

Polysakkaridialdehydien selektiivinen muokkaus oksinitriilaasientsyymillä

Tia-Annette Kakko
Pro gradu -tutkielma
Organisen kemian laboratorio
Kemian laitos
Helsingin yliopisto
Marraskuu 2012



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Kemian laitos
Tekijä/Författare – Author Tia-Annette Kakko		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Polysakkaridialdehydien selektiivinen muokkaus oksinitrilaasientsyymillä		
Oppiaine /Läroämne – Subject Kemia		
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterin tutkielma	Aika/Datum – Month and year Marraskuu 2012	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 67
Tiivistelmä/ Referat – Abstract <p>Guarkumi on monikäyttöinen aine niin lääke- kuin ravintoaineteollisuudessa. Guarkumille tehtävät reaktiot lisäävät mahdollisesti sen monikäyttöisyyttä. Tässä työssä tarkoituksena oli pidentää guarkumialdehydin (galaktomannaanin galaktoosin C-6 aldehydin) hiiliketjua yhdellä hiilellä syanohydriinien avulla.</p> <p>Oksinitrilaasi on syanohydriinejä muodostava entsyymi, jota kasvit käyttävät syanogeneesissä. Orgaanisissa synteeseissä tätä entsyymien ominaisuutta käytetään päinvastaiseen tarkoitukseen eli syanohydriinien muodostamiseen. Reaktioita oksinitrilaasilla on suoritettu kirjallisuuden mukaan runsaasti, mutta lähtöaine on ollut orgaaniseen liuottimeen liukeneva, reaktioseoksena on käytetty orgaanista liuotinta, liuotinseosta tai entsyymi on ollut kiinnitettynä matriisiin.</p> <p>Tutkimuksen kohteena olivat polysakkaridialdehydien oksinitrilaasilla tehtävät entsyymaattiset jatkoreaktiot. Työssä tutkittiin syanohydriinien entsyymaattista syntetisointia vesipitoisissa puskuriliuoksissa. Kokeet tehtiin raffinoosilla ja guarkumilla, jotka oli hapetettu entsyymaattisesti, selektiivisesti, galaktoosin C-6 asemasta aldehydiksi. Syanohydriinien muodostumista tutkittiin kolmella eri oksinitrilaasilla ja kahdella syanidia vapauttavalla yhdisteellä; natriumsyanidilla ja etyyliisanoformaatilla. Lisäksi tutkittiin erilaisten puskurien vaikutusta tulokseen. Näytteistä muodostettiin johdos metanolyysin ja silyloinnin avulla. Haihtuviksi tehdyt sakkariidit analysoitiin GC-MS:lla. Tulokset tarkistettiin lisäksi NMR- ja LC-MS/MS – tekniikoilla. Reaktioiden tuloksena oli α-hydroksiamidiksi hydrolysoitunut syanohydriini.</p> <p>Synteesin toimivuutta ja tuloksia olisi hyvä tutkia vielä alhaisessa lämpötilassa, sillä tähän tutkimukseen sisälletyt kokeet tehtiin huoneenlämpötilassa. Lisäksi parhaan tuloksen tuottanutta <i>AtHNL</i> -entsyymiä olisi hyvä kokeilla pH:ssa 3,3, jolloin kemiallinen reaktio olisi kokonaan suppressoitu.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Oksinitrilaasi, hydroksinitriililyaasi, guarkumi, polysakkaridi, <i>PaHNL</i> , syanohydriini		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Kumpulan kampuskirjasto, Kemian laitos, orgaanisen kemian laboratorio		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

Alkusanat

Erikoistyön tekeminen ja pro gradun kirjoittaminen on ollut opettavainen ja kärsivällisyyttä vaativa projekti. Haluaisin kiittää ohjaajaani FT Kirsti Parikkaa positiivisesta kannustuksesta ja opastuksesta laboratoriotyötä suoritettaessa. Lisäksi hän on antanut hyviä kommentteja kirjoitusta ajatellen. Kiitän myös Sami Heikkistä avusta NMR-analyysien suorittamisessa sekä Sun-Li Chongia MS-analyysien tekemisestä. Professori Maija Tenkaselle kiitos siitä, että kokeellisen osuuden suorittaminen Viikin Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella oli mahdollista. Professori Ilkka Kilpeläistä haluan kiittää tuesta ja ymmärtäväisestä asenteesta koko opintojeni aikana. Työn, opiskelun ja kodin yhteensovittaminen on toisinaan ollut haasteellista, opintojeni loppuun saattamiseksi olen saanut paljon tukea sekä työ- että opiskelukavereilta. Kaikkein eniten tahdon kuitenkin kiittää puolisoani Tommyä siitä, että hän on tukenut minua opintojeni aikana ja kannustanut minua tässä projektissa aina loppuun saakka. jatkamaan opintojani filosofian maisteriksi asti.

Sisällys

Tiivistelmä.....	i
Alkusanat	ii
Sisällys	iii
Lyhenneluettelo.....	v
KIRJALLINEN OSUUS.....	1
1 Johdanto	1
2 Syanohydriniit	2
2.1 Määrittely ja synteesi	2
2.1.1 Syanidilähteet	4
2.2 Syanohydriniinien reaktioita.....	5
2.2.1 Hydroksyyliiryhmän reaktiivisuus	5
2.2.2 Syanoryhmän reaktiivisuus.....	7
3 Entsymaattiset menetelmät syanohydriniinien valmistuksessa	11
3.1 Entsyymit.....	11
3.2 Syanohydriniinien valmistaminen	12
3.2.1 Hydroksinitriililyaasilähteitä	13
3.2.1.1 Rekombinantientsyymit	16
3.2.2 (R)-Oksinitriilaasi	17
4 Hiilihydraatit	18
4.1 Mono-, oligo- ja polysakkaridit.....	18
4.2 Galaktomannaanit.....	22
4.2.1 Galaktomannaanien reaktiivisuus	23
KOKEELLINEN OSUUS.....	25
5 Johdanto	25
5.1 Materiaalit ja menetelmät.....	26
5.1.1 Reagenssit ja entsyymit	26
5.1.2 Sokereiden hapetus	28

5.2	Syanohydrinien synteesi.....	29
5.2.1	Syanidilähteet	29
5.2.2	Puskuriolosuhteet.....	30
5.3	Synteetit hapetetulla raffinoosilla.....	31
5.3.1	Reaktiot natriumsyanidilla.....	31
5.3.2	Reaktiot etyyliisanoformaatilla.....	32
5.3.3	Kemiallisen reaktion tutkiminen.....	33
5.3.4	Reaktiot korkeammassa pH:ssa	34
5.4	Synteetit hapetetulla guarkumilla	35
5.5	Näytteiden käsittely.....	36
5.5.1	GC-MS näytteiden valmistaminen.....	36
5.5.1.1	Pelkistäminen	36
5.5.1.2	Hapan metanolyysi ja silylointi.....	36
5.5.2	NMR- ja MS- näytteiden valmistaminen	38
5.6	Muita kokeita	38
5.6.1	Saostus.....	38
5.6.1.1	Puhdistuskokeet.....	39
5.6.2	Jätteiden hävitys.....	39
5.7	Analysointi.....	40
5.7.1	GC-MS analyysi	40
5.7.1.1	Lähtöaineiden hapetusasteen määrittäminen.....	40
5.7.2	Massaspektrometrinen analyysi.....	41
5.7.3	NMR analyysi.....	42
5.8	Tulokset	42
5.8.1	Lähtöaineiden hapetusasteet	42
5.8.2	Syanohydriniit.....	43
5.8.2.1	GC-MS analyysin tulokset	43
5.8.2.2	MS/MS analyysin tulokset	51
5.8.2.3	NMR analyysin tulokset.....	55
5.8.2.4	Tulosten kooste.....	59
6	Johtopäätökset.....	60
	Viiteluettelo	61

LIITE 1.

Lyhenneluettelo

CLEA	Cross -linked enzyme aggregate, ristosilloitettu entsyymiryhmittymä
DAST	Dietyyliaminorikkitrifluoridi
DIPE	<i>di</i> -Isopropyylieetteri
DMF	<i>N,N</i> -Dimetyyliformamidi
DS	Substituutioaste
Et ₂ O	Dietyylieetteri
Fru	Fruktoosi
Gal	Galaktoosi
GC	Kaasukromatografi
GG	Guarkumi
Glc	Glukoosi
GO	Galaktoosioksidaasi
HCN	Vetysyanidi
HMDS	Heksametyylidisiloksaani
HNL	Hydroksinitriililyaasi, (<i>R</i>)-oksinitriilaasi
KCN	Kaliumsyyanidi
KF	Kaliumfluoridi
Man	Mannoosi
Me ₃ SiCl	Trimetyylisilyylikloridi
MS	Massaspektrometri
NaBD ₄	Natriumboorideuteridi
NaBH ₄	Natriumboorihydridi
NaCN	Natriumsyanidi
NCCOOEt	Etyylisyanoformaatti
NMR	Nuclear magnetic resonance, ydinmagneettinen resonanssi

NTP	Normal temperature and pressure, normaalilämpötila ja -paine
PCl ₅	Fosforipentakloridi
Pd	Palladium
py	Pyridiini
R ₃ SiCN	Trialkyylisilyylisyanidi
Raf	Raffinoosi
Sac	Sakkaroosi
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyylidimetyylisilyylikloridi
TEMPO	2,2,6,6,-Tetrametyylipiperidiini-1-oksyyli
TMCS	Trimetyylikloorisilaani
TMSCl	Trimetyylisilyylikloridi
t _r	Retentioaika

KIRJALLINEN OSUUS

1 Johdanto

Kemia on jatkuvasti kehittyvä tieteenala, jossa edistystä tapahtuu niin uusien tuotteiden syntetisoinnissa kuin laitetekniikassa. Usein tutkimuksessa sovelletaan monia eri menetelmiä ja tieteen alalajeja. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että yhden asian hallinta ei aina riitä, vaan monen alalajin tuntemus ja soveltaminen on tarpeen. Tässä työssä yhdistyvät orgaaninen kemia, biotekniikka sekä laitetekniikka.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää muodostuuko mantelista peräisin olevan hydroksinitriililyaasi -entsyymien avulla vesipitoisissa sakkariidiliuoksissa yhdisteitä, jotka sisältävät syanohydriini-funktionaalisuuden. Reaktiossa muodostui kuitenkin amidiksi hydrolysoitunut syanohydriini. Haastetta tutkimukseen toivat sekä lähtöaineiden liukoisuusominaisuudet että entsyymien vaatimien reaktio-olosuhteiden säätely. Lisäksi lähtöaineiden rajallisuus ja synteesituotteen puhdistuksen haasteellisuus toivat lisämaustetta.

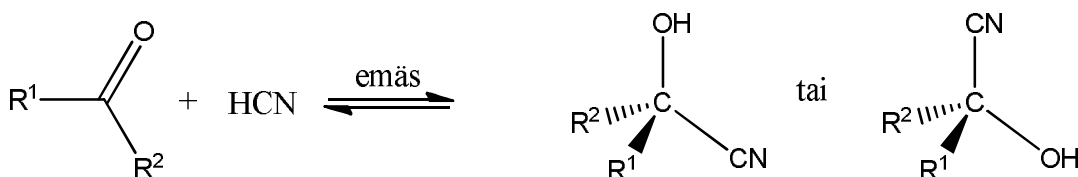
Uusien, synteesimenetelmien ympäristöystävällisyys, ns. vihreä kemia, on viime aikoina ollut tärkeässä asemassa. Lisäksi tuotantotekniset vaatimukset ovat tiukkoja, mieluiten käytetään olemassa olevaa tekniikkaa, sitä vain hiukan muunnellen. Orgaanisten liuottimien käytön vähentäminen ja synteesimenetelmien muuttaminen kestävämmän kehityksen suuntaan ovat tärkeässä asemassa uusia menetelmiä kehitettäessä. Bioteknologian yhdistäminen orgaanisen kemian reaktioihin on vähentänyt suojaryhmien käyttöä, samalla reaktioreitit ovat lyhentyneet ja tarvittavien reagenssien määrä on vähentynyt. Tässä työssä ympäristönäkökohdat huomioitiin mahdollisuuksien mukaan.

Syanohydriinit ovat monikäyttöisiä lähtöaineita kemiallisissa synteeseissä ja niiden muodostaminen on yksi orgaanisen kemian perusreaktioista. Kemiallisessa reaktiossa tuotteena muodostuu α -hydroksinitriilien raseeminen seos. Entsymaattisessa reaktiossa saadaan muodostettua suurimmaksi osaksi tiettyä konformaatiota, jolloin lopputuotteen stereokemia riippuu käytetyn entsyymien stereospesifisyydestä.

2 Syanohydrinit

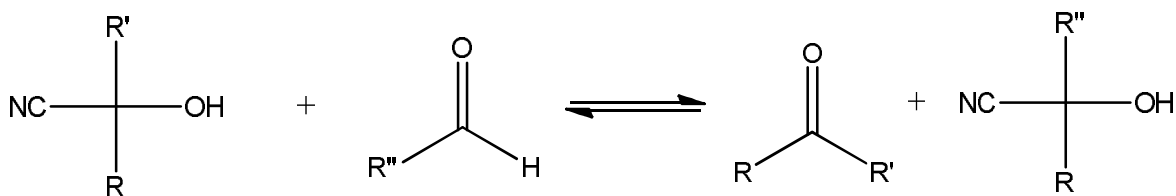
2.1 Määrittely ja synteesi

Syanohydrineissä on sekä syano- että hydroksyyli-ryhmä, jotka ovat kiinnittyneinä molekyylin samaan, alifaattiseen, osaan.¹ Syanohydrinejä valmistettaessa hiiliketju pitenee yhdellä hiilellä ja molekyyliin saadaan usein muodostettua kiraliakeskus.² Tämän lisäksi syanohydrinejä voidaan valmistaa sekä kemiallisesti että entsymaattisesti.



Kuva 1. Syanohydrinien muodostuminen. R^1 = alkyyli, sykloalkyyli, aryyli, heteroaryyli; R^2 = H, alkyyli.³

Kemiallisessa synteesissä vetysyanidia voidaan liittää raseemisesti joko aldehdyi- tai ketonirunkoon jolloin muodostuu α -hydroksinitriilejä. Reaktiota katalysoidaan emäksellä (kuva 1).^{1, 4} Vetysyanidin vaaralliselta käsittelyltä vältetään muodostamalla se suola- tai rikkihapon avulla *in situ*.⁵ Vaihtoehtoisesti α -hydroksinitriili muodostetaan syanidi-ionin vaihdolla ketonisyanohydrinin ja aldehdyin välillä. Menetelmää kutsutaan transhydroasyanaatioksi.³ Reaktiossa muodostuu stabiilimpi, aldehdyistä peräisin oleva, syanohydrini (kuva 2.). Usein tässä reaktiossa ketonina toimii asetonisyanoahydrini.^{1, 6, 7}



Kuva 2. Syanohydrinin valmistaminen transhydroasyanaatiolla. R, R' ja R'' = alkyyli- tai aryyli-ryhmä.^{1, 3}

Mekanistisesti reaktio on nukleofiilinen additio karbonyylihiileen, jolloin syanidi-ionin liittyminen karbonyylihiileen on reaktion nopeutta säätelevä tekijä. Alifaattiset aldehydit ja suurin osa alifaattisista ketoneista muodostavat syanohydriinejä.⁵ Ketoneilla reaktio on yleisesti ottaen hitaampi johtuen sekä elektroneja luovuttavan ryhmän vaikutuksesta että alkyylin aiheuttamasta steerisistä esteistä. Joissakin tapauksissa reaktion tasapaino on enemmän lähtöaineiden puolella. Tällöin tasapainon siirtäminen tuotteen puolelle onnistuu vain joko reaktiotuotteen poistamisella reaktioseoksesta, vetysyanidin määrän lisäämisellä tai biokatalyytin avulla.⁴ Aldehydeistä muodostuva syanohydriini on pysyvämpi ja reaktion tasapaino on pääsääntöisesti tuotteen puolella.^{1, 5} Ketonin ja aldehydin muoto vaikuttavat reaktionopeuteen ja -tasapainoon siten, että alkyyli-aryyliketonit reagoivat huonosti, jos lainkaan. Lisäksi molemmilla ryhmillä molekyylin haaroittuneisuus hidastaa reaktiivisuutta.¹

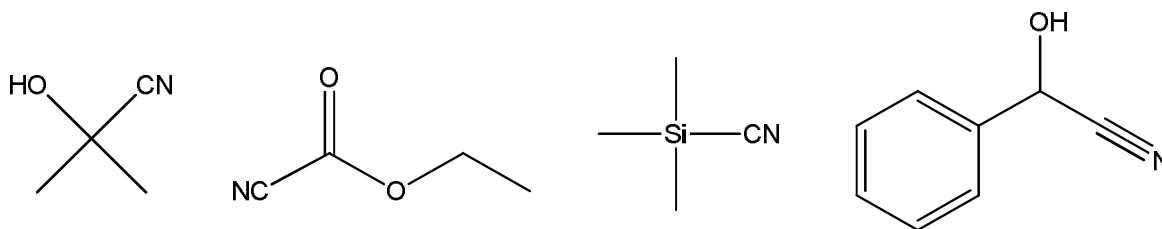
Entsyyttisissä reaktioissa peruseriaate reaktiolle on sama kuin kemiallisessa reaktiossa, mutta näissä reaktioissa entsyymit katalysoivat vetysyanidin enantioselektiivistä liittymistä karbonyylihiileen.^{3, 4} Samalla molekyyliin muodostuu kiraliakeskus, jossa hiiliatomiin on liittynyt neljä erilaista ryhmää ja molekyylistä tulee optisesti aktiivinen. Käytettävät entsyymit tuottavat reaktiossa usein vain joko *R*- tai *S*- muotoa, kun taas kemiallisessa reaktiossa muodostuu aina molempia stereoisomeerejä.^{2, 3, 8} Tällöin enantiopuhkaita tuotteita valmistettaessa kemiallisen reaktion tuottavuus jää suurimmillaan 50 %:iin.⁹ Entsyyttinen hiili-hiili sidoksen muodostuminen on yleensä hyvin diastereo-, enantio-, kemo-, ja regioselektiivistä.³

Edellä mainittujen menetelmien lisäksi syanohydriinien enantioselektiivistä syntetisointia on tehty yhdistämällä sekä kemiallinen että entsyyttinen menetelmä. Tällöin emäskatalysoidussa reaktiossa muodostetaan syanohydriinien raseeminen seos, jonka annetaan edelleen reagoida entsyyttisesti esim. lipaasientsyymien ja asetyloitireagenssin kanssa.¹⁰

Syanohydriinien muodostumisreaktio on eksotermisen ja korkeassa pH:ssa reversiibeli. Tästä seuraa, että kemiallisten, emäskatalysoitujen, reaktioiden tuotteet saadaan eristettyä vasta kun reaktioseos on stabiloitu hapon avulla.¹

2.1.1 Syanidilähteet

Syanohydrinien muodostamiseen tarvitaan syanidi-ioni, ^-CN . Perinteinen tapa syanidi-ionin muodostamiseksi on ollut käyttää vetysyanidia (HCN) emäskatalysoidussa tai syanidisuolaa (NaCN tai KCN) happokatalysoidussa reaktiossa. Muita syanoryhmän lähteitä voivat olla asetonisyanohydriini¹¹, etyylisyanoformaatti (NCCOOEt)^{12, 13}, α -hydroksibentseeniasetonitriili eli mantelinitriili, dietyylisyanofosfonaatti¹³, trialkyylisilyylisyanidi (R_3SiCN)³, alkyylisyanidi ja metallisyanidi⁸. Esimerkkejä rakenteista on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Asetonisyanohydriinin, etyylisyanoformaatin, trimetyylisilyylisyanidin¹⁴ ja mantelinitriilin rakennekaavat.

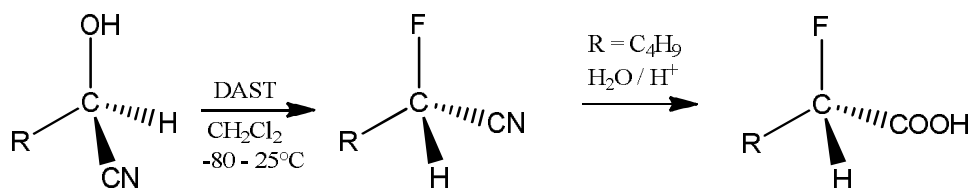
Käytettävä substraatti valikoituu monien eri tekijöiden summasta. Vetysyanidin myrkyllisyys, alhainen kiehumispiste ja reaktion eksotermisyys ovat tärkeitä työturvallisuudessa huomioitavia seikkoja. Lähteissä kehoitetaan käyttämään hälytysjärjestelmää.³ Muiden, hiukan turvallisempien, lähtöaineiden tarkoituksena on vapauttaa vetysyanidi reaktioseokseen *in situ*, josta se liittyy kohdemolekyyliin. Käytettävä reaktiotyyppi vaikuttaa syanidilähteen valintaan siten, että esimerkiksi lähtöaineen emäksisyys vaikuttaa entsyymaattisten reaktioiden kulkuun.³

2.2 Syanohydrinien reaktioita

Syanohydrinit ovat bi- tai monifunktionaalisia yhdisteitä, joiden kemiallinen rakenne sisältää nitrili- ja hydroksyyliosan. Nämä funktionaaliset ryhmät ovat reaktiivisia ja siten monikäyttöisiä.^{3, 15} Tästä syystä niitä käytetään välituotteena useissa kemian teollisuuden reaktioissa.¹ Kiraliakeskus tuo lisäarvoa syanohydrinien monikäyttöisyydelle, ja siksi myös maatalouskemikaali- ja lääkeaineteollisuus ovat kiinnostuneita syanohydrinien kehittämisestä.^{8, 12}

2.2.1 Hydroksyyli ryhmän reaktiivisuus

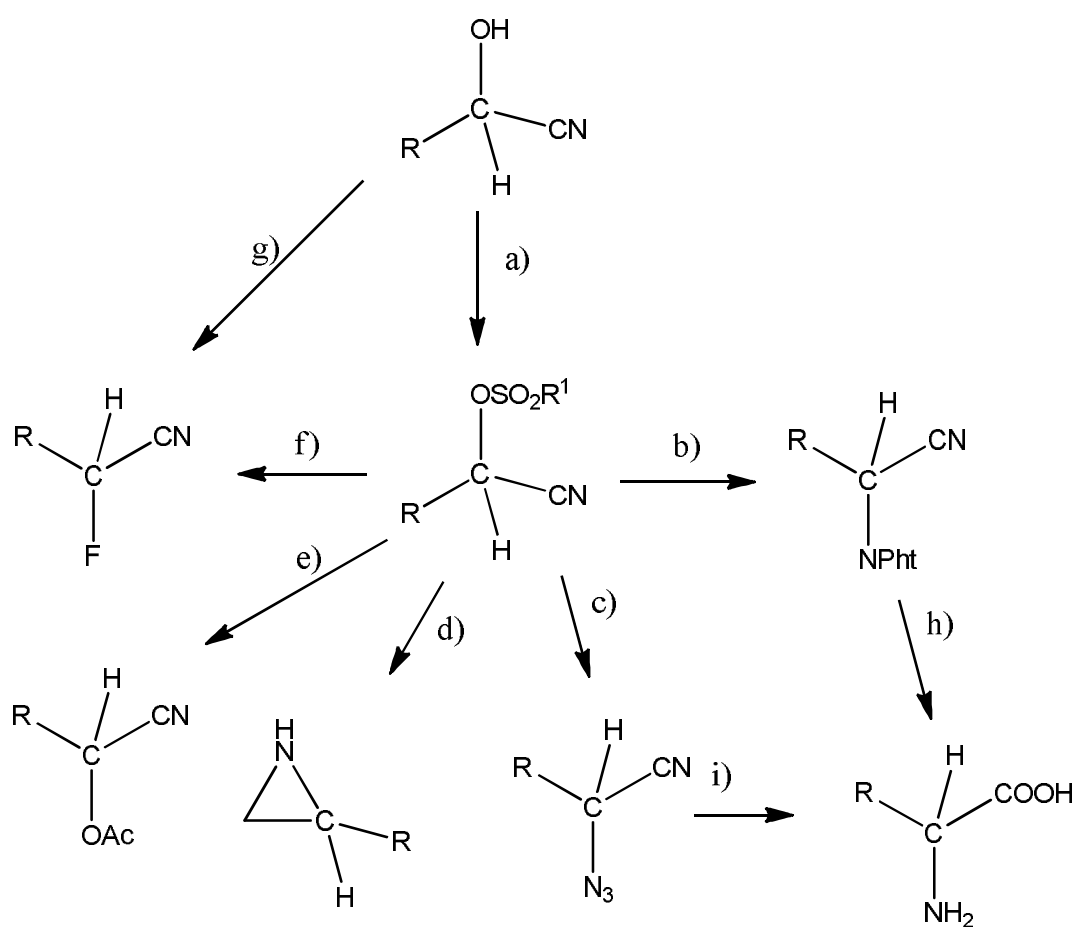
Hydroksyyli ryhmän aktiivisuutta voidaan lisätä muuttamalla se hyväksi poistuvaksi ryhmäksi.¹⁶ Tämä mahdollistaa S_N2 -tyypin korvautumisreaktiot, joissa tapahtuu konfiguraation kääntyminen.¹⁷ Hydroksyyli ryhmä voidaan syrjäyttää myös elektronegatiivisella ryhmällä; esimerkiksi primaariset ja sekundaariset amiinit korvaavat hydroksyylin muodostaen α -aminonitriilejä. Myös halogeenivedyt sekä fosforipentakloridi (PCl_5) reagoivat samalla tavalla muodostaen α -halogeeninitriilejä.¹ Lisäksi suorat stereoselektiiviset reaktiot ovat mahdollisia eräiden reagenssien avulla (kuva 4.) esimerkkinä dietyyliamiinirikkitrifluoridin (DAST) reaktio syanohydrinin kanssa.¹⁶



Kuva 4. (S)-2-fluoronitriilien ja edelleen (S)-2-fluorokarboksyylihappojen valmistaminen (R)-syanohydrineistä.¹⁶

Sen sijaan, että koko hydroksyyli ryhmä (OH) vaihdetaan, voidaan ainoastaan OH-ryhmän vety korvata. Reaktioista yleisin on esterin muodostaminen hapon tai happokloridin kanssa.¹ Kuten alkoholeilla yleensä, niin myös tässäkin tapauksessa, aktivaatio sulfonyyli ryhmällä johtaa useisiin erilaisiin jatkoreaktiomahdollisuuksiin (kuva 5).

Muodostuvat α -sulfonyylioksintriilit sisältävät hyvän poistuvan ryhmän.^{17, 18} Optisesti aktiivisten α -sulfonyylioksintriilien nukleofiiliset substituutioreaktiot johtavat moniin mielenkiintoisiin yhdisteisiin: α -atsidonitrileihin, α -aminonitrileihin, α -aminohappoihin sekä etyleeni-imiineihin.¹⁹ Edellä mainituista, alifaattiset optisesti aktiiviset molekyylit säilyttävät konfiguraationsa, kun taas aromaattiset ovat epästabiilimpia optisen puhtautensa suhteen.¹⁶



Kuva 5. Kiraalisten syanohydriinien hydroksyyliiryhmän jatkoreaktioita.¹⁷ a) R^1SO_2Cl , pyridiini (py), b) kaliumftaali-imidi, *N,N*-Dimetyyliformamidi (DMF) c) kaliumatsidi, DMF, d) $LiAlH_4$, Et_2O , $-80\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7 fosfaattipuskurissa, e) kaliumasetaatti (KOAc), DMF f) KF, kruunueetteri, $45 - 100\text{ }^\circ\text{C}$ tai amberlyst A-26-F, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, g) DAST, $-80\text{ }^\circ\text{C} - 25\text{ }^\circ\text{C}$ tai $TMSCl$, py, DAST, $-80\text{ }^\circ\text{C} - 25\text{ }^\circ\text{C}$, h) hydratsiini (N_2H_4), Δ , i) Pd-C, H_2 .

Syanohydrineistä poistetaan vettä fosforipentoksidin avulla. Dehydruuksella molekyyliin muodostetaan kaksoissidos, joka saadaan polymeroitua. Menetelmällä valmistetaan alkyyliakrylonitriilejä, joita käytetään muun muassa muoviteollisuuden raaka-aineina.¹

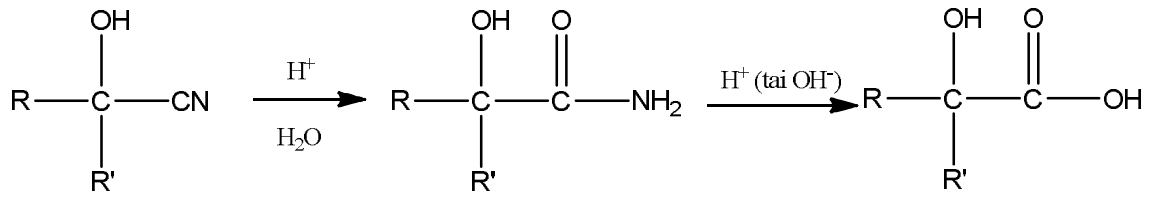
2.2.2 Syanoryhmän reaktiivisuus

Syanohydrinien nitriliryhmälle voidaan tehdä monenlaisia reaktioita, mutta suojaamalla hydroksyyli ryhmä esimerkiksi *tert*-butyylidimetyylisilyylikloridin (TBDMS-Cl) avulla voidaan syanoryhmän reaktiivisuutta lisätä.¹⁷

Ilman hydroksyyli ryhmän suojausta voidaan toteuttaa muun muassa pelkistys- ja hydrolyysireaktioita. Hiili-tyyppi kolmoissidoksen pelkistäminen amiiniksi tapahtuu joko litiumalumiinihydridillä (LiAlH₄)¹⁶ tai katalyyttisellä vedytyksellä, jossa katalyyttinä toimii esimerkiksi palladium.²⁰ Yleensä natriumboorihydridi (NaBH₄) ei pelkistä kolmoissidoksia, mutta eräiden lähteiden mukaan sillä voidaan pelkistää syanohydrinien nitriliryhmä, kun katalyyttinä käytetään trifluoretikkahappoa^{8,21} tai nikkelisuolaa.¹⁵

Hiili-tyyppi sidoksen pelkistykseen jälkeen on mahdollista muokata amiinifunktionaalisuutta happoklorideilla, jolloin muodostetaan β -hydroksiamideja. Vaihtoehtoisesti etikkahappo-muurahaishappoanhydridin avulla muodostetaan *N*-alkyyli- β -aminoalkoholeja.¹⁸

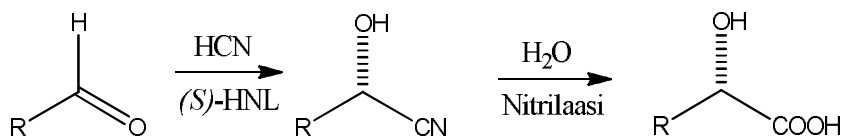
Nitriilien hydrolysointi on happokatalysoitu reaktio (kuva 6.), jossa muodostuu ensin amidi joka hydrolysoituu edelleen karboksyylihapoksi.¹ Vaikka hydrolysointi väkevällä hapolla tai emäksellä muodostaa yleensä raseemisen seoksen,¹⁵ niin yllättävää kyllä väkevä suolahappo ei muuta kiraalisten syanohydrinien optista aktiivisuutta.¹⁷ Silloin kun amidin hydrolyysi on hitaampi kuin nitriilin, on amidi mahdollista eristää reaktioseoksesta.¹ Hydrolysoitaessa trimetyylisilyylikloridia (TMSCl) vedellä muodostuu suolahappoa. Jos reaktio muodostetaan nitriilien kanssa *in situ*, hydrolysoituu nitriili amidihydrokloridiksi. Amidi saadaan vapautettua suolastaan neutraloimalla seos.²²



Kuva 6. Nitriilin hydrolyysi. R = alkyyli tai fenyyl ja R' = alkyyli tai vety¹

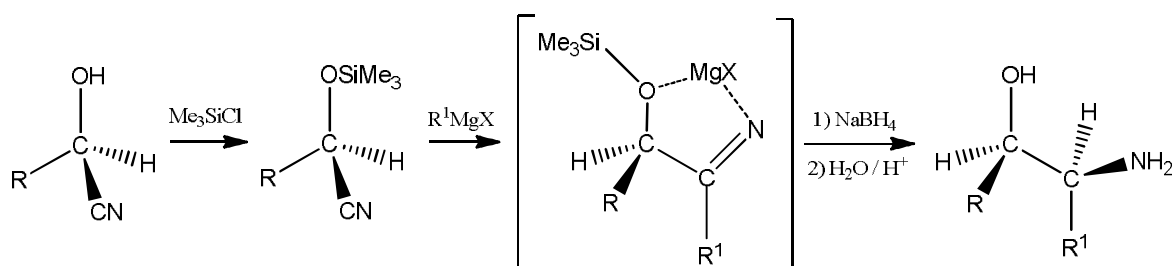
Hellävaraisempia kemiallisia aineita tai biokatalyyttejä käytettäessä tulee amidin muodostumisesta todennäköisempää, tällöin amideja voidaan valmistaa siirtymätal- metallikatalyyttien tai entsyymien avulla. Toimiviksi todettuja metallikatalyyttejä ovat olleet esimerkiksi platinum(II)fosfinitiitti tai palladium(II)kloridi.¹⁵ Entsyymeistä nitriilihydrataasit aikaansaavat amideja, kun taas nitrilaaseilla hydrolyysi etenee karboksyylihapoksi saakka.²³

Liittämällä useampaa entsyymiä apuaineeseen muodostetaan nk. CLEA- entsyymejä (cross-linked enzyme aggregate), joita käyttämällä on mahdollista suorittaa monta reaktiovaihetta samanaikaisesti. Esimerkkinä (*S*)-mantelihapon valmistaminen bentsaldehydistä (kuva 7).²⁴ Toisen tyyppinen nitriilin hydrolyysi tehdään Pinner reaktiossa, jossa kuivan alkoholin ja suolahapon avulla, saadaan valmistettua estereitä.^{1,25}



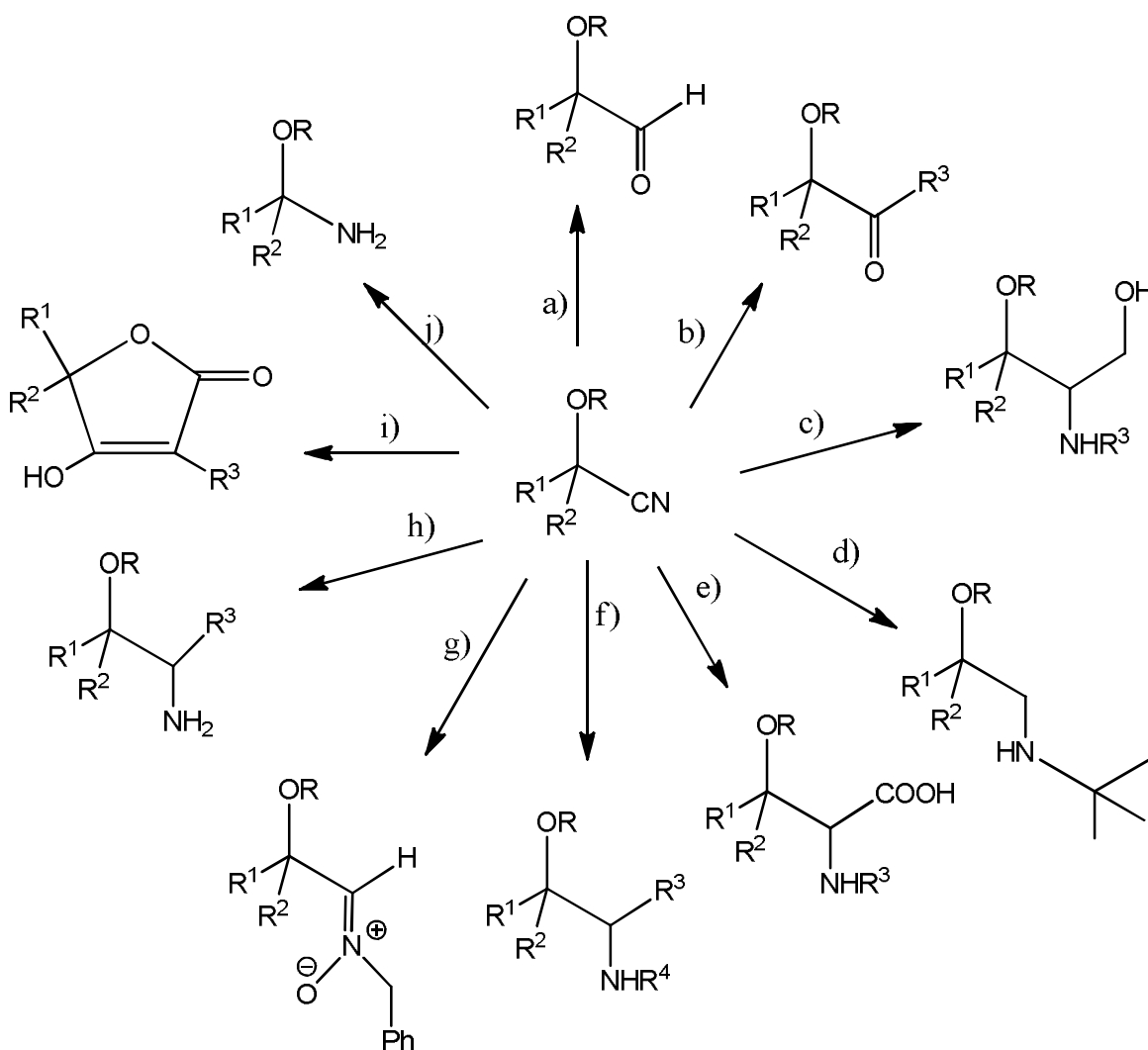
Kuva 7. Käyttämällä samanaikaisesti (*S*)-HNLa ja epäspesifistä nitrilaasia CLEA- matriisiin immobilisoituna saadaan syntetisoitua (*S*)-2- hydroksihappoja. R=C₆H₅²⁴

β -Aminoalkoholien valmistaminen on tärkeää niiden biologisen aktiivisuuden takia.⁸ Esimerkiksi efedriinityyppisiin yhdisteisiin kuuluvan yhdisteen, enantiomeerisesti puhtaan 2-aminoalkoholin, valmistuksessa hydroksyyli-ryhmä suojataan trimetyylisilyylikloridilla (Me_3SiCl), reaktioseokseen lisätään Grignardin reagenssia ja muodostunut imiini välituote pelkistetään natriumboorihydridillä (kuva 8.).^{16, 17} Edellä mainituista imiineistä voidaan edelleen valmistaa *N*-substituoituja aminoalkoholeja transiminaatiolla. Vaihtoehtoisesti aminoalkoholit voidaan hydrolysoida, jolloin muodostetaan optisesti aktiivisia asyloineja, joiden karbonyylihiilen α -asemassa on hydroksyyli-ryhmä.¹⁶



Kuva 8. Stereoselektiivinen 2-aminoalkoholien synteesi. $\text{R} = \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}^1 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{X} = \text{Br}, \text{I}$ ¹⁶

Hydroksyyli-ryhmän suojauksen jälkeen nitrilin mahdollisia reaktioita (kuva 9.) ovat nukleofiiliset additioreaktiot, joissa muodostetaan α -hydroksialdehydejä (a), hydroksiketoneita (b), 2-amino-1,3-dioleja (c), substituoituja β -aminoalkoholeja (d), *N*-substituoituja β -hydroksi- α -aminohappoja (e), *N*-substituoituja, α -substituoituja, α -amino- β -alkoholeja (f), α -hydroksialdonitroneja (g), α -substituoituja α -aminoalkoholeja (h), tetronihappoja (i) ja β -aminoalkoholeja (j).¹⁸ Näiden yhdisteiden jatkoreaktiona voivat esimerkiksi olla pelkistäminen, transiminaatio, hydrolyysi sekä sykloisointi.⁸



Kuva 9. Hydroksyyli­ryhmän suo­jaus mah­dolis­taa se­uraa­vat re­ak­tiot: a) Di-isobu­tyyli­alu­mi­ni­hydri­di (DIBAL), H_2SO_4 , b) Grignard, H_3O^+ , c) Viny­yli Grignard, $NaBH_4$, di-*tert*-bu­tyyli­dikar­bona­atti $[(BOC)_2O]$, me­ta­noli, $NaBH_4$, d) DIBAL, amiini, $NaBH_4$ e) DIBAL, amiini, HCN , kar­bonyyli-imidatsoli, emäs, hap­po, f) Grignard, $NaBH_4$, for­myyli­aset­aatti, liti­umalu­mi­ni­hydri­di ($LiAlH_4$) g) DIBAL, N-ben­sy­yli­hi­drok­sy­yli­amiini h) Grignard, $NaBH_4$ i) $BrZnCHR_3COOR_4$, H_3O^+ j) $LiAlH_4$ tai boraani (BH_3). Mukailtu lähteestä Sharma et al.¹⁸

3 Entsymaattiset menetelmät syanohydrinien valmistuksessa

3.1 Entsyymit

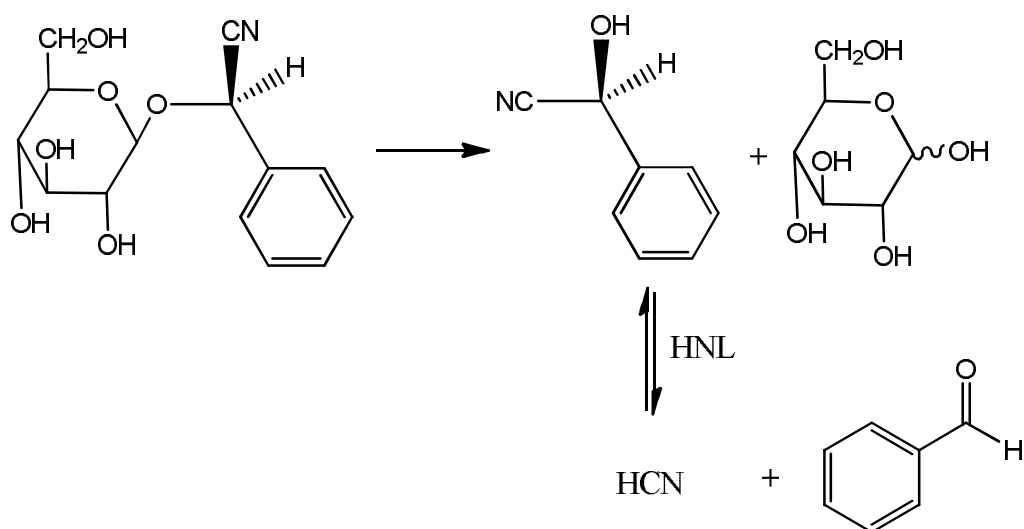
Entsyymit ovat luonnonkatalyyttejä, joita esiintyy kaikissa elämää sisältävissä olosuhteissa. Ne katalysoivat valtavan määrän erilaisia reaktioita alentamalla reaktioiden aktivointienergiaa. Reaktionopeus muuttuu tyypillisesti 10^5 – 10^8 -kertaiseksi, mutta voi muuttua jopa 10^{17} kertaa nopeammaksi kuin ilman entsyymiä tapahtuva reaktio.^{4, 26} Entsyymit ovat proteiineja, ja pysyäkseen aktiivisena niiden tulee esiintyä tietyssä luonnonmukaisessa muodossa.²⁶ Toisin kuin useat kemialliset reagenssit, entsyymit eivät ole herkkiä kosteudelle tai ilmalle.⁴ Osa entsyymeistä vaatii toimiakseen myös kofaktorin ja/tai koentsyymin. Kofaktori on epäorgaaninen ioni, esimerkiksi Fe^{2+} tai Mg^{2+} , kun taas koentsyymi on metalli-orgaaninen- tai orgaaninen molekyyli.²⁷

Entsyymien luonnonmukaisuuden ja rakenteen takia niillä on tiettyjä reaktioolosuhdevaatimuksia. Kullakin entsyymillä on sille ominainen pH- ja lämpötila-alue, jossa se toimii optimaalisesti.²⁶ Entsyymien toiminta on usein substraattispesifistä, eli entsyymit toimivat vain tietynlaisen rakenteen omaavien lähtöaineiden kanssa. Nämä aineet sisältävät kullekin entsyymille oikeanlaisen, aktiivisen sitoutumiskohdan. Entsyymin kiinnittyessä substraattiin siihen muodostuu entsyymisubstraattikompleksi, reaktion aktivointienergia laskee ja reaktio nopeutuu.²⁷

Entsyymien käyttö lisääntyy jatkuvasti mikä johtuu niiden tietyistä, hyvistä ominaisuuksista: ne ovat yleensä kemo-, regio- ja stereoselektiivisiä.⁹ Entsyymien katalysoimat reaktiot suoritetaan normaalipaineessa ja lämpötilassa (NTP), jolloin sivureaktioita tapahtuu vähemmän kuin perinteisissä kemiallisissa reaktioissa. Entsyymien katalysoimissa reaktioissa suojaryhmien käyttö on yleensä tarpeetonta. Lisäksi näitä biokatalyyttejä saadaan eristettyä luonnosta ja synteesituotteiden tuotantoprosessien energiankulutus on NTP -olosuhteiden takia vähäisempää.²⁸ Edelleen biokatalyytit hajoavat biologisesti ja teollisuudessa ympäristöystävällisyys tuo tuotteille lisäarvoa.²⁸

3.2 Syanohydrinien valmistaminen

Oksinitrilaaseja esiintyy luonnossa erittäin yleisesti. Siemenkasvit tuottavat puolustukseen ja aminohappojen biosynteesiin hydroksinitriililyaasia (HNL) eli oksinitrilaasia. Kasvin sisältämät syanogeeniset glykosidit ja/tai syanolipidit ovat stabiilissa muodossa olevia syanohydrinejä, joita oksinitrilaasit pilkkovat vapauttaen samalla vetysyanidia (kuva 10).^{15, 29, 30} α -Hydroksinitriilien entsyymaattisessa valmistuksessa tätä katalyyttiominaisuutta käytetään päinvastaiseen tarkoitukseen eli syanohydrinien muodostamiseen.¹⁵ Syanohydrinit ovat tärkeitä kemiallisten reaktioiden lähtöaineina käytettäviä bifunktionaalisia yhdisteitä, joilla voidaan valmistaa enantiopuhdaita synteesisuotteita.³¹ Lipaasientsyymillä (E.C.3.1.1.3) saadaan valmistettua syanohydrinejä, mutta tällöin tuotteet muodostuvat raseemisena seoksena, aivan kuten kemiallisessa reaktiossa.¹¹



Kuva 10. Syanogeenisten glykosidien hajoaminen ensin glukosidaasin avulla, seuraavassa vaiheessa HNL katalysoi vetysyanidin vapautumisen kasvin puolustukseksi. α -Hydroksinitriilien entsyymaattinen valmistus tapahtuu käänteisessä reaktiossa. Mukailten lähteistä Schmidt *et al.*¹⁷, Pichersky *et al.*³² ja Johnson *et al.*³³

Entsyymeillä on niille suositellut nimet, mutta useiden eri synonyymien takia International Union of Biochemistry and Molecular Biology:n nimeämislautakunnasta koostuva entsyymikomissio (E.C.) on luokitellut entsyymejä E.C.-numeroilla vuodesta 1961 alkaen.³⁴ E.C.-numeron käyttö julkaisuissa on suositeltavaa epäselvyyksien välttämiseksi.

Entsyymien luokittelussa käytetään nelinumeroista järjestelmää, jossa ensimmäinen numero kertoo reaktiotyyppin, toinen reaktion alaluokan, kolmas antaa lisätietoa reaktiosta ja neljäs numero kertoo substraattispesifisyyden.³⁵ Esimerkiksi E.C.4.1.2.x:ssä ensimmäinen 4. tarkoittaa, että entsyymit kuuluvat lyaaseihin, toisena oleva 1. kertoo kyseessä olevan hiili-hiilidoksia muodostava lyaasi ja kolmantena oleva 2. on aldehydilyaasin numero.^{35, 36}

Enantioselektiivinen vetysyanidin additio tuottaa tietyn stereoisomeerin omaavia syanohydriinejä, jotka saadaan aikaan käyttämällä hydroksinitriililyaaseja eli oksinitriilaaseja. Näihin kuuluvat E.C.4.1.2.x; E.C.4.1.2.10, E.C.4.1.2.11, E.C.4.1.2.37, E.C.4.1.2.38 ja E.C.4.1.2.39.^{18, 36} E.C.-numerot E.C.4.1.2.37 ja E.C.4.1.2.39 on poistettu ja niitä korvaavat uudet numerot E.C.4.1.2.46 ja E.C.4.1.2.47. Tässä työssä käytetään uusia numeroita, vaikka viitteessä olisi käytetty vanhoja E.C.-numeroita. (Taulukko 1. s. 15)

3.2.1 *Hydroksinitriililyaasilähteitä*

Kolmisentuhatta kasvilajia tuottaa oksinitriilaasientsyymiä. Lajeihin kuuluu useita eri kasvisukuja, joiden tuottamat entsyymit eroavat toisistaan substraattispesifisyyden ja koentsyymivaatimusten mukaisesti.³⁷

Entsyymilähteet jaotellaan kahteen luokkaan sen mukaan, minkälaisen kofaktorin ne tarvitsevat. Luokkaan I kuuluvat käyttävät flaviiniadeniinidinukleotidia (FAD) ja luokkaan II eivät.¹⁸ Luokkaan I kuuluvat *Rosaceae*-suvun alalajien *Pruinoideae* ja *Maloideae* kasvit, kuten omenat (*McHNL*), kirsikat (*PsHNL*, *PlyHNL*) ja mantelit (*PaHNL*).¹⁸ Näiden entsyymien sekvenssi koostuu pääsääntöisesti *N*-glykolysoituneesta proteiinista, jonka hiilihydraattipitoisuus on 30 %.¹⁷ I luokan entsyymien luonnossa esiintyvä substraatti on (*R*)-mantelintriili (E.C.4.1.2.10).^{37, 38} (*R*)-mantelintriililyaasin substraattispesifisyys on laaja sillä se reagoi myös alifaattisten, aromaattisten, heteroaromaattisten ja α, β -tyydyttymättömien aineiden kanssa.¹⁵ Luokkaan II kuuluvat entsyymit eivät vaadi FAD:a toimiakseen. Tähän luokkaan kuuluvat *Euphorbiaceae*-sukuun kuuluvat kumipuu

(*Hevea Brasiliensis*) HbHNL (E.C.4.1.2.47) ja kassava (*Mannihot esculenta*) MeHNL (E.C.4.1.2.38). Näiden entsyymien toiminta on α/β -hydrolaasien kaltaista. Edellä mainituista kasveista saatavan entsyymin luonnollinen substraatti on asetonisyanohydriini, mutta ne hyväksyvät reagenssiksi mantelinitriililyaasin lailla alifaattiset, aromaattiset, heteroaromaattiset ja α,β -tyydyttymättömät substraatit. Niiden stereoselektiivisyys on mantelinitriilistä poiketen *S*-muotoa.³⁷ (Taulukko 1. s. 15)

Muita II luokkaan kuuluvia kasveja ovat mm. durra ja pellava. Durran (*Sorghum bicolor*) SbHNL (E.C.4.1.2.11), entsyymin aminohapposekvenssi on erilainen kuin muiden tunnettujen hydroksinitriililyaasien ja muistuttaakin suurimmaksi osaksi karboksipeptidaasien sekvenssiä.³⁷ Sen luonnollinen substraatti on (*S*)-4-hydroksimantelinitriili, ja se reagoi lisäksi aromaattisten ja heteroaromaattisten aineiden kanssa.^{15, 39} Pellavasta (*Linus usitatissimum*) saadaan (*R*)-spesifistä hydroksinitriililyaasia (*Lu*HNL, E.C.4.1.2.46), joka on alkoholidehydrogenaasien lailla toimiva sinkistä (Zn^{2+}) riippuvainen entsyymi. Sen luonnollinen substraatti on (*R*)-2-butanoni syanohydriini, ja se toimii alifaattisten ja α,β -tyydyttymättömien aldehydien kanssa.³⁷ (Taulukko 1.)

Entsyymlähteestä riippuen kullakin HNL:lla on sille optimaalinen pH-toiminta-alue. Edellä mainituista suurin osa toimii hyvin pH:ssa 5.5, mutta ääritapauksia ovat MeHNL:n pH-alue 3.5–5.4 ja PsHNL:n alue 6.0–7.0.¹⁸ Lisäksi rekombinanttitekniikalla tuotetuilla entsyymeillä on omat optimialueensa.

Entsyyminäisissä reaktioissa lämpötilalla on suuri vaikutus entsyymien stabiilisuuteen ja muodostuvien tuotteiden enantiomeeriseen puhtauteen. Sen lisäksi, että alhainen lämpötila (-5 – 4 °C) stabiloi entsyymien toimintaa, tuottavat ko. lämpötilassa tehdyt reaktiot enantiomeerisesti puhtaampaa syanohydriiniä.^{3, 18, 40, 41}

Taulukko 1. Hydroksinitriililyaasien E.C.-numerot, niiden suositellut nimet ja synonyymit.^{35, 42}

E.C.-numero	Systemaattinen nimi	Synonyymejä	Substraatit	pH alue	Lämpötila-alue
4.1.2.10	(<i>R</i>)- mantelinitriili bentsaldehydilyaasi (syanidia muodostava)	(<i>R</i>)-mantelinitriililyaasi, (<i>R</i>)- oksinitrilaasi, Oksinitrilaasi, <i>D</i> - oksinitrilaasi, <i>D-α</i> - hydroksinitriililyaasi mantelinitriili bentsaldehydilyaasi <i>Pa</i> HNL, <i>At</i> HNL, (<i>R</i>)-HNL, (<i>R</i>)- <i>Pe</i> HNL, (<i>R</i>)-hydroksinitriililyaasi <i>R</i> -selektiivinen hydroksinitriililyaasi <i>R</i> -selektiivinen HNL (<i>R</i>)-(+)- mantelinitriililyaasi	Mantelinitriili Alifaattiset ja aromaattiset aldehydit ja metyyliketonit	2,5-7	10-35 °C
4.1.2.11	(<i>S</i>)-4- hydroksimantelinitriili 4-hydroksi bentsaldehydilyaasi (syanidia muodostava)	Hydroksimantelinitriililyaasi Hydroksinitriililyaasi Oksinitrilaasi (<i>S</i>)-4-hydroksimantelinitriili Hydroksibentsaldehydilyaasi <i>Sorghum</i> hydroksinitriililyaasi SbHNL	4-Hydroksi-mantelinitriili, aromaattiset aldehydit, ja metyyliketonit	3,2-6,5	-5-25 °C
4.1.2.38	2-hydroksi-1,2-difenylyietanoni bentsaldehydilyaasi (bentsaldehydiä muodostava)	Bentsoiini aldolaasi Bentsaldehydilyaasi	2-hydroksi-1,2-difenylyietanoni,	6-8,5	25-37 ⁱ
4.1.2.46	(2 <i>R</i>)-2-hydroksi-2- metyylibutaaninitriili butan-2- one-lyaasi (syanidia muodostava)	Alifaattinen (<i>R</i>)- hydroksinitriililyaasi (<i>R</i>)-HNL (<i>R</i>)-oksinitrilaasi (<i>R</i>)-hydroksinitriililyaasi <i>Lu</i> HNL	Asetonisyyano-hydriini, alifaattiset aldehydit ja metyyliketonit	4,1-5,5	25 °C
4.1.2.47	(<i>S</i>)-syanohydriinilyaasi (syanidia muodostava)	(<i>S</i>)-hydroksinitriililyaasi (<i>S</i>)-oksinitrilaasi, (<i>S</i>)- <i>Hb</i> HNL (<i>S</i>)- <i>Me</i> HNL, Hydroksinitriililyaasi	Mantelinitriili, alifaattiset ja aromaattiset aldehydit sekä metyyliketonit	4,8-8	-5-25 °C

ⁱ stabiilisuustestien tulos

3.2.1.1 Rekombinantientsyymit

Entsyymien saatavuus riippuu tuotantokasvin HNL pitoisuudesta ja kasvien sadosta. Jotta entsyymien tuotanto ei olisi kasvien tuotannosta ja kasvikaudesta riippuvaista, on niiden tuottamiseksi kehitetty geeniteknikkaan perustuvia menetelmiä.¹⁵

Useita HNL-entsyymejä on tuotettu yhdistelmä-DNA-tekniikkaa hyväksi käyttäen. Esimerkiksi bakteeri- ja hiivakantojen avulla on onnistuttu optimoimaan *MeHNL* ja *HbHNL* entsyymien kloonaukset ja tuottaminen.¹⁵ Mantelista (*Prunus amygdalus*, *Pa*) saatavaa oksinitrilaasia, *PaHNL*-entsyymiä, on muokattu DNA-tekniikalla kloonamalla isoentsyymi 5:a. Tätä on edelleen tuotettu *Pichia pastoris* -hiivan kasvuliuoksessa onnistuneesti.^{43, 44} Tällä tavalla muokkaamalla voidaan tuottaa reaktiivisempia entsyymejä. Rekombinantti isoentsyymi *PaHNL5*:n toiminnallinen pH-alue on 2.5–6.5,⁴⁴ ja perinteisesti mantelista eristetyn *PaHNL*:n optimaalinen alue on 5.5–6.0. Reaktiivisempien entsyymien ansiosta myös epätavallisten substraattien käyttö on mahdollistunut^{44, 45} ja lääkeaineena käytettyjen kiraalisten tuotteiden saanto on parantunut.⁴⁶

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla on tuotettu myös lituruohosta (*Arabidopsis thaliana*, *AtHNL*, E.C.4.1.2.10), saatavaa oksinitrilaasia. Se on rakenteeltaan samankaltainen raseemisen seoksen tuottavan lipaasientsyymien, sekä (*S*)-syanohydriniä tuottavien *HbHNL*:n ja *MeHNL*:n kanssa.^{47, 48} Edellä mainituista poiketen *AtHNL* tuottaa (*R*)-konformaatiota. Tällöin voidaan syntetisoida (*R*)-syanohydrinejä⁴⁹ tai (*R*)- β -nitroalkoholeja.⁵⁰

3.2.2 (R)-Oksinitrilaasi

Syanohydrinien synteesiä on tehty pääasiassa *Pa*HNL -entsyymillä, sillä mantelista peräisin olevaa entsyymiä on saatavilla kohtuulliseen hintaan ja runsaasti.⁵¹ Kirjallisuudessa on esitetty useita erilaisia menetelmiä sisältäen eri lähtöaineita ja muita reagensseja syanohydrinien valmistamiseksi. Seuraavassa käsitellään vain (*R*)-oksinitrilaasientsyymillä suoritettuja reaktioita.

Suurin osa kaupallisesti kiinnostavista oksinitrilaasin substraateista on bentsaldehydijohdannaisia, yleensä veteen liukenemattomia aineita.⁴² Oksinitrilaasi on inaktiivinen täysin vedettömissä olosuhteissa ja kaikissa viitteissä onkin käytetty vettä pH:n säätämiseksi tai entsyymin aktivoimiseksi. Reaktioita (*R*)-oksinitrilaasilla on tehty etyyliasetaatissa, di-isopropyylieetterissä (DIPE) ja dibutyylieetterissä.⁵²⁻⁵⁷ Tämä johtuu siitä, että nämä liuottimet liukenevat veteen vain osittain. Tällöin jopa hitaasti reagoivat karbonyyliyhdisteet muodostavat haluttuja tuotteita mitätömän pienillä vetysyanidin lisäyksillä.¹⁷ DIPE on osoittautunut hyväksi liuottimeksi, sillä entsyymin aktiivisuus pysyy pitkään hyvänä.⁵¹ Muita käytettyjä liuoksia ja liuosyhdistelmiä ovat olleet vesi-etanoli,^{16, 52, 55} vesi-dietyylieetteri,⁵² metyyli-*tert*-butyylieetteri (MTBE),^{58, 59} etanoli-etikkahappo,⁶⁰ vesi-ioniliuos,⁶¹ kaliumfosfaatti-sitraattipuskuri,¹² tolueni,¹² ja dikloorimetaani.¹²

Vetysyanidilähteinä on käytetty HCN,^{54, 55, 62, 63} KCN,⁵² asetonisyanohydriniä,^{52, 62, 63} NaCN⁵⁸ tai etyyliisanoformaattia.¹²

Reaktion pH:ta on säädetty oksinitrilaasientsyymille optimaalisen pH:n aikaansaamiseksi. Kirjallisuudessa reaktioseoksen pH on vaihdellut 3,3 ja 7 välillä lähtöaineesta ja puskurista riippuen. Artikkeleissa todetaan optimin olevan pH viidessä^{11, 17} tai 5,5-6,0:ssa.⁶⁴ Tämän lisäksi todetaan orgaanisen liuottimen ja alhaisen pH:n, vähentävän kemiallista reaktiota.^{11, 37, 51}

Reaktiolämpötila vaikuttaa entsyymien stabiilisuuteen ja tuotteen enantiomeeriseen puhtauteen.³ Syanohydrinejä onkin syntetisoitu oksinitrilaasilla reaktioseoksissa joiden lämpötila on ollut 0 - 30 °C – asteen välissä, yleensä noin 5 °C:ssa.^{29, 65, 66}

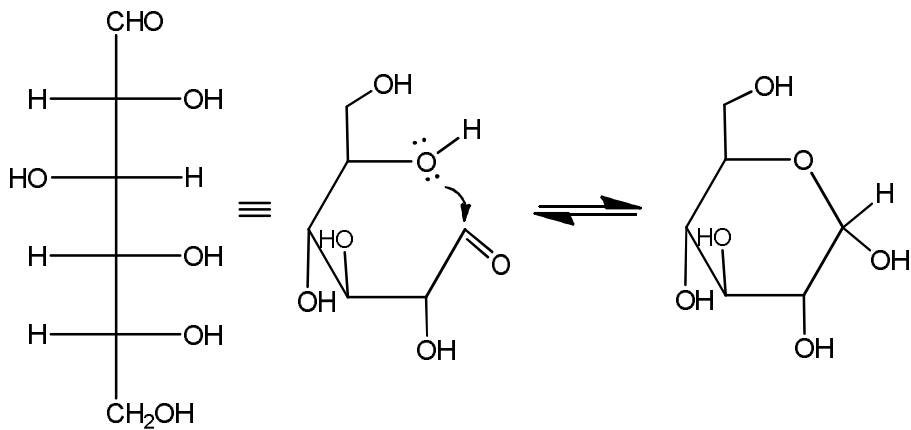
4 Hiilihydraatit

Hiilihydraatit ovat aldehydejä tai ketoneja, joiden hiilirunkoon on liittyneenä useita hydroksyylliryhmiä. Suurin osa luonnon orgaanisesta materiaalista koostuu hiilihydraateista; ne toimivat muun muassa energiavarastona, osana DNA- ja RNA:ta sekä rakenne-elementteinä kasvi- ja bakteerisoluisissa. Kasvien kuivapainosta jopa 80 % on hiilihydraatteja.^{20, 67}

4.1 Mono-, oligo- ja polysakkaridit

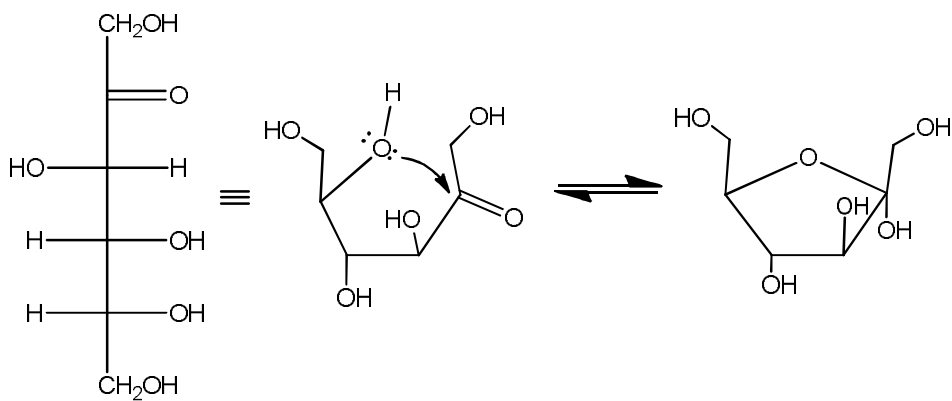
Hiilihydraatit jaotellaan mono, oligo- ja polysakkarideihin. Monosakkarideissa on yksi sokerimolekyyli, oligosakkarideista muodostuu hydrolyysissä kahdesta kahdeksaan monosakkaridiyksikköä⁶⁸ ja polysakkaridit hydrolysoituvat monosakkarideiksi.⁶⁹

Monosakkaridit ovat yksinkertaisimpia hiilihydraatteja, joissa on kolmesta yhdeksään hiiliatomia⁶⁹ ja joiden stereokemiallinen rakenne vaihtelee yhden tai useamman hiiliatomin osalta. Viisi- ja kuusiatomiset sokerit ovat yleisimpiä luonnossa. Pentooseja ovat mm. D-ksyloosi ja D-arabinoosi, heksooseja ovat D-glukoosi, D-fruktoosi, D-galaktoosi ja D-mannoosi.⁷⁰ Monosakkaridit esiintyvät usein rengasrakenteisena johtuen molekyylin etäisten funktionaalisten ryhmien interaktiosta. Yleisesti aldehydin ja alkoholin reaktiossa muodostuu hemiasetaali ja vastaavasti ketonin reagoitessa alkoholin kanssa muodostuu hemiketaali.⁷¹ Sokerimolekyylin sisältämät hydroksyylliryhmät numeroidaan molekyyllissä olevien hiiliatomien mukaisesti.⁷¹



Kuva 11. Glukoosimolekyylin hemiasetaalin muodostuminen.⁷¹

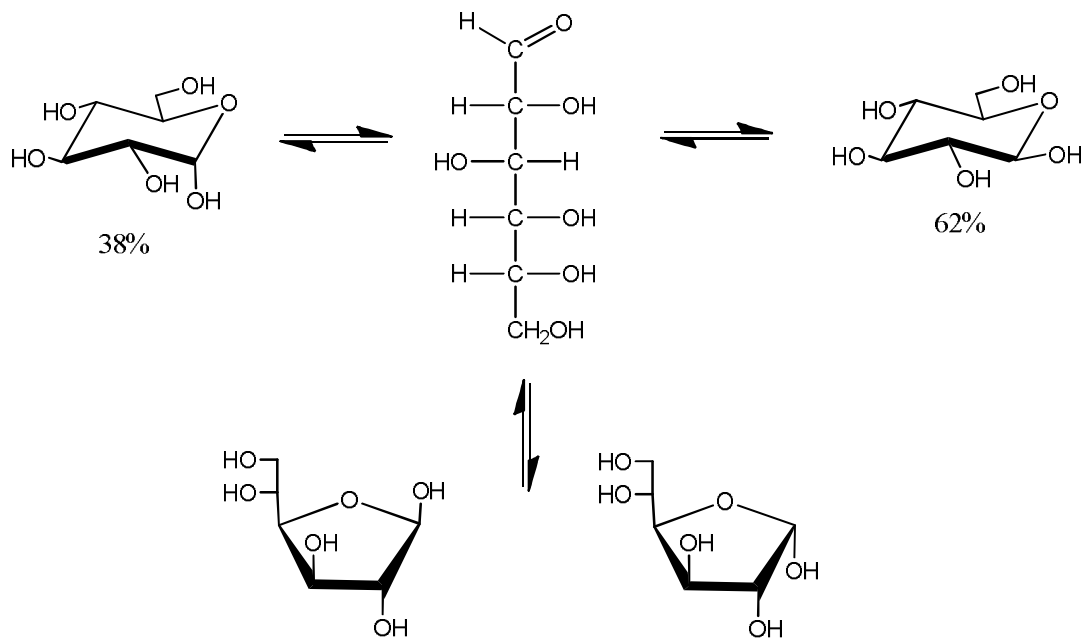
Rengasrakenne syntyy, kun aldoheksooseista muodostuu hemiasetaali ensimmäiseen ja viidenteen hiilen kiinnittyneen ryhmän reaktiossa esimerkkinä glukoosi (kuva 11). Vastaavasti ketoheksooseista muodostuu hemiketaali, kun toisen ja viidennen hiilen funktionaaliset ryhmät reagoivat keskenään esimerkkinä fruktoosi (kuva 12.). Molemmissa tapauksissa entiseen karbonyylihiileen muodostuu uusi kiraliakeskus ja siitä tulee ns. anomeerinen hiili.



Kuva 12. Fruktoosin hemiketaalin muodostuminen.⁷¹

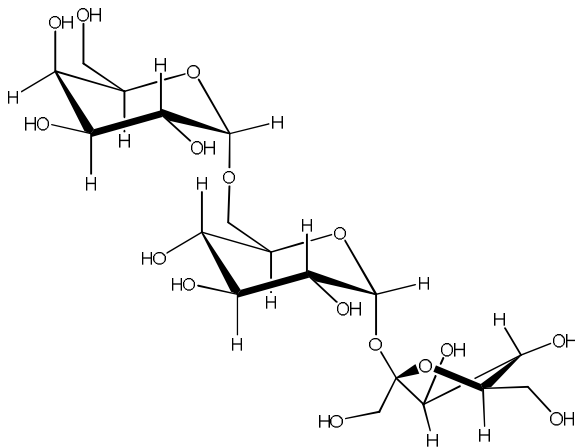
Rengasrakenteinen, anomeerisen hiilen sisältävä sokerimolekyyli esiintyy α - tai β -muodossa, riippuen muodostuneen hydroksyyli ryhmän suunnasta molekyyliin nähden.⁷¹ Liuoksissa sokerien anomeeriset muodot esiintyvät tautomerisessa tasapainossa (kuva 13.)⁷²

Oligo- tai polysakkaridissa anomeerisen hiilen hydroksyyli-ryhmä on sitoutunut toisen sokerimolekyylin hiileen. Sokerimolekyylin anomeerinen hiili voi liittyä toisen sokerin mihin tahansa hydroksyyli-ryhmään muodostaen uuden α - tai β -glykosidisen sidoksen. Aksiaalisesti toisiinsa sitoutuneet sokerimolekyylit voivat muodostaa kierteisen konformaation, tällöin glykosidiset sidokset ovat α -muotoa. Tärkkelyksen sisältämä amyloosi on esimerkki tällaisesta kierteisestä muodosta. β -Glykosidisten sidosten muodostama molekyyli on taas lineaarinen, kuten esimerkiksi galaktomannaanissa.⁷⁰



Kuva 13. Glukoosin vesiliuoksessa (rt) muodostuvat eri tautomeriamuodot. α - furanosodi, β -furanosodi-, ja asyklista aldehydi -muotoa on liuoksessa yhteensä alle 0,2 %. Mukailten lähteestä⁷²

Kolme tärkeintä oligosakkaridia ovat sakkaroosi, laktoosi ja maltoosi, nämä kaikki ovat disakkarideja. Niiden kemiallinen merkitys on lähinnä ravitsemuksellinen. Ne hydrolysoituvat elimistössä siten, että sakkaroosi glukoosiksi ja fruktoosiksi, laktoosi galaktoosiksi ja glukoosiksi sekä maltoosi kahdeksi glukoosiksi. Nämä muutetaan elimistössä aineenvaihdunnan avulla energiaksi.⁷¹ Eräs esimerkki trisakkaridista on raffinoosi, jota saadaan uutettua soijapavuista.⁷³ Raffinoosi koostuu galaktoosi-, glukoosi- ja fruktoosiyksiköistä (kuva 14).⁶⁸ Trisakkaridina siinä on noin 30 % galaktoosiyksiköitä.⁷⁴

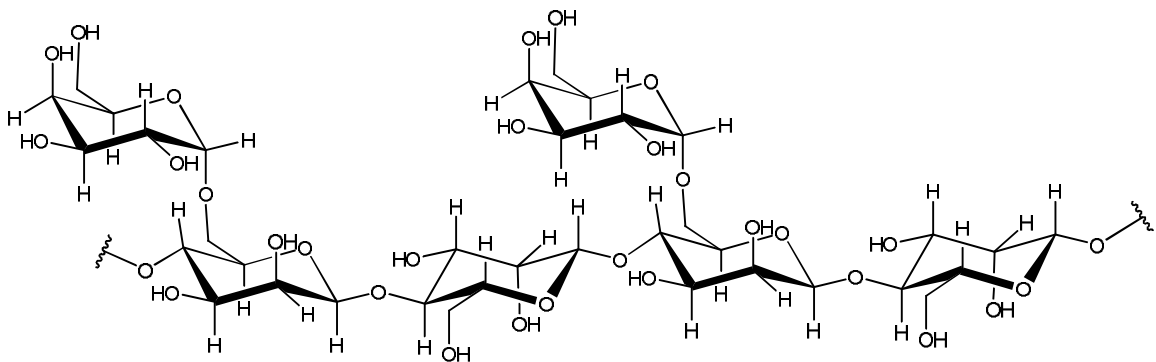


Kuva 14. Raffinoosin eli α -D-Galaktopyranosyyli-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranosidin rakenne. Mukailtu lähteestä Neubauer *et al.*⁷⁵

Polysakkaridit ovat homo- tai heteropolysakkarideja sen mukaan koostuuko sen rakenne samanlaisista vai erilaisista monosakkarideista. Polysakkaridien rakenne voi olla suora tai haaroittunut. Esimerkiksi glukoosin energiavarastomuoto glykogeeni on homopolysakkaridi. Se koostuu suorasta glukoosiketjusta, jossa on noin joka kymmenennessä yksikössä haarautuma.⁶⁹ Eräs esimerkki heteropolysakkaridista on guarkumi (kuva 15.).

4.2 Galaktomannaanit

Galaktomannaanit ovat tärkeitä polysakkarideja useilla eri teollisuuden aloilla. Vilja- ja palkokasvien siementen varastoravintoa on yleensä tärkkelys, mutta joidenkin palkokasvien varastopolysakkaridina toimivat galaktomannaanit.⁷⁶ Nämä ovat monikäyttöisiä makromolekulaarisia hiilihydraatteja, joita saadaan sekä monivuotisten puuvartisten että yksivuotisten kasvien siemenistä.⁷⁷ Guarkumi (*Cyamopsis tetragonolobus*) on eräs tällainen yksivuotinen palkokasvi, jota kasvaa runsaasti Intian niemimaalla. Sen rakenne on muistuttaa useimmista palkokasveista saatavien galaktomannaanien perusrakennetta (kuva 15.). Se on lineaarinen $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisiin sidoksin sitoutunut D-mannopyranosidiketju, jossa on satunnaisesti liittyneenä yksittäinen $\alpha(1\rightarrow6)$ -sidoksella kiinnittynyt D-galaktoosihaara. Johanneksen leipäpuusta (*Cerartonia siliqua*) saatava kumi (locust bean gum, LBG) on toinen tärkeä galaktomannaani.⁷⁸



Kuva 15. Idealisoitu guarkumin rakenne.⁷⁷

Eri kasvilajien galaktomannaanit eroavat toisistaan mannoosi-galaktoosi -suhteen (M:G), galaktoosihaarojen paikan- ja molekyylipainovaihteluvälin mukaan.^{76, 79} Galaktoosihaarat voivat esiintyä molekyyliässä säännöllisesti, satunnaisesti tai jaksoina. Guarkumin M:G -suhde on noin 2:1 ja siinä olevat galaktoosiyksiköt esiintyvät pareittain tai kolmen sarjoissa. Haarautumaton mannoosiketju on yleensä alle kuuden sokerimolekyylin mittainen.^{76, 78} Johanneksenleipäpuukumin M:G -suhde on 4:1 ja sen haarautumaton mannoosiketju voi olla jopa 20. yksikön mittainen.⁷⁰ Johanneksenleipäpuun

galaktomannaanin galaktoosipitoisuus on noin 17–26 % ja guarkumin galaktoosipitoisuus vaihtelee 33–40 % välillä.^{74, 77} Galaktomannaanien rakenteiden erot vaikuttavat niiden vesiliukoisuuteen, viskositeettiin ja reaktiivisuuteen.⁸⁰ Nämä määrittelevät edelleen kunkin galaktomannaanin teolliset sovellukset. Guarkumin teollinen käyttö on lähtöisin paperiteollisuuden tarpeista, mutta koska se on taloudellisin ja runsaimmin saatavilla oleva raaka-aine, on sen käyttö nykyään laaja-alaista mm. elintarvike- ja lääketieteellisyydessä.⁷⁶

Käyttötarkoituksesta riippumatta galaktomannaanin perusrakenne pysyy muuttumattomana, mutta mm. molekyylipainoa, viskositeettia ja liukoisuutta voidaan muuttaa hydrolyyttisellä tai oksidatiivisella depolymerisaatiolla. Tällöin muodostetaan stabilisaattoreita, viskositeetin muodostajia ja emulsaattoreita.⁷⁶ Näitä käytetään öljylähteiden kaivauksissa, räjähd-, kaivos-, paperi- ja tekstiiliteollisuudessa. Edelleen guarkumia käytetään ruoka-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa edullisena lisäaineena esimerkiksi estämään veden kidemuodostusta jäätelöissä, ravintoaineissa lisäämässä kylläisyyden tunteen syntymistä ja ruokavalmisteissa miellyttävän suutuntuman aikaansaamiseksi.^{76, 77, 81}

4.2.1 Galaktomannaanien reaktiivisuus

Guarkumin galaktoosisivuhaarat sisältävät yhden primaarisen ja kolme sekundaarista OH-ryhmää, substituoitu mannoosi kaksi sekundaarista OH-ryhmää, sekä substituoimaton mannoosi kaksi sekundaarista ja yhden primaarisen OH-ryhmän (kuva 15).⁷⁷

Galaktomannaanien hydroksyyliiryhmät voidaan derivatisoida. Niiden primaariset ja sekundaariset hydroksyyliiryhmät (OH) ovat lähes yhtä reaktiivisia.⁷⁷ Yleisesti ottaen primaarinen hydroksyyli reagoi helpommin kuin sekundaarinen. Hydroksyyliiryhmiä on mahdollista hapettaa selektiivisesti käyttämällä joko kemiallista tai entsyymattista menetelmää. Kemiallisessa reaktiossa voidaan käyttää esimerkiksi 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyylä (TEMPO)^{82, 83} ja entsyymattisessa esimerkiksi galaktoosioksidaasia (GO).^{74, 84, 85} TEMPO:lla galaktoosin ja vapaiden mannoosiryhmien C-6 hydroksyyliiryhmät hapettuvat karboksyylihapoksi. Entsyymattisella menetelmällä terminaalisten galaktoosien C-6 hydroksyyliiryhmät hapettuvat aldehydiksi.

Guarkumia voidaan derivatisoida tarpeen mukaan muodostamalla siitä estereitä tai eetterijohdannaisia. Sitä karboksimeetyloidaan vesiliuoksissa^{86, 87} ja hydroksietyloidaan

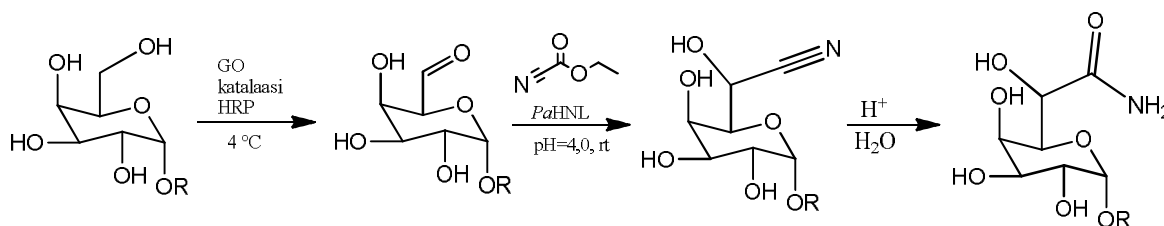
emäksisissä olosuhteissa.⁸⁸ Siitä on muodostettu metyyliettereitä, joiden metyyli substituentit ovat olleet satunnaisesti kiinnittyneenä sokerirenkaiisiin substituutioasteella 0,3-0,6.⁸⁹ Teollisuuden tarpeisiin valmistetaan hydroksipropyli-, hydroksietyyli-, karboksimeyyli-hydroksipropyli- ja kationista guarkumia.⁹⁰ Myös kationisia hydroksyylipropyyli- ja guarkumeja, hydrofobisia guarkumeja sekä guarkumifosfaatteja valmistetaan.⁷⁷ Hydroksyyli-ryhmien korvautumista kuvataan substituutioasteella (DS, degree of substitution). Sen maksimaalinen arvo on kolme, jolloin kaikki molekyylin hydroksyyli-ryhmät ovat substituoituja.⁹⁰ Polysakkaridin liukoisuusominaisuudet voivat muuttua niinkin pienillä DS:n arvoilla kuin 0,1.⁹⁰

Guarkumia voidaan depolymerisoida lämmittämällä sitä suolahapon kanssa.⁸⁹ Myös muiden vahvojen happojen tai orgaanisten happojen, kuten sitruuna- tai askorbiinihapon, käyttäminen on mahdollista. Ketjun pilkkomiseen on mahdollista käyttää myös emäksisiä olosuhteita tai vahvoja hapettimia esim. vetyperoksidia, myös elektronisuihkulla tai gammasäteillä säteilyttäminen pilkkovat polymeerin pienempiin osiin.⁷⁷ Näin ollen derivatisointireaktioita suoritettaessa on huomioitava käytetyn emäksen konsentraatio, lämpötila sekä reaktioaika suurimman mahdollisen substituutioasteen saavuttamiseksi, kuitenkin molekyylikoon siitä kärsimättä.⁸⁹

KOKEELLINEN OSUUS

5 Johdanto

Tässä työssä tutkittiin oligo- ja polysakkarideja, joiden terminaalisen galaktoosin C-6- asemassa oleva hydroksyyliiryhmä hapetettiin entsyymaattisella reaktiolla selektiivisesti aldehydiksi. Muodostetun aldehydin annettiin edelleen reagoida vetysyanidin kanssa siten, että katalyyttinä toimi mantelista peräisin oleva oksinitriilaasientsyymi. Reaktioseoksessa muodostui syanohydriini, joka hydrolysoitui edelleen α -hydroksiamidiksi (kuva 16.). Reaktioseokseen mahdollisesti jäljelle jäänyt lähtöaine (aldehydi) pelkistettiin alkoholiksi NaBH_4 :llä.



Kuva 16. Synteesireitti, GO = galaktoosioksidasi, HRP= piparjuuriperoksidaasi, PaHNL= (R)-oksinitriilaasientsyymi

Tuotteet analysoitiin pääasiassa kaasukromatografia-massaspektrometrillä (GC-MS). Analyysiä varten tuote kuivattiin vakuumiunilla, hydrolysoitiin ja silyloitiin. Synteesituotteiden rakenteet varmistettiin nestekromatografia-massaspektrometrillä (LC-MS/MS) ja ydinmagneettisella resonanssispektroskopiolla (NMR). Näitä menetelmiä varten näytteet kuivattiin kylmäkuivaimella.

5.1 Materiaalit ja menetelmät

5.1.1 Reagenssit ja entsyymit

Sakkaridit:

D-(+)-raffinoosi pentahydraatti (Sigma R0250)

Guarkumi, GG (Sigma, G 4129)

Pilkottu guarkumi, GM₅₀, (3KP17, mw 50 000 g/mol)

Metyyli- α -D-galaktopyranosidi (Fluka 66916)

D-(+)-mannoosi, Merck

D-(+)-glukoosi, Merck

D-(+)-galaktoosi, Merck

Syanidilähteet:

Natriumsyanidi, NaCN, Merck

Etyylisyanoformaatti, NCCOOEt, (Sigma E18859)

Entsyymit:

Galaktoosioksidaasi (GO, G7907, E.C.1.1.3.9, Sigma), 73 U/mg

Piparjuuriperoksidaasi (HRP, P8250, EC 1.11.1.7, Sigma), Tyyppi II, 188 U/mg

Katalaasi (Kat, C30, E.C. 1.11.1.6, Sigma), 22000 U/mg ja 638 kU/ml

(*R*)-Oksinitriilaasi (*Pa*HNL, M6782, E.C.4.1.2.10, Sigma) 560 U/ml

β -glukosidaasi (G0395, E.C. 3.2.1.21, Sigma) 2,18 U/mg

Hydroksinitriililyaasi (HNL), *Arabidopsis thaliana*, recombinant from *E.Coli*, (79847, Sigma), 581 U/ml

Pelkistimet:

Natriumboorihydridi (NaBH_4 , Sigma)

Natriumboorideuteridi (NaBD_4 , Sigma)

Silyointireagenssit:

Klooritrimetyylisilaani, TMCS (Fluka 92360)

Heksametyylidisiloksaani, HMDS (Fluka 52619)

Pyridiini, py, (Sigma)

Muut reagenssit:

Etanoli, EtOH, (92,4 %)

Metanoli, MeOH, (Sigma)

Asetyylikloridi, (Sigma)

Sitruunahappo monohydraatti, (Merck)

Trinatriumsitraatti dihydraatti, (Merck)

Natriumdivetyfosfaatti dihydraatti $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (Riedel de Haën)

Dinatriumvetyfosfaatti Na_2HPO_4 , (Riedel de Haën)

Dowex 1x2-200 ioninvaihtohartsii, (Sigma 217387)

Synteesit tehtiin huoneenlämpötilassa magneettisekoituksella.

5.1.2 Sokereiden hapetus

Hapetettua sakkaria valmistettiin D-(+)-raffinoosi pentahydraatista (Raf) sekä guarkumista (GG).^{74, 84} Menetelmässä galaktoosiyksikön C-6 hydroksyyli hapetetaan selektiivisellä entsyymaattisella menetelmällä aldehydiksi vesiliuoksessa. Hapetusreaktioon käytettyjen entsyymien pitoisuus laskettiin suhteellisenä osuutena polysakkaridin sisältämistä terminaalista galaktoosiyksiköistä.

D-(+)-raffinoosi pentahydraattia liuotettiin ultrapuhtaaseen veteen siten, että sen raffinoosipitoisuus oli 42 mM. Liuosta sekoitettiin 200-300 rpm nopeudella kahden tunnin ajan huoneenlämpötilassa, jotta kaikki raffinoosi oli varmasti liuennut. Tähän liuokseen lisättiin galaktoosioksidaasia (GO) 73U, katalaasia (kat) 127 kU ja piparjuuriperoksidaasia (HRP) 226 U. Liuosta hapetettiin avoimessa astiassa 200 rpm sekoituksella 72 tunnin ajan +4 °C. Entsyymien toiminta inaktivoitiin kuumentamalla liuosta kiehuvaan vesihauteeseen. Liuoksen sisälämpötilaa pidettiin 5 minuutin ajan 80 °C, jonka jälkeen liuos siirrettiin säilöpulloon ja +4 °C. Tästä liuoksesta otettiin näyte hapetusasteen määrittystä varten.

Guarkumia hapetettaessa liuotettiin se ultrapuhtaaseen veteen ja annettiin liuoksen (1 mg/ml) sekoittua 200-300 rpm nopeudella kahden tunnin ajan. Tähän liuokseen lisättiin GO (29 U), kat (51 kU) sekä HRP (188U). Liuosta hapetettiin avonaisessa astiassa 200 rpm sekoituksella 24 h, + 4 °C. Reaktio lopetettiin lämmittämällä seosta vesihauteeseen, jossa sitä pidettiin niin kauan että liuoksen sisälämpötila oli 5 minuutin ajan + 80 °C. Liuos jäädytettiin ja säilytettiin + 4 °C. Liuoksesta otettiin näyte hapetusasteen määrittystä varten. (Taulukko 7. s. 43)

Pilkottua guarkumia (GM₅₀) hapetettiin liuottamalla sitä (5 mg/ml) ultrapuhtaaseen veteen, liuosta sekoitettiin 200-300 rpm 1,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Reaktio käynnistettiin lisäämällä liuokseen HRP (37,6 U), kat (10 kU) ja GO (5,8 U). Reaktioliuosta sekoitettiin avonaisessa astiassa 200 rpm sekoituksella + 4 °C 48 h, jonka jälkeen se siirrettiin säilöpulloon.

5.2 Syanohydriinien synteesi

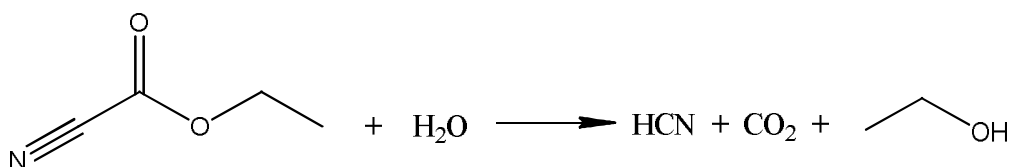
Syanohydriinien syntetisointia on tehty aikaisemmin useilla eri entsyymeillä, mutta reaktioliuoksena on ollut joko liuotin tai kaksifaasisysteemi. Vaihtoehtoisesti entsyymejä on käytetty kantajamateriaalissa, esimerkiksi selluloosassa. Tässä työssä tarkoituksena oli saada mantelista peräisin oleva (*R*)-oksinitrilaasientsyymi toimimaan sellaisenaan vesipuskuri-liuoksessa.

Synteeseissä tutkittiin (*R*)-oksinitrilaasientsyymiä sekä β -glukosidaasia, jotka molemmat toimivat kasveissa syanogeenisten glykosidien katabolian katalyytteinä. Lisäksi kokeiltiin lituruohosta saatavan hydroksinitriililyaasin toimivuutta. Synteetit suoritettiin pääasiassa pH 4.0:ssa, jotta korkeammassa pH:ssa tapahtuva kemiallinen reaktio olisi ehkäisty mahdollisimman hyvin. Kemiallisen reaktion suuruutta tutkittiin ns. reaktionollalla, jossa reaktio suoritettiin entsyymattisen reaktion optimaalisissa olosuhteissa ilman entsyymiä.

Suoritettuja kokeita tehtiin suuri määrä, sillä haluttiin selvittää kaikkien reaktioon osallistuvien aineiden ristikkäisvaikutus. Näin ollen esimerkiksi oksinitrilaasilla onnistuneet kokeet toistettiin β -glukosidaasilla. Lisäksi synteessin toimivuutta tutkittiin guarkumilla.

5.2.1 Syanidilähteet

Reaktioissa syanidilähteenä käytettiin natriumsyanidia (NaCN) ja etyyliisyanoformaattia (NCCOOEt). Kirjallisuuden mukaan asetonisyanohydriini olisi helppokäyttöinen kaupallinen syanidilähde syanohydriinin muodostamiseksi, sillä se liukenee veteen ja hydrolysoituu reaktioseoksessa asetoniksi ja syanidiksi.² Valitettavasti asetonisyanohydriiniä ei ollut saatavilla työnsuoritusajankohtana. Myös sekä natriumsyanidi että etyyliisyanoformaatti muodostavat reaktioseokseen vetysyanidia *in situ*. Etyyliisyanoformaatti hajoaa vedessä (kuva 17.) muodostaen vetysyanidia, hiilidioksidia ja etanolia, kun taas natriumsyanidi muodostaa vetysyanidia ja emästä.



Kuva 17. Etyylisianoformaatin hajoaminen vedessä.¹²

Ensimmäiset kokeet tehtiin natriumsyanidilla, mutta todettiin käytön olevan hankalaa pH:n säätämisen takia. Etikkahapolla olisi ollut mahdollista aikaansaada oikea pH natriumsyanidia käytettäessä,³⁹ mutta riskinä oli sakkaridin hydrolysoituminen, joten sitä reittiä ei edes harkittu. Natriumsyanidin emäksisyys aiheutti reaktioseokseen pH:n kohoamisen jopa kolmeentoista saakka. Tällöin reaktioseokseen lisättiin sitruunahappoa, jonka seurauksena liuoksen puskurointikyky menetettiin. Koska reaktio-olosuhteiden vakioiminen todettiin hankalaksi ja samanlaisten olosuhteiden aikaansaaminen useisiin eri reaktioihin koettiin mahdottomaksi, päätettiin jatkossa käyttää etyyllisianoformaattia syaanilähteenä.

5.2.2 Puskuriolosuhteet

Käytetyt lähtöaineet olivat sakkarooseja jotka liukenevat veteen ja pyridiiniin sekä osittain etanoliin. Lähtöaineiden hapetus tehtiin laimeissa vesiliuksissa ja jatkoreaktion puskurointikyky saavutettiin lisäämällä lähtöaineliuokseen väkevämpää puskuria. Tämä laimeni siten, että saatiin reaktioille sopiva puskurikonsentraatio ja pH.

Kirjallisuudessa (*R*)-oksinitrilaasin kanssa on yleisimmin käytetty sitraattipuskuria⁶⁶ mutta myös fosfaatti-^{12, 21} tartraatti-^{11, 91} ja asetaattipuskureja^{29, 92} on käytetty. Fosfaattipuskurilla saavutettava pH-taso (5,7–8,0) on huomioitava sitä käytettäessä ja puskurin pH:ta laskettiin kirjallisuuden mukaisesti sitruunahapolla.^{12, 21}

Tässä työssä puskuriliuksena käytettiin pääasiassa pH 4.0:n sitruunahappopuskuria, mutta myös saman pH:n fosfaatti-sitraattipuskurin toimivuutta kokeiltiin. Edelleen testattiin synteetin toimivuutta fosfaattipuskurin pH-tason alarajalla (5,8) ja sen vaikutusta kemiallisen reaktion määrään.

5.3 Synteetit hapetetulla raffinoosilla

5.3.1 Reaktiot natriumsyanidilla

Alkuvalmisteluina turvotettiin β -glukosidaasi entsyymi, jotta se oli aktiivista heti reaktioseokseen pipetoitaessa. β -glukosidaasia punnittiin Eppendorf-putkeen, johon lisättiin natriumsitraattipuskuria (pH 4,0) siten, että liuoksen puskurikonsentraatio oli reaktioseoksessa noin 40 mmol. Entsyymiin annettiin turvota putkessa 20 minuutin ajan. β -glukosidaasilla tehdyissä reaktioissa liuoksen väri oli keltainen tai kellertävä.

Kaksikaulakolviin, jossa oli magneettisekoitus, pipetoitiin hapetettua raffinoosiliuosta (esim. 0,34 mmol). Kolviin lisättiin joko 0,1 M natriumsitraattipuskurissa turvotettua β -glukosidaasia (esim. 55 U) tai (*R*)-oksinitrilaasia (esim. 106 U) sekä punnittu, sitruunahappoon (pH 4,0) liuotettu natriumsyanidi (NaCN, esim. 2 mmol). Liuoksen natriumsitraattikonsentraatio oli tällöin 48 mM (taulukko 2.). Lisäysten jälkeen tarkistettiin liuoksen pH ja säädettiin se neljäksi sitruunahapon avulla. Kolviin liitettiin vetysyanidipoisto, joka johdettiin letkun kautta suppilolla laimeaan NaOH -liuokseen. Tällöin reaktioseoksesta mahdollisesti kaasumaisena vapautuva vetysyanidi jäi emäsluokseen. Tätä vetysyanidin talteenottoa käytettiin kaikissa kokeissa.

Taulukko 2. Reaktiot hapetetulla raffinoosiliuoksella (Raf), jossa vetysyanidia vapauttavana reagenssina oli natriumsyanidi (NaCN). Puskurina käytettiin natriumsitraattia pH 4,0.

Koe	n (Raf) [mmol]	β -glukosi- daasi [U]	n (NaCN) [mmol]	Oksi- nitrilaasi [U]	Puskuri- konsen- traatio [mM]
RAFCN 1	0,34	55	2		48
RAFCN 2	0,34	110	4		40
RAFCN 7	0,17	106	1		40
RAFCN 6	0,17		1	106	40

Reaktio suoritettiin huoneenlämpötilassa, ilman erillistä jäädytystä. Seoksesta otettiin näytteitä 0-24 h reaktioajoilla. Näytteet (esim. 0,08 mmol gal) saostettiin etanoli-vesi -liuoksella (3:1), sentrifugoitiin 13400 rpm, 5 min. Supernatantti dekantoihin pois, sakka pestiin vedellä ja näyte saostettiin uudelleen etanoli-vesi -liuoksella. Näytteet pelkistettiin NaBD₄:lla (esim. 0,2 mmol) yli yön, ja saostettiin kuten edellä. Vaihtoehtoisesti näytteet pelkistettiin ensin NaBD₄:lla, jonka jälkeen suoritettiin vastaava saostus ja pesu kuin edellä ennen pelkistystä. Saatu tuote jatkokäsiteltiin kohdan 5.5. mukaisesti.

5.3.2 *Reaktiot etyyliisanoformaattilla*

Kolviin pipetoitiin hapetettua raffinoosiliuosta (esim. 0,10 mmol), lisättiin natriumsitraattipuskuria (pH 3,3 tai 4,0) siten, että liuoksen puskurikonsentraatio oli 10 tai 40 mM (taulukko 3). Vaihtoehtoisesti käytettiin fosfaattisitraattipuskuria. Seokseen lisättiin natriumsitraattipuskurissa turvotettua β -glukosidaasia (esim. 57 U) tai mantelista peräisin olevaa oksinitriilaasia (esim. 53 U) sekä etyyliisanoformaattia (NCCOOEt, esim. 0,42 mmol), (taulukko 3.). Etyyliisanoformaatti ei liuennut vesi- puskuri -liuokseen, joten NCCOOEt:in reaktiivisuutta parannettiin pienentämällä sen pisarakokoa. Pisara hajotettiin sekoitusta hetkellisesti nopeuttamalla, jolloin seokseen muodostui useita mikropisaroita. Näin saavutettiin suurempi reaktiivinen pinta-ala, joka lisäsi reaktiivisuutta.

Reaktiot toteutettiin huoneenlämpötilassa magneettisekoituksella. Näytteidenotto- ja reaktioaika oli 0,5-25 tuntia. Näytteet pelkistettiin analyysimenetelmän vaatimusten mukaisesti joko NaBD₄:lla tai NaBH₄:llä yli yön. Näytteet saostettiin etanoli-vesiliuoksella (6:1-8:1), sentrifugoitiin ja pestiin kuten kohdassa 5.5.

Taulukko 3. Hapetetulla raffinoosiliuoksella (Raf) tehtyjä kokeita, jossa vetysyanidilähteenä toimi etyyliisanoformaatti (NCCOOEt).

Koe	n (Raf) [mmol]	β - glukosi- daasi [U]	n (NCCOOEt) [mmol]	Oksi- nitrilaasi [U]	Natrium- sitraatti- puskuri [mM]	Fosfaatti- sitraatti- puskuri [mM]
RAFCN 9	0,10	57	0,42		40	
RAFCN 3	0,34		1,2	106	10	
RAFCN 8	0,17		0,84	53	40	
RAFCN 14	0,17		0,84	53		40
RAFCN 14_II	0,50		2,5	160		40
RAFLituCN	0,20		0,84	54 ^a		40

^a Rekombinantititeknikalla tuotettu, lituruohosta peräisin oleva oksinitrilaasi, ArHNL (taulukko 1. s. 15).

5.3.3 Kemiällisen reaktion tutkiminen

Kemiällisessä reaktiossa muodostuvien syanohydriinien määrää rajoitetaan pitämällä reaktion pH mahdollisimman alhaisena. Tässä työssä reaktiot suoritettiin suurimmaksi osaksi pH 4:ssä, jossa entsyymien toiminta olisi kohtalaista ja kemiallinen reaktio olisi ollut vähäistä. Kemiällistä reaktiota tutkittiin seuraamalla etyyliisanoformaatin ja raffinoosialdehydin välistä reaktiota puskuriolosuhteissa. Tutkittiin lisäksi pelkän puskurin vaikutusta hapetettuun raffinoosiliuokseen (taulukko 4).

Hapetettua raffinoosiliuosta (esim. 0,17 mmol), natriumsitraatti- tai fosfaattisitraattipuskuria (pH 4,0) ja etyyliisanoformaattia (esim. 0,84 mmol) sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1-19 tunnin ajan. Liuoksen puskurikonsentraatio oli 40 mM.

Seoksesta otetut näytteet pelkistettiin NaBD₄:lla. Pelkistetty näyte saostettiin etanolilla (1:3-1:6). Näyte sentrifugoitiin 13400 rpm, 10 min. Supernatantti kaadettiin pois ja näyte pestiin vedellä, toistettiin saostus ja sentrifugointi. Näytteet käsiteltiin kohdan 5.5 mukaisesti.

Taulukko 4. Kemiällisen reaktion tutkiminen pH 4,0:ssa.

Koe	n (Raf) [mmol]	n (NCCOOEt) [mmol]	Natrium- sitraatti- puskuri [mM]	Fosfaatti- sitraatti- puskuri [mM]
RAFCN 0	0,17	0,84	40	
RAFCN0_2	0,10		40	
RAFCN 15	0,10	0,42		40

5.3.4 Reaktiot korkeammassa pH:ssa

Tutkittiin pH:n vaikutusta reaktioon, tutkittiin myös vastaava reaktionolla kemiällisen reaktion vertaamiseksi korkeammassa pH:ssa.

Hapetettuun raffinoosiliuokseen (0,17 mmol) lisättiin natriumsitraatti- tai natriumvetyfosfaattipuskuri. Puskurien pH-arvot olivat 5,8 ja reaktiossa reaktioseoksen pH säädettiin 5,95 vastaavan puskurin happo- tai emäsmuodolla. Reaktioseoksen puskurikonsentraatio oli 40 mM. Seokseen lisättiin oksinitrilaasientsyymi (53 U) sekä etyyliisyanofормаatti (0,84 mmol), (taulukko 5.). Reaktio- ja näytteidenottoaika oli 1-4 tuntia. Näytteet pelkistettiin NaBH₄:llä yön yli, saostettiin etanolilla (1:8) ja pestiin kuten edellä kohdassa 5.5.

Taulukko 5. Hapetetun raffinoosiliuoksen kokeet pH 5,95:ssä.

Koe	n (Raf) [mmol]	Oksi- nitri-laasi [U]	n (NCCOOEt) [mmol]	Natrium- sitraatti- puskuri [mM]	Natrium- vetyfosfaatti- puskuri [mM]
RAFCN 10	0,17	53	0,84	40	
RAFCN 11	0,17	53	0,84		40
RAFCN 13	0,10		0,42	40	

5.4 Synteetit hapetetulla guarkumilla

Reaktion toimivuutta tutkittiin hapetetulla guarkumiliuoksella. Lisäksi reaktiota tutkittiin hapetetulla, pilkottua guarkumia (molekyylipaino noin 50 000 g/mol, GM₅₀) sisältävällä, liuoksella. Selvitettiin lisäksi reagenssien määrän vaikutusta tulokseen.

Hapetettuun guarkumiliuokseen (esim. 0,1 mmol gal) lisättiin oksinitrilaasia (esim. 38 U) tai natriumsitraattipuskurissa turvotettua β -glukosidaasia (40 U). Liuokseen lisättiin joko sitruunahappoliuokseen (pH 4,0) liuotettua NaCN (0,45 mmol) tai etyyliisyanoformaattia (esim. 0,56 mmol), sekä natriumsitraattipuskuria (pH 4,0). Liuoksen puskurikonsentraatio oli 40 mM tai 160 mM (taulukko 6.).

Taulukko 6. Hapetetulla guarkumilla suoritettavat kokeet. GG_kem = kemiallisen reaktion tutkiminen, GG_oxCN ja GuarCN 1 ja 2 ovat guarkumiliuoksien koodeja, GuarCN_R = rekombinantititeknikalla tuotetun entsyymin *A/HNL* merkintä, GM50_oxCN ja CN2 ovat pilkotun guarkumin (M =50 000 g/mol) koodeja, n(Gal) on reaktioseoksen sisältämä laskennallinen galaktoosin ainemäärä.

Koe	n (Gal) [mmol]	β - glukosi- daasi [U]	Oksi- nitrilaasi [U]	n (NaCN) [mmol]	n (NCCOOEt) [mmol]	Natrium- sitraatti- puskuri [mM]
GG_kem.	0,02				0,11	40
GG_oxCN	0,10	40		0,45		160
GuarCN 1	0,10		38,0		0,56	40
GuarCN 2	0,10		76,0		1,12	40
GuarCN_R	0,10		38,0 ^a		0,56	40
GM50_oxCN	0,04		15,2		0,22	40
GM50_oxCN 2	0,04		30,4		0,44	40

^a Rekombinantititeknikalla tuotettu, lituruohosta peräisin oleva oksinitrilaasi, *A/HNL* (taulukko 1. s.15).

Reaktio- ja näytteenottoaika oli 1-24 tuntia. Näytteet (0,007-0,010 mmol gal) joko pelkistettiin heti NaBD₄:lla (0,03-0,07 mmol) yön yli ja pelkistettiin seuraavana päivänä tai vaihtoehtoisesti saostettiin ennen pelkistystä. Näytteet saostettiin etanolilla (1:1-1:3), sentrifugoitiin 13000 rpm 5 min, dekantoiitiin supernatantti pois ja pestiin etanolivesiseoksella (1:1-3:1). Toistettiin sentrifugointi ja dekantointi. Näytteet jatkokäsiteltiin kohdan 5.5. mukaisesti.

5.5 Näytteiden käsittely

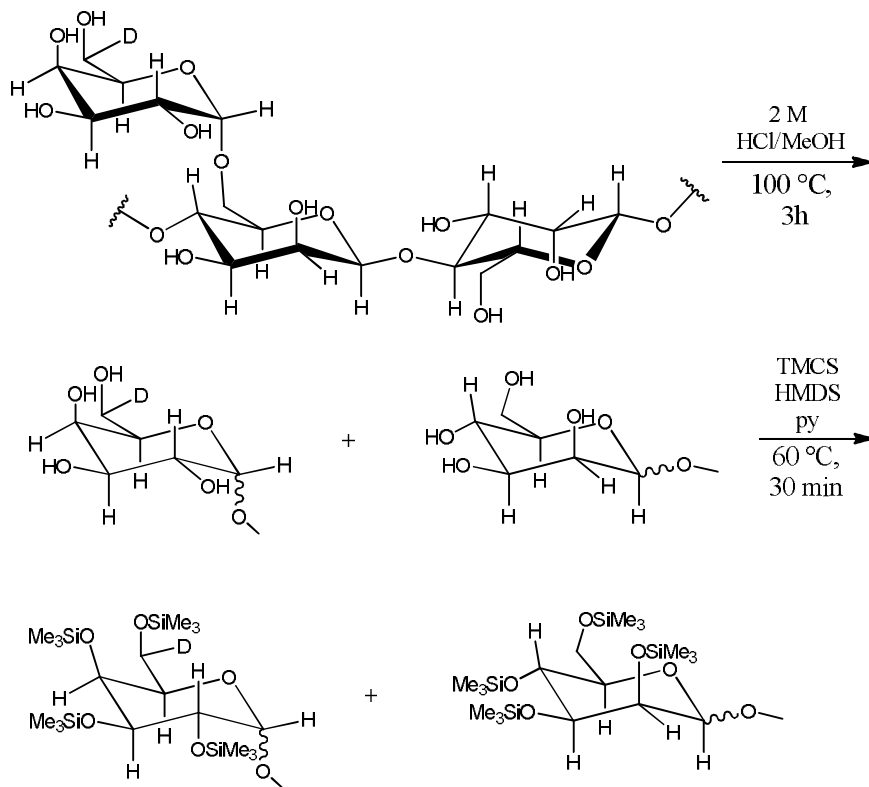
5.5.1 GC-MS näytteiden valmistaminen

5.5.1.1 Pelkistäminen

Hapetetuista sakkariidiliuoksista, tai vaihtoehtoisesti syanohydrinien synteeseistä, otetut näytteet pelkistettiin NaBD₄:llä. Tällöin lähtöaineen raffinoosin tai guarkumin galaktoosin C-6- asemassa ollut hapettunut aldehydi pelkistyi deuteroiduksi alkoholiksi. Näytteisiin lisättiin kolmea galaktoosiekvivalenttia vastaava määrä NaBD₄:a, jonka annettiin reagoida yön yli huoneenlämpötilassa magneettisekoituksella. Näytteet saostettiin etanolilla (1:1-1:8) ja sentrifugoitiin 5 tai 10 min 13400 rpm. Supernatantti dekantoiitiin pois ja sakka (5-10 mg) siirrettiin päärynäkolviin.

5.5.1.2 Hapan metanolyysi ja silylointi

Reaktioseoksista otetut pelkistetyt ja saostetut näytteet kuivattiin veden poistamiseksi päärynäkolvissa vakuumiunissa +40 °C, 30–120 min, 0 bar. Näytteet hydrolysoitiin happamalla metanolyysillä, jolloin sokereimolekyyleistä muodostettiin metyyliettereitä. Tällöin tutkittavana olleen polysakkaridin terminaalinen galaktoosiyksikkö saatiin erilleen ja metyloitua 1-asemassa olleen hiilen hydroksyylistään.⁹³⁻⁹⁵ Edelleen näyte silyloitiin, jotta saatiin muodostettua haihtuva, GC-MS:llä analysoitava monomeeri. Silyloinnissa galaktoosin ja muidenkin liuoksessa olevien sokereiden vapaat hydroksyyliyhdyt derivatisoitiin trimetyylisilyliettereiksi (kuva 18.).^{93, 94}



Kuva 18. NaBD₄:llä pelkistetyn guarkumin metanolyysi ja silyointi kaavamaisesti esitettynä. Kuvassa olevat rakenteet ovat esitetty esimerkinomaisesti, sillä metanolyysissä voi muodostua useita eri sokerirakenteita.^{93, 95}

Kuivuneisiin näytteisiin lisättiin 2 ml vedetöntä, 2M hapanta metanolia (HCl/MeOH), korkki suljettiin tiukasti kiinni ja kolvi laitettiin lämpökaappiin 100 °C, 3h. Näytteiden annettiin jäähtyä, mahdollinen jäljelle jäänyt happo neutraloitiin 100 µl:lla pyridiiniä. Liuos siirrettiin mitta-asteikolliseen muoviputkeen ja kolvi huuhdeltiin metanolilla, kunnes liuoksen tilavuus vastasi 1 mg/ml pitoisuutta. Lopputilavuus oli näin ollen 5-10 ml.⁹³

Tästä otettiin edelleen 1 ml lasiseen koeputkeen silyointia varten. Liuos haihdutettiin koeputkesta typpivirralla 50 °C:ssa, johon lisättiin silyointireagenssit: pyridiini (py, 180 µl), heksametyylidisiloksaani (HMDS, 60 µl) ja trimetyylikloorisilaani (TMCS, 20 µl). Tarvittavan silyointireagenssin määrän muuttuessa, olivat aineiden suhteelliset tilavuudet kuitenkin 9:3:1 (py, HMDS, TMCS).⁹⁶ Koeputki suljettiin kierrekorkilla ja liuokset vorteksoitiin. Putki siirrettiin uuniin 60 °C puolen tunnin ajaksi, jonka jälkeen näyte haihdutettiin jälleen typpivirralla 50 °C kuivaksi (20 min). Koeputkeen pipetoitiin 1 ml heptaania ja vorteksoitiin. Saatu liuos suodatettiin Pall 0,45 µl ruiskusuodattimen läpi

näytteensyöttäjän lasiastiaan (vialiin) joka suljettiin korkilla. Näyte analysoitiin GC-MS:llä.⁹⁴

5.5.2 NMR- ja MS- näytteiden valmistaminen

NMR- ja LC-MS/MS- analyysiä varten näyte pelkistettiin reagoimattoman aldehydin poistamiseksi NaBH₄:llä, saostettiin etanolilla (1:5) ja sentrifugoitiin 8500 rpm, 10 minuutin ajan. Näyte pestiin vedellä ja saostettiin uudelleen. Sakka liuotettiin pieneen määrään ultrapuhdasta vettä, jäädytettiin pakastimessa (-22 °C) ja kuivattiin pakkaskuivaimessa noin 20 tunnin ajan.

Muodostuneesta hienojakoisesta jauheesta punnittiin noin 20 mg NMR-näyteeksi eppendorf-putkeen. Jauhe liuotettiin 1,0 ml:aan deuteroitua vettä (D₂O) ja suodatettiin Pall 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi NMR- putkeen.

LC-MS/MS -analyysiä varten valmistettiin kuivatusta jauheesta 1 mg/ml pitoisuustasolla oleva liuos ultrapuhtaaseen veteen.

5.6 Muita kokeita

5.6.1 Saostus

Yleisesti ottaen oligosakkaridit saostuvat noin 60 % etanoliliuoksella.^{97, 98} Kokeissa raffinoosiperäisten näytteiden saostuksessa oli hankaluuksia, sillä käytetty noin 70 % (3:1, v/v) etanoliliuos ei saostanut synteesisistä otettuja näytteitä ja todettiin tarvittavan etanolin määrän olevan jopa 8:1 veteen nähden. Polysakkarideilla tätä saostusongelmaa ei ollut.

Puskuriolosuhteet vaikuttivat saostumiseen. Fosfaattisitraattipuskurilla näytteistä saostuneen sakan määrä oli hyvin pieni, kun taas natriumsitraattipuskurilla sakka oli selkeästi suurempi. Tämä voi johtua sitraattipuskurin suuresta sitruunahappomäärästä, sillä se liukenee etanoliin, joka taas aiheutti suuremman sakan näytteenkäsittelyssä. Fosfaattisitraattipuskurissa sitruunahappoa lisättiin ainoastaan pH:n säätöön, jolloin sen määrä puskurissa oli suhteellisen pieni.

5.6.1.1 Puhdistuskokeet

Näytteiden sisältämää sitruunahappoa yritettiin poistaa kokeilumuotoisesti Dowex 200 kationinvaihtohartsilla sekä DP-10 suolanpoistopylväällä. Dowex-hartsilla saatiin erottumaan kaksi fraktiota UV-signaaliin perustuen, mutta fraktiot sisälsivät edelleen puskurin komponentteja. Sephadex-matriisilla täytetty DP-10 suolanpoistopylvään todettiin kapasiteetiltaan liian pieneksi, jotta puskurin ja tuotteen samankaltaisesti käyttäytyvät molekyylit olisi saatu erilleen toisistaan.

5.6.2 Jätteiden hävitys

Reaktiossa käytettiin joko natriumsyanidia tai etyyliisyanoformaattia jolloin vapautui vetysyanidia. Tästä syystä kaikki työssä muodostuneet pesuliuokset ja jäljelle jääneet reagenssit, joihin olisi mahdollisesti jäänyt syanidia, käsiteltiin vaarattomaksi.

Liuosten maksimaalinen syanidimäärä arvioitiin mahdollisimman tarkasti. Isoon dekantterilasiin säädettiin magneettisekoitus ja seos laimennettiin syaniditasolle 1 mg/ml ja sen pH säädettiin NaOH:lla noin yhdeksitoista. Tähän liuokseen lisättiin 72 µl 10–15 % -natriumhypokloriittia yhtä syanidimilligrammaa kohden. Sekoitusta jatkettiin 0,5-1 tunnin ajan. pH:n tarkistettiin olevan 10 ja seokseen lisättiin 2 M HCl pienissä erissä, kunnes pH oli 7-8. Liuosta seisotettiin vähintään tunnin ajan (yleensä yli yön), jonka jälkeen se kaadettiin viemäriin runsaan veden kera.⁹⁹

5.7 Analysointi

5.7.1 GC-MS analyysi

Näytteet analysoitiin Hewlett-Packard 5890 kaasukromatografilla (GC), johon oli liitetty saman valmistajan 5972 massaspektrometri (MS). Kolonnina käytettiin DB-5-tyypin kolonnia, jossa on 5 % fenyyliiryhmiä metyyliipolysiloksaanifaasisissa. Kolonnin pituus oli 30 m, sisähalkaisija 0,32 mm, sekä stationäärifaasin paksuus 0,25 µm. Tämän tyyppiset kolonnit ovat poolittomia, monikäyttöisiä ns. yleiskolonneja, jotka kestävät korkeitakin lämpötiloja.

Näytteen injektioilavuus oli 1 µl, kolonnin kantajakaasuna käytettiin heliumia, jonka virtaus oli 1,1 ml/min. Näytteen jakosuhte oli 1:10 sekä huuhteluventtiilin virtaus 3 ml/min. Kolonnin alkupään paine oli 15 psi ja injektorin lämpötila 250 °C.

Kaasukromatografian ajo-ohjelma oli seuraavanlainen:

Uunin lämpötila 120 °C (5 min) - 3 °C/min, 180 °C - 15 °C/min, 250 °C (5 min). Kokonaisajoaika oli 32,67 min.

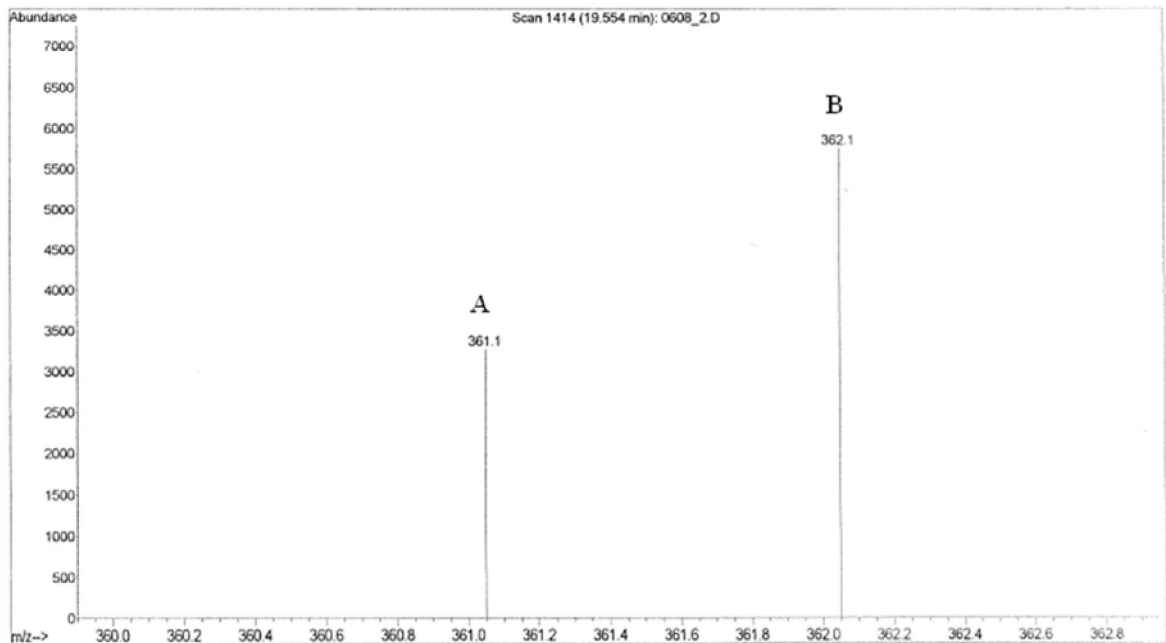
5.7.1.1 Lähtöaineiden hapetusasteen määrittäminen

Hapettettujen guarkumi- ja raffinoosiliuosten hapetusaste määritettiin, jotta voitiin tarkistaa reaktion onnistuminen. Hapetusaste vaikutti myös jatkoreaktioiden saannon arvioimiseen.

Näytteen kaasukromatografisesta kromatogrammista haettiin galaktoosin piikki standardin retentioajan perusteella. Tämän piikin massaspektrin ionien m/z 361 ja m/z 362 intensiteettien avulla saatiin laskettua tuotteen hapetusaste (kaava 1).⁷⁴

$$\text{Hapetusaste} = \frac{\left(B - \frac{A}{2}\right) * 100\%}{A + B - \frac{A}{2}} \quad \text{Kaava (1)}$$

Kaavassa 1. A= m/z 361 intensiteetti ja B= m/z 362 intensiteetti.



Kuva 19. Hapetetun guarkumin kromatogrammin piikin t_r 19,544 min spektrin osa, jossa ovat tutkittavat ionit A m/z 361 ja B m/z 362, sekä niiden intensiteetit (A =3284 ja B = 5748).

Kaavan (1) avulla saadaan kuvan 19. tuloksista laskettua guarkumin hapetusasteeksi 58,6%. Lähtöaineiden hapetusasteiden tulokset on esitetty taulukossa 7 sivulla 43.

5.7.2 Massaspektrometrinen analyysi

Massaspektrometrinen (MS) analyysi tehtiin Agilent 6330 Ion Trap LC/MS -laitteella, jossa ionisointimenetelmänä oli sähkösumutus-ionisaatio (ESI), (Agilent Technology, Palo Alto, USA).

Massaspektrometristä analyysiä varten näytettä tai raffinoosiliuosta (1 mg/ml) pipetoitiin 3-5 μ l 400 μ l:aan metanoli-vesi-muurahaishappoliuosta (50:49:1). Lisäksi varauksellisten adduktien muodostamiseksi näytteisiin pipetoitiin apuaineita (1-3 μ l). Positiivisten ionien muodostamiseen litiumasettaattia (10 mg/ml) ja negatiivisten ionien aikaansaamiseksi ammoniumkloridia (10 mg/ml). Näytteen virtausnopeus sähkösumutus-ionisaatioyksikköön oli 7 ml/min. Näytteet analysoitiin pääasiassa positiivisella ionisaatiolla, mutta yksi näyte tutkittiin kokeeksi myös negatiivisella ionisaatiolla.

5.7.3 NMR analyysi

NMR analyysit tehtiin Varian NMR-spektrometreillä käyttäen joko 300, 500 tai 600 MHz:in laitetta. Näytteistä mitattiin sekä ^1H - että ^{13}C NMR – spektrit 27 °C:n lämpötilassa. Vertailuksi NMR:llä analysoitiin reaktiossa käytetty D-(+)-raffinoosi pentahydraatti tai puskurissa käytetty sitruunahappo.

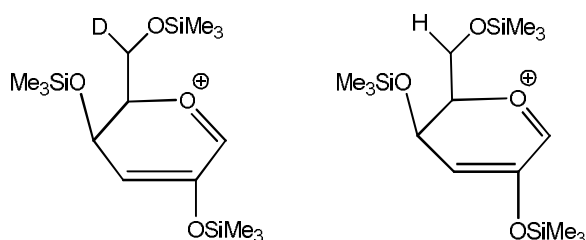
NMR-analyysit tehtiin deuteroidussa vedessä (D_2O) ilman kemiallisen siirtymän referenssiä, joka D_2O - liuoksilla on tyypillisesti asetoni tai 4,4-dimetyyli-4-silapentaani-1-sulfonihappo (DSS).¹⁰⁰ Näin ollen spektrien ppm-asteikkoa ei voitu asettaa kohdalleen ns. tunnettujen kemiallisten siirtymien avulla, vaan nollakohta määritettiin laskennallisesti käyttäen liuottimen deuteriumsignaalin taajuutta.

5.8 Tulokset

5.8.1 Lähtöaineiden hapetusasteet

Reaktion onnistumista seurattiin pelkistämällä tuote NaBD_4 :llä jolloin aldehydistä muodostui deuteroitualkoholi. Tämän jälkeen tuote metanolysoitiin ja silyloitiin kromatografista analyysiä varten. Kaasukromatografisessa analyysissä havaittiin galaktopyranoosin piikki, galaktoosille tyypillisellä retentioajalla (t_r) noin 19,55 min. Piikin massajakaumasta voitiin havaita muodostetun, silyloidun d_1 -metyyli- α -D-galaktopyranosidin ioni, jonka massaluku 362 eroaa yhdellä massayksiköllä hapettumattoman, silyloidun, metyyli- α -D-galaktopyranosidin massasta 361 (Kuva 20).⁷⁴

96



Kuva 20. Vasemmalla d_1 -metyyli- α -D-galaktopyranosidin ja oikealla metyyli- α -D-galaktopyranosidin massaspektrometristä tulosta vastaavat rakenteet.⁷⁴

Taulukko 7. Lähtöaineiden hapetusasteet. GG=guarkumi, RAF= raffinoosi, GM50 = pilkottu guarkumi ja RAF ox =50 mg/ml raffinoosi.

Lähtöaine	Pitoisuus [mg/ml]	Hapetusaste [%]
GG_1	1	67
RAF_1	21	100
GM ₅₀	5	97
RAF ox	42	100

5.8.2 Syanohydriniit

5.8.2.1 GC-MS analyysin tulokset

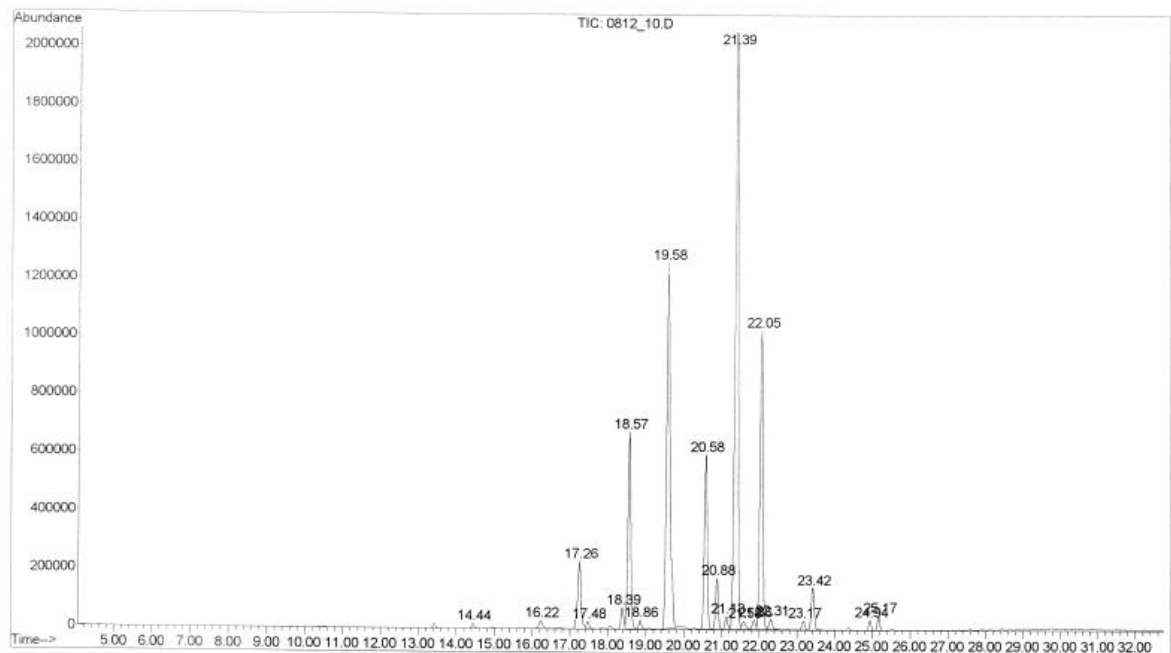
Menetelmä, jossa tutkitaan tietyn kromatografisen piikin massaspektrin yhtä tai kahta ionia vaatii kohtalaisen vahvat näytteet. Tästä syystä näytteiden kromatogrammit eivät tässä työssä edustaneet ns. kaunista muotoa, vaan piikit levenivät, jotta massaspektrissä näkyi tarpeeksi intensiivinen ioni.

Kromatografisen erotuksen varmistamiseksi analysoitiin standardeina D-(+)-mannoosi (Man), D-(+)-glukoosi (Glc) ja D-(+)-galaktoosi (Gal), jotka metanalysoitiin ja silyloitiin, kuten näytteet yleensä (kohta 5.5.). Näin saatiin varmistettua kromatogrammissa olevien piikkien retentioajat (taulukko 8.), sekä kyseisten aineiden massaspektrit. Lisäksi analysoitiin hapetettu, pelkistetty raffinoosi ja guarkumi.

Jokaisen kokeen kaikki näytteet metanalysoitiin, silyloitiin ja analysoitiin GC-MS:llä. Onnistuneissa kokeissa havaittiin kromatogrammin muuttuneen raffinoosin kromatogrammista (kuva 21.) siten, että galaktoosin signaalit retentioajoilla (t_r) 18,6, 19,6 ja 20,6 min olivat pienentyneet tai jopa hävinneet kokonaan. Lisäksi kromatogrammiin muodostui uusia, kohtalaisen suuria signaaleja retentioajoilla 6,3, 9,3, 26,2, 26,6 ja 26,8 minuuttia. (kuvat 22 ja 23). Näistä 6,3 ja 9,3 min eluoituvat yhdisteet olivat massaspektrien mukaan puskurin sisältämiä sitruunahapon ja natriumsitraatin silyloituja muotoja.

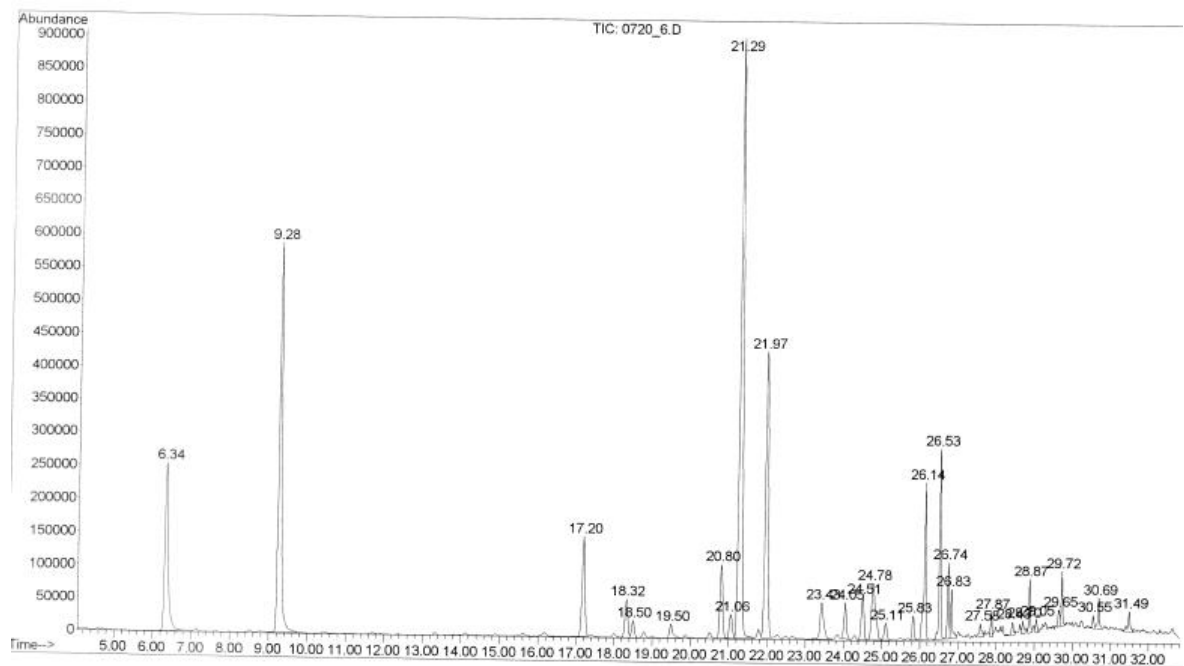
Taulukko 8. GC-MS:llä analysoitujen standardien retentioajat minuutteina. t_r = retentioaika [min], man = mannosi, gal = galaktoosi, glc = glukoosi, raf = raffinoosi ja guar = guarkumi. Guarkumistandardi analysoitiin ensimmäisenä, jonka jälkeen kolonnin alkupäästä poistettiin pieni pala, tästä syystä mannoosi- ja galaktoosistandardien retentioajat eroavat hiukan guarkumin ajoista.

	t_{r1}	t_{r2}	t_{r3}	t_{r4}	t_{r5}	t_{r6}
Man	18,03					
Gal		18,59	19,62	20,60		
Glc					21,39	22,06
Raf		18,57	19,58	20,58	21,39	22,05
Guar	18,15	18,52	19,56	20,52		



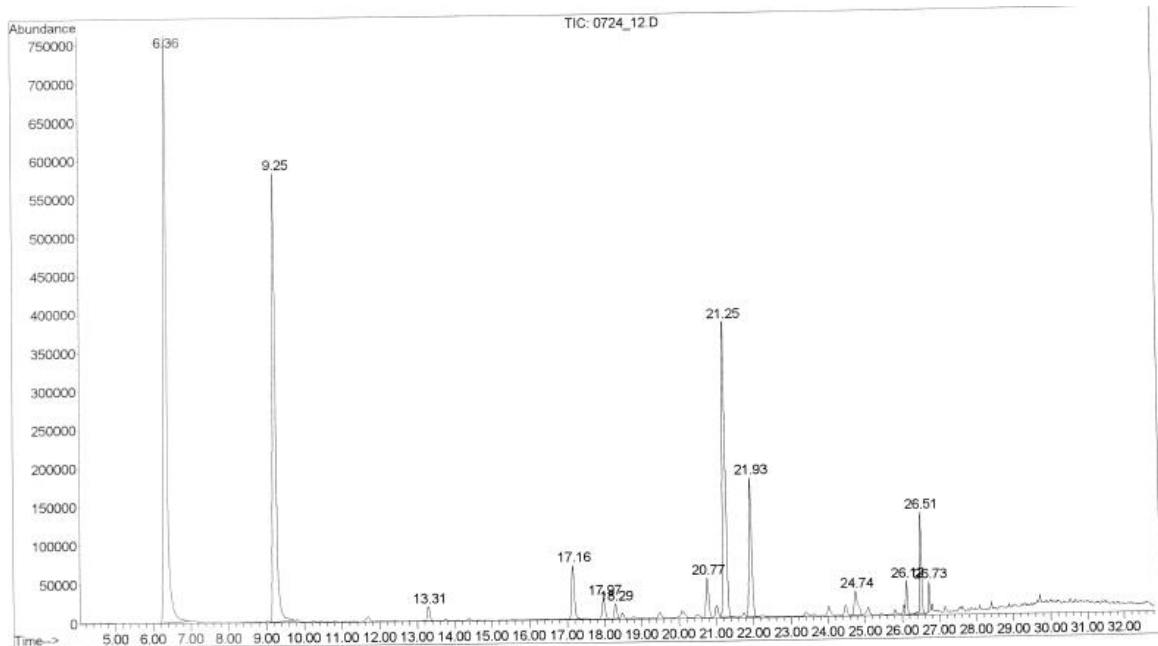
Kuva 21. Raffinoosin kromatogrammi. Galaktoosin signaaleja ovat 18,57, 19,58 ja 20,58 min eluoituvat piikit ja glukoosin vastaavasti 21,39 ja 22,05 min.

Hapetettun raffiinoosin syanohydriniisyntetisointi aloitettiin 24 tunnin reaktioajalla, josta otettiin muutamia näytteitä reaktioajan optimoimista varten. Neljän ja kuuden tunnin reaktioajoilla ei ollut merkittävää eroa tuloksissa, mutta 24 h reaktioajalla kromatogrammin oletetut tuotepiikit retentioajoilla 26,2 ja 26,5 min pienenevät. Seuraavaksi otettiin 0-4 tunnin ajanjakso, jonka aikana näytteitä otettiin 0,5 tunnin välein. Tuloksena oli reaktioaikaoptimi 1,5–2,0 tuntia, jonka kohdalla tuotteiden piikit olivat maksimissaan.

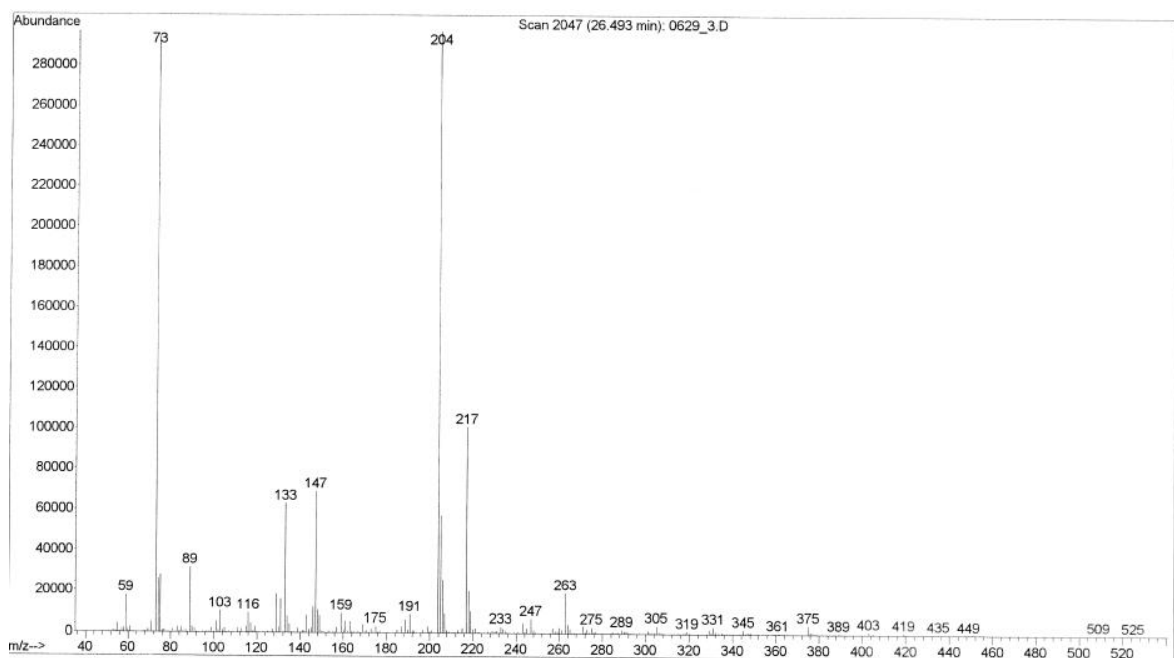


Kuva 22. Näytteen (RAFCN 5, 2,5 h) kromatogrammi. Galaktoosin piikit t_r 18,50 ja 19,50 min ovat pienentyneet huomattavasti. Glukoosin piikit ovat edelleen paikallaan t_r 21,29 ja 21,97 min, t_r 26,14 min jälkeen eluoituu useita eri yhdisteitä.

Tutkittaessa näytteiden kromatogrammeja voitiin todeta ajon loppupuolella eluoituneiden piikkien olevan sokeryhdisteitä. Johtopäätöksenä oli se, että joku tai jotkut näistä suurista t_r 26–27 min eluoituneista yhdisteistä olisi voinut olla synteesissä muodostunut toivottu tuote.



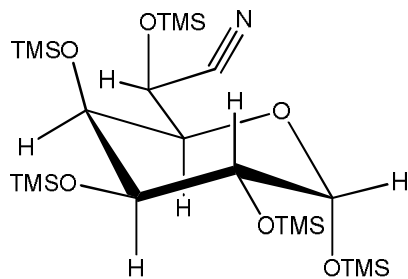
Kuva 23. Näytteen kromatogrammi (RAFCN 7, 2 h). Galaktoosin piikit t_r 18,50 ja 19,50 min ovat pienentyneet niin pieniksi, etteivät integroituneet. t_r 26,2, 26,5 ja 26,7 min eluoituvat mahdollisen tuotteen piikit.



Kuva 24. Näytteen (RAFCN 4, 4 h) kromatogrammin t_r 26,5 min eluoituneen piikin massaspektri.

Näytteiden massaspektrit noudattavat sokerimolekyyleille tyypillistä pilkkoutumisspektriä. Esimerkiksi galaktoosistandardin t_r 19,53 min spektrin suurimpien intensiteettien ionit ovat: 217, 204, 147, 133 ja 73 aivan kuten kuvassa 25.⁹⁶

Tutkittaessa tarkemmin reaktiossa selvästi muodostuneiden yhdisteiden t_r 26,2 ja 26,5 min massaspektrejä (kuva 24.), löytyi jälkimmäisestä mielenkiintoinen tulos: ionit 509 ja 525; niiden molekyyli­massat ovat suuremmat kuin oletetun synteesituotteen molekyyli­massa 507 olisi ollut (kuva 25.). Näin ollen päätettiin tehdä MS- ja NMR -analyysi samalla lailla tehdyille näytteelle.



Kuva 25. GC-MS analyysiä varten metyloitu ja silyloitu synteesituote ja sen oletettu rakenne.

Raffinoosialdehydin muuttumista tuotteeksi tutkittiin suhteellisena osuutena glukoosin piikkien (t_r 21,40 ja 22,06 min) pinta-alasta (taulukko 9.). Oletuksena oli, että glukoosi ei reagoi reaktio-olosuhteissa, sillä se on raffinoosissa galaktoosin ja fruktoosin välissä, eikä sisällä sellaista reaktiivista ryhmää, joka olisi voinut reagoida käyttämissämme reaktio-olosuhteissa. Tällöin sen osuus näytepiikeistä pysyy vakiona analyysimenetelmän vaihteluvälin puitteissa. Analysoinnissa käytettiin automaattista integrointia. Lähes kaikissa analyyseissä glukoosin piikki oli kromatogrammin suurin. Galaktoosin kahden isomeerin piikkien pinta-alat olivat keskimäärin 147,6 % (\pm 1,6 %) näytteiden kokonaispinta-aloista.

Käytetyllä menetelmällä ei toistaiseksi voida laskea saantoprosenttia, sillä menetelmään ei ole olemassa sellaista standardia, joka kestäisi happaman metanolyysin. Menetelmässä olisi voitu käyttää sorbitolia ulkoisena standardina. Sen käyttöä ei koettu tarpeelliseksi, sillä tässä työssä arvioitiin lähinnä entsyymaattisen reaktion onnistumista. Tätä voitiin arvioida yhtäläillä glukoosin avulla.

Tuotteen muodostumista aldehydistä arvioitiin lähtöaineen galaktoosin piikin pinta-alan avulla. Hapetetulla raffinoosilla galaktoosin piikki on noin 128 % ja glukoosin vastaavasti 148 %, jolloin pinta-alojen suhde on natriumsitraattipuskurissa tehdyillä reaktioilla noin 86 %. Näin ollen kromatogrammissa olevien tuotteen piikkien ja glukoosin piikkien pinta-alojen maksimaalinen suhdeluku voi olla saman verran (86 %). Tämä vastaisi 100 % muuttumista lähtöaineesta tuotteeksi. Vastaavasti sitraattifosfaattipuskurissa tehtyjen reaktioiden maksimaalinen konversio on noin 70 %.

Konversiota arvioitiin tuotteen ja glukoosin pinta-alojen suhteena. Tulos esitetään muuttumisena maksimikonversioista (kaava 2.).

$$K = \left(\frac{P(\text{Gal})}{P(\text{Glc})} : \frac{S(\text{Gal})}{S(\text{Glc})} \right) * 100 \% \quad (\text{Kaava 2.})$$

Kaavassa 2. K = konversio, P = tuotteen prosentuaalinen yhteenlaskettu pinta-ala, S = lähtöaineen prosentuaalinen yhteenlaskettu pinta-ala.

Esimerkkilaskuna kaavan 2 mukaisesti laskettu, fosfaattisitraattipuskurilla tehdyn reaktion, konversioprosentti:

$$K = \left(\frac{73}{144} : \frac{128}{149} \right) * 100 \% = 59 \%$$

Taulukko 9. Sitraattipuskurissa (pH 4,0) tehtyjen reaktioiden konversioprosentit. Glukoosi (glc), galaktoosi (gal), Gal/Glc – suhde sekä konversioprosentti. Luvut kohdissa glc, gal ja tuote esitetään kromatogramissa esiintyvien ko. yhdisteen piikkien yhteenlaskettujen pinta-alojen prosentuaalisina osuuksina. Konversio on laskettu kaavan 2 mukaisesti.

Reaktio	Glc [%]	Gal [%]	Gal/Glc [%]	Tuote [%]	Konversio [%]
Hapetettu raffinoosi (Raf)	148,8	128,1	86,1	-	-
Kemiallinen reaktio (Raf 0)	148,7	51,4	34,6	44,7	34,9
RafCN 8	146,3	20,9	14,3	40,5	32,1
RafCN 9	149,9	75,0	50,0	33,2	25,7
RafCN 10	145,9	59,5	40,8	34,9	27,8
RafCN 11	148,7	64,8	43,6	46,0	35,9
RafCN 12	147,2	43,2	29,4	20,9	16,5

Nollanäytteen konversio tuotteeksi on 10–35 % hapetetun raffinoosin metanolysoidusta ja silyloidusta galaktoosin piikistä. Sitraattipuskurilla tehtyjen synteetit tuotteiden konversio jäi pienemmäksi kuin pelkän kemiallisen reaktion muodostama konversio (Taulukko 9.). Paras saatiin pitkällä reaktioajalla (19–20 h), fosfaattisitraattipuskurissa, pH 4,0 tehdyssä kokeessa. Tällöin kemiallisen reaktion osuus jäi pieneksi, kun vastaavassa pH 6,0 tehdyssä reaktiossa kemiallinen reaktio tuotti 50 % konversion (Taulukko 10.).

Taulukko 10. Fosfaattisitraattipuskurissa tehtyjen synteesien konversioprosentit. R= rekombinantti tekniikalla tuotettu entsyymi *AtHNL*.

Reaktio	Glc [%]	Gal [%]	Gal/Glc [%]	Tuote [%]	Konversio [%]
Kemiallinen reaktio pH 6	145,6	28,2	19,4	70,3	56,1
Kemiallinen reaktio pH 4	148,5	103,8	69,9	14,0	11,0
Entsyaattinen reaktio pH 4	144,3	26,0	18,0	73,0	58,8
R entsyaattinen reaktio pH 4	149,0	14,6	9,8	81,5	63,6

Guarkumialdehydillä tehdyt synteesit tuottivat vastaavantyyppisen tuloksen kuin edellä olevat D-raffinoosialdehydille tehdyt reaktiot. Natriumsitraattipuskurissa tehty guarkumin jatkoreaktio tuotti pienemmän konversion kuin pelkkä kemiallinen reaktio. Pilkotulle guarkumille reaktio tehtiin fosfaattisitraattipuskurissa ja tällöin tuotetta muodostui enemmän.

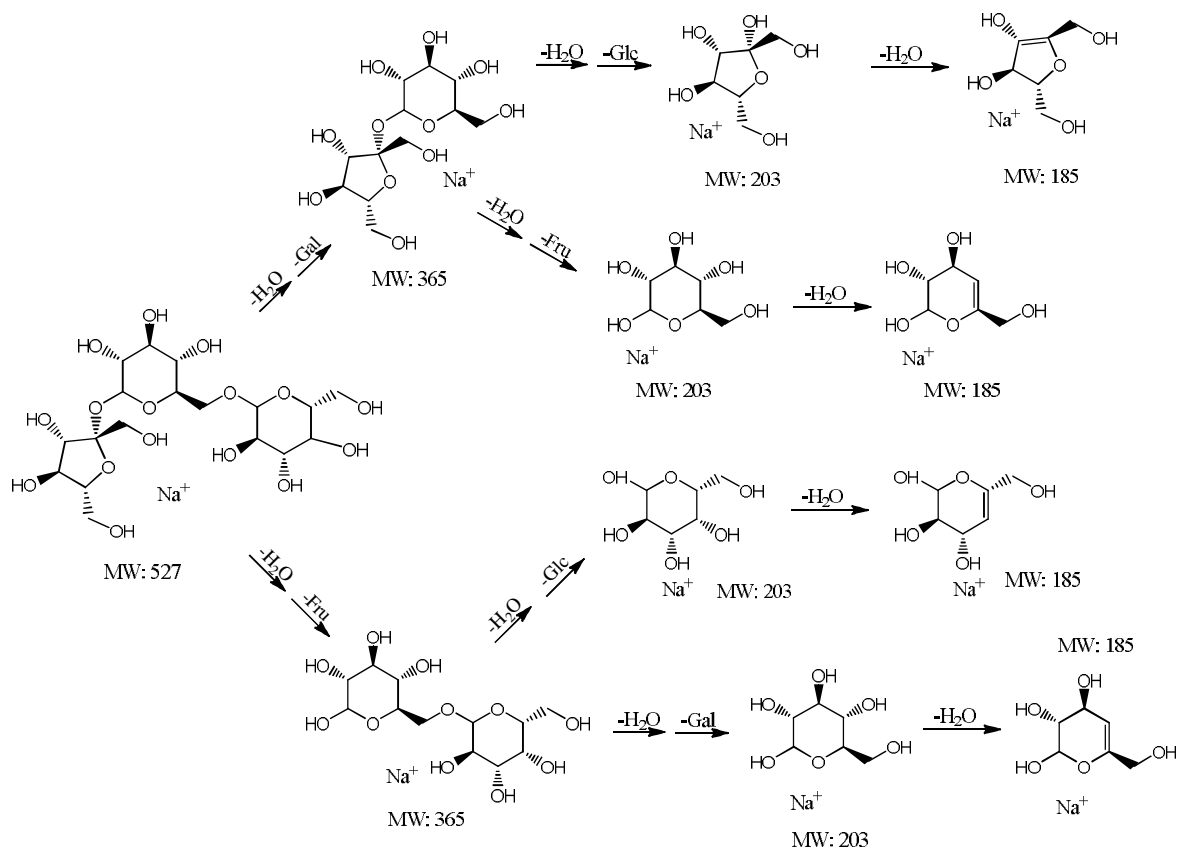
Konversioprosentit on laskettu hapetusaste huomioiden tuotteen ja galaktoosin suhteesta (taulukko 11.). Guarkumin hapetusaste oli 67 %, joten galaktoosin määrä oli 50,5 %. Pilkotulla guarkumilla hapetusaste oli 97 %, ja näin ollen suurin mahdollinen galaktoosin määrä 80,9 %.

Taulukko 11. Guarkumilla (GG) tehtyjen reaktioiden konversioprosentit. Man = mannoosi, Gal = galaktoosi, kem = kemiallinen reaktio, ents = entsyaattinen, oksinitriilaasilla tehty, reaktio Guar₅₀ = pilkottu guarkumi ja R = rekombinantti tekniikalla tuotettu entsyymi *AtHNL*.

Reaktio	Man [%]	Gal [%]	Tuote [%]	Konversio [%]
GG Hapetettu	100	75,3		
GG Kem.	100	29,7	39,0	77,3
GG Ents.	100	28,4	32,5	64,4
Guar ₅₀	100	83,4		
Guar ₅₀ _ents.	100	24,3	31,5	37,8
Guar ₅₀ _R	100	37,5	60,8	72,9

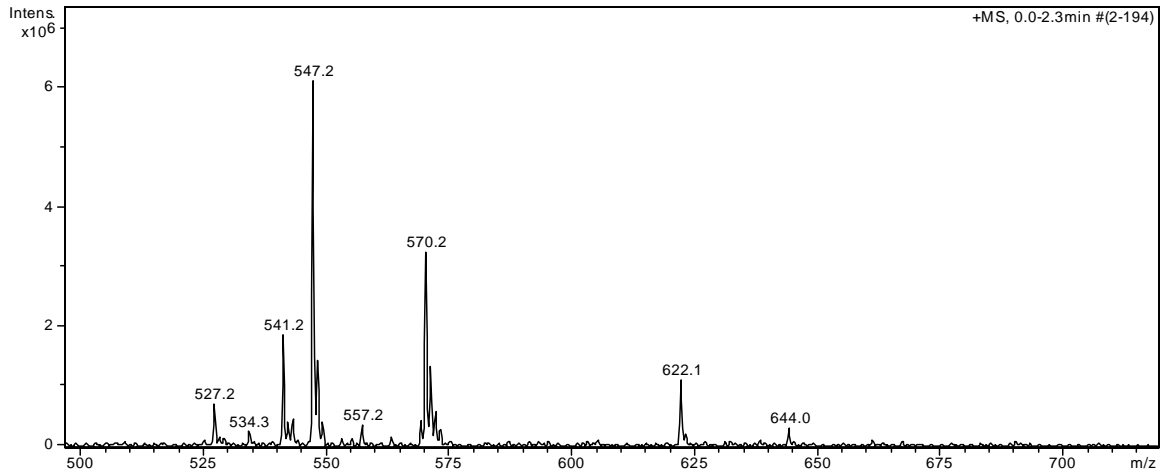
5.8.2.2 MS/MS analyysin tulokset

Vertailuna analysoitiin raffinoosi, jonka molekyylipaino on 504 g/mol. Sen massaspektrometrinen ioni 527,2 oli raffinoosin natriumaddukti $[M + Na]^+$, joka pilkkoutui edelleen MS-MS ioniloukussa. Pilkkoutumiset tapahtuivat sokerimolekyyleille tyypilliseen tapaan m/z 162:n lohkeamisilla. Tämä ioni vastaa sokerimolekyyliä, josta on lohjennut vesi (180 - 18) g/mol.¹⁰¹ Lohkeaminen tapahtui kaksi kertaa, ensimmäisen jälkeen suurimmaksi piikiksi jäi 365, joka vastaa joko fruktoosi-glukoosi-natriumadduktia $[Fru+Glc+Na]^+$ tai galaktoosi-glukoosi-natriumadduktia $[Gal+Glc+Na]^+$. Seuraavan lohkeamisen jäljelle jäävät pilkeionit 203 ja 185 vastaavat yhtä sokerimolekyyliä jossa on natriumaddukti; $[Fru+Na]^+$, $[Glu+Na]^+$ ja/tai $[Glc+Na]^+$ (180+23=203) tai vastaavat veden lohkeamisen jälkeen (162+23=185), kuva 26.

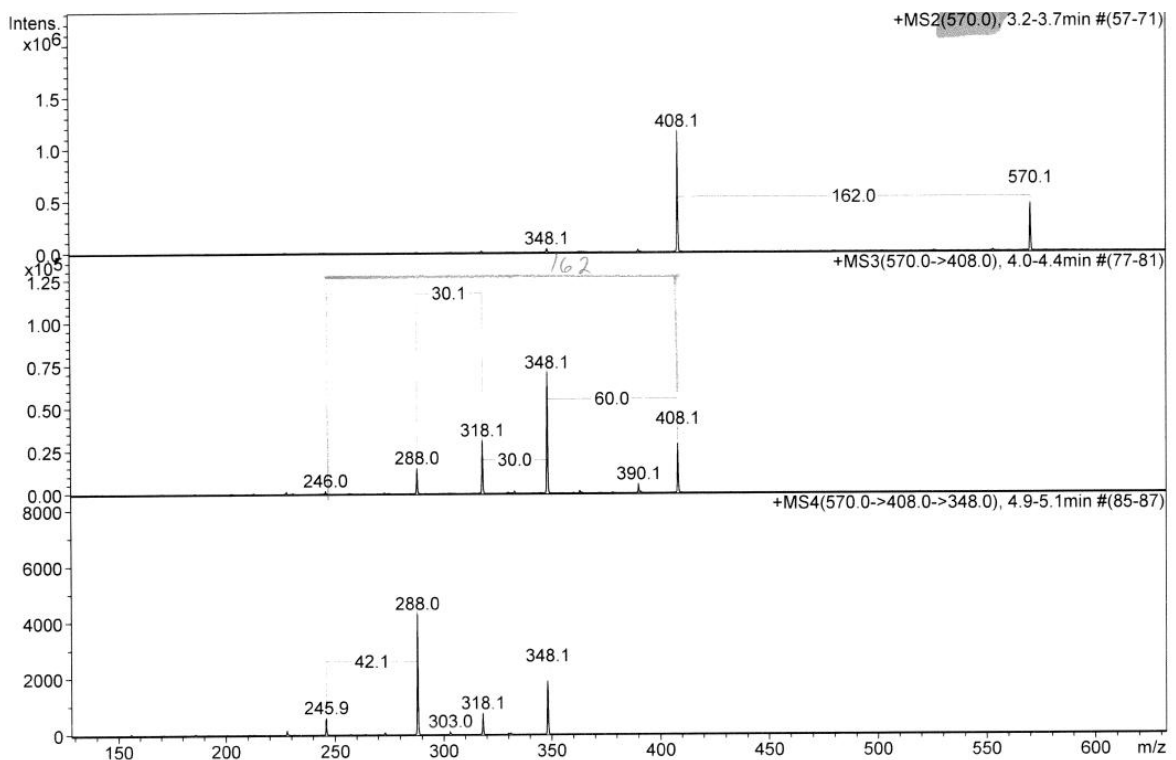


Kuva 26. Raffinoosin mahdollinen pilkkoutuminen MS-MS:lla. Raffinoosin pilkkoutuminen tapahtuu sokerimolekyyli kerrallaan. Toiselle molekyylin päädyssä olevasta sokerirakenteesta tapahtuu veden eliminaatio, jonka jälkeen anhydrosakkaridi lohkeaa.¹⁰¹ Ylimmässä reitissä molekyylistä lohkeaa ensin galaktoosi-, sitten glukoosi- ja viimeisenä vesimolekyyli. Alimmassa reitissä äiti-ionista lohkeaa fruktoosi, sitten galaktoosi ja lopuksi vesi.

Tuotteen positiivisessa ionisaatiossa muodostuneen spektrin intensiivisimmät ionit olivat m/z 547,2 ja 570,2 (kuva 27). Spektrissä esiintyy myös raffinoosin natriumadduktin -ioni $[\text{Raf}+\text{Na}]^+$, m/z 527,2. Tämä tarkoittaa sitä, että lähtöainetta on jäänyt reagoimatta. Spektrin loppupään signaalit yli massaluvuilla yli 600 ovat peräisin laitekontaminaatiosta.

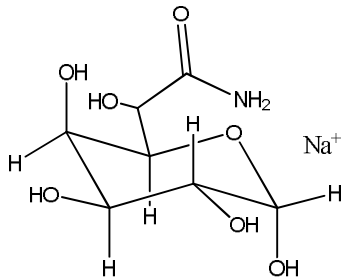


Kuva 27. Näytteen positiivisen ionisaation spektri.

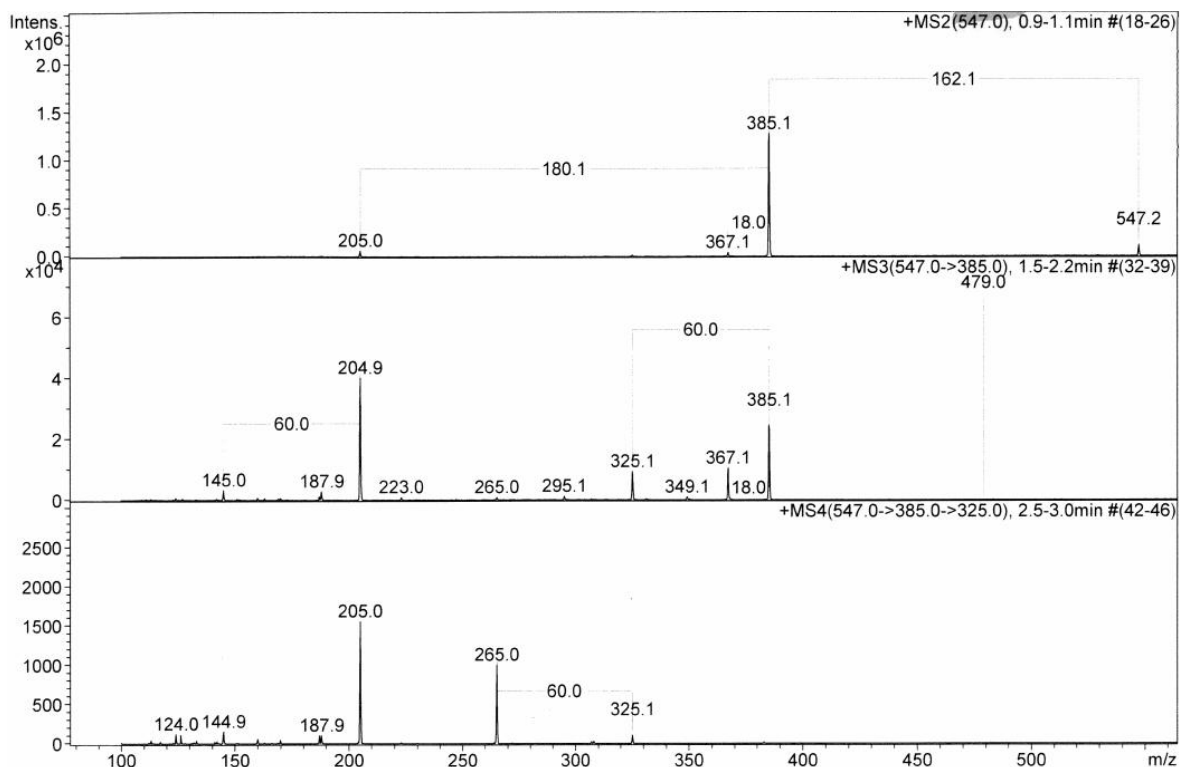


Kuva 28. Näytteen ionin m/z 570 pilkkoutuminen ioniloukussa.

Ionin 570 pilkkoutuminen tapahtui m/z 162:n pilkeioneilla samaan tapaan kuin raffinoosilla (kuva 28.). Jäljelle jäi ioni 246, joka vastaa galaktoosialdehydistä muodostunutta amidia, joka on natriumadduktina (kuva 29).

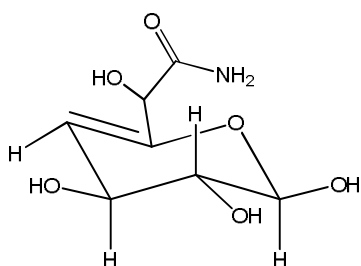


Kuva 29. Näytteen (MS)⁴ pilkeen ionin m/z 246 mahdollinen rakenne.



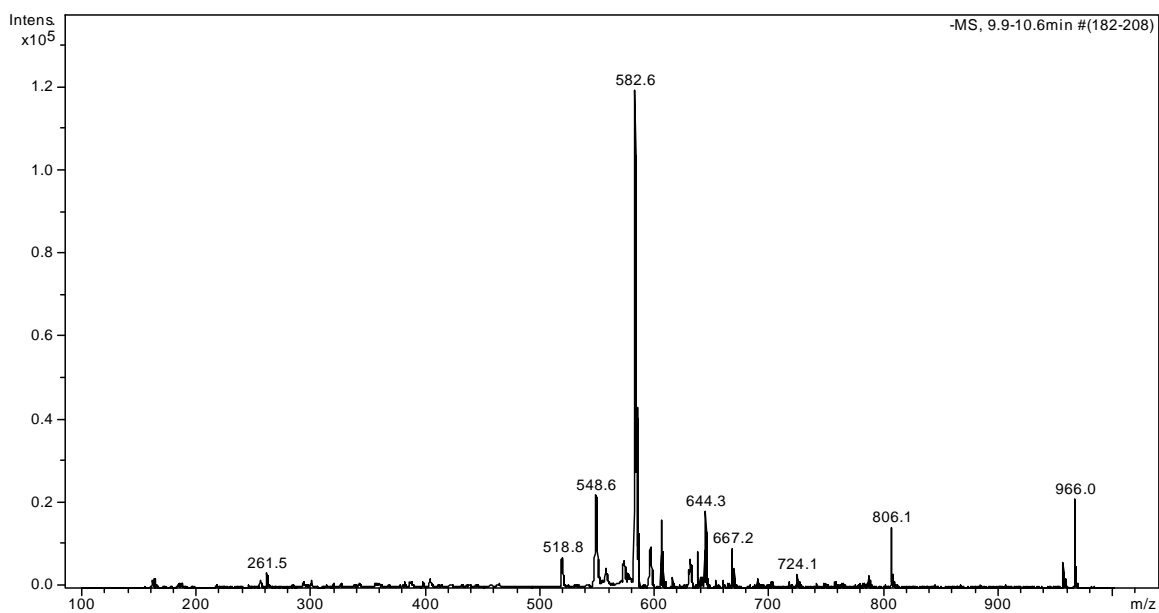
Kuva 30. Näytteen ionin m/z 547 fragmentti-ionit.

Toisen intensiivisen ionin massaluku 547 (kuva 30.) on vastaava tuote ilman Na^+ -adduktia, siitä jäljelle jäävä MS^4 -ioni on 205 vastaa galaktoosia, josta on lohjennut vesi, mutta jonka C-6-hiileen on liittynyt amidiryhmä (kuva 31.).



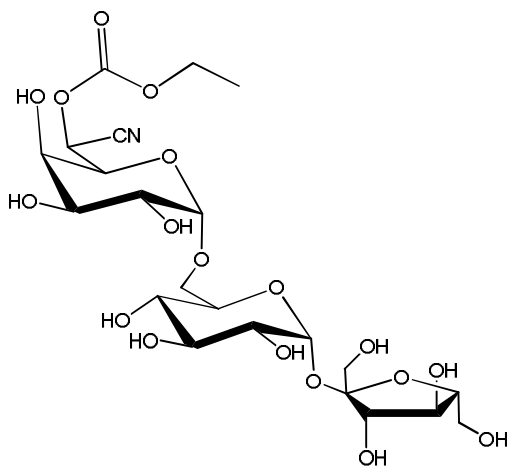
Kuva 31. Näytteen MS-MS -ionia 205 vastaava mahdollinen rakenne.

Myös toinen näyte analysoitiin, todettiin siitä saatujen ionien olevan samanlaiset kuin edellä. Tämän lisäksi tämä toinen näyte analysoitiin myös negatiivisella ionisaatiolla. Raffinoosin α -hydroksiamidin klooriaddukti-ionin $[M+Cl]^-$ molekyylipaino on 582,9. Massaspektrin intensiivisimmän ionin massa on 582,6. Seuraavaksi intensiivisin ioni oli massaluvulla 548,6, vastaten positiivisen ionisaation massalukua 547 (kuva 32.).



Kuva 32. Negatiivisen ionisaation massaspektri, ionit 582,6 ja 548,6 ovat peräisin tuotteesta.

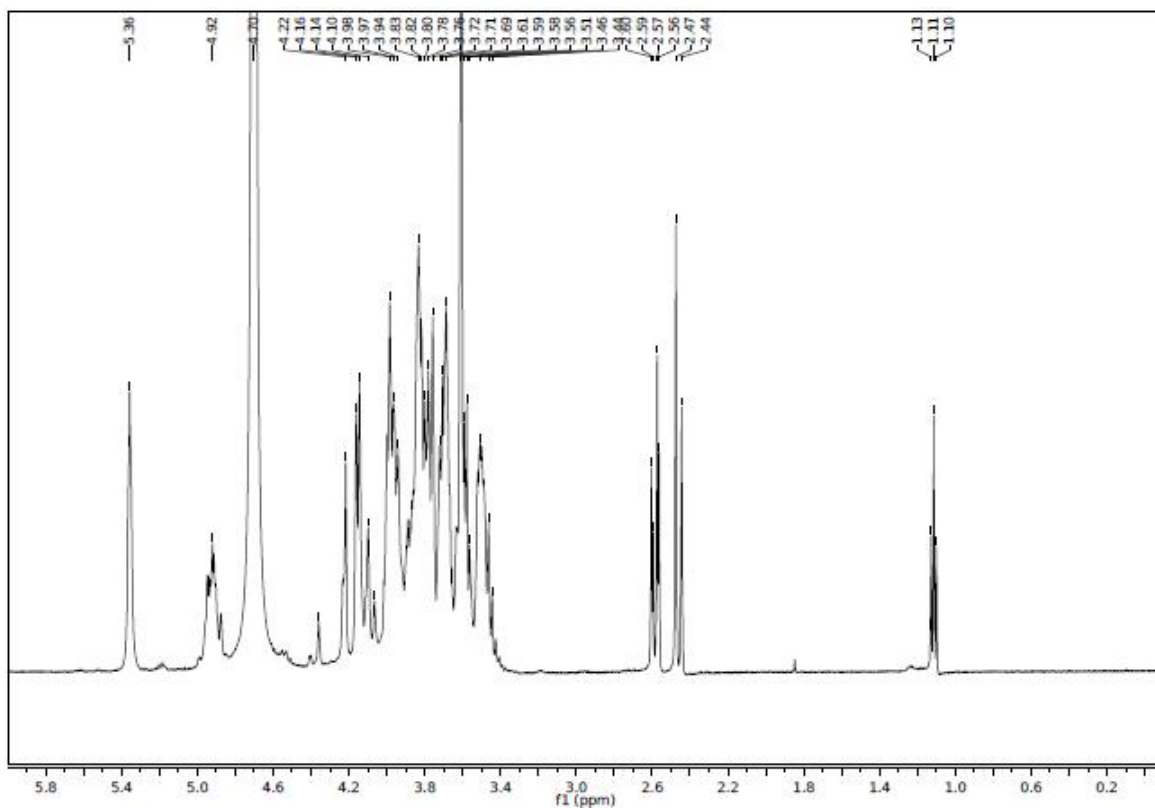
Massaspektrometrinen analyysi tukee amidirakenteen olemassaoloa. Syanohydriinien syntetisoinnissa etyyllisanoformaattilla (NCCOOEt) olisi teoriassa mahdollista suojata nitriliryhmän viereinen α -asemassa oleva hydroksyyliiryhmä. Reaktio voisi tapahtua etyyllisanoformaatista vapautuvalla etyyliformaatilla.¹² Tällaisen rakenteen (kuva 33) massaluvuilla $[M] = 602$, $[M+Na]^+ = 625$, $[M+Cl]^- = 637$ olemassaolosta ei kuitenkaan ole näyttöä.



Kuva 33. Teoriassa mahdollinen raffinoosialdehydin reaktiotuote, jossa syanohydriinin hydroksyyliiryhmä on suojattu etyyliformaatilla.¹²

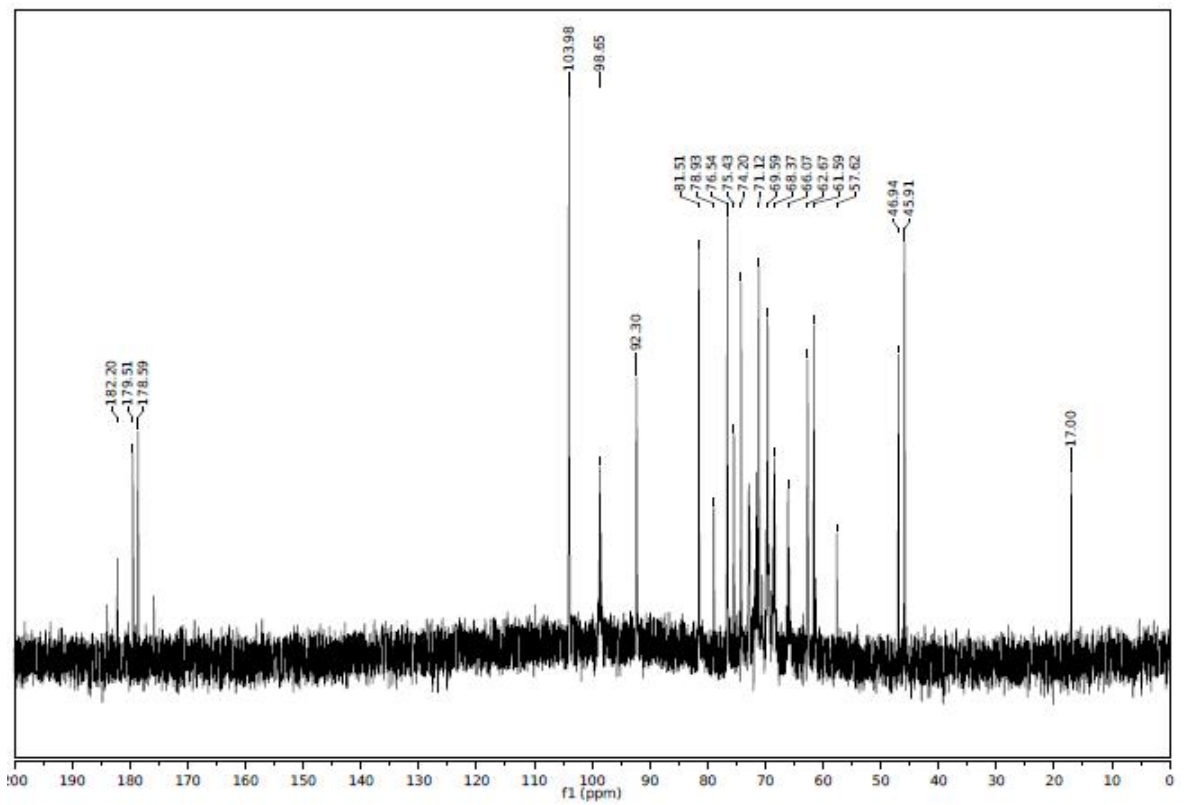
5.8.2.3 NMR analyysin tulokset

Sitraatti-fosfaattipuskurissa syntetisoidun tuotteen (RAFCN14, taulukko 3.) spektrin resoluutio on huono, eikä signaalien välille saada pohjaviivaerotusta. Myös anomeeristen hiilten protonien signaalit menevät päällekkäin muodostaen multipletin noin 5 ppm:n alueella. Protonispektrissä esiintyvät seuraavat signaalit: ^1H NMR (D_2O) δ [ppm] = 1,21 (t), 2,55 (dd), 2,67 (dd), 3,55 -4,25 (m), 4,3 (d), 5,00-5,10 (m) ja 5,45 (d), (kuva 34.).

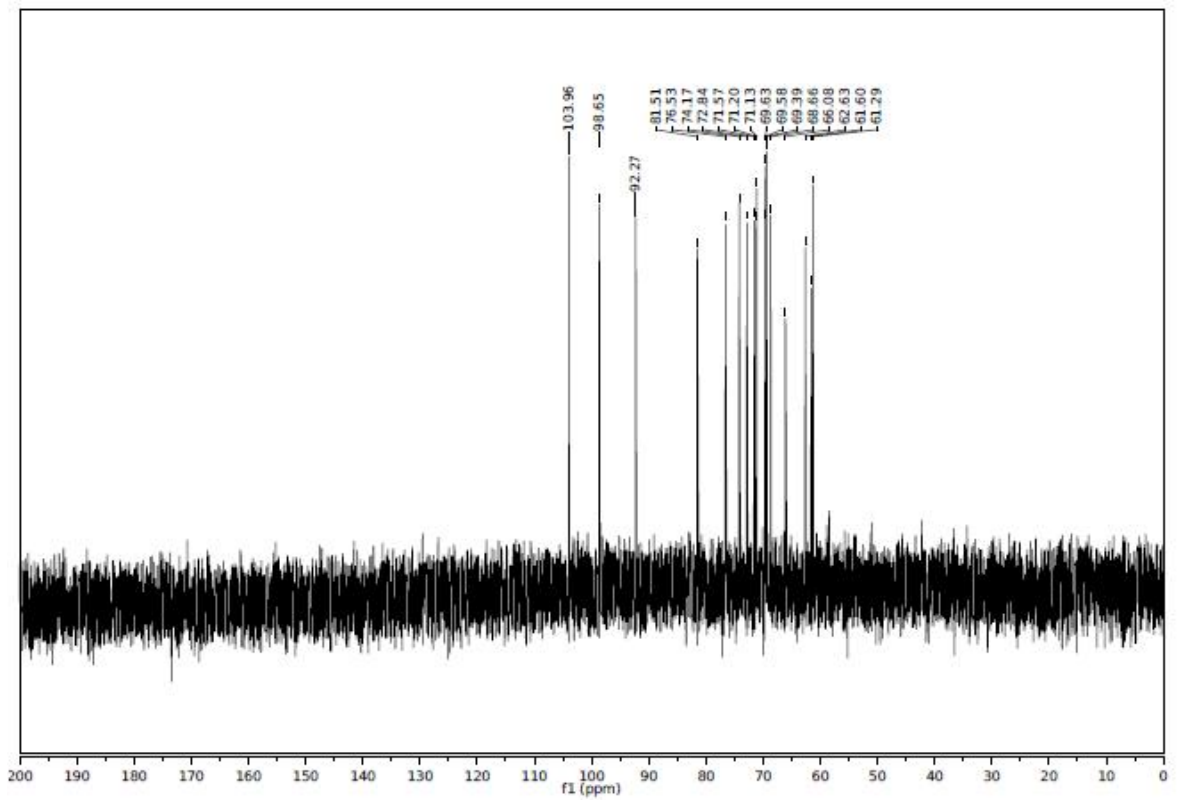


Kuva 34. Synteesituotteen ^1H NMR (D_2O) – spektri.

Epäpuhtauksia ovat sekä puskurin sisältämän sitruunahapon että saostuksessa käytetyn etanolin signaalit. Sitruunahappo aiheuttaa 2,55 ppm:n ja 2,67 ppm:n alueella olevat dupletin dupletit. Etanoli tuottaa protonispektriin tripletin 1,2 ppm (ja kvartetin 3,7 ppm, joka jää sokerirungon signaalien alle).¹⁰² Sitruunahapon vertailuspektrin (liite 1.) signaalien paikat ($\delta = 2,84$ ja 3,02 ppm) poikkeavat hiukan näytteiden tuloksista. Syynä on sitruunahaponäytteen alhaisempi pH.¹⁰³ Synteesituotteen vesiliuoksen pH on ollut noin 4, ja sitruunahapon vesiliuoksen pH on 2,3. Muuten protonispektrin rakenne vastaa suurilta osin vertailuaineena käytetyn raffinoosin, pelkistetyn lähtöaineen, spektriä (kuva 35.).



Kuva 36. Synteesituotteen ^{13}C NMR (D_2O) – spektri.



Kuva 37. Raffinoosin ^{13}C NMR (D_2O) – spektri.

NMR -analyysin tuloksena voidaan todeta, että tuote on hyvin todennäköisesti amidimuodossa, sillä ^{13}C -spektreissä kirjallisuusarvot amidien karbonyylihiilen signaalille on 170–180 ppm,¹⁰⁴ tuotteen spektrissä esiintyy 176–179 ppm kolme piikkiä, joista kaksi tulee sitruunahaposta ja yksi tuotteesta. Tuotteen spektrissä ei esiinny signaaleja alifaattisten nitrilien kirjallisuusarvojen (115–125 ppm) alueella.¹⁰⁴

5.8.2.4 Tulosten kooste

Kirjallisuudessa oksinitrilaasilla ei todeta olevan hydrolyyttistä taipumusta. Reaktioseoksessa on kuitenkin vapaana sekä protoneja että hydroksyyilejä. Edellä tutkituilla menetelmillä synteessin tulokseksi saadaan amidi syanohydriinin sijaan, joten synteessin aikana tapahtuu hydrolyysi amidiksi. Kirjallisuudessa ei ole julkaistu täysin vastaavaa tässä tutkittua vesiliuoksessa muodostettua synteesiä. Saatua tulosta tukee kolmella eri menetelmällä tehdyt analyysit, jotka kaikki osoittavat amidirakenteen olemassaolon.

6 Johtopäätökset

Synteesin mielenkiintoinen tulos on tuottanut monia eri ajatuksia tämän tutkimuksen jatkamiseksi. Menetelmän analysoinnin parantamiseksi olisi hyvä pohtia LC -menetelmän kehittämistä tai kvantitointimenetelmän yhdistämistä GC-MS:lle. Standardinlisäysmenetelmä (raffinoosille glukoosilla ja guarkumille mannoosilla) voisi olla kokeilun arvoinen. Edelleen kiraliakolonin yhdistäminen kvantitointimenetelmään tuottaisi varmasti hyviä tuloksia jatkoa ajatellen.

Synteesin kehittämiseen uusia ajatuksia on syntynyt koskien rekombinanttientsyymiä (*A β HNL*) ja sen toiminnan optimointia. Koska rekombinanttitekniikalla tuotetut entsyymit toimivat paremmin alhaisessa pH:ssa, voisi jatkossa sitraattipuskuria kokeilla *A β HNL*:n kanssa pH 3,3:ssa. Sillä tällöin kemiallinen reaktio olisi suppressoitu. Lisäksi voisi kokeilla reaktion toimivuutta noin 4 °C lämpötilassa.

Optimaalisten reaktio-olosuhteiden löydyttyä riittää aiheesta haastetta vielä seuraaville tutkijoille, sillä reaktioiden jatkaminen entsyymaattisesti on seuraava suuri askel.

Viiteluettelo

1. Kirk, R.E., Othmer, D.F., *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed., 7, (1993), ss. 821-834.
2. Kirk, R.E., Othmer, D.F., *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed., 9, (1994), ss. 703-704.
3. Brovotto, M., Gamenara, D., Saenz Méndez, P., Seoane, G. A., *C-C bond-forming lyases in organic synthesis*, Chem. Rev., (2011) 111, 4346-4403.
4. Sukumaran, J., Hanefeld, U., *Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes*, Chem. Soc. Rev., (2005) 34, 530-542.
5. Streitwieser, A., Heathcock, C.H., Kosower, E.M., *Introduction to Organic Chemistry*, 4th ed., Macmillan Publishing Company, USA, New York, (1992), s.405.
6. Danieli, B., Frattini, S., Roda, G., Carrea, G., Riva, S. *Almond oxynitrilase-catalyzed transformation of substituted aldehydes. Part 2*, J Molec Catal B, (1998) 5, 223-228.
7. Ueatrongchit, T., Tamura, K., Ohmiya, T., *Hydroxynitrile lyase from Passiflora edulis: Purification, characteristics and application in asymmetric synthesis of (R)-mandelonitrile*, Enzyme Microb. Technol., (2010) 46, 456-465.
8. Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C., Griengl, H. *Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry*, Appl. Microbiol. Biotechnol., (2007) 76, 309-320
9. García-Urdiales, E., Alfonso, I., Gotor, V., *Update 1 of: Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis*, Chem. Rev., (2011) 111, PR110.
10. Veum, L., Kanerva, L., Halling, P., Maschmeyer, T. Hanefeld, U. *Optimisation of the Enantioselective Synthesis of Cyanohydrin Esters*, Advanced Synthesis & Catalysis, (2005) 347, 1015-1021.
11. Hietanen, A., Ekholm, F.S., Leino, R., Kanerva, L. T. *Applying Biocatalysis to the Synthesis of Diastereomerically Enriched Cyanohydrin Mannosides*, European Journal of Organic Chemistry, (2010) 6974-6980.
12. Purkarthofer, T., Skranc, W., Weber, H., Griengl, H., Wubbolts, M., Scholz, G., Pöchlauer, P. *One-pot chemoenzymatic synthesis of protected cyanohydrins*, Tetrahedron, (2004) 60, 735-739.
13. Wang, W., Liu, X., Lin, L., Feng, X. *Recent progress in the chemically catalyzed enantioselective synthesis of cyanohydrins*, European Journal of Organic Chemistry, (2010) 4751-4769.
14. Elliott, J.D., Choi, V.M.F., Johnson, W.S., *Asymmetric synthesis via acetal templates. 5. Reactions with cyanotrimethylsilane. Enantioselective preparation of cyanohydrins and derivatives*, The Journal of Organic Chemistry, (1983) 48, 2294.

15. Holt, J., Hanefeld, U., *Enantioselective Enzyme-Catalysed Synthesis of Cyanohydrins*, Current Organic Synthesis, (2009) 6, 15-37.
16. Effenberger, F., *Synthesis and Reactions of Optically Active Cyanohydrins*, Angewandte Chemie International Edition in English, (1994) 33, 1555-1564.
17. Schmidt, M., Griengl, H., *Oxynitrilases: From cyanogenesis to asymmetric synthesis*, Biocatalysis – From Discovery to Application, (1999) 200, 193-226.
18. Sharma, M., Sharma, N.N., Bhalla, T.C., *Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry*, Enzyme Microb. Technol., (2005) 37, 279-294.
19. Effenberger, F., *(R) - and (S)-Cyanohydrins: Their Enzymatic Synthesis and Their Reactions*, Microbial Reagents in Organic Synthesis, (1992), 25-33
20. Viite 5, s. 745.
21. Purkarthofer, T., Pabst, T., Van, D.B., Griengl, H., Maurer, O., Skranc, W. *Large-scale synthesis of (R)-2-amino-1-(2-furyl)ethanol via a chemoenzymatic approach*, Organic Process Research and Development, (2006) 10, 618-621.
22. Basu, M.K., Luo, F., *Efficient transformation of nitrile into amide under mild condition*, Tetrahedron Lett., (1998) 39, 3005-3006.
23. Reisinger, C., *Enzymatic hydrolysis of cyanohydrins with recombinant nitrile hydratase and amidase from Rhodococcus erythropolis*, Biotechnol. Lett., (2004) 26, 1675-1680.
24. Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. *Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase–nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity*, Tetrahedron: Asymmetry, (2006) 17, 320-323.
25. Sawada, D., Kanai, M., Shibasaki, M., *Enantioselective Total Synthesis of Epothilones A and B Using Multifunctional Asymmetric Catalysis*, J. Am. Chem. Soc., (2000) 122, 10521-10532.
26. Koeller, K.M., Wong, C., *Enzymes for chemical synthesis*, Nature, (2001) 409, 232.
27. Frey, P.A., Hegeman, A.D., *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York, (2007), s. 831.
28. Kosjek, B., Fleitz, F.J., Dormer, P.G., Kuethe, J. T. Devine, P. N. *Asymmetric bioreduction of α,β -unsaturated nitriles and ketones*, Tetrahedron: Asymmetry, (2008) 19, 1403-1406.
29. Johnson, D.V., Zabelinskaja-Mackova, A.A., Griengl, H., *Oxynitrilases for asymmetric C–C bond formation*, Curr. Opin. Chem. Biol., (2000) 4, 103-109.
30. Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A. Kratky, C. *The Hydroxynitrile Lyase from Almond: A Lyase that Looks Like an Oxidoreductase*, Structure, (2001) 9, 803-815.

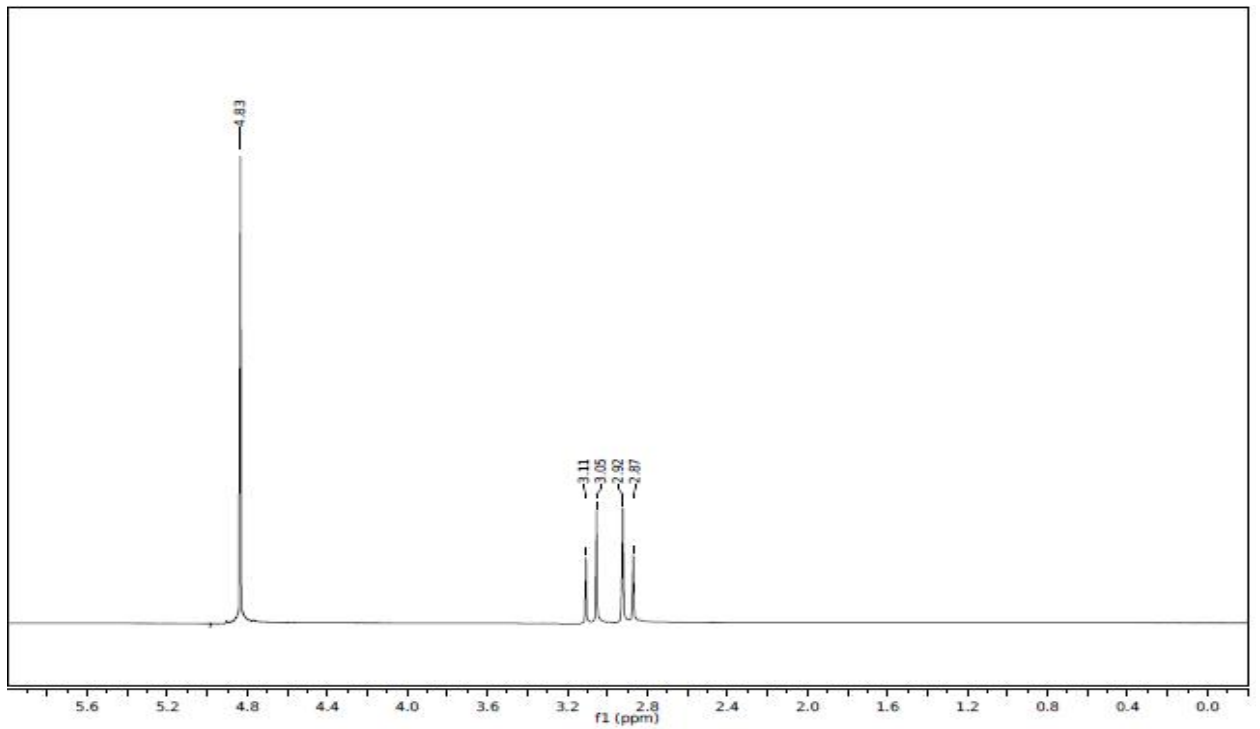
31. Wohlgemuth, R., *Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry*, Curr. Opin. Biotechnol., (2010) 21, 713-724.
32. Pichersky, E., Lewinsohn, E., *Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism*, Annual Review of Plant Biology, (2011) 62, 549-566.
33. Johnson, D.V., Griengl, H., *Biocatalytic Applications of Hydroxynitrile Lyases*, Springer Berlin, Heidelberg, (2008) 63, ss. 31-55.
34. *Introduction to Enzyme Nomenclature*, Historical Introduction, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/history.html> (23.1.2012)
35. *Enzyme Nomenclature*, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (14.12.2011)
36. BRENDA, *The Comprehensive Enzyme Information System*, <http://www.brenda-enzymes.org/index.php4> (18.12.2011)
37. Fechter, M.H., Griengl, H., *Hydroxynitrile Lyases: Biological Sources and Application as Biocatalysts*, Food Technol. Biotechnol., (2004) 42, 287-294.
38. Dreveny, I., Kratky, C., Gruber, K., *The active site of hydroxynitrile lyase from Prunus amygdalus: Modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis*, Protein Science, (2002) 11, 292-300.
39. Effenberger, F., Förster, S., Wajant, H., *Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis*, Curr. Opin. Biotechnol., (2000) 11, 532-539.
40. Willeman, W.F., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J., *Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (R)-mandelonitrile by Prunus amygdalus hydroxynitrile lyase using a process model approach*, Enzyme Microb. Technol., (2002) 30, 200-208.
41. Willeman, W.F., Hanefeld, U., Straathof, A.J.J., Heijnen, J. J. *Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by Prunus amygdalus hydroxynitrile lyase*, Enzyme Microb. Technol., (2000) 27, 423-433.
42. Andexer, J. N., Langermann, J. V., Kragl, U., Pohl, M. *How to overcome limitations in biotechnological processes - examples from hydroxynitrile lyase applications*, Trends Biotechnol. (2009) 27, 599-607.
43. Weis, R., Gaisberger, R., Skranc, W., Gruber, K., Glieder, A. *Carving the Active Site of Almond R-HNL for Increased Enantioselectivity*, Angewandte Chemie International Edition, (2005) 44, 4700-4704.
44. Glieder, A., Weis, R., Skranc, W., Poehlauer, P., Dreveny, I., Majer, S., Wubbolts, M.; Schwab, H., Gruber, K. *Comprehensive Step-by-Step Engineering of an (R)-Hydroxynitrile Lyase for Large-Scale Asymmetric Synthesis*, Angewandte Chemie International Edition, (2003) 42, 4815-4818.
45. Weis, R., Poehlauer, P., Bona, R., Skranc, W., Luiten, R., Wubbolts, M., Schwab, H., Glieder, A. *Biocatalytic conversion of unnatural substrates by recombinant almond R-HNL isoenzyme 5*, J Molec Catal B, (2004) 29, 211-218.

46. Strohmeier, G.A., Pichler, H., May, O., Gruber-Khadjawi, M. *Application of designed enzymes in organic synthesis*, Chem. Rev., (2011) 111, 4141-4164.
47. Guterl, J., Andexer, J.N., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Rosenkranz, T., Fitter, J., Gruber, K., Kragl, U., Eggert, T., Pohl, M. *Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold*, J. Biotechnol., (2009) 141, 166-173.
48. Okrob, D., Metzner, J., Wiechert, W., Gruber, K.; Pohl, M. *Tailoring a Stabilized Variant of Hydroxynitrile Lyase from Arabidopsis thaliana*, ChemBioChem, (2012) 13, 797-812.
49. Okrob, D., Paravidino, M., Orru, R.V.A., Wiechert, W., Hanefeld, U., Pohl, M. *Hydroxynitrile Lyase from Arabidopsis thaliana: Identification of Reaction Parameters for Enantiopure Cyanohydrin Synthesis by Pure and Immobilized Catalyst*, Advanced Synthesis & Catalysis, (2011) 353, 2399-2408.
50. Fuhshuku, K., Asano, Y., *Synthesis of (R)- β -nitro alcohols catalyzed by R-selective hydroxynitrile lyase from Arabidopsis thaliana in the aqueous-organic biphasic system*, J. Biotechnol., (2011) 153, 153-159.
51. Gregory, R. J. H. *Cyanohydrins in Nature and the Laboratory: Biology, Preparations, and Synthetic Applications*. Chem. Rev. (1999), 99, 3649-3682.
52. Kanerva, L.T., *Biocatalytic ways to optically active 2-amino-1-phenylethanol*, Acta Chem. Scand., (1996) 50, 234-242.
53. Yosef, H.A.A., Morsy, N.M., Mahran, M.R.H., Aboul-Enein, H. *Preparation and reactions of optically active cyanohydrins using the (R)-hydroxynitrile lyase from Prunus amygdalus*, Journal of the Iranian Chemical Society, (2007) 4, 46-58.
54. Roos, J., Effenberger, F., *Hydroxynitrile lyase catalyzed enantioselective HCN addition to O-protected α -hydroxyaldehydes*, Tetrahedron: Asymmetry, (1999) 10, 2817-2828.
55. Effenberger, F., *Enzyme-Catalysed Cyanohydrin Synthesis in Organic-Solvents*, Angewandte Chemie International Edition in English, (1987) 26, 458-460.
56. Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P., *Hydroxynitrile lyase-catalyzed synthesis of cyanohydrins in organic solvents: Parameters influencing activity and enantiospecificity*, Enzyme Microb. Technol., (1999) 25, 384-391.
57. Effenberger, F., *Hydroxynitrile lyases, Interesting Biocatalysis in Stereoselective Organic Syntheses*, International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, Phuket, Thailand, 23-27.11.1997
58. Gerrits, P.J., Willeman, W.F., Straathof, A.J.J., Heijnen, J. J., Brussee, J., van der Gen, A. *Mass transfer limitation as a tool to enhance the enantiomeric excess in the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins*, J Molec Catal B, (2001) 15, 111-121.
59. Avi, M., Fechter, M.H., Gruber, K., Belaj, F., Pöchlauer, P., Griengl, H. *Hydroxynitrile lyase catalysed synthesis of heterocyclic (R)- and (S)-cyanohydrins*, Tetrahedron, (2004) 60, 10411-10418.

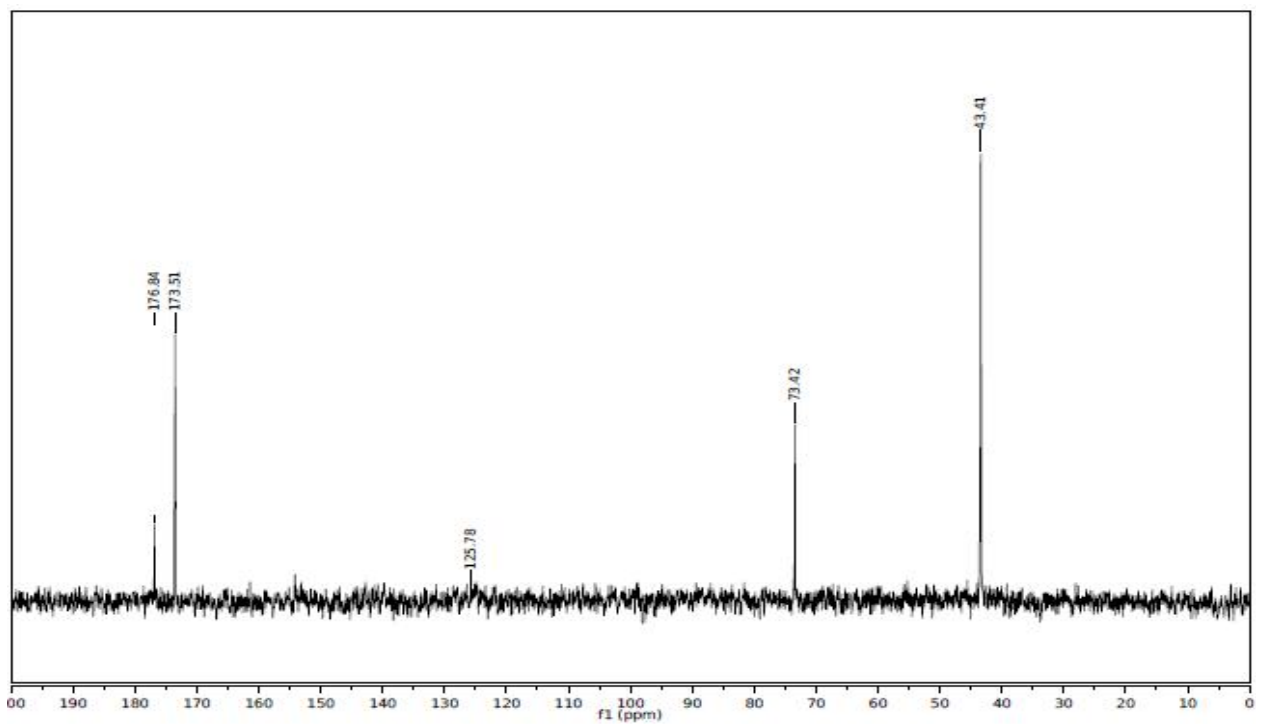
60. Brussee, J., Roos, E.C., Van Der Gen, A., *Bio-organic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins*, Tetrahedron Lett., (1988) 29, 4485-4488.
61. Gaisberger, R.P., Fechter, M.H., Griengl, H., *The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids*, Tetrahedron: Asymmetry, (2004) 15, 2959-2963.
62. Kiljunen, E., Kanerva, L.T., *(R)- and (S)-cyanohydrins using oxynitrilases in whole cells*, Tetrahedron: Asymmetry, (1996) 7, 1105-1116.
63. Bianchi, P., Roda, G., Riva, S., Danieli, B., Zabelinskaja-Mackova, A., Griengl, H. *On the selectivity of oxynitrilases towards α -oxygenated aldehydes*, Tetrahedron, (2001) 57, 2213-2220.
64. Gerrits, P.J., Marcus, J., Birikaki, L., van der Gen, A. *Difficult substrates in the R-hydroxynitrile lyase catalyzed hydrocyanation reaction: application of the mass transfer limitation principle in a two-phase system*, Tetrahedron: Asymmetry, (2001) 12, 971-974.
65. Griengl, H., Schwab, H., Fechter, M., *The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases*, Trends Biotechnol., (2000) 18, 252-256.
66. Gröger, H., *Enzymatic Routes to Enantiomerically Pure Aromatic α -Hydroxy Carboxylic Acids: A Further Example for the Diversity of Biocatalysis*, Advanced Synthesis & Catalysis, (2001) 343, 547-558.
67. Campbell, M.K., *Biochemistry third edition*, John Vondeling, (1999), ss. 303-310
68. Viite 5, ss. 900-938
69. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. In *Biochemistry 6th edition*; W.H. Freeman and Company: New York, (2002); ss.303-315.
70. Mathur, N.K., *Industrial Galactomannan Polysaccharides*, CRC Press, (2011) ss. 1-4.
71. Viite 67, ss. 420-453
72. deMan, J.M., In *Principles of Food Chemistry (3rd Edition)*; Springer - Verlag, ss. 163-183.
73. Tunngland, B.C., Meyer, D., *Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, (2002) 3, 90-109.
74. Parikka, K., Leppänen, A., Pitkänen, L., Reunanen, M. Willför, S. Tenkanen, M. *Oxidation of Polysaccharides by Galactose Oxidase*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2010) 58, 262-271.
75. Neubauer, H., *NMR structure determination of saccharose and raffinose by means of homo- and heteronuclear dipolar couplings*, Helv. Chim. Acta, (2001) 84, 243-258.
76. Viite 70, ss. 61-92.
77. Phillips, G.O., Williams, P.A., *Handbook of Hydrocolloids, 2nd ed.*, Woodhead Publishing, (2009), ss. 228-251.

78. Viite 70, ss. 5-14.
79. Viite 70, ss. 27-39.
80. Söderqvist-Lindblad, M., Albertsson, A., In *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2 nd ed.*, (Chemical Modification of Hemicelluloses and Gums) CRC Press, (2004), ss. 491-508.
81. Prabakaran, M., *Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems*, Int. J. Biol. Macromol., (2011) 49, 117-124.
82. Freitas, R.A., Martin, S., Paula, R.C., Feitosa, J. P. A. Sierakowski, M. *Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds*, Thermochimica Acta, (2004) 409, 41-47.
83. Sierakowski, M.R., Milas, M., Desbrières, J., Rinaudo, M. *Specific modifications of galactomannans*, Carbohydr. Polym., (2000) 42, 51-57.
84. Parikka, K., Tenkanen, M., *Oxidation of methyl alpha-d-galactopyranoside by galactose oxidase: products formed and optimization of reaction conditions for production of aldehyde*, Carbohydr. Res., (2009) 344, 14-20.
85. Frollini, E., Reed, W.F., Milas, M., Rinaudo, M. *Polyelectrolytes from polysaccharides: Selective oxidation of guar gum — a revisited reaction*, Carbohydr. Polym., (1995) 27, 129-135.
86. Kamel, M., Abd El-Thalouth, I., Amer, M.A., Ragheb, A. Nassar, S.H. *Chemical Modification of Guar Gum Part I: Carboxymethylation in Aqueous Medium*, Starch - Stärke, (1992) 44, 433-437.
87. Dodi, G., Hritcu, D., Popa, M.I., *Carboxymethylation of guar gum: synthesis and characterization*, Cellulose Chem. Technol., (2011) 45 (3-4), 171-176.
88. Patel, S.P., *Rheological Properties of Guar Gum and Hydroxyethyl Guar Gum in Aqueous-Solution*, Int. J. Biol. Macromol., (1987) 9, 314-320.
89. Risica, D., Dentini, M., Crescenzi, V., *Guar gum methyl ethers. Part I. Synthesis and macromolecular characterization*, Polymer, (2005) 46, 12247-12255.
90. Viite 70, ss. 49-60.
91. Kiljunen, E., Kanerva, L.T., *Novel (R)-oxynitrilase sources for the synthesis of (R)-cyanohydrins in diisopropyl ether*, Tetrahedron: Asymmetry, (1997) 8, 1225-1234.
92. Ognyanov, V., Datcheva, V.K., Kyler, K.S., *Preparation of chiral cyanohydrins by an oxynitrilase-mediated transcyanation*, J. Am. Chem. Soc., (1991) 113, 6992-6996.
93. Sundberg, A., Sundberg, K., Lillandt, C., Holmbom, B. *Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acidic methanolysis and gas chromatography*, Nordic Pulp and Paper Research Journal, (1996) 11, 216-219.
94. Heikkinen, S., *Standard Operating Procedure for Acid Methanolysis*, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, 11.2.2011

95. Bertaud, F., Sundberg, A., Holmbom, B., *Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins*, Carbohydr. Polym., (2002) 48, 319-324.
96. Bleton, J., Mejanelle, P., Sansoulet, J., Goursaud, S., Tchaplal, A. *Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums*, Journal of Chromatography A, (1996) 720, 27-49.
97. Sen, D., Gosling, A., Stevens, G.W., Bhattacharya, P.K., Barber, A.R., Kentish, S.E., Bhattacharjee, C., Gras, S.L. *Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation*, Food Chem., (2011) 128, 773-777.
98. Swennen, K., Courtin, C.M., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C. Delcour, J.A. *Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures*, Carbohydr. Polym., (2005) 62, 283-292.
99. Koskinen, A., *Syanidijätteen käsittely*, TKK, Kemian tekniikan osasto, Org. kem. lab, (2002)
100. Bubb, W.A., *NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity*, Concepts in Magnetic Resonance Part A, (2003) 19A, 1-19.
101. Gross, J., *Mass Spectrometry 2nd ed.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2011), ss. 255-259.
102. Gottlieb, H.E., Kotlyar, V., Nudelman, A., *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities*, J. Org. Chem., (1997) 62, 7512-7515.
103. Loewensterin, A., Roberts, J.D., *The Ionization of Citric Acid Studied by the Nuclear Magnetic Resonance Technique I*, J. Am. Chem. Soc., (1960) 82, 2705-2710.
104. Hase, T., In *Tables For Organic Spectrometry*, 4th ed. Otatiето, Helsinki, 1997, s.78.



Kuva 1. Sitruunahapon ^1H NMR (D_2O) – spektri



Kuva 2. Sitruunahapon ^{13}C NMR (D_2O) – spektri

