

***Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaasi
biokeemiline iseloomustamine ligniini väärimise seisukohalt**

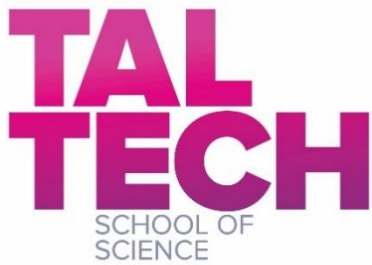
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Ander Erik

Juhendaja: Kairit Zovo, KBI teadur

Kaasjuhendaja: Tiit Lukk, KBI vanemteadur

Õppekava: LAAB20



The biochemical characterization of *Thermoanaerobaculum aquaticum* catalase-peroxidase in the context of lignin valorization

Bachelor thesis

Student: Ander Erik

Supervisor: Kairit Zovo, KBI Researcher

Co-supervisor: Tiit Lukk, Senior Researcher

Study programm: LAAB20

Tallinn 2023

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Ander Erik

[digiallkirjastatud]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kairit Zovo

[digiallkirjastatud]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1 Lignotselluloos.....	8
1.2 Peroksüdaasid.....	9
1.3 Katalaasid.....	9
1.4 Katalaas-peroksüdaasid.....	9
1.5 Ekstremofiilid ja ligninolüütilised ensüümid.....	11
1.5.1 <i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i>	12
1.6 Ligniini eraldamine, kasutamine ja väärindamine.....	13
2. Töö eesmärgid.....	15
3. Materjalid ja meetodid.....	16
3.1 <i>TaKatG</i> ekspressioon <i>E. coli</i> 's.....	16
3.2 <i>E. coli</i> rakkude lüüs.....	16
3.3 Ensüümi puhastamine kasutades nikkel-afiinsuskromatograafiat.....	16
3.4 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees.....	17
3.5 <i>TaKatG</i> heemiga rekonstrueerimine.....	17
3.6 Geelfiltratsioon.....	17
3.7 Valgu kontsentreerimine.....	17
3.8 <i>TaKatG</i> peroksüdaasne aktiivsus.....	17
3.8.1 DMP.....	18
3.8.2 ABTS.....	18
3.9 <i>TaKatG</i> katalaasne aktiivsus.....	18
3.10 <i>TaKatG</i> termostabiilsus.....	19
3.11 Ligniini inkubeerimine <i>TaKatG</i> -ga.....	19
3.12 Kõrgsurvedelikkromatograafia.....	19
4. Tulemused.....	20
4.1 <i>TaKatG</i> ekspressioon ja puhastamine.....	20
4.1.1 Nikkel-afiinsuskromatograafia.....	20
4.1.2 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees.....	21
4.1.3 Geelfiltratsioon.....	21
4.2 <i>TaKatG</i> peroksüdaasne aktiivsus.....	22

4.2.1 DMP.....	22
4.2.2 ABTS	24
4.3 <i>Ta</i> KatG katalaasne aktiivsus	26
4.4 <i>Ta</i> KatG termostabiilsus	27
4.5 Kõrgsurvevedelikkromatograafia	29
5. Arutelu	31
Kokkuvõte.....	32
Abstract	33
Tänuavaldused	34
Kasutatud kirjandus	35

Kasutatud lühendid

ABTS – 2,2'-asino-bis(3-etuülbensotiasoliin-6-sulfoonhape) diammooniumsool

BHT – butüleeritud hüdroksütolueen

DMP – 2,6-dimetoksüfenool

E. coli – *Escherichia coli*

H₂O₂ – vesinikperoksiid

IPTG – isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid

Kan – kanamütsiin

KatG – katalaas-peroksüdaas

k_{cat} – katalüütiline konstant

k_{cat}/K_m – spetsiifilisuse konstant

K_i – inhibitsiooni konstant

K_m – Michaelise konstant

MYW kofaktor – metioniin-türosiin-trüptofaan kofaktor

Mn – arvkeskmine molekulmass

Mw – masskeskmine molekulmass

PDI – polüdisperssuse aste

rpm – *revolution per minute* e. pööret minutis

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees

TaKatG – *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaas

THF – tetrahüdrofuraan

V_{max} – ensüümreaktsiooni maksimumkiirus

Sissejuhatus

Lignotselluloosne biomass koosneb kolmest taime rakukesta koostises olevast biopolümeerist: tselluloosist, hemitselluloosist ja ligniinist. Ligniin omakorda koosneb omavahel ristsidestatud *p*-kumarüül-, koniferüül- ning sinapüülalkoholist, mis moodustavad *p*-hüdrosüfenüül (H), guaiatsüül (G) ja süringüül ühikud (S). Ligniin annab taimerakkudele tugevuse ning kaitseb tselluloosi ja hemitselluloosi hüdrolyüsi eest. Senini on biomassist tööstuslikult kasutatud eelkõige tselluloosi ja hemitselluloosi ning ligniini on käsitletud pigem kui mittesobivat kõrvalprodukti.

Ligniini koostises olev süsinik moodustab ligikaudu kolmandiku kogu maailma orgaanilisest süsinikust (v.a fossiilsed kütused), seetõttu omab ligniin suurt potentsiaali toorainena nii keemiatööstusele kui ka eri materjalide tootjatele. Peamiseks probleemiks ligniini lagundamisel ja kasutamisel on selle struktuuri keerukus, koostise varieeruvus, heterogeensus ning limiteeritud lahustuvus erinevates solventides. Lisaks erinevatele füüsikalise-keemilistele meetoditele on ligniini võimalik lagundada ka kasutades mikroorganismide poolt sünteesitud oksüdatiivseid ensüüme. Selliste ligninolüütiliste ensüümide hulka kuuluvad näiteks lakaasid ja peroksüdaasid.

Katalaas-peroksüdaasid on erilised bifunktsionaalsed ensüümid, mis omavad nii katalaas kui ka peroksüdaas aktiivsust. Neil on üks aktiivtsenter, mille bifunktsionaalsus sõltub kahest teineteisest sõltuvast kofaktorist. Esimene bakteriaalne katalaas-peroksüdaas, millel näidati ligniini lagundavat aktiivsust pärines organismist *Amycolatopsis sp. 75iv2* (Brown et al., 2011) .

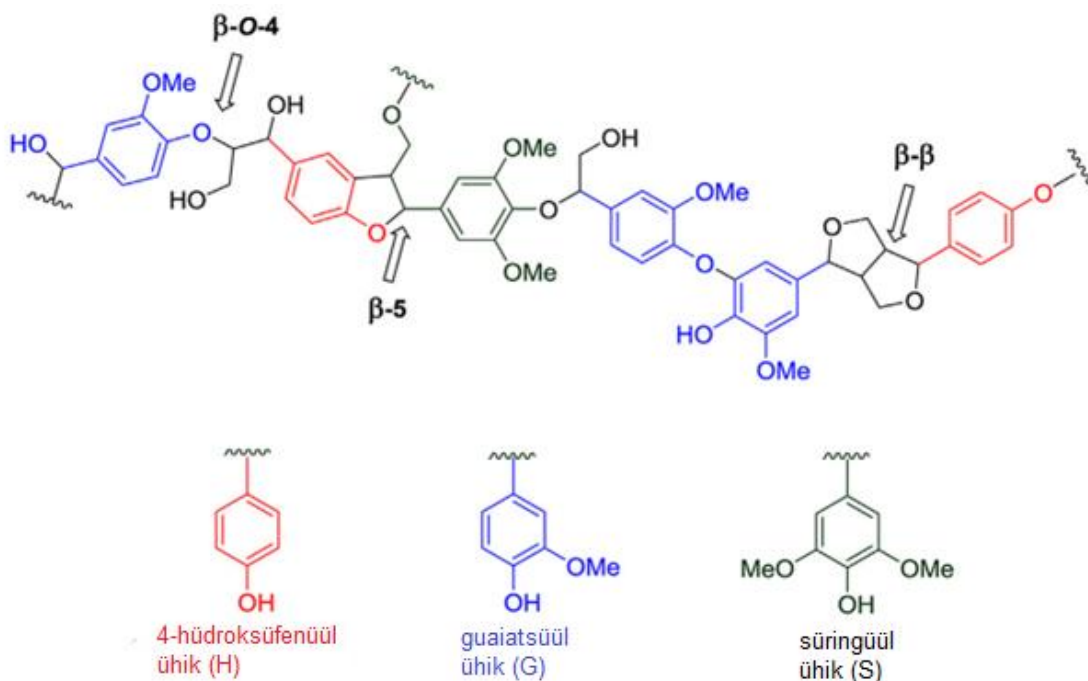
Antud töö eesmärgiks oli uurida termofiilsest bakterist *Thermoanaerobaculum aquaticum* pärinevat katalaas-peroksüdaasi, mida saaks potentsiaalselt kasutada ligniini lagundajana tööstuslikes tingimustes. *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaasi uurimiseks ekspresseeriti ning puhastati ensüüm, uuriti tema katalüütilist aktiivsust, vastupidavust kõrgendatud temperatuuridele ja võimet ligniini lagundada väiksemateks fragmentideks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Lignotselluloos

Lignotselluloos on põhiline rakkestades leiduv struktuurne komponent kõrgemates taimedes. See koosneb kolmest biopolümeerist: tselluloos (40–60%), hemitselluloos (10–40%) ja ligniin (15–30%) (Zhu et al., 2022). Kui tselluloos ja hemitselluloos on polüsahhariidid, siis ligniin on hargnev aromaadne polümeer (de Gonzalo et al., 2016; Chauhan, 2020). Tselluloos on lineaarne homopolümeer, mis koosneb β -1,4 sidestatud glükoosi monomeeridest, kuid hemitselluloos on heteropolümeer, mis võib koosneda erinevatest C5 ja C6 suhkrutest (Cao et al., 2018).

Ligniini on teine kõige levinum orgaaniline polümeer tselluloosi järel. Ligniini annab taimerakkudele tugevuse ja kaitseb tselluloosi ja hemitselluloosi hüdrolyüsi eest (de Gonzalo et al., 2016). Ligniini polümeer moodustub kolmest erinevast monolignoolist: *p*-kumarüülalkohol, koniferüülalkohol ja sinapüülalkohol, mis erinevad üksteisest metoksü-rühmade arvu poolest. Nendest moodustuvad oksüdatiivse ristsidestamise käigus ligniini põhilised ehituskivid: *p*-hüdrosüfenüül (H), guaiatsüül (G) ja süringüül (S) ühikud (Korányi et al., 2020), mis on omavahel ühendatud erinevate eeter- ja süsinik-süsinik sidemetega (nt β -O-4, β - β ja β -5) (Joonis 1). Ligniini koostis sõltub taime liigist (lehtpuu, okaspuu, rohhtaim) ja taimekoostisest. Kõrgemates taimedes katalüüsivad monolignoolide polümerisatsiooni lakaasid või muud oksüdaasid (de Gonzalo et al., 2016).



Joonis 1. Näide ligniini struktuurist, mille moodustavad *p*-hüdrosüfenüül (H), guaiatsüül (G) ja süringüül ühikud (S), mis on ühendatud ligniinis enim esinevate sidemetega (de Gonzalo et al., 2016).

Taimne biomass on taastuv süsinikuallikas, millest saab toota nii kütuseid kui ka erinevaid kemikaale. Aastas kasvab juurde umbes 100 miljardit tonni taimset biomassi (Naik et al., 2010). Enamus selles sisalduvast süsinikust on seotud biopolümeeride (tselluloos, hemitselluloos, ligniin) struktuuri (Brown et al., 2011). Ligniin on neist biopolümeeridest keemiliselt kõige keerukam oma varieeruva koostise ja erinevate C-C ja eetersidemete tõttu (Brown et al., 2011; Chio et al., 2019). Looduses toimub taimse biomassi koostises oleva ligniini lagundamine erinevate organismide (seened ja bakterid) abil, kes toodavad kas rakusiseseid või sekreteeritavaid oksüdatiivseid ensüüme (Brown et al., 2011).

1.2 Peroksüdaasid

Peroksüdaasid lagundavad erisuguseid peroksiide (kõige tavalisemalt vesinikperoksiidi), et oksüdeerida orgaanilisi ja anorgaanilisi substraate. Peroksüdaase iseloomustab nende katalüütiline mitmekesisus ja nende võime oksüdeerida väga erinevaid substraate nagu näiteks fenoole ja aroomaatseid amiine. Selliseid ensüüme võime leida taimedest, bakteritest ning seene- ja loomariigist. Kõige rohkem kommertsiaalselt kasutatust leidnud peroksüdaasiks võib pidada mädarõika peroksüdaasi. (de Oliveira et al., 2021)

Tselluloosi ja hemitselluloosi saab ensümaatiliselte lagundada glükosiidhüdrolaaside abil. Ligniin on hüdroolüüsi suhtes vastupidav ning tema lagundamine sõltub oksüdatiivsetest ensüümidest (Wang et al., 2018). Sellised oksüdatiivseid ensüüme nimetatakse ligninolüütilisteks ensüümideks ning need on looduses laialt levinud. Siia kuuluvad lakaasid ja erinevad peroksüdaasid nagu ligniinperoksüdaasid, mangaanperoksüdaasid, mitmekülgsed peroksüdaasid ja värvi eemaldavad peroksüdaasid (Wang et al., 2018).

1.3 Katalaasid

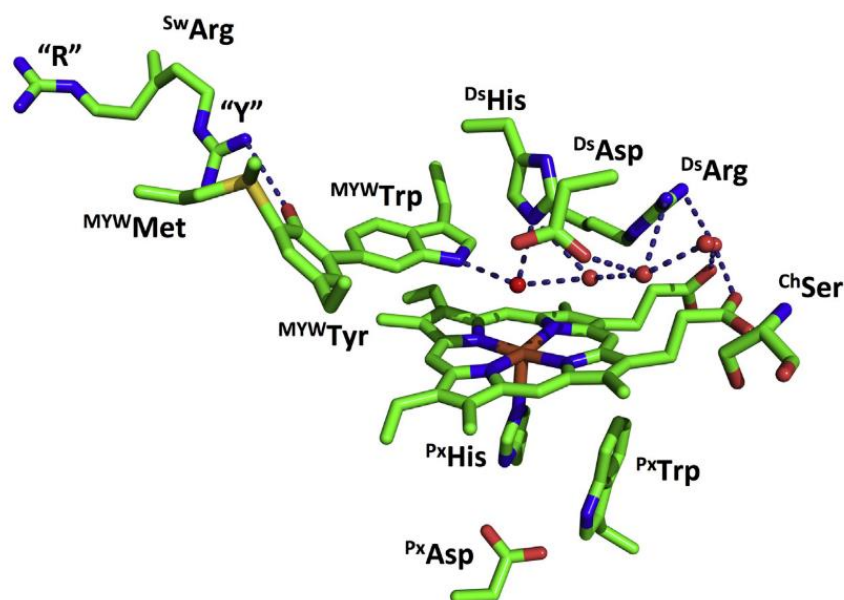
Katalaasid on evolutsiooniliselt väga vanad ensüümid, mis kaitsevad organismi vesinikperoksiidist tuleneva ülimalt reaktiivse hüdroksüülradikaali eest. Katalaase saab fülogeneetiliselt jaotada kolmeks: heemi sisaldavad katalaasid, heemi sisaldavad katalaas-peroksüdaasid ja mangaani sisaldavad katalaasid (Loewen et al., 2015). Katalaasid eksisteerivad peaaegu kõikidest aeroobsetes ning paljudes anaeroobsetes organismides. Vähesel määral on katalaasid aktiivsust leitud ka heemisaldavates valkudes, mis ei klassifitseeru katalaaside alla (Chelikani et al., 2004).

1.4 Katalaas-peroksüdaasid

Katalaas-peroksüdaasid (KatG) on ensüümid (EC 1.11.1.21), millel on nii katalaasne kui ka peroksüdaasne aktiivsus (Claiborne & Fridovich, 1979), kasutades selleks ühte aktiivtsentrit (Ndontsa et al., 2012). Esimene KatG struktuur avaldati 2002. aastal (Yamada et al., 2002), mis kinnitas juba järjestuse põhjal saadud infot, et KatG-del puudub struktuurne sarnasus monofunktsionaalsete heem-katalaasidega, olles struktuurilt sarnased pigem taime peroksüdaasidega (Njuma et al., 2014). KatG-d kuuluvad (koos tsütokroom C peroksüdaasi, askorbaadi peroksüdaasi ja mädarõika peroksüdaasiga) klass I mitteloomsete peroksüdaaside superperekonda. KatG on ainuke esindaja oma superperekonnas, mille katalaasne aktiivsus on võrreldav monofunktsionaalsete katalaaside omaga

(Ndontsa et al., 2012). Ka KatG-de peroksüdaasne aktiivsus on võrreldav teiste superperekonda kuuluvate ensüümide omaga (Njuma et al., 2017).

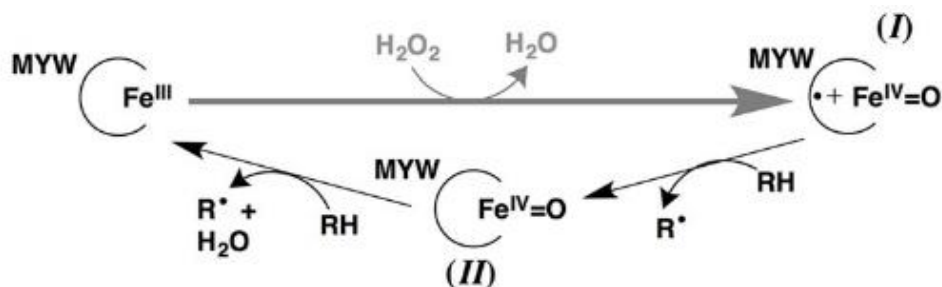
KatG-de märkimisväärne katalüütiline mitmekülgus ning aktiivtsentri bifunktsionaalsus peitub kahe teineteisest sõltuva kofaktori koostööst. Nendeks kofaktoriteks on heem ja KatG-dele iseloomulik metioniin-türosiin-trüptofaan (MYW) järjestus (Joonis 2). Asendades MYW-järjestuses ükskõik millise kolmest aminohappest mõne teisega, väheneb oluliselt katalaasne aktiivsus, kuid peroksüdaasne aktiivsus säilib. Heem üksi ei suuda KatG-le anda katalaasest aktiivsust, kuid heemi olemasolu on vajalik ensüümi katalaasse aktiivsuse jaoks. KatG aktiivtsenter on väga sarnane samasse superperekonda kuuluvate peroksüdaaside aktiivtsentritega. Samas on KatG aktiivtsentril ka märkimisväärsed erinevusi. Näiteks on KatG aktiivtsentri läheduses kaks suurt lingu, mis muudavad ligipääsu aktiivtsentri heemile palju kitsamaks, kui on omane peroksüdaasidele (Njuma et al., 2017). Ka MTW-järjestus on omane vaid KatG-dele, see puudub teistel samasse klassi kuuluvatel peroksüdaasidel nagu tsütokroom C peroksüdaas ja askorbaadi peroksüdaas (Njuma et al., 2014). MYW kofaktori struktuur on väga tundlik keskkonna pH-le selle läheduses oleva arginiini tõttu, mille konformatsioon on pH-st sõltuv („R“ ja „Y“ konformatsioonid, Joonis 2) (Njuma et al., 2014).



Joonis 2. Katalaas-peroksüdaasi aktiivtsenter. Px – proksimaalses osas paiknevad aminohapped (nt ^{Px}His). Ds – distaalses osas paiknevad aminohapped (nt ^{Ds}His). MYW - metioniin-türosiin-trüptofaan kofaktorisse kuuluvad aminohapped (nt ^{MYW}Trp). ^{Sw}Arg – pH-st sõltuv arginiini „lüliti“. „R“ and „Y“ – arginiini „lüliti“ erinevad konformatsioonid olenevalt keskkonna pH-st. ^{Ch}Ser – aktiivtsentri juurdepääsu kanalisse kuuluv seriin. Punased kerad – veemolekulid. Punktiiriga on näidatud aktiivtsentri olulised vesiniksidemed (muudetud, Njuma et al., 2014).

Kuna KatG-de aktiivtsenter on täiesti erinev tüüpiliste katalaaside omast, siis võib järeldada, et ka nende katalaasne mehhanism on klassikaliste katalaaside omast erinev. KatG-de täielikku katalaasset mehhanismi pole veel lõplikult kindlaks tehtud. On teada, et KatG alustab oma katalaasset või peroksüdasset tsükli alati ühte moodi, kui puhkeolekus ensüümi oksüdeeritakse vesinikperoksiidi abil (moodustub *Compound I*) (Joonis 3). Selline esimene etapp on omane nii tavalistele heemi sisaldavatele katalaasidele, peroksüdaasidele kui ka KatG-dele. Kuidas KatG-de katalaasne mehhanism edasi läheb, selles pole veel konsensusele jõutud. (Njuma et al., 2017)

KatG omab klassikalist peroksüdaasset reaktsioonimehhanismi (ping-pong mehhanism). Esmalt oksüdeeritakse vesinikperoksiidi abil puhkeolekus ensüüm (moodustub kation radikaal ehk *Compound I*) (I), Joonis 3). Seejärel oksüdeeritakse substraat ja moodustub *Compound II* (II), Joonis 3), millele järgneb veel ühe substraadi oksüdatsioon ning ensüüm naaseb puhkeolekusse (Joonis 3). (Njuma et al., 2014)

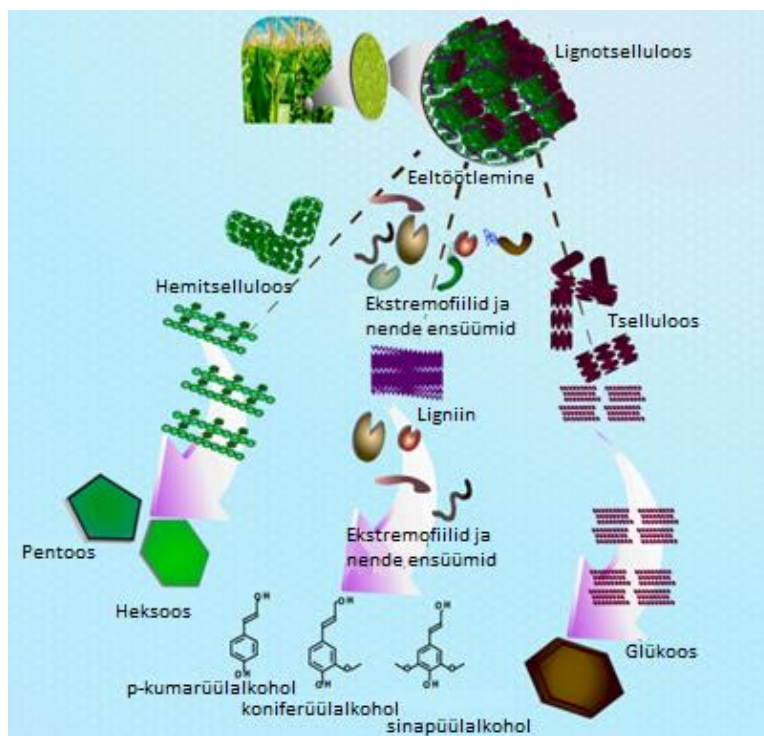


Joonis 3. Katalaas-peroksüdaasi peroksüdaasne reaktsioon. *Compound I* (I) moodustumine (näidatud halliga) on ühine nii katalaasile kui peroksüdaasile rajale. Klassikalisele peroksüdaasile mehhanismile omane *Compound II* (II) moodustumine ning puhkeolekusse tagasi jõudmine on näidatud musta noolega (Njuma et al., 2017).

KatG on ka oksüdüreduktaas, mis substraadi oksüdeerimiseks vajab kofaktorina heemi ning kosubstraadina kasutab vesinikperoksiidi. Esimene bakteriaalne KatG, millel näidati ligniini lagundavat aktiivsust, pärines organismist *Amycolatopsis sp. 75iv2* (Brown et al., 2011), (Chauhan, 2020). Mikroorganismi *T. xylanilyticus*'e katalaas-peroksüdaas suudab aga oksüdeerida ligniinist saadud madalmolekulaarseid aroomaatseid ühendeid (Fall et al., 2023).

1.5 Ekstremofiilid ja ligninolüütilised ensüümid

Ekstremofiilid on mikroorganismid, kes suudavad elada äärmuslikes keskkonnatingimustes. Ekstremofiilid pakuvad teadlastele huvi, kuna nende poolt toodetud ensüümid suudavad taluda erinevaid äärmuslikke tingimusi nagu kõrgeid temperatuure, ekstreemseid pH väärtusi, toksilisi fenoolseid komponente (tekivad näiteks ligniini töötlemisel), hapnikuvaegust ja/või kõrget osmootset rõhku. Selliseid mikroorganisme võime leida süvamerest, kuumaveeallikatest, kaevandustest, polaarialadelt, reoveest ja mujalt. (Zhu et al., 2022)

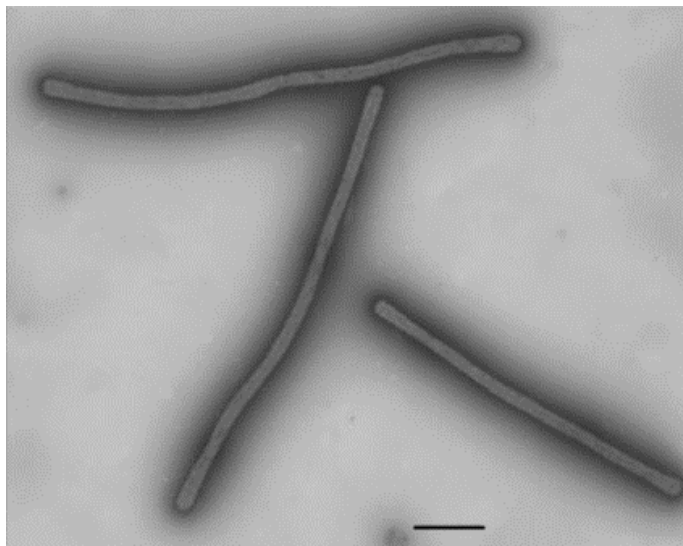


Joonis 4. Lignotselluloosse biomassi töötlemise ahel (Zhu et al., 2022).

Põhilised mikroorganismid, kes suudavad ligniini depolümeeriseerida, on seened ja bakterid. Need mikroorganismid toodavad nii rakusiseseid kui ka sekreteeritavaid ligninolüütilisi ensüüme. Ligniini lagundamise teevad võimalikuks erinevad oksüdatiivsed ensüümid. Peamised ligniini depolümeeriseerivad ensüümid on lakaasid, mangaanperoksüdaasid, ligniinperoksüdaasid, mitmekülgsed peroksüdaasid ja värvi eemaldavad peroksüdaasid (Zhang et al., 2022). Täiendavalt osalevad ligniini lagundamisel veel mitmesuguseid abiensüümid, mis toodavad erinevaid ühendeid (nt kosubstraat vesinikperoksiidi, mida vajavad peroksüdaasid) ja metaboliite (nt happed), mis stabiliseerivad ensüüm-tekitatud radikaale. Lisaks osalevad ligniini struktuuri lagundamisel kaudsetl ka ensüümid, mis tekitavad reaktiivseid ühendeid (Weiss et al., 2020), (Fall et al., 2023). Ekstreemofiilsetest organismidest eraldatud ensüümid on sobivad kandidaadid ligniini depolümeeriseerimiseks ja rakendamiseks tööstuslikes (äärmuslikes) tingimustes (Joonis 4) (Zhu et al., 2022).

1.5.1 *Thermoanaerobaculum aquaticum*

Acidobacteria hõimkonda kuuluv *Thermoanaerobaculum aquaticum* (Joonis 5) isoleeriti algselt Ameerika Ühendriikide Hot Spring rahvusparkis asuvast kuumaveeallikast. *Thermoanaerobaculum aquaticum* (MP-01^T tüvi) on Gram-negatiivne anaeroob, mille genoomi G + C sisaldus on 62,7%. Mitteliikuvad ja pikliku kujuga rakud (3,5–8 µm pikad ja 0,2–0,3 µm laiad) ei moodusta spore ning jagunevad binaarselt.



Joonis 5. Elektronmikroskoopia pilt *Thermoanaerobaculum aquaticum* tüvest MP-01^T. Mõõtkava 1 µm (Losey et al., 2013).

T. aquaticum kasvab temperatuuril 50–65 °C, pH-vahemikus 6,0–8,0 ja 0–0,5%-se (w/v) soola (NaCl) kontsentratsiooni juures. Optimaalsetes tingimustes (60 °C; pH 6,5; 0% NaCl) on organismi generatsiooniaeg ligikaudu 8,9 h ning maksimaalne rakutihedus $8,0 \cdot 10^7$ ml⁻¹. (Losey et al., 2013)

1.6 Ligniini eraldamine, kasutamine ja väärindamine

Fossiilse tooraine varude ammendumine ja selle negatiivne mõju keskkonnale on suunanud teadlaskonda uurima alternatiivseid ning taastuvaid keskkonnasõbralikke ressursse. Lignotselluloosne biomass võiks olla selleks taastuvaks süsinikuallikaks. Siiani on biomassist peamiselt kasutatud ainult tselluloosi ja hemitselluloosi ning ligniini on peetud pigem kasutuks kõrvalproduktiks, mida reeglina põletatakse energia saamiseks. (Fall et al., 2023)

Tööstuses (nt paberi tootmine) kasutatakse taimsest biomassist (nt puit) tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini eraldamiseks eeltötlust, milleks on traditsioonilised mehaanilised ja keemilised meetodeid. Samas, traditsiooniliste meetodite kombineerimine bioloogiliste eeltötlusprotsessidega (mikroorganismide või ensüümidega) võimaldaks nimetatud komponente biomassist efektiivsemalt ja terviklikumalt (vähem keemilisi modifikatsioone) eraldada. Lisaks peetakse bioloogilisi eeltötlusprotsesse ka keskkonnasõbralikumateks, kuna need tekitavad vähem toksilisi jääke (Joonis 4). (Zhu et al., 2022)

Ligniini struktuuris sisalduv süsinik moodustab umbes 30% kogu maailma (v.a fossiilne süsinik) orgaanilisest süsinikust. Tselluloosi- ja paberitööstus toodab jääkproduktina aastas ligikaudu 50 miljonit tonni ligniini, mida saaks väärindada (põletamise asemel). Ligniin on sobilik tooraine, et tööstuslikult toota mitmeid materjale või materjalide komponente, näiteks süsinikkiudu, vaiku, emulgaatoreid, bioplastikut, kütuseid, vahтусid jne. Lisaks vabanevad ligniini depolümeeriseerimisel väärtuslikud aromaatsed ühendid, mis oleks alternatiiviks fossiilsest toorainest toodetud

aromaatsetele ühenditele ning kemikaalidele (aromaatsed alkoholid, aldehüüdid, happed, benseen, toluen, ksüleenid). (Weiss et al., 2020)

Ligniini tööstuslikku kasutamist raskendavad selle struktuuri keerukus, koostise varieeruvus, heterogeensus, piiratud lahustuvus ning eeltötluse käigus tekkinud keemilised modifikatsioonid (Weiss et al., 2020). Seetõttu on oluline leida uusi tõhusaid mikroorganisme või neist pärit ensüüme, mis taluksid äärmuslikke tööstuslikke tingimusi (kõrge temperatuur, äärmuslik pH jne), et ligniini depolümeeriseerida ja väärandada (Zhu et al., 2022).

2. Töö eesmärgid

1. *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaasi (*TaKatG*) ekspressioon ja puhastamine.
2. *TaKatG* peroksüdaase aktiivsuse määramine ABTS-i ja DMP-ga.
3. *TaKatG* katalaasse aktiivsuse määramine H₂O₂-ga.
4. *TaKatG* temperatuuritaluvuse uurimine.
5. *TaKatG* ligninolüütilise aktiivsuse uurimine.

3. Materjalid ja meetodid

3.1 *TaKatG* ekspressioon *E. coli*'s

Thermoanaerobaculum aquaticum'i katalaas-peroksüdaasi (*TaKatG*) eelkloneeritud koodon-optimeeritud geenijärjestust sisaldav (Geenipanga kood: WP_038049511.1) pET28a(+) ekspressioonikonstruktsioon, mis sisaldas N-terminaalset His₆-järjestust ja trombiini lõikesaiti, telliti Twist Bioscience-ist. Plasmiid viidi *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 DE3 rakkudesse elektroporatsiooni teel. *E. coli* rakud külvati Petri tassil olevale tardsöötmele, mis sisaldas 30 µg/ml kanamütsiini (Kan) (Fisher Scientific, Belgia), ning inkubeeriti üleöö 37 °C juures (Sanyo). Tekkinud kolooniatest võeti külviaasaga väike kogus rakke, viidi 3 ml LB vedelsöötmesse ning inkubeeriti üle öö 37 °C, 180 rpm juures (New Brunswick Scientific, innova 4300). Seejärel valmistati 1 liiter LB söödet, mis steriliseeriti autoklaavides (121 °C, 20 min) (Sanyo, Labo Autoclave). Autoklaavitud söötmesse lisati Kan (30 µg/ml) ja 6 ml starter-kultuuri ning inkubeeriti 37 °C, 180 rpm juures (New Brunswick Scientific, innova 4300). Kui rakutihedus jõudis OD₆₀₀ = 0,6-ni, indutseeriti valguekspressioon 0,5 mM isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiidiga (IPTG) (Fisher Scientific, Belgia) ja kultuur jäeti üle öö 30 °C, 180 rpm juurde kasvama (New Brunswick Scientific, innova 4300). Rakud eraldati söötimest tsentrifuugides 4000 rpm, 10 min, 4 °C (Beckman, J6 – HC Centrifuge).

3.2 *E. coli* rakkude lüüs

Tsentrifuugitud rakkude mass suspendeeriti, kasutades 30 ml puhvrit (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM imidasool; pH 7,5) ning rakud purustati Avestin Emulsiflex C5 homogenisaatoriga. Rakukestad tsentrifuugiti põhja tingimustel 35000 g, 45 min, 4 °C (Sorvall, RC28S) ning saadud lüsaat koguti edasiseks puhastamiseks.

3.3 Ensüümi puhastamine kasutades nikkel-afiinsuskromatograafiat

Lüsaat kanti eelnevalt puhver A-ga (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM imidasool; pH 7,5) tasakaalustatud nikkel-afiinsuskromatograafia kolonnile HiTrap™ FF, 5 ml (GE Healthcare), kasutades ÄKTA pure (GE Healthcare) vedelikkromatograafia süsteemi. *TaKatG* His₆-märgis seondus kolonnis olevate immobiliseeritud nikli ioonidega, mille tulemusena voolutatati välja mitte-huvipakkuvad valgud, kasutades A puhvrit. Kolonni pesti 5% puhver B-ga mahuga 10 kolonni ruumala, et eemaldada mitespetsiifiliselt seondunud valgud. Huvipakkuv valk elueeriti tõusvas imidasooli gradiendis, suurendades puhver B osakaalu (20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 0,5 M imidasool; pH 7,5) 100%-ni. Voolukiirus oli 5 ml/min ja fraktsiooni suurus 5 ml. Valku detekteeriti 280 nm juures ning huvipakkuvat valku sisaldavad fraktsioonid valati kokku ning mõõdeti kogu valgulahuse absorptsioon lainepikkusel 280 nm. Kasutades *TaKatG* ekstinktsioonikoefitsienti $\epsilon_{280} = 173830 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ProtParam, Expasy), arvutati ligikaudne saadud ensüümi kogus. Proovile kanti peale kaks ühikut trombiini (Cytiva) 1 mg ensüümi kohta, et puhastatud valgult eemaldada His₆-märgis.

3.4 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees

Valmistati 12%-ne 1,5 mm paksusega lahutav geel ja 4%-ne 1,5 mm paksusega kontsentreeriv geel. Proovid segati Laemmli puhvriga (4% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS); 20% glütserool; 120 mM Tris-HCl; 0,02% (w/v) bromofenool sinine) ja kuumutati 98 °C juures 5 min (BioSan, TS-100). 15 µl proovi ja valgu markerit (Thermo Scientific, Leedu) kanti geeli süvenditesse. Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees (SDS-PAGE) (Bio-Rad, PowerPac Basic) viidi läbi konstantsel voolutugevusel 25 mA, kasutades 1x SDS-foreesipuhvrit (25 mM Tris-HCl; 192 mM glütsiin; 0,1% SDS; pH 8,3). Valgud visualiseeriti Coomassie Brilliant Blue (AppliChem, Saksamaa) värviga.

3.5 *Ta*KatG heemiga rekonstrueerimine

Valgule lisati kahekordses kontsentratsiooni liias hemiini (Acros Organics, Belgia) ning inkubeeriti 2 h toatemperatuuril. Seejärel filtreeriti lahus läbi 0,45 µm-se poori suurusega filtri.

3.6 Geelfiltratsioon

Kasutades ÄKTA pure vedelikchromatograafia süsteemi ja geelfiltratsiooni kolonni HiPrep™ 26/10 Desalting (GE Healthcare), teostati puhvri vahetus, et vabaneda mitteseostunud hemiinist ja imidasoolist ning viia ensüüm säilituspuhvrissse. Kolonni voolutati kiirusel 7 ml/min puhvriga 20 mM Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 7,5. Kolonnist elueerunud *Ta*KatG ensüümi sisaldavad fraktsioonid valati kokku.

3.7 Valgu kontsentreerimine

Kokkuvalatud fraktsioonid kontsentreeriti, kasutades membraankontsentraatorit (Vivaspin Turbo 15, Sartorius), mis ei lase läbi membraani molekule, mis on suuremad kui 10 kDa. Kontsentreerimiseks tsentrifugeeriti proovi sisaldavat kontsentraatorit korduvalt tingimustel 4000 g, 10 min, 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5804 R). Seejärel mõõdeti lahuse absorptsioon spektrofotomeetriliselt (Shimadzu, UV-2700), et arvutada valgu kontsentratsioon. Määrati nii kogu valgu kontsentratsioon 280 nm juures kui ka heemiga rekonstrueeritud ehk aktiivse valgu kontsentratsioon 406 nm juures, kasutades heemi sisaldavatele valkudele iseloomulikku ekstinktsioonikoefitsienti $\epsilon_{406} = 100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Teder et al., 2017). Kontsentreeritud ensüüm tilgutati vedelasse lammastikku ning saadud pärlid hoiustati -80 °C juures (Phcbi, VIP ECO Natural Refrigerants).

3.8 *Ta*KatG peroksüdaasne aktiivsus

*Ta*KatG peroksüdaasest aktiivsust uuriti kahe substraadiga: 2,6-dimetoksfenooliga (DMP) (Acros organics, India) ja 2,2-asino-bis(3-etüülbensotiasoliin-6-sulfoonhape) diammooniumsoolaga (ABTS) (Biosynth, Slovakkia). Reaktsioonid käivitati ensüümi lisamisega. Peroksüdaasest aktiivsuseks vajab ensüüm vesinikperoksiidi (H₂O₂) (Honeywell Fluka, Saksamaa). Kuna H₂O₂ võib aja jooksul laguneda, määrati selle kontsentratsioon, mõõtes absorptsiooni 240 nm juures. H₂O₂ kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati ekstinktsioonikoefitsienti $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Nelson ja Kiesow, 1972). Kõik ensüümikineetika katsed on tehtud vähemalt kolmes korduses. Mitmest substraadist sõltuva

ensüümikineetika uurimiseks saab kasutada ühele substraadile mõeldud võrrandeid, kui varieerida ühe substraadi kontsentratsiooni ja hoida teist konstantsena. Kineetiliste parameetrite arvutamiseks kasutati Michaelis-Menteni valemit (valem 1) või empiirilist substraadi inhibitsiooni valemit (valem 2), kus V_0 – ensüümreaktsiooni algkiirus; $[S]$ – substraadi kontsentratsioon; V_{max} – ensüümreaktsiooni maksimumkiirus; K_m – Michaelise konstant, substraadi kontsentratsioon $\frac{1}{2} V_{max}$ juures; K_i – inhibitsiooni konstant.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \text{ (valem 1)}$$

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \text{ (valem 2)}$$

Ensüüm-katalüüsitud reaktsioonikiiruse ja substraadi kontsentratsiooni sõltuvusest arutati näilised kineetilised parameetrid, kasutades mitte-lineaarset regressioonianalüüsi (OriginLab 2019 Pro programm).

3.8.1 DMP

DMP lahustati dimetüülformamiidis (Fisher Chemical, Suurbritannia). DMP oksüdatsiooni mõõdeti 470 nm juures ($\epsilon_{470} = 53200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Breslmayr et al., 2018), kasutades spektrofotomeetrit (Shimadzu, UV-2700). Esmalt määrati DMP oksüdatsioonireaktsiooni jaoks *TaKatG*-ga optimaalne pH ning edasised mõõtmised teostati selle pH juures. Substraati varieeriti vahemikus 0,4 mM kuni 40 mM, hoides H_2O_2 kontsentratsiooni konstantsena 1 mM juures. Mõõtmistes kasutati 60 nM *TaKatG*-d. Leiti näilised kineetilised konstandid: Michaelise konstant (K_m), katalüütiline konstant (k_{cat}) ja spetsiifilisuse konstant (k_{cat}/K_m) DMP-le. H_2O_2 kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0,025 mM kuni 3 mM, kasutades 5 mM DMP-d ning arutati vastavad näilised kineetilised parameetrid H_2O_2 -le. Mõõtmistes kasutati 30 nM *TaKatG*-d. Substraadi inhibitsiooni korral määrati ka inhibitsiooni konstant (K_i).

3.8.2 ABTS

ABTS-i oksüdatsioonil tekkivat ABTS-i kationradikaali teket mõõdeti 420 nm juures ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Childs & Bardsley, 1975). ABTS-i oksüdatsioonireaktsiooni jaoks leiti optimaalne pH ning edasised mõõtmised teostati selle pH juures. Substraati varieeriti vahemikus 0,025 mM kuni 3 mM, kasutades 2,6 mM H_2O_2 ning 6,3 nM *TaKatG*-d. Leiti näilised kineetilised konstandid K_m , k_{cat} ja k_{cat}/K_m ABTS-ile. H_2O_2 -le kineetiliste parameetrite määramiseks muudeti H_2O_2 kontsentratsiooni vahemikus 0,1 mM kuni 10,3 mM, kasutades 0,5 mM ABTS-i ning 6,3 nM *TaKatG*-d. Substraadi inhibitsiooni korral määrati ka K_i .

3.9 *TaKatG* katalaasne aktiivsus

Katalaasset aktiivsust uuriti kasutades substraadina H_2O_2 . Katalaasse reaktsiooni käigus lõhub katalaas H_2O_2 , kus igast kahest H_2O_2 molekulist tekib kaks H_2O ja üks O_2 molekul. H_2O_2 dismutatsiooni mõõdeti 240 nm juures ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Nelson ja Kiesow, 1972). Reaktsiooni toimumiseks leiti

optimaalne pH ning edasised mõõtmised teostati selle pH juures. Substraati lisati vahemikus 10 mM kuni 150 mM H₂O₂ ning kasutati 15 nM *Ta*KatG-d. Leiti kineetilised parameetrid K_m , k_{cat} ja k_{cat}/K_m .

3.10 *Ta*KatG termostabiilsus

Temperatuuri taluvuse uurimiseks inkubeeriti *Ta*KatG-d kõrgematel temperatuuridel: nii 42 °C kui ka 70 °C (Eppendorf, Mastercycler) juures 48 h. Spektrofotomeeter oli varustatud termostaadiga (Shimadzu, TCC-100), et hoida lahuse temperatuur konstantne ning lahuseid (v.a DMP ja H₂O₂) inkubeeriti eelnevalt 42 °C juures (Eppendorf, Thermomixer comfort). Erinevatel ajahetkedel võeti inkubeerivast ensüümilahusest proov ning mõõdeti jääkaktiivsus 42 °C juures, kasutades substraadina DMP-d või ABTS-i Ensüümi varulahuse kontsentratsioon oli 6 µM (DMP) või 0,6 µM (ABTS), mida lahjendati mõlemal puhul 100 korda reaktsioonisegusse. DMP puhul kasutati järgmisi reaktsioonitingimusi: 60 nM *Ta*KatG; 10 mM DMP; 1 mM H₂O₂; 50 mM Hepes pH 7,5. ABTS-i puhul kasutati järgmisi reaktsioonitingimusi: 6 nM *Ta*KatG; 0,5 mM ABTS; 2,5 mM H₂O₂; 50 mM Na-atsetaat pH 4,5. $\tau^{1/2}$ leiti kasutades OriginLab (OriginLab 2019 Pro) programmi.

3.11 Ligniini inkubeerimine *Ta*KatG-ga

Kasutatud ligniin oli varasemalt eraldatud haavapuidu biomassist organosolv meetodil, kasutades solvendina etanooli (Jöul et al., 2022). Haavapuidu ligniin lahustati (20 mg/ml) dimetüülsulfoksiidis (Amresco, Ameerika) ning lahjendati seejärel 50 mM Tris-HCl pH 8,0 puhverlahustesse lõppkontsentratsiooniga 2 mg/ml. Reaktsioonides kasutati kahte erinevat H₂O₂ lõppkontsentratsiooni: 2 mM ja 10 mM. Reaktsiooni lisati 5 µM *Ta*KatG, kontrollidesse ensüümi ei lisatud. Reaktsiooni inkubeeriti 42 °C, 180 rpm (Eppendorf, Innova43 Incubator Shaker) 48 h. Peale 24 h möödumist lisati reaktsioonidesse juurde esialgne kogus H₂O₂-i. Peale inkubeerimist proovid külmutati ja lüofiliseeriti (Labogene, Scanvac Coolsafe).

3.12 Kõrgsurvevedelikkromatograafia

Lüofiliseeritud ligniiniproovidele lisati 500 µl tetrahüdrofuraani (THF) (Honeywell, Saksamaa), mis oli stabiliseeritud butüüleeritud hüdroksütolueeniga (BHT) (Fluka, Šveits). Proove segati 5 min vorteksil (Heidolph, Saksamaa) ning seejärel tsentrifuugiti (Heraeus, Biofuge pico) 15 min, 13000 rpm. Supernatant eraldati ning 20 µl sellest süstiti vedelikkromatograafia süsteemi (Shimadzu, prominence), mis oli ühendatud eelkolonni ning kahe MesoPore PLgel GPC/SEC eksklusioonkromatograafia kolonniga (Agilent Technologies, Suurbritannia). Kalibreerimiseks kasutati EasiVial PS-L polüstüreeni standardeid GPC/SEC (Agilent Technologies). Kolonniahhi oli temperatuuril 40 °C ning voolukiirus 1 ml/min. Mobiilseks faasiks oli BHT-ga stabiliseeritud THF. Ligniini neelduvust detekteeriti 254 nm juures (UV detektor).

Kasutades Shimadzu LabSolutions tarkvara, arvutati molekulmassi jaotused: masskeskmine molekulmass (M_w) ja arvkeskmine molekulmass (M_n). Polüdisperssuse aste (PDI) arvutati valemiga M_w/M_n . PDI on molekulmasside jaotuse laiuse hindamiseks kasutatav suurus ning selle arvuline väärtus on üks või sellest suurem (Viéville et al., 2011).

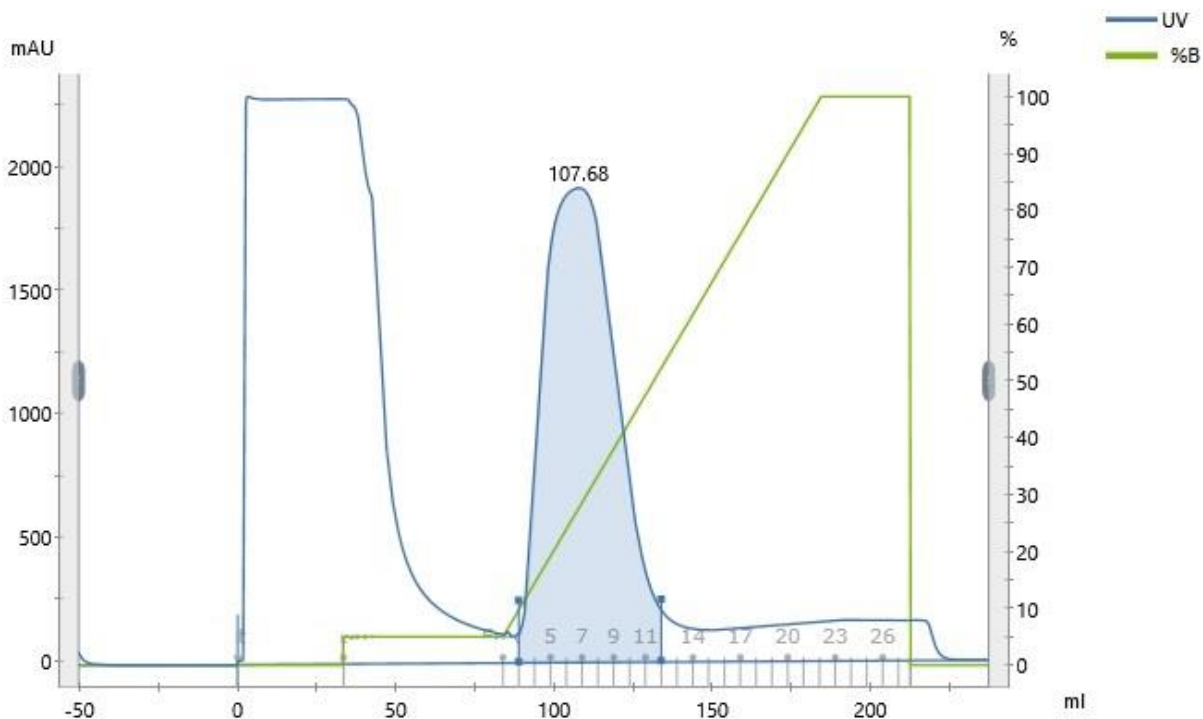
4. Tulemused

4.1 *Ta*KatG ekspressioon ja puhastamine

*Ta*KatG ekspresseeriti *E. coli* BL21 rakkudes, mida indutseeriti 0,5 mM IPTG-ga. Rakke kasvatati üleöö ning seejärel tsentrifuugiti, et eraldada rakud söötimest. Rakud purustati homogenisaatoriga, rakukestad tsentrifuugiti põhja ning edasi kasutati rakulüsaati.

4.1.1 Nikkel-afiinsuskromatograafia

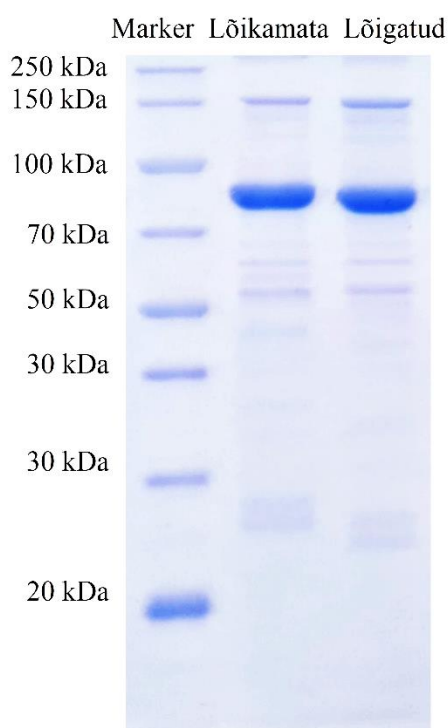
Lüsaat kanti nikkel-afiinsuskromatograafia kolonnile. Kolonni pesti 5% puhver B-ga, et eemaldada mittespetsiifiliselt seondunud valgud. Huvipakkuv valk kinnitus tänu valgu küljes olevale His₆-märgisele kolonnile. *Ta*KatG elueerus kolonnist puhver B koostises oleva imidasooli kontsentratsioonigradiendis tingimustel: 11% kuni 52% puhver B-d, alates 50 mM imidasooli kontsentratsioonist. Valk elueerus fraktsioonidesse 3–11 (Joonis 6). *Ta*KatG-d sisaldavad fraktsioonid valati kokku (45 ml). 280 nm juures mõõdeti valgulahuse absorptsioon ning kasutades Lambert-Beer'i seadust leiti, et valku oli ~150 mg. Valgulahusele lisati 2 ühikut trombiini ühe mg valgu kohta ning jäeti üleöö +4 °C juurde, et *Ta*KatG-lt ära lõigata His₆-märgis.



Joonis 6. Nikkel-afiinsuskromatogramm. Edasiseks puhastamiseks koguti fraktsioonid 3–11. Puhvrid: 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM imidasool; pH 7,5 (A) ja 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 0,5 M imidasool; pH 7,5 (B). Valk tuvastati 280 nm juures.

4.1.2 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees

TaKatG teoreetiline molekulmass aminohappelise sisalduse põhjal on 81708 Da ehk ~81,7 kDa (ProtParam ExPasy). His₆-märgise teoreetiline molekulmass on ~0,8 kDa. *TaKatG*, mida inkubeeriti trombiiniga His₆-märgise lõikamiseks, on geelil liikunud õige pisut allapoole (Joonis 7, rada 3), mis viitab molekulmasside erinevusele His₆-märgisega ja -märgiseta *TaKatG* vahel. Geelipildil on näha ka 150 kDa markeri juures võimalikku *TaKatG* dimeeri (Joonis 7, rajad 2 ja 3).

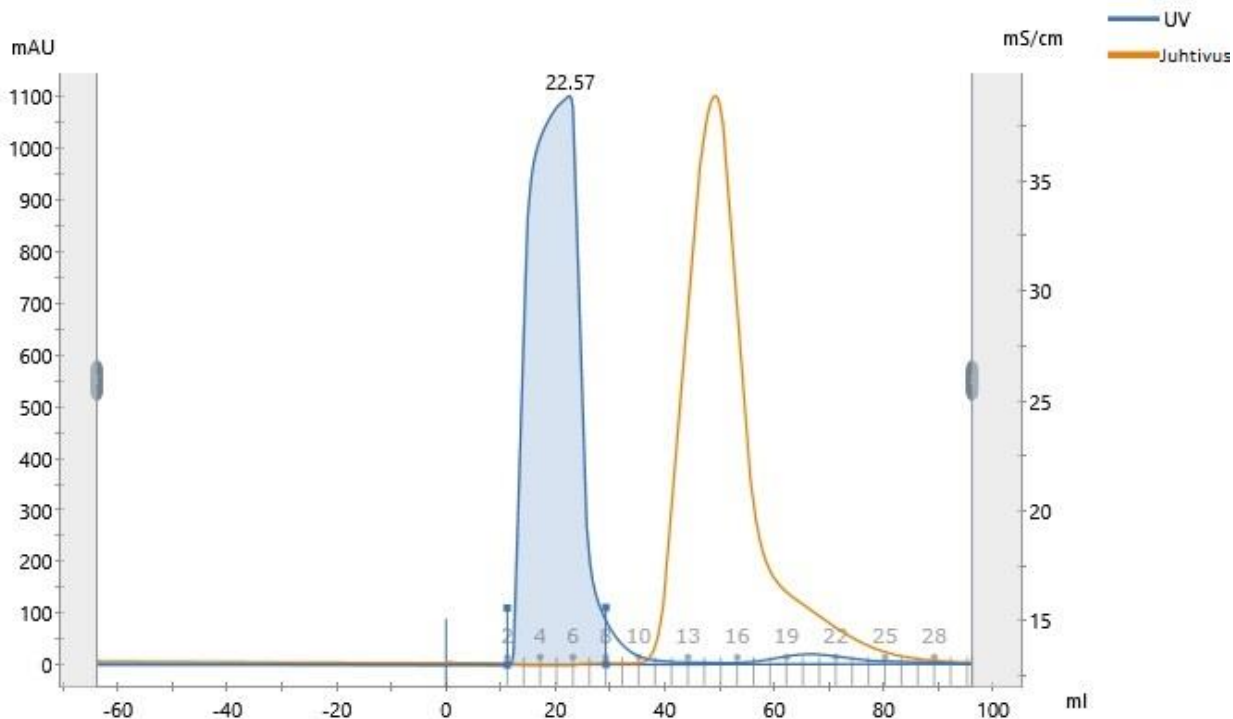


Joonis 7. SDS-PAGE analüüs. Valgumarker (rada 1), His₆-märgisega *TaKatG* pärast nikkel-afiinsuskromatograafiat (rada 2) ja trombiiniga inkubeeritud *TaKatG* (rada 3). *TaKatG* teoreetiline molekulmass on 81,7 kDa.

4.1.3 Geelfiltratsioon

Peale nikkel-afiinsuskromatograafiat ja SDS-PAGE analüüsi rekonstrueeriti *TaKatG*-d hemiiniga. Selleks lisati valgu proovile kahekordses kontsentratsiooni liias hemiini ning inkubeeriti 2 h toatemperatuuril. Inkubatsiooni lõppedes filtreeriti proov läbi 0,45 µm filtri ning teostati geelfiltratsioon, et viia ensüüm säilituspuhvrise ning vabaneda proovis sisalduvatest üleliigsetest komponentidest.

Ensüüm elueerus fraktsioonides 2–7. Kromatogrammilt on näha, et geelfiltratsiooni kolonni poorsete kerakeste sees kauem viibinud sool ja imidasool elueeruvad hiljem (Joonis 8). Fraktsioonid, mis sisaldasid huvipakkuvat ensüümi, kontsentreeriti ning määrati ensüümi kontsentratsioon (totaalne ensüümi kontsentratsioon ja aktiivse ensüümi kontsentratsioon).



Joonis 8. Geelfiltratsiooni kromatogramm. Ensüüm elueerus fraktsioonidesse 2–7. Puhver: 20 mM Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 7,5. Valku detekteeriti 280 nm juures.

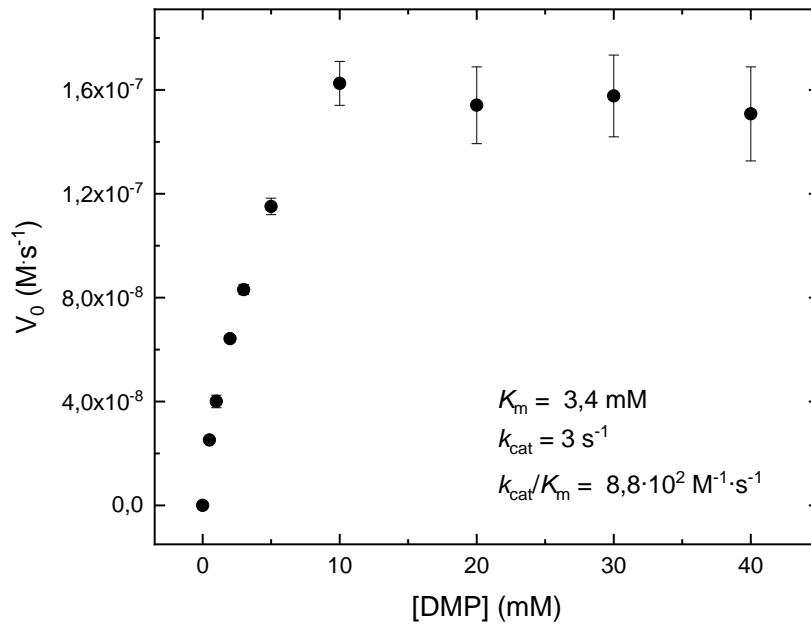
Ekspressiooni tulemusena saadi 1 liitrist söötimest 83,6 mg valku, millest 47,7 mg oli aktiivset ensüümi ehk heemi sisaldavat valku. Ensüümi aktiivne vorm, heemiga rekonstrueeritud *TaKatG*, moodustas 57% kogu valgu hulgast ning edasiste katsete teostamisel arvestati ainult aktiivse valgu kontsentratsiooni.

4.2 *TaKatG* peroksüdaasne aktiivsus

Ensüümi peroksüdaasest aktiivsust mõõdeti substraatide ABTS ja DMP oksüdatsiooni kaudu.

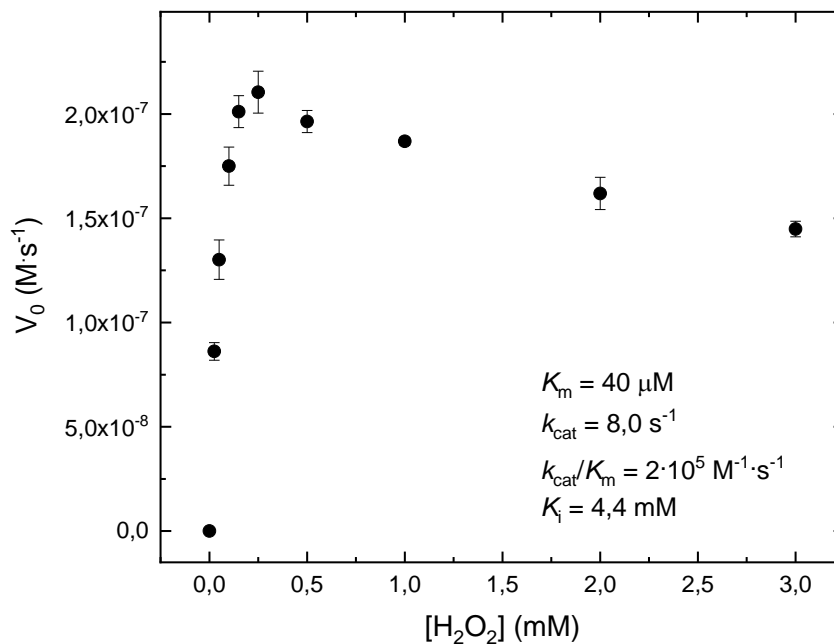
4.2.1 DMP

Esmalt määrati DMP oksüdatsioonireaktsiooni jaoks optimaalne pH, milleks osutus pH 7,5 (50 mM HEPES). Kõik edasised mõõtmised DMP-ga teostati sellel pH-l ja toatemperatuuril, kasutades 60 nM *TaKatG*-d; 1 mM H₂O₂; 50 mM HEPES puhvrit (pH 7,5). Saadud tulemustest leiti näilised kineetilised parameetrid (Joonis 9). Kasutades Michaelis-Menteni võrrandit, arvutati näilised kineetilised konstandid $K_m = 3,4 \text{ mM}$, $k_{cat} = 3 \text{ s}^{-1}$ ja $k_{cat}/K_m = 8,8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.



Joonis 9. *Ta*KatG kineetika DMP-ga. 60 nM *Ta*KatG; 1 mM H₂O₂; pH 7,5. Graafikul on kolme individuaalse katse keskmised tulemused, standardhälve on näidatud veariibaga.

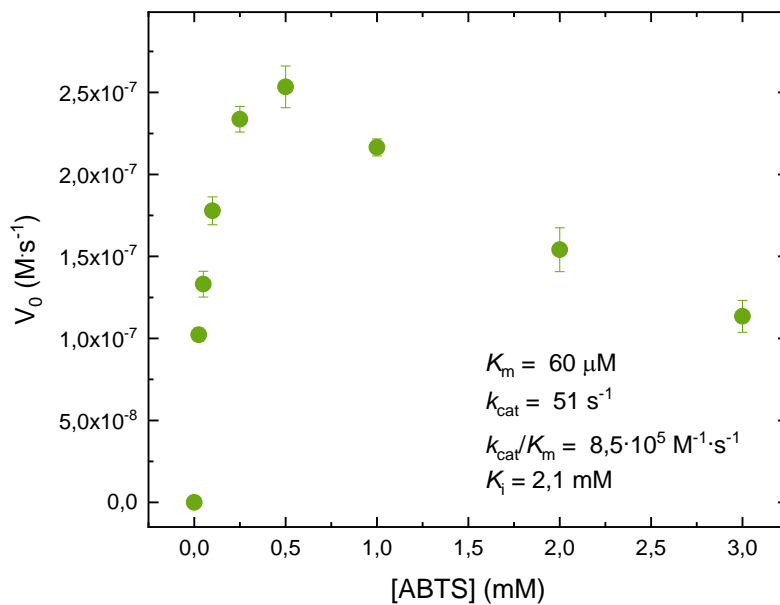
Jättes substraadi kontsentratsiooni konstantseks (5 mM DMP), uuriti, kuidas mõjub kosubstraadi H₂O₂ kontsentratsiooni muutus DMP oksüdatsioonireaktsioonile. Selleks kasutati 30 nM *Ta*KatG-d, 50 mM HEPES puhvrit (pH 7,5). Saadud tulemused analüüsiti substraadi inhibitsiooni võrrandiga ning leiti näilised kineetilised parameetrid H₂O₂-le. Näilised kineetilised konstandid antud tingimuste juures on $K_m = 40 \mu M$, $k_{cat} = 8,0 s^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 2 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ ja $K_i = 4,4 mM$. Jooniselt on näha, et kõrgemad H₂O₂ kontsentratsioonid mõjuvad DMP oksüdatsioonireaktsiooni kiirusele inhibeerivalt (Joonis 10).



Joonis 10. *Ta*KatG kineetika DMP-ga erinevatel H₂O₂ kontsentratsioonidel. 30 nM *Ta*KatG; 5 mM DMP; 50 mM Hepes pH 7,5.

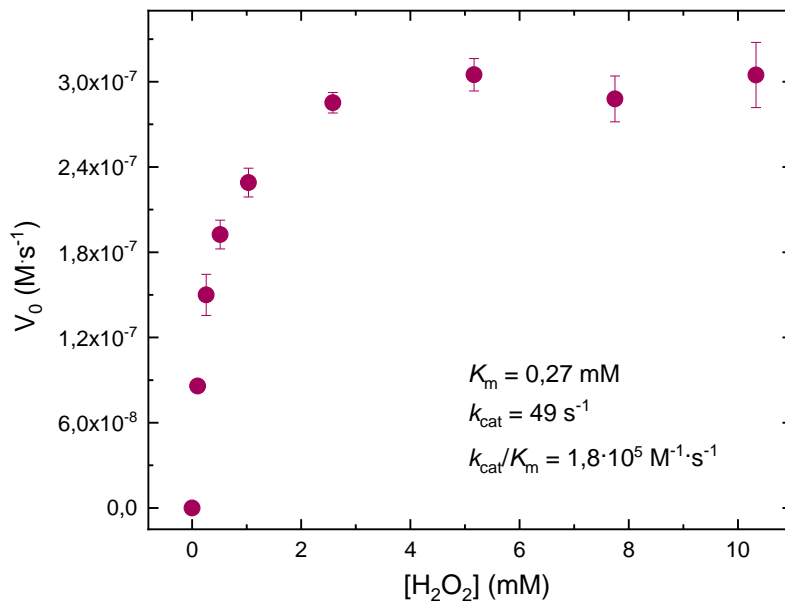
4.2.2 ABTS

Algselt määrati ABTS-i oksüdatsioonireaktsiooni jaoks optimaalne pH, milleks osutus pH 4,5 (50 mM Na-atsetaat). Kõik edasised ABTS-i oksüdatsioonireaktsioonid teostati sellel pH-l ja toatemperatuuril. ABTS-i oksüdatsioonikineetika uurimiseks kasutati 6,3 nM *Ta*KatG-d; 2,6 mM H₂O₂; 50 mM Na-atsetaat, pH 4,5 puhvrit. Saadud algkiiruste abil arvutati näilised kineetilised parameetrid, kasutades substraadi inhibitsiooni võrrandit (Joonis 11). Näilised kineetilised konstandid antud tingimuste juures on $K_m = 60 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 51 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 8,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ja $K_i = 2,1 \text{ mM}$. Jooniselt on näha, kuidas kõrgemad substraadi kontsentratsioonid hakkavad ABTS-i oksüdatsioonikiirust inhibeerima (Joonis 11).



Joonis 11. *Ta*KatG kineetika ABTS-iga. 6,3 nM *Ta*KatG; 2,6 mM H₂O₂; 50 mM Na-atsetaat pH 4,5.

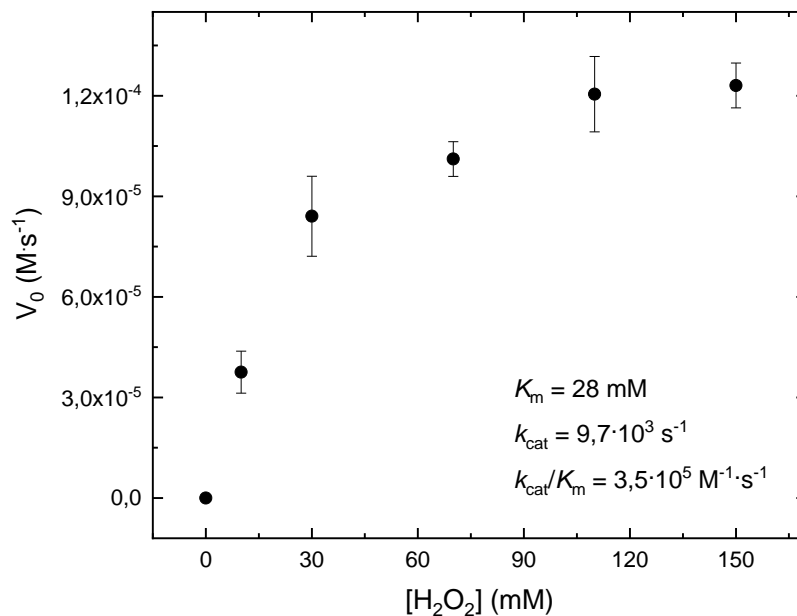
Jättes ABTS-i kontsentratsiooni konstantseks (0,5 mM), uuriti, kuidas mõjub kosubstraadi H₂O₂ kontsentratsiooni muutus ABTS-i oksüdatsioonireaktsioonile. Selleks kasutati 6,3 nM *Ta*KatG, 0,5 mM ABTS-i ja 50 mM Na-atsetaati pH 4,5. Kasutades Michaelis-Menten valemit leiti kineetilised parameetrid H₂O₂-le (Joonis 12). Näilised kineetilised konstandid H₂O₂-le antud tingimuste juures on $K_m = 270 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 49 \text{ s}^{-1}$ ja $k_{\text{cat}}/K_m = 1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.



Joonis 12. *TaKatG* kineetika ABTS-iga varieerides H_2O_2 kontsentratsiooni. 6,3 nM *TaKatG*; 0,5 mM ABTS; 50 mM Na-atsetaat pH 4,5.

4.3 *TaKatG* katalaasne aktiivsus

Algselt määrati *TaKatG* katalaasne aktiivsuse iseloomustamise jaoks optimaalne pH, milleks osutus pH 7,0 (50 mM HEPES). Katalaasne aktiivsuse määramise jaoks kasutati substraadina H_2O_2 ning 15 nM *TaKatG*. Kineetilised parameetrid leiti kasutades Michaelis-Menten valemit (Joonis 13). Kineetilised konstandid antud tingimuste juures on $K_m = 28$ mM, $k_{cat} = 9,7 \cdot 10^3$ s⁻¹ ja $k_{cat}/K_m = 3,5 \cdot 10^5$ M⁻¹·s⁻¹. Tulemustest saame järeldada, et meie ensüüm suudab taluda väga kõrgeid H_2O_2 kontsentratsioone ning H_2O_2 efektiivselt dismuteerida.

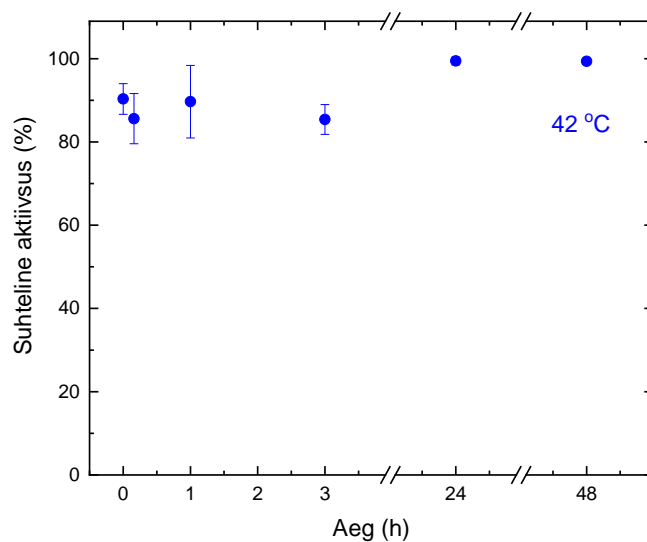


Joonis 113. *TaKatG* katalaasne aktiivsus toatemperatuuril substraadi vahemikus 10 mM kuni 150 mM H₂O₂. 15 nM *TaKatG*; 50 mM HEPES pH 7,0.

4.4 *TaKatG* termostabiilsus

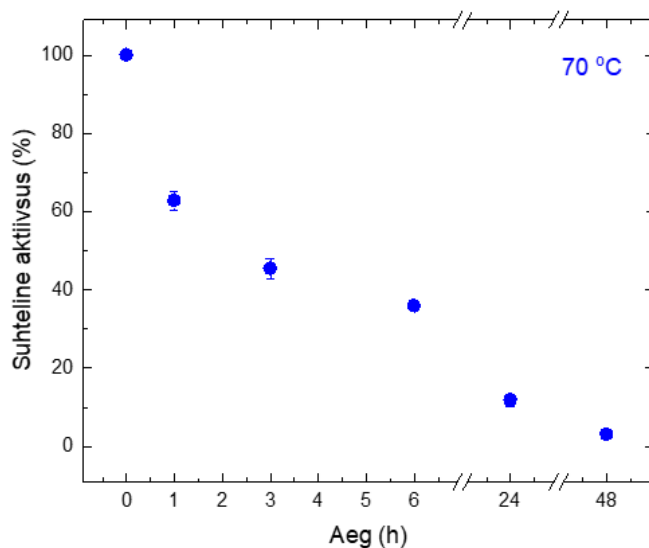
TaKatG termostabiilsust uuriti inkubeerides ensüümi nii 42 °C kui ka 70 °C juures 48 h. Erinevatel ajapunktidel mõõdeti ensüümi jääkaktiivsust, kasutades substraadina DMP-d või ABTS-i. Inkubeerides ensüümi 42 °C juures kasutati substraadina DMP-d (Joonis 14) ning inkubeerides ensüümi 70 °C juures kasutati substraadina ABTS-i (Joonis 15). Jääkaktiivsused mõlema substraadiga mõõdeti 42 °C juures. (Joonised 14 ja 15).

TaKatG-i inkubeerimine 42 °C juures 48 h ei mõjutanud oluliselt ensüümi aktiivsust ega põhjustanud ensüümi inaktiveerumist (Joonis 14). Sellest järeldati, et ligiiniikatseteks *TaKatG*-ga on 42 °C sobilik temperatuur.



Joonis 14. *TaKatG* jääaktiivsus inkubeerimisel 42 °C juures 48 h. 60 nM *TaKatG*; 10 mM DMP; 1 mM H₂O₂; 50 mM Hepes pH 7,5.

TaKatG inkubeerimine 70 °C juures mõjutas ensüümi aktiivsust. Pikaajaline inkubeerimine 70 °C juures mõjus ensüümile inaktiveerivalt ning aktiivsus langes ajas märgatavalt. 1 h möödudes kaotas ensüüm ~40% oma aktiivsusest. 24 h möödudes kaotas ensüüm suurema osa aktiivsusest (säilus ~10% aktiivsusest). Pärast 48 h on ensüüm täielikult inaktiivne (Joonis 15). Inaktivatsiooni poolestusaeg $\tau^{1/2} = 5,1$ h. Sellest saab järeldada, et ligniini katsetel ei saaks kasutada nii kõrgeid inkubeerimise temperatuure.

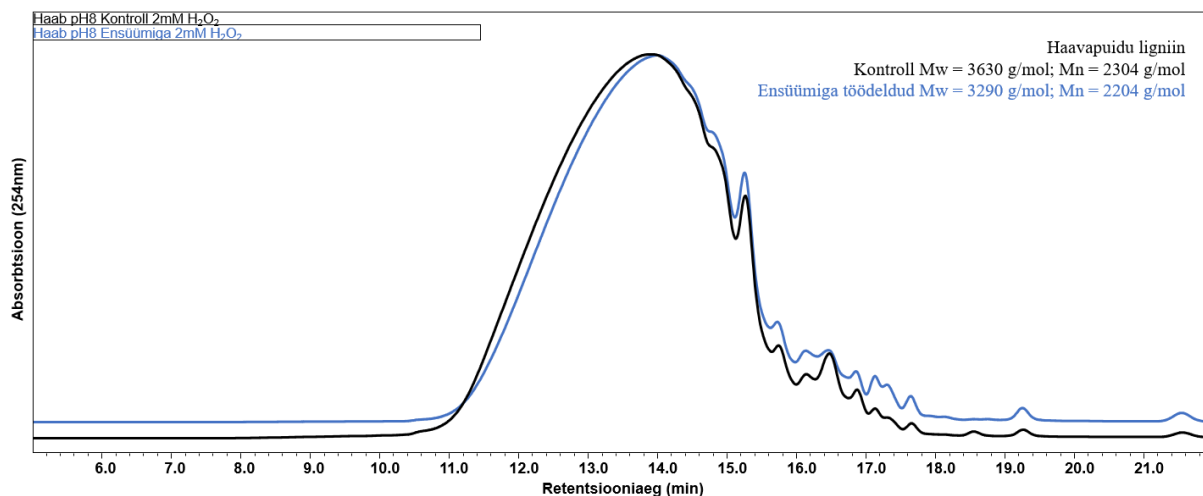


Joonis 15. *TaKatG* jääaktiivsus inkubeerimisel 70 °C juures 48 h. 6 nM *TaKatG*; 0,5 mM ABTS; 2,5 mM H₂O₂; 50 mM Na-atsetaat pH 4,5. Inaktivatsiooni poolestusaeg $\tau^{1/2} = 5,1$ h.

4.5 Kõrgsurvevedelikkromatograafia

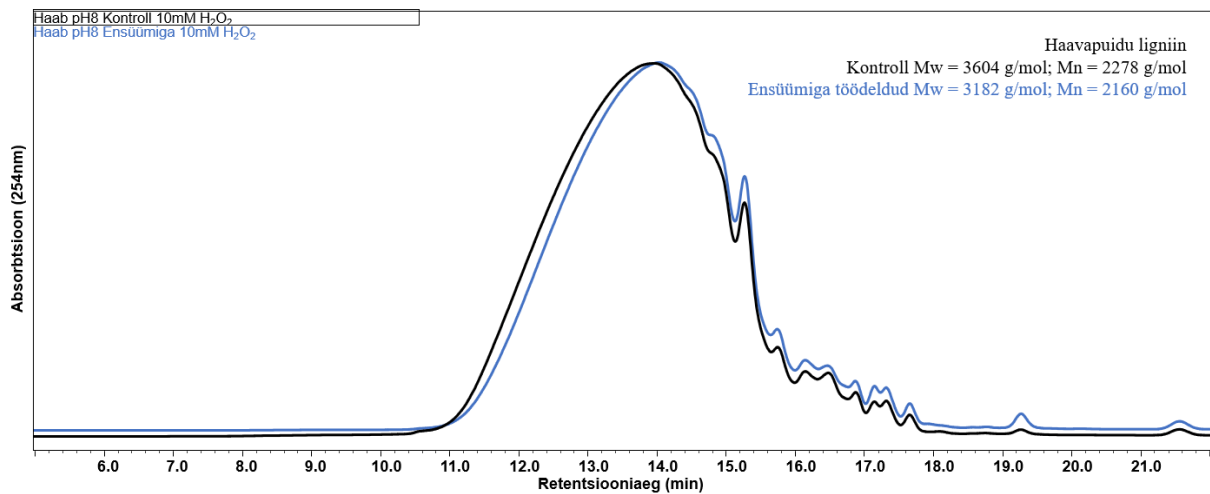
Haavapuidu ligniini (2 mg/ml) inkubeeriti 5 μM *TaKatG*-ga 48 h, 42 °C, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 juures, kuhu oli lisatud 2 mM või 10 mM H_2O_2 ning pärast 24 h möödumist lisati reaktsioonidesse juurde esialgne kogus H_2O_2 . Haavapuidu ligniini inkubeerimisel saadud kromatogrammi piikidele leiti M_w , M_n ja PDI väärtused. Joonistel 16 ja 17 esitatud kromatogrammid on normaliseeritud paremaks visualiseerimiseks.

Haavapuidu ligniini inkubeerimisel, kasutades 2 mM H_2O_2 , saadi kontrollproovi $M_w = 3630$ g/mol ja $M_n = 2304$ g/mol ning PDI = 1,58. Ensüümiga töödeldud haavapuidu ligniini $M_w = 3290$ g/mol ja $M_n = 2204$ g/mol ning PDI = 1,49. Normaliseeritud kromatogrammide võrdlusest on näha vähesel määral haavapuidu ligniini depolümeriseerumist ensüümiga töödeldud proovis võrreldes kontrolliga. Seda näitab ligniini piigi nihe paremale, väiksema molekulmassi poole, mida kinnitavad ka M_w ja M_n väärtused. Väiksem PDI väärtus ensüümiga töödeldud haavapuidu ligniini proovis näitab, et proov on muutunud homogeensemaks (Joonis 16).



Joonis 16. Ensüümiga töödeldud ja töötlemata haavapuidu ligniinide massijaotused. Ligniini inkubeeriti 5 μM *TaKatG*-ga, 2 mM H_2O_2 , 42 °C, 48 h, pH 8 juures (sinine), kontrollile ensüümi ei lisatud (must).

Haavapuidu ligniini inkubeerimisel, kasutades 10 mM H_2O_2 , saadi kontrolli $M_w = 3604$ g/mol ja $M_n = 2278$ g/mol ning PDI = 1,58. Ensüümiga töödeldud haavapuidu ligniini $M_w = 3182$ g/mol ja $M_n = 2160$ g/mol ning PDI = 1,47. Normaliseeritud kromatogrammide võrdlusest on samuti näha vähesel määral haavapuidu ligniini depolümeriseerumist ensüümiga töödeldud proovis võrreldes kontrolliga. PDI väärtuse vähenemine viitab proovi muutumisele homogeensemaks (Joonis 17).



Joonis 17. Ensüümiga töödeldud ja töötlemata haavapuidu ligniinide massijaotused. Ligniini inkubeeriti $5 \mu\text{M}$ *TaKatG*-ga, 10 mM H_2O_2 , $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 h , pH 8 juures (sinine), kontrollile ensüümi ei lisatud (must).

5. Arutelu

Antud töös ekspresseeriti ja puhastati *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaas (*TaKatG*) ning uuriti selle katalüütilisi ja ligniini lagundavaid omadusi. Peroksüdaasse aktiivsuse uurimiseks kasutati kahte erinevat substraati (DMP ja ABTS) ning kalatalaasset aktiivsust uuriti spektrofotomeetriliselt H_2O_2 dismutatsiooni kaudu. Testiti ka *TaKatG* temperatuuritaluvust ning selle võimet depolümeriseerida haavapuidu organosolv ligniini erinevatel tingimustel.

TaKatG oli võimeline oksüdeerima H_2O_2 juuresolekul nii DMP-d kui ka ABTS-i. DMP oksüdatsioon toimus neutraalse pH lähedal (pH 7,5), samas kui ABTS-i oksüdatsioon toimus happelises keskkonnas (pH 4,5). *TaKatG* oksüdeeris ABTS-i efektiivsemalt kui DMP-d, k_{cat}/K_m vastavalt $8,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ja $8,9 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Hoides DMP kontsentratsiooni konstantsena ning muutes H_2O_2 kontsentratsiooni, täheldati kõrgemal H_2O_2 kontsentratsioonidel substraadi inhibitsiooni (Joonis 10), mida ei esinenud ABTSi korral (Joonis 12). Substraadi inhibitsioon on ping-pong mehhanismi puhul tavapärane nähtus, kuna substraat võib seonduda nõ „valele ensüümi vormile“ (Cornish-Bowden, 2012).

Uurides *TaKatG* katalaasset aktiivsust, leiti, et ensüüm talub kõrgeid H_2O_2 kontsentratsioone ning suudab H_2O_2 efektiivselt dismuteerida. Töös uuritud *TaKatG* H_2O_2 lagundamise katalüütiline aktiivsus oli märkimisväärselt suurem ($k_{\text{cat}} = 9,7 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) kui näiteks *Thermobacillus xylanilyticus*'e katalaas-peroksüdaasil ($k_{\text{cat}} = 171 \text{ s}^{-1}$) (Fall et al., 2023). Seejuures jäi *TaKatG* katalaasne aktiivsus alla kirjanduses toodud monofunktsionaalsete katalaaside katalüütilise aktiivsuse vahemikule ($k_{\text{cat}} = 7 \cdot 10^4$ kuni $1,6 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) (Borges et al., 2014). Singh ja kolleegid uurisid seitsmest erinevast organismist pärit KatG-de katalüütilisi omadusi. Esitatud katalaassed aktiivsused jäid vahemikku $4,9 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ kuni $1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ (Singh et al., 2008). *TaKatG* katalaasne aktiivsus oli $9,7 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$, mis jääb toodud aktiivsuste vahemikku. Samade autorite poolt raporteeritud peroksüdaassed aktiivsused jäid vahemikku 8 s^{-1} kuni 25 s^{-1} (ABTS-ga). *TaKatG* peroksüdaasne aktiivsus ABTS-ga oli 51 s^{-1} , mis on kõrgem kui viidatud artiklis saadud vahemik (Singh et al., 2008).

Termotolerantselt bakterist pärit *TaKatG* temperatuuritaluvuse testimiseks inkubeeriti ensüümi $42 \text{ }^\circ\text{C}$ ja $70 \text{ }^\circ\text{C}$ juures 48 h. Ensüümi aktiivsus $42 \text{ }^\circ\text{C}$ juures 48 h vältel ei langenud, kuid $70 \text{ }^\circ\text{C}$ juures kaotas ensüüm 24 h jooksul 90% oma aktiivsusest.

Haavapuidu organosolv ligniini depolümeriseerimine oli märgatav nii 2 mM H_2O_2 kui ka 10 mM H_2O_2 juuresolekul (pH 8), peale 48 h inkubeerimist $42 \text{ }^\circ\text{C}$ juures (Joonised 16 ja 17). Meie töögrupis on varasemalt ligniini lagundamisel erinevate ensüümidega saadud häid tulemusi just pH 8 juures, seetõttu kasutati antud pH-d. Käesoleva töö tulemustest võib järeldada, et ligniini lagundamiseks kasutatud tingimustest sobib paremini 2 mM H_2O_2 , kuna kõrgem H_2O_2 kontsentratsioon ei suurendanud ligniini depolümerisatsiooni.

Kokkuvõte

Ligniin kuulub lignotselluloosse biomassi koostisesse koos tselluloosi ja hemitselluloosiga. Ligniin koosneb *p*-hüdrosüfenüüli, guaiatsüüli ja süringüüli ühikutest. Kui seni on tööstuses rakendust leidnud tselluloos ja hemitselluloos, siis ligniini on pigem peetud soovimatuks kõrvalproduktiks. Peamiseks probleemiks ligniini kasutamisel on tema keeruline struktuur, varieeruv koostis, heterogeensus ning piiratud lahustuvus.

Lõhkudes ligniini biopolümeeri, kasutades nii füüsikalisi-keemilisi kui ka bioloogilisi protsesse, vabanevad väärtuslikud aromaatsed ühendid. Bioloogilise ligniini lagundamise teevad võimalikuks erinevad oksüdatiivsed ensüümid (peroksüdaasid ja lakaasid), mis depolümeerivad ligniini väikemateks fragmentideks, mida on hõlpsam kasutada ligniini väärindamiseks.

Selle töö raames uuriti bakteri *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaasi, mis on bifunktsionaalne ensüüm, omades nii katalaas- kui ka peroksüdaas-aktiivsust. Selleks ekspresseeriti ning puhastati *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaas, uuriti tema peroksüdaas- ja katalaas-aktiivsust, temperatuuritaluvust ning võimet lagundada ligniini.

Täideti kõik töös püstitatud eesmärgid. Ekspressiooni tulemusena saadi 1 liitrist söötimest 47,7 mg aktiivset ensüümi. *Thermoanaerobaculum aquaticum*'i katalaas-peroksüdaas omab peroksüdaas-aktiivsust nii substraadi ABTS-i kui ka DMP suhtes. Ensüüm omab ka arvestatavat katalaas-aktiivsust. Kasutatud katalaas-peroksüdaas säilitas peroksüdaas-aktiivsuse 42 °C juures vähemalt 48 h. Samuti lagundas ensüüm kasutatud tingimustel (pH 8, 42 °C, 48 h) vähesel määral organosolv haavapuidu ligniini.

Edaspidi on plaanis optimeerida ligniini depolümeerimise tingimusi ning uurida erinevate redoks-mediaatorite mõju ligniini lagundamisele. Samuti on kavas testida ensüümi mõju ka teiste ligniinide peal.

Abstract

Lignin is part of lignocellulosic biomass together with cellulose and hemicellulose. Lignin biopolymer is composed of cross-linked *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols, which form the *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) units. So far, only cellulose and hemicellulose have been industrially utilized, but lignin is considered rather as an unwanted byproduct. The main problem in using lignin is its recalcitrant structure, variable composition, heterogeneity and limited solubility.

By breaking down the lignin biopolymer, using either physico-chemical or biological processes, valuable aromatic compounds are released. Biological lignin degradation is possible by using various oxidative enzymes (peroxidases and laccases), which depolymerize lignin into smaller fragments that are easier to use for lignin valorization.

As part of this work, catalase-peroxidase from *Thermoanaerobaculum aquaticum* was studied. It is a bifunctional enzyme with both, catalase and peroxidase activities. The aim for this study was to express and purify *Thermoanaerobaculum aquaticum* catalase-peroxidase, examine its peroxidase and catalase activities, temperature tolerance and ability to degrade lignin.

All goals set in the study were fulfilled. From 1 liter of medium 47,7 mg of active catalase-peroxidase was obtained. The studied catalase-peroxidase had peroxidase activity for both substrates used, ABTS and DMP. The enzyme had also considerable catalase activity. The studied enzyme retained its peroxidase activity at 42 °C for at least 48 hours and degraded organosolv aspen lignin under tested conditions (42 °C) to a small extent.

In the future, it is planned to optimize the conditions of lignin depolymerization, and to investigate the effect of different redox mediators on lignin depolymerization. It is also planned to test the depolymerizing effect of the enzyme on other lignins.

Tänuavaldused

Tahaksin tänada oma juhendajaid, Kairit Zovo ja Tiit Lukk, nende abi ja suunamise eest. Keelekorrektuuri aitasid läbi viia Hegne Pupart ja Eve-Ly Ojangu. Lisaks suur aitäh puidukeemia grupi liikmetele, ilma kelleleta antud bakalaureusetöö ei oleks võimalik.

Kasutatud kirjandus

- Borges, P. T., Frazão, C., Miranda, C. S., Carrondo, M. A., & Romão, C. V. (2014). Structure of the monofunctional heme catalase DR1998 from *Deinococcus radiodurans*. *The FEBS Journal*, *281*(18), 4138–4150. <https://doi.org/10.1111/febs.12895>
- 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 monoxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>
- Brown, M. E., Walker, M. C., Nakashige, T. G., Iavarone, A. T., & Chang, M. C. Y. (2011). Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: Application to microbial lignin degradation. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(45), 18006–18009. <https://doi.org/10.1021/ja203972q>
- Cao, X., Aiken, G. R., Butler, K. D., Huntington, T. G., Balch, W. M., Mao, J., & Schmidt-Rohr, K. (2018). Evidence for major input of riverine organic matter into the ocean. *Organic Geochemistry*, *116*, 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.11.001>
- Chauhan, P. S. (2020). Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*(June 2019), 101498. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101498>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Cellular and Molecular Life Sciences Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*, 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Childs, R. E., & Bardsley, W. G. (1975). The steady state kinetics of peroxidase with 2,2' azino di (3 ethylbenzthiazoline 6 sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*, *145*(1), 93–103. <https://doi.org/10.1042/bj1450093>
- Chio, C., Sain, M., & Qin, W. (2019). Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *107*(February), 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.008>
- Claiborne, A., & Fridovich, I. (1979). Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *Journal of Biological Chemistry*, *254*(10), 4245–4252. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50722-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50722-5)
- Cornish-Bowden, A. (2012). Why substrate inhibition occurs. In *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (Fourth Ed, p. 211). Wiley-Blackwell.
- de Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H. M., & Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, *236*, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>
- de Oliveira, F. K., Santos, L. O., & Buffon, J. G. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International*, *143*(March), 110266.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>

- Fall, I., Czerwiec, Q., Abdellaoui, S., Doumèche, B., Ochs, M., Rémond, C., & Rakotoarivonina, H. (2023). A thermostable bacterial catalase-peroxidase oxidizes phenolic compounds derived from lignins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(1), 201–217. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12263-9>
- Jöul, P., Ho, T. T., Kallavus, U., Konist, A., Leiman, K., Salm, O. S., Kulp, M., Koel, M., & Lukk, T. (2022). Characterization of Organosolv Lignins and Their Application in the Preparation of Aerogels. *Materials*, *15*(8). <https://doi.org/10.3390/ma15082861>
- Korányi, T. I., Fridrich, B., Pineda, A., & Barta, K. (2020). Development of ‘Lignin-First’ Approaches for the Valorization of Lignocellulosic Biomass. *Molecules*, *25*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122815>
- Loewen, P. C., Villanueva, J., Switala, J., Donald, L. J., & Ivancich, A. (2015). Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: Substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *83*(5), 853–866. <https://doi.org/10.1002/prot.24777>
- Losey, N. A., Stevenson, B. S., Busse, H. J., Damsté, J. S. S., Rijpstra, W. I. C., Rudd, S., & Lawson, P. A. (2013). *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov., sp. nov., the first cultivated member of acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(PART 11), 4149–4157. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.051425-0>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Ndontsa, E. N., Moore, R. L., & Goodwin, D. C. (2012). Stimulation of KatG catalase activity by peroxidic electron donors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.06.003>
- Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, *49*(2), 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4)
- Njuma, O. J., Davis, I., Ndontsa, E. N., Krewall, J. R., Liu, A., & Goodwin, D. C. (2017). Mutual synergy between catalase and peroxidase activities of the bifunctional enzyme KatG is facilitated by electron hole-hopping within the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(45), 18408–18421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.791202>
- Njuma, O. J., Ndontsa, E. N., & Goodwin, D. C. (2014). Catalase in peroxidase clothing: Interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *544*, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.11.007>
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Jha, V., Switala, J., & Loewen, P. C. (2008). Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *471*(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.12.008>

- Teder, T., Lõhelaid, H., & Samel, N. (2017). Structural and functional insights into the reaction specificity of catalase-related hydroperoxide lyase: A shift from lyase activity to allene oxide synthase by site-directed mutagenesis. *PLoS ONE*, *12*(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185291>
- Viéville, J., Tanty, M., & Delsuc, M. A. (2011). Polydispersity index of polymers revealed by DOSY NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, *212*(1), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2011.06.020>
- Wang, X., Yao, B., & Su, X. (2018). Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113373>
- Weiss, R., Guebitz, G. M., Pellis, A., & Nyanhongo, G. S. (2020). Harnessing the Power of Enzymes for Tailoring and Valorizing Lignin. *Trends in Biotechnology*, *38*(11), 1215–1231. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.010>
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., & Tanaka, N. (2002). The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *haloarcula marismortui*. *Nature Structural Biology*, *9*(9), 691–695. <https://doi.org/10.1038/nsb834>
- Zhang, S., Dong, Z., Shi, J., Yang, C., Fang, Y., Chen, G., Chen, H., & Tian, C. (2022). Enzymatic hydrolysis of corn stover lignin by laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase. *Bioresource Technology*, *361*(July), 127699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127699>
- Zhu, D., Qaria, M. A., Zhu, B., Sun, J., & Yang, B. (2022). Extremophiles and extremozymes in lignin bioprocessing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *157*(December 2021), 112069. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.112069>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Ander Erik (*autori nimi*)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „*Thermoanaerobaculum aquaticum*’i katalaas-peroksüdaasi biokeemiline iseloomustamine ligniini väärindamise seisukohalt“, (*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Kairit Zovo ja Tiit Lukk, (*juhendaja nimed*)

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023 (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.