



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Innledende kinetikkstudier av den lytisk polysakkarid monooxygenasen, *SmAA10A*, ved bruk av stopped-flow spektrofotometri og isotermisk titreringskalorimetri.

Preliminary kinetic studies of the lytic polysaccharide monooxygenase, *SmAA10A*, using stop-flow spectrophotometry and isothermal titration calorimetry.

James Alexander Ydstebø Thorpe
Lektorutdanning i realfag

Forord

Arbeidet presentert i denne mastergradsavhandlingen ble utført som en del av forskningsgruppen Protein Engineering and Proteomics (PEP), ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) hos Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), i perioden januar til mai 2021. Denne avhandlingen utgjør en bestanddel blant gruppens overordnede prosjekt om å kunne avdekke den molekylære mekanismen til LPMO-er.

Først vil jeg rette en stor takk til mine veiledere Professor Morten Sørlie og Postdoktor Ivan Ayuso-Fernandez for god veiledning i løpet av mastergraden. Ivan har vært utrolig hjelpevillig ovenfor alt av mulige stopped-flow utfordringer og har gitt god veiledning under hele perioden til tross for noen språkutfordringer.

Jeg vil også takke til alle masterstudente, PhD-studentene og postdoktorerne som jeg har hatt gleden av å dele laboratorium med. Deriblant har jeg hatt mange fine lunsjpauser med Maja Mollat, Rannei Skaali og Ingrid Elvebakken i en ellers isolert skolehverdag. Videre takk rettes også til postdoktor Kelsi Hall for å være behjelpelige med arbeid på laboratoriet samt PhD-stipendiat Lukas Riederer for å ha gitt meg god opplæring innen bruk av ITC-instrumentet.

En stor takk skal også rettes til min samboer Hanna Bruun Tørnby for gode råd, fine turer, korrekturlesning av oppgaven samt for å ha lyttet til mine høyttekende monologer om LPMOer, reduktanter med mer. Til slutt vil jeg takke min familie for mange lange telefonsamtaler på tur, både om mastergraden og alt annet som falt inn i hodet mitt under dette siste halvåret mitt på Ås. De har gitt meg etterlengtede pauser, gode råd og masse støtte i mitt arbeid mot å bli ferdigutdannet biokjemiker og Lektor i realfag.

James Alexander Ydstebø Thorpe

Ås, Mai 2021

Sammendrag

De kobberavhengige enzymene kjent som lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMO-er) katalyserer den oksidative nedbrytningen av polysakkarider som kitin og cellulose ved spalting av glykosidbindinger. Under denne prosessen benytter LPMO-er seg av en reduktant i tillegg til et av kosubstratene H_2O_2 eller O_2 . Disse katalytiske egenskapene til LPMO-er har gitt dem en sentral rolle innen forskningen på fremtidige bioraffineringsprosesser hvor bærekraftig biomasse kan benyttes til bioøkonomiske formål. Denne mastergradsavhandlingen inngår som en del av et større forskningsprosjekt hvor målet er å avdekke ny kunnskap om den molekylære mekanismen til LPMO-er. Arbeidet i denne oppgaven benyttet metoder som stopped-flow spektroskopi og isotermisk titreringskalorimetri.

Den iboende forskjellen i emittert fluorescens mellom *SmAA10A*-Cu(II) og *SmAA10A*-Cu(I) ble utnyttet til å bestemme reduksjonshastigheten for *SmAA10A* og kosubstratet H_2O_2 under anaerobe miljøforhold. Hastigheten (k_{1app}) for reduksjonen av *SmAA10A* var av størrelsesorden 10^5 , 10^3 og $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ved pH 7 med henholdsvis L-askorbinsyre, gallussyre og L-cytein. For reduksjonen med L-Cystein ble det observert en moderat binding av reduktanten til enzymet med en bindingskonstant (K_{D1}) i orden av $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, med en tilhørende førsteordens hastighetskonstant (k_1) på 4.1 s^{-1} . En svak økning i reduksjonshastigheten ble observert ved pH 8 for alle reduktanter. For å enkelt kunne studere reduksjonen av hydrogenperoksid med *SmAA10A*-Cu(I) ble det utviklet og optimalisert en ny stopped-flow metode. De resulterende reduksjonshastighetene etter intiell reduksjon av *SmAA10A*-Cu(II) med enten L-askorbinsyre, gallussyre eller L-cystein var da av størrelsesorden $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Stopped-flow resultatene antyder at hverken reduksjonen av *SmAA10A* eller H_2O_2 , ved tilstedeværelse av antioksidantene L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein, er hastighetsbestemmende trinn i den molekylære mekanismen til LPMO-er. Det viste seg også at reduksjonshastigheten for *SmAA10A* er avhengig av reduktanten som benyttes. ITC-metoden viste potensiale, men er i nåværende tilstand uegnet til bestemmelse av kinetiske- eller termodynamiske parametere for oksidaseaktiviteten til fritt kobber og *LsAA9A*. Datamaterialet presentert i denne oppgaven utgjør dermed et grunnlag for videre studier på veien mot å avdekke mulige hastighetsbestemmende trinn i den oksidative mekanismen til LPMO-er.

Abstract

The copper dependent enzymes known as lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) can catalyse the oxidative cleavage of glycosidic bonds found in polysaccharides such as chitin and cellulose. During this process LPMOs utilize a reductant as well as one of its co-substrates H_2O_2 or O_2 . The catalytic properties of LPMOs have resulted in them attracting great interest within scientific community for their potential application in biorefining processes where economical gains can be made from the degradation of sustainable biomass. This thesis is a part of a larger research project that hopes to uncover new knowledge about the molecular mechanism of LPMOs. The work presented in this thesis employs methods such as stopped-flow fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC).

The intrinsic fluorescence properties of *SmAA10A*-Cu(II) and *SmAA10A*-Cu(I) were utilized to determine the speed of reduction for *SmAA10A* and the co-substrate H_2O_2 in an anaerobic environment. The reduction speeds for *SmAA10A* (k_{1app}) were in the order of 10^5 , 10^3 and 10^4 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, at pH 7, when reduced by L-ascorbic acid, gallic acid and L-cysteine, respectively. When using L-cysteine we observed a moderate binding affinity of the reductant represented by a binding constant (K_{D1}) in the order of $10^{-4} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, and a first order rate constant (k_1) of 4.1s^{-1} . A slight increase in speed was observed at pH 8 for all reductants. For studying the reduction of hydrogen peroxide by *SmAA10A*-Cu(I) we developed and optimized a new stopped-flow method. The resulting reduction speeds were in the order of $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, after initial reduction of *SmAA10A*-Cu(II) by either L-ascorbic acid, gallic acid or L-cysteine.

The stopped-flow results suggest that neither the reduction of *SmAA10A* nor H_2O_2 in the presence of L-ascorbic acid, gallic acid and L-cysteine are rate-limiting steps in the molecular mechanism of LPMOs. It is also clear that the speed of reduction varies between reductants. The ITC-method did show potential, however it does not in its current setup allow for determination of kinetic nor thermodynamic parameters for the oxidase activity of free copper ions and *LsAA9A*. The data presented in this thesis therefore provide a basis for future studies with the aim of uncovering potential rate-limiting steps in the oxidative mechanism of LPMOs.

Innhold

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
Forkortelser	VI
1. Innledning	1
1.1 Karbohydrater.....	2
1.1.1 Cellulose	2
1.1.2 Kitin	4
1.2 Karbohydrataktive enzymer	5
1.2.1 Glykosidhydrolaser	5
1.2.2 Lytisk polysakkarid monooksygenaser – Axiliary activities (hjelpenzymer).....	8
Mangfoldet av LPMO-familier	8
Struktur og substratbinding.....	9
Aktivt sete.....	11
Elektrondonorer	12
Mulige reaksjonsmekanisme(r) og kosubstrat(er).....	13
1.3 Isotermisk titreringskalorimetri	16
1.4 Stopped-flow spektroskopi	19
1.5 Oppgavens formål	22
2. Materialer.....	24
Laboratorieutstyr	24
Programvare	25
Kjemikalier	25

3. Metoder	26
3.1 Proteinproduksjon av <i>SmAA10A</i> og <i>NcAA9C</i> katalytisk domene	26
3.2 Bestemmelse av proteinkonsentrasjoner	26
3.3 Stopped-flow eksperimenter	27
3.3.1 Stopped-flow reduksjon av <i>SmAA10A/NcAA9C</i> katalytisk domene	27
3.3.2 Stopped-flow re-oksidasjon av <i>SmAA10A</i> med H₂O₂	28
3.4 Bearbeiding av stopped-flow data	30
3.5 Isotermisk titreringskalorimetrisk analyse av oksidaseaktiviteten til kobbersulfat og <i>LsAA9A</i>	31
4. Resultater	32
4.1 Stopped-flow reduksjon av <i>SmAA10A</i>	32
4.2 Stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av <i>SmAA10A</i>	36
4.2.1 Innledende stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av <i>SmAA10A</i>	36
4.2.2 Optimaliserte stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av <i>SmAA10A</i>	39
4.3 Innledende isotermisk titreringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til fritt kobber og <i>LsAA9A</i>	42
4.3.1 Isotermisk titreringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til kobber(II)sulfat	43
4.3.2 Isotermisk titreringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til <i>LsAA9A</i>	45
5. Diskusjon	46
5.1 Effekten av reduktanter på reduksjonshastigheten for <i>SmAA10A</i>	47
5.2 Reduksjon av kosubstratet hydrogenperoksid med <i>SmAA10A</i>	50
5.3 Oksidaseaktiviteten til fritt kobber og <i>LsAA9A</i>	53
5.4 Oppsummerende betraktninger og fremtidige perspektiver	54
Referanser	55
Vedlegg	i

Forkortelser

AA – Auxiliary activity / hjelpeenzym

AscA – Askorbinsyre

CAZy – Karbohydrataktive enzymedatabasen

CBM – Carbohydrate binding module

CDH – Cellobiosedehydrogenase

CNC – Cellulose nanokrystall

FAD – Flavin adenin dinukleotid

GaA – Gallussyre

GH – Glykosidhydrolaser

HRP – Pepperrot peroksidase

ITC – Isotermisk titreringskalorimetri

Ls – *Lentinus similis*

LPMO – Lystisk polysakkarid monooksygenaser

NFC – Nanofiber cellulose

NMR – Kjernemagnetisk resonans

Nc – *Neurospora crassa*

PDB – Protein Data Bank

QM/MM – kvantemekaniske/molekylærmekaniske beregninger

Sm – *Serratia marcescens*

Trp – Tryptofan

Tyr – Tyrosin

Å – Ångstrøm

1. Innledning

Dagens moderne samfunn og dets økonomiske vekst er fremdeles sterkt avhengig av petroleumbaserte produkter og tjenester. Selv om nyere politikk og internasjonalt samarbeid har resultert i en økning av fornybare energikilder på 41% i 2019 står fremdeles fossile brensler for opp mot 84% av verdens energibehov (Rapier, 2020). Dermed vil det være nyttig å kunne bruke andre tilgjengelige forekomster av hydrokarboner i form av karbohydrater fra plante- og matavfall. Dette kan da erstatte noe av energitapet forbundet med utfasingen av fossile brensler. Teknologien har også potensiale til å gi oss tilgang på fornybar og karbonnøytral energi ved å redusere de globale klimagassutslippene, og den utgjør en del av arbeidet mot å nå målet om å begrense den globale oppvarmingen til 1,5 – 2°C, som vedtatt i Parisavtalen. (Payne et al., 2015).

Den nødvendige bioteknologien for å kunne utnytte disse lagrene av karbohydrater til produksjon av biodrivstoff er enda i startfasen og er dermed ikke konkurransedyktige med fossile energikilder som kull, olje og gass (Wyman et al., 2005). Karbohydratet cellulose er krystallinsk og uløselig, men det kan gjennom mekanisk, kjemisk og enzymatisk behandling nedbrytes til glukoseenheter. Disse glukoseenhetene kan så fermenteres til bioetanol eller benyttes som grunnenheter til syntese av bioplast, tekstiler, emulgatorer med flere.

Den enzymatiske nedbrytningen står sentralt i prosessen for å kunne utvikle konkurransedyktig annengenerasjons biodrivstoff, og løsningen kan komme fra naturlige enzymer hos sopp og bakterier. I naturen har flere sopp- og bakteriearter utviklet enzymlblandinger bestående av glykosidhydrolaser (GH) (Harris et al., 2010), lytisk polisakkarid monooksygenaser (LPMO) og ikke katalytisk aktive karbohydrat bindingsmoduler (CBM-er) med flere (Payne et al., 2015). Disse enzymlblandingene har siden deres oppdagelse i 2010 (Vaaje-Kolstad et al.) blitt studert og videreutviklet in vitro med mål om å karakterisere, optimalisere og designe nye enzymer til produksjon av biodrivstoff, bioplast med mer.

Videre i introduksjonen vil det omtales ulike typer karbohydrater (del 1.1), GH-er og LPMO-er (del 1.2), samt bruken av isotermisk titeringskalorimetri (del 1.3) og stopped-flow fluorescens (del 1.4) som metoder for bestemmelse av kinetiske- og termodynamiske parametere av ulike LPMO-er.

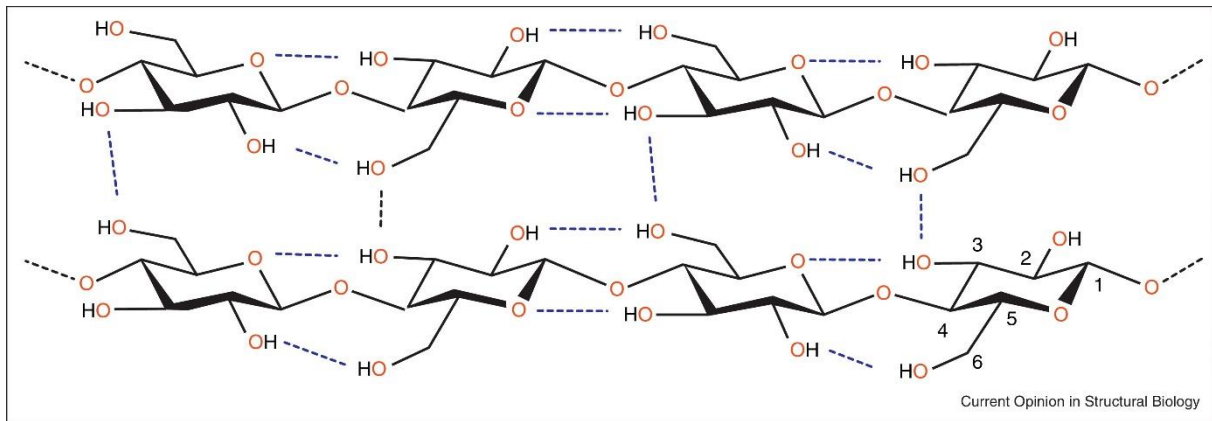
1.1 Karbohydrater

Karbohydrater er en gruppe biomolekyler med naturlige ringstrukturer som inneholder grunnstoffene karbon, hydrogen og oksygen, ofte uttrykt med den generelle støkiometriske formelen $(CH_2O)_n$. De utgjør en sentral rolle i den metabolske produksjonen og lagringen av energi i plante- og dyreceller, samt andre biokjemiske prosesser (Lande & Svihus, 2020).

Karbohydrater kan deles inn i mono-, oligo- og polysakkarider. Monosakkarider som glukose, fruktose og galaktose er de minste karbohydratenhetene og utgjør grunnenhetene (monomer) i større karbohydrater. Disakkarider består av to monomerer, oligosakkarider mellom to og ti monomerer, og polysakkarider består av to til flere tusener monosakkaridenheter. De sammensatte karbohydratene er strukturelt bundet av kovalente glykosidbindinger mellom to monomerer, som oftest en O-glykosidbinding. Denne bindingstypen oppstår som et resultat av kondensasjonsreaksjonen mellom hydroksylgruppen (et hemiacetal eller hemiketal) på det anomere karbonatomet (karbon 1) og en hydroksylgruppe på et annet karbonatom (Bernatek et al., 2019). Videre skal struktur, egenskaper og anvendelsesområder til polysakkaridene Cellulose (1.1.1) og Kitin (1.1.2) omtales.

1.1.1 Cellulose

Cellulose er et uløselig lineært homopolysakkarid bestående av heksosen D-glukopyranose (glukose) bundet sammen med en β -1,4-O-glykosidbinding (Figur 1.1.1). Denne bindingen er svært stabil, gitt fraværet av katalysatorer, og har en estimert halveringstid på 4,7 millioner år, ved $25^\circ C$ og $pH = 7-14$ (Wolfenden et al., 1998). Cellulose eksisterer i mange amorfe og krystallinske former, men naturlig finnes hovedsakelig to ulike krystallinske former, Cellulose I og II (O'Sullivan, 1997). I cellulose I er polysakkaridkjedene pakket parallelt med hverandre (reducerende ender orientert i samme retning), mens i cellulose II er kjedene pakket antiparallelt (reducerende ender orientert i motsatt retning) (Eijsink et al., 2008).



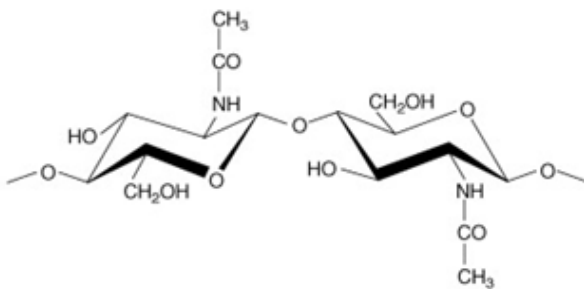
Figur 1.1.1. Delstruktur av cellulose. Strukturen viser intra- og intermolekulære hydrogenbinger mellom glukoseenhetene og mellom polysakkaridkjedene. Glukoseenhetene er orientert med 180° -vinkel og gir opphav til dimeren cellobiose. Hentet fra Hemsworth et al. (2013).

I naturen er cellulose den mest utbredte polymeren og utgjør store deler av celleveggen hos planter i form av krystallinske strukturer bundet sammen av hydrogenbindinger (Klemm et al., 2005). Den store naturlige forekomsten av cellulose gjør det til et mulig bærekraftig råstoff for produksjonen av biodrivstoff og andre bionedbrytbare produkter (Zakariassen et al., 2009). Derimot er utviklingen av annengenerasjons biodrivstoff fremdeles ikke bærekraftig ut fra et økonomisk perspektiv (Payne et al., 2015). Derfor er det viktig at videre forskning på enzymkatalysert nedbrytning av biopolymerer effektiviseres ved hjelp av ny bioteknologi med vekt på økt produksjon av etanol fra celluloserik biomasse (Zakariassen et al., 2009).

Tradisjonelt er cellulose kjent som utgangsstoffet for å lage papp, papir og tekstiler. I nyere tid har utviklingen av nanofibre og nanokrystaller fra cellulose blitt sentralt innen nanoteknologi og biomedisin. Dette er grunnet egenskaper som høy spesifikk overflate, styrke, høy stabilitet, lav vekt, den biotilgjengelighet og bionedbrytningsgrad (Kalia et al., 2014). Nanofibrene av cellulose (NFC) utvinnes gjennom kjemiske og mekaniske metoder, mens cellulose nanokrystaller (CNC) dannes ved hydrolyse av cellulose med sterke syrer. Disse formene for cellulose kan dannes fra bakteriell cellulose og har åpnet opp for nye eksperimentelle biomedisinske metoder som regenerering av bein, brusk og hud. De kan muligens også brukes til å utvikle langtidsvirkende medisiner som aktiveres spesifikt nær et lokalt virkningsområde i kroppen ved oralt inntak. Mulighetene er dermed mange hvis statlig godkjenning av metodene oppnås (Halib et al., 2017).

1.1.2 Kitin

Kitin er den analoge polysakkaridforbindelsen til Cellulose, hvor den viktigste kjemiske forskjellen mellom forbindelsene er at kitin inneholder en acetyllert aminogruppe på karbon 2. Grunnenheten N-acetyl-D-glukosamin (GICNAc) er bundet sammen med β -1,4-O-glykosidbindinger. Denne bindingen er orientert med 180° -vinkel og gir opphav til den strukturelle og funksjonelle dimeren kitobiose (Horn et al., 2006) (Figur 1.1.2). Krystallinsk kitin er lineære polysakkaridkjeder som bindes sammen med intermolekylære hydrogenbindinger til et uløselige nanofibre (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007). Lengden på kitinfibrene er avhengige av opphavsorganismen.



Figur 1.1.2. Kjemisk struktur av kitin med β -1,4-o-glykosidbinding mellom to N-acetyl-D-glukosaminenheter. Hentet fra Eijsink et al. (2008).

Krystallinsk kitin finnes ofte i to ulike former, α -kitin og β -kitin, der α -kitin er den vanligste formen. Her ligger polysakkaridkjedene antiparallelt, med de reduserende endene motsatt av hverandre. I β -kitin derimot ligger kjedene parallelt, med de reduserende endene orientert i samme retning. Den antiparallelle pakkingen av α -kitin gir et høyere antall hydrogenbindinger, og dermed økt stabilitet og uløselighet i forhold til β -kitin (Rinaudo, 2006). Det finnes også en tredje naturlig og lite utforsket form for kitin; γ -kitin. I denne formen er polysakkaridkjedene orientert i en rekkefølge hvor to kjeder er parallele etterfulgt av en antiparallell kjede (Kaya et al., 2017).

Hoveddelen av eksoskjelettet til leddyr samt celleveggen hos flere sopp- og bakteriearter består av kitin (Tang et al., 2015). Kitin er dermed i likhet med cellulose produsert i store mengder i naturen. Hydrolysering eller industriell deacetylering av kitin danner nedbrytningsprodukter som kitosan, kitoooligosakkarider og andre derivater. Kitosan består av D-glukosamin og N-acetyl-D-glucosamine i β -(1-4)-glykosidbinding (Cheung et al., 2015). Kitosan og kitoooligosakkarider er kortere, mer vannløselige og har flere anvendelser enn rent kitin. Noen bruksområder av kitosan og kitoooligosakkarider inkluderer bioplast (Fernandez &

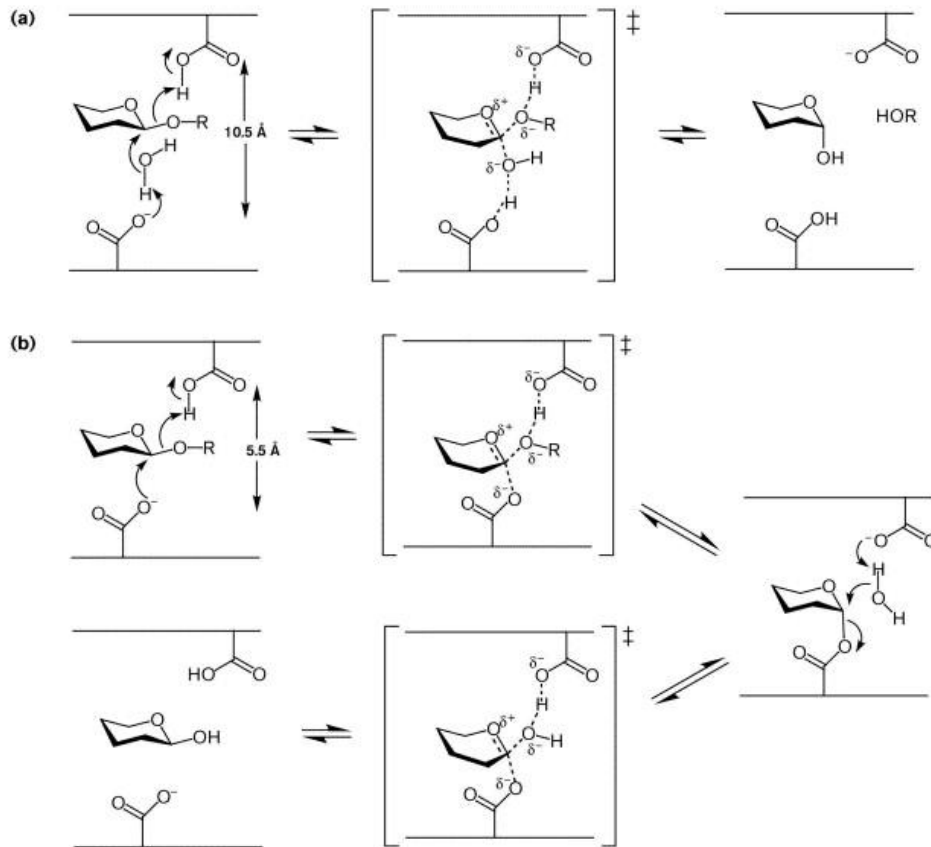
Ingber, 2014), kosmetikk, vannrensning, økt plantevekst og sykdomsimmunitet (Dutta et al., 2004), samt nanoteknologi og genterapi (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007; Aam et al., 2010). Egenskapene og biotilgjengeligheten av kitin og dens nedbrytningsprodukter gir dermed opphav til et mangfold av muligheter som et miljøvennlig bioråstoff. Muligheter inkluderer produksjon av biodrivstoff og bioplast, utvikling av landbruks- og medisinsk teknologi med mer (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007; Payne et al., 2015; Zakariassen et al., 2009).

1.2 Karbohydrataktive enzymer

1.2.1 Glykosidhydrolaser

Databasen for karbohydrataktive enzymer (CAZy, www.cazy.org) har vært tilgjengelig siden 1998 og inneholder enzymklasser som glykotransferaser, polysakkaridlyaser, karbohydratesteraser, glykosidhydrolaser (GH-er), karbohydrat bindende moduler (CBM-er) (Cantarel et al., 2009), og auxiliary activities (hjelpenzymer) (Lombard et al., 2014). Blant disse er glykosidhydrolasene sentrale innenfor flere ulike biologiske prosesser som nedbrytning (depolymerisering) av karbohydrater, hvor cellulaser og kitinaser er aktive på henholdsvis substratene cellulose og kitin. GH-er katalyserer hydrolyseringen av glykosidbindinger mellom karbohydratenheter eller karbohydrater bundet til andre stoffgrupper som glykosider, glykaner og glykokonjugater (Lombard et al., 2014). Av denne grunnen er glykosidhydrolaser essensielle i enzymcocktails og av stor økonomisk verdi i nedbrytningsprosessen av forbehandlet fornybar biomasse til mindre oligosakkarider, da disse danner substrater for videre oksidasjon til biodrivstoffet etanol (Wilson, 2009).

Glykosidbindinger kan enzymatisk hydrolyseres gjennom en generell syrekatalyse med to nødvendige residuer; en nukleofil/base og en protondonor. Hydrolyseringsmekanismen kan resultere i enten inversjon eller bevaring av oksygengruppens konfigurasjon ved det anomere karbonatomet, karbon 1 (Jitonnom et al., 2011; Sinnott, 1990). Den inverterende mekanismen (Figur 1.2.1a) benytter en katalytisk syre og base med avstand på ca. 10 Å. Mekanismen starter med ett trinn hvor oksygenet i glykosidbindingen protoneres av syren, samtidig deprotonerer basen et vannmolekyl. Vannmolekylet utfører så et nukleofilt angrep på det anomere karbonet, og stereokjemien inverteres (Davies & Henrissat, 1995).

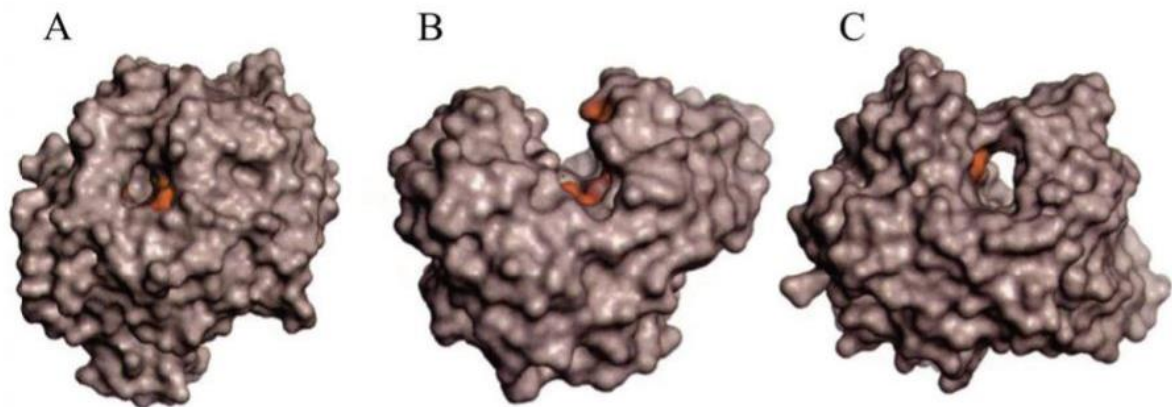


Current Opinion in Chemical Biology

Figur. 1.2.1. Den generelle reaksjonsmekanismen til glykosidhydrolaser for (a) invertering med β -glykosidase og (b) bevaring med β -glykosidase via et intermediat. Hentet fra Rye og Withers (2000).

Den bevarende mekanismen (Figur 1.2.1.b) skjer i to trinn og bruker en generell form for syre-/basekatalyse med en nukleofil i en avstand på ca. 5,5 Å. Først protoneres oksygenatomet i glykosidbindingen og det stabiliseres ved dannelsen av et kovalent intermediat med nukleofilen. Deretter deprotonerer den deprotonerte syre-/baseresidu et vannmolekyl, som videre utfører et nukleofilt angrep på intermediet fra trinn 1. Dette resulterer i at stereokjemien på det anomere karbonatomet bevares (Davies & Henrissat, 1995; Rye & Withers, 2000).

Glykosidhydrolaser består ofte av flere domener med et katalytisk aktivt domene bundet til ett eller flere ikke-katalytiske domener, ofte i form av CBM-er. Selv om enzymkatalysen foregår i det katalytiske domenets aktive sete promoterer ofte CBM-er til økt binding mellom enzym og substrat. Topologien til det aktive setet kan deles i tre grupper; lomme (A), kløft (B) eller tunnel (C) (Figur 1.2.2).



Figur. 1.2.2. Topologier til det aktive setet hos glykosidhydrolaser. Katalytisk aktive aminosyrer er farget røde. A) lomme for en glukoamylase fra *Asperigillus awamori* (PDB: 1GLM). B) kløft for endoglukanasen E2 fra *Thermobifida fusa* (PDB: 2BOD). C) Tunnel for cellobiosehydrolase II fra *Thricoderma reesei* (PDB: 415U). Hentet fra Davies og Henrissat (1995).

Topologien til det aktive setet bestemmer ofte aktiviteten og virkemåten til ulike GH-er. De kan være endoaktive og bryte glykosidbindinger internt i polysakkaridkjeder, eller eksoaktive ved å bryte glykosidbindinger fra endene. De kan også være prosessive eller ikke-prosessive uavhengig av deres endo- eller eksoaktivitet. Lommetopologien er mest utbredt blant ekso-glykosidhydrolaser som katalyserer depolymeriseringer der det er mange tilgjengelige ender. Kløft-topologien er vanlig for endo-glykosidhydrolaser. GH-er med tunelltopologi leder polysakkaridkjeden gjennom enzymets aktive sete og er effektive på substrater hvor det er få tilgjengelige ender på polysakkaridkjedene (Davies & Henrissat, 1995).

Prosessivitet er et enzyms evne til å forbli bundet til substratet ved etterfølgende hydrolyseaksjoner (Davies & Henrissat, 1995). Prosessivitet er sentralt for GH-er da nedbrytningen av krystallinske substrater som kitin og cellulose krever store mengder fri energi på henholdsvis 5,6 kcal/mol (Beckham & Crowley, 2011) og 5,4 kcal/mol (Beckham et al., 2011) for en chitobiose- og cellobioseenheter. Ofte resulterer dette i at GH-katalysert hydrolyse av krystallinske substrater som cellulose og kitin har lave katalytisk hastighetskonstantverdier (k_{kat}) (Kurasin & Våljamäe, 2011; Zakariassen et al., 2010). Denne trege kinetiske nedbrytningen av cellulose gir dermed utfordringer ovenfor kostnadseffektiviseringen og sammensetningen av enzymcocktails til bioraffineringsprosesser. Derfor har oppdagelsen av en ny enzymklasse, i dag kjent som LPMO-er, resultert i nye muligheter for utviklingen av konkurransedyktige annengenerasjons biodrivstoff og bioplast som et alternativ til fossile energikilder (Hemsworth et al., 2016).

1.2.2 Lytisk polysakkarid monooksygenaser – Axiliary activities (hjelpeenzymer)

Enzymklassen i dag kjent som lytisk polysakkarid monooksygenaser (LPMO-er) ble først identifisert på 1990-tallet som enten kitinaktive CBM-er (familie CBM33) eller som lite katalytisk aktive former for GH-er (familie GH61) (Armesilla et al., 1994; Schnellmann et al., 1994). I 2010 ble det oppdaget at det endoglukanase-aktive enzymet GH61 viste en betydelig økning i aktivitet ved nærvær av divalente metalioner (Harris et al., 2010). Denne oppdagelsen kom på bakgrunn av forskning fra Karehabdi et al. (2008), som viste at det var nødvendig med tilstedeværelse av divalente metallioner for å kunne bestemme enzymets krystallinske struktur med høy oppløsning (1,6 Å). Videre arbeid av Vaaje-Kolstad et al. (2010) viste at enzymer i familiene GH61 og CBM33 ikke viste endoglukanase-aktivitet, men heller oksiderte overflaten av krystallinsk kitin ved bruk av O_2 og en reduktant.

Mangfoldet av LPMO-familier

Funnet av den oksiderende mekanismen resulterte i at enzymer i familiene GH61 og CBM33 ble omklassifisert i CAZy-databasen til auxiliary activity enzymer (hjelpeenzymer) med forkortelsen LPMO eller AA (Horn et al., 2012; Levasseur et al., 2013). Senere oppdagelser av LPMO-er har resultert i nye familier som AA11 (Hemsworth et al., 2014), AA13 (Lo Leggio et al., 2015; Vu et al., 2014), AA14 (Couturier et al., 2018), AA15 (Sabbadin et al., 2018) og AA16 (Filiatrault-Chastel et al., 2019). GH61 og CBM33 ble omklassifiserte til henholdsvis familie AA9 og AA10. Familiene er blitt kategorisert basert på sekvenslikhet (Levasseur et al., 2013). For mer informasjon om familienes kjente substrater og opprinnelse se Tabell 1.2.1.

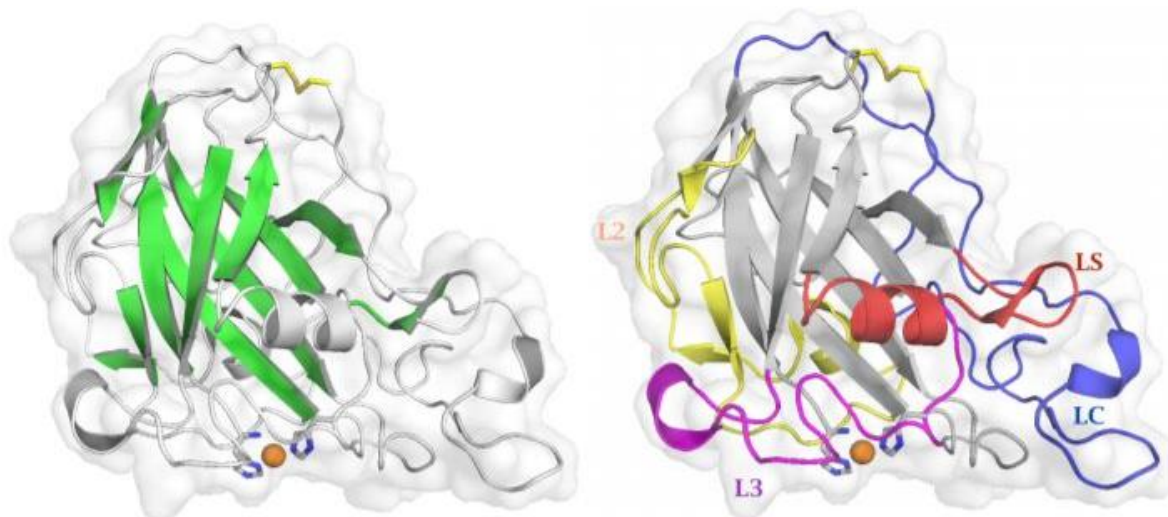
Tabell 1.2.1 Oversikt over de ulike auxiliari activity (AA) familiene som inneholder LPMO-er. Viser antallet kjente enzymer og strukturer, samt substrater og typen organismer hvor de er av naturlig opprinnelse per 21.01.2021 (www.cazy.org).

Familie	Antall enzymer (antall strukturer)	Opprinnelse	Substrater
AA9	30 (17)	Sopp	Cellulose (Phillips et al., 2011; Quinlan et al., 2011), Oligosakkarider (Isaksen et al., 2014), Hemicellulose (Agger et al., 2014), Xyalan (Frommhagen et al., 2015).
AA10	26 (23)	Bakterier (noen virus)	Cellulose og Kitin (Forsberg et al., 2014b)
AA11	1 (1)	Sopp	Kitin (Hemsworth et al., 2014)
AA13	4 (1)	Sopp	Stivelse (Lo Leggio et al., 2015; Vu et al., 2014)
AA14	2 (1)	Sopp	Xylan (Couturier et al., 2018)
AA15	2 (1)	Insekter	Cellulose og Kitin (Sabbadin et al., 2018)
AA16	1 (0)	Sopp	Cellulose (Filiatrault-Chastel et al., 2019)

Struktur og substratbinding

Den tertiære krystallstrukturen til de fleste LPMO-er er strukturelt sett svært like og består av en β -sandwich, som igjen består av to β -plater sammensatt av opptil syv til ni β -tråder (Figur 1.2.3) (Vaaje-Kolstad et al., 2017). Strukturen inneholder også flere loops og små α -helikser mellom β -trådene i sekvensen, og gir opphav til strukturell diversitet blant LPMO-er.

Loopene kan også være nyttige for substratgjenkjennelse og -spesifisitet ettersom de utgjør store deler av enzymets bindingsoverflate.



Figur 1.2.3. Tertiær krystallstruktur av LPMO-en *NcAA9C* (PDB id: 4D7U) fra soppen *Neurospora crassa* viser generelle likhetstrekk for LPMO-strukturer, utenom de markerte loopene som kan variere sterkt avhengig av den individuelle LPMO-en. β -sandwichen er farget grønt, loopene har ulike farger, kobberatomet er farget oransje (sfære) og er koordinert til to histidiner (sticks). Hentet fra Karlsen (2017).

LPMO-er har vist aktivitet på et mangfold av ulike polysakkarider (Tabell 1.2.1), hvor et fellestrekk er den flate substratbindene overflaten. Denne overflaten binder godt til krystallinske substrater som cellulose og kitin. Unntak finnes blant annet for AA13 som har en rundere bindingsoverflate ettersom den katalyserer stivelse i det som kan likne en lomme-topologi (Lo Leggio et al., 2015). *NcLPMO9C* er et annet unntak grunnet dens aktivitet på det ikke-krystallinske substratet hemicellulose og løselige cellooligosakkarider (Agger et al., 2014). Enzym-substrat interaksjonene hos *SmLPMO10A* fra organismen *Serratia marcescens* ble først studert av Vaaje-Kolstad et al. (2005) ved stedrettet-mutagene og ga informasjon om at både polare aminosyrer og en enkel aromatisk aminosyre (Tyr 54) var viktige for binding av substratet (Harris et al., 2010). Dette er uvanlig ettersom aromatiske aminosyrer ofte er skjult inni proteinkjernen sjeldent for å unngå kontakt med løsningsmiddelet. En grunn til at aromatiske aminosyrer kan bidra til substratbinding er at aromatringsringen kan bidra i posisjoneringen av substratet ved bruk av lokale π -interaksjoner (Beeson et al., 2015). Dette har også blitt observert for AA9-enzymet (Li et al., 2012). Senere viste Frandsen et al. (2016) ved krystalliseringsstudier av et LPMO-substrat-kompleks at celluloseaktive LPMO-er er mer hydrofobe på den substratbindene overflaten enn kitinaktive LPMO-er. Dette kan være på grunnlag av cellulose sin hydrofobe overflatestruktur.

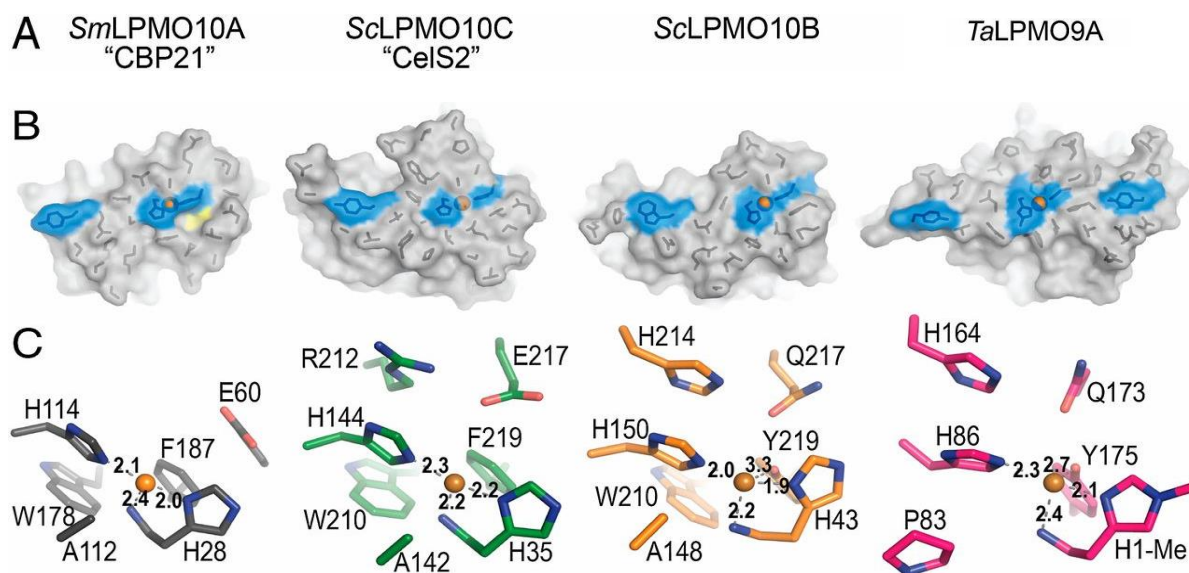
I likhet med GH-er har flere LPMO-er én eller flere CBM-er, med konserverte aromatiske aminosyrer på overflaten. Unntaket er AA10-familien som nesten utelukkende består av

enkeltdomeneenzymer (Horn et al., 2012). Det har senere vist at CBM-er sannsynligvis promoterer til økt substratbinding av polysakkarider som cellulose (CBM1 og CBM2), kitin (CBM1, CBM2, CBM5/12 CBM14 og CBM73) eller stivelse (CBM20) (Vaaje-Kolstad et al., 2017). Dette kan komme av at de kontrollerer posisjonen av det aktive setet i forhold til substratet for optimalisering av katalysen. Den nærliggende effekten av CBM-er bidrar til å øke den effektive konsentrasjonen av enzymet [E], og kan resultere i økt katalytisk aktivitet ved at de beskytter enzymet fra egenkatalytisk inaktivering (Courtade et al., 2018). Når CBM-er fjernes fra eller byttes mellom LPMO-er kan det resultere i svekking av substratbindingskapasiteten, enzymstabiliteten og den katalytiske aktiviteten, grunnet endringer i protein-substrat interaksjoner (Courtade et al., 2018; Crouch et al., 2016; Forsberg et al., 2014b; Forsberg et al., 2018). Dette påpeker betydningen av CBM-er for opprettholdelsen av LPMO-ers katalytiske aktivitet.

Aktivt sete

Nær midten av den substratbindende overflaten ligger det aktive setet. Det er flatt utformet og inneholder et bundet kobberatom koordinert av tre nitrogenatomligander fra to ulike histidiner (Figur 1.2.3). Den ene histidinen er lokalisert N-terminalt og danner sammen med den andre histidinen et konservert katalytisk motiv kjent som histidin brace (Horn et al., 2012; Quinlan et al., 2011). Denne koordineringen av kopperatomet er essensielt for enzymkatalysen hos alle LMPO-er.

I sin inaktive form, Cu(II), er kobberatomet koordinert av tyrosin i aksialposisjon for familiene AA9, AA11 og AA13 (Figur 1.2.4). Dette er grunnet Cu(II) preferanse for koordinasjonstall mellom fire til seks, som ved hjelp av to vannmolekyler resulterer i en beskyttende oktaeder geometri (Karkehabadi et al., 2008; Kjaergaard et al., 2014; McEvoy et al., 2021). Hos AA10-familien er det fenylalanin eller alanin som befinner seg i aksialposisjonene og resulterer i en trigonal-bipyramidal geometri (Hemsworth et al., 2013). Når kobberatomet blir redusert til Cu(I) ved hjelp av en ekstern elektrondonor krever det minimalt med omrokking av atomene i det aktive setet. Cu(I) er ofte koordinert av tre ligander, som gir en sannsynlig endring av geometrien mot en mer planar histidin brace. Dette kan trolig forekomme ved at de to vannmolekylene og tyrosin flyttes for å gi plass til kosubstratet (Beeson et al., 2015; Kjaergaard et al., 2014).



Figur. 1.2.4 Strukturell sammenlikning av fire LPMO-er. A) Enzymnavn. B) Foreslått substratbindingsoverflate for LPMO-ene. Svarte aminosyrer ligger i horisontalaksen. Kobberatomet er oransje (sfære). Blått representerer koordinerende histidiner og mulige substratbindende aromater. C) Aktive seter til LPMO-ene, med den karakteristiske histidin bracen. Inkluderer alle aminosyrer innen 6 Å av kobberatomet. Hentet fra Forsberg et al. (2014a).

Elektrondonorer

Tilgangen på ekstracellulære elektron donorer er nødvendige for aktiveringen av den oksidative mekanismen til LPMO-er slik at de kan katalysere hydroksyleringen av polysakkarider (Kracher et al., 2016). Det finnes et mangfold av ulike reduksjonsmidler for LPMO-er deriblant; askorbinsyre (AscA), glutation (Vaaje-Kolstad et al., 2010), gallussyre (Quinlan et al., 2011), cystein, pyrogallol (Lo Leggio et al., 2015), lignin, resveratrol, katekin, koffeinsyre, sinapinsyre og hydrokinon (Westereng et al., 2015).

Det er også blitt vist at det FAD-avhengige enzymet cellobiosedehydrogenase (CDH) kan fungere som elektron donor for LPMO-er (Phillips et al., 2011). Courtade et al. (2016) viste ved bruk av kjernemagnetiskresonans (NMR) og isotermisk titreringskalorimetri (ITC) at CDH bindes direkte til det aktive setet på LPMO-en. Dette impliserer at kobberatomet reduseres til Cu(I) før substratbinding og det andre elektronet i katalysen lagres eller tilføres det aktive setet via en elektrontransportvei innad i LPMO-en. Dette resulterer i liten tunnel mellom proteinet og løsningsmiddelet som sterisk hindrer tilgangen på videre reduktant til det aktive setet hos *Sm*AA10A slik at kun små molekyler som H₂O, O₂ og H₂O₂ kan passere (Bissaro et al., 2018; Chylenski et al., 2019; Eijsink et al., 2019; Forsberg et al., 2019).

En annen mulighet for reduksjon er at CDH binder til en sideloop før elektronene overføres via et hydrogenbindingsnettverk eller konserverte aromatiske aminosyrer, men denne teorien har ikke blitt eksperimentelt verifisert (Li et al., 2012). Et nyere og spennende

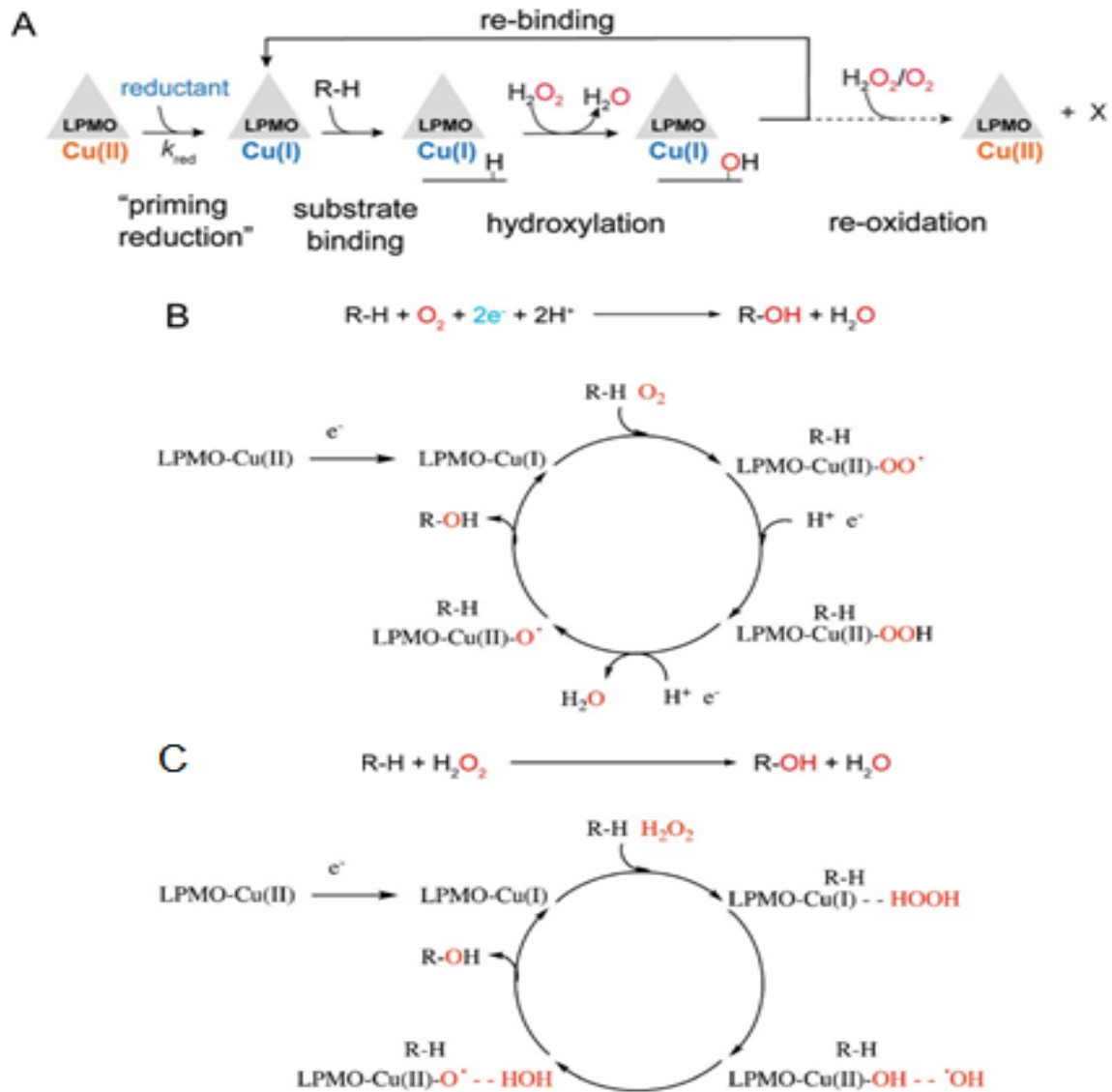
reduksjonsmiddel for LPMO-er en lysdrevet reaksjon med klorofyll. Resultatene fra Canella et al. (2016) viste til en 20-gangers økning i produksjonen av oligosakkarider og 100-gangers økning i aktivitet ved bruk av lys-indusert elektronoverføring. Det er også blitt vist at LPMO-er redusert ved lys-indusert elektronoverføring produserer og er avhengige av H₂O₂, men uavhengige av andre reduktanter for effektiv katalyse av krystallinske polysakkarider (Bissaro et al., 2020a). Disse resultatene viser at LPMO-er har tilgang til flere naturlige elektrondonorer hvor mekanismene må identifiseres og karakteriseres før de kan brukes til effektiv nedbrytning av lignin- og celluloseholdig biomasse.

Mulige reaksjonsmekanisme(r) og kosubstrat(er)

LPMO-er ble opprinnelig klassifiserte som monooksyngasser grunnet eksperimenter med CBP21, ¹⁸O₂ og reduktanten askorbinsyre som viste, ved MALDI-TOF massespektrometri, at ett isotopmerket oksygenatom ble inkludert i det oksiderte produktet, samt at fraværet av O₂ eller bruken av cyanid inhiberte enzymaktiviteten (Vaaje-Kolstad et al., 2010). Videre studier viste at LPMO-er er avhengige av et kobberion, en elektrondonor og O₂ som kosubstrat, for å utføre oksidativt bindingsbrudd av krystallinske polysakkarider (Horn et al., 2012). Det har derimot senere blitt vist både eksperimentelt og ved kvantemekaniske og molekylærmekaniske beregninger (QM/MM) at H₂O₂ er det foretrekkende kosubstratet til LPMO-er (Bissaro et al., 2016b; Bissaro et al., 2017; Bissaro et al., 2020a; Bissaro et al., 2020b).

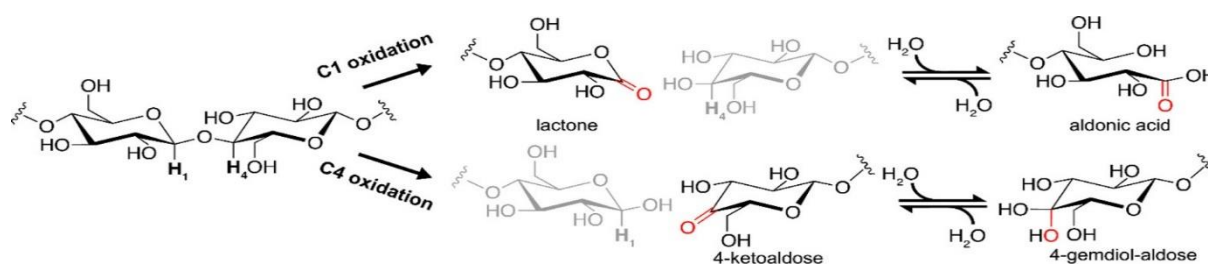
Grunnlaget for H₂O₂ som kosubstrat ble vist av Bissaro et al. (2016b; 2017) som viste stabil og hurtig reaksjonskinetikk ved kontrollert tilgang på H₂O₂, med opptil 26 ganger mer produktdannelse enn den O₂-drevede reaksjonen. Liknende resultater ble senere oppnådd i 2020 av en annen forskningsgruppe (Hedison et al.). Denne økningen i produktdannelse samsvarer med resultater fra Cannella et al. (2016) og kan tyde på at H₂O₂ utgjør en viktig rolle som kosubstrat for LPMO-er, deriblant i fotokatalytiske reaksjonssystemer med klorofyll. LPMO-en, *Tl*LPMO9E, katalyserte reaksjonene under anaerobe med resulterende substøkiometriske mengder askorbinsyre og oksiderte produkter. Dette tilsier at den H₂O₂-drevede katalysen kun krever ett elektron for aktivering av Cu(I) i opptil 20 katalytiske sykluser (Hedison et al., 2020). Eksperimenter med ¹⁸O i form av H₂¹⁸O₂, med et ti ganger molart overskudd av O₂ viste at oksygenatomet i de oksiderte produktene stammet fra H₂O₂. Dette har resultert i flere QM/MM-studier som diskuterer spesifikke mekanismer og tilhørende kobberoksid/-superoksid spesier (Figur 1.2.5). Mekanismene avsluttes med en

omleiringsreaksjon mellom den nydannede hydroksylgruppen og glykosidbindingen og resulterer i ulike produktdannelse (Figur 1.2.6) avhengig av LPMO-familien (Chylenski et al., 2019).



Figur 1.2.5. Grunnleggende og sammensatte representasjoner av mulige reaksjonsmekanismer for LPMO-katalyse av polysakkarider. A) Grunnleggende reaksjonsmekanisme for SmAA10A med kosubstratet H_2O_2 . Viser reduksjon av LPMO-en, binding av substrat, hydroksylering av substrat, gjentatte katalytiske sykluser og til slutt oksidering av LPMO-en tilbake til Cu(II). X betegner reaksjonsprodukter. B) Oppsummering av foreslåtte reaksjonsmekanismer for oksidasjon av substrat, ved hjelp av hydrogenabstraksjon med kosubstratet O_2 eller C) H_2O_2 . Inkluderer nettoreaksjon (over syklusen) for monooksygenase- og peroksygenasereaksjonen. Reaksjonene i B) krever tilførsel av et elektron og et proton under reaksjonssyklusen og er et mulig hastighetsbestemmende trinn grunnet usikkerheten omkring tilførselen av det andre elektronet. I C) er den begrensende reaksjonen muligens tilknyttet dannelsen av H_2O_2 eller superoksidet. Sammensatt og hentet fra Bissaro et al. og Chylenski et al. (2020b; 2019).

Kinetiske studier av Kusk et al. (2018a), Hangasky et al. (2018) og Frandsen et al. (2016) viste i likhet med tidligere eksperimenter at O_2 -drevne reaksjoner var ca. 1000 ganger mindre effektive (k_{cat}/K_m) enn for reaksjoner drevet av H_2O_2 . Videre ble det observert at ved lav substrat- eller høy H_2O_2 -konsentrasjon kunne LPMO-er reagere med H_2O_2 og oksidativt inaktiveres. (Bissaro et al., 2017; Loose et al., 2018; Müller et al., 2018). Det ble senere vist av Petrović et al. (2018) at metylering av den N-terminale histidinen beskytter LPMO-er mot auto-katalytisk oksidativ inaktivering. I en nylig publisert studie ble det oppdaget at LPMO-er i familien AA10 er katalytisk sensitive til svært små mengder (mikromolar) av Cu(II)-ioner i løsning med molart overskudd av reduktanten askorbinsyre, grunnet dannelsen av H_2O_2 når askorbinsyre reduserer fritt Cu(II) til Cu(I). Derimot viste gallussyre seg å være lite sensitiv for frie Cu(II)-ioner. Dette tyder på at reaksjonshastigheten under normale reaksjonsbetingelser er begrenset av den LPMO-uavhengige dannelsen av H_2O_2 ved oksidasjon av reduktanten (Stepnov et al., 2021). På bakgrunn av forskningen så langt kan H_2O_2 betraktes som det foretrekkende kosubstratet for LPMO-er, men den oksidative nedbrytningen av krystallinsk biomasse er fremdeles lite eksperimentelt verifisert, og er avhengig av mange faktorer som $[H_2O_2]$, $[O_2]$, [Reduktant], $[Cu]^{2+}$ med flere. Videre finnes det store individuelle variasjoner i reduksjonspotensialet for redoksparet, LPMO-Cu(II)/Cu(I), og oksidaseaktivitet varierer stort mellom ulike familier. Dermed er bedre forståelse av kinetikken mellom LPMO-er og reduktanter, bestemmelse av oksidasemekanismen og evnen til å produsere H_2O_2 fra O_2 sentrale aspekter som gjenstår å karakterisere før LPMO-er kan anvendes i fremtidige bioraffineringsprosesser. (Borisova et al., 2015; Forsberg et al., 2014a; Aachmann et al., 2012).



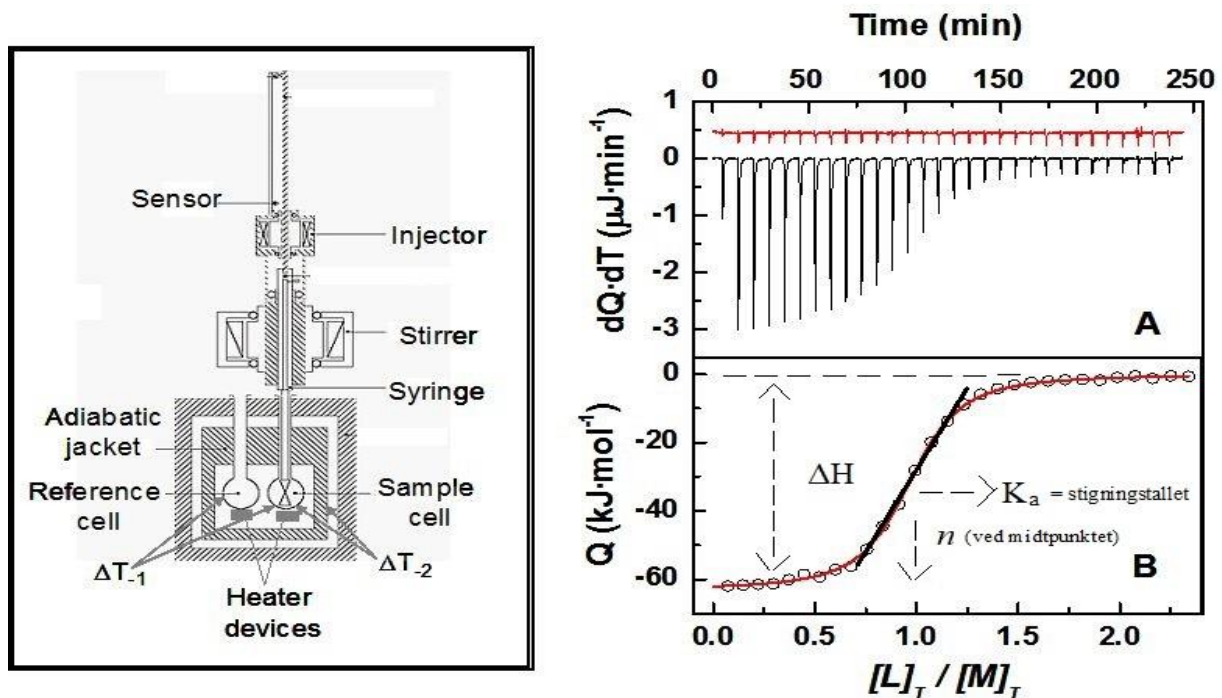
Figur 1.2.6 C1 og C4 selektive oksidasjonsprodukter fra LPMO-katalysert nedbrytning av cellulose. Produktene er lakton eller 4-ketoaldose, som henholdsvis er i likevekt med deres hydrerte former aldonsyre og 4-gemidol. Hentet fra Chylenski et al. (2019).

Som tidligere beskrevet gir den GH-katalytiske mekanisme mono- oligo-, og polysakkaridprodukter hvor den funksjonelle hydroksyl-/karbonylgruppen på C1 og hydroksylgruppen på C4 bevares. Den LPMO-katalyserte mekanismen derimot endrer disse funksjonelle gruppene grunnet den oksidative mekanismen. LPMO-er kan regioselektivt oksidere C1, C4 eller både C1 og C4 (Figur 1.2.6) (Forsberg et al., 2014a; Isaksen et al., 2014). C1 oksidasjonsprodukter dannes fra LPMO-type 1, C4_{oks}-produkter fra type 2, mens C1_{oks}- og C4_{oks}-produkter dannes fra type 3. For C1-aktive LPMO-er er likevekten forskjøvet mot høyre (aldonsyre) ved nøytral pH, mens for C4-aktive LPMO-er forblir likevekten uendret (Villares et al., 2017). Celluloseaktive LPMO-er viser både C1- og C4-aktivitet, mens for LPMO-er som er aktive på xylan, stivelse og kitin har kun C1-oksiderede produkter blitt oppdaget (Chylenski et al., 2019; Forsberg et al., 2019).

1.3 Isotermisk titreringskalorimetri

Isotermisk titreringskalorimetri (ITC) er en ikke-destruktiv metode som kan benyttes til å studere molekylære interaksjoner mellom stoffer og biomolekyler, for eksempel enzymbinding av substrat, ved å registrere varmeendringer. Metoden kan benyttes til nøyaktig og effektiv bestemmelse av bindingskonstanter (K_a), entalpi (ΔH°), entropi (ΔS°), spontanitet uttrykt ved Gibbs fri energi (ΔG°) og støkiometrien (n) til en reaksjon ved å måle reaksjonsvarmen.

Et ITC-instrument består av to identiske celler (Figur 1.3.1). Den ene er en prøvecelle, hvor reaksjonen foreligger, den andre en referansecelle fylt med vann eller buffer. Alle løsninger bør være avgasset for å unngå støy fra luftbobler. Begge cellene består av et høyledende termisk materiale omgitt av en adiabatisk kappe (varmeskjold) som holder temperaturen konstant i begge cellene for å hindre varmeoverføring mellom dem. Utenfor denne kappen ligger det et annet varmeskjold som isolerer cellene fra omgivelsestemperaturen. De fleste moderne ITC instrumenter opererer ved å registrere temperaturforskjellen mellom det to cellene, og mellom cellene og varmeskjoldene. Varmeskjoldene til cellene og veggene tilfører varme om nødvendig for å opprettholde konstant temperatur i systemet (Pierce et al., 1999).



Figur 1.3.1 Venstre: Skjematisk oversikt over hovedkomponentene i et ITC-instrument. Høyre: Resultater fra et protein-ligand-forsøk. Øvre del, A) viser et ITC-termogram for injeksjonen av ligand til protein (svart) i tillegg til fortynningen av ligand i buffer (rød). Nedre del, B) viser en bindingsisoterm hvor varmen (Q) plottes mot total ligandkonsentrasjon $[L]_T$ delt på den totale proteinkonsentrasjonen $[M]_T$. Videreutviklet fra arbeidet til Martinez et al. (2013).

I 2001 viste Todd og Gomez to ulike teknikker for bestemmelse av kinetiske konstanter ved bruk av ITC, hvor begge baserte seg på det at forholdet mellom reaksjonshastigheten og reaksjonsvarmen er proporsjonalt. Metode 1 går ut på at et enzym titreres med en økende mengde substrat under pseudo-første ordens reaksjonsbetingelser. Metode 2 derimot bruker kun en enkelt injeksjon av substrat og følger kontinuerlig med på endringen i reaksjonsvarmen mens substratmengden reduseres som et resultat av omdanningen til produkter. Metode 2 brukes ofte ved lav reaksjonsvarme eller ved store reaksjonshastigheter. Ved injeksjon av enzym eller ligand gjennom den roterende injektorsprøyten vil reaksjonshastigheten kunne bestemmes ved å måle endringen i den instrumentelle varmen tilført per tid (termisk kraft) til prøvecellen som et resultat av reaksjonsvarmen. Ved en varmegenererende reaksjon (eksoterm, $\Delta H < 0$) vil kalorimeteret måtte levere mindre termisk kraft for å opprettholde temperaturlikevekten, og dette resulterer i et negativt utslagssignal på termogrammet. For varmekrevende reaksjoner (endoterm, $\Delta H > 0$) må instrumentet levere mer termisk kraft for å opprettholde isothermen, og dette resulterer i et positivt signalutslag på termogrammet.

Bruken av ITC som metode for enzymanalyser er godt beskrevet av Todd og Gomez (2001). Videre følger en beskrivelse av likningene brukt som en del av denne oppgaven. Under pseudo-første ordens analyser drives termodynamiske reaksjoner dersom $\Delta G < 0$, uttrykket ved $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, hvor entalpiendringen observeres som varme. Dette betyr at ITC er en metode som kan bestemme reaksjonshastigheter for enzymkatalyserte reaksjoner av substrat. Den termiske kraften kan da måles som en funksjon av varmen (Q) og tid (dt) gitt ved likningen:

$$Kraft = \frac{dQ}{dt} \quad (1.3.1)$$

Videre er mengden varme for en reaksjon ved omgjøring av n mol substrat til produkt gitt ved:

$$Q = n * \Delta H_{app} = [P]_{tot} * V * \Delta H_{app} \quad (1.3.2)$$

hvor V er volumet av løsningen i prøvecellen, P er konsentrasjonen av produkt dannelsen i molar (M) og ΔH_{app} er den eksperimentelle molare entalpiendringen for reaksjonen. Dette gjør det mulig uttrykke den termiske kraften og reaksjonshastigheten (raten) for et enzym ved likningen:

$$Kraft = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} * V * \Delta H_{app} \quad (1.3.3)$$

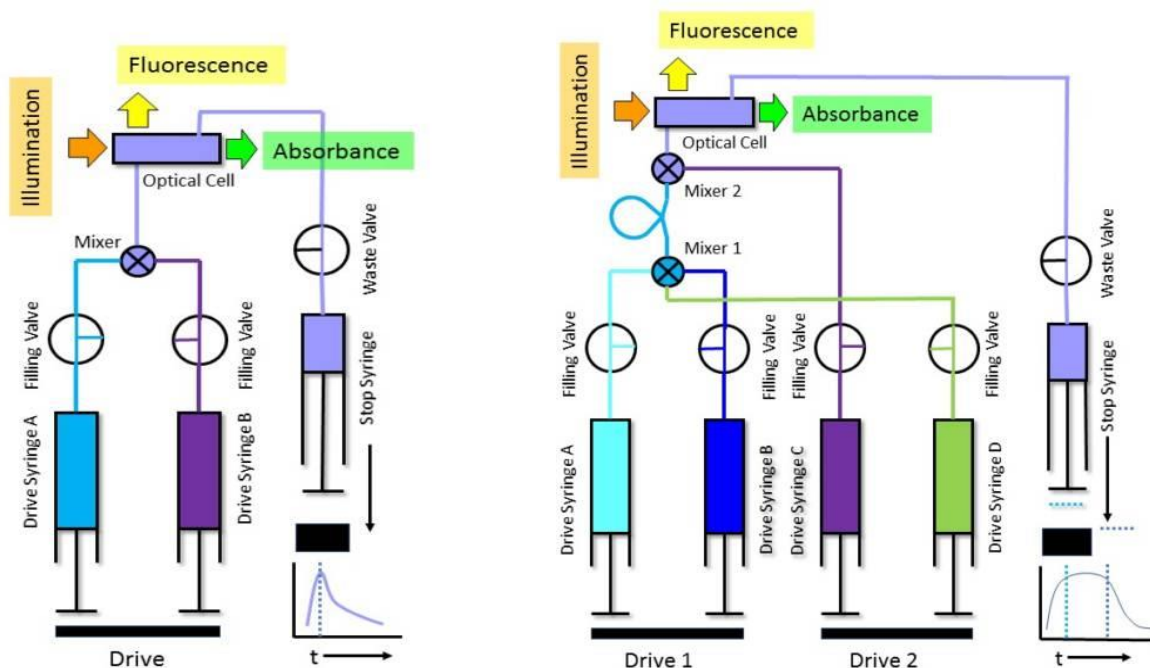
Som kan omformes til:

$$Raten = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V * \Delta H_{app}} * \frac{dQ}{dt} \quad (1.3.4)$$

ITC kan videre anvendes som en hurtigmetode for bestemmelse av kinetiske og termodynamiske parametere for enzymkatalyserte reaksjoner i blanke løsninger, og krever ikke dannelsen av UV/vis-absorberende stoffer som Amplex® Red eller coerulignon. De overnevnte stoffene er brukt i LPMO-analyser av henholdsvis Kittl et al. (2012) og Breslmayr et al. (2019). Det er også mulig å bestemme reaksjonsentalpien fra ett forsøk, i motsetning til en van't Hoff-analyse hvor flere forsøk ved ulike temperaturer må gjennomføres. En ulempe med metoden er dersom reaksjonen har en lav entalpiendring kan det være utfordrende å gjennomføre analyser.

1.4 Stopped-flow spektroskopi

Biokjemiske reaksjoner er ofte hurtige, med en reaksjonstid på mellom 50-100 ms. Dette krever hurtige analysemetoder som stopped-flow spektroskopi for å kunne gi robuste, selektive, sensitive og høyoppløselige data om enzymkinetikk. Et stopped-flow spektrofotometer (Figur 1.4.1) er et instrument som kan blande to til fire ulike reaktanter hurtig (<1 ms), med en dødtid på 1-2 ms. Dødtiden utgjør tiden mellom blanding inntreffer og første mulige observasjon registreres. Dermed er tiden som kreves for å blande reagensene fra to eller flere sprøyter ofte opphavet til dødtiden. Sprøytene styres av stempler som utfører blandingen med volumer på mellom 40-150 μL til en observasjonscelle hvor lyset fra lampen interagerer med blandingen og UV/vis-absorbans eller fluorescens (spenning) per tid registreres som en kurve (AppliedPhotophysics, 2018; Bagshaw, 2013; Gore, 2000). Den nye blandingen fortrenger den tidligere løsningen mot stop-sprøyten, som fylles inntil stempelen aktiverer en utløsningsbryter. Da stoppes blandingen av nye reagenser og datainnsamlingen startes (Lesk, 2016). I sekvensiell blandingsmodus vil stopped-flow-instrumentet blande to reagenser før det etter en angitt tid (millisekunder til flere sekunder senere) blandes med en tredje reagens og fyller observasjonscellen (AppliedPhotophysics, 2018; Bagshaw, 2013).



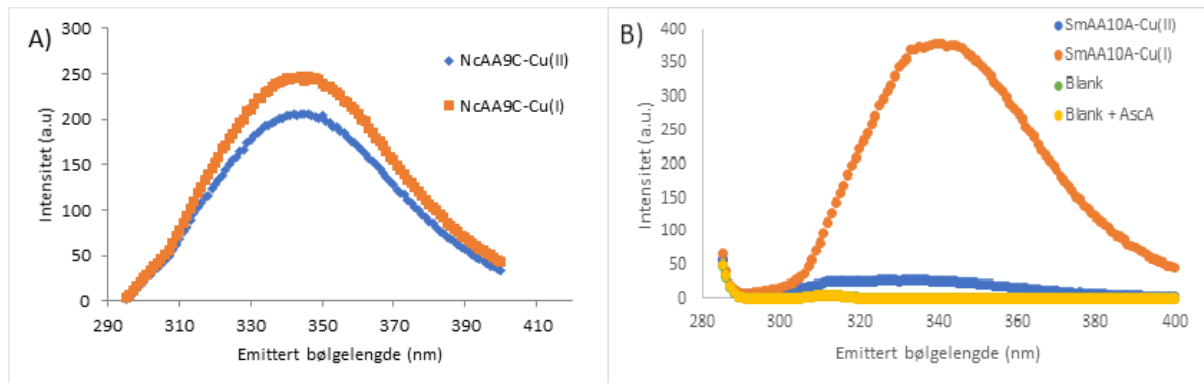
Figur 1.4.1. Skjematisk oversikt av et stopped-flow instrument i enkel- og dobbel blandingsmodus. Absorbans måles direkte gjennom observasjonscellen, mens fluorescens måles med 90° vinkel til lyskilden som ofte består av en Xe eller Xe/Hg lampe. Stopp-sprøyten forhindrer reaksjonen fra å fortsette kontinuerlig og resulterer i målinger av hurtige kinetiske reaksjoner i millisekundområdet. Hentet fra TgKScientific.

Under pseudo-førsteordens reaksjoner med en dødtid på 1 ms kan hastighetskonstanter bestemmes nøyaktig, med en k_{obs} verdi på mellom 10-1000 s^{-1} , gitt at metoden har et godt signal til støyforhold (Bagshaw, 2013). Ut fra kinetiske kurver kan parametere som hastighets- (Bissaro et al., 2020b), bindings-, effektivitets- og likevektskonstanter samt redokspotensialer beregnes (Ayuso-Fernández et al., 2019; Sørli et al., 2000). Dette gjør at et stopped-flow spektrofotometer kan anvendes som et hjelpemiddel i forskningen på LMPO-er sine reaksjonsmekanismer, elektronoverføring (Breslmayr et al., 2020), reaksjonsintermediater (Singh et al., 2020), fluorescens (Bissaro et al., 2016a), proteinstrukturer, bindingsinteraksjoner, proteinfolding med mer. Ved utførelse av gjentatte stopped-flow analyser kan effekten av parametere som temperatur, pH og reaktantkonsentrasjon på enzyms reaksjonskinetikk studeres (AppliedPhotophysics, 2018).

Stopped-flow analyser med fluorescensdetektor benytter seg av de fluorescerende egenskapene til et stoff. Fluorescens kan beskrives som det effektive tapet av eksitasjonsenergi ved emisjon av stråling, og oppstår normalt innen $10^{-8} - 10^{-6}$ s, som er hurtigere enn dødtiden til et moderne stopped-flow instrument (Lesk, 2016). Bølgelengden på den emitterte strålingen vil være lengre enn eksitasjonsbølgelengden ettersom deler av energien som kreves for å eksitere og øke molekylets kinetiske energi går tapt til omgivelsene i form av varme (Nahata, 2011). Denne forskyvningen av emisjonen fra absorpsjonen kan benyttes eksperimentelt til å filtrere bort lyset fra eksitasjonen, slik at fotomultiplikatoren kan registrere svakt fluorescerende lyssignaler og oppnå lave deteksjonsgrenser (Lesk, 2016).

Tidligere eksperimenter av Bissaro et al. (2016a; 2020b) har vist at endringer i fluorescens for *SmAA10A* (tidligere CPB21) og *ScAA10C* (Cels2) kan anvendes til å studere oksidasjonstilstanden til kobberatomet. De tidligere eksperimentene viste at en eksitasjon med bølgelengde 280 nm resulterte i en økt intensitet av fotomultiplikatorens fluorescensrespons for LMPO-Cu(I) i forhold til LPMO-Cu(II) ved hjelp av stopped-flow spektroskopi. Dette har senere vist seg å være tilfellet for *NcAA9C*, men forskjellen i intensitet er markant høyere hos *SmAA10A* (Figur 1.4.2). En emisjonstopp for LPMO-Cu(I) ble registrert rundt bølgelengden 340 nm med et monokromatisk filter ($\lambda > 320$ nm) for å utelukke interferens fra korte absorberende bølgelengder som ble brukt til eksitering av LPMO-en. Det ble antatt at endringen i fluorescens mellom LPMO-Cu(I) og LMPO-Cu(II) hos CBP21 (PDB ID: 2BEM) skyldes konformasjonsendringer i det aktive setet og i π -interaksjonene mellom fem ulike tryptofan residuer i den første- og andre sfæren (Trp178, Trp119, Trp108, Trp128 og Trp94) (Bissaro et al., 2020b). For *NcAA9C* (PDB ID: 4D7U) er det fremdeles usikkert hvilke

residuer som gir opphav til endringer i fluorescens, men mulige residuer kan være Trp62 og Trp131.



Figur. 1.4.2. Emisjonsspektre for den redoksavhengige fluorescerende egenskapen hos A) *NcAA9C* i redusert form (Cu(I), oransje), oksidert form (Cu(II), blå). B) *SmAA10A* i redusert form (Cu(I), oransje), oksidert form (Cu(II), blå), blankprøve (grønn) og blankprøve med reduktanten askorbinsyre (gul). Figurene er fremstillinger av upublisert data fra arbeidet til Dr. Ivan Ayuso-Fernandez (A) og stipendiat Ole Golten (A og B).

Fluorescensanalysene ble utført på et Varian Cary Eclipse fluorescens spektrofotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

1.5 Oppgavens formål

Per i dag er det mange publikasjoner om LPMO-er og deres anvendelsesmuligheter i fornybare bioraffineringsprosesser. Derimot er det få detaljerte kinetiske studier om LPMO-er sine reaksjonsmekanismer, og det å kjøre eksperimentelle kinetiske studier har vist seg å være utfordrende (Chylenski et al., 2019; Eijsink et al., 2019; Forsberg et al., 2019). Derfor er det et reelt behov for flere kinetiske metoder som kan gi innsikt i den molekylære mekanismen til LPMO-er. Videre krever disse metodene som ikke bare studerer den helhetlige nedbrytningen av karbohydrater, men også individuelle trinn i mekanismene som kan verifiseres med videre kvantemekaniske og molekylærmekaniske beregningsstudier.

Dette er hvor denne mastergradsoppgaven inntreffer som en del av den pågående forskningen på LPMO-er. Oppgaven er underlagt PEP-gruppen (Protein Engineering and Proteomics Group) ved NMBU hvor det blant annet jobbes med å finne fluorescerende proteiner samt etablere stopped-flow analysemetodikk til å kunne utføre eksperimenter for sammenlikning av reduksjon, re-oksidasjon, oksidase-, peroksidase-, monooksygenase- og peroksygenaseaktivitet innad og mellom LPMO-familiene AA9, AA10 og AA11 (Sørli, 2021).

I 2020b ble det publisert en studie av Bissaro et al. hvor det ble brukt stopped-flow spektroskopi for å bestemme kinetiske hastighetskonstanter for reduksjonen og re-oksidasjonen av *SmAA10A* med henholdsvis L-askorbinsyre og hydrogenperoksid. Askorbinsyre er bare en av et mangfold reduktanter (se del 1.2.2) som er blitt brukt innen forskning på LPMO-er. Derfor tok vi utgangspunkt i metodene beskrevet av Bissaro et al. og reproduserte de opprinnelige resultatene for reduksjonen av *SmAA10A* med L-askorbinsyre. Metoden ble senere gjennomført med andre LPMO-reduktanter som gallussyre og L-cystein for å øke dens anvendelsesverdi. Det forelå også et mål om å teste påvirkninger av miljøendringer, og reduksjonen ble derfor testet ved både pH 7.0 og 8.0 for å studere om reduksjonshastigheten kunne relateres til pH. Metoden ble også forsøkt utført med *NcAA9C* katalytisk domene for å studere forskjeller i reduksjonshastigheten mellom LPMO-familier, men resultater herfra ble ikke inkludert i oppgaven grunnet at proteinet var farget brunt, som ikke er en normal farge for LPMO-løsninger.

Videre ble metoden for re-oksidasjonen av *SmAA10A* videreutviklet med mål om å simplificere analysen ved å fjerne det eksterne aktiveringstrinnet, slik at både reduksjonen og re-oksidasjonen av proteinet kunne gjennomføres på stopped-flow spektrofotometeret. Grunnlaget for å eliminere den eksterne reduksjonen av *SmAA10A* med askorbinsyre er at

dette trinnet er en tidkrevende prosess som også medbringer usikkerhet dersom ikke all reduktant fjernes, eller hvis systemet ikke forblir fullstendig oksygenfritt. Dette ble oppnådd ved å optimalisere spektrofotometeret mot et forsøk i dobbel blandingsmodus etter installasjon av en forsinkelseslinje. Det ble senere utført både innledende og optimaliserte re-oksidasjonsforsøk med reduktantene L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein.

I tillegg til stopped-flow analysene ble det utført innledende isotermisk titreringskalorimetriske analyser av fritt CuSO_4 og *LsAA9A* for å måle termodynamiske og kinetiske parametere for oksidaseaktiviteten. De overnevnte analysemetodene skulle da danne et grunnlag for videreutviklingen av robuste kinetiske forskningsmetoder for karakterisering av ulike trinn i den molekylære reaksjonsmekanismen til LPMO-er.

Nedenfor følger videre mål for egen utvikling som ble utarbeidet med utgangspunkt i læringsutbyttebeskrivelsen for mastergradsemnet, M30-KJEMI (NMBU):

Kunnskapsmål:

- Kunne selvstendig gjennomføre et forskningsarbeid basert på en vitenskapelig problemstilling.
- Ha avansert og anvendt kunnskap om LPMO-ers; struktur, reaksjonsmekanismer, kinetikk og termodynamikk, samt kunnskap om metoder som stopped-flow spektroskopi og isotermisk titreringskalorimetri.

Ferdighetsmål:

- Kunne benytte relevant forskningslitteratur og metoder samt trekke konklusjoner basert på egne forskningsresultater.

Generell (grunnleggende) kompetanse:

- Kunne formidle kunnskap fra et selvstendig forskningsprosjekt både skriftlig og muntlig.
- Kunne lese, forstå og anvende forskningslitteratur på en hensiktsmessig måte som imøtekommer forskningsetiske retningslinjer.
- Kunne skrive en faglig sammenhengene monografi for avhandlingen.

2. Materialer

Tabell 2.1. Labororientstyr

Labororientstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Autoklavteip	12 mm	VWR
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Anaerobt kammer	A95 TG anaerobic workstation	Whitley
Blåkorkflasker	1000 mL 500 mL 250 mL 100 mL	VWR
MaxyClear Snaplock Microsentrifugerør	2 mL -Axygen® 1,5 mL -Axygen®	VWR
Fryser (-20 °C)		Bosch Whirlpool
Glassutstyr		Scott-Duran VWR
Ismaskin	KF145	PORKKA
Isotermisk titreringskalorimeter	VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal
Kjøleskap (4 °C)		Whirlpool
Kulturflasker	Nalgene 2000 mL	Thermo Scientific
Kyvette	µ-Kyvette G1.0	Eppendorf
Magnetrorer	fisherbrand	Thermo Fisher Scientific
Mikrovekt	Sartorius CP-2P	VWR
Parafilm ® M	Laboratory Film	BEMIS
Pasteur pipetter	Plast, 5 mL Plast, 3 mL Plast, 1 mL	VWR
pH-meter	FiveEasy Plus	Mettler Toledo
Pipettespisser	Next Generation Tip Refill	VWR
Pipetter	0,5-5 mL 100-1000 µL 20-200 µL	VWR
Plastsprøyter	30 mL 20 mL 10 mL 5 mL 2 mL	BD Plastipak HENKE SASS WOLF BD Emerald
Sentrifugerør	Cellstar® Tubes 50 mL Cellstar® Tubes 15 mL	Greiner Bio-One
Spekterfotometer	D30 Biphotometer Cary 60 UV-vis	Eppendorf Agilent Technologies
Steritop® Filter	0,22 µm PES Membran	Millipore Express® PLUS
Stopped-flow spektrifotometer	SMF4000	BioLogic Scientific Instruments

Tabell 2.2. Programvare

Programvare	Bruksområde	Leverandør
Bio-Kine32	Stopped-flow analyser	BioLogic
Microsoft Excel	Databehandling	Microsoft
MicroCal VP Viewer Origin 7	ITC analyser	OriginLab
Sigma Plot	Databehandling	Systat Software Inc.
Simple Reads	[H ₂ O ₂] bestemmelse	Cary WinUV

Tabell 2.3. Kjemikalier

Kjemikalie	Formel	Leverandør
Amplex® Red	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄	Thermofisher Scientific
Bis-Tris	C ₈ H ₁₉ NO ₅	VWR
Destillert vann (Milli-Q®)	dH ₂ O	Millipore
Dimetylsulfoksyd	C ₂ H ₆ OS	Merck KGaA
Gallussyre monohydrat	C ₇ H ₆ O ₅	Sigma-Aldrich
Horseradish Peroxidase (HRP)		Sigma-Aldrich
Hydrogenklorid 37%	HCl	Sigma-Aldrich
Hydrogenperoksid 30%	H ₂ O ₂	Merck KgGaA
Kobbersulfat	CuSO ₄	Sigma-Aldrich
L-Askorbinsyre	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma-Aldrich Merck KGaA
L-Cystein hydroklorid monohydrat	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Sigma-Aldrich
Metanol	HCOH	VWR
Natriumhydroksid	NaOH	VWR
Vann: TraceSELECT Milli®-Q	H ₂ O	Honeywell Millipore
Tris hydroklorid	C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl	AMRESCO

3. Metoder

3.1 Proteinproduksjon av *SmAA10A* og *NcAA9C* katalytisk domene

SmAA10A ble produsert, rensset, oppkonsentrert og mettet med kobbersulfat av Dr. Ivan Ayuso-Fernandez etter beskrivelsen av Vaaje-Kolstad et al. (2005), for bruk i stopped-flow analyser. Proteinløsningen ble før analyser filtrert for overflødig kobber og oppkonsentrert igjen for å unngå produksjon av små mengder H₂O₂ grunnet fritt Cu(II) (se del 1.2.2).

NcAA9C katalytisk domene ble produsert, rensset, oppkonsentrert, mettet med kobbersulfat og overflødig kobber ble filtrert bort av Dr. Ivan Ayuso-Fernandez etter beskrivelsen av Rieder et al. (2021).

3.2 Bestemmelse av proteinkonsentrasjoner

Materialer:

- Isolert protein (*SmAA10A*)
- Blankprøve av buffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.0)
- Kyvette (µ-Kyvette G1.0, Eppendorf, Hamburg, Tyskland)
- D30 Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Tyskland)

Metode:

Proteinkonsentrasjonen av *SmAA10A* kan måles ved bruk av et D30 Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Tyskland), som måler absorbansen av de aromatiske aminosyrene fenyylalanin, tyrosin og tryptofan ved absorpsjonsmaksimum på henholdsvis 257 nm, 274 nm og 280 nm. Konsentrasjonen kan deretter bestemmes ved hjelp av Beer-Lamberts lov (Lesk, 2016).

$$A = \epsilon cl \quad (3.1.1)$$

, hvor A er absorbansen målt ved 280 nm, c er den molare konsentrasjonen, ϵ er den molare ekstinksjonskoeffisienten og l er lengden på absorpsjonscellen (kyvetten). For *SmAA10A* og *NcAA9C* er de teoretiske molare ekstinksjonskoeffisientene henholdsvis 35200 M⁻¹ cm⁻¹ (Kuusk et al., 2018b) og 32680 M⁻¹ cm⁻¹ (beregnet med ExPASy, PrtoParam). Lengden på kolonnen var 1 cm og det ble først analysert en blankprøve av buffer (2.5 µL) før analyse av proteinkonsentrasjonen ved 1/50 fortytning, for å sikre at målingen var innenfor det lineære målområdet hvor spektrofotometeret er mest nøyaktig.

3.3 Stopped-flow eksperimenter

3.3.1 Stopped-flow reduksjon av *SmAA10A/NcAA9C* katalytisk domene

Materialer:

- 10 μM *SmAA10A/NcAA9C* katalytisk domene
- 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0)
- 40 mM Tris hydroklorid (pH 8.0)
- L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein (10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2500 μM)
- TraceSelect Vann
- 50 mL Falcon sentrifugerør
- Plastsprøyter (5 mL, 10 mL, 20 mL)
- Parafilm ® M
- Whitley A95 TG anaerobic workstation
- SFM4000 stopped-flow spectrophotometer (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France)

Metode:

Stopped-flow analysene er basert på reduksjon- og re-oksidasjonsmetodene beskrevet av Bissaro et al. (2020b). Endringer i fluorescens ble målt ved hjelp av et SFM4000 stopped-flow spektrofotometer (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France) i enkel blandingsmodus mellom *SmAA10A/NcAA9C* katalytisk domene og en reduktant (L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein) med en eksitasjonsbølglengde (λ) på 282/280 nm. Fotomultiplikatoren tilførte automatisk en spenning på 200-750V for å regulere signalet mellom kvantifiseringsgrensen og signalmetning. Detektoren filtrerte bort bølglengder mindre enn 320 nm, for kun å detektere emittert fluorescens. Alle løsninger ble lagret i et anaerobt kammer (Whitley A95 TG anaerobic workstation) i 16 timer og/eller gjennomstrømt i 10 min med $\text{N}_2(\text{g})$ før tillaging av anaerobe analyseløsninger for å forhindre re-oksidasjon av proteinet, ettersom dette kunne resultere i lavere hastighetskonstanter.

Til prøveinnlasting på stopped-flow spektrofotometeret ble det brukt plastsprøyter forsegle i det anaerobe kammeret med Parafilm®M. Oksygenfri buffer ble brukt i prepareringen av de ulike reduktantkonsentrasjonene. For L-askorbinsyre ble det brukt Trace-select vann for å forhindre dannelsen av H_2O_2 med bakgrunn i en nylig publikasjon av Stepnov et al. (2021). Ferdiglaget oksygenfritt protein (10 μM i 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) ble så blandet hurtig (<

10 ms) med likt volum av oksygenfri reduktant (AscA/GaA/L-cys) i varierende konsentrasjoner (sluttkonsentrasjon 5-1250 μM), ved 25 °C, og endringer i fluorescens ble målt. En blanding av buffer (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - pH 7.0 eller 40 mM Tris hydroklorid - pH 8.0) og protein ble analysert som løsningsblank. Blankprøvesignalet ble subtrahert fra resultatene. Se vedlegg 1 for programinnstillinger brukt til enkel blandingsmodus analyser.

3.3.2 Stopped-flow re-oksidasjon av *SmAA10A* med H_2O_2

Materialer:

- 10 μM *SmAA10A*
- 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0)
- L-askorbinsyre (15 μM) / gallussyre (20 μM) / L-cystein (20 μM)
- 10 μM L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein
- H_2O_2 (2 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1600 μM , 3200 μM)
- TraceSelect vann
- 50 mL Falcon sentrifugerør
- Plastsprøyter (5 mL, 10 mL, 20 mL)
- Parafilm®M
- Whitley A95 TG anaerobic workstation
- Cary 60 UV-vis (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- SFM4000 stopped-flow spectrophotometer (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France)

Metode:

Endringer i fluorescens ved re-oksidasjon ble målt ved hjelp av et SFM4000 stopped-flow spektrofotometer (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France) i dobbel blandingsmodus, hvor *SmAA10A* først ble redusert med reduktanten (L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein) i en forsinkelseslinje (100 μL) før videre blanding med H_2O_2 (sluttkonsentrasjon 1 – 1600 μM). Til eksitasjon av *SmAA10A* ble det brukt en bølgelengde (λ) på 282 nm, og detektoren filtrerte bort bølgelengder mindre enn 320 nm, for å kun detektere emittert fluorescens. Fotomultiplikatoren tilførte automatisk en spenning på 200-750V for å regulere signalet mellom kvantifiseringsgrensen og signalmetning. Alle

løsninger ble lagret i et anaerobt kammer (Whitley A95 TG anaerobic workstation) i 16 timer og/eller gjennomstrømt i 15 min med $N_2(g)$ før tillaging av anaerobe analyseløsninger for å hindre O_2 -drevet re-oksidasjon av proteinet, siden dette kunne påvirke hastighetskonstantene.

Til prøveinnlastning på stopped-flow spektrofotometeret ble plastsprøytene forseglet med parafilm i det anaerobe kammeret. Oksygenfri buffer ble brukt i prepareringen av de ulike konsentrasjonene av reduktant og H_2O_2 . Konsentrasjonen av H_2O_2 -stamløsningen ble eksperimentelt bestemt med et Cary 60 UV-vis spektrofotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) og en molar ekstinksjonskoeffesient på $39.8 M^{-1} s^{-1}$, før videre fortykning til ønskede konsentrasjoner. For analyser med askorbinsyre ble det brukt Trace-select vann for å forhindre dannelsen av H_2O_2 Stepnov et al. (2021). Ferdiglaget (oksygenfritt) protein ($10 \mu M$ i $0,1 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$) ble blandet hurtig ($< 10 ms$) i forsinkelseslinjen og kyvetten med likt volum av oksygenfri reduktant (AscA/GaA/L-cys) ved $25 ^\circ C$. Endringer i fluorescens ble målt i 5-50 s inntil spenningen stabiliserte seg før videre blanding mellom redusert protein (i forsinkelseslinjen) og H_2O_2 resulterte i re-oksidasjon av LPMO-en målt i kyvetten. En blanding av buffer ($0,1 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 - pH 7.0$) og protein ble analysert som løsningsblank. Før injeksjon av analyseløsninger ble stopped-flow spektrofotometeret vasket med store mengder anaerob buffer ($0,1 M, pH 7.0$) for å gjøre instrumentet oksygenfritt. Se vedlegg 2 og 3 for programinnstillingene brukt til dobbel blandingsmodusanalyser.

Videre optimalisering av metoden ble gjennomført med utgangspunkt i det grunnleggende analyseoppsettet beskrevet ovenfor, hvor følgende endringer ble foretatt:

Reduksjonstiden og programinnstillingene (vedlegg 4) ble tilpasset reduksjonen av *SmAA10A* med 1 molar ekvivalent av reduktant ($10 \mu M$ L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein).

Nødvendige injeksjonsvolumer ble beregnet ved hjelp av vedlegg 5. Optimaliseringsprosessen innebar å endre innstillingene for datainnsamling til de siste 500 ms før injeksjon av H_2O_2 slik at datapunktene kun ble fordelt utover re-oksidasjonsreaksjonen. Programmet ble videre tilført et vasketrinn med anaerob $0,1 M NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 (pH 7.0)$ på 300 ms etter at datainnsamlingen opphørte. I alle de optimaliserte analysene ble TraceSelect vann benyttet for å unngå uønskede sidereaksjoner mellom reduktant, hydrogenperoksid, *SmAA10A* eller fritt kobber som beskrevet av Stepnov et al. (2021).

3.4 Bearbeiding av stopped-flow data

Stopped-flow resultatene i denne oppgaven er bearbeidet ut fra målte hastighetskonstanter (k_{obs}). Pseudo-førsteordens konstanter, k_{obs} , ble bestemt ut fra følgende likning ved hjelp av programvaren Bio-Kine32 (BioLogic Science Instruments, Grenoble, France):

$$Y = at + b + \sum_{i=1}^N c_i e^{-k_i t} \quad (3.4.1)$$

Plot av k_{obs} mot substratkonsentrasjonen (reduktant eller H_2O_2) ble tilpasset en lineær eller hyperbolsk modell av enkelttekspontenkarakter. For de kinetiske verdiene som kunne tilpasses en lineær modell ble andreordens hastighetskonstanter, k_{app} , beregnet. Plottene av k_{obs} mot reduktantkonsentrasjonen som kunne tilpasses en Michaelis-Menten modell resulterte i førsteordens bindings- (K_{D1}) og hastighetskonstanter (k_1) for LPMO-reduktant-komplekset. Gjennomsnitt og standardavvik for de målte hastighetskonstantene ved ulike substratkonsentrasjon ble analysert i Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) før lineære og hyperbolske plot ble laget i SigmaPlot (Sysat Software Inc., San Jose, USA). Første- og andreordenskonstanter med tilhørende standardavvik nevnt ovenfor ble så beregnet ut fra plottene generert i SigmaPlot. Figurer som fremstiller resultater i form av normalisert fluorescens er beregnet ved likning 3.4.2. hentet fra Bissaro et al. (2020b).

$$1 - \frac{\Delta F}{\Delta F_{\text{maks}}} = 1 - \frac{F_{\text{maks}} - F(t)}{F_{\text{maks}} - F_0} \quad (3.4.2)$$

, hvor F_{maks} og F_0 er henholdsvis det fluorescerende signalet fra fullstendig redusert og ikke-reduert LPMO.

3.5 Isotermisk titreringskalorimetriske analyser av oksidaseaktiviteten til kobbersulfat og *LsAA9A*

Materialer:

- Kobbersulfat (0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM)
- 5 μM *LsAA9A*
- 2,8 mM L-askorbinsyre
- 500 mM Bis-Tris (pH 6.5)
- 10 mM Amplex® Red
- 0,4 mg/mL HRP
- 0,1 M Natriumhydroksid
- Plastsprøyter 2 mL
- VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, Northampton, USA)
- Microcal VP Viewer (OriginLab, Northampton, USA)

Metoder:

Alle målinger ble utført med 50 mM Bis-Tris buffer, pH 6.5 ved 30 °C, med en blandingshastighet på 260 o/min og et reaksjonscellevolum på 1.4214 mL. L-askorbinsyre (2.8 mM) ble plassert i den roterende sprøyten, og tre injeksjoner på 10, 5 og 10 μL ble injisert i reaksjonscellen. Cellen inneholdt CuSO_4 (0.01-1 μM), 0.0025 mg/mL HRP og 100 μM Amplex® Red. Referansecellen inneholdt vann (Milli-Q®). Etter oppnåelse av initiell- og omrøringslikevekt for de kalorimetriske cellene til 30 °C ble grunnlinjen målt i 60 s før L-askorbinsyre ble injisert i tre injeksjoner til en sluttkonsentrasjon på 50 μM . Data brukt til videre beregninger ble målt fra basislinjen til varmeutslagsminimum for bestemmelse av dQ/dt . Integralet av hele varmeutslaget ga Q. For analysen med 0.05 μM *LsAA9A* ble CuSO_4 erstattet av enzymet mens alle andre reagenser i cellen forble uendret. Sluttkonsentrasjonen av tilsatt askorbinsyre var 90 μM etter tre injeksjoner på 10, 5 og 30 μL . Mellom ulike konsentrasjoner av CuSO_4 ble prøvecellen vasket tre ganger med Milli®-Q-vann. Før analyseoppstart ble cellen vasket en gang med 0.1 M natriumhydroksid, tre ganger med Milli®-Q-vann og fire ganger med 50 mM Bis-Tris buffer (pH 6.5) for å fjerne uønskede stoffer og fritt kobber fra reaksjonscellen.

4. Resultater

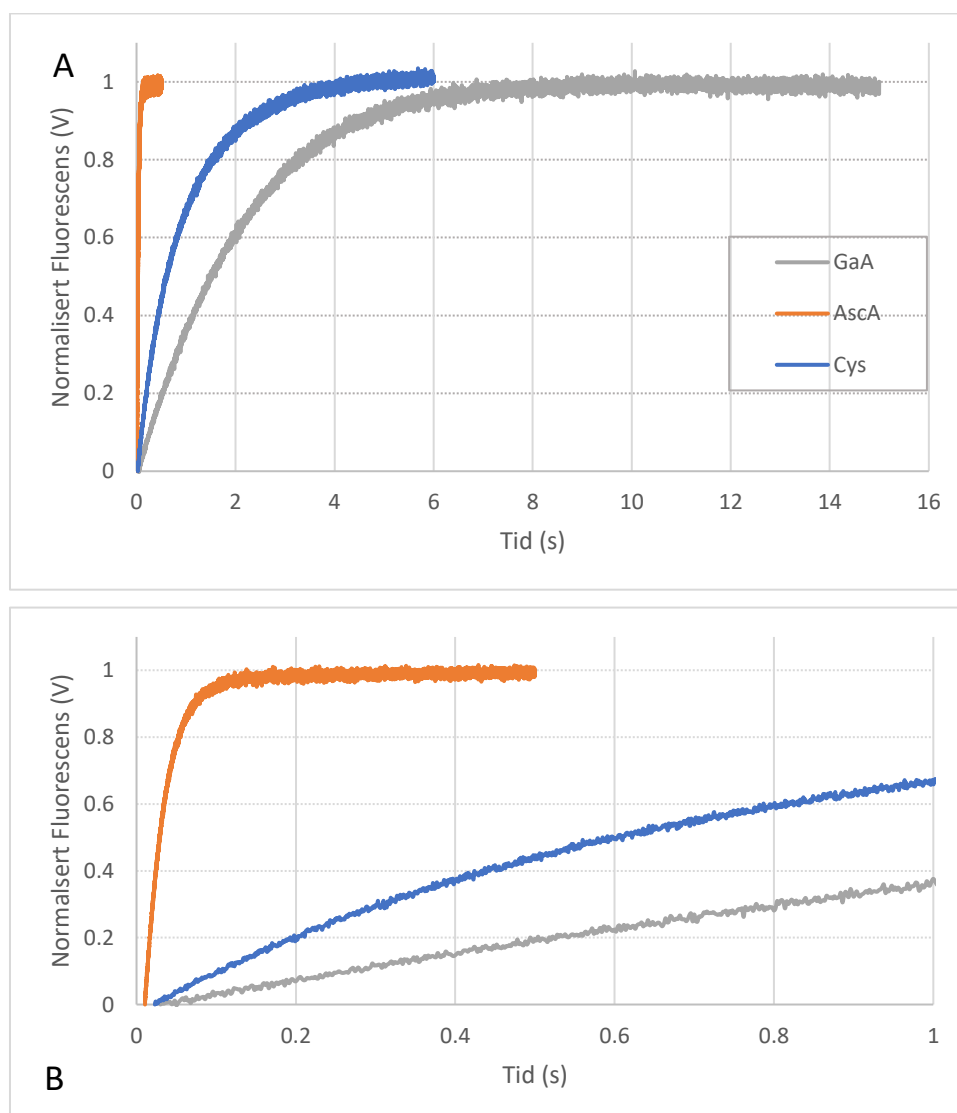
4.1 Stopped-flow reduksjon av *SmAA10A*

For å få innsikt i om reduksjonen av LMPO-er fra den inaktive LMPO-Cu(II) formen til den aktive LMPO-Cu(I) formen med ulike reduktanter kunne være det begrensende trinnet i LMPO-katalysen fortsatte vi arbeidet til Bissaro et al. (2020b). Metoden skulle også benyttes til å studere hastigheten og mengden reduktant nødvendig for å oppnå fullstendig reduksjon av *SmAA10A*. Etter blanding av *SmAA10A*-Cu(II) og en molar ekvivalent reduktant (L-askorbinsyre/gallussyre/L-cystein) under anaerobe forhold ble det analysert prøver med høyere konsentrasjoner av reduktant for å oppnå pseudo-førsteordens betingelser (> 10 molar ekvivalenter). For alle tre reduktantene ble endringen i total fluorescens uendret, og fullstendig reduksjon ble oppnådd med kun 1 molar ekvivalent. En pseudo-førsteordens reaksjonshastighet for reduksjonen av *SmAA10A* med L-askorbinsyre og gallussyre viste seg å øke lineært med konsentrasjonen av reduktantene (Figur 4.1.2-4.1.3), mens for L-cystein økte hastigheten i samsvar med en hyperbolsk Michaelis-Menten kurve (Figur 4.1.4) som ga en førsteordens hastighetskonstant, k_1 , samt en bindingskonstant, K_{D1} . Forskjellen i tid for fullstendig reduksjon av de tre reduktantene er illustrert i figur 4.1.1 og gjenspeiler de ulike reaksjonshastighetene. De resulterende andreordens hastighetskonstantene oppgitt i Tabell 4.1.1 indikerer i likhet med Bissaro et al. (2020b) at reduksjonen av *SmAA10A* ikke er det hastighetsbestemmende trinnet i den molekylære mekanismen grunnet høye verdier (10^3 - 10^5 $M^{-1} s^{-1}$).

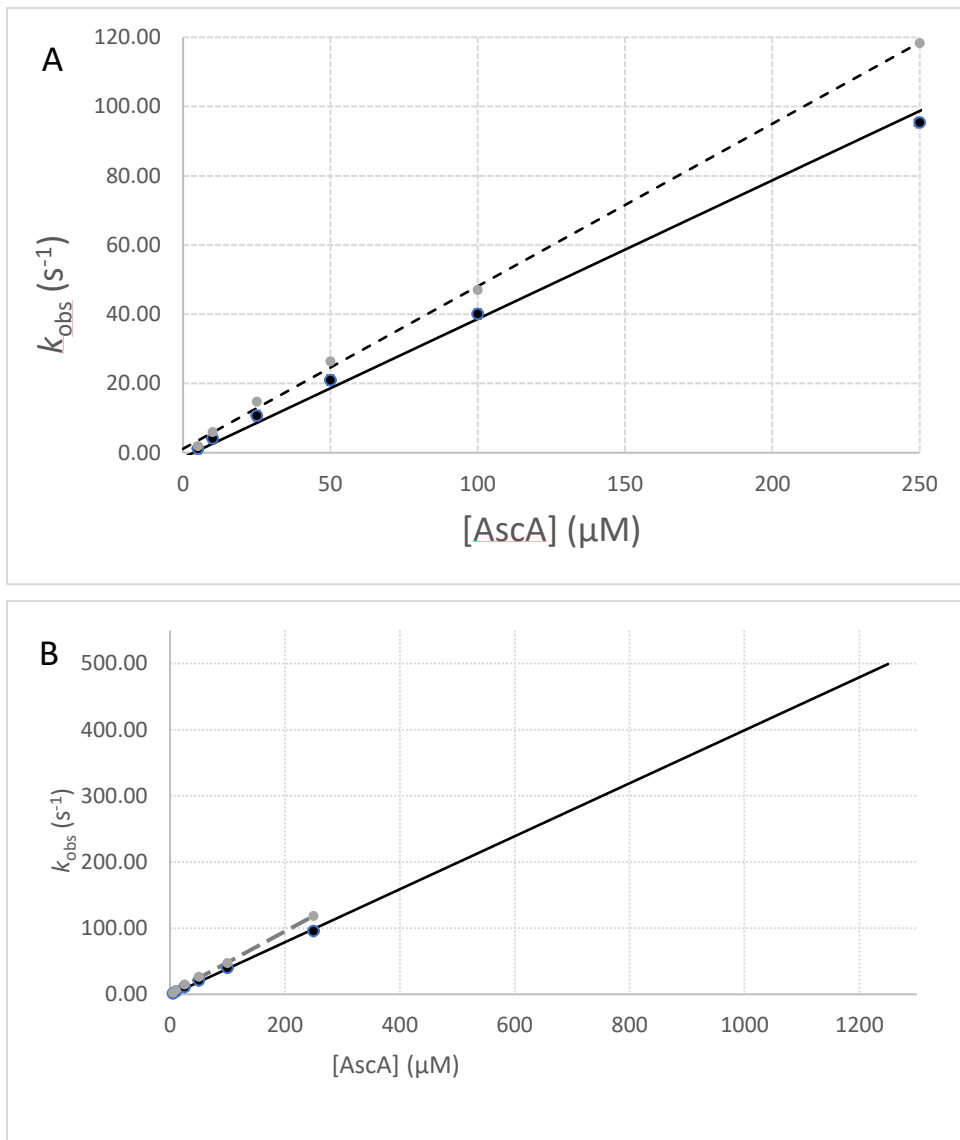
Eksperimentet ble gjentatt ved bruk av 40 mM Tris hydroklorid (pH 8) som buffer for å studere effekten av pH på reduksjonshastigheten. Dette resulterte i høyere førsteordens reaksjonshastigheter for alle reduktantene (Tabell 4.1.1). En konsekvens av dette var at reduksjonen med askorbinsyre bare kunne analyseres opptil 250 μM ved pH 8, da startpunktet for reaksjonen ble raskere enn dødtiden til instrumentet (1 ms). Figur 4.1.2-4.1.4 viser hele linjer og sorte punkter til målinger ved pH 7. Stiplede linjer og grå punkter representerer målinger ved pH 8. Alle resultatene inkluderer standardavvik og et minimum av tre tekniske replikater, mens L-askorbinsyre også har en biologisk replikat fra arbeidet av Bissaro et al. (2020b).

Tabell 4.1.1. Kinetiske hastighetskonstanter av andre orden (k_{1app}) for L-Askorbinsyre, gallussyre og L-Cystein, samt førsteordens hastighetskonstanter (k_1) og bindingskonstanter (K_{D1}) for L-cystein. n = 3.

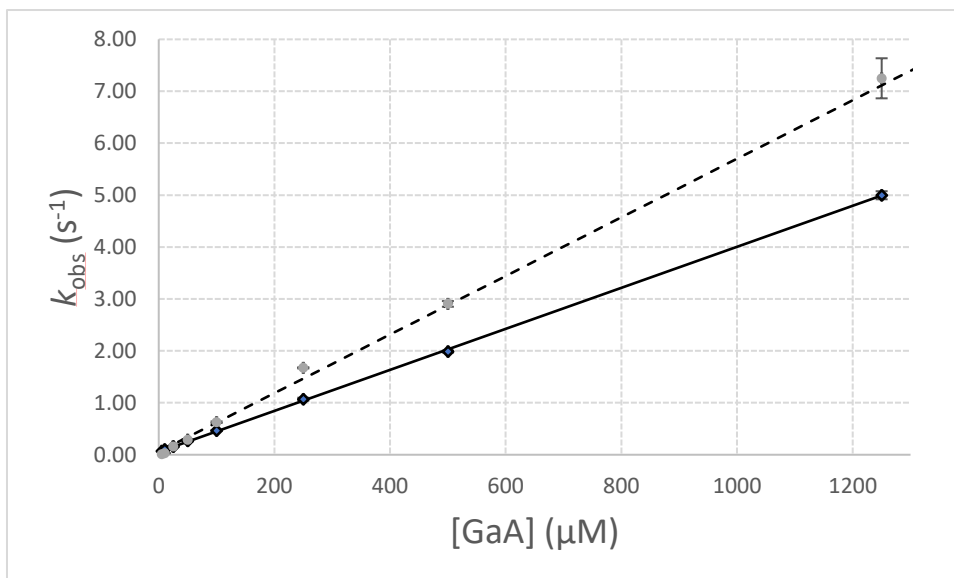
Reduktant		pH 7	pH 8
L-Askorbinsyre	k_1 (s^{-1})	-	-
	K_{D1} (μM)	-	-
	k_{1app} ($M^{-1} s^{-1}$)	$(4.0 \pm 0.42) \cdot 10^5$	$(4.6 \pm 0.69) \cdot 10^5$
Gallussyre	k_1 (s^{-1})	-	-
	K_{D1} (μM)	-	-
	k_{1app} ($M^{-1} s^{-1}$)	$(4.0 \pm 0.00) \cdot 10^3$	$(5.6 \pm 0.00) \cdot 10^3$
L-Cystein	k_1 (s^{-1})	4.1 ± 0.13	4.4 ± 0.22
	K_{D1} (μM)	108 ± 11.3	130 ± 20.5
	k_{1app} ($M^{-1} s^{-1}$)	$(3.8 \pm 0.39) \cdot 10^4$	$(3.2 \pm 0.55) \cdot 10^4$



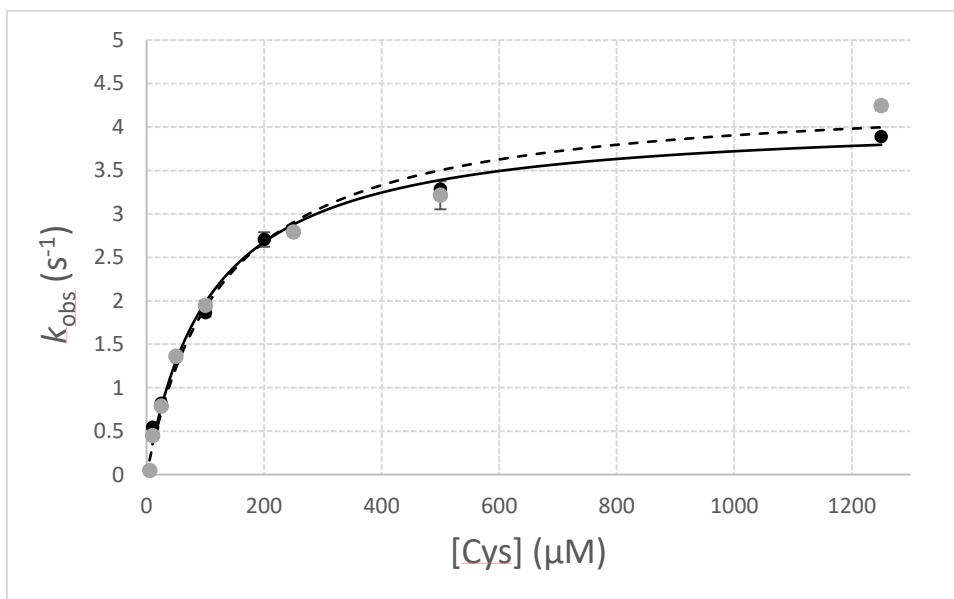
Figur 4.1.1. A) Stopped-flow fluorescenskurve for reduksjonen av *SmAA10A* med 100 μM (pH 8): L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein. B) Forskjell i reduksjonstider mellom reduktantene innen første sekund av analysen. n = 4.



Figur 4.1.2. Observerte pseudo-førsteordens hastighetskonstanter for reduksjonen av *SmAA10A* med ulike konsentrasjoner av reduktanten L-askorbinsyre ved bruk av stopped-flow spektroskopi. B) fullstendig plot for reduksjonen ved pH 7. $n = 3$.



Figur 4.1.3. Observerte pseudo-førsteordens hastighetskonstanter for reduksjonen av SmAA10A med ulike konsentrasjoner av reduktanten gallussyre ved bruk av stopped-flow spektroskopi. n = 3.



Figur 4.1.4. Observerte pseudo-førsteordens hastighetskonstanter for reduksjonen av SmAA10A med ulike konsentrasjoner av reduktanten L-cystein ved bruk av stopped-flow spektroskopi. n = 3.

4.2 Stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av *SmAA10A*

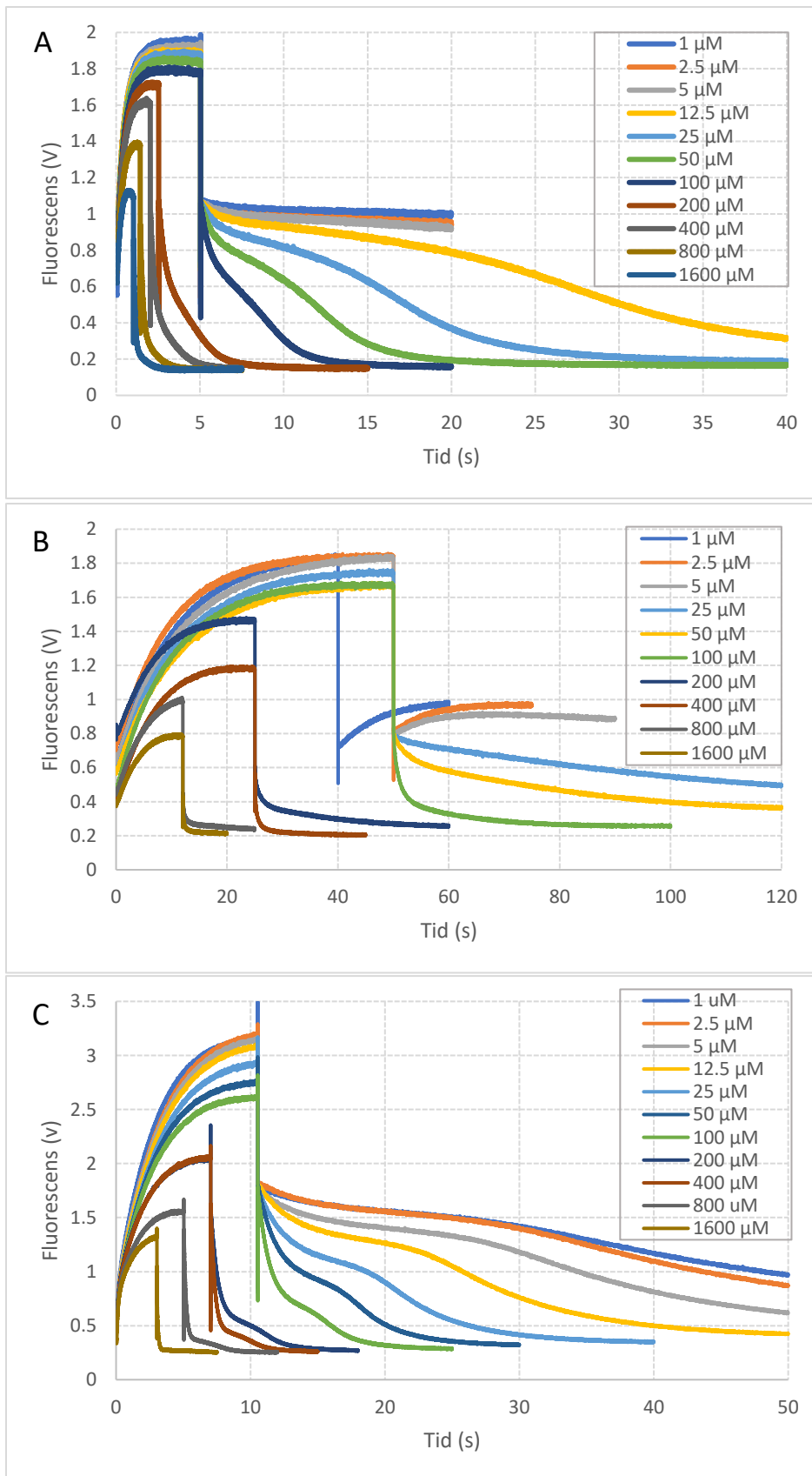
4.2.1 Innledende stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av *SmAA10A*

LPMO-er er kjent for å kunne produsere hydrogenperoksid og drive substratbindene oksygenase- og peroksygenasereaksjoner, men deres mekanismer kan også resultere i katalytiske peroksidase-reaksjoner hvor det aktive setet i LPMO-en oksidativt skades eller inaktiveres (Bissaro et al., 2016b; Bissaro et al., 2017; Isaksen et al., 2014; Loose et al., 2018; Müller et al., 2018). Derfor forsøkte vi, etter å ha reprodusert resultatene fra Bissaro et al. (2020b) for reduksjonen av *SmAA10A*, å replikere resultatene og videreutvikle metoden for re-oksidasjonen av *SmAA10A* med H_2O_2 .

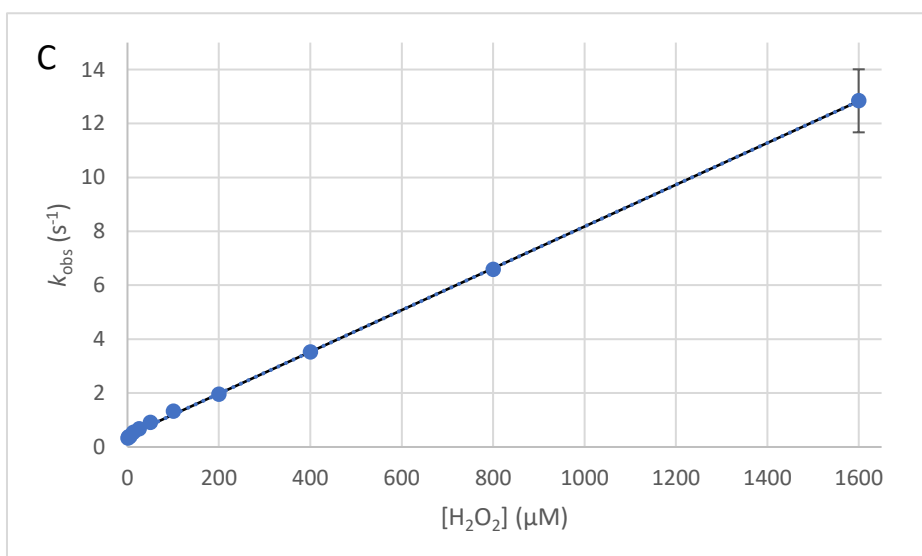
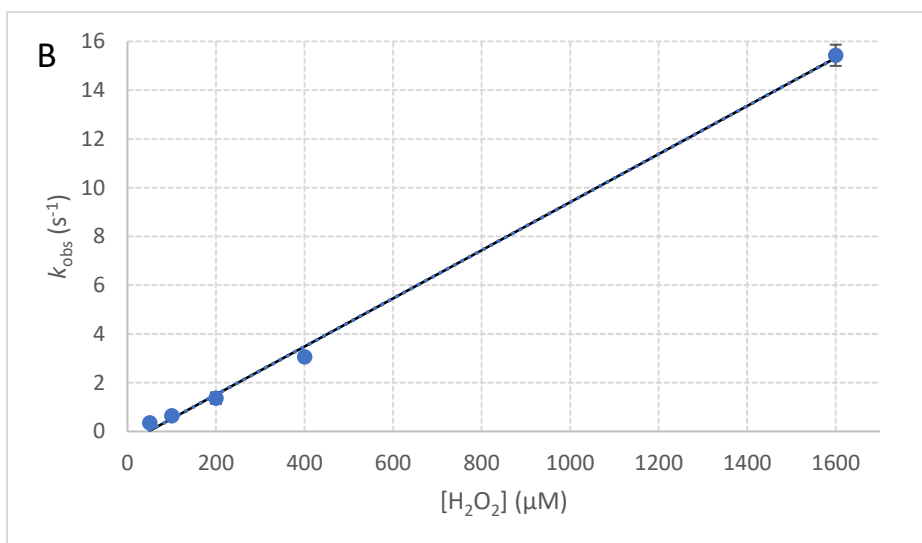
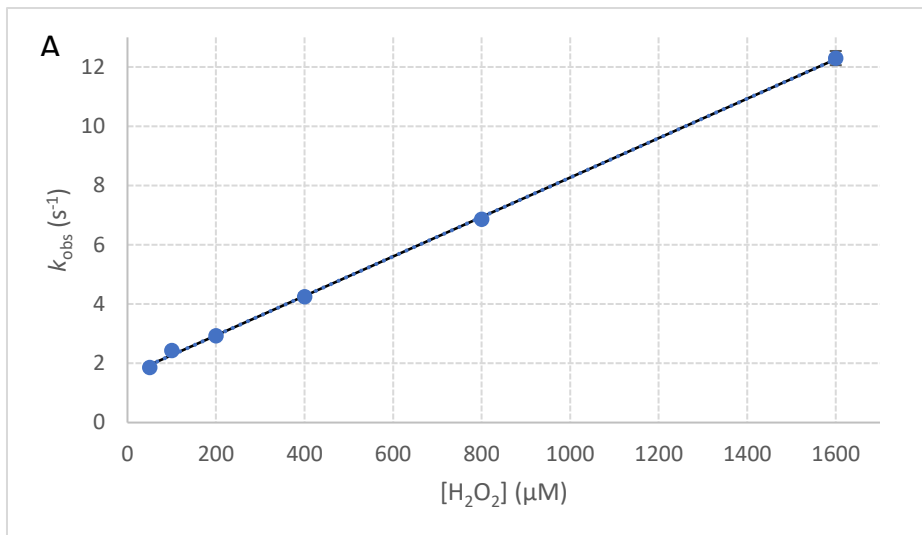
Den påfølgende re-oksidasjonen av *SmAA10A* etter reduksjon med enten L-askorbinsyre, gallussyre eller L-cystein kjennetegnes ved en reduksjon i fluorescens, da LPMO-Cu(I) oksideres til LPMO-Cu(II) ved interaksjon med H_2O_2 (Bissaro et al., 2020b). For analyser med askorbinsyre og L-cystein ble to faser av ulike hastigheter observert (Figur 4.2.1.a og c). Fasene var tydeligst ved lave konsentrasjoner (2-100 μM). For askorbinsyre ble de to fasene til én fase ved konsentrasjoner på over 400 μM , ulikt L-cystein hvor de to fasene forble observert for alle konsentrasjoner av hydrogenperoksid. Gallussyre derimot viste til en økning i fluorescens ved lavere konsentrasjoner (1-5 μM), med kun ett hurtig trinn for re-oksidasjonen ved høyere konsentrasjoner (50-1600 μM , Figur 4.2.1.b). Videre ble det observert at ved økt konsentrasjon av hydrogenperoksid ble reduksjonstiden kortere for alle analyser til tross for uendret mengde reduktant. Beregninger av andre ordens hastighetskonstanter viser at re-oksidasjonen av *SmAA10A* er hurtig ($10^3 M^{-1} s^{-1}$, Tabell 4.2.1), kan beskrives med lineære regresjonsanalyser (Figur 4.2.2.), og er i overenstemmelse med resultater av Bissaro et al. (2020b) for askorbinsyre. Re-oksidasjonen for L-askorbinsyre og L-cystein er henholdsvis ca. 59 og 4.9 ganger tregere enn reduksjonen med tilsvarende reduktant. Derimot er re-oksidasjonen med gallussyre ca. 2.5 ganger raskere enn reduksjonen vist i tabell 4.1.1.

Tabell 4.2.1. Kinetiske hastighetskonstanter av andre orden for re-oksidasjonen av *SmAA10A* med hydrogenperoksid etter reduksjon med enten L-askorbinsyre, gallussyre eller L-cystein ved pH 7.0. n=3.

	L-Asorbinsyre	Gallussyre	L-Cystein
$k_{10app} (M^{-1} s^{-1})$	$(6.7 \pm 0.74) \cdot 10^3$	$(9.9 \pm 0.30) \cdot 10^3$	$(7.8 \pm 0.48) \cdot 10^3$
R ² -verdi	0.999	0.998	0.999



Figur 4.2.1. Stopped-flow fluorescensmålinger for re-oksidasjon av *SmAA10A* med ulike konsentrasjoner av H_2O_2 etter reduksjon med a) L-askorbinsyre (1,5 molare ekvivalenter), b) gallussyre (2 molare ekvivalenter) og c) L-cystein (2 molare ekvivalenter). $n = 1$.



Figur 4.2.2. Observerte pseudo-førsteordens hastighetskonstanter for re-oksidasjonen av *SmAA10A* ved ulike konsentrasjoner av hydrogenperoksid etter reduksjon med a) L-askorbinsyre (1,5 molare ekvivalenter), b) gallussyre (2 molare ekvivalenter) og c) L-cystein (2 molare ekvivalenter). $n = 3$.

4.2.2 Optimaliserte stopped-flow re-oksidasjonseksperimenter av *SmAA10A*

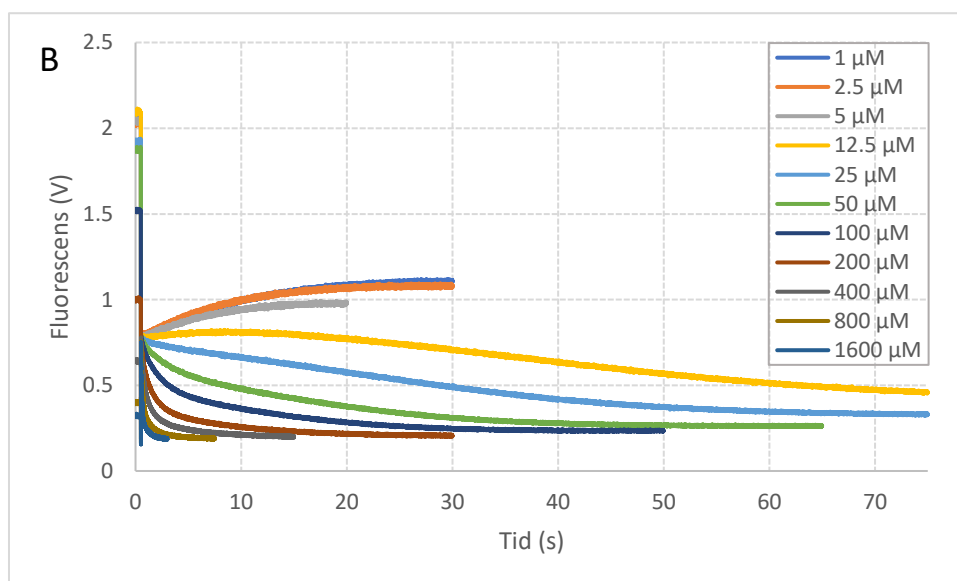
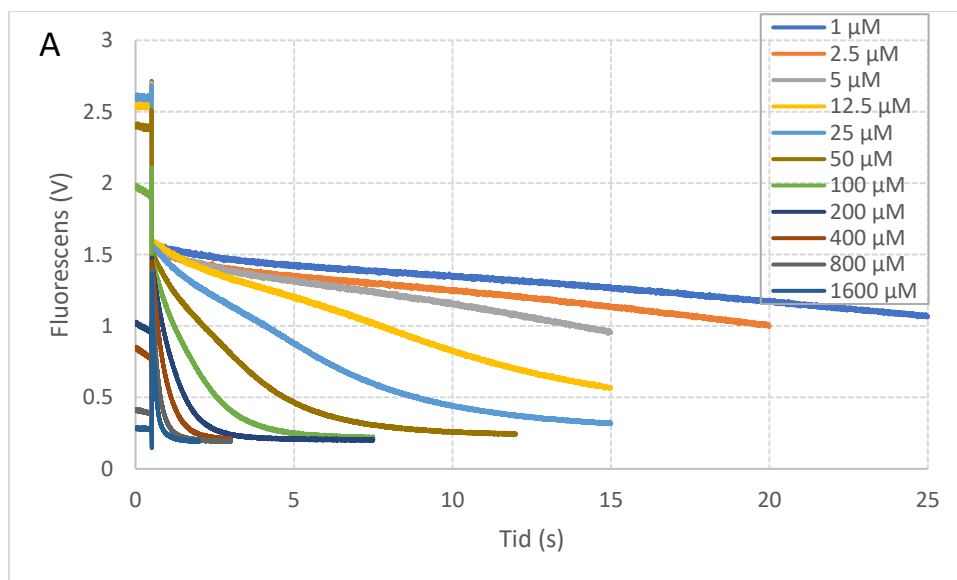
De optimaliserte stopped-flow analysene for re-oksidasjonen av *SmAA10A* hadde et støkiometrisk forhold på 1:1 mellom LPMO og reduktant. Dette ble gjort for å kunne bestemme kinetiske hastighetskonstanter for re-oksidasjonen med større grad av nøyaktighet enn tidligere analyser ved å utelukke muligheten for uønskede reaksjoner mellom LPMO-en og molart overskudd av reduktant.

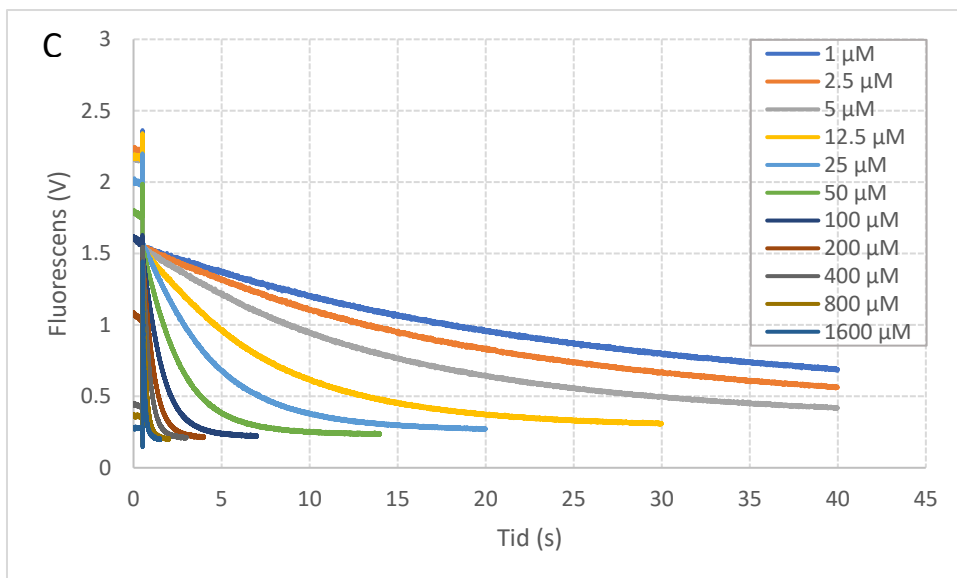
For disse eksperimentene ble resultatene noe ulikt de tidligere analysene med molart overskudd av reduktant. I likhet med tidligere eksperimenter ble det observert to faser av ulik hastighet for re-oksidasjonen med L-askorbinsyre (Figur 4.2.3.a). Gallussyre viste fremdeles en økning i fluorescens ved lave konsentrasjoner av hydrogenperoksid (1-5 μM), med kun ett hurtig trinn ved høyere konsentrasjoner (50-1600 μM , Figur 4.2.3.b). De to fasene til L-askorbinsyre ble videre til én fase ved konsentrasjoner over 50 μM , som er noe lavere enn 400 μM hvor dette fenomenet ble observert ved 1.5 molare ekvivalenter. Ulikt de tidligere analysene ble det kun observert én fase ved alle konsentrasjoner av hydrogenperoksid for re-oksidasjon med L-cystein (Figur 4.2.3.c). De beregnede andre ordens hastighetskonstantene (Tabell 4.2.2.) kunne beskrives med lineær regresjon (Figur 4.2.4.), var i overenstemmelse med resultater av Bissaro et al. (2020b) for askorbinsyre, og viste at re-oksidasjonen av *SmAA10A* er hurtig ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Hastighetskonstantene av andre orden for den optimaliserte re-oksidasjonen var henholdsvis ca. 59 og 5.6 ganger tregere enn reduksjonen med tilsvarende reduktant for L-askorbinsyre og L-cystein. Re-oksidasjonen for gallussyre er derimot ca. 2.0 ganger raskere enn reduksjonen (Tabell 4.1.1.).

Fluorescenssignalet ble i likhet med tidligere analyser (del 4.2.1) redusert ved høyere H_2O_2 -konsentrasjoner slik at re-oksidasjonen kan se ut til å starte ved en høyere spenning enn der hvor reduksjonen sluttet. Denne signalreduksjonen som observeres i kyvetten skyldes sannsynligvis at kyvetten er i direkte kontakt med sprøyte nummer 4 og blander nummer 3. Her injiseres H_2O_2 til cellen, og det kan dermed foreligge rester av H_2O_2 fra tidligere injeksjoner i blanderen samt kyvetten. Innføringen av et vasketrinn i programmet endret ikke dette fenomenet og indikerer at dette er et resultat av det eksperimentelle- eller instrumentelle oppsettet. Fenomenet påvirker derimot ikke observasjonene av re-oksidasjonen ettersom denne ligger oppstrøms i forsinkelseslinjen, uten kontakt med H_2O_2 , frem til blanding med injisert H_2O_2 i blander nummer 3.

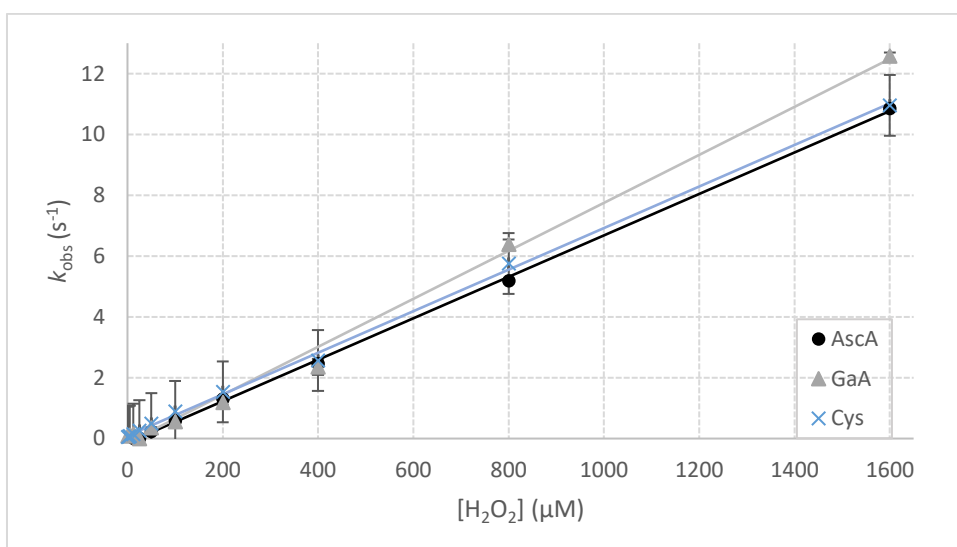
Tabell. 4.2.2. Kinetiske hastighetskonstanter av andre orden for re-oksidasjonen av *SmAA10A* med hydrogenperoksid etter reduksjon med enten L-askorbinsyre, gallussyre eller L-cystein ved pH 7.0. n=3.

	L-Askorbinsyre	Gallussyre	L-Cystein
k_{10app} ($M^{-1} s^{-1}$)	$(6.8 \pm 0.060) \cdot 10^3$	$(7.9 \pm 0.20) \cdot 10^3$	$(6.8 \pm 0.080) \cdot 10^3$
R ² -verdi	0.999	0.995	0.998





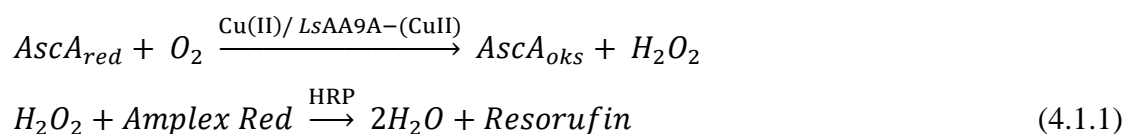
Figur 4.2.3. Stopped-flow fluorescensmålinger for re-oksidasjon av *SmAA10A* med ulike konsentrasjoner av H_2O_2 etter reduksjon med 1 molar ekvivalent av enten a) L-askorbinsyre, b) gallussyre eller c) L-cystein. $n = 1$.



Figur 4.2.4. Observerte pseudo-førsteordens hastighetskonstanter for re-oksidasjonen av *SmAA10A* ved ulike konsentrasjoner av hydrogenperoksid etter reduksjon med 1 molar ekvivalent av enten L-askorbinsyre (svart), gallussyre (grå) eller L-cystein (blå). $n = 3$.

4.3 Innledende isotermisk titreringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til fritt kobber og LsAA9A

Som nevnt tidligere (del 1.3) vil endring i kraft med hensyn på tid, dQ/dt (1.3.1), i et ITC-forsøk være proporsjonal med reaksjonshastigheten til den pågående reaksjon. For å kunne bestemme reaksjonshastigheten må dQ/dt relateres til endringen i produktkonsentrasjon med hensyn på tid (likning 1.3.3 og 1.3.4) gjennom bestemmelse av ΔH_{app} . Forsøksoppsettet bestod et koblet assay hvor produksjonen av H_2O_2 fra oksidasereaksjonen reagerer videre som et kosubstrat i en påfølgende peroksidase-reaksjon katalysert av HRP:



En enkel injeksjon av askorbinsyre, som begrensende reaktant, med et gitt injeksjonsvolum og konsentrasjon i et ITC-forsøk hvor alle andre forbindelser er i overskudd vil da gi ΔH_{app} for den samlede reaksjonen grunnet den støkiometriske avhengigheten for de påfølgende reaksjonene. Integrasjon av varmeutslaget avgitt eller tatt opp gir Q og ΔH_{app} som beregnes ved Q/n (1.3.2), hvor n er gitt ved å multiplisere konsentrasjon av askorbinsyre i reaksjonscellen med reaksjonscellevolumet ($n = cV$). dQ/dt ble lest av som avstanden fra basislinjen til varmeutslagsminimumet for hver enkelt injeksjon i ITC-forsøket (Figur 4.3.1 og 4.3.2). k_{kat} verdiene i tabell 4.3.1 og 4.3.2 ble beregnet ut fra følgende formel:

$$k_{kat} = \frac{Raten}{[Cu(I)/LPMO-Cu(II)]} \quad (4.1.2)$$

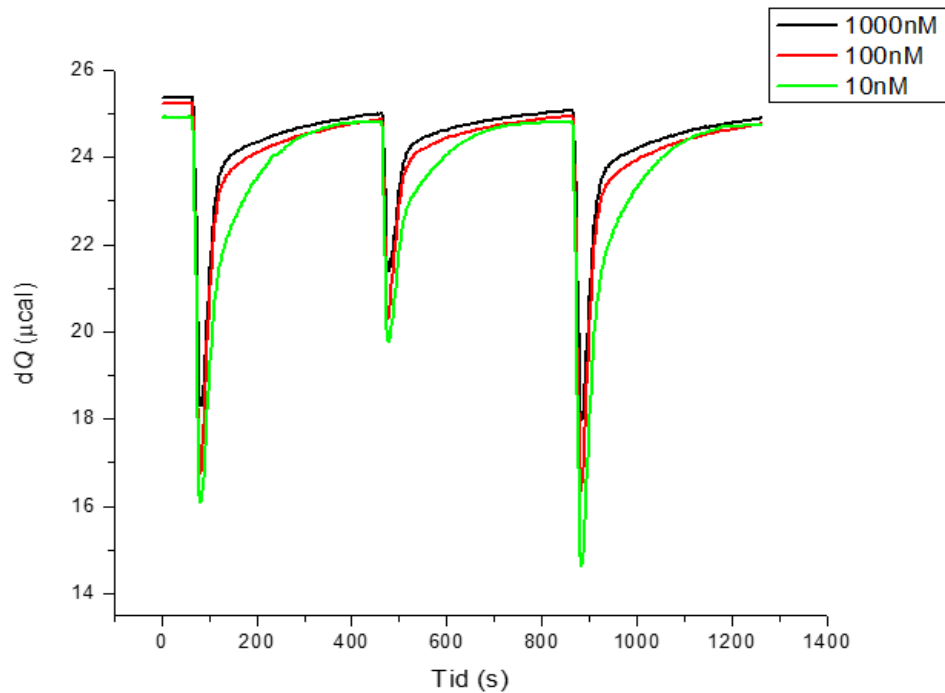
, hvor raten ble først beregnet med likning 1.3.4.

4.3.1 Isotermisk titreringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til kobber(II)sulfat

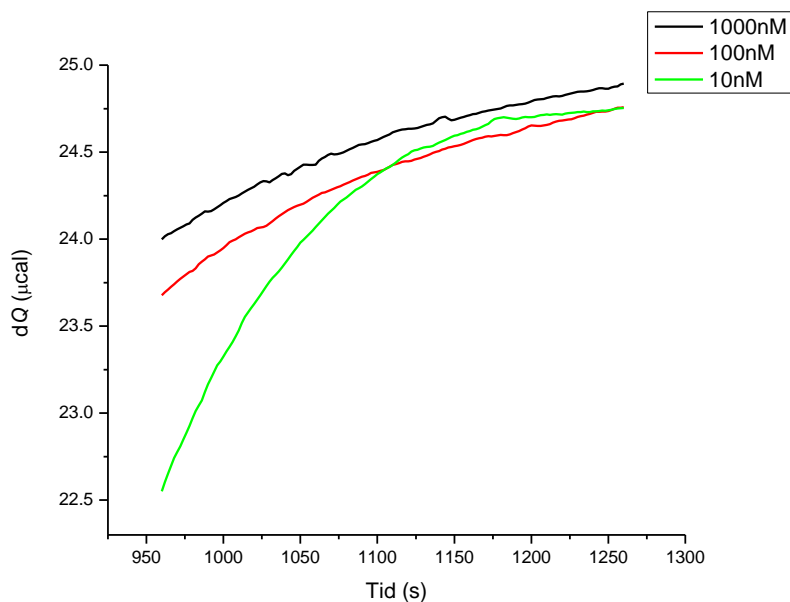
For å verifisere anvendeligheten av ITC til å bestemme kinetiske parametere for oksidaseaktiviteten til fritt kobber ble det gjennomført en serie med forsøk hvor henholdsvis 10, 5 og 10 μL injeksjoner av askorbinsyre (2.8 mM) ble tilført løsninger med 0.01, 0.1 og 1 μM kobbersulfat i reaksjonscellen. Analysen viste at den beregnede endringen i entalpi ($\Delta H_{\text{app}}^{\circ}$) forblir uendret uavhengig av den injiserte stoffmengden askorbinsyre innad i et forsøk, men entalpiendringen øker positivt i relativt liten grad i forhold til økningen av kobbersulfatkonsentrasjonen. Den katalytiske hastighetskonstanten (k_{kat}) ser ut til å være proporsjonal med stoffmengden tilsatt askorbinsyre innad i et forsøk, men blir tregere når konsentrasjonen av kobbersulfat økes (Tabell 4.3.1). Dette er en konsekvens av at endring i Q (nevner i likning 4.1.2) ved injeksjon virker å være uavhengig av konsentrasjon av Cu(II) i reaksjonscellen (teller i likning 4.1.2). Videre kan det kun observeres én fase på termogrammet for 0.01 μM kobbersulfat (Figur 4.3.1), mens to distinkte faser kan observeres i termogrammene for analysene ved 0.1 μM og 1 μM kobbersulfat (Figur 4.3.1). Det første trinnet er en hurtig reaksjon i likhet med den observert ved 0.01 μM kobbersulfat. Den påfølgende fasen derimot viste til en reduksjon i kraft (dQ/dt) ved økte kobbersulfatkonsentrasjoner (Figur 4.3.2).

Tabell 4.3.1. Stoffmengde (n) av askorbinsyre, mengde varme (Q), endring i varme over tid (dQ/dt), beregnet $\Delta H_{\text{app}}^{\circ}$ og k_{kat} for injeksjon av henholdsvis 10, 5 og 10 μL , 2.8 mM askorbinsyre til varierende konsentrasjoner av Cu(II)SO₄. $n=1$.

[AscA] (μM)	n_{AscA} (nmol)	Q (μcal)	dQ/dt ($\mu\text{cal/s}$)	$\Delta H_{\text{app}}^{\circ}$ (Mcal/mol)	k_{kat} (s^{-1})
0.01 μM CuSO ₄					
20	0.28	-576	-8.82	-2.1	0.30
10	0.14	-322	-5.03	-2.3	0.15
20	0.28	-673	-10.2	-2.4	0.30
0.1 μM CuSO ₄					
20	0.28	-466	-8.49	-1.7	0.036
10	0.14	-222	-4.57	-1.6	0.020
20	0.28	-441	-8.58	-1.6	0.039
1 μM CuSO ₄					
20	0.28	-400	-7.04	-1.4	0.0035
10	0.14	-189	-3.62	-1.3	0.0019
20	0.28	-383	-7.08	-1.4	0.0037



Figur 4.3.1. Termogram for oksidaseaktiviteten til 0.01, 0.1 og 1 μM CuSO_4 ved titrering av 2.8 mM askorbinsyre. Reaksjonscellen inneholdt 0.0025 mg/mL HRP og 100 μM Amplex® Red i 50 mM Bis-Tris buffer, pH 6.5, ved 30 °C. Basislinjen ble registrert i 60 s før tre injeksjoner av askorbinsyre ga en sluttkonsentrasjon på 50 μM . Data brukt til videre beregninger tok utgangspunkt i dQ/dt , som er avstanden fra basislinjen til varmeutslagsminimumet inntil dQ/dt returnerer til grunnlinjen for hver enkelt injeksjon.



Figur 4.3.2. Utvalgt del av termogrammene i figur 4.3.1 for det andre trinnet i oksidaseaktiviteten til 0.01, 0.1 og 1 μM CuSO_4 ved titrering av 2.8 mM askorbinsyre til reaksjonscellen.

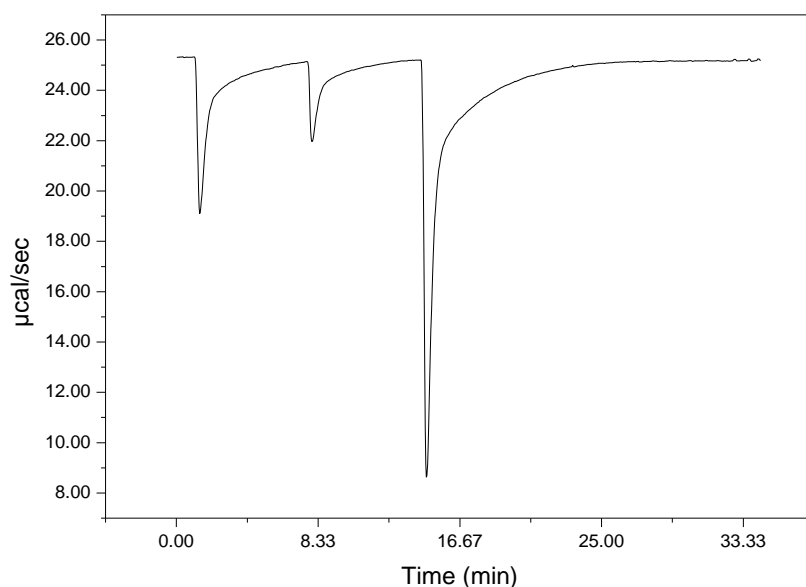
4.3.2 Isotermisk titeringskalorimetrisk studie av oksidaseaktiviteten til *LsAA9A*

I et forsøk på å verifisere anvendeligheten av ITC til å bestemme kinetiske parametere for oksidaseaktivitet til LPMO-er ble det gjennomført et eksperiment hvor henholdsvis 10, 5 og 30 μL injeksjoner av askorbinsyre (2.8 mM) ble tilført en 0.05 μM *LsAA9A*-løsning i reaksjonscellen. Analysen viste at endringen i entalpi ($\Delta H^{\circ}_{\text{app}}$) forblir uendret uavhengig av den tilsatte stoffmengden askorbinsyre. Den katalytiske hastighetskonstanten (k_{kat}) derimot ser ut til å være proporsjonal med stoffmengden tilsatt askorbinsyre (Tabell 4.3.2).

Termogrammet (Figur 4.3.3) viser i likhet med forsøkene utført med 0,1 og 1 μM kobbersulfat (del 4.3.2) tegn til to reaksjonsfaser av ulik hastighet, en hurtig initiell reaksjon og en påfølgende reaksjon deretter.

Tabell 4.3.2. Stoffmengde (n) av askorbinsyre, mengde varme (Q), endring i varme over tid (dQ/dt), beregnet $\Delta H^{\circ}_{\text{app}}$ og k_{kat} for injeksjon av henholdsvis 10, 5 og 30 μL , 2.8 mM askorbinsyre til 0.05 μM *LsAA9A*-Cu(II). $n=1$.

[AscA] (μM)	n_{AscA} (nmol)	Q (μcal)	dQ/dt ($\mu\text{cal/s}$)	$\Delta H^{\circ}_{\text{app}}$ (Mcal/mol)	k_{kat} (s^{-1})
0.05 μM <i>LsAA9A</i>					
20	0.28	-377	-6.26	-1.3	0.066
10	0.14	-191	-3.16	-1.4	0.033
60	0.85	-1208	-16.6	-1.4	0.16



Figur 4.3.3. Termogram for oksidaseaktiviteten til 0.05 μM *LsAA9A* ved titring av 2.8 mM askorbinsyre. Reaksjonscellen inneholdt 0.0025 mg/mL HRP og 100 μM Amplex® Red i 50 mM Bis-Tris buffer, pH 6.5, ved 30 °C. Basislinjen ble registrert i 60 s før tre injeksjoner av askorbinsyre ga en sluttkonsentrasjon på 90 μM .

5 Diskusjon

Virkingen av ulike reduktanter på reduksjonen av *SmAA10A* og kosubstratet hydrogenperoksid

Siden oppdagelsen av LPMO-er og deres evne til å kunne oksidativt nedbryte krystallinske polysakkarider som kitin og cellulose har enzymene fått en sentral rolle innen forskningen på omdannelse og utnyttelse av energien i fornybare biomasser. Til tross for stor forskningsinteresse rundt feltet, som inkluderer et mangfold av kunnskap om LPMO-er sin klassifisering, struktur og substratspesifisitet er det fremdeles kun et fåtall eksperimentelle kinetiske studier som belyser aktiviteten og mulige mekanismer for LPMO-er. Per i dag er det kun to detaljerte kinetiske studier om LPMO-aktivitet på kjente substrater. Den ene var av Kuusk et al. (2018a) som viste at den H₂O₂-drevede oksidasjonen av krystallinsk kitin ved hjelp av den bakterielle LPMO-en, *SmAA10A*, har en andreordens katalytisk effektivitetskonstant ($k_{\text{kat}}/K_{\text{mH}_2\text{O}_2}$) av størrelsesorden $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Den andre studien viste derimot at den O₂-drevede nedbrytningen av celloheksose med den fungale LPMO-en, *MtPMO9E*, har en $k_{\text{kat}}/K_{\text{mO}_2}$ av størrelsesorden $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Hangasky et al., 2018).

Arbeidet i denne avhandlingen har brukt metoder som stopped-flow fluorescens og isotermisk titreringskalorimetri for å studere oksidaseaktiviteten til fritt kobber og *LsAA9A* samt reduksjonshastigheten av *SmAA10A* og H₂O₂ med reduktantene L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein. Analysene ble gjennomført for å øke forståelsen av den molekylære mekanismen som LPMO-er benytter for nedbrytning av krystallinske polysakkarider. Våre kinetiske data og videreutviklede metode kan gi innsikt i to av trinnene i den tidligere foreslåtte mekanismen for *SmAA10A* (Bissaro et al., 2020b). Avhandlingen utgjør også et videre grunnlag for fremtidige kinetiske studier av LPMO-er og deres interaksjoner med ulike reduktanter.

5.1 Effekten av reduktanter på reduksjonshastigheten for *SmAA10A*

Hastigheten for reduksjonen *SmAA10A* var tregere i følgende rekkefølge, L-askorbinsyre, L-cystein og gallussyre med en størrelsesorden på henholdsvis 10^5 , 10^4 og $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tilstand 1 til 2, figur 5.1.1). Det ble videre observert en svak økning i hastighetene av andre orden ved pH 8 for analyser med gallussyre og askorbinsyre, mens cystein forble uendret (del 4.1).

Hastighetsforskjellene mellom reduktantene kan skyldes deres individuelle reduksjonsmekanismer for doneringen av det nødvendige elektronet, med utgangspunkt i stoffenes fysikalskjemiske egenskaper. Askorbinsyre for eksempel, er en antioksidant som kan danne minst fem mulige forbindelser i vandige løsninger. To av dem er semi-dehydroaskorbinsyre (SDA) og dehydroaskorbinsyre (DHA). De kan reagere både som reduksjonsmidler og oksidasjonsmidler, men som oftest virker de reduserende (Sapper et al., 1982). Andre mulige forbindelser inkluderer askorbat, asorbyl radikaler og askorbyl radikal-anioner (Wang et al., 2020). Nylig ble det vist at DHA kan brukes som et reduksjonsmiddel for LPMO-er, med en lav aktivitetsforlengende effekt for *SmAA10A* (Brander et al., 2021). QM/MM simuleringer av Wang et al. (2020) viste videre at askorbat overfører elektronet til LPMO-Cu(II) ved hjelp av vannmolekyler, uten å måtte bindes til LPMO-er. Dette antyder da at askorbinsyre har muligheten for å redusere LPMO-er flere ganger per molekyl askorbinsyre enn tidligere antatt, ettersom flere av de mulige intermediatene etter den første elektronoverføringen er ansett til å være reaktive. Videre vil kjemisk reversibilitet, eller mangel på sådan, til produkter etter elektronoverføringen påvirke kinetikken til elektronoverføringen fra reduktant til LPMO-en. Dersom elektronoverføringen fra reduktanten resulterer i et produkt som videre reagerer irreversibelt, slik tilfelle kan være for L-askorbinsyre, vil kinetikken for reduksjonen påvirkes av den etterfølgende reaksjonen (McCormick et al., 2014; Sapper et al., 1982). Dette kan da være et grunnlag for den hurtige reduksjonen av *SmAA10A* observert av oss i likhet med Bissaro et al. (2020b).

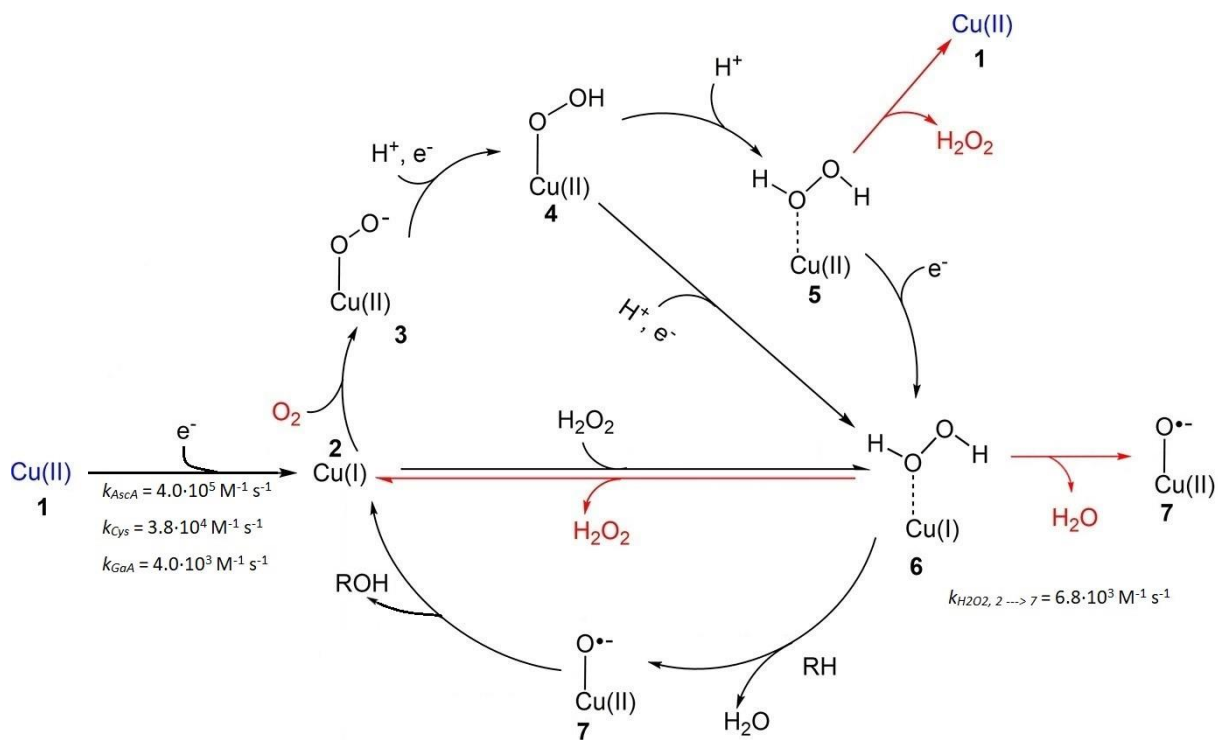
Reduktantene gallussyre og L-cystein har derimot andre stoffegenskaper som kan påvirke reduksjonen av LPMO-er. Gallussyre er en polyfenolsyre som kan fungere som en antioksidant ved donering av et hydrogenatom eller et elektron (Badhani et al., 2015). Videre har metoder som syklisk voltammetri (CV) and differensialpulserende voltammetri (DPV) vist at oksidasjonen av gallussyre skjer i to trinn. Først avgis et proton og et elektron ved dannelsen av et semikinon, før det i andre trinn avgis enda et proton og elektron ved oksidasjon til kinon (Chikere et al., 2020). Selv om cystein i likhet med askorbinsyre og gallussyre kan betegnes som en antioksidant har ikke cystein de nødvendige

redoksegenskapene til å redusere LPMO-er flere ganger i anaerobe miljø. Dette kan begrunnes ved at uten tilgang på molekylært oksygen kan cystein kun oksideres én gang til et cystein tiylradikal som er i likevekt med cystin gjennom auto-oksidativ dannelse av disulfidbroer (Darkwa et al., 2004; Saez et al., 1982). Videre indikerer våre resultater at cystein bindes til *SmAA10A* under reduksjonen (Figur 4.1.4), som kan skyldes dannelsen av et stabilt LPMO-Cu-tiolat-kompleks (Rigo et al., 2004). Derimot forklarer ikke disse egenskapene hvorfor reduksjonshastigheten er større ved bruk av cystein enn gallussyre (Tabell 4.1.1.), men mulige forklaringer kan finnes ved å sammenlikne redoksegenskapene til *SmAA10A* og reduktantene.

Redokspotensialet til *SmAA10A*-Cu(II)/*SmAA10A*-Cu(I) har tidligere blitt bestemt til 275 mV, og selv om de rapporterte redokspotensialene for LPMO-Cu(II)/LPMO-Cu(I) redokspar ofte er mellom 155 til 326 mV er de fleste større enn 240 mV (Garajova et al., 2016; Aachmann et al., 2012). Dermed burde *SmAA10A* kunne bli redusert av reduktanter med lave redokspotensialer. En tidligere studie av Moe (2016) benyttet potensiometri for å studere om redokspotensialene til de tre overnevnte reduktantene var pH-avhengige. Resultatene viste at alle reduktantenes reduksjonspotensialer er mindre enn 240 mV i målområdet pH 5-8, som indikerer at reduksjonen av *SmAA10A* er termodynamisk gunstig (grunnet $E > 0$). Videre viste det seg at redokspotensialene for de tre reduktantene ble redusert lineært ettersom pH-en økte. Ved bruk av Nernst likning kan en da forvente en endring i stigningstallet for redokspotensialene på -59 mV dersom reaksjonen kun er avhengig av pH (Breslmayr et al., 2019). Selv om den negative trenden stemmer overens med resultatene av Moe (2016) og Breslmayr et al. (2019) er ikke de eksperimentelle verdiene i samsvar med den teoretiske verdien. Dette antyder at potensialene ikke kun er pH-avhengige.

Moe (2016) antyder videre at gallussyre er den svakeste reduktanten etterfulgt av L-cystein som er sterkere, mens L-askorbat har sterkest reduksjonsevne. Dette er i overenstemmelse med den økende hastighetsrekkefølgen observert for L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein (Tabell 4.1.1). Oksidasjonsreduksjonspotensialet (ORP) vil da kunne øke positivt ved pH 8 grunnet en reduksjon av reduktantenes reduksjonspotensialer. Våre resultater om at de tre reduktantene kan redusere *SmAA10A* hurtig både ved pH 7 og 8 samsvarer med dette. Videre grunnlag for en mulig korrelasjon mellom LPMO-ers katalytiske aktivitet og redokspotensialer ble illustrert av Kracher et al. (2016) ved at lavere reduksjonspotensialer for reduktanter, deriblant fenoler som gallussyre, resulterte i høyere grad av LPMO-aktivering. Denne sammenhengen er også blitt demonstrert for *NcAA9C*, hvor dannelsen av oksiderte

produkter økte lineært ved en økning i pH samtidig som redokspotensialet til hydrocoerulignone-coerulignon substratene ble redusert lineært (Breslmayr et al., 2019). En lignende korrelasjon er tidligere blitt observert av Meyer et al. (1983) for andre typer elektronoverførende proteiner. De overnevnte eksperimentelle studiene kan dermed tyde på at endringer i reduksjonshastigheten av LPMO-er som *SmAA10A* kan begrunnes ut fra forskjellen i redokspotensialet mellom LPMO og reduktant. Det anbefales dermed at videre arbeid gjøres for å nærmere studere redokspotensialene til reduktantene ved ulike pH-verdier samt utføre flere analyser etter beskrivelsen i del 3.3.1 ved andre relevante pH-verdier for å studere om hastighetsendringen er gjeldene over et større målområde.



Figur. 5.1.1. Sammenfattede mekanismer for LPMO-aktivering av oksygen og hydrogenperoksid. Røde reaksjonspiler indikerer at reaksjonen ikke er sammenkoblet med oksidering av substratet. Inkluderer observerte hastighetskonstanter for reduksjonen av *SmAA10A* (med L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein) og H_2O_2 (med L-cystein). Basert på arbeid av Wang et al. (2020) og Bissaro et al. (2020b).

5.2 Reduksjon av kosubstratet hydrogenperoksid med *SmAA10A*

Re-oksidasjonen av *SmAA10A* (rød sidereaksjon, fra tilstand 2 til 7 via 6, figur 5.1.1), heretter betegnet som reduksjonen av kosubstratet hydrogenperoksid, resulterte i andreordens hastighetskonstanter i orden av $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dette kan antyde at H_2O_2 er det naturlige kosubstratet til LPMO-er ettersom reduksjonen er tre størrelsesordener større enn tilsvarende reduksjon av O_2 (Bissaro et al., 2020b). Verdiene var av samme orden både før og etter optimalisering av stopped-flow metoden (Tabell 4.2.1 og 4.2.2). Optimaliseringen bestod hovedsakelig av å redusere mengden reduktant, enten L-askorbinsyre, gallussyre eller L-cystein, til 1 molar ekvivalent (for mer informasjon se del 3.3.2). Optimaliseringen av metoden resulterte i bedre nøyaktighet og presisjon enn de innledende forsøkene.

Selv om de observerte hastighetskonstantene er i overenstemmelse med de av Bissaro et al. (2020b) for L-askorbinsyre, så inkluderer stopped-flow oppsettet i denne avhandlingen en viktig komponent som er ulik Bissaro et al. sine eksperimenter. Forskjellen ligger i tilstedeværelsen av reduktant i reaksjonsblandingen og selv om dette påvirket observasjonene noe, forble hastighetene relativt uendret. Som nevnt tidligere kan oksidasjonen av L-askorbinsyre danne opptil fem ulike forbindelser, hvor blant annet DHA har vist seg å kunne redusere samt øke aktiviteten til LPMO-er innen familiene AA9, AA10 og AA13, sammenliknet med askorbat. Denne «aktivitetsforlengende effekten» av DHA var minimal, men observerbar for *SmAA10A* (Brander et al., 2021). Videre beskrev Hegnar et al. (2019) at *GtLPMO9B* fra organismen *Gloeophyllum trabeum*, viste økt enzymaktivitet ovenfor substratet PASC ved bruk av gallussyre sammenliknet med askorbinsyre.

Aktivitetsforlengelsen begrunnes av forfatterne ved at mengden H_2O_2 i blandingen ble redusert med 54% for askorbinsyre og 94% for gallussyre, ved molforhold 1:1 mellom reduktant og hydrogenperoksid, og beskyttet dermed LPMO-en mot oksidativ H_2O_2 -inaktivering. Denne effekten kan forklare hvorfor våre observasjoner for reduksjonen av H_2O_2 , med askorbinsyre i blandingen, resulterte i to ulike hastighetsfaser ved lave og middels konsentrasjoner av hydrogenperoksid (Figur 4.2.1a og 4.2.3a). Effekten kan muligens også forklare hvorfor det observeres to faser ved lave konsentrasjoner av askorbinsyre (1-50 μM) selv for de optimaliserte analysene med støkiometriske mengder reduktant. Dette kan begrunnes ved at DHA og andre oksiderte forbindelser av askorbinsyre interagerer med H_2O_2 og *SmAA10A*, hvor da deler av enzymet kan bli beskyttet mot oksidativ inaktivering. For de innledende analysene ble denne innvirkningen på H_2O_2 -reduksjonen observert opptil 400 μM H_2O_2 og kan i disse tilfeller skyldes tilstedeværelsen av 1,5 molare ekvivalenter askorbinsyre.

Reduksjonen av hydrogenperoksid med gallussyre i reaksjonsblandingen viste tegn til re-reduksjon av *SmAA10A* ved lave konsentrasjoner av H_2O_2 (1-5 μM), og kun ett hastighetstrinn ved høyere konsentrasjoner (50-1600 μM , figur 4.2.3b). For konsentrasjonen 12.5 μM opptrer to trinn i likhet med askorbinsyre, men trinnet er mindre tydelig for gallussyre. Re-reduksjonen av *SmAA10A* kan skyldes at LPMO-er er kjent for å kunne gjennomføre peroksidasesereaksjoner på mono-, di- og polyfenoler, inkludert gallussyre. Dette betyr at gallussyre ikke bare er en reduktant, men også et substrat for LPMO-er som kan beskytte *SmAA10A* mot re-oksidasjon ved å forbruke H_2O_2 i en peroksidasesereaksjon, illustrert ved nedre halvdel av den sykliske mekanismen i figur 5.1.1. (Breslmayr et al., 2018; Stepnov et al., 2021).

Gallussyre har videre vist seg å kunne virke inhiberende ovenfor produksjonen av oksidative forbindelser i syklusen til peroksidaser (Serrano et al., 2010), og benyttes ofte i biologiske systemer for beskyttelse mot reaktive oksygenforbindelser (ROS) som H_2O_2 (Badhani et al., 2015). Denne antioksidierende egenskapen til gallussyre kan også påvirke den observerte re-reduksjonen ved lave konsentrasjoner (1-5 μM H_2O_2) samt overgangen til den påfølgende hurtige fasen observert ved $[\text{H}_2\text{O}_2] > 12.5 \mu\text{M}$. Videre tyder dette på at peroksidasesereaksjonen med gallussyre kan utkonkurrere bindingen og påfølgende reduksjon av H_2O_2 (rød sidereaksjon, fra tilstand 2 til 7 via 6, figur 5.1.1). Påvirkningen av peroksidasesereaksjonen gjør dermed at vi anbefaler ikke å bruke gallussyre som reduktant i videre mekanistiske og kinetiske studier ettersom den sannsynligvis deltar i sidereaksjoner ved fravær av andre LPMO-substrater.

For cystein kan det andre trinnet observert ved 2 molare ekvivalenter skyldes konkurrerende inhibering av fritt cystein som bindes moderat til det aktive setet grunnet den høye K_d -verdien observert under stopped-flow analyser for reduksjonen av *SmAA10A* (Tabell 4.1.1). De to trinnene ble ikke observert ved de optimaliserte analysene med 1 molar ekvivalent. Dette kan begrunnes ved at cystein kun kan oksideres én gang, til et tiylradikal i likevekt med cytin, uten tilgang på molekylært oksygen (Darkwa et al., 2004; Saez et al., 1982). Uten et molart overskudd av cystein forhindres ikke lenger reduksjonen av H_2O_2 ved binding av et nytt beskyttende cysteinmolekyl, og dermed forsvinner det andre trinnet observert ved overskudd av reduktant. Ut fra våre observasjoner kan dette tyde på at L-cystein er den mest egnede reduktanten, ved 1 molar ekvivalent, for videre mekanistiske og kinetiske studier av LPMO-er. Dette grunngis ved at den ikke innvirker på hverken reaksjoner innad i den katalytiske syklusen eller i eventuelle sidereaksjoner, ulikt L-askorbinsyre og gallussyre.

En utfordring med metoden per i dag er at det ikke er mulig å skille med fluorescens hvilke av de sykliske og ikke sykliske LPMO-Cu(II)-forbindelsene (Figur 5.1.1) som reduserer fluorescenssignalet. Dette betyr at det dermed ikke mulig å kvantifisere hvilket responsbidrag spesifikke LPMO-Cu(II)-forbindelser utgjør ovenfor det totale fluorescenssignalet ved reduksjon av H₂O₂ (Bissaro et al., 2020b). Derfor kan det anbefales at freeze-quenching benyttes for videre studier av kinetiske forbindelser under stopped-flow-reduksjonsanalyser, for å øke innsikten i den molekylære mekanismen til LPMO-er. Videre anbefaler vi at det kjøres ulike «recovery»-analyser for å gi informasjon om reduksjonen av fluorescenssignalet skyldes re-oksidasjon av LPMO-Cu(I) til ulike LPMO-Cu(II)-forbindelser, eller om det er grunnet oksidativ inaktivering av LPMO-en (tilstand 7, Figur 5.1.1). Dette kan gjøres ved å tilsette mer reduktant til systemet ved utvalgte tidspunkt etter reduksjonen av H₂O₂ for å studere om fluorescenssignalet gjenopptas. Alternativt kan massespektrometri benyttes til å studere hvilke deler av proteinet som har blitt oksidert av H₂O₂, ved å foreta prøveoppsamling av innledende stopped-flow analyser. De overnevnte forslagene til videre arbeid vil kreve henholdsvis et stopped-flow fluorescensinstrument med en freeze-quench prøveoppsamler, et egnet massespektrometer og et analyseoppsett med to forsinkelseslinjer i trippel blandingsmodus.

Videre tanker rundt mulige forbedringer av analysemetoden inkluderer å utvide forsøket til flere kjente LPMO-reduktanter. Dersom en reduktant viser seg å redusere irreversibelt, i likhet med L-cystein ved 1 molar ekvivalent, kan metoden muligens benyttes til å studere kinetikken for flere trinn i den molekylære mekanismen til fluorescerende LPMO-er. Metoden er allerede under utvikling for andre fluoriserende proteiner, som *ScLPMO10C*, *MgLPMO10A*, *AfAA11A/B* og *NcAA9C* katalytisk domene. Blant disse LPMO-ene er *NcAA9C* katalytisk domene og *MgLPMO10A* er spesielt interessante ettersom den førstnevnte kan i teorien analyseres i en stopped-flow med vannløselige substrater som cello-oligosakkarider mens den sistnevnte er termisk stabil opptil ca. 80 °C (Tuveng et al., 2020).

5.3 Oksidaseaktiviteten til fritt kobber og *LsAA9A*

Forsøket på å bruke isotermisk titeringskalorimetri til kinetiske hastighetsbestemmelse av oksidaseaktiviteten (fra tilstand 1 til 5 til 1, figur 5.1.1) til fritt Cu(II) og *LsAA9A* ga ikke resultater som tidligere forventet. Det var forventet at en økning i konsentrasjonen av kobbersulfat skulle resultere i følgende; økning av oksidaseaktiviteten, økt reaksjonshastighet, økt varmeutslag for den første reaksjonsfasen samt hurtigere retur fra utslagsmaksimum til grunnlinjen. Disse forventningene bygget på tidligere beskrivelser av Stepnov et al. (2021) om at mengden av fritt kobber kan relateres til produksjonen av H₂O₂ gjennom en katalytisk oksidasereaksjon ved tilstedeværelse av askorbinsyre.

Den første fasen observert i alle termogrammene er en hurtig reaksjon som tilsynelatende er uavhengig av konsentrasjonen til fritt kobber. Dette kan begrunnes ved at fasen forblir uendret til tross for økningen av mengden kobbersulfat i systemet. Den andre fasen er derimot kobberavhengig og kan skyldes ulike reaksjoner som inngår i koblingen mellom oksidaseaktiviteten til fritt kobber og HRP sin påfølgende peroksidasesereaksjon. For eksempel kan Cu(I) reagere i en peroksidaseaksjon med dannet H₂O₂ som re-oksiderer Cu(I) til Cu(II), i en Fentonreaksjon med dannelse av OH• og H₂O, slik at oksidaseaktiviteten til Cu(II) kan gjenopptas. Det at reaksjonshastigheten minker ved høyere kobberkonsentrasjoner kan muligens ha en sammenheng med en tidligere studie som viste at kobber(D)ioner i vandig løsning, med tilstedeværelse av askorbat, kunne inhibere hemme peroksidaseaktiviteten til HRP (Xianyu et al., 2013).

I nåværende tilstand er ikke metoden egnet for bestemmelse av kinetiske eller termodynamiske parametere som k_{kat} og $\Delta H^{\circ}_{\text{app}}$ uten videre arbeid. Derfor bør metoden optimaliseres før det utføres videre forsøk på å bestemme oksidaseaktiviteten til fritt kobber og LPMO-er med isotermisk titeringskalorimetri. Dette kan gjøres ved å utføre ulike kontrollanalyser. Disse kontrollforsøkene kan inkludere titrering av reduktanten til løsninger av; buffer, HRP, HRP og Amplex® Red og kobbersulfat for å studere komponentenes innvirkning på det totale varmebidraget. Siden varmeutslaget ser ut til å være uavhengig av Cu(II) konsentrasjonen er det sannsynlig at den første fasen i reaksjonsforløpet er en reaksjon mellom L-askorbinsyre og HRP, eller L-askorbinsyre og Amplex® Red. Den første reaksjonen er ikke usannsynlig siden dette vil innebære en reduksjon av Fe(III) i HRP til Fe(II). Støtte for den andre reaksjonen kan ses i lys fra arbeidet til Kont et al. (2020) hvor nærvær av L-askorbinsyre med Amplex® Red gir endringer i resorufindannelse sammenliknet med fravær av L-askorbinsyre. Det anbefales også å utvikle metoden inn mot andre

peroksidaser og substrater enn HRP og Amplex® Red. Videre arbeid bør også utvides med hensikten om å ha anvendelsesverdi for andre kjente LPMO-er og reduktanter.

5.4 Oppsummerende betraktninger og fremtidige perspektiver

Oppdagelsen av LPMO-er sin oksidative nedbrytningsevne av krystallinske polysakkarider har bidratt til et paradigmeskifte innenfor feltet om karbohydrataktive enzymer. Forskningen har siden den gang utviklet nye metoder til bruk innen bioteknologi og anvendbare bioraffineringsprosesser. Likevel er kunnskapen vår om LPMO-er sine reaksjonsmekanismer fremdeles begrenset. For at LPMO-er som *SmAA10A* skal kunne benyttes til bærekraftig produksjon av biodrivstoff fra kitin- og lignocellulose-rik biomasse trengs det mer grunnleggende arbeid og økt forståelse omkring deres reaksjonsmekanismer.

Arbeidet presentert i denne avhandlingen bidrar til det pågående forskningsarbeidet ved å presentere relevante kinetiske data for LPMO-en *SmAA10A*, samt metoder som kan benyttes for videre karakterisering av trinnene i den molekylære mekanismen til LPMO-er. Stopped-flow metodene beskrevet tidligere har vist et potensiale for videre anvendelser, mens ITC-metoden klart krever mer arbeid for at den skal kunne benyttes til måling av oksidaseaktivitet. Datamaterialet tilgjengelig kan antyde at hverken reduksjonen av *SmAA10A* eller H_2O_2 , ved tilstedeværelse av antioksidantene L-askorbinsyre, gallussyre og L-cystein, er hastighetsbestemmende trinn i den molekylære mekanismen til LPMO-er. Dataene viser også at reduksjonshastigheten for *SmAA10A* er avhengig av reduktanten som benyttes.

Referanser

- Agger, J. W., Isaksen, T., Várnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Ludwig, R., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (17): 6287. doi: 10.1073/pnas.1323629111.
- AppliedPhotophysics. (2018). *Stopped-flow technology*. photophysics.com. Tilgjengelig fra: <https://www.photophysics.com/stopped-flow-spectrometry/stopped-flow-technology/> (lest 22.02).
- Armesilla, A. L., Thurston, C. F. & Yagüe, E. (1994). CEL1: a novel cellulose binding protein secreted by *Agaricus bisporus* during growth on crystalline cellulose. *FEMS Microbiology Letters*, 116 (3): 293-299. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06718.x.
- Ayuso-Fernández, I., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Ruiz-Dueñas, F. J. & Martínez, A. T. (2019). Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (36): 17900. doi: 10.1073/pnas.1905040116.
- Badhani, B., Sharma, N. & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*, 5 (35): 27540-27557. doi: 10.1039/C5RA01911G.
- Bagshaw, C. R. (2013). Stopped-Flow Techniques. I: Roberts, G. C. K. (red.) *Encyclopedia of Biophysics*, s. 2460-2466. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Beckham, G. T. & Crowley, M. F. (2011). Examination of the α -Chitin Structure and Decrystallization Thermodynamics at the Nanoscale. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (15): 4516-4522. doi: 10.1021/jp200912q.
- Beckham, G. T., Matthews, J. F., Peters, B., Bomble, Y. J., Himmel, M. E. & Crowley, M. F. (2011). Molecular-Level Origins of Biomass Recalcitrance: Decrystallization Free Energies for Four Common Cellulose Polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (14): 4118-4127. doi: 10.1021/jp1106394.
- 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.
- Bernatek, E., R., Uggerud, E. & Pedersen, B. (2019). *Karbohydrater - kjemi*. Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/karbohydrater_-_kjemi (lest 13.01).

- Bissaro, B., Forsberg, Z., Ni, Y., Hollmann, F., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2016a). Fueling biomass-degrading oxidative enzymes by light-driven water oxidation. *Green Chemistry*, 18 (19): 5357-5366. doi: 10.1039/C6GC01666A.
- Bissaro, B., Røhr, Å. K., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2016b). Fenton-type chemistry by a copper enzyme: molecular mechanism of polysaccharide oxidative cleavage. *bioRxiv*: 097022. doi: 10.1101/097022.
- 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 (10): 1123-1128. doi: 10.1038/nchembio.2470.
- Bissaro, B., Isaksen, I., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G. H. & Røhr, Å. K. (2018). How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. *Biochemistry*, 57 (12): 1893-1906. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00138.
- Bissaro, B., Kommedal, E., Røhr, Å. K. & Eijsink, V. G. H. (2020a). Controlled depolymerization of cellulose by light-driven lytic polysaccharide oxygenases. *Nature Communications*, 11 (1): 890. doi: 10.1038/s41467-020-14744-9.
- Bissaro, B., Streit, B., Isaksen, I., Eijsink, V. G. H., Beckham, G. T., DuBois, J. L. & Røhr, Å. K. (2020b). Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (3): 1504. doi: 10.1073/pnas.1904889117.
- Borisova, A. S., Isaksen, T., Dimarogona, M., Kognole, A. A., Mathiesen, G., Várnai, A., Røhr, Å. K., Payne, C. M., Sørli, M., Sandgren, M., et al. (2015). Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity*. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (38): 22955-22969. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660183>.
- Brander, S., Lausten, S., Ipsen, J. Ø., Falkenberg, K. B., Bertelsen, A. B., Nørholm, M. H. H., Østergaard, L. H. & Johansen, K. S. (2021). Colorimetric LPMO assay with direct implication for cellulolytic activity. *Biotechnology for Biofuels*, 14 (1): 51. doi: 10.1186/s13068-021-01902-4.
- Breslmayr, E., Hanžek, M., Hanrahan, A., Leitner, C., Kittl, R., Šantek, B., Oostenbrink, C. & Ludwig, R. (2018). A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 11 (1): 79. doi: 10.1186/s13068-018-1063-6.

- Breslmayr, E., Daly, S., Požgajčić, A., Chang, H., Rezić, T., Oostenbrink, C. & Ludwig, R. (2019). Improved spectrophotometric assay for lytic polysaccharide monoxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 12 (1): 283. doi: 10.1186/s13068-019-1624-3.
- Breslmayr, E., Laurent, C. V. F. P., Scheiblbrandner, S., Jerkovic, A., Heyes, D. J., Oostenbrink, C., Ludwig, R., Hedison, T. M., Scrutton, N. S. & Kracher, D. (2020). Protein Conformational Change Is Essential for Reductive Activation of Lytic Polysaccharide Monoxygenase by Cellobiose Dehydrogenase. *ACS Catalysis*, 10 (9): 4842-4853. doi: 10.1021/acscatal.0c00754.
- Cannella, D., Möllers, K. B., Frigaard, N. U., Jensen, P. E., Bjerrum, M. J., Johansen, K. S. & Felby, C. (2016). Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. *Nature Communications*, 7 (1): 11134. doi: 10.1038/ncomms11134.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic acids research*, 37 (Database issue): D233-D238. doi: 10.1093/nar/gkn663.
- Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H. & Chan, W. Y. (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 13 (8). doi: 10.3390/md13085156.
- Chikere, C. O., Faisal, N. H., Kong-Thoo-Lin, P. & Fernandez, C. (2020). Interaction between Amorphous Zirconia Nanoparticles and Graphite: Electrochemical Applications for Gallic Acid Sensing Using Carbon Paste Electrodes in Wine. *Nanomaterials*, 10 (3). doi: 10.3390/nano10030537.
- Chylenski, P., Bissaro, B., Sørli, M., Røhr, Å. K., Várnai, A., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. (2019). Lytic Polysaccharide Monoxygenases in Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass. *ACS Catalysis*, 9 (6): 4970-4991. doi: 10.1021/acscatal.9b00246.
- Courtade, G., Wimmer, R., Røhr, Å. K., Preims, M., Felice, A. K. G., Dimarogona, M., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Sandgren, M., Ludwig, R., et al. (2016). Interactions of a fungal lytic polysaccharide monoxygenase with β -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (21): 5922. doi: 10.1073/pnas.1602566113.
- Courtade, G., Forsberg, Z., Heggset, E. B., Eijsink, V. G. H. & Aachmann, F. L. (2018). The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide

- monooxygenase promote localized cellulose oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (34): 13006-13015. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004269>.
- Couturier, M., Ladevèze, 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): 306-310. doi: 10.1038/nchembio.2558.
- Crouch, L. I., Labourel, A., Walton, P. H., Davies, G. J. & Gilbert, H. J. (2016). The Contribution of Non-catalytic Carbohydrate Binding Modules to the Activity of Lytic Polysaccharide Monooxygenases *. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (14): 7439-7449. doi: 10.1074/jbc.M115.702365.
- Darkwa, J., Olojo, R., Chikwana, E. & Simoyi, R. H. (2004). Antioxidant Chemistry: Oxidation of l-Cysteine and Its Metabolites by Chlorite and Chlorine Dioxide. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108 (26): 5576-5587. doi: 10.1021/jp049748k.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859. doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9).
- Dutta, P., Dutta, J. & Tripathi, V. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63: 20-31.
- Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M. & Horn, S. J. (2008). Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends in Biotechnology*, 26 (5): 228-235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.004>.
- Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B. & Vaaje-Kolstad, G. (2019). On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnology for Biofuels*, 12 (1): 58. doi: 10.1186/s13068-019-1392-0.
- Fernandez, J. G. & Ingber, D. E. (2014). Manufacturing of Large-Scale Functional Objects Using Biodegradable Chitosan Bioplastic. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299 (8): 932-938. doi: <https://doi.org/10.1002/mame.201300426>.
- Filiatrault-Chastel, C., Navarro, D., Haon, M., Grisel, S., Herpoël-Gimbert, I., Chevret, D., Fanuel, M., Henrissat, B., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., et al. (2019). AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnology for Biofuels*, 12 (1): 55. doi: 10.1186/s13068-019-1394-y.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2014a). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide

- monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (23): 8446. doi: 10.1073/pnas.1402771111.
- Forsberg, Z., Røhr, Å. K., Mekasha, S., Andersson, K. K., Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G. & Sørli, M. (2014b). Comparative Study of Two Chitin-Active and Two Cellulose-Active AA10-Type Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Biochemistry*, 53 (10): 1647-1656. doi: 10.1021/bi5000433.
- Forsberg, Z., Bissaro, B., Gullesen, J., Dalhus, B., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2018). Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (4): 1397-1412. doi: 10.1074/jbc.M117.817130.
- Forsberg, Z., Sørli, M., Petrović, D., Courtade, G., Aachmann, F. L., Vaaje-Kolstad, G., Bissaro, B., Røhr, Å. K. & Eijsink, V. G. H. (2019). Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59: 54-64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.015>.
- Frandsen, K. E. H., Simmons, T. J., Dupree, P., Poulsen, J.-C. N., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., von Freiesleben, P., et al. (2016). The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature chemical biology*, 12 (4): 298-303. doi: 10.1038/nchembio.2029.
- Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., van Berkel, W. J. H., Gruppen, H. & Kabel, M. A. (2015). Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 8 (1): 101. doi: 10.1186/s13068-015-0284-1.
- Garajova, S., Mathieu, Y., Beccia, M. R., Bennati-Granier, C., Biaso, F., Fanuel, M., Ropartz, D., Guigliarelli, B., Record, E., Rogniaux, H., et al. (2016). Single-domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose. *Scientific reports*, 6: 28276-28276. doi: 10.1038/srep28276.
- Gore, M. (2000). *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry : A Practical Approach*. Practical Approach Series. Oxford: OUP Oxford.
- Halib, N., Perrone, F., Cemazar, M., Dapas, B., Farra, R., Abrami, M., Chiarappa, G., Forte, G., Zanconati, F., Pozzato, G., et al. (2017). Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10 (8): 977. doi: 10.3390/ma10080977.

- Hangasky, J. A., Iavarone, A. T. & Marletta, M. A. (2018). Reactivity of O₂ versus H₂O₂ with polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (19): 4915. doi: 10.1073/pnas.1801153115.
- Harish Prashanth, K. V. & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (3): 117-131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>.
- Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., et al. (2010). Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry*, 49 (15): 3305-3316. doi: 10.1021/bi100009p.
- Hedison, T. M., Breslmayr, E., Shanmugam, M., Karnpakdee, K., Heyes, D. J., Green, A. P., Ludwig, R., Scrutton, N. S. & Kracher, D. (2020). Insights into the H₂O₂-driven catalytic mechanism of fungal lytic polysaccharide monooxygenases. *The FEBS Journal*, n/a (n/a). doi: <https://doi.org/10.1111/febs.15704>.
- Hegnar, O. A., Petrovic, D. M., Bissaro, B., Alfredsen, G., Várnai, A. & Eijsink, V. G. H. (2019). pH-Dependent Relationship between Catalytic Activity and Hydrogen Peroxide Production Shown via Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and environmental microbiology*, 85 (5): e02612-18. doi: 10.1128/AEM.02612-18.
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (5): 660-668. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.006>.
- Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2014). Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature chemical biology*, 10 (2): 122-126. doi: 10.1038/nchembio.1417.
- Hemsworth, Glyn R., Déjean, G., Davies, Gideon J. & Brumer, H. (2016). Learning from microbial strategies for polysaccharide degradation. *Biochemical Society Transactions*, 44 (1): 94-108. doi: 10.1042/BST20150180.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (48): 18089. doi: 10.1073/pnas.0608909103.

- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (1): 45. doi: 10.1186/1754-6834-5-45.
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijsink, V. G. H. & Horn, S. J. (2014). A C4-oxidizing Lytic Polysaccharide Monooxygenase Cleaving Both Cellulose and Cello-oligosaccharides*. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (5): 2632-2642. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530196>.
- Jitnom, J., Lee, V. S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H. A. & Mulholland, A. J. (2011). Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Modeling of Substrate-Assisted Catalysis in Family 18 Chitinases: Conformational Changes and the Role of Asp142 in Catalysis in ChiB. *Biochemistry*, 50 (21): 4697-4711. doi: 10.1021/bi101362g.
- Kalia, S., Boufi, S., Celli, A. & Kango, S. (2014). Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications. *Colloid and Polymer Science*, 292 (1): 5-31. doi: 10.1007/s00396-013-3112-9.
- Karkehabadi, S., Hansson, H., Kim, S., Piens, K., Mitchinson, C. & Sandgren, M. (2008). The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 383 (1): 144-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.016>.
- Karlsen, V. (2017). *Roles of Charged Residues in the Active Site of Lytic Polysaccharide Monooxygenase - Effect on Katalysis*: nmbu.braage.unit.no.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I. & Labidi, J. (2017). On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, 176: 177-186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>.
- Kittl, R., Kracher, D., Burgstaller, D., Haltrich, D. & Ludwig, R. (2012). Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (1): 79. doi: 10.1186/1754-6834-5-79.
- Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, S. D., Xu, F., Hemsworth, G. R., Walton, D. J., Young, N. A., Davies, G. J., Walton, P. H., Johansen, K. S., et al. (2014). Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (24): 8797. doi: 10.1073/pnas.1408115111.

- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P. & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44 (22): 3358-3393. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- Kont, R., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H. & Väljamäe, P. (2020). Kinetic insights into the peroxxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Nature Communications*, 11 (1): 5786. doi: 10.1038/s41467-020-19561-8.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K. G., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G. H. & Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 352 (6289): 1098. doi: 10.1126/science.aaf3165.
- Kurasin, M. & Väljamäe, P. (2011). Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *The Journal of biological chemistry*, 286 (1): 169-177. doi: 10.1074/jbc.M110.161059.
- Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H., Sørli, M. & Väljamäe, P. (2018a). Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (2): 523-531. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817593>.
- Kuusk, S., Bissaro, B., Kuusk, P., Forsberg, Z., Eijsink, V. G. H., Sørli, M. & Väljamäe, P. (2018b). Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 293 (31): 12284. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.AAC118.004796>.
- Lande, B. & Svihus, B. (2020). *Karbohydrater - ernæring*. Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/karbohydrater-ern%C3%A6ring> (lest 13.01).
- Lesk, A. M. (2016). *Introduction to Protein Science - Architecture, Function and Genomics*. 3 utg. New York, NY10016, USA: Oxford University Press.
- 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): 41. doi: 10.1186/1754-6834-6-41.
- Li, X., Beeson, William T., Phillips, Christopher M., Marletta, Michael A. & Cate, Jamie H. D. (2012). Structural Basis for Substrate Targeting and Catalysis by Fungal Polysaccharide Monoxygenases. *Structure*, 20 (6): 1051-1061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.002>.
- Lo Leggio, L., Simmons, T. J., Poulsen, J.-C. N., Frandsen, K. E. H., Hemsworth, G. R., Stringer, M. A., von Freiesleben, P., Tovborg, M., Johansen, K. S., De Maria, L., et al.

- (2015). Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nature Communications*, 6 (1): 5961. doi: 10.1038/ncomms6961.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henriissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42 (Database issue): D490-D495. doi: 10.1093/nar/gkt1178.
- Loose, J. S. M., Arntzen, M. Ø., Bissaro, B., Ludwig, R., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. (2018). Multipoint Precision Binding of Substrate Protects Lytic Polysaccharide Monooxygenases from Self-Destructive Off-Pathway Processes. *Biochemistry*, 57 (28): 4114-4124. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00484.
- Martinez, J. D., Murciano-Calles, J., Cobos, E., S., Iglesias-Bexiga, M., Luque, I. & Ruiz-Sanz, J. (2013). Isothermal Titration Calorimetry: Thermodynamic Analysis of the Binding Thermograms of Molecular Recognition Events by Using Equilibrium Models. I: Elkordy, A. A. (red.) *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*: IntechOpen.
- McCormick, M. C., Keijzer, K., Polavarapu, A., Schultz, F. A. & Baik, M.-H. (2014). Understanding Intrinsically Irreversible, Non-Nernstian, Two-Electron Redox Processes: A Combined Experimental and Computational Study of the Electrochemical Activation of Platinum(IV) Antitumor Prodrugs. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (25): 8992-9000. doi: 10.1021/ja5029765.
- McEvoy, A., Creutzberg, J., Singh, R. K., Bjerrum, M. J. & Hedegård, E. D. (2021). The role of the active site tyrosine in the mechanism of lytic polysaccharide monooxygenase. *Chemical Science*, 12 (1): 352-362. doi: 10.1039/D0SC05262K.
- Meyer, T. E., Przysiecki, C. T., Watkins, J. A., Bhattacharyya, A., Simonsen, R. P., Cusanovich, M. A. & Tollin, G. (1983). Correlation between rate constant for reduction and redox potential as a basis for systematic investigation of reaction mechanisms of electron transfer proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (22): 6740. doi: 10.1073/pnas.80.22.6740.
- Moe, K. (2016). *Elektron paramagnetisk resonans signaturer av CBP21 fra Serratia marcescens med ulike kitinsubstrater*. nmbu.brage.unit.no/: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.
- Müller, G., Chylenski, P., Bissaro, B., Eijsink, V. G. H. & Horn, S. J. (2018). The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of

- a commercial cellulase cocktail. *Biotechnology for Biofuels*, 11 (1): 209. doi: 10.1186/s13068-018-1199-4.
- Nahata, A. (2011). Spectrofluorimetry as an Analytical Tool. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2: 107e. doi: 10.4172/2153-2435.1000107e.
- NMBU. *M30-KJEMI Masteroppgave*. nmbu.no. Tilgjengelig fra: <https://www.nmbu.no/emne/M30-KJEMI> (lest 15.02.).
- O'Sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3): 173-207. doi: 10.1023/A:1018431705579.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J. & Beckham, G. T. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115 (3): 1308-1448. doi: 10.1021/cr500351c.
- Petrović, D. M., Bissaro, B., Chylenski, P., Skaugen, M., Sørli, M., Jensen, M. S., Aachmann, F. L., Courtade, G., Várnai, A. & Eijsink, V. G. H. (2018). Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation. *Protein Science*, 27 (9): 1636-1650. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.3451>.
- Phillips, C. M., Beeson, W. T., Cate, J. H. & Marletta, M. A. (2011). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 6 (12): 1399-1406. doi: 10.1021/cb200351y.
- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999). Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 19 (2): 213-221. doi: <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0852>.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jørgensen, 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*, 108 (37): 15079. doi: 10.1073/pnas.1105776108.
- Rapier, R. (2020). *Fossil Fuels Still Supply 84 Percent Of World Energy — And Other Eye Openers From BP's Annual Review*. Forbes.com. Tilgjengelig fra: <https://www.forbes.com/sites/rrapier/2020/06/20/bp-review-new-highs-in-global-energy-consumption-and-carbon-emissions-in-2019/> (lest 13.01).

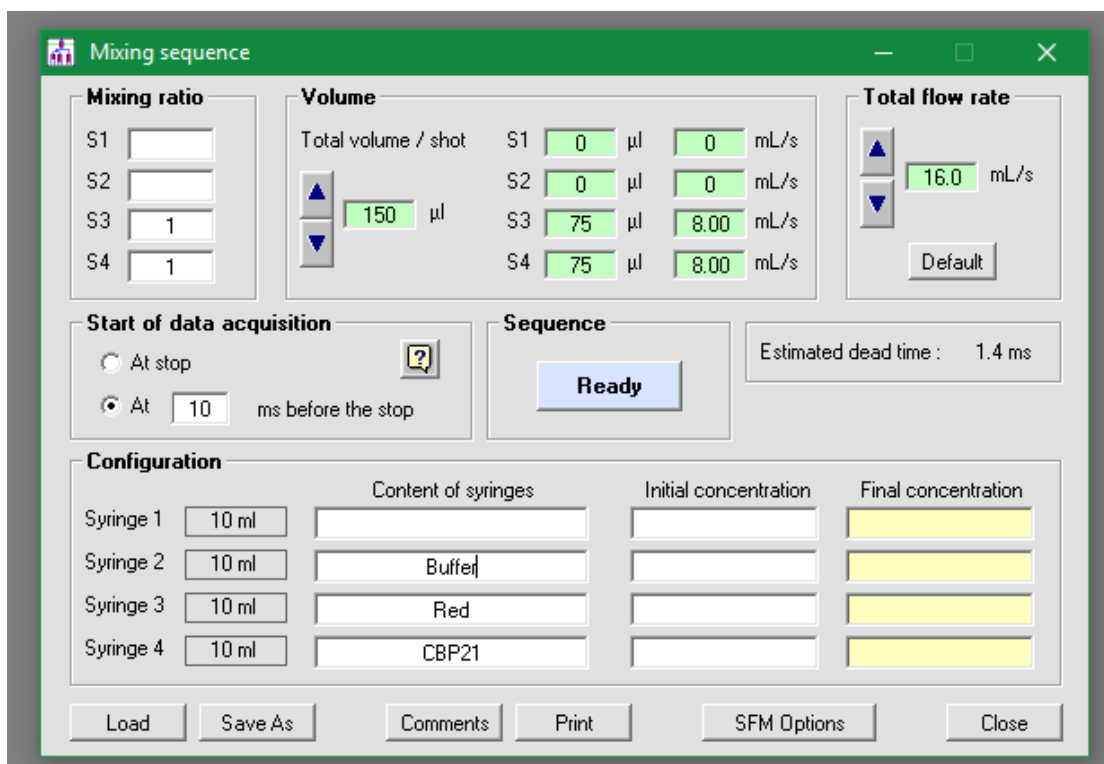
- Rieder, L., Ebner, K., Glieder, A. & Sørli, M. (2021). Novel molecular biological tools for the efficient expression of fungal lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, 14 (1): 122. doi: 10.1186/s13068-021-01971-5.
- Rigo, A., Corazza, A., Luisa di Paolo, M., Rossetto, M., Ugolini, R. & Scarpa, M. (2004). Interaction of copper with cysteine: stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98 (9): 1495-1501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.06.008>.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7): 603-632. doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- Rye, C. S. & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (5): 573-580. doi: [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00135-6).
- 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): 756. doi: 10.1038/s41467-018-03142-x.
- Saez, G., Thornalley, P. J., Hill, H. A. O., Hems, R. & Bannister, J. V. (1982). The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 719 (1): 24-31. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90302-6).
- Sapper, H., Justus-L, S.-O., Paul, H.-H. & Lohmann, W. (1982). The Reversibility of the Vitamin C Redox System: Electrochemical Reasons and Biological Aspects. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 37: 942-946. doi: 10.1515/znc-1982-1015.
- Schnellmann, J., Zeltins, A., Blaak, H. & Schrepf, H. (1994). The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline α -chitin of fungi and other organisms. *Molecular Microbiology*, 13 (5): 807-819. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00473.x>.
- Serrano, J., Cipak, A., Boada, J., Gonzalo, H., Cacabelos, D., Cassanye, A., Pamplona, R., Zarkovic, N. & Portero-Otin, M. (2010). Double-edged sword behaviour of gallic acid and its interaction with peroxidases in human microvascular endothelial cell culture (HMEC-1). Antioxidant and pro-oxidant effects. *Acta Biochim Pol*, 57 (2): 193-8.
- Singh, R. K., Blossom, B. M., Russo, D. A., Singh, R., Weihe, H., Andersen, N. H., Tiwari, M. K., Jensen, P. E., Felby, C. & Bjerrum, M. J. (2020). Detection and Characterization of a Novel Copper-Dependent Intermediate in a Lytic Polysaccharide

- Monooxygenase. *Chemistry – A European Journal*, 26 (2): 454-463. doi: <https://doi.org/10.1002/chem.201903562>.
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, 90 (7): 1171-1202. doi: 10.1021/cr00105a006.
- Stepnov, A. A., Forsberg, Z., Sørli, M., Nguyen, G.-S., Wentzel, A., Røhr, Å. K. & Eijsink, V. G. H. (2021). Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics. *Biotechnology for Biofuels*, 14 (1): 28. doi: 10.1186/s13068-021-01879-0.
- 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: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4826>.
- Sørli, M. (2021). *Veiledningssamtale via Zoom* (Digital samtale 24.03.21).
- Tang, W. J., Fernandez, Javier G., Sohn, Joel J. & Amemiya, Chris T. (2015). Chitin Is Endogenously Produced in Vertebrates. *Current Biology*, 25 (7): 897-900. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.058>.
- TgKScientific. *Stopped-Flow*. We-page. Techniques. hi-techsci.com: TgK Scientific. Tilgjengelig fra: <https://www.hi-techsci.com/techniques/stopped-flow/> (lest 21.02).
- Todd, M. J. & Gomez, J. (2001). Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? *Analytical Biochemistry*, 296 (2): 179-187. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5218>.
- Tuveng, T. R., Jensen, M. S., Fredriksen, L., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G. H. & Forsberg, Z. (2020). A thermostable bacterial lytic polysaccharide monooxygenase with high operational stability in a wide temperature range. *Biotechnology for Biofuels*, 13 (1): 194. doi: 10.1186/s13068-020-01834-5.
- Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., Saake, B., Berrin, J.-G. & Cathala, B. (2017). Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Scientific Reports*, 7 (1): 40262. doi: 10.1038/srep40262.
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D. & Marletta, M. A. (2014). Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2): 562-565. doi: 10.1021/ja409384b.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H. K., Eijsink, V. G. H. & van Aalten, D. M. F. (2005). Crystal Structure and Binding Properties of the *Serratia marcescens* Chitin-binding Protein CBP21*. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11313-11319. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M407175200>.

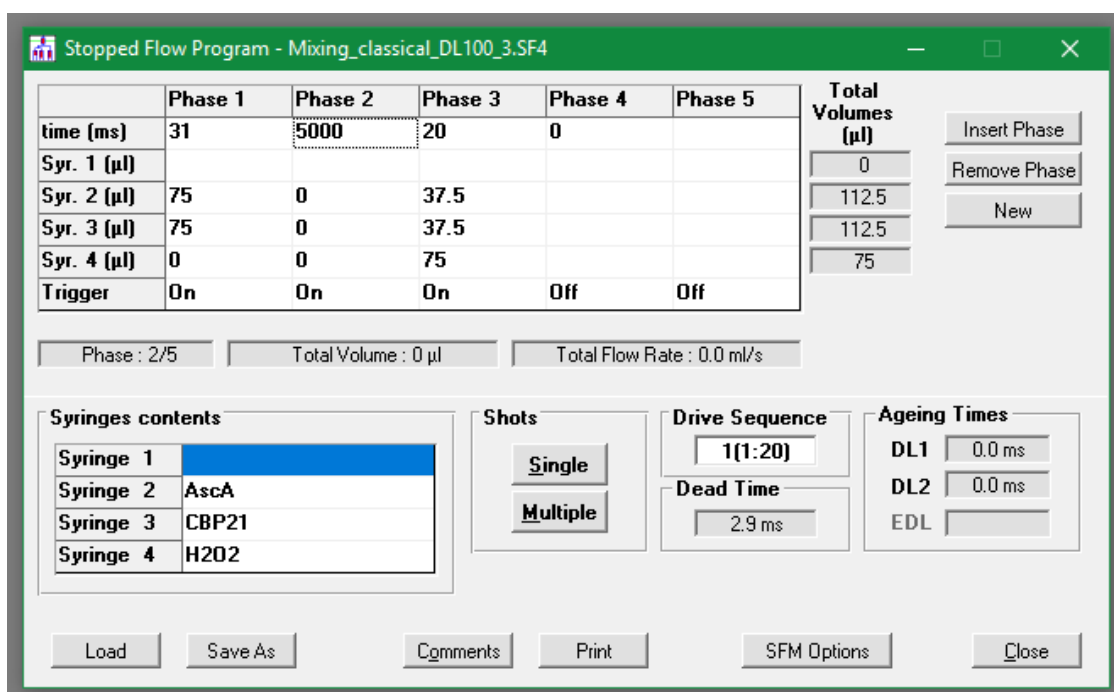
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222. doi: 10.1126/science.1192231.
- Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J. S. M., Bissaro, B. & Eijsink, V. G. H. (2017). Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 44: 67-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012>.
- Wang, B., Wang, Z., Davies, G. J., Walton, P. H. & Rovira, C. (2020). Activation of O₂ and H₂O₂ by Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *ACS Catalysis*, 10 (21): 12760-12769. doi: 10.1021/acscatal.0c02914.
- Westereng, B., Cannella, D., Wittrup Agger, J., Jørgensen, H., Larsen Andersen, M., Eijsink, V. G. H. & Felby, C. (2015). Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Scientific Reports*, 5 (1): 18561. doi: 10.1038/srep18561.
- Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (3): 295-299. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.007>.
- Wolfenden, R., Lu, X. & Young, G. (1998). Spontaneous Hydrolysis of Glycosides. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (27): 6814-6815. doi: 10.1021/ja9813055.
- Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R. & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96 (18): 1959-1966. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>.
- Xianyu, Y., Zhu, K., Chen, W., Wang, X., Zhao, H., Sun, J., Wang, Z. & Jiang, X. (2013). Enzymatic Assay for Cu(II) with Horseradish Peroxidase and Its Application in Colorimetric Logic Gate. *Analytical Chemistry*, 85 (15): 7029-7032. doi: 10.1021/ac401925j.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Vårum, K. M., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *The Journal of biological chemistry*, 284 (16): 10610-10617. doi: 10.1074/jbc.M900092200.
- Zakariassen, H., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2010). Signatures of activation parameters reveal substrate-dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase. *Carbohydrate Polymers*, 81 (1): 14-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.048>.

- Aachmann, F. L., Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monoxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (46): 18779. doi: 10.1073/pnas.1208822109.
- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs*, 8 (5). doi: 10.3390/md8051482.

Vedlegg



Vedlegg 1. Innstillinger (avansert modus) for enkel blandingsmodus brukt til reduksjonsanalyser av *SmAA10A* som beskrevet i del 3.3.1.



Vedlegg 2. Innstillinger (klassisk modus) for dobbel blandingsmodus brukt til innledende re-oksidasjonsanalyser av *SmAA10A* med L-askorbinsyre og gallussyre som beskrevet i del 3.3.2. Tiden i fase 2 ble satt til 45000 ms for å oppnå fullstendig reduksjon av *SmAA10A* med gallussyre.

Stopped Flow Program - Mixing_classical_DL100_Cys.SF4

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5	Total Volumes (µl)
time (ms)	31	7000	20	0		0
Syr. 1 (µl)						150
Syr. 2 (µl)	100	0	50			150
Syr. 3 (µl)	100	0	50			100
Syr. 4 (µl)	0	0	100			
Trigger	On	On	On	Off	Off	

Phase : 1/5 Total Volume : 200 µl Total Flow Rate : 6.452 ml/s

Syringes contents

Syringe 1	
Syringe 2	Cys
Syringe 3	CBP21
Syringe 4	H2O2

Shots: Single, Multiple

Drive Sequence: 1(1:20)

Dead Time: 2.2 ms

Ageing Times: DL1: 0 ms, DL2: 0 ms, EDL:

Buttons: Load, Save As, Comments, Print, SFM Options, Close

Vedlegg 3. Innstillinger (klassisk modus) for dobbel blandingsmodus brukt til innledende re-oksidasjonsanalyser av *SmAA10A* med L-Cystein som beskrevet i del 3.3.2.

Stopped Flow Program - Cysreox2.SF4

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5	Total Volumes (µl)
time (ms)	31	9500	500	20		0
Syr. 1 (µl)					300	112.5
Syr. 2 (µl)	75	0		37.5		112.5
Syr. 3 (µl)	75	0		37.5		75
Syr. 4 (µl)	0	0		75		
Trigger	Off	Off	On	On	Off	

Phase : 2/5 Total Volume : 0 µl Total Flow Rate : 0.0 ml/s

Syringes contents

Syringe 1	
Syringe 2	Red
Syringe 3	CBP21
Syringe 4	H2O2

Shots: Single, Multiple

Drive Sequence: 1(1:20)

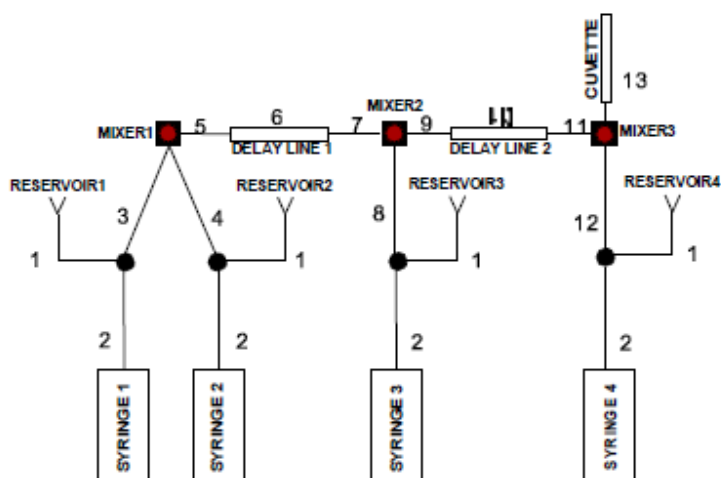
Dead Time: 2.9 ms

Ageing Times: DL1: 0.0 ms, DL2: 0.0 ms, EDL:

Buttons: Load, Save As, Comments, Print, SFM Options, Close

Vedlegg 4. Innstillinger (klassisk modus) for dobbel blandingsmodus brukt til re-oksidasjonsanalyser av *SmAA10A* med L-Cystein som beskrevet i del 3.3.2. Tiden i fase 2 ble satt til 7000 ms og 50000 ms for henholdsvis L-askorbinsyre og gallussyre i overensstemmelse med tiden som krevdes for å oppnå fullstendig reduksjon av *SmAA10A*. Tidene ble bestemt ut fra resultatene i del. 3.3.1. Fase 4 innebærer vasking av hele systemet med 300 µL anaerob buffer.

SFM-4000/S FLOW LINE VOLUMES	
Line Number	Flow Line Volume (μl)
1	42
2	5
3	37
4	39
5	8
6	Delay Line 1
7	7
8	47
9	8
10	Delay Line 2
11	11
12	62
13	Cuvette (Figure 5)

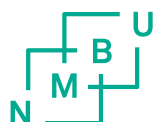


	DELAY LINE AND INTERMIXER VOLUMES*				
	Delay Line				
	None	N ^o 1(10)	N ^o 2(50)	N ^o 3(100)	N ^o 4(200)
Volume (μl)	0	10	50	100	200
Intermixer Volume M1 _{BB} – M2 _{BB} (μl)	16	27	66	116	216
Intermixer Volume M2 _{BB} – M3 _{BB} (μl)	20	30	70	120	220
Intermixer Volume M2 _{BB} – M3 _{HDS} (μl)	18	29	68	118	218

*Notes: Intermixer volumes are measured from the mixing point of one mixer to the mixing point of the next mixer. BB indicates a Berger Ball mixer has been installed at the position noted. HDS indicates a High Density mixer has been installed at that position.

Figure 11: SFM-4000/S Flow Line and Delay Line Volumes

Vedlegg 5. Skjematisk oversikt av Stopped-flow spektrofotometer 4000. Inkluderer de fire sprøytene, mulige blandere og forsinkelseslinjer som kan installeres for å gjennomføre analyser av ulike typer i sekvensiell blandingsmodus. Tabellene viser volum i ulike deler av stopped-flow spektrofotometeret og i overgangene mellom delene.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway