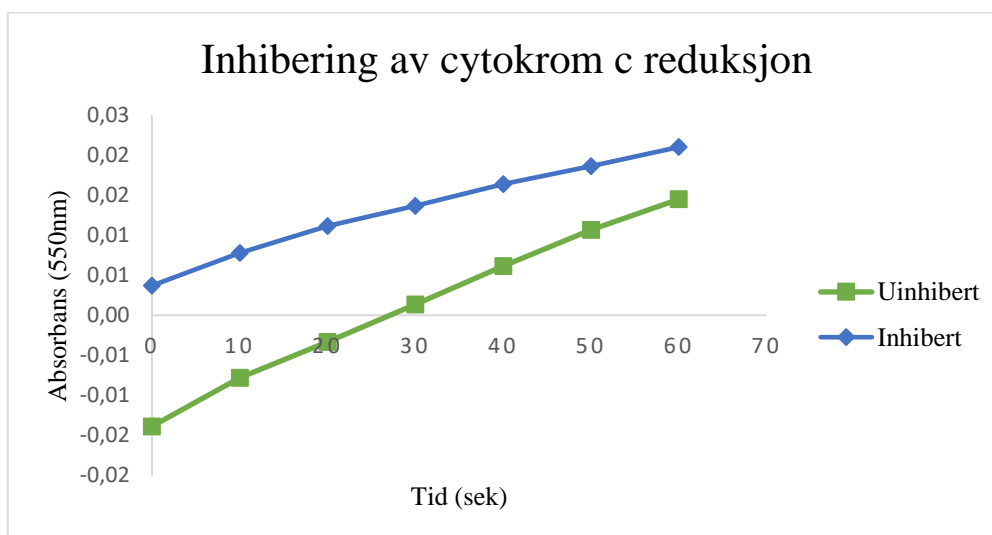
For å få en større forståelse for den katalytiske reaksjonen til *TfSOD* ble enzymet karakterisert. Det ble utført forsøk for å bestemme enzymets pH- og temperaturoptimum, smeltepunkt, redokspotensial og enzymets krystallstruktur. I tillegg ble det utført forsøk med EPR for å identifisere metallkofaktoren i det aktive setet.

4.3.1. Enzymaktivitet

I denne oppgaven ble to aktivitetstester utført for å undersøke om enzymets funksjon var intakt. Metodene som ble benyttet for å måle enzymaktiviteten er inhibering av cytochrom c reduksjon og inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol (jf. avsnitt 3.6.1 og 3.6.2). Begge metodene har sine begrensninger da xantin oksidase ikke er aktiv under pH 5.5 (Beyaztas & Arslan, 2015) og pyrogallol autooksidierer kun i basisk løsning (Li, 2012).

4.3.2. Inhibering av cytochrom c reduksjon med TjSOD

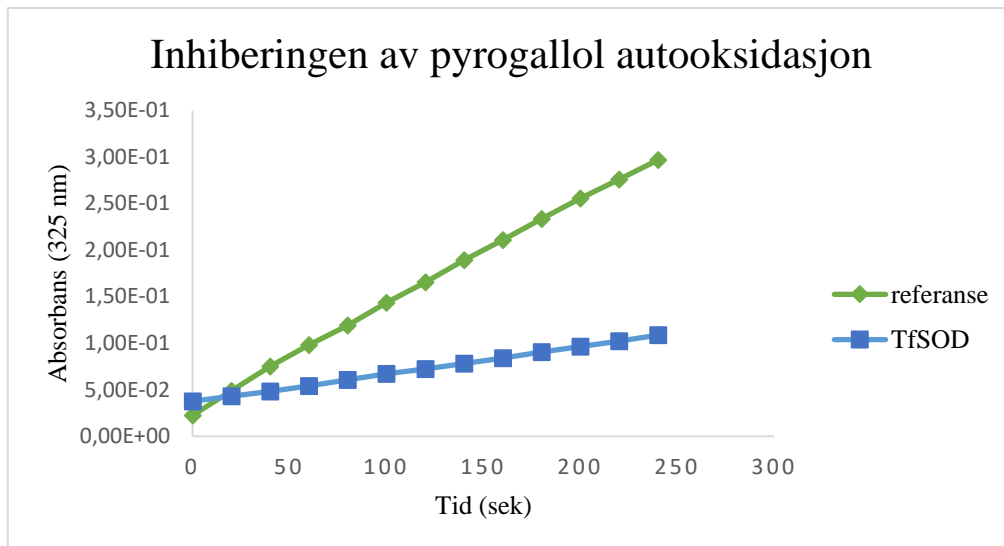
TjSOD kan inhibere cytochrom c reduksjon ved å konkurrere om $O_2^{\bullet-}$. Inhiberingen ble målt UV-vis ved 550 nm og er framstilt i figur 4-5. Inhibert prøve vil ha større endringer i absorbansen enn den uinhiberte prøva. Når reaksjonen inhiberes så vil reaksjonshastigheten gå ned, hvilket gjenspeiles i en kurve med lavere stigningstall enn for reaksjonen uten enzym. 50 % inhibering ble oppnådd ved 16 nM TjSOD som gav en aktivitet på $5 \cdot 10^5$ U/mg. Denne aktiviteten er høyere enn Fe-SOD fra *Mycobacterium ulcerans* som har en verdi lik 10 U/mg (Roberts & Hirst, 1996) og fra *Nostoc PCC 7120* som har en verdi lik 15.5 U/mg (Regelsberger et al., 2004).



Figur 4-5. Diagrammet viser to grafer som beskriver inhiberingen av cytochrom c reduksjon med TjSOD framstilt som absorbans over tid. Grønn graf er reaksjonsforløp uten enzym, mens blå graf er reaksjonsforløp med enzym.

4.3.3. Inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol med TjSOD

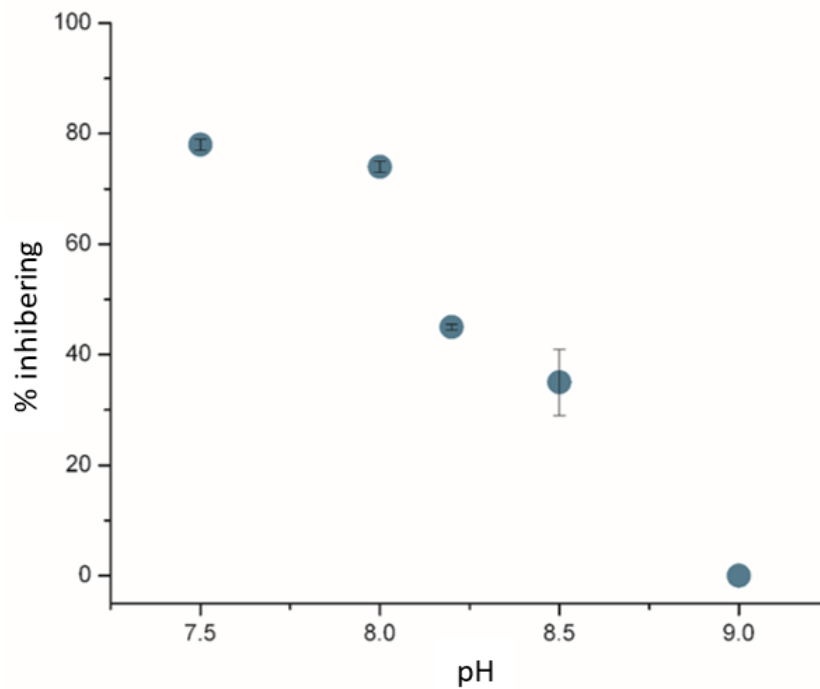
TjSOD kan inhibere autooksidasjonene til pyrogallol, og denne inhiberingen ble målt UV-vis ved 325 nm og er framstilt i figur 4-6. Når autooksidasjonen inhiberes går reaksjonshastigheten ned, hvilket gjenspeiles i en kurve med lavere stigningstall enn den uinhiberte reaksjonen. 50 % inhibering ble oppnådd ved 2.4 mM TjSOD som gav en aktivitet på $1.7 \cdot 10^4$ U/mg.



Figur 4-6. Diagrammet viser to grafer som beskriver inhiberingen av autooksidasjonen til pyrogallol med *TfSOD* framstilt som absorbans over tid. Grønn graf er reaksjonsforløp uten enzym, mens blå graf er reaksjonsforløp med enzym.

4.3.4. Bestemmelse av pH-optimumet til *TfSOD*

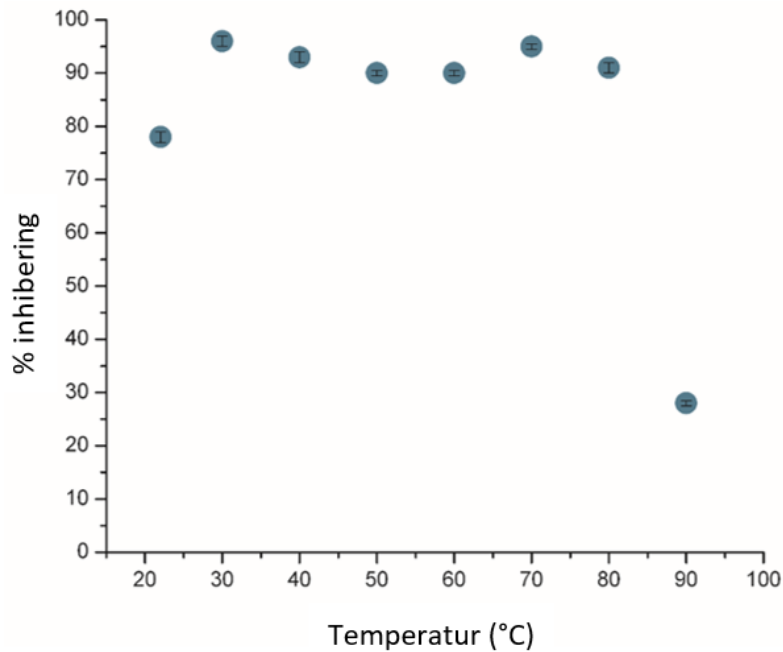
Karakterisering av *TfSOD* sitt pH-optimum ble bestemt ved bruk av pyrogallol som substrat og reaksjonsbufferer med ulike pHer (jf. avsnitt 3.6.3). Resultatet er framstilt i figur 4-7 som prosentvis inhibering av pyrogallol autooksidasjon plottet mot pH. Enzymet viste høyest aktivitet ved pH 7.5. En Fe-SOD fra *Spirulina platensis* viste høyest aktivitet ved pH 7.0 (Ismaiel et al., 2014), mens en Fe-SOD fra *Ochrobactrum tritici* har et pH-optimum lik 7.5 (Branco & Morais, 2016). Ved sammenligning med litteraturen viser det seg at pH-optimumet stemmer overens med termofile SODer (Areekit et al., 2011; Guo et al., 2008; Li et al., 2005; Song et al., 2009).



Figur 4-7. pH-optimum for *T/SOD* fremstilt som prosentvis inhibering av pyrogallol autooksidasjon med hensyn på pH. Enzymets pH optimum var lik 7.5 ved romtemperatur.

4.3.5. Bestemmelse av temperaturoptimumet til *T/SOD*

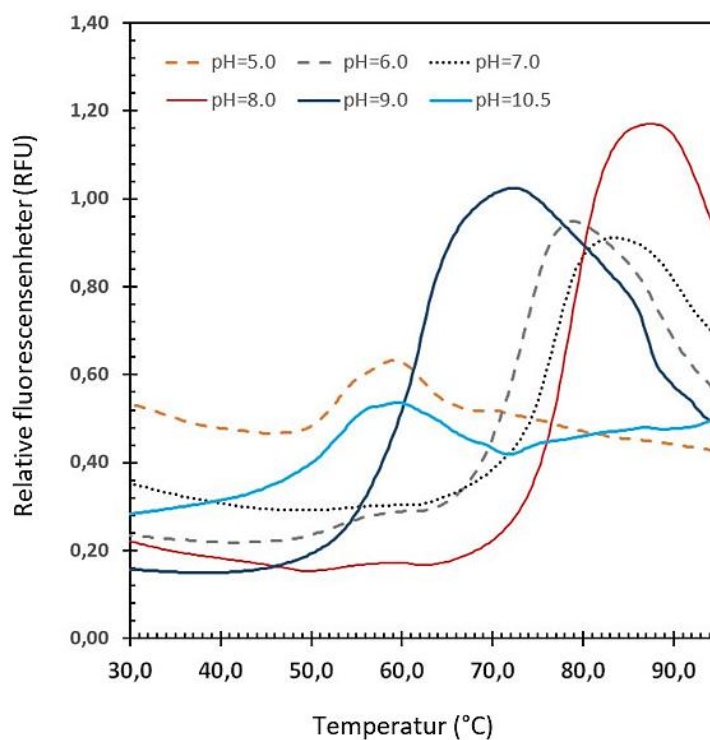
Karakterisering av *T/SOD* sitt temperaturoptimum ble bestemt ved bruk av pyrogallol som substrat og ulike reaksjonstemperaturer (jf. avsnitt 3.6.4). Resultatet er framstilt i figur 4-8 som prosentvis inhibering av pyrogallol autooksidasjon med hensyn på temperatur. Enzymet viste høy stabilitet fra 30 °C til 80 °C. Dette resultatet er delvis sammenlignbart med andre termofile SODer da de yter optimal aktivitet mellom 41 °C og 75 °C for *Bacillus stearothermophilus*, mellom 37 °C og 73 °C for *Thermothrix sp* og mellom 65 °C og 80 °C for *Thermus filiformis* (Gligić et al., 2000; Mandelli et al., 2013).



Figur 4-8. Temperaturoptimum for *Tj*SOD fremstilt som prosentvis inhibering av autooksidasjonen til pyrogallol med hensyn på temperatur. Enzymet viste høy stabilitet fra 30 °C til 80 °C ved pH 7.5.

4.3.6. Bestemmelse av smeltepunktet til *Tj*SOD

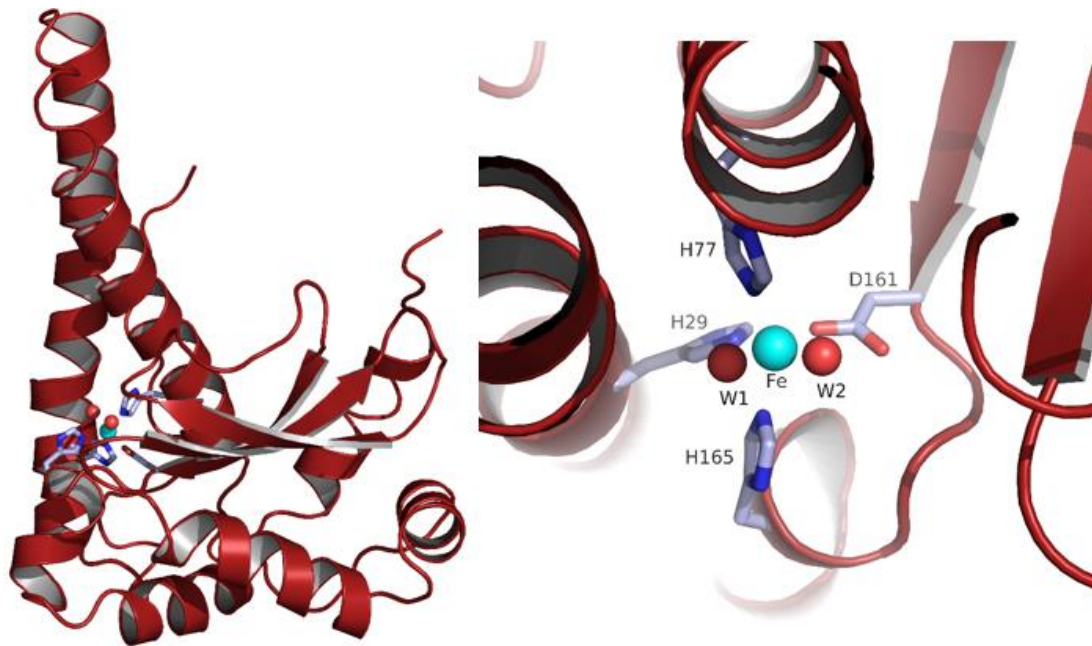
I arbeidet med å karakterisere *Tj*SOD ble smeltepunktet til enzymet bestemt ved NorStruct i Tromsø. Smeltepunktet ble bestemt ved bruk av fluorescensbasert analyse av den termiske stabiliteten til enzymet (Layton & Hellinga, 2010). Smeltepunktet til *Tj*SOD, som vist i figur 4-9, er 78.9 °C ved pH 8.0 som tilsvarer infleksjonspunktet til grafen. Det høye smeltepunktet er forventet da enzymet stammer fra en termofil bakterie.



Figur 4-9. Termostabiliteten til *TjSOD* ved ulike pHer framstilt som relativ fluorescensenhet mot reaksjonstemperatur. Smeltepunktet ble bestemt til å være 78.9 °C ved pH 8.0.

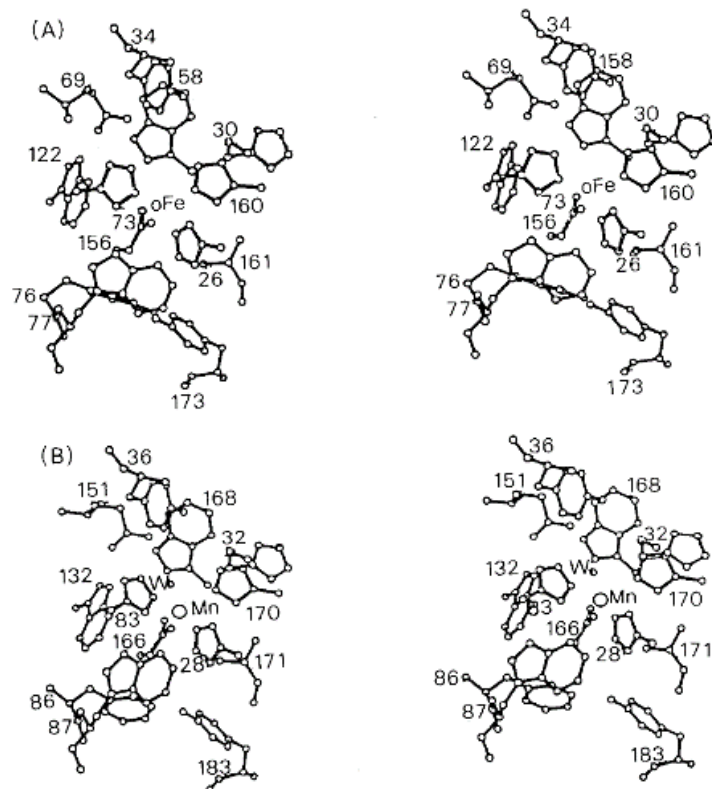
4.4. Krystallstruktur *TjSOD*

I arbeidet med å karakterisere *TjSOD* utførte NorStruct et krystalliseringscreen med etterfølgende optimalisering og løsning av struktur. Krystallstrukturen på 1.7 Å ble laget ved bruk av en homolog SOD fra *Propionobacterium freudenreichii* (PDB ID: 1BSM; 73 % sekvenslikhet). Den identifiserte metallkofaktoren i det aktive setet er jern som er omringet av tre histidiner (H29, H165 og H77), en aspartat (D161) og to vannmolekyler (W1 og W2). Det aktive setet og monomeren til *TjSOD* er vist i figur 4-10.



Figur 4-10. Krystallstrukturen av *TfSOD* (venstre) og det aktive setet med jern som kofaktor (høyre). Jernet i det aktive setet er bundet til tre histidiner (H29, H77 og H165), en aspartat (D161) og to vannmolekyler (W1 og W2).

Det aktive setet til Fe-SOD fra *Escherichia coli* består av tre histidinresiduer (H26, H73 og H160) og en aspartat (D156) som er bundet til metallkofaktoren. Disse fire residuene sammen med glutaminsyre (E159) som danner en saltbro med en av de tre histidinresiduene (H160) ved dimerisering av enzymet er konserverte residuer i Fe-SOD. Det aktive setet til Mn-SOD fra *Thermus thermophilus* er nesten identisk med Fe-SOD fra *E. coli* sitt aktive sete utenom residuene 151 og 86 (figur 4-11). Gln151 i Mn-SOD danner samme interaksjoner som Gln69 i Fe-SOD (Carlioz et al., 1988; Stallings et al., 1991; Wintjens et al., 2008). Aminosyreresiduene i det aktive setet til Fe-SOD fra *E. coli* er sammenlignbare med residuene som ble funnet i det aktive setet til Fe-SOD fra *T. fusca*.

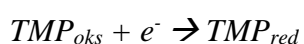


Figur 4-11. Skjematisk skisse av det aktive setet til Fe-SOD fra *Escherichia coli* (A) og det aktive setet til Mn-SOD fra *Thermus thermophilus* (B). Det aktive setet til de to enzymene er nesten identiske utenom residuene 151 og 86 i Mn-SOD (Fukui & Soda, 1994).

4.5. Cellepotensialet til *Tf*SOD

Dannelsen av TMP_{oks} ble spektrofotometrisk målt ved 610 nm, noe som gjør det mulig å beregne konsentrasjonen av TMP_{oks} som igjen gjenspeiler konsentrasjonen av TfSOD-Fe^{3+} (ligning 4-3). Gjennomsnittsabsorbansen ble bestemt til å være 0.33 med en ekstinksjonskoeffisient lik $14.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, gav en konsentrasjon på $23 \mu\text{M}$ TMP_{oks} . Beregnet likevektskonstant fra ligning 3-9 (jf. avsnitt 3.6.1) gav verdien 0.57. Cellepotensialet til redoksligning 4-3 blir således -14 mV mot. normal hydrogen elektrode (NHE). Ligning 4-3 minus ligning 4-1 gir ligning 4-2 (Aachmann et al., 2012a; Aachmann et al., 2012b). Dette medfører at reduksjonspotensialet for $\text{TfSOD-Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{TfSOD-Fe}^{2+}$ ble beregnet (jf. avsnitt 3.6.1) til å være lik 287 mV mot NHE.

Reaksjonen i form av halvreaksjoner og netto reaksjonsligning er vist i ligning 4-1 til 4-3.



$$E = 273 \text{ mV}$$

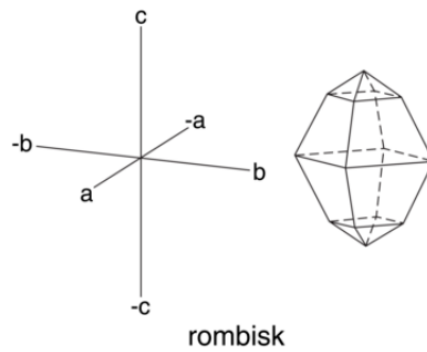
Ligning 4-1



Metallionet er en avgjørende faktor ved definisjonen av redokspotensialet til *TfSOD*, og dette potensialet vil gi uttrykk for den termodynamiske begrensningen for kjemien enzymet kan utføre. Reaksjonsmekanismen til *TfSOD* er todelt siden enzymet først vil oksidere superoksidet ($O_2^{\cdot-}$) og deretter redusere det samme superoksidet. Derfor må redokspotensialet være mellom halvreaksjonene som gjenspeiler dette reaksjonsforløpet, altså nær 360 mV mot NHE (Miller, 2012; Miriyala et al., 2012). I denne oppgaven ble redokspotensialet bestemt til å være 287 mV mot NHE (jf. avsnitt 3.7). Denne verdien er nærliggende til redokspotensialet til Fe-SOD fra *Esterichia coli* som er lik 320 mV mot NHE (Amin et al., 2018), men den er høyere enn Fe-SOD fra *Pseudomonas ovalis* og Fe-SOD fra *Azotobacter vinelandii* som begge har et redokspotensial lik 230 mV mot NHE (Barrette et al., 1983).

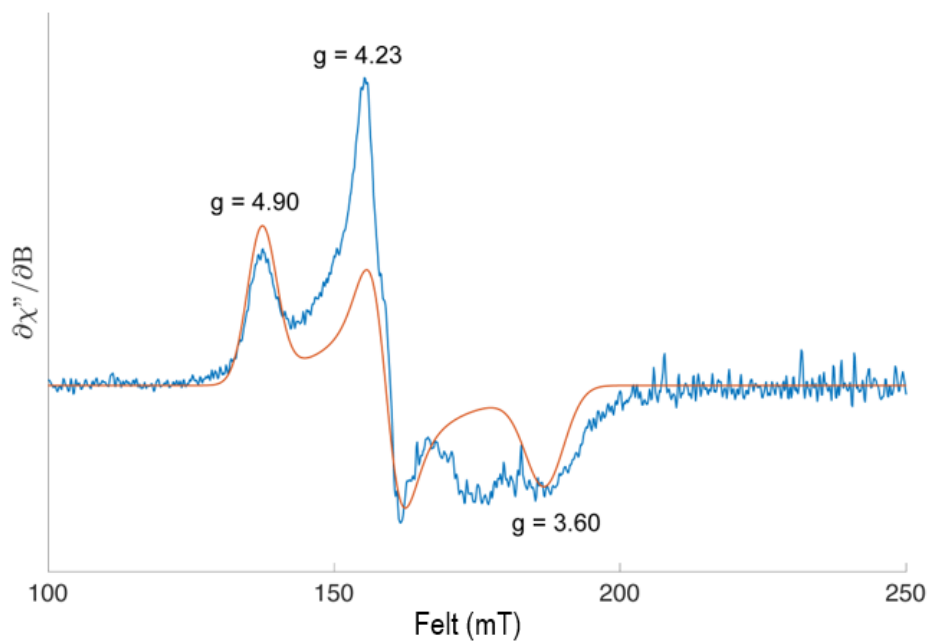
4.6. EPR med *TfSOD*

Ved krystallstrukturtillagning ble det antatt at jern var kofaktoren i det aktive setet. For å bekrefte dette ble det utført EPR i samarbeid med Åsmund Røhr Kjendseth (jf. avsnitt 3.8). Spekteret er vist i figur 4-13 med magnetisk felt oppgitt i millitesla på x-aksen, mens y-aksen er en intensitetsakse som viser det første deriverte absorpsjonssignalet. Den blå grafen er originaldata. Forekommende støy i EPR-spektrumet kan komme av ujevn koking i kaldfingeren som inneholder flytende nitrogen hvor EPR-prøven oppbevares under opptak av spektrum. Den oransje grafen er simulert basert på g-verdiene i figuren. G-verdiene sier noe om ligandsymmetrien til Fe-ionene og i dette tilfellet er det en rombisk geometri (figur 4-12).



Figur 4-12. Skjematisk skisse over aksekors og krystallform til en rombisk geometri. Denne geometrien oppstår når $g_1 \neq g_2 \neq g_3$ (Fossen, 2018).

Ved å sammenligne spekteret i figur 4-13 med andre jernspekter var det mulig å bekrefte den antatte metallkofaktoren (jern) til enzymet. Spekteret er sammenlignbart med Fe-SOD fra *Desulfovibrio gigas*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Escherichia coli* og *Pseudomonas ovalis* som har tilnærmet like g-verdier på toppene (Dos Santos et al., 2000; Kerfeld et al., 2003; Renault et al., 2000; Yamakura et al., 1995; Yost & Fridovich, 1973).



Figur 4-13. EPR spekter til T/SOD med kobber som referanse. Det magnetiske feltet er oppgitt i millitesla på x-aksen, mens y-aksen er en intensitetsakse. Blå graf er ordinaldata, mens oransje graf er simulert basert på g-verdiene i grafen.

4.7. Uttrykk og rensing av *TfDLDH*

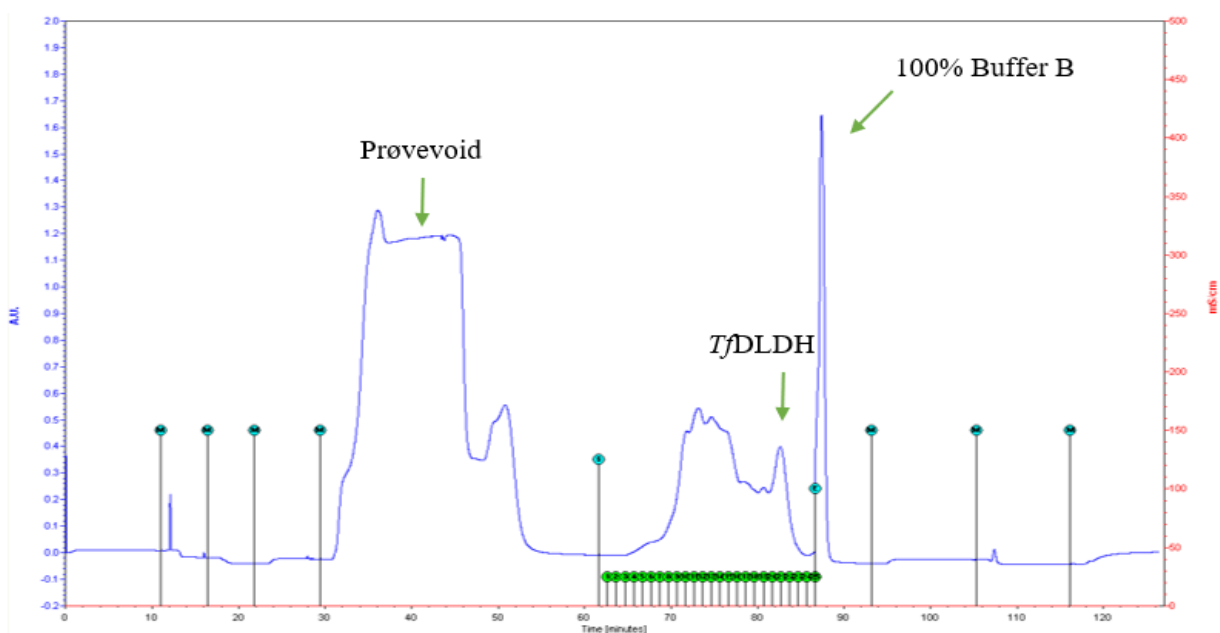
Dihydrolipoamid dehydrogenase fra jordbakterien *Thermobifida fusca* ble dyrket og rensset etter protokoller i delkapittel 3.2 og 3.3. Enzymet har tidligere blitt uttrykt og rensset med bruk av His-Tag (Rahmanpour et al., 2017). I denne oppgaven ble det utviklet en metode for rensing uten bruk av His-Tag.

4.7.1. Induksjonstest

En induksjonstest ble utført etter transformering av enzymkonstruktene for å undersøke om enzymene ble overuttrykt og finne optimale uttrykksforhold (jf. avsnitt 3.2.1). *TfDLDH* sine optimale betingelser for overuttrykk var ved dyrking i TB medium ved 18 °C med 0.2 mM IPTG (resultater ikke vist). Disse betingelsene ble derfor brukt ved videre dyrking i storskala.

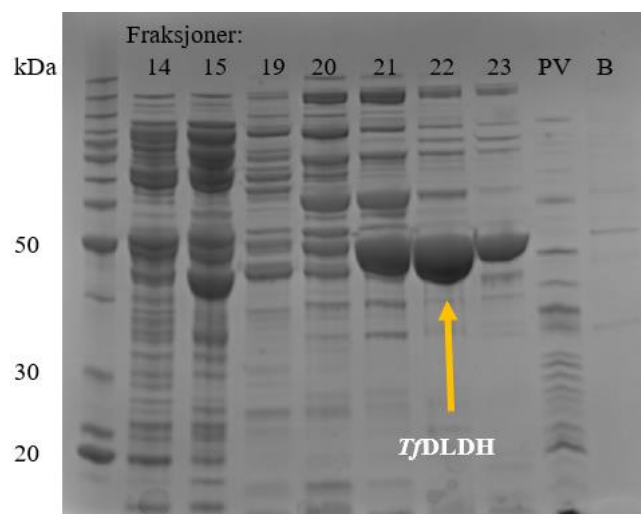
4.7.2. Rensing av *TfDLDH*

Figur 4-14 viser kromatogrammet fra rensingen av *TfDLDH* med sterk anionbytter. Den første toppen er voiden med alle proteinene som ikke har bundet seg til kolonnematerialet. Proteinet ble eluert med en saltgradientgradient bestående av 1M NaCl. Målproteinet ble eluert ved 35 % NaCl som tilsvarer ca. 17 kolonnevolumer.



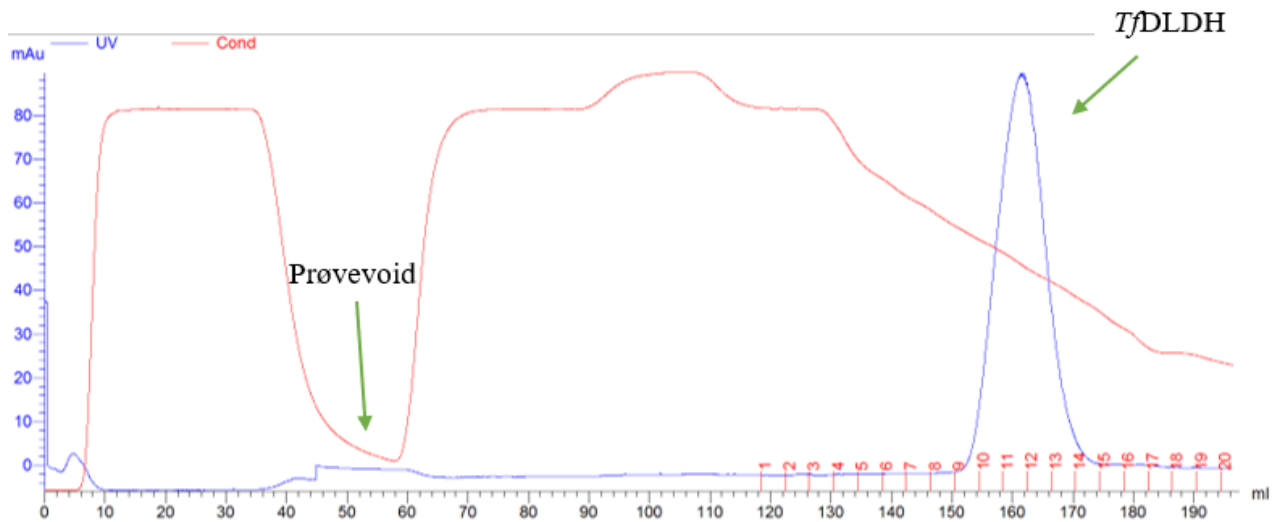
Figur 4-14. Kromatogrammet viser rensingen av *TfDLDH* med IEC. Fraksjoner på 4 mL ble samlet og disse er nummerert fra 1 til 25 i figuren.

Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som er vist i figur 4-15. Et bånd ved 48 kDa er en indikasjon på *TfDLDH*. Det var kun fraksjon 21, 22 og 23 som inneholdt *TfDLDH*. Disse fraksjonene hadde en gul farge som bekrefter innhold av det ønskede proteinet. Den gule fargen kan komme av at en flavingruppe er bundet til proteinet (Håkansson & Smith, 2007).



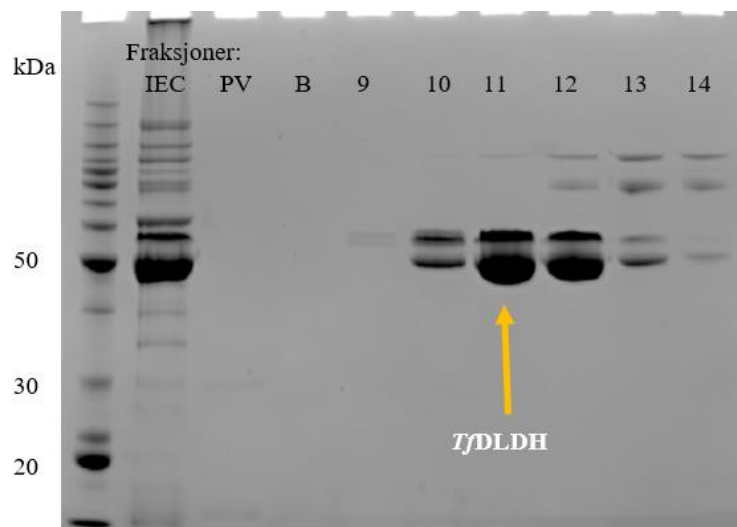
Figur 4-15. SDS-PAGE gel etter rensing av *TfDLDH* med IEC. Første brønn inneholder en størrelsesmarkør, de 7 neste brønnene fraksjoner fra elueringstoppen, mens de to siste brønnene inneholder henholdsvis prøvevoid og 100 % buffer B. Et bånd ved ca. 48 kDa er en indikasjon på *TfDLDH*.

Fraksjonene som inneholdt *TfDLDH* ble slått sammen for videre rensing med hydrofob interaksjonskromatografi. Enzymet ble eluert med en gradient bestående av 50 mM Tris-HCl, og kromatogrammet er vist i figur 4-16. Målproteinet ble eluert ved 50 % Tris-HCl som tilsvarer ca. 9 kolonnevolumer.



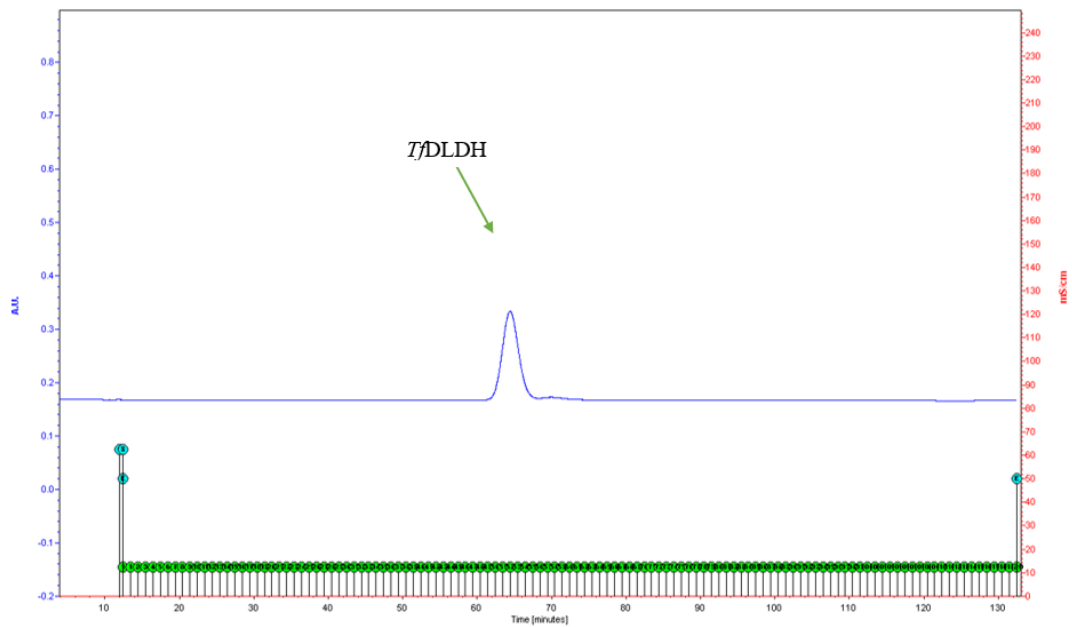
Figur 4-16. Kromatogrammet viser rensingen av *TjDLDH* med HIC. Fraksjoner på 4 mL ble samlet og disse er nummerert fra 1 til 20 i figuren.

Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som er vist i figur 4-17. *TjDLDH* har molekylvekt lik 48 kDa. Ett bånd rett ved 50 kDa er muligens et *E. coli* protein og for å fjerne dette proteinet ble gelfiltrering benyttet som siste rensetrinn.



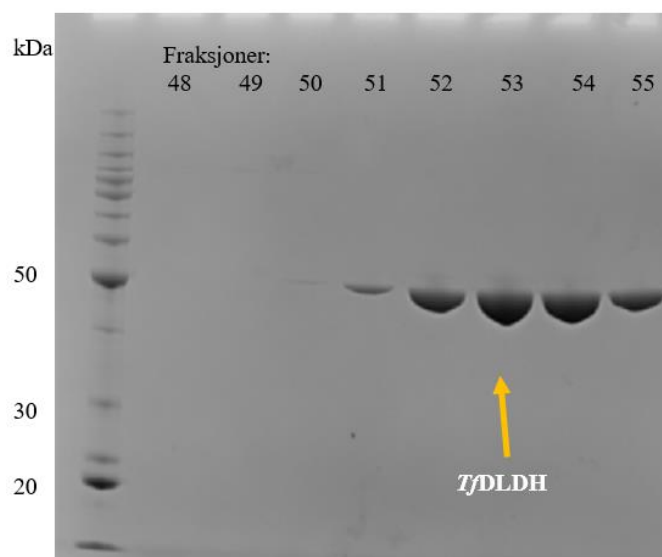
Figur 4-17. SDS-PAGE gel etter rensing av *TjDLDH* med HIC. Første brønn inneholder en størrelsesmarkør, mens brønn nummer 2 inneholder en prøve fra IEC. Brønn nummer 3 inneholder prøvevoid (PV), mens brønn nummer 4 inneholder 100 % buffer B. De 6 neste brønnene inneholder fraksjoner fra rensingen. Bånd ved ca. 48 kDa er en indikasjon på *TjDLDH*.

Fraksjonene ble slått sammen for videre rensing med gelfiltrering. Kromatogrammet er vist i figur 4-18. Toppen inneholder *Tf*DLDH som ble eluert ved ca. ½ kolonnevolum.



Figur 4-18. Kromatogrammet viser rensingen av *Tf*DLDH med SEC. Fraksjoner på 1 mL ble samlet og disse er nummerert fra 1 til 120 i figuren.

Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som er vist i figur 4-19.



Figur 4-19. SDS-PAGE gel etter rensing av *TfDLDH* med SEC. Første brønn inneholder en størrelsesmarkør, mens de 8 neste brønnene er fraksjoner fra elueringstoppen. Et enslig bånd ved ca. 48 kDa bekrefter rent enzym.

4.7.3. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon – A280

Etter rensing og oppkonsentrering av *TfDLDH* ble konsentrasjonen bestemt ved å måle absorbanse ved 280 nm (jf. avsnitt 3.3.7). Utbyttet var 10 mg/L medium.

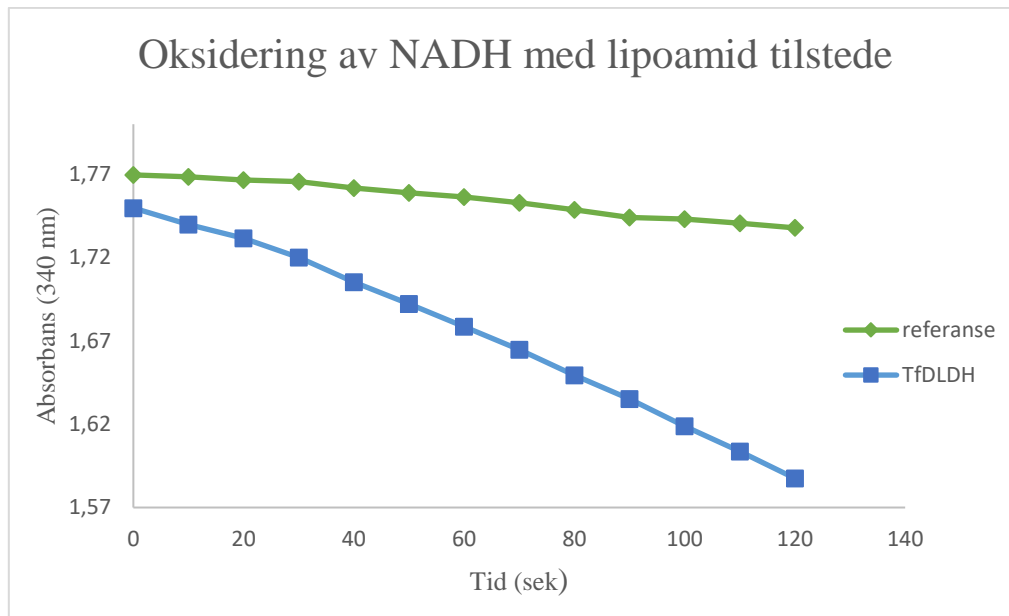
4.8. Karakterisering av *TfDLDH*

For å få en større forståelse for den katalytiske reaksjonen til *TfDLDH* ble enzymet karakterisert. Det ble utført forsøk for å avsløre enzymets temperaturoptimum, smeltepunkt og krystallisering av enzymet. Krystallstrukturen til *TfDLDH* er enda ikke bestemt.

4.8.1. Enzymaktivitet

I denne oppgaven ble en aktivitetstest utført med *TfDLDH* for å undersøke om enzymets funksjon var intakt. Metoden som ble benyttet for å måle enzymaktiviteten er oksidering av NADH med lipoamid tilstede (jf. avsnitt 3.6.5). UV-vis måling ved 340 nm av NADH oksidering med *TfDLDH* er framstilt i figur 4-20. Når NADH oksideres vil absorbanse reduseres. Reduksjonshastigheten øker i reaksjonen tilsatt enzym. 50 % oksidering ble oppnådd ved 66.7 nM *TfDLDH* som gav en aktivitet lik 3.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Denne verdien er lavere enn

DLDH fra *Streptococcus pneumoniae* som har en spesifikk aktivitet lik 11.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Håkansson & Smith, 2007) og DLDH fra *Clostridium kluveri* som har en spesifikk aktivitet lik 88 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Chakraborty et al., 2008).

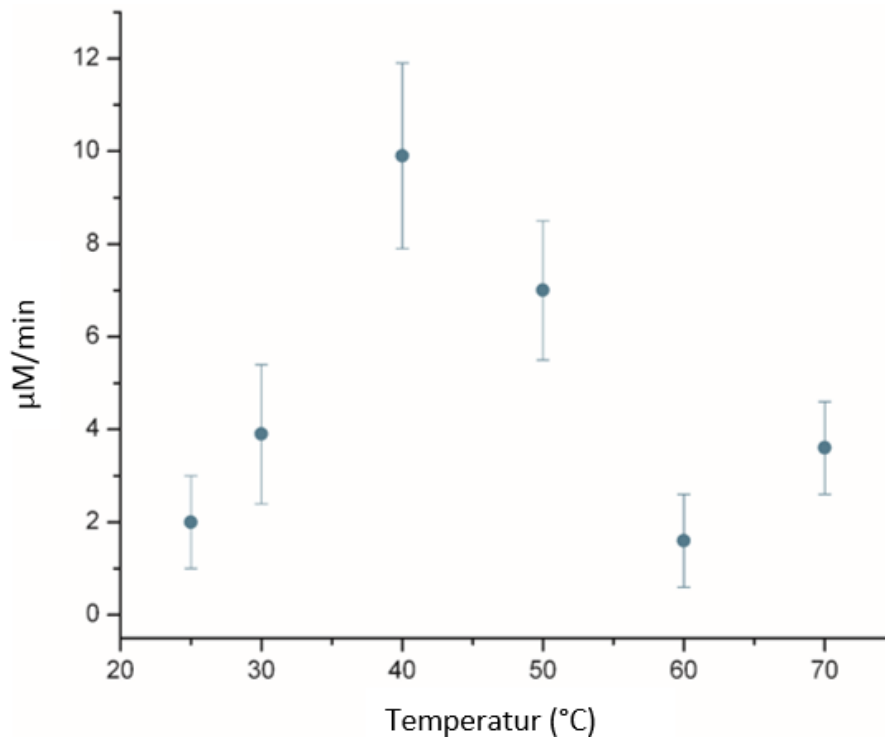


Figur 4-20. Diagrammet viser to grafer som beskriver oksideringen av NADH med *TfDLDH*. Grønn graf viser reaksjonsforløp uten enzym, mens blå graf viser reaksjonsforløp med enzym. Nedgangen i absorbans ved 340 nm gjenspeiler oksideringen av NADH med lipoamid tilstede over tid.

4.8.2. Bestemmelse av temperaturoptimumet til *TfDLDH*

Karakterisering av *TfDLDH* sitt temperaturoptimum ble bestemt ved bruk av NADH som substrat ved ulike reaksjonstemperaturer (jf. avsnitt 3.6.6). Resultatet er framstilt i figur 4-21 som $\mu\text{M}/\text{min}$ over temperatur. Enzymet viste høyest aktivitet ved 40 °C. Reaksjonen ble utført ved pH 6.0 ettersom dette tidligere er bestemt til å være enzymets pH-optimum (Rahmanpour et al., 2017). Det er uventet at enzymet ikke har en høyere temperaturoptimum da den stammer fra den termofile bakterien *T. fusca* som har en veksttemperatur lik 55 °C (Zhang, 2011). En DLDH fra *Bacillus sphaericus* har et temperaturoptimum lik 30 °C (Kianmehr et al., 2017). Derimot viste en DLDH fra *Clostridium kluveri* samme temperaturoptimum som *TfDLDH* og i tillegg hadde enzymet en aktivitet lik 20 % av den høyeste aktiviteten ved 70 °C (Chakraborty

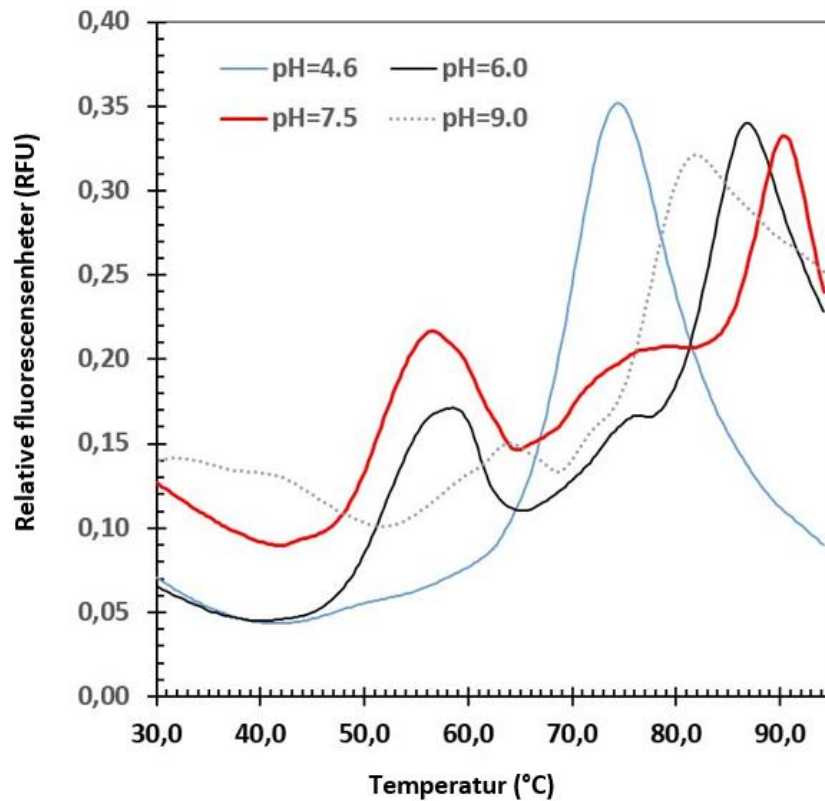
et al., 2008). *Tf*DLDH viser en aktivitet som er omtrent 35 % av den høyeste aktiviteten ved 70 °C.



Figur 4-21. Temperaturoptimum for *Tf*DLDH fremstilt som mengde NADH oksidert per minutt ved ulike temperaturer. Temperaturoptimumet er 40 °C ved pH 6.0.

4.8.3. Bestemmelse av smeltepunkt til *Tf*DLDH

I arbeidet med å karakterisere *Tf*DLDH ble det smeltepunktet bestemt ved NorStruct ved bruk av en fluorescensbasert analyse av den termiske stabiliteten til enzymet (Layton & Hellinga, 2010). Smeltepunktene til *Tf*DLDH, som vist i figur 4-22, er 51 °C og 88 °C ved pH 7.5 som tilsvarer infleksjonspunktene til grafen. Det høye smeltepunktet på 88 °C er forventet da enzymet stammer fra en termofil bakterie. To smeltepunkt kan i seg selv komme av at enzymet denatureres i to adskilte trinn som følge av enzymets ulike bindingsdomener da det er antatt at enzymet har ett for NADH og ett for FADH.

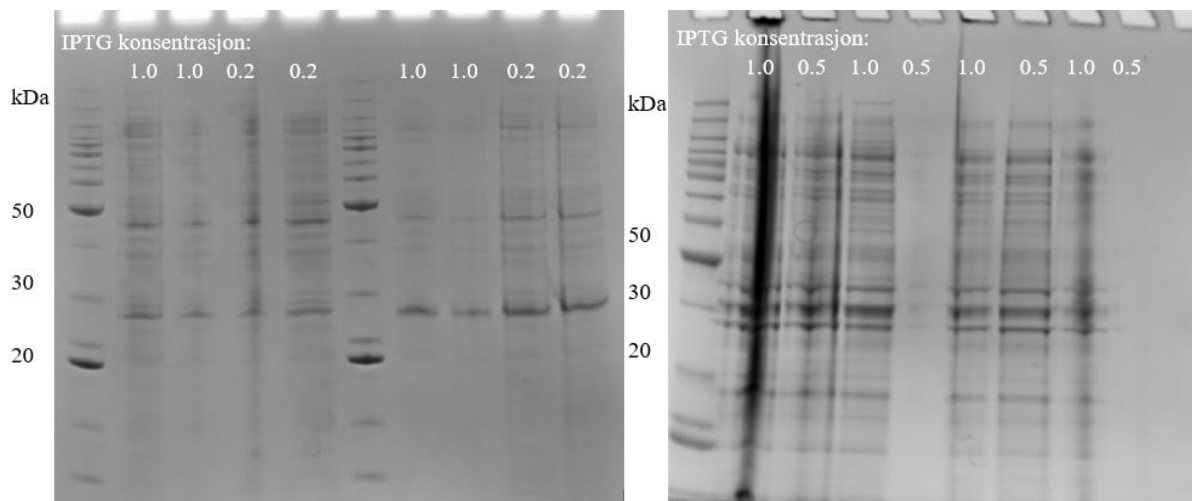


Figur 4-22. Termostabiliteten til *TfDLDH* ved ulike pHer framstilt som relativ fluorescensenheter mot reaksjonstemperatur. Smeltepunktene ble bestemt til å være 51 °C og 88 °C ved pH 7.5.

4.9. Uttrykk av *TfPO* og *TfE8*

I denne oppgaven ble det forsøkt å klonere og uttrykke enzymene polyfenol oksidase og E8 fra jordbakterien *Thermobifida fusca*. Flere induksjonstester ble utført etter transformering av enzymkonstruktene for å undersøke om enzymene ble overuttrykt. Hverken *TfPO* med molekylvekt ca. lik 24 kDa eller *TfE8* med molekylvekt ca. lik 43 kDa ble overuttrykt. Figur 4-23 viser et eksempel på en induksjonstest av hvert enzym der det ble testet for ulike betingelser som medium, IPTG konsentrasjon, kobber(II)klorid mengde og temperatur.

Da konstruktene for Q47QW5 ble bestilt ble det antatt at dette var et lakkaselignende protein, men i senere tid har proteinet blitt identifisert som en polyfenol oksidase.

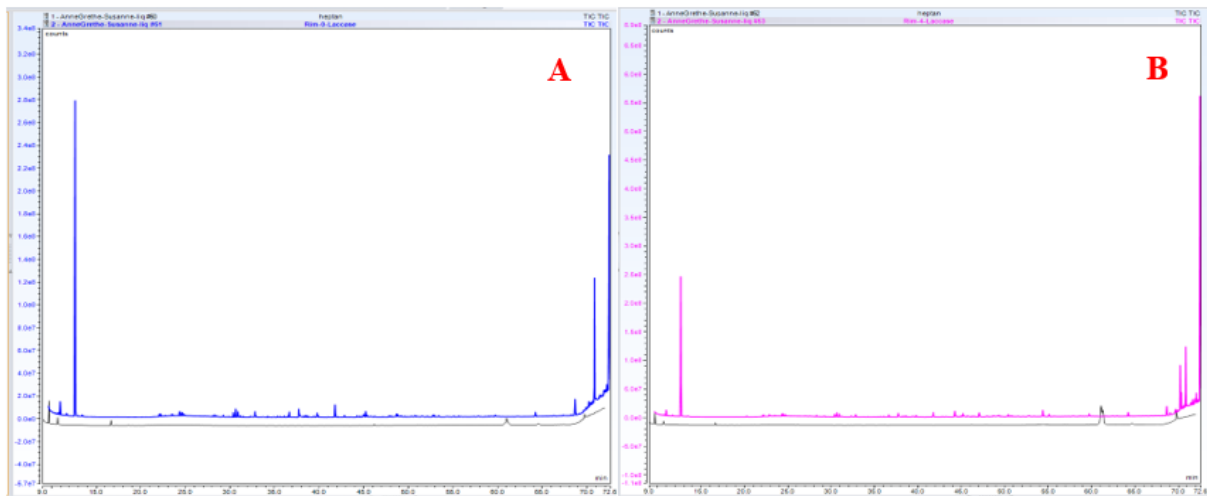


Figur 4-23. Til venstre er et eksempel på SDS-PAGE etter en induksjonstest med *TfPO*. Første brønn inneholder størrelsesmarkør, mens de fire neste inneholder prøver indusert med 1.0 mM og 0.2 mM IPTG med 5 μ L av 0.25 mM CuCl_2 og inkubert ved 18 $^\circ\text{C}$. Brønn nummer 6 inneholder en størrelsesmarkør, mens de fire neste inneholder prøver indusert med 1.0 mM og 0.2 mM IPTG med 500 μ L av 0.25 mM CuCl_2 og inkubert ved 30 $^\circ\text{C}$. Til høye er et eksempel på SDS-PAGE etter en induksjonstest med *TfE8*. Første brønn inneholder størrelsesmarkør, mens de fire neste inneholder prøver indusert med 1.0 mM og 0.5 mM IPTG i henholdsvis LB og TB medie inkubert ved 30 $^\circ\text{C}$. Brønn 7 til 9 fire neste inneholder prøver indusert med 1.0 mM og 0.5 mM IPTG i henholdsvis LB og TB medie inkubert ved 18 $^\circ\text{C}$.

4.10. GC-MS analyse av dampeksplodert bjørk nedbrutt med lakkase

Siden lakkaser har vist seg å kunne bryte ned lignin og at det antatte lakkaselignende proteinet viste seg å være en polyfenol oksidase, ble det besluttet å prøve ut en kommersielt tilgjengelig lakkase i nedbrytning av en bjørkeprøve. Dette for å kunne sammenligne effektiviteten av de bakterielle enzymene som ble klonet i denne oppgaven med denne lakkasen. Prøvene jf. avsnitt 3.9 ble analysert med GC-MS. Prøvekromatogrammene er vist i figur 4.24 som henholdsvis viser reaksjonen uten og med lakkase. De svarte kurvene i hvert kromatogram er blankprøven som består av heptan, mens den blå (figur 4-24A) og den rosa grafen (figur 4-24B) er henholdsvis nullprøve og 4 timers prøve av en lakkase katalysert reaksjon. Toppene som gav utslag ble identifisert med NIST 11 biblioteket som viste ingen typiske lignocellulosefragmenter i kromatogrammene. De identifiserte toppene i MS analysen kan være ekstraktiver fra bjørk. Denne hypotesen kommer på bakgrunn av at molekylstrukturen viser lange hydrokarbonkjeder med over 750 i matchfaktor. Disse hydrokarbonkjedene blir ikke brutt ned av enzymet. I naturen vil ekstraktivene bli brutt ned av andre enzymer. En annen grunn for

fravær av typiske lignocellulose fragmenter i analysen kan være at prøvetakingene var fra heterogene prøver som resulterte i ulike MS spekter.



Figur 4-24. A) viser et kromatogram av dampeksplodert bjørk uten tilsatt lakkase ved 50 °C og pH 4.5. Blå graf er bjørkeprøven uten lakkase, mens svart graf er blankprøven. B) viser kromatogram av dampeksplodert bjørk med tilsatt lakkase ved 50 °C og pH 4.5. Rosa graf er bjørkeprøven med lakkase med reaksjonstid lik 4 timer, mens svart graf er blankprøven.

5. OPPSUMMERING OG VIDERE ARBEID

Uttrykk og rensing av enzymene superoksid dismutase og dihyrolipoamid dehydrogenase fra *Thermobifida fusca* var vellykket og karakteriseringen av disse gir et innblikk i den katalytiske mekanismen deres.

Det kan være interessant å karakterisere *TfDLDH* ytterligere når krystallstrukturen identifiseres for å finne mer ut om bindingsdomene og det aktive setet.

E8 består av tre domener, ett n-terminal katalytisk domene, ett hoveddomene og ett karbohydratbindende domene (Meier et al., 2018). Til videre arbeid kan det være lettere å prøve å uttrykke E8 proteinet uten det karbohydratbindende domenet.

Siden EPR spekteret til *TfSOD* har mye støy kan det være av interesse å utføre nok et EPR spekter for å oppnå mindre støy.

Enzymatisk nedbrytning av dampeksplodert bjørk med en kommersiell lakkase fra *Trametes versicolor* gav ingen resultater av interesse. Ved fremtidig enzymatisk nedbrytning av dampeksplodertbjørk vil det lønne seg å benytte homogene substratprøver. Dette kan oppnås ved oppmaling av bjørkesubstrat og vil muligens resultere i mer reproducerbare data med mindre støy. En annen faktor som vil kunne minske støy er vasking av bjørkesubstrat med aceton etter dampekspløsning for å fjerne ekstraktiver.

Et mål for videre arbeid er å benytte løsninger som inneholder ulike enzymer fra den termofile bakterien *Thermobifida fusca* som kan gi en synergisk effekt ved nedbrytning av lignocellulose. Det vil være interessant å teste enzymene enkeltvis og gruppevis for å få et bedre innblikk i den katalytiske reaksjonen ved nedbrytning.

6. REFERANSER

- Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. & Vaaje-Kolstad, G. (2012a). NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 109 (46): 18779-18784. doi: 10.1073/pnas.1208822109.
- Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. & Vaaje-Kolstad, G. (2012b). Supporting information, Aachmann et al. 10.1073/pnas.1208822109. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*
- 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.
- Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., Bovet, L., Lee, Y., Geldner, N., Fernie, Alisdair R., et al. (2012). AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current biology*, 22 (13): 1207-1212. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.064.
- Amin, M., Mohamed, Z., El-Sayed, M., Samy, A., Sultan, A., Bassuoni, M. & Alkordi, M. H. (2018). Combined QM/MM and Monte Carlo study for redox leveling in Mn and Fe superoxide dismutase. *Journal of biological inorganic chemistry*, 23 (2): 285-293. doi: 10.1007/s00775-017-1530-8.
- Areekit, S., Kanjanavas, P., Khawsak, P., Pakpitchareon, A., Potivejkul, K., Chansiri, G. & Chansiri, K. (2011). Cloning, expression, and characterization of thermotolerant manganese superoxide dismutase from *Bacillus sp.* MHS47. *International journal of molecular sciences*, 12 (1): 844-856. doi: 10.3390/ijms12010844.
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B. & Paës, G. (2017). Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnology for biofuels*, 10 (1): 36. doi: 10.1186/s13068-017-0718-z.
- Bajpai, P. (2016). Structure of lignocellulosic biomass. I: SpringerBriefs in Molecular Science, *Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production*, s. 7-12. Singapore: Springer Singapore.
- Bansal, N. & Kanwar, S. S. (2013). Peroxidase(s) in environment protection. *The scientific world journal*, 2013: 1-9. doi: 10.1155/2013/714639.
- Barrette, W. C., Sawyer, D. T., Fee, J. A. & Asada, K. (1983). Potentiometric titrations and oxidation-reduction potentials of several iron superoxide dismutases. *Biochemistry*, 22 (3): 624-627. doi: 10.1021/bi00272a015.
- Batista, A. P., Kletzin, A. & Pereira, M. M. (2008). The dihydrolipoamide dehydrogenase from the crenarchaeon *Acidianus ambivalens*. *FEMS microbiol letters*, 281 (2): 147-154. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01082.x.

- Baurhoo, B., Ruiz-Feria, C. A. & Zhao, X. (2008). Purified lignin: nutritional and health impacts on farm animals—a review. *Animal feed science and technology*, 144 (3): 175-184. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.10.016
- 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.
- Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M. & Marletta, M. A. (2015). Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual review of biochemistry*, 84 (1): 923-946. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034439.
- Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A. & Obinger, C. (2009). Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *Journal of experimental botany*, 60 (2): 423-440. doi: 10.1093/jxb/ern309.
- Beyaztas, S. & Arslan, O. (2015). Purification of xanthine oxidase from bovine milk by affinity chromatography with a novel gel. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30 (3): 442-447. doi: 10.3109/14756366.2014.943204.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M. & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource technology*, 128: 751-759. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.145.
- Bischof, J. C. & He, X. (2005). Thermal stability of proteins. *Annals of the New York academy of sciences*, 1066: 12-33. doi: 10.1196/annals.1363.003.
- Bissaro, B., Røhr, Å. K., Müller, G., Chylenski, P., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2017). Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature chemical biology*, 13: 1123-1128. doi: 10.1038/nchembio.2470.
- Bissoyi, A., Kumar, A., Rizvanov, A. A., Nesmelov, A., Gusev, O., Patra, P. K. & Bit, A. (2016). Recent advances and future direction in lyophilisation and desiccation of mesenchymal stem cells. *Stem cells international*, 2016: 1-9. doi: 10.1155/2016/3604203.
- Bocchini, G. C. G. a. P. (1995). Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry of lignocellulose. *Rapid communications in mass spectrometry*, 9: 815-826
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54: 519-546. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Borregaard. (2018). *Verdens ledende bioraffineri*. Tilgjengelig fra: <https://www.borregaard.no/Miljoe-og-samfunn/Det-groenne-rommet/Verdens-ledende-bioraffineri> (lest 5. april).
- Branco, R. & Morais, P. V. (2016). Two superoxide dismutases from *TnOchr* are involved in detoxification of reactive oxygen species induced by chromate. *BMC microbiol*, 16: 16-27. doi: 10.1186/s12866-016-0648-0.

- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R. & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 6: 1-11. doi: 10.1038/srep33037.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M. & Singh, R. (2011a). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current opinion in biotechnology*, 22 (3): 394-400. doi: 10.1016/j.copbio.2010.10.009.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M. & Rahmanpour, R. (2011b). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports*, 28 (12): 1883-1896. doi: 10.1039/c1np00042j.
- 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.
- Carlioz, A., Ludwig, M. L., Stallings, W. C., Fee, J. A., Steinman, H. M. & Touati, D. (1988). Iron superoxide dismutase - Nucleotide-sequence of the gene from *Escherichia-coli*-K12 and correlations with crystal-structures. *Journal of biological chemistry*, 263 (3): 1555-1562.
- Chakraborty, S., Sakka, M., Kimura, T. & Sakka, K. (2008). Characterization of a dihydrolipoyl dehydrogenase having diaphorase activity of *Clostridium kluyveri*. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 72 (4): 982-988. doi: 10.1271/bbb.70724.
- Chylenski, P., Petrovic, D. M., Muller, G., Dahlstrom, 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: 1-13. doi: 10.1186/s13068-017-0862-5.
- Cole, J. L., Tan, G. O., Yang, E. K., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (1990). Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge study. *Journal of the american chemical society*, 112 (6): 2243-2249. doi: 10.1021/ja00162a025.
- Couturier, M., Ladeveze, S., Sulzenbacher, G., Ciano, L., Fanuel, M., Moreau, C., Villares, A., Cathala, B., Chaspoul, F., Frandsen, K. E., et al. (2018). Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature chemical biology*, 14 (3): 1-5. doi: 10.1038/nchembio.2558.
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D. H., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., et al. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of Life. *Current opinion in chemical biology*, 29: 108-119. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.018
- Dimarogona, M., Topakas, E. & Christakopoulos, P. (2013). Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (19): 8455-8465. doi: 10.1007/s00253-013-5197-y.
- Dos Santos, W. G., Pacheco, I., Liu, M. Y., Teixeira, M., Xavier, A. V. & LeGall, J. (2000). Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from

- the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Journal of bacteriology*, 182 (3): 796-804.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. & Rebeille, F. (2001). The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in plant science*, 6 (4): 167-176.
- Durbin, S. D. & Feher, G. (1996). Protein crystallization. *Annual review of physical chemistry*, 47: 171-204. doi: 10.1146/annurev.physchem.47.1.171.
- EDVOTEK. (2018). *Principles of gel filtration chromatography, store experiment at room temperature*: The biotechnology education company.
- Egeland, E. S. (2017). *Beers lov*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/Beers_lov (lest 19. mars).
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V. & Okoh, A. I. (2016). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen*, 6 (1): 1-14. doi: 10.1002/mbo3.394.
- Fossen, H. (2018). *Krystallografi*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/krystallografi> (lest 26. april).
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64 (64): 97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- Frommhagen, M., Koetsier, M. J., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W. A., Vincken, J.-P., van Berkel, W. J. H., Kabel, M. A. & Gruppen, H. (2016). Lytic polysaccharide monoxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. *Biotechnology for biofuels*, 9 (1): 1-17. doi: 10.1186/s13068-016-0594-y.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. I: Walker, J. M. (red.) *The proteomics protocols handbook*, s. 571-607. Totowa, NJ: Humana Press.
- GE Healthcare. (2006). *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography, principles and methods*. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- GE Healthcare. (2010). *Gel filtration, principles and methods*. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- GE Healthcare. (2012). *Spectrophometry, handbook*. Buckinghamshire: GE Healthcare.
- GE Healthcare. (2016). *Ion exchange chromatography, principles and methods*. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- GE Healthcare. (2018a). *HiTrap Q HP anion exchange chromatography column*. Tilgjengelig fra: <https://www.gelifesciences.com/en/no/shop/chromatography/prepacked-columns/ion-exchange/hitrap-q-hp-anion-exchange-chromatography-column-p-00607> (lest 10. januar).

- GE Healthcare. (2018b). *HiTrap phenyl HP*. Tilgjengelig fra: <https://www.gelifesciences.com/en/no/shop/chromatography/prepacked-columns/hydrophobic-interaction/hitrap-phenyl-hp-p-05630> (lest 29. januar).
- GenScript. (2018). *Vector list – ORF clones*. Tilgjengelig fra: <https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-22b.pdf> (lest 12. april).
- Gligić, L., Radulović, Ž. & Zavišić, G. (2000). Superoxide dismutase biosynthesis by two thermophilic bacteria. *Enzyme and microbial technology*, 27 (10): 789-792. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00302-1
- Gomez del Pulgar, E. M. & Saadeddin, A. (2014). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical reviews in microbiology*, 40 (3): 236-247. doi: 10.3109/1040841X.2013.776512.
- Gonzalo, D. 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.
- Guo, F. X., Shi-Jin, E., Liu, S. A., Chen, J. & Li, D. C. (2008). Purification and characterization of a thermostable MnSOD from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. *Mycologia*, 100 (3): 375-380.
- Haikarainen, T., Frioux, C., Zhnag, L.-Q., Li, D.-C. & Papageorgiou, A. C. (2014). Crystal structure and biochemical characterization of a manganese superoxide dismutase from *Chaetomium thermophilum*. *Biochimica et biophysica Acta (BBA)/proteins and proteomics*, 1844 (2): 422-429. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.11.014
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315 (5813): 804-807. doi: 10.1126/science.1137016.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V. G. H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, 5: 1-12. doi: 10.1186/1754-6834-5-45.
- Håkansson, A. P. & Smith, A. W. (2007). Enzymatic characterization of dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* harboring its own substrate. *Journal of biological chemistry*, 282 (40): 29521-29530. doi: 10.1074/jbc.M703144200.
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Ens, W. & Hill, R. D. (2004). Dihydrolipoamide dehydrogenase from porcine heart catalyzes NADH-dependent scavenging of nitric oxide. *FEBS letters*, 568 (1-3): 146-150. doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.024.
- Ismail, M. M. S., El-Ayouty, Y. M., Loewen, P. C. & Piercey-Normore, M. D. (2014). Characterization of the iron-containing superoxide dismutase and its response to stress in cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Journal of applied phycology*, 26 (4): 1649-1658. doi: 10.1007/s10811-013-0233-y.
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Swiderska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A. & Paszczynski, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis

- and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 41 (6): 941-962. doi: 10.1093/femsre/fux049.
- Jung, S.-J., Kim, S.-H. & Chung, I.-M. (2015). Comparison of lignin, cellulose, and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. *Biomass and bioenergy*, 83: 322-327. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.10.007
- Kerfeld, C. A., Yoshida, S., Tran, K. T., Yeates, T. O., Cascio, D., Bottin, H., Berthomieu, C., Sugiura, M. & Boussac, A. (2003). The 1.6 Å resolution structure of Fe-superoxide dismutase from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of biological inorganic chemistry*, 8 (7): 707-714. doi: 10.1007/s00775-003-0469-0.
- Kianmehr, A., Mahdizadeh, R., Oladnabi, M. & Ansari, J. (2017). Recombinant expression, characterization and application of a dihydrolipoamide dehydrogenase with diaphorase activity from *Bacillus sphaericus*. *3 Biotech*, 7 (2): 1-9. doi: 10.1007/s13205-017-0763-0.
- Kim, H. (2002). *Activity of human dihydrolipoamide dehydrogenase is reduced by mutation at threonine-44 of FAD-binding region to valine*, b. 35.
- Kubo, S., Uraki, Y. & Sano, Y. (1998). Preparation of carbon fibers from softwood lignin by atmospheric acetic acid pulping. *Carbon*, 36 (7): 1119-1124. doi: 10.1016/S0008-6223(98)00086-4
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (8): 3713-3729. doi: 10.1021/ie801542g.
- Laboratory, E. M. B. (2018). *Protein purification - extraction and clarification; preparation of cell lysates from E. coli*. Tilgjengelig fra: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/cell_lysates_ecoli/ (lest 12. mars).
- Lancaster, V. L., LoBrutto, R., Selvaraj, F. M. & Blankenship, R. E. (2004). A cambialistic superoxide dismutase in the thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of bacteriology*, 186 (11): 3408-3414. doi: 10.1128/jb.11.3408-3414.2004.
- Lange, H., Decina, S. & Crestini, C. (2013). Oxidative upgrade of lignin – recent routes reviewed. *European polymer journal*, 49 (6): 1151–1173. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2013.03.002.
- Lavelle, F., Michelson, A. M. & Dimitrijevic, L. (1973). Biological protection by superoxide dismutase. *Biochemical and biophysical research communications*, 55 (2): 350-357. doi: 10.1016/0006-291X(73)91094-2
- Layton, C. J. & Hellinga, H. W. (2010). Thermodynamic analysis of ligand-induced changes in protein thermal unfolding applied to high-throughput determination of ligand affinities with extrinsic fluorescent dyes. *Biochemistry*, 49 (51): 10831-10841. doi: 10.1021/bi101414z.

- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for biofuels*, 6: 1-14. doi: 10.1186/1754-6834-6-41.
- Levy, E., Eyal, Z. & Hochmant, A. (1992). Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 296 (1): 321-327. doi: 10.1016/0003-9861(92)90579-L
- Li, D.-C., Gao, J., Li, Y.-L. & Lu, J. (2005). A thermostable manganese-containing superoxide dismutase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Extremophiles*, 9 (1): 1-6. doi: 10.1007/s00792-004-0413-4.
- Li, M., Zhu, L. & Wang, W. (2016). Improving the thermostability and stress tolerance of an archaeon hyperthermophilic superoxide dismutase by fusion with a unique N-terminal domain. *Springerplus*, 5: 1-10. doi: 10.1186/s40064-016-1854-9.
- Li, X. C. (2012). Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (25): 6418-6424. doi: 10.1021/jf204970r.
- Linder, J. & Holtebekk, T. (2018). *Elektronspinnresonans*. 5. January utg. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/elektronspinnresonans> (lest 14. februar).
- Linger, J. G., Vardon, D. R., Guarnieri, M. T., Karp, E. M., Hunsinger, G. B., Franden, M. A., Johnson, C. W., Chupka, G., Strathmann, T. J., Pienkos, P. T., et al. (2014). Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proceedings of the national academy of sciences*, 111 (33): 12013-12018. doi: 10.1073/pnas.1410657111.
- Liu, Y., Ying, Y.-L., Wang, H.-Y., Cao, C., Li, D.-W., Zhang, W.-Q. & Long, Y.-T. (2013). *Real-time monitoring of the oxidative response of a membrane-channel biomimetic system to free radicals*, b. 49.
- Liu, Y., Ying, Y. L., Wang, H. Y., Cao, C., Li, D. W., Zhang, W. Q. & Long, Y. T. (2013). Real-time monitoring of the oxidative response of a membrane-channel biomimetic system to free radicals. *Chemical communications*, 49 (59): 6584-6586. doi: 10.1039/c3cc41763h.
- LOEW, O. (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, 11 (279): 701-702. doi: 10.1126/science.11.279.701.
- 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.
- Mabee, W. E., Gregg, D. J., Arato, C., Berlin, A., Bura, R., Gilkes, N., Mirochnik, O., Pan, X., Kendall Pye, E. & Saddler, J. N. (2006). Updates on softwood-to-ethanol process development. *Applied biochemistry and biotechnology*, 129 (1): 55-70. doi: 10.1385/abab:129:1:55.

- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J. O., Bauer, S., Nair, S. K., Cronan, J. E. & Gerlt, J. A. (2014). Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation. *Biochemistry*, 53 (24): 4047-4058. doi: 10.1021/bi500285t.
- Mandelli, F., Franco Cairo, J. P., Citadini, A. P., Buchli, F., Alvarez, T. M., Oliveira, R. J., Leite, V. B., Paes Leme, A. F., Mercadante, A. Z. & Squina, F. M. (2013). The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from *Thermus filiformis*. *Letters in applied microbiology*, 57 (1): 40-46. doi: 10.1111/lam.12071.
- Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Blázquez, P., Barry, D. A. & Holliger, C. (2013). Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *AMB express*, 3 (1): 1-14. doi: 10.1186/2191-0855-3-63.
- Marklund, S. & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47 (3): 469-474.
- Marriott, P. E., Gomez, L. D. & McQueen-Mason, S. J. (2016). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New phytologist*, 209 (4): 1366-1381. doi: 10.1111/nph.13684.
- Massey, V., Gibson, Q. H. & Veeger, C. (1960). Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase). *Biochemical journal*, 77 (2): 341-351.
- McCords, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *The journal of biological chemistry*, 244 (of november 25): 6049-6055.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34 (3): 254-265. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.019
- McPherson, A. & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta crystallographica. Section F, structural biology communications*, 70 (Pt 1): 2-20. doi: 10.1107/S2053230X13033141.
- Meier, K. K., Jones, S. M., Kaper, T., Hansson, H., Koetsier, M. J., Karkehabadi, S., Solomon, E. I., Sandgren, M. & Kelemen, B. (2018). Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars. *Chemical reviews*, 118 (5): 2593-2635. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00421.
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B. & Novy, R. E. (1998). Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. *Methods in molecular medicine*, 13: 257-292. doi: 10.1385/0-89603-485-2:257.
- Miller, A.-F. (2001). *Handbook of metalloproteins*. Fe superoxide dismutase. Chichester: John Wiley & sons.
- Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*, 586 (5): 585-595. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.048.

- Miriyala, S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, D., Vujaskovic, Z., St Clair, D. & Batinic-Haberle, I. (2012). Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochimica et biophysica acta*, 1822 (5): 794-814. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.002.
- Monavari, S., Galbe, M. & Zacchi, G. (2009). Impact of impregnation time and chip size on sugar yield in pretreatment of softwood for ethanol production. *Bioresource technology*, 100 (24): 6312-6316. doi: 10.1016/j.biortech.2009.06.097.
- Morais, A. R. d. V., Alencar, É. d. N., Xavier Júnior, F. H., Oliveira, C. M. d., Marcelino, H. R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E. S. T. d. & Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: a review. *International journal of pharmaceutics*, 503 (1): 102-114. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.047.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96 (6): 673-686. doi: 10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology advances*, 33 (1): 13-24. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008.
- Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S. & Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies. *Renewable and sustainable energy reviews*, 72: 178-190. doi: 10.1016/j.rser.2017.01.039.
- Novagen. (2006). *pET system manual*. 11 th utg. Tilgjengelig fra: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (lest 12. april).
- Oslo, U. i. (2018). *Lignin*: Universitet i Oslo. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/l/lignin.html> (lest 10. februar).
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science*, 4 (11): 2411-2423. doi: 10.1002/pro.5560041120.
- Pan, X., Kadla, J. F., Ehara, K., Gilkes, N. & Saddler, J. N. (2006). Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (16): 5806-5813. doi: 10.1021/jf0605392.
- Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W. & Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *Journal of biological chemistry*, 289 (24): 16615-16623. doi: 10.1074/jbc.R114.563148.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J. C. N., Johansen, K. S., Krogh, K., Jorgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., et al. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, 108 (37): 15079-15084. doi: 10.1073/pnas.1105776108.

- 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): 709-711. 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.
- Rahmanpour, R., King, L. D. & Bugg, T. D. (2017). Identification of an extracellular bacterial flavoenzyme that can prevent re-polymerisation of lignin fragments. *Biochemical and biophysical research communications*, 482 (1): 57-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.144.
- Ramasarma, T., Rao, A. V. S., Devi, M. M., Omkumar, R. V., Bhagyashree, K. S. & Bhat, S. V. (2015). New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 400 (1): 277-285. doi: 10.1007/s11010-014-2284-z.
- Rashid, G. M., Taylor, C. R., Liu, Y., Zhang, X., Rea, D., Fulop, V. & Bugg, T. D. (2015). Identification of manganese superoxide dismutase from *Sphingobacterium sp.* T2 as a novel bacterial enzyme for lignin oxidation. *ACS chemical biology*, 10 (10): 2286-2294. doi: 10.1021/acscchembio.5b00298.
- Reed, L. J. (1974). Multienzyme complexes. *Accounts of chemical research*, 7 (2): 40-46. doi: 10.1021/ar50074a002.
- Reed, L. J. & Hackert, M. L. (1990). Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *Journal of biological chemistry*, 265 (16): 8971-8974.
- Regelsberger, G., Laaha, U., Dietmann, D., Ruker, F., Canini, A., Grilli-Caiola, M., Furtmuller, P. G., Jakopitsch, C., Peschek, G. A. & Obinger, C. (2004). The iron superoxide dismutase from the filamentous cyanobacterium *Nostoc PCC 7120* - localization, overexpression, and biochemical characterization. *Journal of biological chemistry*, 279 (43): 44384-44393. doi: 10.1074/jbc.M406254200.
- Renault, J. P., Verchere-Beaur, C., Morgenstern-Badarau, I., Yamakura, F. & Gerloch, M. (2000). EPR and ligand field studies of iron superoxide dismutases and iron-substituted manganese superoxide dismutases: relationships between electronic structure of the active site and activity. *Inorganic chemistry*, 39 (12): 2666-2675.
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R. & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal biology reviews*, 27 (3-4): 67-82. doi: 10.1016/j.fbr.2013.07.001.
- Roberts, B. & Hirst, R. (1996). Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of medical microbiology*, 45 (5): 383-387. doi: 10.1099/00222615-45-5-383.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454 (7206): 841-845. doi: 10.1038/nature07190.

- Sabbadin, F., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Henrissat, B., Dupree, P., Tryfona, T., Marques, R. D. S., Sweeney, S. T., Besser, K., Elias, L., et al. (2018). An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. *Nature communications*, 9: 1-12. doi: 10.1038/s41467-018-03142-x.
- Sahu, I. D., McCarrick, R. M. & Lorigan, G. A. (2013). Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems. *Biochemistry*, 52 (35): 5967-5984. doi: 10.1021/bi400834a.
- Sahu, I. D. & Lorigan, G. A. (2015). Biophysical EPR studies applied to membrane proteins. *Journal of physical chemistry & biophysics*, 5 (6): 1-16. doi: 10.4172/2161-0398.1000188.
- Scientific, T. (2018a). *One Shot™ BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C601003> (lest 9. april).
- Scientific, T. (2018b). *Coomassie brilliant blue R-250 dye*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20278> (lest 29. januar).
- Scientific, T. (2018c). *Protein gel electrophoresis technical handbook*: Thermofisher Scientific.
- scientific, T. (2018d). *NuPAGE™ LDS sample buffer (4X)*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0008> (lest 29. januar).
- Scientific, T. (2018e). *Gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) information*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html> (lest 18 mars).
- Scientific, T. (2018f). *TraceGOLD TG-1701MS GC columns*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26090-0200> (lest 18. mars).
- Scientific, T. (2018g). *Lysozyme solution (50 mg/mL)*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90082> (lest 10. april).
- Scott, B. R., Huang, H. Z., Frickman, J., Halvorsen, R. & Johansen, K. S. (2016). Catalase improves saccharification of lignocellulose by reducing lytic polysaccharide monooxygenase-associated enzyme inactivation. *Biotechnology letters*, 38: 425-434. doi: 10.1007/s10529-015-1989-8.
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A.-F., Teixeira, M. & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical reviews*, 114 (7): 3854-3918. doi: 10.1021/cr4005296.
- Sigma-Aldrich. (2018). *Enzymatic assay of superoxide dismutase*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-superoxide-dismutase.html> (lest 19. mars).
- Silva Coelho-Moreira, J. d., Maria, G., Castoldi, R., Silva Mariano, S. d., Dorneles, F., Bracht, A. & Marina, R. (2013). Involvement of lignin-modifying enzymes in the degradation of herbicides. I: *Herbicides - advances in research*, s. 165-187.

- Solomon, E. I., Augustine, A. J. & Yoon, J. (2008). O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton transactions* (30): 3921-3932. doi: 10.1039/B800799C.
- Song, N.-N., Zheng, Y., E, S.-J. & Li, D.-C. (2009). Cloning, expression, and characterization of thermostable Manganese superoxide dismutase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. *Journal of microbiology*, 47 (1): 123-130. doi: 10.1007/s12275-008-0217-9.
- Stallings, W. C., Metzger, A. L., Patridge, K. A., Fee, J. A. & Ludwig, M. L. (1991). Structure-function-relationships in iron and manganese superoxide dismutases. *Free radical research communications*, 12-3: 259-268. doi: 10.3109/10715769109145794.
- Su, Y., Yu, X., Sun, Y., Wang, G., Chen, H. & Chen, G. (2018). Evaluation of screened lignin-degrading fungi for the biological pretreatment of corn stover. *Scientific reports*, 8 (1): 1-11. doi: 10.1038/s41598-018-23626-6.
- 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.
- Sørli, M., Seefeldt, L. C. & Parker, V. D. (2000). Use of stopped-flow spectrophotometry to establish midpoint potentials for redox proteins. *Analytical biochemistry*, 287 (1): 118-125. doi: 10.1006/abio.2000.4826.
- Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial cell factories*, 6: 1-23. doi: 10.1186/1475-2859-6-9.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z. L., Zhai, H., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. H. (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. M., 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.
- Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M. & Rovira, C. (2012). Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H₂O₂ oxidation in model systems and implications for heme protein engineering. *Journal of inorganic biochemistry*, 117: 292-297. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.07.002.
- Vinardell, M. P. & Mitjans, M. (2017). Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. *International journal of molecular sciences*, 18 (6): 1-15. doi: 10.3390/ijms18061219.
- Watt, S. A., Wilke, A., Patschkowski, T. & Niehaus, K. (2005). Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics*, 5 (1): 153-167. doi: doi:10.1002/pmic.200400905.
- Whittaker, J. W. (2003). The irony of manganese superoxide dismutase. *Biochemistry society transactions*, 31 (Pt 6): 1318-1321. doi: 10.1042/.

- Whittaker, J. W. (2012). Non-heme manganese catalase--the 'other' catalase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 525 (2): 111-120. doi: 10.1016/j.abb.2011.12.008.
- Wilkins, R. (1983). *Lignins as formulating agents for controlled release in agriculture*, b. 15.
- Wintjens, R., Gilis, D. & Rooman, M. (2008). Mn/Fe superoxide dismutase interaction fingerprints and prediction of oligomerization and metal cofactor from sequence. *Proteins*, 70 (4): 1564-1577. doi: 10.1002/prot.21650.
- Yamakura, F., Kobayashi, K., Ue, H. & Konno, M. (1995). The pH-dependent changes of the enzymic activity and spectroscopic properties of iron-substituted manganese superoxide dismutase. A study on the metal-specific activity of Mn-containing superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 227 (3): 700-706.
- Yost, F. J., Jr. & Fridovich, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry*, 248 (14): 4905-4908.
- Youn, H.-D., Hah, Y. C. & Kang, S.-O. (1995). Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS microbiology letters*, 132 (3): 183-188. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07831.x
- Youn, H., Kwak, J., Youn, H.-D., Hah, Y. & Kang, S.-O. (1998). Lipoamide dehydrogenase from *Streptomyces seoulensis*: biochemical and genetic properties. *Biochimica et biophysica acta (BBA)/protein structure and molecular enzymology*, 1388 (2): 405-418. doi: 10.1016/S0167-4838(98)00200-3.
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L. & Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical reviews*, 110 (6): 3552-3599. doi: 10.1021/cr900354u.
- Zamocky, M. & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics & molecular biology*, 72 (1): 19-66. doi: 10.1016/s0079-6107(98)00058-3.
- Zamocky, M., Furtmuller, P. G. & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid redox signal*, 10 (9): 1527-1548. doi: 10.1089/ars.2008.2046.
- Zhang, M. (2011). *Thermobifida fusca*. Tilgjengelig fra: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Thermobifida_fusca (lest 16. april).
- Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 82 (5): 815-827. doi: 10.1007/s00253-009-1883-1.
- Zhu, J., Pan, X. & Zalesny, R. (2010a). Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied microbiology and biotechnology*, 87 (3): 847-857. doi: 10.1007/s00253-010-2654-8.
- Zhu, J. Y. & Pan, X. J. (2010b). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*, 101 (13): 4992-5002. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.007.

Ziebell, A., Gracom, K., Katahira, R., Chen, F., Pu, Y. Q., Ragauskas, A., Dixon, R. A. & Davis, M. (2010). Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. *Journal of biological chemistry*, 285 (50): 38961-38968. doi: 10.1074/jbc.M110.137315.

7. VEDLEGG

7.1. DNA-sekvenser

DNA-sekvensene til enzymene som ble klonet i denne oppgaven ble hentet fra en åpen nettdatabase (<https://www.uniprot.org/>). Hvert enzym har sin unike kode som kan brukes for ytterligere informasjon, og denne er listet i tabell 7-1.

Tabell 7-1. Oversikt over enzymene klonet i denne oppgaven og deres uniprotkoder.

Enzym	Kode
<i>Tf</i> SOD	Q47RC2
<i>Tf</i> DLDH	Q47R85
<i>Tf</i> PO	Q47QW5
<i>Tf</i> E8	Q47PB9

7.1.1. DNA-sekvensen til *Tf*SOD

```
>ENA|AAZ54995|AAZ54995.1 Thermobifida fusca YX superoxide  
dismutase  
ATGTCCGCGCCGTACACGCTTCCTGAACTGCCCTACGACTACTCCGCTCTGGAGCCGTGG  
ATCTCGGGCGAGATCATGGAGCTGCACCACGACAAGCACCACGCCGCTACGTCAAGGGC  
GCCAACGACGCTCTGGAGCAGCTGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGGCGACCTGAGCAAGGTC  
AACCTGCTGCAGAAGAACCTCGCCTTCAACCTGGCCGGCCACGTCAACCACACCGTGTTTC  
TGGCCGAACCTGTCCGCGACGGCGGCGACAAGCCGGAAGGCGAGCTCGGCGCTGCCATC  
GACGACGCCTTCGGATCCTTCGACGCCTTCCGCGCCCACTTCAGTGCCGCCGCCACCGGC  
ATCCAGGGCTCGGGCTGGGCGATCCTCGCCTGGGACATCCTCGGCCAGCGGCTCATCATC  
GAGCAGCTCTACGACCACCAGGGCAACCTGGCTGCCGGCTCCTACCCGCTGCTCATGCTC  
GACATGTGGGAGCACGCCTTCTACCTGCAGTACAAGAACGTCAAGGCCGACTACGTGAAG  
GCGTTCTGGAACGTGGTGAACCTGGGCCGACGTGGCCAAGCGGTTTCGAGGACGCCCGCAAG  
GTCGCCCTCGGCTGA
```

7.1.2. DNA-sekvensen til *TfDLDH*

>ENA|AAZ55032|AAZ55032.1 *Thermobifida fusca* YX dihydroliipoamide dehydrogenase

GTGAGTGAAAGCGGCGGCACATTCGATCTCGTCATCCTGGGCGGCGGTAGCGGTGGCTAC
TCGGCCGCCATCCGCGCCTCCGAACCTCGGCATGCGTGTCGCCCTGATTGAGAAAGACAAG
CTCGGCGGCACCTGCCTGCACTACGGCTGTATTCCGACCAAGGCCCTGCTGCACGCGGGT
GAGGTCGCCGACACGGTGCGGGCCAGCGAGAAGTTCGGTGTCCGGGCCTCGTTTCGACACA
ATCGACATGGCCCGTGTCCACGAGTACAAGGACAAGGTCGTCAGTGGTCTGCACCGCGGC
CTGACCGGTCTGATCAAGGCCCGCGGCATCACCTGGTCGAGGGTGAGGGCAAGCTGACC
GGTGTGACGAGGTCACGGTCAACGGGGTGGCCTACAAGGGTCGGCACATCATCCTGGCC
ACCGGGTCCCAGGCGGTTTCGCTCCCTGGTCTGGAGATCGACGGGGAGCGGATCATCACC
AGCTACGAGGCGCTCCGCTTGGACCGGGTCCCCAAGTCCGCGATCATCCTGGGCGGCGGT
GTCATCGGCGTCGAGTTCGCCAGCGTGTGGCGTTCGTTTCGGCGCCGAGGTGACGATTGTC
GAGGCGCTGCCGCACCTGGTCCCGGCGGAGGAGGAGTCCAGCTCCAAGCTGCTGGAGCGG
GCGTTCGCAAGCGCGGGATCAAGTTCGAGCTGGGCAGCCCGTTTGAGAGCGTGAAGCTC
ACCGAGACCGGGTGAGCATGACGCTGGCGAGCGGCAAGACCGTGGAAGGCGAGCTGCTG
CTGGTGGCGGTGGGCCGCGGTCCGGTCTCCAGGGCTGGGCTACGAGGAGGTCCGGCATC
CGCCTGGAGCGCGGCTTCGTCCAGGTCGATGAGAACCTGCACACCGGAGTCGGCAACATC
TACGCGGTGGGCGACTTGATCCCCACGCCGAGTTGGCGCACGTCCGGCTTTGCCGAGGGT
ATTTTCGTCGCCGAGCACATTGCCGGGCTGAACCCGGTGAACATCGACTACGACGGTATT
CCGCGGGTACCTACTCCGACCCGGAGGTGGCGTCCGTGGGGATCACCTCCAAGACCGCG
GCCGAACGCGGGATCGAGACCACCGAGTTCGTCTACAACCTGGCGGGCAACGGGAAGAGC
CAGATCCTGCAGACCCAGGGCGCGGTCAAGGTCATCGCGGCCAAGGACGGCCCCGGTGTG
GGTGTGCACATGGTGGGCAGCCGCGTCCGGCAGCTGATCACCGAGGGCCAGCTGATCTAC
AACTGGGAGGCGCTGCCGTCTGAGGTGGCGCAGCTCATCCACGCGCATCCGACCCAGTCC
GAGGCGTTGGGCGAGGCCCACTTGGCGCTAGCGGGCAAGCCGTTGCACGTCCACGACTGA

7.1.3. DNA-sekvensen til *TfPO*

>NC_007333.1:1300229-1300963 *Thermobifida fusca* YX, complete genome

GTGCTCCCCGTGACGGGCACCGTGGTTCGAGTTGGCCCCGGGATACACGCCGGATTCACCGG
CCGTGCCGGAGGAGTCAGCGGGGAGCCGTACGCGACCCTGAACCTGGGCGACCACGTGGGTG
ACGACCCTGCAGCGGTGGCGGAGAACCGGAGACGGGCCGCCCTCGGGTTCGGGATCTCCCC

GACCGCGTGGTGTGGATGAACCAGGTGCACGGCGCCACCGCGGTGACCGTGACCGGATCCGG
CCAGGCGGGGGACGTCGACGCAGTCGTCACCCCGGAAGCAGGCCTCGCCTTGGCGGTGCTGG
TGGCGGACTGCCTGCCCTGCTGGTCGCGGACGCCGAGCCGGGGTGATCGGCGCGGCGCAC
GCGGGACGCCCCGGCATGGCGGGCGGGAGTGGTGCCTGCCCTGGTGGCGGAGATGGCCCCGCA
CGGGGCGCGCCCCGAGCGGTGTGTTGCCCTCCTGGGGCCCCGCGATCTGCGGCCGCTGCTACG
AGGTGCCCCGCGACCTGCAGGACAGGGTGGCCCGCACGGTTCCAGAAGCCCGCTGCACAACC
GCGGAAGGCACACCAGGACTAGACATTCGAGCCGGAGTACCGCACAGTTGACGAACTTGGG
CGTGACGAATATCACTCATGACAGTCGGTGTACTCGGGAGAGCGCCGACTTGTTCCTACC
GCAGAGACGCGACCACCGGACGGTTCGCCGGATATGTCTGGAGGGTCCCATGA

7.1.4. DNA-sekvensen til *TfE8*

>ENA|AAZ55700|AAZ55700.1 *Thermobifida fusca* YX cellulose-
binding, family II, bacterial type:Fibronectin, type III
GTGAGAATGAGAAGCCGGCTCGCTGCTTTTGGCGCACTCGCTGGCTTGACTGCAACCCTC
GCCGCCGTCACACCGGCCGAGGATGCTTACGCGCACGGCGCGATGACCTACCCCCGACG
CGTAGCTACATCTGCTACGTCAACGGCATCGAGGGGGGCCAGGGCGGCAACATCGCGCCC
ACCAACCCCGCTTGCCAGAACCTGCTTGC GGAGAACGGCAACTACCCGTTCTACAACCTGG
TTCGGCAACCTCATCAGCGACGCTGGTGGCCGGCACCGCGAGATCATCCCGGACGGCCAG
CTCTGCGGCCCCACCCGAGTTCAGCGGCCTGAACCTGGTCAGCGAGCACTGGCCCACC
ACCACGCTGGTGGCCGAAGCACCATCACCTTCCAGTACAACGCCTGGGCACCGCACCCC
GGCACCTGGTACCTGTACGTCACCAAGGATGGCTGGGATCCCAACTCCCCGCTGGGTTGG
GACGACCTGGAGCCTGTTCCCTTCCACACGGTCACCGACCCGCGATCCGTCCTGGTGGC
CCCAGGGACCGGAGTACTACTGGGACGCCACGCTGCCTAACAAGTCGGGCGCCACATC
ATCTACTCGATCTGGCAGCGCTCCGACAGCCCGGAGGCCTTCTACGACTGCACCGACGTG
GTGTTTCGTCGGCGGCGGCGACGACGGCGGTTTCGGGCGGTCTCAGCCGGACACTGAGGCG
CCCCTGCTCCCAGCACCCCGGTGGCTGGTTCCTGAACGGCACCTCCGCCAGATCAGC
TGGCCTGCTGCAACCGACAACGTCGGTGTGCCGAGTACCGGGTGTACAACGCGGCCAAC
GACGAGCTGCTGGCCACGACTCGCACCACCAGCGTCACCCCTCACCGGGCTGACGCCGAAC
ACCGACTACTCGATCTACGTCGTGGCGCGCGACGCGGGCAACACCTCGAGCCCGTCG
GCGACGCTGACCTTCAACTCGGGTACGCTCCCGCGCTCGCCTGCGAGATCGAGTACAGC
ACACCCAACACCTGGTACGGCGGATTCACCGCCAGGTGCGGATCTACAACGGCAGCCAC
GAGTCCATCGACGGCTGGGAACTGACGTGGGACTTCACCAACGGTGGAGCCATCAACCAG

GCGTGGAACGCCACTGCCAGCAGTCCGGAACCACCGTGACGGTCACCAACGTCTCGTGG
AACAGCACCATTCCGCACCACGGCTCGGTGGAGTTCGGCTTCAACGCCAACTCCACGCGG
GAGCCGGGAGTGCCGGAGAACTTCAAGCTCAACGGCAGCCTCTGCTCCGTGGCCTAA

7.2. Aminosyresekvenser

Aminosyresekvensene til enzymene som ble klonet i denne oppgaven ble hentet fra <https://www.uniprot.org/>.

7.2.1. Aminosyresekvensen til *TfSOD*

```
>tr|Q47RC2|Q47RC2_THEFY Superoxide dismutase OS=Thermobifida  
fusca (strain YX) GN=Tfu_0957 PE=3 SV=1  
MSAPYTLPELPYDYSALEPWISGEIMELHHDKHHAAYVKGANDALEQLAEAREKGDLSKV  
NLLQKNLAFNLAGHVNHTVFWPNLSPDGGDKPEGELGAAIDDAFGSFDAAFRHFSAATG  
IQGSGWAILAWDILGQRLIIEQLYDHQGNLAAGSYPLLMLDMWEHAFYLYQKNVKADYVK  
AFWNVVNWADVAKRFEDARKVALG
```

7.2.2. Aminosyresekvensen til *TfDLDH*

```
>tr|Q47R85|Q47R85_THEFY Dihydrolipoyl dehydrogenase  
OS=Thermobifida fusca (strain YX) GN=Tfu_0994 PE=4 SV=1  
MSESGGTFDLVILGGSGGYSAAIRASELGMRVALIEKDKLGGTCLHYGCIPTKALLHAG  
EVADTVRASEKFGVRASFDITIDMARVHEYKDKVVSGLHRGLTGLIKARGITLVEGEGKLT  
GVDEVTVNGVAYKGRHIILATGSQARSLPGLAIDGERIITSYEALRLDRVPSAIILGGG  
VIGVEFASVWRSFGAEVTIVEALPHLVPAAEESSSKLLERAFRKRGIKFEFGSPFESVKL  
TETGVSMTLASGKTVEGELLLVAVGRGPVSQGLGYEEVGIRLERGFVQVDENLHTGVGNI  
YAVGDLIPTPQLAHVGFVAEGIFVAEHIAGLNPVNIDYDGIPRVITYSDPEVASVGITSKTA  
AERGIETTEFVYNLAGNGKSQILQTOGAVKVIAAKDGPVLGVHMGSRVGEELITEGQLIY  
NWEALPSEVAQLIHAHPTQSEALGEAHLALAGKPLHVHD
```

7.2.3. Aminosyresekvensen til *TfPO*

```
>tr|Q47QW5|Q47QW5_THEFY Laccase domain protein OS=Thermobifida  
fusca (strain YX) GN=Tfu_1114 PE=3 SV=1
```

MTGTVVELAPGIHAGFTGRAGGVSGEFYATLNLGDHVGDDPAAVAENRRRAALGFGISPD
RVVWMNQVHGATAVTVTGSGQAGDVDAVVTPEAGLALAVLVADCLPLLVADAAAGVIGAA
HAGRPGMAAGVVPALVAEMARHGARPERCVALLGPAICGRCYEVPRDLQDRVARTVPEAR
CTTAEGTPGLDIRAGVTAQLTNLGVNTITHDSRCTRESADLFSYRRDATTGRFAGYVWRV
P

7.2.4. Aminosyresekvensen til *TjE8*

```
>tr|Q47PB9|Q47PB9_THEFY Cellulose-binding, family II, bacterial  
type:Fibronectin, type III OS=Thermobifida fusca (strain YX)  
GN=Tfu_1665 PE=4 SV=1  
MRMRSRLAAFGALAGLTATLAAVTPAEDAYAHGAMTYPPTRSYICYVNGIEGGQGGNIAP  
TNPACQNLLAENGNYPFYNWFGNLI SDAGGRHREI I PDGQLCGPHPQFSGLNLVSEHWPT  
TTLVAGSTITFQYNAWAPHPGTWYLYVTKDGWDPNSPLGWDDLEPVPFHTVTDPPIRPGG  
PEGPEYYWDATLPNKSGRHI IYSIWQRSDSPEAFYDCTDVVVFVGGDDGGSGGPQPDTEA  
PTAPGTPVAGSLNGTSAQISWPAATDNVGVAEYRVYNAANDELLATTRTTSVTLTGLTPN  
TDYSIYVVARDAAGNTSSPSATLTFNSGDAPALACEIEYSTPNTWYGGFTAQVRIYNGSH  
ESIDGWELTWDFTNGETINQAWNATAQQSGTTVTVTNVSWNSTIPHHGSVEFGFNANSTR  
EPGVPENFKLNGLCSVA
```



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway