

Kasvisoluseinässä esiintyvät ligniini rakenteet, entsyymaattiset reaktiot ja ligniini-hiilihydraatti kompleksi malliaineen esterisidosten entsyymaattinen hajottaminen esteraaseilla

Helsingin yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta
Kemian koulutusohjelma
Pro gradu -tutkielma
Harri Hinkka
Synteesi ja Analyysi
Marraskuu 2020



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen	Laitos - Institution - Department Kemian Laitos	
Tekijä - Författare - Author Harri Hinkka		
Työn nimi - Arbetets titel Kasvisoluseinässä esiintyvät ligniini rakenteet, entsyymaattiset reaktiot ja ligniini-hiilihydraatti kompleksi malliaineen esterisidosten entsyymaattinen hajottaminen esteraaseilla		
Oppiaine - Läroämne - Subject Kemia		
Työn laji/ Ohjaaja - Arbetets art/Handledare - Level/Instructor Pro gradu -tutkielma	Aika - Datum - Month and year Marraskuu 2020	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 70
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Tutkielma käsittelee kasvien lignoselluloosaa yleisellä tasolla painottuen kuitenkin melko vähän hyödynnetyin, mutta toiseksi runsaimmin luonnosta löytyvän makromolekyylin, ligniinin rakenteeseen, synteisiin sekä hajoamisreaktioihin. Tämän lisäksi tarkastellaan lignoselluloosassa esiintyvien esterisidosten merkitystä ligniinien sekä hiilihydraattien välillä. Lignoselluloosassa esiintyvien esterisidosten roolista on vielä paljon selvitettävää, sillä nämä sidokset ovat sekä lignoselluloosan rakenteen että sen biokatalyyttisen hajottamisen kannalta merkittäviä.</p> <p>Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään lignoselluloosan koostumus, jonka jälkeen esitellään lyhyesti jo paremmin tutkitut selluloosa ja hemiselluloosa ja keskitytään pääasiassa ligniiniin, ligniini-hiilihydraatti komplekseihin (LCC) sekä näiden rakenteiden syntyyn ja entsyymaattiseen hajottamiseen. Esittelyssä käsitellään lisäksi keskeisiä entsyymeitä, jotka näiden rakenteiden hajottamiseen osallistuvat.</p> <p>Kokeellisessa osuudessa keskityttiin entsyymaattisella puolella pelkästään esteraaseihin. Tutkittavana ferulasokeriseos-malliaineen esterisidosten hajottaminen pääasiassa neljällä esteraasilla (<i>AnFAE</i> A, B, C ja D). Malliaine syntetisoitiin ferulahaposta ja metyyli-α-D-glukopyranosidista suojaamalla vain ferulahaposta ylimääräinen hydroksi-ryhmä ja antaen reaktion vapaasti substituoida sokerin vapaita ryhmiä luoden isomeerisen metyyli feruloyyli-α-D-glukopyranosidiseoksen, jossa ferulahappo on sitoutunut esterisidoksella joko sokerin 2-, 3-, 4-, tai 6-asemaan. Malliaineen lisäksi tutkittiin esteraasien aktiivisuutta ja substraattispesifisyyttä käyttäen substraattina kymmenettä erityyppistä kanelihapon metyyli- tai etyyliesteriä.</p>		
Avainsanat – Nyckelord Ligniini, hiilihydraatti, esterisidokset, esteraasi, ferulahappo, kanelihappo, aktiivisuus		
Muita tietoja - Övriga uppgifter - Additional information		
Säilytyspaikka - Förvaringsställe - Where deposited Helsingin Yliopiston digitaalinen arkisto HELDA/eThesis		

Sisällys

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuuskatsaus	2
2.1 Kasvisoluseinän rakenne	2
2.1.2 Selluloosa	4
2.1.3 Hemiselluloosa	5
2.1.4 Ligniini	6
2.2 Ligniinin reaktiot	15
2.2.1 Ligniinin hajoittaminen entsyymeillä	15
2.2.2 Lakkaasit	16
2.2.3 Ligniiniperoksidaasit	19
2.2.4 Mangaaniperoksidaasit	22
2.2.5 Versatiiliperoksidaasit	24
2.3 Esteraasit	25
2.3.2 Ferulahappoesteraasi	29
2.4 Ferulahappo	30
2.5 Ferulaesterit ja niiden malliaineet	31
3. Kokeellinen osuus	33
3.1 Menetelmät ja laitteistot	33
3.2 LCC-Malliaineen synteetit	34
3.2.2 Ferulahapon asetylointi	34
3.2.3 4-O-Asetyyli ferulahappokloridin synteesi	35
3.2.4 4-O-Asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin synteesi	36
3.2.5 Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen synteesi	39
3.3 Esterisidoksen katkaisu entsyymaattisesti käyttäen esteraaseja	42
3.3.2 Metyyli- ja etyyliesterit substraatteina	42

3.3.3	Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen esterisidosten katkaisu.....	46
3.4	Yhteenveto.....	53
4.	Lähteet.....	55
5.	Liitteet.....	61

Lyhenteet ja merkinnät

5-5	Ligniinin bifenyylinen rakenne
4CL	4-Kumaraatti-CoA-ligaasi
β 1	Ligniinin 1,2-diaryyilipropaani rakenne
β -5	Ligniinin fenyylikumaraani rakenne
β -1,4	Kahden glukoosin välillä oleva glykosidinen sidos
β -O-4	Ligniinin difenyyli eetteri rakenne
β - β	Ligniinin resinoli rakenne
AA1/2	Auxiliary family 1 tai 2
AnFAE	Feruloyyli esteraasi <i>Aspergillus Niger</i>
C3H	ρ -Kumaryyli sikimihappo / Kiniini 3-hydroksylaasi
C4H	Kanelihappo-4-hydroksylaasi
CA	Klorogeenihappo
CAD	Kanelialkoholi dehydrogenaasi
CAZy	Carbohydrate-active enzymes
CoA	Koentsyymi A
CCoAOMT	Kahvi-CoA o-metyylitransferaasi
CCR	Kaneli-CoA reduktiaasi
COMT	Kahvihappo/5-hydroksiferulahappo o-metyylitransferaasi
EC	Etyylikumaraatti
E.C.	Entsyymi klassifikaatio
EHM	Etyyli-4-hydroksi-3-metoksisinnamaatti
F5H	Ferulaatti 5-hydroksylaasi
GSH	Glutationi
HCT/CST	Hydroksikaneli-CoA :Sikimihappo / Kiniini hydroksikanelitransferaasi
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
LCC	Ligniini-hiilihydraatti kompleksi (lignin-carbohydrate complex)



LFP	Ligniini-ferulaatti-polysakkaridi kompleksi
LIP	Ligniini-peroksidaasi
MC	Metyylikaffeatti
MCi	Metyylisinnamaatti
MG	Metyyligallaatti
MF	Metyyliferulaatti
MMC	Metyyli 3,4-dimetoksisinnamaatti
MS	Metyylisinapaatti
MpC	Metyylikumaraatti
MNP	Mangaaniperoksidaasi
NMR	Ydinmagneettiresonanssispektroskopia
TAL	Tyrosiiniammoniakkilyaasi
TLC	Ohutkerroskromatografia
PAL	Fenyylialaniiniammoniakkilyaasi
uFA	Tyydyttymätön rasvahappo
UV	Ultravioletti-asteilyspektroskopia
VP	Versatiiliperoksidaasi

1. Johdanto

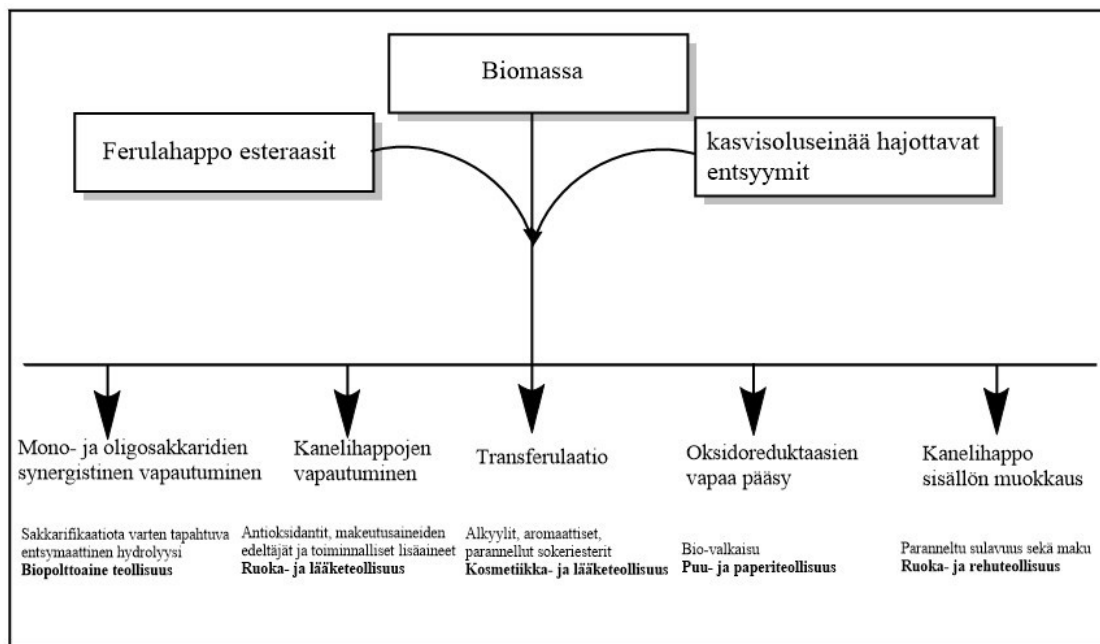
Yhteiskunnan energiantuotantoon käytetään useita raaka-aineita, erityisesti fossiilisia polttoaineita, joita on rajallisesti saatavilla maapallolla. Fossiilisten polttoaineiden käytöstä aiheutuu ongelmallisia elinympäristöä vahingoittavia päästöjä. Fossiilisten polttoaineiden rajallisuuden ja päästöhaittojen takia on globaalisti herännyt keskustelua fossiilisten polttoaineiden korvaamisesta uusiutuvilla raaka-aineilla. Varteenotettavia vaihtoehtoja fossiilille polttoaineille ovat erityisesti uusiutuvat biopohjaiset puu- ja kasvipohjaiset raaka-aineet. Biopohjaisilla uusiutuvilla raaka-aineilla tarkoitetaan yleensä lignoselluloosaa.

Kasvipohjainen biomassa lignoselluloosa koostuu pääasiassa kolmesta makromolekyulistä; selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä. Näiden lisäksi kasvisoluseinä sisältää pieniä määriä proteiineja sekä erilaisia uuteaineita.¹ Näiden komponenttien massaosuudet vaihtelevat riippuen kasvi- sekä puulajista. Yleisesti voidaan arvioida, että tyypillisesti puun biomassa sisältää 30–50% selluloosaa, 20–35% hemiselluloosaa ja 15–30% ligniiniä.²

Biopolttoaineiden avulla on mahdollista vähentää kasvihuonekaasujen, kuten hiilidioksidin (CO₂) määrää ilmakehässä, ja täten edistää taistelua ilmastonlämpenemistä vastaan. Biopolttoaineiden kyky vähentää CO₂ -päästöjen määrää perustuu siihen, että niiden raaka-aineina hyödynnettävät kasvit vähentävät kasvuvaiheessaan CO₂:a, eli toisin sanoen biopolttoaineet kompensoivat tuottamiaan CO₂ -päästöjä.³ Sekä ensimmäisen että toisen sukupolven biopolttoaineiden hiilikierrossa hyödyntämisen lisäksi on kehitetty menetelmiä lignoselluloosan muuntamiseksi hyödyllisiksi lisäarvoa tuottaviksi. Näitä arvoa tuottavia lopputuotteita ja sovellutuksia ovat esim. lääkkeet, hiilikuitu materiaalit, puuliimat, polymeerien prekursorit sekä hienokemikaalit kuten bentseeni, tolueeni, ksyleeni, fenoli, guajakoli, vanilliinihappo, vanilliini sekä useat muut orgaaniset hapot ja alkoholit.^{4,5}

Toistaiseksi prosessien kallis hinta hyötyyn nähden on esteenä sekä biopolttoaineiden että muiden hyötykemikaalien kannattavalle tuottamiselle. Lisäksi laboratorioissa testattujen prosessien skaalaus teollisuutta varten on haastavaa.^{4,5} Tässä työssä

keskitytään erityisesti kanelihappoestereihin osana soluseinärakennetta sekä niiden muokkaukseen ferulahappoesteraaseilla. Toinen painopiste työssä on ligniini, sillä sen osuus lignoselluloosasta on huomattava ja sen hyötykäyttö teollisessa mittakaavassa ei ole ollut toistaiseksi kannattavaa. Kuvassa 1 on esitettyä teollisia applikaatioita, joissa ferulahappoesteraasit ovat keskeisessä osassa, muiden kasvisoluseinää hajottavien entsyymien kanssa. Kuvasta nähdään, että jo tällä hetkellä ferulahappoesteraasit ovat teollisesti hyödyllisiä ja että niiden potentiaalia halutaan tutkia.



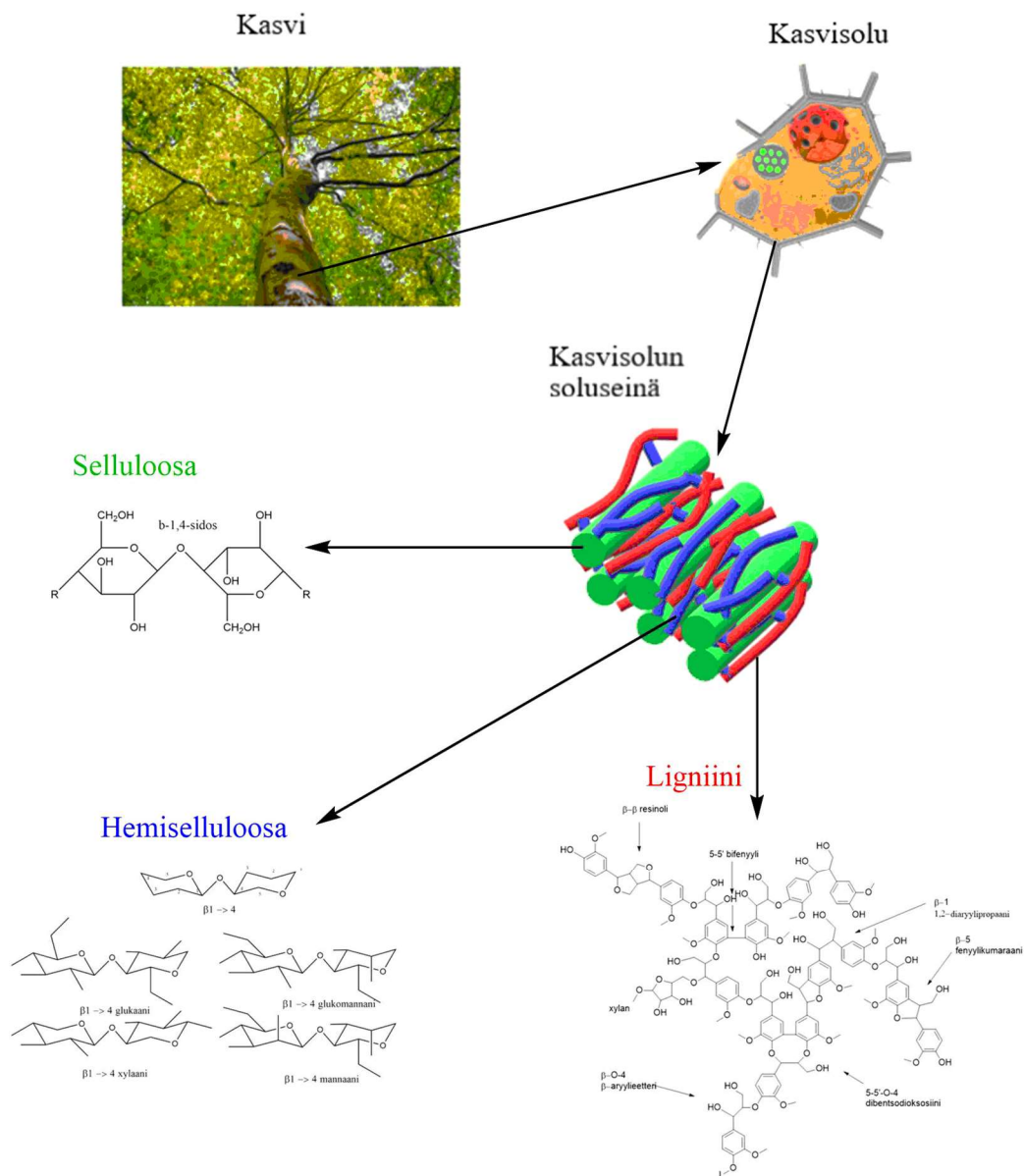
Kuva 1. Kaavio Biomassan hajottamisen teollisista applikaatioista ferulahappoesteraasilla, muokattu Dilokpimol et al. (2016).⁶

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kasvisoluseinän rakenne

Kasvisoluseinä jakautuu primääriseen sekä sekundääriseen seinään, joiden koostumus ja tehtävä eroaa solussa merkittävästi. Ulompi eli primäärinen seinä koostuu pääasiassa polysakkarideista, kuten selluloosasta, hemiselluloosasta sekä pektiinistä.⁷ Sisempi eli sekundäärinen seinä koostuu lignoselluloosasta eli selluloosan ja hemiselluloosan lisäksi, se sisältää myös kaikki osat toisiinsa niin sanotusti liimaavan ligniinin.⁷ Sekä primäärisen että sekundäärisen soluseinän rakenteiden osuudet vaihtelevat riippuen

kasvilajista, kudostyypistä sekä sen kehitysteestä.⁸ Soluseinän rakenne on yksinkertaistettuna havainnollistettu kuvassa 2. tämän tutkielman kannalta merkittävimpien kemiallisten rakenteiden kannalta.



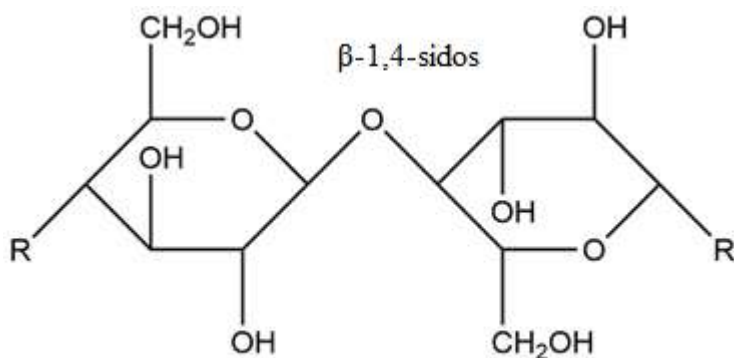
Kuva 2. Kasvisoluseinän rakenne ja merkittävimmät rakenneosat.

Lignoselluloosan rakenneosien osuudet vaihtelevat kasvilajeittain. Lehtipuissa lignoselluloosassa on 40–55% selluloosaa, 24–40% hemiselluloosaa ja 18–25% ligniiniä, kun taas havupuilla vastaavat ovat 45–50% selluloosaa, 25–35% hemiselluloosaa ja 25–35% ligniiniä sekä vehnän oljessa 30% selluloosaa, 50%

hemiselluloosaa ja 15% ligniiniä.⁹ Puhuttaessa lignoselluloosasta keskitytään usein sen pääainesosiin selluloosaan, hemiselluloosaan sekä ligniiniin, vaikka nämä eivät esiinny erillään toisistaan, vaan ovat kiinnittyneinä toisiinsa muodostaen ligniini-hiilihydraatti komplekseja (LCC).¹⁰ Erilaiset LCC rakenteet esitellään myöhemmin ligniinin yhteydessä.

2.1.2 Selluloosa

Selluloosa on kasvisolun soluseinien runsaimmin esiintyvä rakenneosana, joka muodostaa 40,6 - 51,2% soluseinien kokonaisuudesta.¹¹ Se rakentuu sadoista jopa kymmeneen tuhansiin koostuvista toisiinsa glykosidisella(β -1,4)-sidoksella liittyneistä D-Glukoosi molekyyleistä, kuten kuvasta 3 on nähtävissä. Nämä polymeeriset glukoosiketjut mikrosäikeiksi pakkautuen muodostavat selluloosan makrorakenteen.¹¹



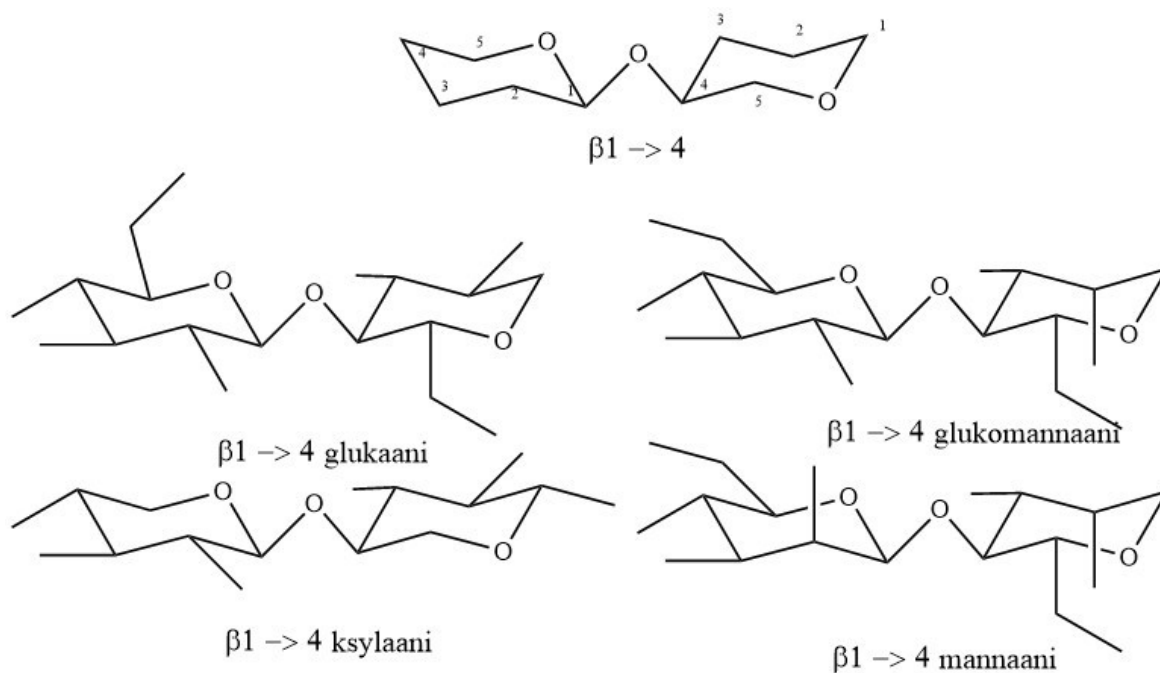
Kuva 3. Glykosidinen sidos kahden D-Glukoosin välillä.

Selluloosa esiintyy useimmin kiteisessä muodossa, mutta osa esiintyy amorfisena. Amorfisessa muodossa selluloosa on herkemmin altistunut entsymaattiselle hajotukselle.¹²

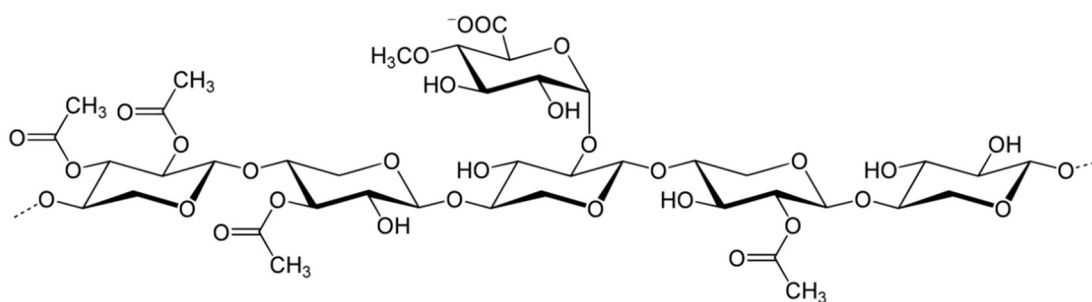
Selluloosaa on hyödynnetty kemiallisena raaka-aineena noin 150 vuoden ajan ja sen rooli raaka-aineena on vuosien varrella kasvanut merkittävästi, varsinkin kun ympäristöystävälliset biotuotteet kasvattavat merkitystään taistelussa ilmastonmuutosta vastaan.¹³ Selluloosan hyödyntämiseksi se erotellaan muusta lignoselluloosasta, jolloin sen käsittely helpottuu huomattavasti.

2.1.3 Hemiselluloosa

Hemiselluloosa on kasvisolun soluseinien toiseksi runsaimmin esiintyvä rakenneosia, muodostaen jopa 28,5-37,2% soluseinien kokonaisuudesta.¹¹ Hemiselluloosat rakentuvat pääosin ksylaaneista, galaktomannaaneista, mannaneista sekä ksyloglukaaneista. Näiden lisäksi esiintyy sokereista ja hapoista koostuvia monomeerisia tai oligomeerisia sivuketjuja. Kuten kuvasta 4 nähdään päärakenteita yhdistää ekvatoriaalinen sitoutuminen hiilien C1 ja C4 välillä.¹⁴ Hemiselluloosan makrorakenne eroaa selluloosasta ketjujen pituudella sekä haarautuvuudella. Hemiselluloosaketjut ovat usein lyhyempiä sekä haarautuvaisempia kuin selluloosassa. Kuva 5 havainnollistaa ksylaani ketjun rakennetta lehtipuussa.



Kuva 4. Hemiselluloosan rakenneosia yhdistää ekvatoriaalinen linkki C1 ja C4 välillä.¹⁴



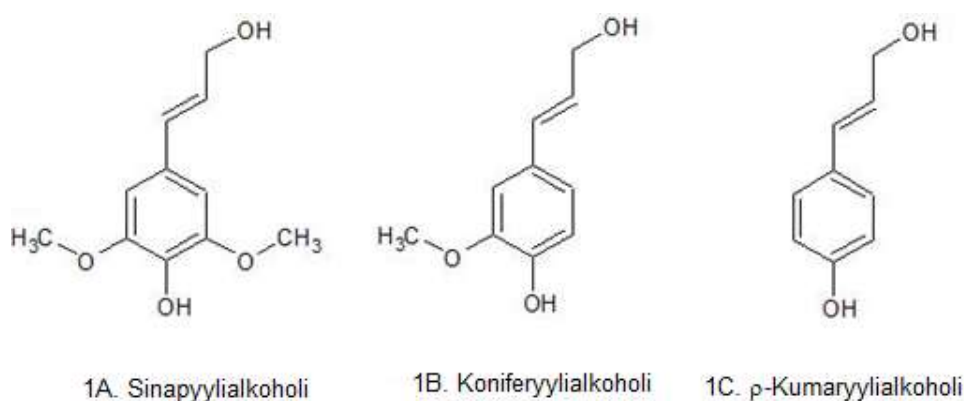
Kuva 5. Ksylaaniin rakenne lehtipuussa.

Hemiselluloosa erotellaan lignoselluloosasta ja käsitelläänkin usein yhdessä selluloosan kanssa, kun ligniini on saatu eroteltua massasta. Ksylaani on hemiselluloosan rakenteista yleisin ja tämän työn kannalta kiinnostavin, sillä sen ja ligniinin kautta hemiselluloosaketjut ja täten selluloosayksiköt ovat kytkeytyneet toisiinsa.

2.1.4 Ligniini

Ligniini on kasvisolun soluseinien kolmanneksi yleisin rakenneosa, ja runsaimmin esiintyvä luonnollinen fenolinen polymeeri. Se muodostaa soluseinien kokonaisuudesta noin 13,6-28,1%. Tämä osuus voi olla jopa kaksinkertainen siirryttäessä ruoholajikkeista havupuihin.¹¹

Ligniini toimii selluloosan ja hemiselluloosan tukirankana, joka niin sanotusti liimaa osat paikalleen kasvien soluseinissä. Se muodostaa eetteri ja esterisidoksia hemiselluloosaan, joka on linkittynyt selluloosaan.¹⁵ Rakenteeltaan ligniini on muita soluseinän rakenneosia kompleksisempi, mistä johtuen sen rakenteet eivät ole yhtä selkeitä. Ligniini on muodostunut polymeroitumalla kanelialkoholi tyypisistä monomeereista, joita kutsutaan yleisemmin nimellä monolignolit. Näistä yleisimmät sinapyylialkoholi (1A), koniferyylialkoholi (1B) ja *p*-kumaryylialkoholi (1C) ovat esitettynä kuvassa 6.

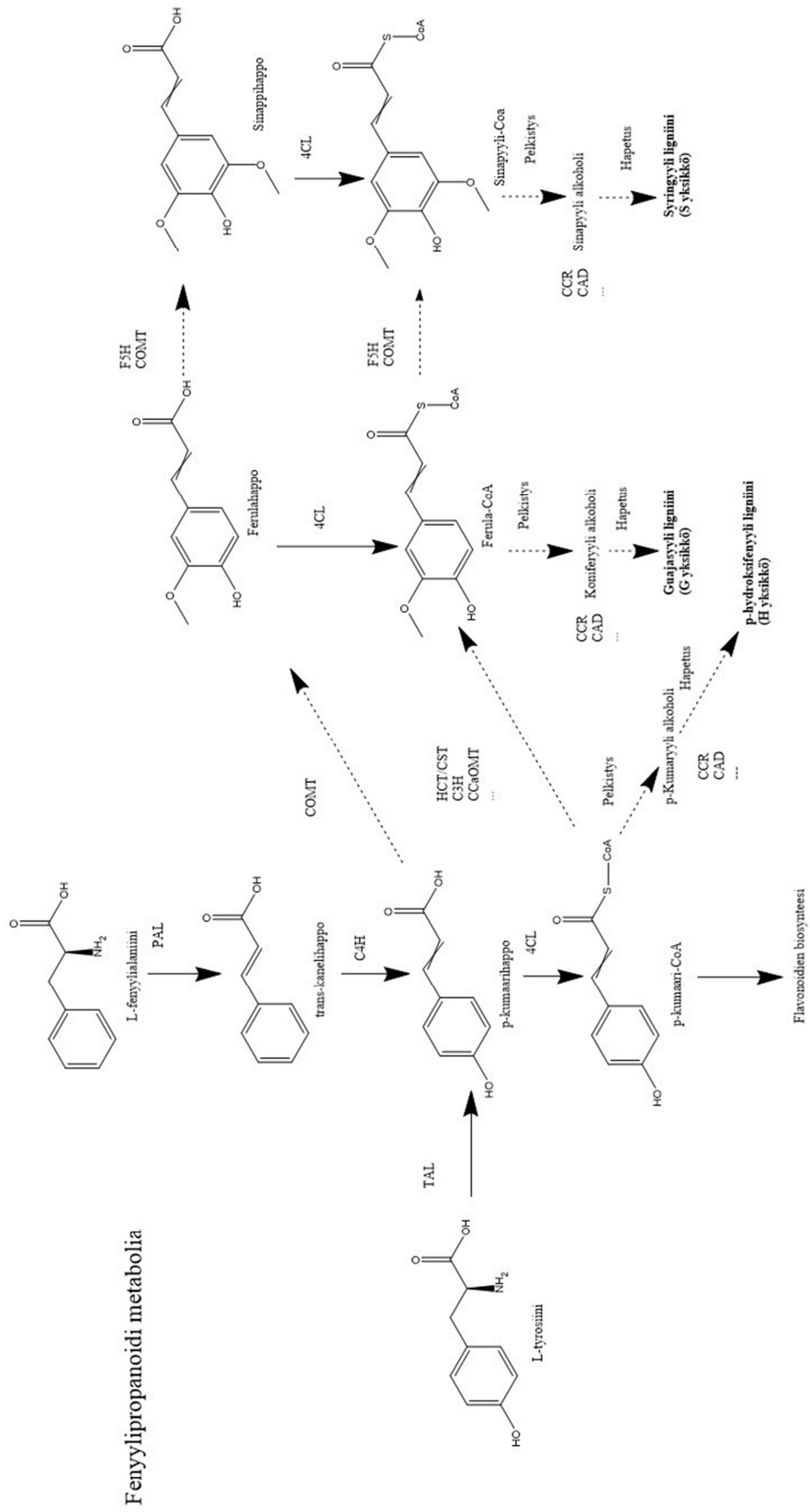


Kuva 6. Ligniinin yleisimmät monolignolit. Huom! Kuvassa *p*-kumaryylialkoholi

Näistä monolignoleista rakentuu ligniinin selkäranka. Ne polymeroituvat kiinni toisiinsa muodostaen erilaisia sidoksia ja haaroja. Tällöin on kyseessä ligniinin biosynteesi eli lignifikaatio.

Ligniinin hajottamiseksi hyödyllisiksi kemikaaleiksi on ymmärrettävä, miten ligniinin lignifikaatio tapahtuu. Ligniinin biosynteesissä monolignolien synteesi tapahtuu entsyymaattisesti ensin fenyylialaniinin muuttumisesta fenyylialaniiniammoniakkilyaasin (PAL) vaikutuksesta *trans*-kanelihapoksi, joka edelleen muuttuu *p*-kumaarihapoksi kanelihappo-4-hydroksylaasin (C4H) vaikutuksesta. *p*-kumaarihappo jatkaa *p*-kumaryyli-koentsyymi A (CoA) kun 4-kumaraatti-CoA-ligaasi (4CL) pääsee siihen vaikuttamaan. *p*-kumaarihappo taikka *p*-kumaryyli-CoA jatkaa ligniinin monomeerien synteesiin.¹⁶ *p*-Kumaarihappo muodostaa ferulahappoa kahvihappo/5-hydroksiferulahappo O-metyylitransferaasin (COMT) vaikutuksesta, ja se voi jatkaa muokkaantumista joko ferula-CoA 4CL vaikutuksesta, tai ferulaatti 5-hydroksylaasin (F5H) ja COMT vaikutuksesta sinappihapoksi. Sinappihappo muuttuu 4CL vaikutuksesta sinapyyli-CoA, kun taas *p*-kumaryylihappo voidaan jatkaa myös ferula-CoA hydroksikaneli-CoA : sikimihappo/kiniini hydroksikanelitransferaasi (HCT/CST), *p*-kumaryyli sikimihappo/kiniini 3-hydroksylaasi (C3H), kahvi-CoA O-metyylitransferaasi (CCoAOMT) vaikutuksesta.¹⁶ Monolignolit voidaan muodostaa vastaavista hapoista pelkistämällä alkoholi-muodoikseen, jotka polymerisoituvat kasvin soluseinässä ligniini yksiköikseen guajasyyli (G), syringyyli (S) sekä *p*-hydroksifenyli (H). Yllä kuvattu ligniinin biosynteesi on esitettyä kuvassa 7.¹⁷

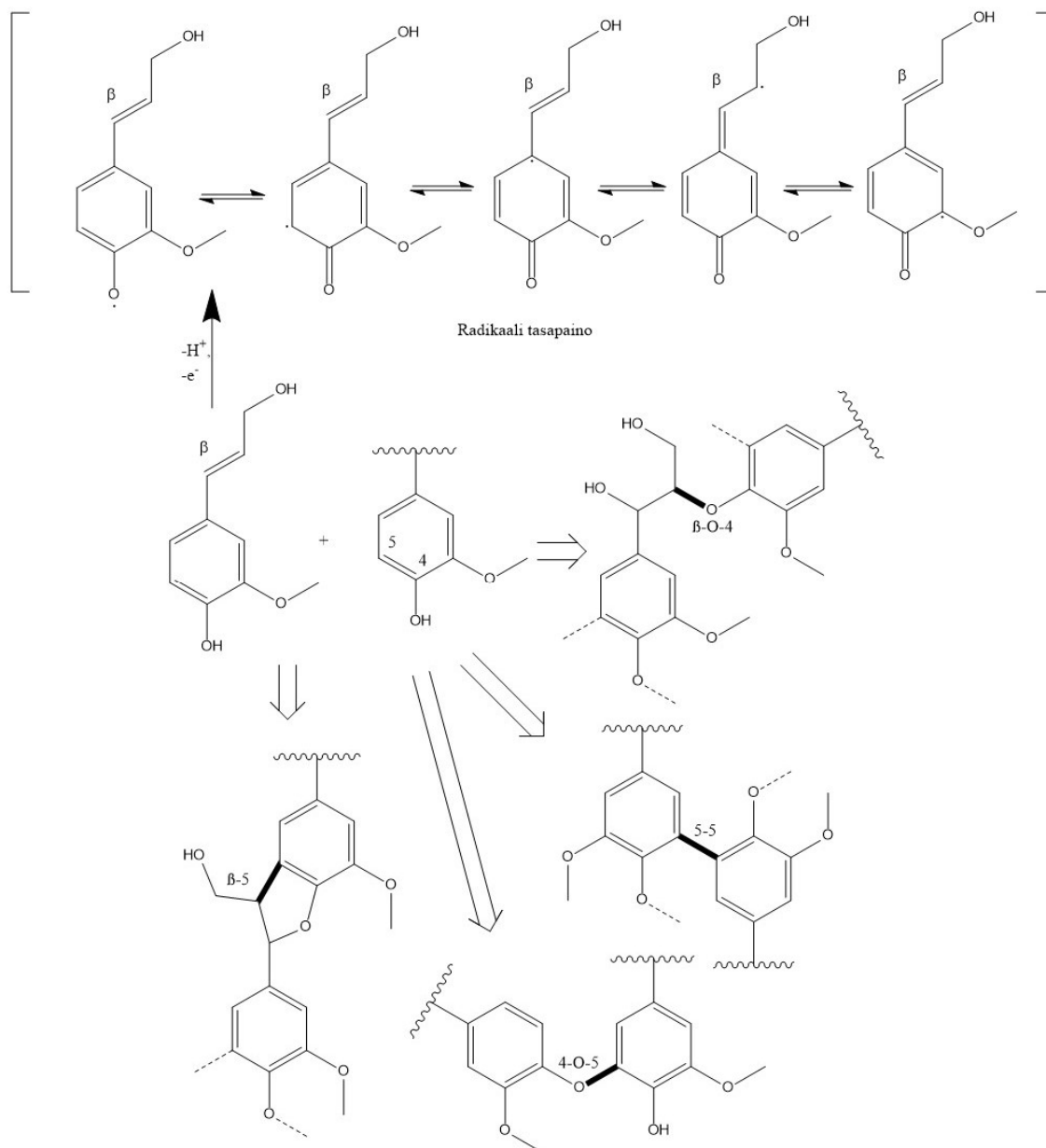
Lignini monomeerien biosynteesi



Kuva 7. Kuvaus yleisestä fenyylipropanoidi metaboliasta (kuva mukailen Emiliani et al. 2009).

Fenyylipropanoidi metabolia etenee aina L-fenyylialaniinista p-kumaryyli-CoA asti ja tästä päästään ligniinin monomeerien biosynteesiin joko ferula-CoA, sinapyyli-CoA taikka p-kumaryyli-CoA kautta. Kiinteät nuolet kuvaavat entsyymattista reaktiota ja katkoviivalliset kuvaavat useampaa peräkkäistä entsyymattista reaktiota. Entsyymit ovat lyhennetty kolmella kirjaimella: PAL, fenyylialaniiniammoniakkilyaasi; TAL, tyrosiiniammoniakkilyaasi; C4H, kanelihappo-4-hydroksylaasi; 4CL, 4-kumaraatti-CoA-ligaasi; COMT, kahvihappo/5-hydroksiferulahappo O-metyylitransferaasi; HCT/CST, hydroksikaneli-CoA : Sikimihappo/kiniini hydroksikanelitransferaasi; C3H, p-kumaryyli sikimihappo/kiniini 3-hydroksylaasi; CCoAOMT, kahvi-CoA O-metyylitransferaasi; CCR, kaneli-CoA reduktaasi; CAD, kanelialkoholi dehydrogenaasi; F5H, ferulaatti 5-hydroksylaasi.¹⁶

Nämä monoglignoli yksiköt liittyvät toisiinsa kasvin soluseinässä tapahtuvassa biosynteesissä radikaalilytkentäreaktioiden kautta, ja kyseiset reaktiot on esitetty kuvassa 8.

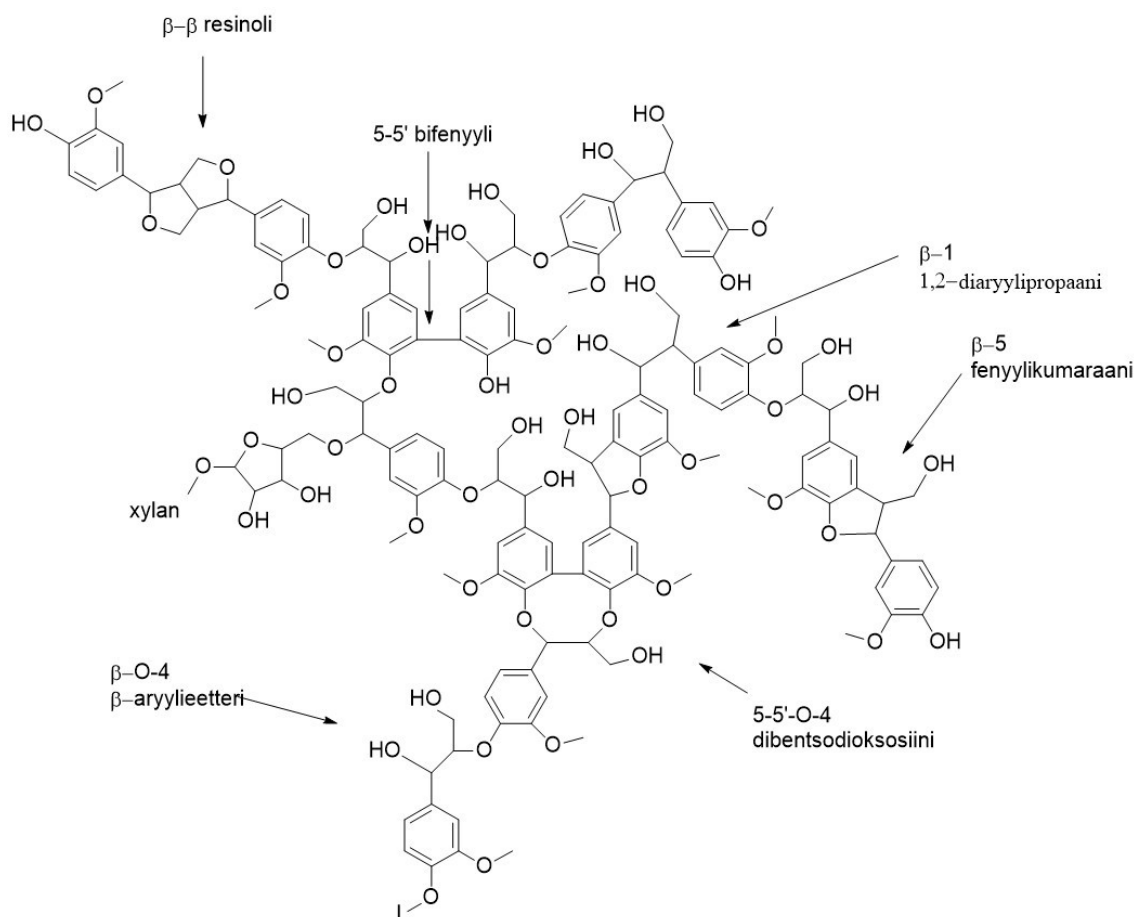


Kuva 8. Lignifikaatio sekä siinä muodostuvat sidokset.¹⁷

Monolignolien hapettavaa polymerisointia edeltää entsymaattinen dehydrogenaatio ja oksidaatio, joka muodostaa vapaan radikaalin monolignoliin. Nämä monolignoliradikaalit polymerisoituvat radikaalikytkentäreaktioilla pikkuhiljaa kasvattaen polymeerin. Kuvatun mekanismin yksityiskohdat eivät ole vielä täysin tunnettuja, mutta sen katalyytteina oletetaan toimivan mm. peroksidaasi- sekä lakkaasi-entsyymit.¹⁸ Näiden entsyymien avulla on onnistuttu hapettamaan monolignoleita *in vitro* -olosuhteissa synteettiseksi ligniiniksi (dehydrogenation polymer, DHP) sekä kasvisoluissa on pystytty polymerisoimaan ligniiniä lisäämällä vetyperoksidia.¹⁹ Peroksidaasin ja lakkaasin vaikutusta lignifikaatioon tukevat myös kokeet, joissa niiden

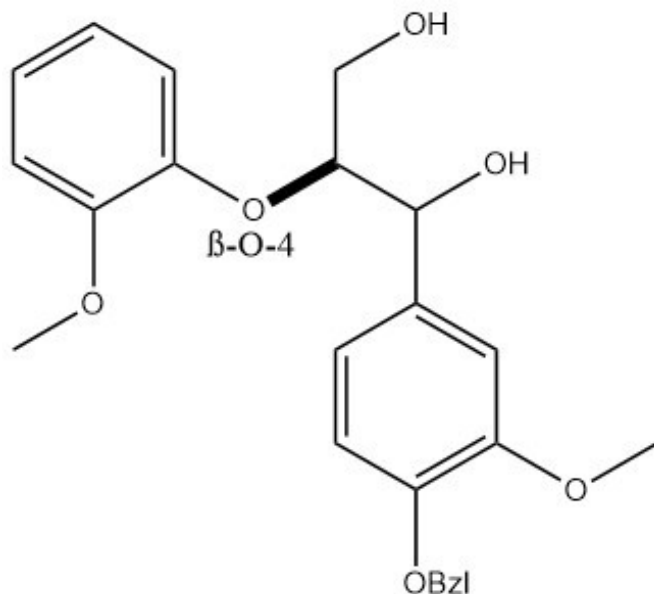
määrän vähentämisen on huomattu laskevan myös ligniinin määrää kasveissa.^{20,21} Peroksidaasin ja lakkaasin on ehdotettu vaikuttavan lignifikaatioon joko sen eri vaiheissa tai spesifisesti tiettyihin solutyyppeihin ja solukkoihin.²²

Lignifikaation lopputuloksena monolignolien muodostamista ligniiniyksiköistä sekä muista aromaattisista yhdisteistä muodostuu lopulta laaja ja haarautunut matriisi, josta voidaan nähdä satunnaisesti muodostuneita rakenteelle merkittäviä ei-toistuvia sidoksia. Tämä tekee ligniinin rakenteesta amorfisen. Kuvassa 9 esitetään ligniinin yleinen rakenne sekä sen rakenteen kannalta merkittävimpiä hiili-hiilidoksia sekä hiilen ja hapen välisiä linkkejä. Näistä yleisimmät ja siten kaikkein merkittävimmät hiili-happidokset ovat β -aryylieetteri eli β -O-4 sidos ja hiili-hiili sidoksista merkittävimmät ovat resinoli- (β - β'), fenyylikumaraani- (β -5') ja bifenyyliset (5-5') rakenteet. β -O-4 sidokset muodostavat jopa 80% ligniinin sidoksista lehtipuissa sekä ruohoissa ja noin 50% sidoksista havupuissa.²³ Ligniinin β -O-4-sidoksen yleisyys ja sen katkaisemisen helppous mahdollistavat ligniinin pilkkomisen ja hyötykäytön.



Kuva 9. Ligniinin yleiset rakenteet (alkuperäinen kuva: Jussi Sipilä).

Ligniinin ominaisuuksia ja reaktioita voidaan usein tutkia valmistamalla ligniinin malliaineita, eli pienempiä yksiköitä, jossa esiintyy esimerkiksi β -O-4 sidos, ja tutkimalla miten tämä malliaine reagoi hajotusreaktioissa esimerkiksi eri entsyymien vaikutuksesta. Kuvassa 10 on esitettyä β -O-4-aryylieetterin malliaine.

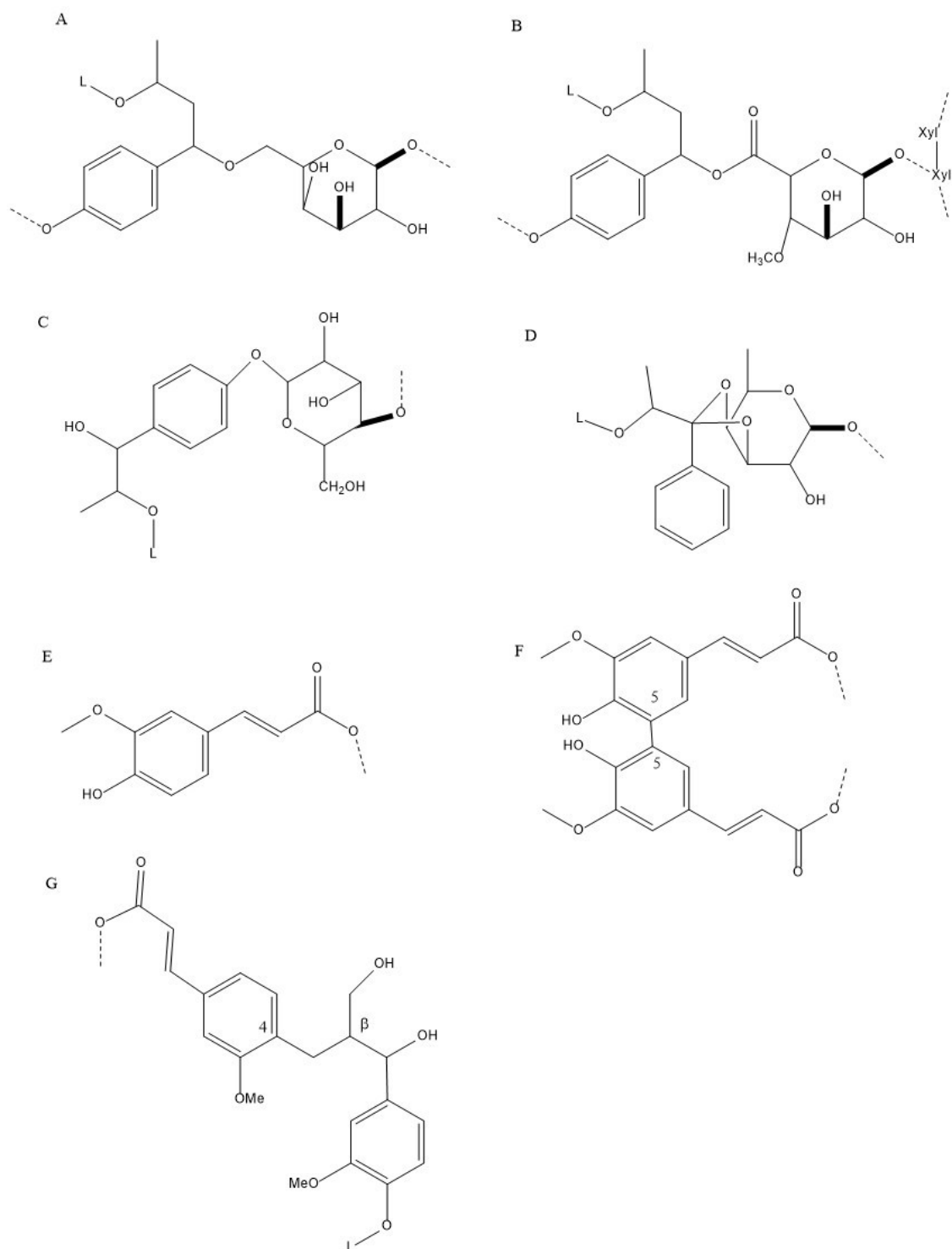


Kuva 10. Ligniinin malliaine 1-4-(bentsyylioksi)-3-metoksifenyyl)-2-(2-metoksifenoksi)propan-1,3-dioli.

2.1.5 Ligniini-hiilihydraatti kompleksit (LCC)

Erittäin mielenkiintoinen lignoselluloosan eri rakenneosia toisiinsa sitova kemiallinen linkki biomassassa ovat sidokset, jotka liittävät ligniinin ja hiilihydraatimolekyylin yhteen muodostaen ns. ligniini-hiilihydraattikompleksin (LCC). LCC:ien ominaisuuksia ei ole vielä kattavasti tutkittu eikä siten ole vielä laajaa tietoa niiden vaikutuksesta lignoselluloosaan, mutta niiden oletetaan olevan keskeisessä asemassa lignoselluloosabiomassan kestävässä ja suhteellisen tiivisti pakatussa matriisissa.¹⁰ LCC:t muodostuvat samoissa olosuhteissa, kuin ligniinin biosynteesi tapahtuu. LCC:n muodostuksessa nukleofiilien liittyessä kinonimetidiin, välituotteiden sidokset muodostuvat, *p*-kumaryylialkoholin hapettuessa.²⁴

LCC:t on jaettu eri kategorioihin riippuen siitä, miten ne reagoivat esikäsitelyssä ja mikä on niiden ligniini-hiilihydraatti (LC) -sidoksien hajottamisreaktion mekanismi. LC-sidoksia löytyy kahdeksan eri kategoriaa: Bentsyylietterit (**A**), bentsyyliesterit (**B**), fenyylglykosidi sidokset (**C**), aetaalisidokset (**D**), ferulaesterit (**E**), diferulaesteri (5'-5') (**F**), β -O-4-diferulaatti (**G**), kuvassa 11.¹⁰ Kuvassa 11 funktionaalinen ryhmä L kuvastaa ligniiniä ja katkoviivat kuvaavat hiilihydraatti ketjun alkua.



Kuva 11. LCC:n pääsidostyyppit, mukailten Zhao, Yong et al. (2020) sekä Tarasov, Dmitry et al (2018).^{10,24}

Bentsyylieetterin LC-sidokset (A) puilla ovat muodostuneet pääasiallisesti ligniinin ja hiilihydraatin välille, mutta ruohoilla sidokset muodostuvat polysakkaridien sekä ferulahappojen välille.^{10,25,26} Bentsyylieetteri-, bentsyyliesteri- sekä fenyyliglykosidi-

LS-sidokset ovat yleisimmät ligniini-hiilihydraattikomplekseissa esiintyvistä sidostyypeistä.²⁷ Sekä bentsyylietterin (A) että fenyyliglykosidin (C) LC-sidoksissa yhdistyvät hiilihydraatin glykosyyli- tai mannosyyliyksikön kautta ligniinin fenolisiin tai propyyilisivuketjujen hydroksyyliisiin ryhmiin.²⁴ Bentsyyliesterien LC-sidoksien (B) arvioidaan olevan yleisiä lehtipuissa, sillä asylaatio rajoittaa sekä bentsyylietterin LC-sidosten että fenyyliglykosidin LC-sidosten muodostumista, ja täten mahdollistaa esterisidosten osuuden kasvamisen.²⁸ Asetaali-tyyppiset (D) LC-sidokset muodostuvat ligniinin fenyylipropaaniyksikön hapettuneiden -rakenteiden karbonyyliryhmien ja hiilihydraatin hydroksyyliiryhmien välille.²⁴ Sekä ferulaatti- (E) ja diferulaattiesterit (F) muodostavat merkittävän osan ruohojen sekä muiden nurmikasvien LCC-sidoksista, ja varsinkin ferula- sekä kumaarihappojen on todettu sitoutuneen kyseisten kasvien soluseiniin isoissa määrissä.²⁴

2.2 Ligniinin reaktiot

Ligniinin pilkkomiseen ja eristämiseen käytetään useita erilaisia metodeja, joihin kuuluu muun muassa hydrolyysi, pyrolyysi ja sulfonointi. Ligniinin täytyy ensin eristää muusta biomassasta, jolloin saadaan niin kutsuttua teknistä ligniiniä. Erilaiset tekniset ligniinit on nimetty sen prosessin mukaan, jolla ne on erotettu biomassasta, näitä on esimerkiksi kraft-ligniini, hydrolyyttinen ligniini, pyrolyyttinen ligniini ja organosolv-ligniini. Eristettyjen ligniinien hajottamista voidaan jatkaa kemiallisesti ja katalyyttisesti tai kuten tässä tutkielmassa tarkemmin perehdytään, biologisella depolymerisaatiolla entsyymien vaikutuksesta.

2.2.1 Ligniinin hajoittaminen entsyymeillä

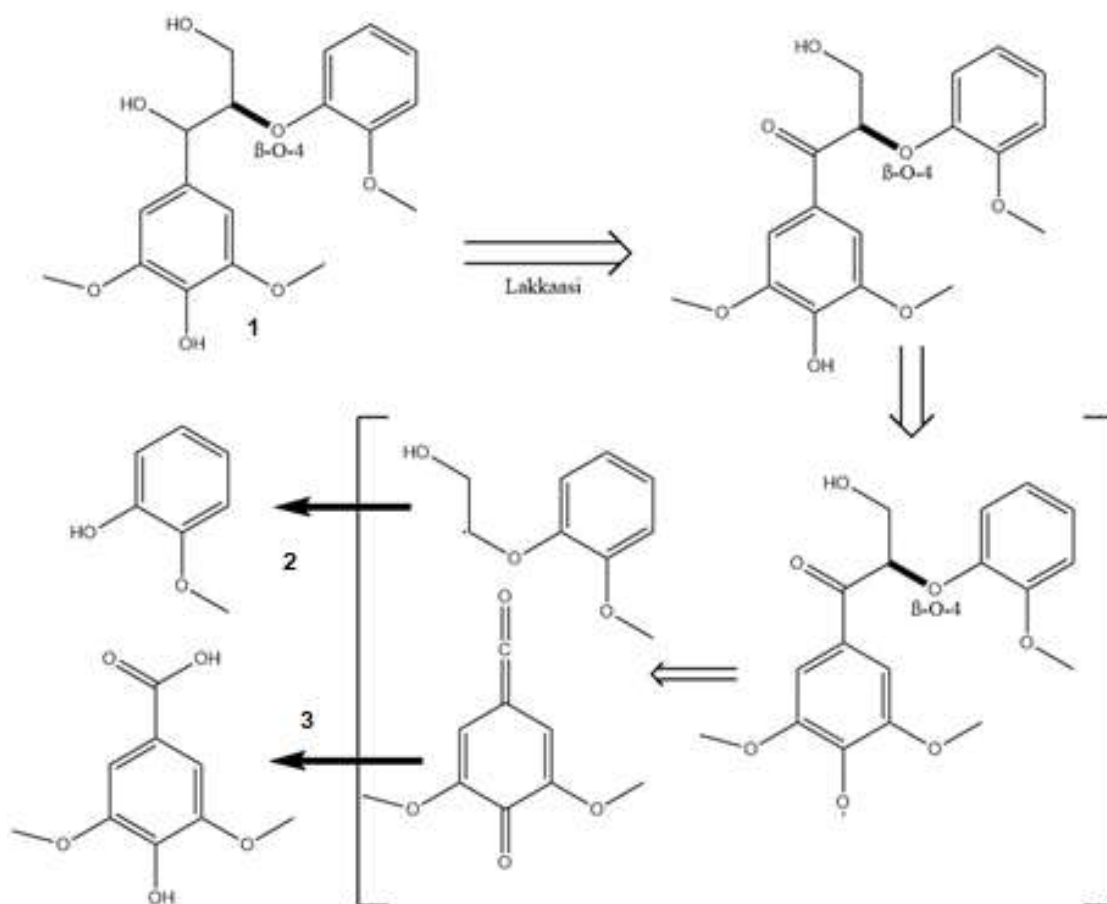
Kasvien biomassan hyödyntämiseksi on usein sen eri komponentit erotettava toisistaan ja prosessoitava erikseen, jotta kaikista osasista voidaan saada mahdollisimman suuri

osa hyötykäyttöön. Usein isoin ongelma tässä operaatiossa on kemiallisesti kestävä ja liimamainen ligniini, jonka tehtävä on suojella kasvin soluseinää mikrobien kemiallisilta hyökkäyksiltä. Perinteisessä puunjalostusteollisuudessa tämä on ratkaistu tehokkailla kemiallisilla erotusmenetelmillä kuten esimerkiksi sulfaattiprosessilla, jossa kerättyä puumassaa keitetään alkalisisessa natriumvetysulfidiliuoksessa. Kääntöpuolena tässä sulfaattiprosessissa sekä muissa rajuissa teollisissa prosesseissa on se että lopputuotteesta on hajotettu enemmän sidoksia kuin on haluttu, jolloin ligniini jää biomassasta hyödyntämättä. Vaihtoehdoksi näille teollisille prosesseille on löydetty mielenkiintoisia ligniinin hajottamisprosesseja omaavat valkolahottajasienet ja niistä löydetty erilaiset entsyymit, joiden on huomattu pystyvän muovaamaan ligniiniä sekä muita aromaattisia makromolekyylejä pienemmiksi monomeeri-, dimeeri- sekä oligomeeri-fragmenteiksi.²⁹ Entsyymiyhdistelmän ansiosta valkolahottajasienet voivat viedä tämän prosessin vielä pitemmälle ja näiden fragmenttien muokkaus voi jatkaa lahottajasienien soluissa metaboloitumalla.²⁹

Kun puhutaan näistä ligniinin rakenteen entsyymaattisesta hajottamisesta vastuussa olevista entsyymeistä, on kyseessä usein oksidoreduktaaseihin luokiteltavat joko CAZy AA1-ryhmään kuuluvat lakkaasit tai CAZy AA2 ryhmään kuuluvat luokan-II ligniiniä muokkaavat peroksidaasit, eli ligniiniperoksidaasi, mangaaaniperoksidaasi sekä versatiiliperoksidaasi. Alla käydään läpi näiden entsyymien toimintaa sekä niiden oletettuja reaktiomekanismeja ligniinin malliaineilla.

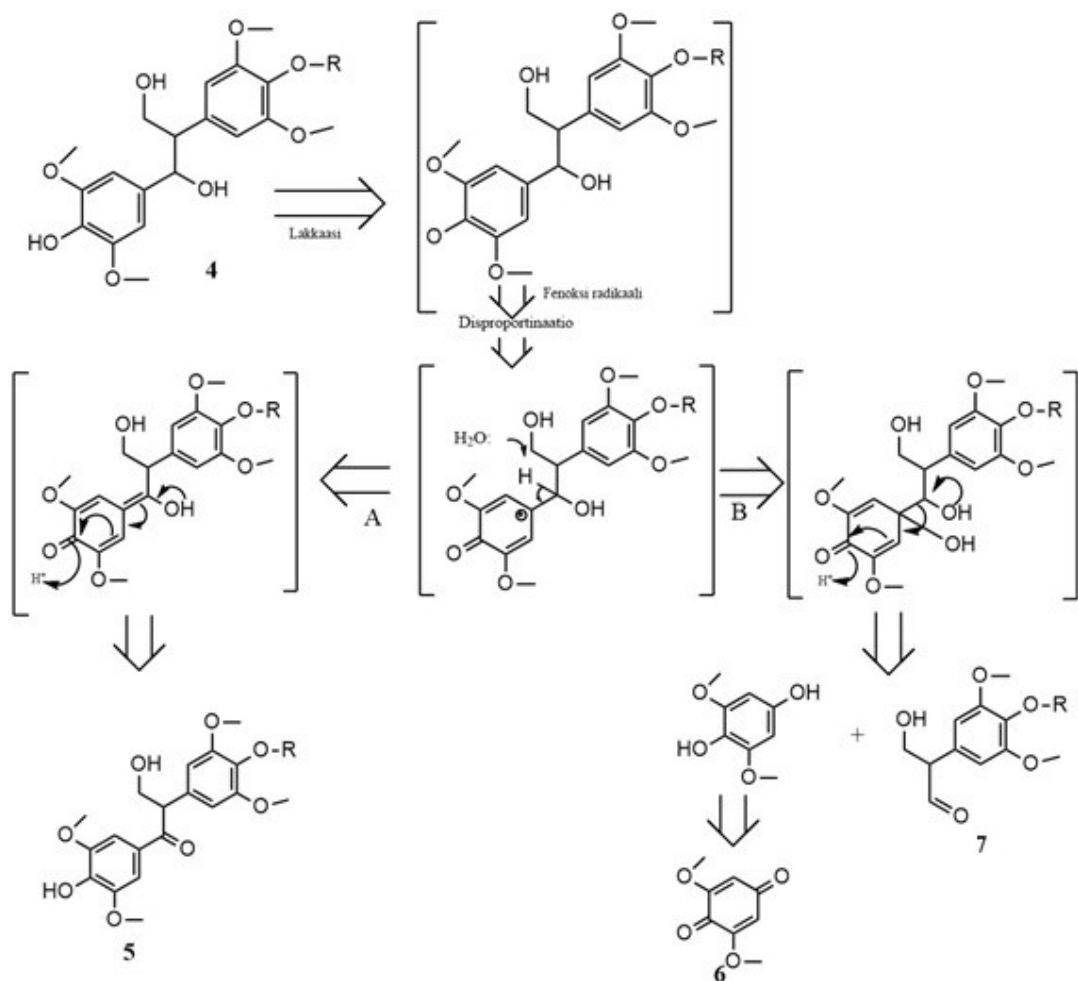
2.2.2 Lakkaasit

Lakkaasit ovat hapettavia entsyymejä, joista yleisesti puhutaan oksidoreduktaaseina, mutta tarkemmin luokiteltuna kuuluvat CAZy AA1-ryhmään (Carbohydrate-active enzymes, auxiliary family 1) (EC 1.10.3.2). Lakkaasit reagoivat fenolisten ja fenolisia piirteitä omaavien ryhmien kanssa, katalysoiden hapen pelkistymisen vedeksi, fenolin toimiessa **vedyn** lähteenä.³⁰ Ligniiniä muokatessaan lakkaasin on havaittu hapettavan ligniinin fenolisia rakenteita fenoksidiradikaaleiksi.³¹ Lakkaasin katalysoimaa ligniinin hajoamisreaktiota on tutkittu ligniinin β -O-4- sekä β -1 malliaineilla, joiden avulla on tehty hypoteesi reaktion mekanistisesta reitistä. Kuvassa 18 on esitettyinä syringyyli glyseroli- β -guajasylyieetterin (**1**) hajoamisreaktio lakkaasin avulla.³² Kuvassa lähtöaineen **1** β -O-4-sidos katkaistaan lakkaasilla bentsyyliisessä hapetusreaktiossa, tuottaen lopputuotteina metoksifenolia (**2**) ja syringyylihappoa (**3**).



Kuva 18. Ligniinin malliaineen hajotus lakkaasin katalysoimana.³²

Lakkaasin käyttö yksinään fenolisten yhdisteiden hapettamiseen ei ole kovin tehokasta ja radikaali-mediaattorin lisääminen on todettu tehostavan erityisesti fenolisten yhdisteiden sekä β -O-4-sidoksen hapettumista huomattavasti.³³ Kuvassa 19 on esitettyä lakkaasin katalysoimana β -1-sidoksen katkaisu.

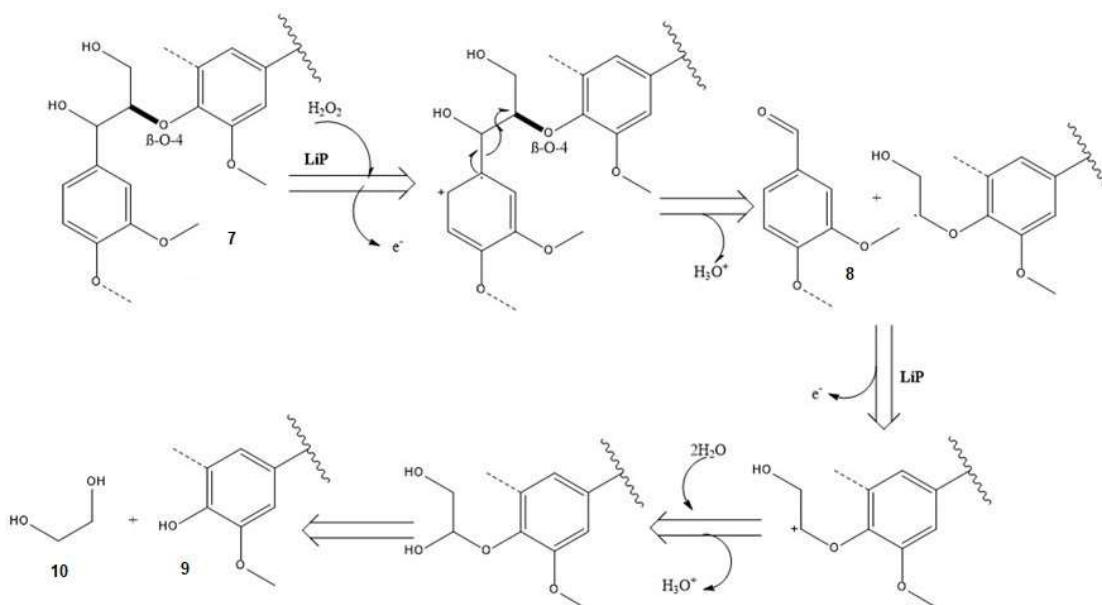


Kuva 19. β -1-malliaineen reaktio lakkaasin katalysoimana.³²

Kuvassa 19 fenolinen β -1-malliaine 4 hapettuu lakkaasin katalysoimana kahta eri reaktiotietä A ja B. Reitissä A lähtöaine 4 hapettuu vastaavaksi ketoniksi 5. Ligniinin ja ligniinin malliaineen hajottamisen kannalta reitti B on mielenkiintoisempi, sillä siinä saadaan kahta hyödyllistä lopputuotetta 2,6-dimetoksikinonia 6 ja fenyyliaetaldehydia 7.

2.2.3 Ligniiniperoksidaasit

CAZy AA2 luokkaan II kuuluvat ligniiniperoksidaasit (LiP) (EC 1.11.1.14), kuten nimestä voi päätellä, ovat entsyymejä, jotka ovat erikoistuneet hajottamaan ligniinin sidoksia hapettavalla reaktiolla. Reaktion on todettu tapahtuvan LiP:n hemin porfyriinin välityksellä vetyperoksidin vaikutuksesta, niin että vetyperoksidi toimii reaktiossa elektroni-akseptorina, jolloin saadaan aikaan malliaineen hapettava reaktio.^{34,35} Kompleksisten makromolekyylien kuten ligniinin kanssa LiP käyttää lisäksi katalyyttisesti aktiivista tryptofaania, toimimaan elektronin siirtäjänä hapetettavasta molekyylistä LiP:n hemiin.³⁶ LiP:n toimintaa ligniinin rakenteen hajottamisessa on tutkittu malliaineilla kuten esimerkiksi β -O-4 sidoksen omaavilla molekyyileillä. Hammel et al. (1985) tutki dimeerisen β -O-4-malliaineen hajottamista LiP:lla, jonka reaktiosta saatiin lopputuotteena bentsaldehydiä, propyylifenolia, fenyyliglyserolia sekä katekolia.³⁷ Fenyyliglyseroli muodostuu β -O-4 sidoksen läpikäydessä hydrolyysin.³⁸ Katekoli muodostetaan β -O-4 dimeerin demetoksyylaatiolla.³⁹ Hapettava β -O-4 sidoksen hajoamisreaktio tapahtuu pääasiassa propyylisivuketjun α -C β välillä tuottaen bentsaldehydiä (**8**), metoksifenolia (**9**) ja etaani-1,2-diolia (**10**). Tämä on kuvattu kuvassa 20.

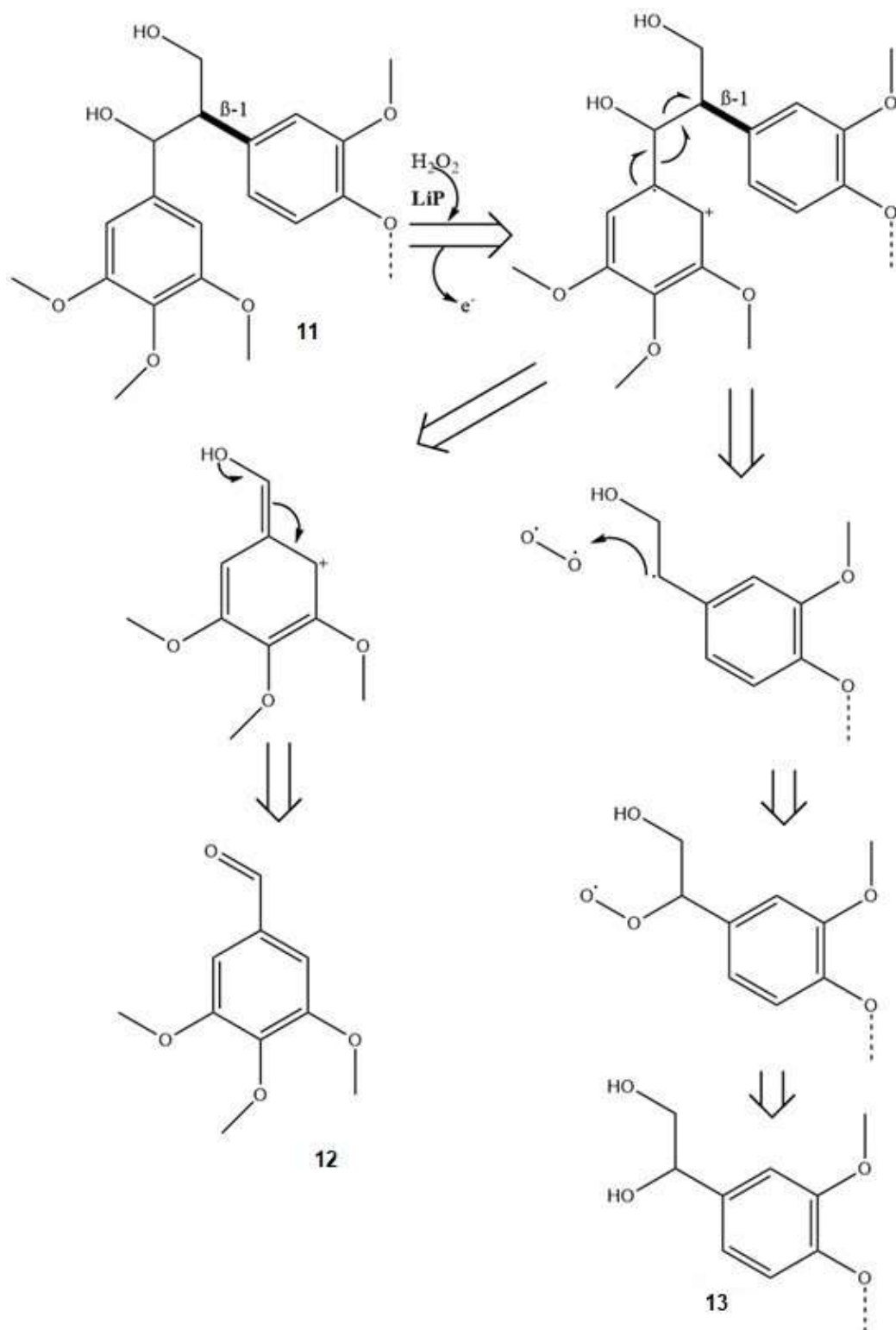


Kuva 20. Ei-fenolisen β -O-4-malliaineen (**7**) α -C β -sidoksen katkaisu LiP:n avulla.³⁷

Kuvassa 20 esitetty reaktiomekanismi vastaa mekanismia, joka on esitetty aiemmin diaryylipropanien hapettamiselle LiP:n avulla.^{40,41}

LiP katkaisee vastaavasti myös ei-fenolisia β -1-sidoksia vastaavanlaisesti kuin β -O-4 tapauksessa, esitettynä kuvassa 21. β -1-sidoksen katkaisu tapahtuu huomattavasti harvemmin kuin β -O-4 sidoksen, sillä sen esiintyvyys ligniinissä on huomattavasti vähäisempää runsaasti esiintyvään β -O-4 sidokseen verrattuna. LiP:n käyttö isommissa, vähintään 20 yksikön, ligniinin malliaineissa, vaatii veratryylialkoholin läsnäoloa, jotta hapettava hajottaminen onnistuu tehokkaasti. Veratryylialkoholin rooli toimii reaktiossa todennäköisimmin mediaattorina.⁴²

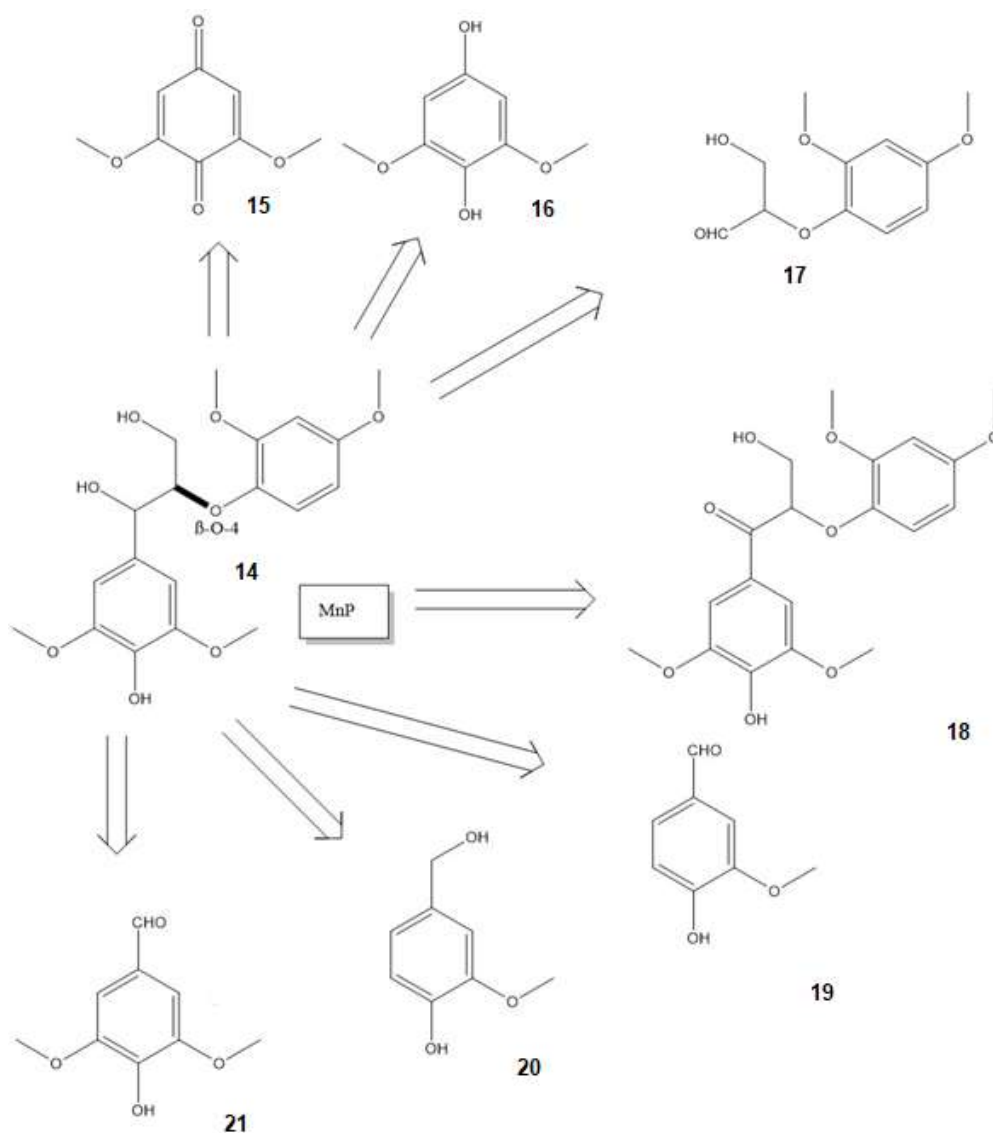
Kuvan 21 β -1 malliaine (**11**) hapetetaan LiP:n ja vetyperoksidin happiradikaalin avulla. Hapettavasta hajoamisreaktiosta saadaan 3,4,5-trimetoksibentsaldehydiä (**12**) sekä dimetoksifenyylietaani-1,2-diolia (**13**).



Kuva 21. Ei-fenolisen β -1 malliaineen $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ halkaisu LiP:n avulla.³²

2.2.4 Mangaaniperoksidaasit

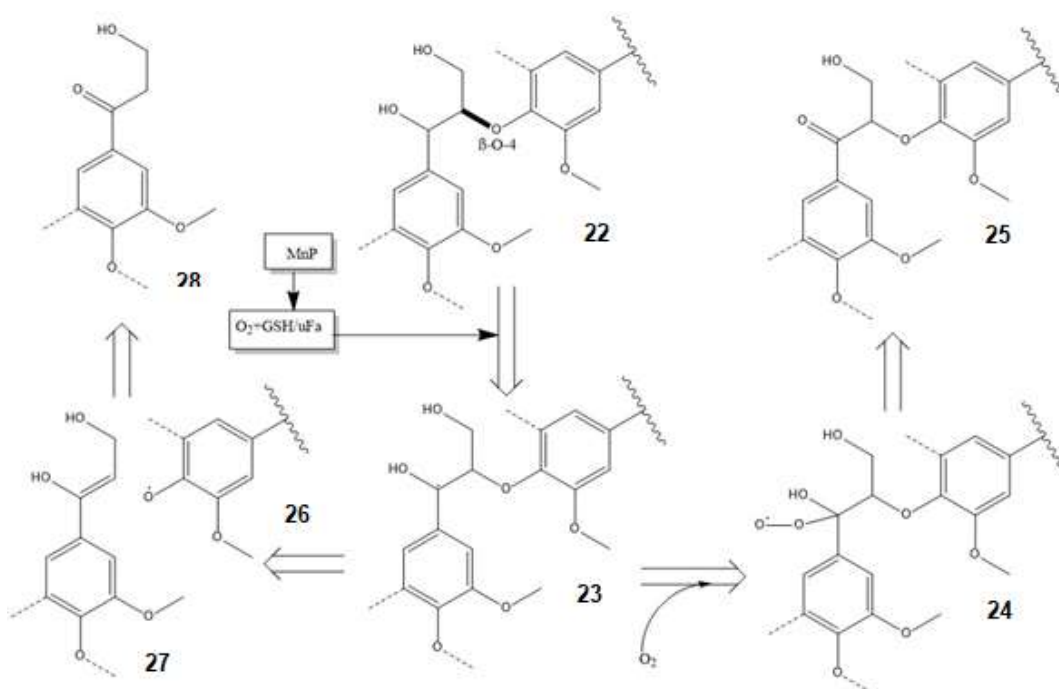
Mangaaniperoksidaasit (MnP) kuuluvat LiP:n tavoin CAZy AA2 II luokkaan (EC 1.11.1.13), ja kuten LiP:n tapauksessa se kykenee hapettamalla katalysoimaan ligniinin hajottamista. Mangaaniperoksidaasin mekanismi on samankaltainen LiP:n kanssa ja MnP sisältää aktiivisen hemin, joka on keskeinen osa katalyyysiä. Reaktiossa mangaani(II) hapettuu mangaani(III), vetyperoksidin toimiessa elektronin vastaanottajana.^{42,43} Mangaani(III) ollessa erittäin reaktiivinen mangaanin muoto, hapetusasteen stabiloimiseksi lahottajasisienissä muodostuu orgaanisia happoja kuten oksalaattia ja malonaattia. Nämä hapot stabiloivat mangaani(III) muodostaen sen kanssa stabiilin kelaatin, joka mahdollistaa mangaani(III)-ionien läpäistä selluloosan huokokset ja vaikuttaa suoraan ligniinin fenolisiin rakenteisiin.⁴⁴ Kuvassa 22 on esitettyä fenolisen β -O-4 malliaineen (**14**) hapettamisesta MnP:lla.



Kuva 22. Fenolisen ligniinin lopputuotteita, MnP:n katalysoiman hapettavan hajoamisen seuraksena.⁴⁵

Kuvassa 22 esitetyt lopputuotteet ovat 2,6-dimetoksi-1,4-bentsokinoni (**15**), 2,6-dimetoksi-1,4-dihydroksibentseeni (**16**), 2-[4-(hydroksimetyyli)-2metoksifenoksi]-3hydroksipropanaali (**17**), β-O-4 malliaineen vastaava ketomuoto (**18**), 3-metoksi-4-hydroksi-bentsaldehydi (vanilliini) (**19**), 3-metoksi-4-hydroksibentsyyli alkoholi (vanillyylialkoholi) (**20**) ja 3,5-dimetoksi-4-hydroksibentsaldehydi (syringaldehydi) (**21**).⁴⁵ Fenolisten rakenteiden ollessa ligniinissä harvinaisempia on hyvä huomioida miten MnP saadaan reagoimaan ei-fenolisten rakenteiden kanssa. MnP saa hajotettua

ei-fenolisia rakenteita yhdessä glutationin (GSH) sekä tyydyttämättömien rasvahappojen (uFA = unsaturated fatty acids) yhdistelmänä. Hypoteettinen mekanismi tälle reaktiolle on esitettyä kuvassa 23. Kuvassa lähtöaineena on ei-fenolinen malliaine (22), joka reagoi MnP:n, GSH:n, uFA:n sekä hapen vaikutuksesta ei-fenolisen malliaineen bentsyyliiradikaaliksi (23). Bentsyyliiradikaali hapettuu edelleen joko peroksyiradikaaliksi (24) ja tästä malliaineen vastaavaksi ketomuodoksi (25) tai hajoaa fenoksyiradikaaliksi (26) sekä hydroksipropanoni-johdannaiseksi (27), joka jatkaa edelleen omaan ketomuotoonsa (28).^{46,47}



Kuva 23. Ei-fenolisen β -O-4 ligniinin malliaineen hajotus MnP:n avulla.⁴⁵

2.2.5 Versatiiliperoksidaasit

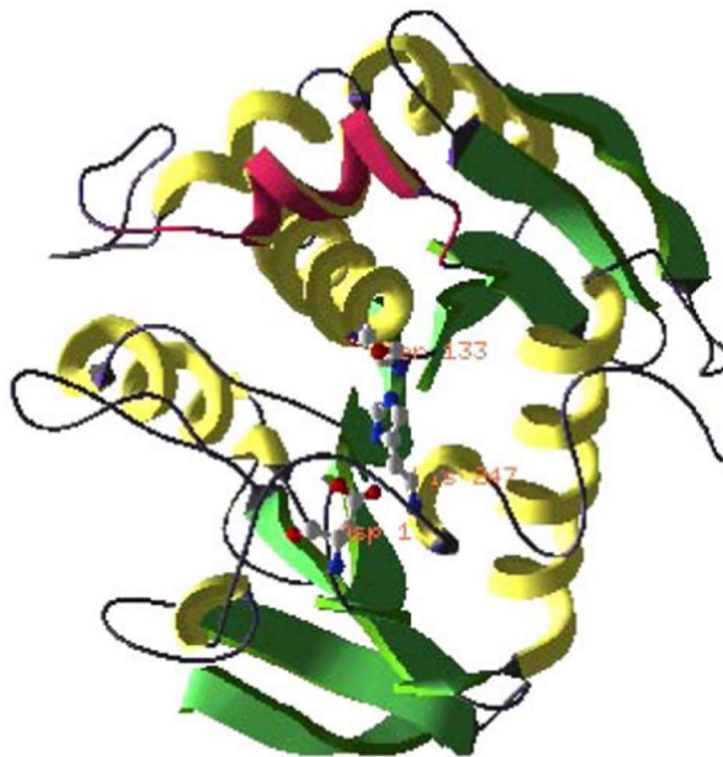
Versatiiliperoksidaasit (VP) (EC 1.11.1.16.) ovat luokan II ligniiniä muokkaavia peroksidaaseja kuten MnP ja LiP. Kuten entsyymien nimi antaa ymmärtää on VP monipuolinen siinä suhteessa, että sen toiminta yhdistää sekä LiP:n että MnP:n ominaisuuksia.^{48,49} Peroksidaasien ominaisuuksien yhdistäminen mahdollistaa entsyymien hajottaa kattavamman määrän substraatteja. VP pystyy siirtämään ei-fenoliselta aromaattiselta yhdisteeltä elektronin VP:lle, mikä mahdollistaa kyseisen

yhdisteen hapettumisen, tämä mekanismi vastaa LiP toimintaa.⁴⁹ MnP:n toimintaa vastaavasti VP pystyy myös hapettamaan Mn(II)-ionin Mn(III)-ioniksi.⁴⁹ VP:n toimintaa ja hapetusmekanismia ohjaa vahvasti olosuhteiden happamuus. VP toimii noin pH:ssa 5 tai sen yläpuolella, lähellä neutraalia olevissa olosuhteissa, samalla tavoin kuin MnP hapettaen mangaania.⁴⁹ LiP:a vastaavaa toimintaa VP:lla tapahtuu pH 5 alapuolella.⁴⁹ VP:n etu sen monipuolisuuden lisäksi on sen tehokkuus fenolisten yhdisteiden hapettamisessa, mikä on LiP:n sekä MnP:n avulla huomattavasti tehottomampaa ja MnP:n tapauksessa vaatii Mn(II)-ionien läsnäolon.⁴⁹ VP:n reaktiomekanismin LiP tyyppisten reaktioiden kanssa uskotaan toimivan kuten kuvassa 20 esitetty reaktiosarja, ja toimiessaan MnP:n tyyppisesti otaksutaan reaktion etenevän kuvan 22 reaktiosarjan mukaisesti.

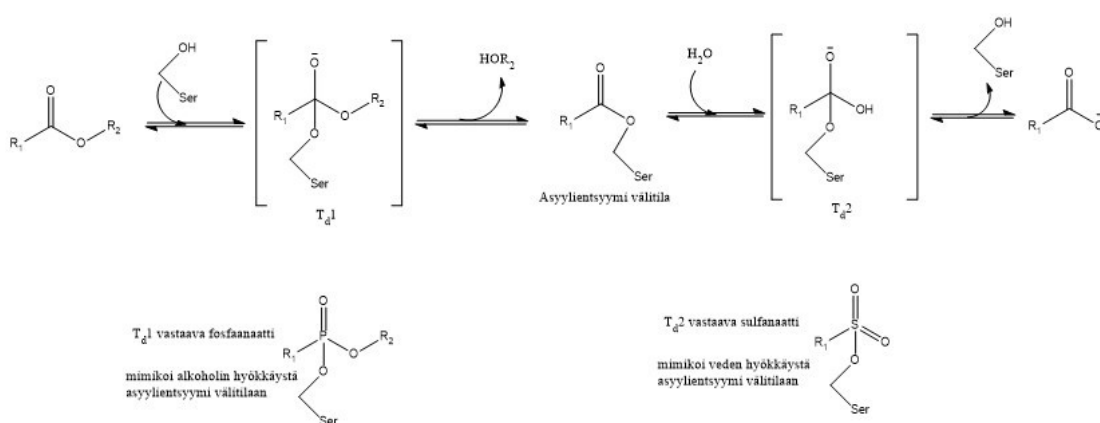
2.3 Esteraasit

Esteraasit ovat laaja joukko entsyymejä, jotka ovat erikoistuneet esterisidosten katkaisemiseen sekä niiden muodostamiseen biokatalyyttisesti. Esteraasit kuuluvat vielä laajempaan entsyymiluokkaan nimeltä hydrolaasit (EC 3.1.1.1), joka jaetaan usein esteraaseihin ja lipaaseihin. Tässä työssä käytetystä ferulahappoesteraasista *Aspergillus Niger* AnFAE A on kuvassa 14, josta voidaan nähdä entsyymin aktiivinen keskus. Lipaasit ovat erikoistuneet hydrolysoimaan veteen liukenemattomia estereitä, kun taas esteraasit katalysoivat vesiliukoisten esterien hydrolyysiä. Hydrolyysi on reaktio, jossa vesimolekyylin avulla katkaistaan molekyylissä sidos, joka on usein esterisidos. Esterisidoksen hydrolyysi on tavallisesti happo- tai emäskatalysoitu reaktio, mutta esteraasien katalysoiman esterisidoksen hajoamisen mekanismista ei olla päästy vielä varmuuteen vaan siitä löytyy useampia teorioita. Yksi vaihtoehto mekanismille on esitetty Jiang et al. (2011) tekemässä tutkimuksessa, jossa vertailtiin röntgenkuvia esteraasien ja lipaasien aktiivisista keskuksista katalyysin aikana. Tutkimuksessa havaittiin, että substraatin karbonyyli-happi osoittaa esteraasin/lipaasin aktiivisen keskuksen. Hydrolyysireaktio tehtiin *Pseudomonas fluorescens* esteraasilla, jossa on sulfonaattiryhmä aktiivisessa keskuksessa, ja kuvattiin röntgenillä.⁵⁰ Tutkimuksessa huomattiin että transitiotilan nukleofiilisesä hyökkäyksessä sulfonaattiryhmän happimolekyylillä ”mallintaa” veden hyökkäystä asyylientsyymi-välitilaan, eli tapahtuu silloitus karbonyyli-hapen sekä sulfonaattiryhmän hapen välille.⁵⁰ Mahdollinen rooli

silloittavalle vesimolekyylille on sijoittaa ja aktivoida hyökkäävä vesimolekyyli hydrolysaaseissa.⁵⁰ Kuvassa 15, on esitettyä miten hydrolyysin ja asyyliisiirron välillä reaktio riippuu siitä toimiiko vesi vai alkoholi nukleofiilinä, tässä nähdään miten sulfonaattiryhmän happi toimii hyökkävänä vetenä ja saadaan aikaan hydrolyysi.

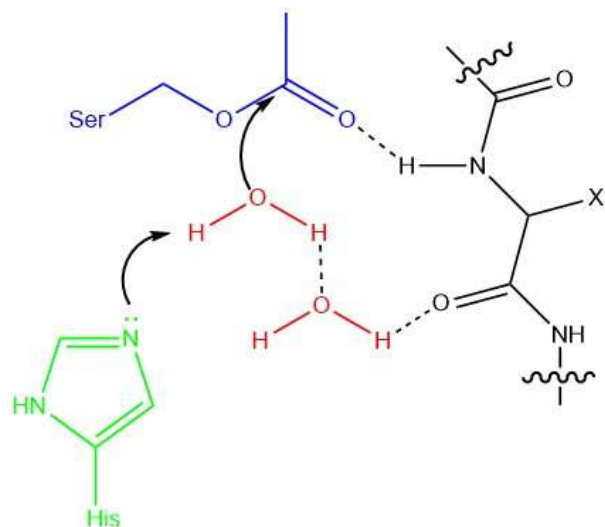


Kuva 14. 3D kuva *Aspergillus Niger* AnFAE A esteraasin aktiivisesta keskuksesta.⁵¹

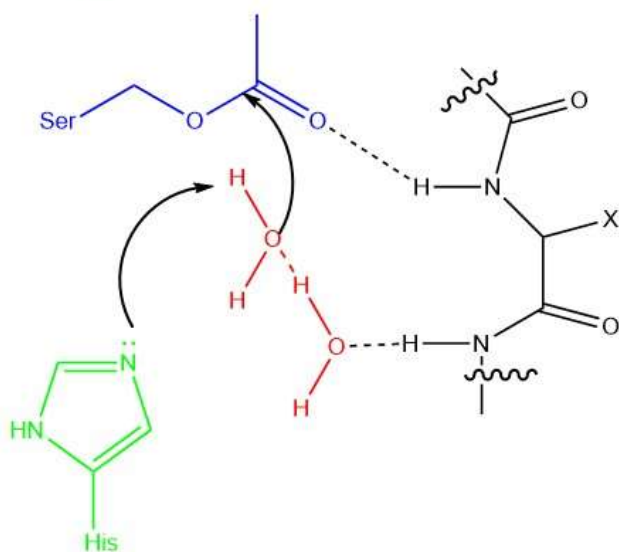


Kuva 15. Esterin hydrolyysi-mekanismi, kun katalyyttinä on käytetty seriiniesteraasia.⁵⁰

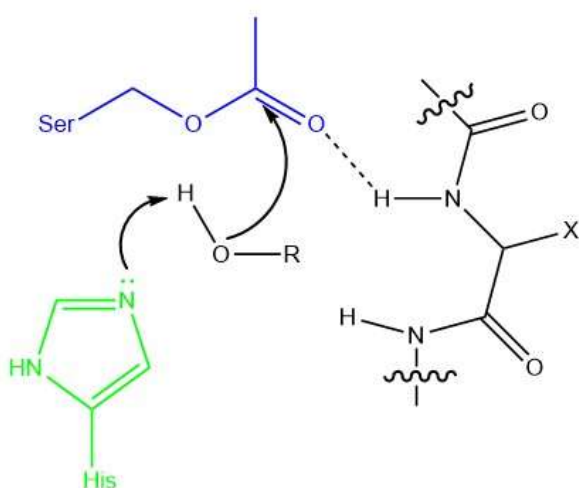
Ensimmäinen tetrahedrinen välitila (Td1) muodostuu kun seriini hyökkää esteriin. Seriiniin liitetty fosfanaatti mallintaa Td1-tilaa. Alkoholin HOR2 irtoaminen Td1-tilasta antaa asyylientsyymi-välitilan, joka muuntautuu Td2-välitilaksi veden hyökkäyksen seurauksena. Seriiniin liitetty sulfonaatti mallintaa Td2-välitilaa, jossa yksi sulfonaatin happi mallintaa Td2-tilaan hyökkäävää vettä. Seriinin irtoaminen Td2-tilasta luo lopullisen karboksyylihappotuotteen.⁵⁰ Tutkimuksen perusteella tehtiin lopulliset hypoteesit siitä kuinka oksianionin ”silmukka” joko aktivoi tai deaktivoi hyökkäävän veden toisesta vesimolekyylistä, kuva 16. Esteraaseilla, pääketjun karbonyylin happi toimii emäksenä aktivoiden hyökkäävän vesimolekyylin.



A) Vesi-vesi interaktio suosii hydrolyysiä



B) Vesi-vesi happointeraktio ei suosii hydrolyysiä



C) veden siirtymä suosii alkoholyysiä

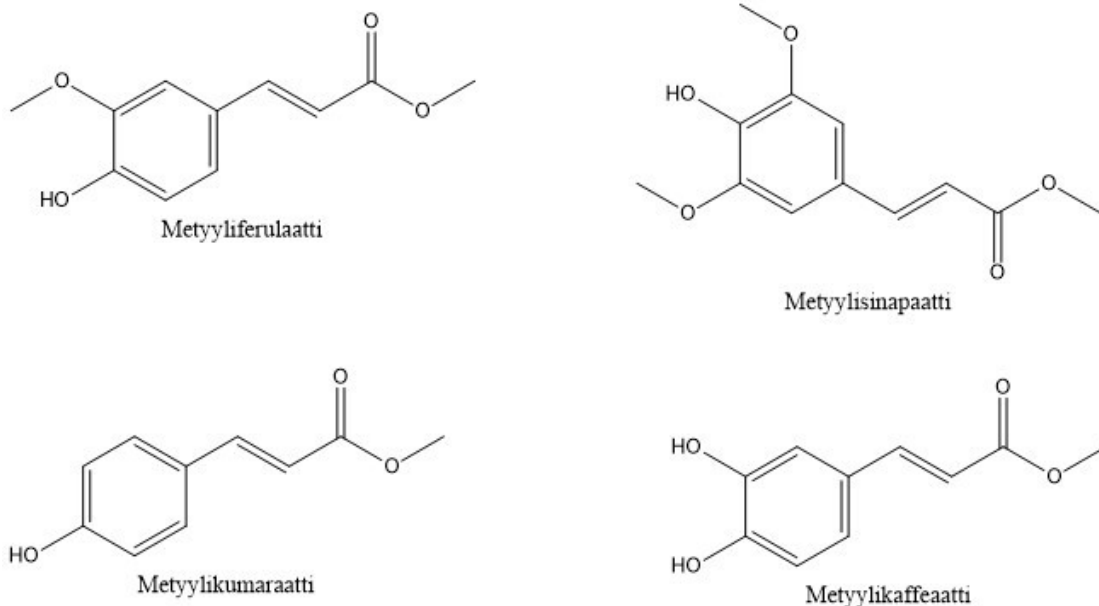
Kuva 16. Hypoteesi miten eri konformaatiot oksianionisilmukassa vaikuttavat esteraaseissa ja asyylitransferaaseissa Jiang et al. (2011) mukaan.⁵⁰

2.3.2 Ferulahappoesteraasi

Ferulahappoesteraasi (E.C. 3.1.1.73) kuuluu karboksyylihappoesteraaseihin (E.C. 3.1.1) ja on erikoistunut fenolisen kanelihapon ja polysakkaridin välisen esterisidoksen hajottamiseen, vapauttaen kanelihappoja.⁵² Koska lignoselluloosan kompleksiset rakenteet hankaloittavat sen hajottamista hyötytuotteiksi, sekä sen eri osien erilainen vastustuskyky hydrolyysille, on tutkittu tehokkaita biologisia esikäsittelymekanismeja lignoselluloosan liuottamiseksi ja hajottamiseksi.⁵¹ Yksi vaihtoehto tätä varten on sienien tuottamia entsyymejä hyödyntävä esikäsittely. Lignoselluloosan rakenteiden hajottaminen vaatii useiden entsyymien yhteistyötä, jotta kaikki osat saadaan eroteltua toisistaan ja vielä hajotettua hyödyllisiksi tuotteiksi. Hemiselluloosan hajottaminen vaatii entsyymejä ainakin kahden eri kategorian entsyymeistä: Endoksylanaasi ja β -ksylosidaasi, joiden tehtävänä on katkaista ksylaanin pääketju.⁵³ Lisäksi eri rakenteita toisiinsa yhdistävien sivuketjujen katkaisemiseksi tarvitaan apuentyymejä, kuten ferulahappoesteraasia.⁵⁴ Muiden apuentyymien lisäksi ferulahappoesteraasilla on tärkeä rooli hemiselluloosan säikeiden hydrolyysissä, katkaisten ferulahapposivuketjuja ja silloituksia eri rakenteiden välillä.⁵¹ Näiden tehtävien lisäksi ferulahappoesteraasit ovat erittäin potentiaalinen biokatalyytti useille hyödyllisille tuotteille lääke-, kosmetiikka-, sekä ruokateollisuudessa.⁶

Perinteisesti ferulahappoesteraasit oli jaettu A- ja B-tyyppiin riippuen niiden spesifisyydestä tiettyihin aromaattisiin molekyyliihin, sekä niiden erilaisesta kyvystä vapauttaa diferulahappoja esteröidyistä molekyyleistä.⁵⁵ Luokittelu on kuitenkin ajan myötä päivittynyt ensin ABCD-luokitteluun, joka perustuu niiden aktiivisuuteen kanelihapposubstraateilla. A-luokka on aktiivinen metyyliferulaatilla, metyyli *p*-kumaraatilla sekä metyyliisinaapaatilla, ja tunnettu esimerkki tästä luokasta on *Aspurgellus Niger* FAE A (*AnFAE* A).⁵¹ Luokka B on aktiivinen substraateilla: metyyliferulaatti, metyyli *p*-kumaraatti sekä metyylikaffeatti, mutta se ei käytä metyyliisinaapaattia kuten A-luokan esteraasit. Tunnettu B-luokan ferulahappoesteraasi on *Penicillium funiculosum* FAE-B.⁵¹ C- ja D-luokan esteraasit kykenevät hydrolysoimaan kaikkia 4 erilaista kanelihappoa, jotka ovat esitettyinä kuvassa 17.

Yleinen luokan C esteraasi on *Aspergillus Niger* FAE B (*AnFAE* B) ja D-luokan tyyppinen esteraasi on *Piromyces equi* EstA.⁵¹



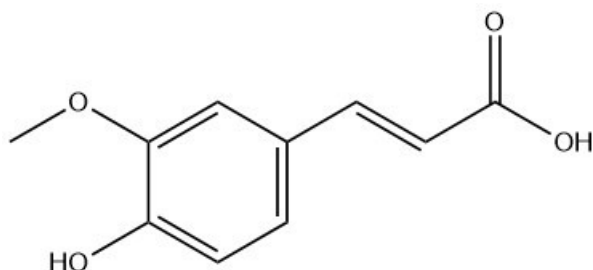
Kuva 17. Kanelihappoesterit, joiden avulla todetaan esteraasien substraattispesifisyyteen perustuva ABCD-luokittelu.

Tämä luokittelu ei kuitenkaan kuvaa täydellisesti ferulahappoesteraasien laajaa määrää ja ominaisuuksien kirjoa, tästä syystä on fylogeneettisen analyysin avulla tutkittu ja löydetty lukemattomia uusia ferulahappoesteraaseja ja uusia luokkia. ABCD-luokittelu kertoo kuitenkin kemiallisesta näkökulmasta tarpeeksi ferulahappoesteraasien substraattispesifisyydestä.

2.4 Ferulahappo

Ferulahappo esiintyy kasvisoluseinien lignoselluloosisissa rakenteissa kiinnittyneinä ligniiniin, proteiineihin tai muihin ferulahappoihin joko kovalenttisin esterisidoksin taikka eetterisidoksin, ja tämä kiinnittyminen tapahtuu ferulahapon hapettuessa.²⁴ Ferulahappojen karboksyylihapporyhmän avulla ferulahapot voivat muodostaa myös esterisidoksen polysakkaridien kanssa.²⁴ Ferulaatti, joka on muodostanut polysakkaridien kanssa sidoksen, voi hapettamalla reagoida edelleen vielä ligniinin kanssa muodostaen ligniini-ferulaatti-polysakkaridikompleksin (LFP).⁵⁶ Ferulahapon on myös havaittu esiintyvän dimeerisenä sekä trimeerisenä hapettavan kytkennän kautta

esteröityneissä taikka eetteröityneissä ferulahappojäännöksissä.⁵⁷ Kun kasvisoluseinän mikrobista ja entsyymaattista hajottamista on kasvatettu, on huomattu että vapaan ferulahapon osuus hajotetusta soluseinästä on lisääntynyt.⁵⁸ Vapaan ferulahapon rakenne on esitettyä kuvassa 12.

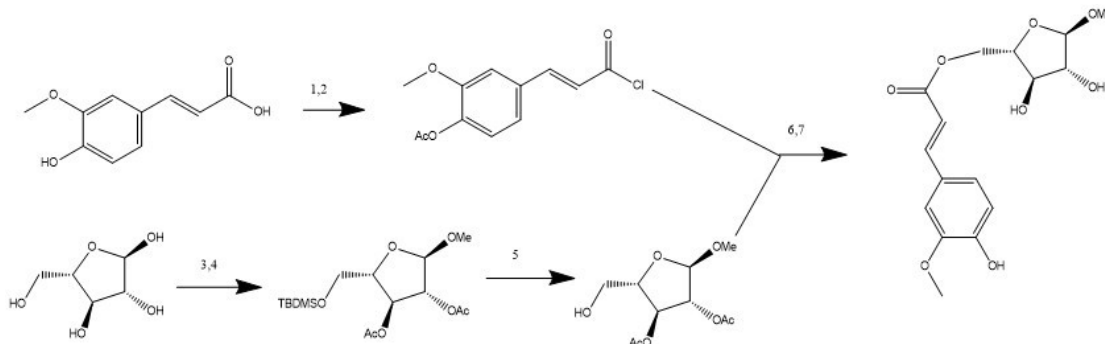


Kuva 12. Ferulahapon rakenne.

Ferulahappoa esiintyy runsaasti kasvien, lukuunottamatta puita, soluseinän lignoselluloosamateriaalissa ja se on ligniinissä monen aromaattisen lopputuotteen prekursori. Ferulahappoa hyödynnetään myös itsessään antioksidanttina.

2.5 Ferulaesterit ja niiden malliaineet

Ferulahapon käyttäytymistä lignoselluloosaan sitoutuneena voidaan mallintaa syntetisoimalla tutkittavaa sidosta jäljittelevä malliaine. Näin voidaan tutkia ferulahapon ja lignoselluloosan ainesosien välisiä vuorovaikutuksia ja saada parannettua yleistä ymmärrystä soluseinän hajottamisesta.⁵⁹ Ferulahappo sitoutuu lignoselluloosan eri osiin esterisidoksella, jolloin voidaan puhua ferulaesteristä. Ferulaesterit voivat osallistua epäsuorasti ligniinin silloittamiseen, kaappaamalla ligniinin kinonimetriidi välituotteita, tai suoraan osallistumalla ligniinin vapaa-radikaali polymeroitumisprosessiin.⁵⁹ Ferulaesterit ja lignifikaatioprosessi ovat keskeisessä osassa kasvin soluseinän rakennetta. Ferulahappoesteri malliaine voidaan muodostaa liittämällä ferulahappo hiilihydraattimolekyylisiin, jolloin saadaan niin kutsuttu 'sokeriaddukti'. Tämän sokeriadduktin avulla voidaan tutkia sekä ferulaestereihin liittyvää regiokemiaa että lignoselluloosassa esiintyvien ferulaesterien hajottamista entsyymaattisesti. Ferulaesterin malliaineen eli 'sokeriadduktin' syntetisoimisesta voidaan nähdä esimerkki kuvassa 13.⁵⁹



Kuva 13. Sokeriaddukti Metyyli 5-0-(E)- feruloyyli- α -D-arabinofuranoosin 7-vaiheinen synteesi mukailten Ralph, J. et al (1992).⁵⁹

Metyyli 5-0-(E)- feruloyyli- α -D-arabinofuranoosin synteesiä varten tarvitaan ferulahappo, jonka fenolinen hydroksyyliiryhmä suojataan ensin vaiheessa 1 asetyyliiryhmällä, jonka jälkeen voidaan muodostaa kohdassa 2 happokloridi tionyylikloridin avulla. Mikäli halutaan varmistaa, että kaikki ferulahappo sitoutuu arabinofuranoosiin samasta kohtaa, täytyy sokerin muut hydroksyyliiryhmät suojata. Vaiheessa 3 suojataan ensin primäärinen hydroksyyliiryhmä johon ferulahappo halutaan liittää sellaisella suojaryhmällä, jonka voi poistaa jättäen muut suojaryhmät paikoilleen, kuten esimerkiksi tässä on käytetty silyylieetteriä. Vaiheessa 4 on suojattu loput hydroksyyliiryhmät asetyylillä. Vaiheessa 5 poistetaan silyylieetteri ja päästään lopulliseen Metyyli 5-0-(E)- feruloyyli- α -D-arabinofuranoosin synteesiin vaiheessa 6, missä pyridiinin avulla liitetään ferulahappo sokeriin. Viimeisessä vaiheessa poistetaan asetyylisuojarahyhmät ja saadaan lopullinen ferulahapon malliaine eli Metyyli 5-0-(E)-feruloyyli- α -D-arabinofuranoosi. Tässä tutkielmassa käydään läpi ferulahappoesterin synteesi ja muodostuvan esterisidoksen hajoaminen esteraasien vaikutuksesta.

3. Kokeellinen osuus

Tutkimustyön tarkoituksena oli syntetisoida metyyli α -D-glukopyranosidin ja ferulahapon esterijohdannainen eli metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeerinen seos, jossa keskeisenä sidoksena esiintyy esterisidos metyyli α -D-glukopyranosidin 2-, 3-, 4- tai 6-asemaan. Lopuksi tämän tuoteseoksen esterisidoksen katkaisua tutkittiin neljällä eri esteraasilla. Tutkimus toimii hyvänä esimerkkinä siitä, miten entsyymien avulla voidaan hajottaa myös lignoselluloosassakin runsaasti esiintyviä esterisidoksia ja täten kehittää lignoselluloosan kokonaisvaltaista entsyymaattista hajottamista tulevaisuuden prosesseja varten.

Tutkimuksen koejärjestely on jaettu kahteen vaiheeseen. Aluksi syntetisoitiin isomeerinen metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi seos nelivaiheisella synteesillä. Tuoteseos puhdistettiin kromatografisesti ja karakterisoitiin myöhempiä esteraasihydrolyysejä varten. Toisessa vaiheessa valmistettiin reaktiosarjat *AnFAE*-esteraasien aktiivisuuksien määrittämiseksi. Reaktioista otettiin näytteitä usealla aikavälillä ja reaktioiden edistymistä seurattiin kvantitatiivisesti HPLC-laitteistolla. Samalla saatiin tietoa eri esteraasien substraattispesifisyyksistä. Käytetyt esteraasit olivat peräisin Helsingin yliopiston Mikrobiologian osaston Fungal Genetics and Biotechnology-ryhmältä. Mainitut vaiheet ovat kuvattu seuraavassa kappaleessa Menetelmät ja laitteistot.

3.1 Menetelmät ja laitteistot

Synteesien etenemistä seurattiin jokaisessa vaiheessa TLC ohutkerroskromatografialla, käyttäen TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ohutlevyjä. Synteesin välituotteet puhdistettiin uudelleenkiteyttämällä ja lopputuote pylväskromatografisesti, ensin manuaalisesti ja lopuksi vielä preparatiivisella suorafaasikromatografialla käyttäen automaattista CombiFlash EZ Prep Teledyne ISCO kromatografialaitteistoa, johon oli liitetty valmiiksi pakattu silikakolonni.

Kaikki välituotteet sekä lopputuote, lukuunottamatta ensimmäistä asetyloitua ferulahappoa, tunnistettiin mittaamalla niistä ^1H -, ja ^{13}C -NMR-spektrit käyttäen Varian Mercury Plus 300 MHz ja Varian Inova Unity 500 MHz ydinmagneettiresonanssispektrometrejä. Näytteet oli liuotettu deuteroituun asetoniin ja mittausten lämpötila oli 27 celsiusta.

Esterisidosten katkaisun edistymistä seurattiin Agilent 1260 Infinity HPLC-nestekromatografialaitteistolla. Ennen näytevialeihin siirtämistä, näytteet suodatettiin 45 μm GHP-membraani HPLC-suodattimien läpi. Näytteet injektioitiin 5 μl tilavuuksissa. Näytteiden erotus HPLC-laitteistossa tehtiin kahdella eri kolonnilla Kinetex 2.6u C18 100A (50 x 2.1 mm) (Phenomenex) ja InfinityLab Poroshell 120 SB-AQ (100 x 3 mm) (Agilent) (näyte- ja kolonnikohtaisuus kerrotaan alla esitetyissä tuloksissa). Substraatit eluointiin käyttäen isokraattista metodia, jossa ajoliuoksena oli 80:20 0,1% TFA ja ACN ja synteetit eluointiin käyttäen isokraattista metodia, jossa ajoliuoksena oli 90:10 0,1% TFA ja ACN.

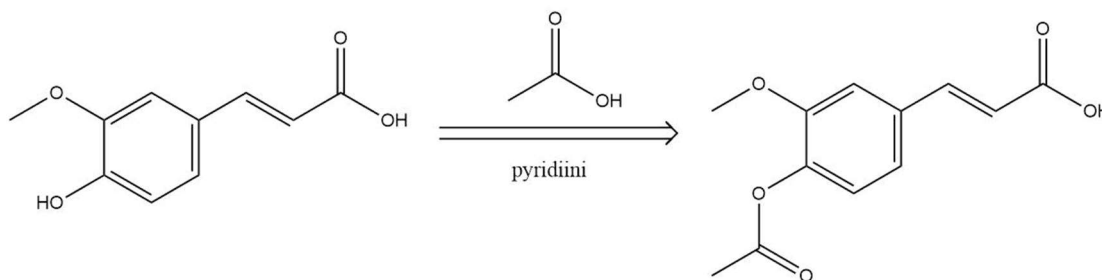
3.2 LCC-Malliaineen synteesit

Metyyli- α -D-glukopyranosidin ja ferulahapon liittäminen tehtiin ilman sokerin suojausta. Ensin ferulahapon vapaa hydroksidiryhmä suojattiin asetyyliryhmällä, jonka jälkeen karboksyylihappo reagoi tionyylikloridin kanssa muodostaen ferulahappokloridin. Ferulahappokloridi reagoi sitten metyyli- α -D-glukopyranosidin kanssa muodostaen isomeerisen metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi-seoksen, jossa ferulahappo on sitoutunut joko sokerin 2-, 3-, 4-, tai 6-asemaan.

3.2.2 Ferulahapon asetylointi

Ferulahappo asetyloitiin sekoittamalla huoneenlämmössä yön yli, minkä jälkeen reaktioseos kaadettiin jääveten. Jäävedessä reaktioseosta sekoitettiin noin puolen tunnin ajan, jolloin tuote saostui. Saostuma suodatettiin sekä pestiin kylmällä vedellä. Tämän jälkeen tuotteen annettiin kuivua vetokaapissa. Taulukossa 1. on esitetty ensimmäisen vaiheen eli ferulahapon asetyloinnin lähtöaineet

sekä lopullisen tuotteen 4-O-asetyyliferulahapon määrä. Reaktioyhtälö on esitetty kuvassa 24.



Kuva 24. Ferulahapon suojaaminen asetyyliryhmällä.

Taulukko 1. Ferulahapon asetylointi

Lähtöaine	MW(g/mol)	m(g)	n(mol)	V(ml) d(g/ml)
Ferulahappo	194,19	5,0	0,026	-
Pyridiini	79,10	9,8	0,12	10 (0,98)
Etikkahappo	60,05	10,5	0,17	10 (1,05)
Tuote	MW(g/mol)	m(g) / Saanto (%)	n(mol)	teor.m. (g)
4-O-asetyyliferulahappo	236,22	5,7 / (93 %)	0,024	6,14

Ferulahapon asetyloinnista ei mitattu NMR-spektrejä, sillä pelkän TLC:n seuraamisella voitiin olla varmoja reaktion onnistumisesta.

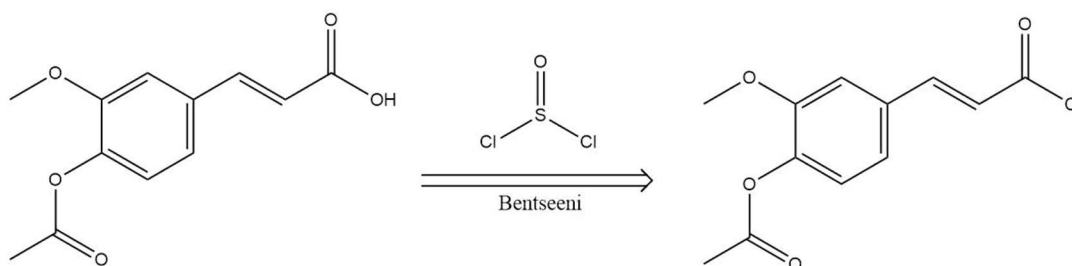
3.2.3 4-O-Asetyyli ferulahappokloridin synteesi

Edellä saatua 4-O-asetyyliferulahappoa refluksoitettiin öljyhauteella noin 88–100 °C tionyylikloridin kanssa, kunnes kaasun muodostus on loppunut, jolloin saatiin muodostettua 4-O-asetyyliferulakloridi. Reaktioyhtälö on esitetty kuvassa 25. Bentseeni haihdutettiin alipaineessa ja tuote liuotettiin lämpimään tolueeniin, joka myös haihdutettiin. Tämän jälkeen tuote uudellenkiteytettiin tolueenista. Tämän reaktion lähtöaineet ja tuotteet on esitetty taulukossa 2. Reaktion etenemisen tehostamiseksi tionyylikloridia lisättiin noin 3-kertainen ainemäärä asetyloituun ferulahappoon nähden.

Reaktion onnistuminen varmistettiin sekä ^1H -, että ^{13}C -NMR spektroskopiolla ja tuotteen spektrit on esitetty liitteissä 1 ja 2.

^1H -NMR (300 MHz, d_6 -asetoni): δ 2.28 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 6.93 (d, 1H), 7.20 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.94 (d, 1H)

^{13}C -NMR (500 MHz, d_6 -asetoni): δ 19.8, 55.9, 112.8, 122.3, 123.3, 123.8, 150.9, 152.3, 165.5, 168.0



Kuva 25. Ferulahappokloridin synteesi.

Taulukko 2. Ferulahappokloridin synteesi

Lähtöaine	MW(g/mol)	m(g)	n(mol)	V(ml) d(g/ml)
4-O-asetyyliferulahappo	236,22	2,0	0,0085	-
Tionyylikloridi	118,96	3,0	0,025	1,8 / (1,64)
Bentseeni	78,11	26,4	0,34	30 / (0,88)
Tuote	MW(g/mol)	m(g) / Saanto (%)	n(mol)	teor.m. (g)
4-O-asetyyliferulahappokloridi	254,67	1,6 / (74 %)	0,0071	2,16

3.2.4 4-O-Asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin synteesi

Asetyyli-ryhmällä suojattu ferulahappokloridi lisättiin seuraavassa reaktiossa metyyli- α -D-glukopyranosidiin, jota oli reaktiossa 3-kertainen määrä ferulahappokloridiin verrattuna. Tällä varmistettiin, että kaikki ferulahappokloridi reagoi, sekä pienennettiin

mahdollisuutta sille, että yhteen sokeriin liittyisi useampi ferulahapporyhmä. Kuvassa 26 on esitetty neljä vaihtoehtoista rakennetta, muodostuvalle isomeeriselle metyyli-4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidiseokselle, jossa ferulahappo on sitoutunut joko sokerin 2-, 3-, 4-, tai 6-asemaan. Reaktion ainemäärät on esitetty taulukossa 3.

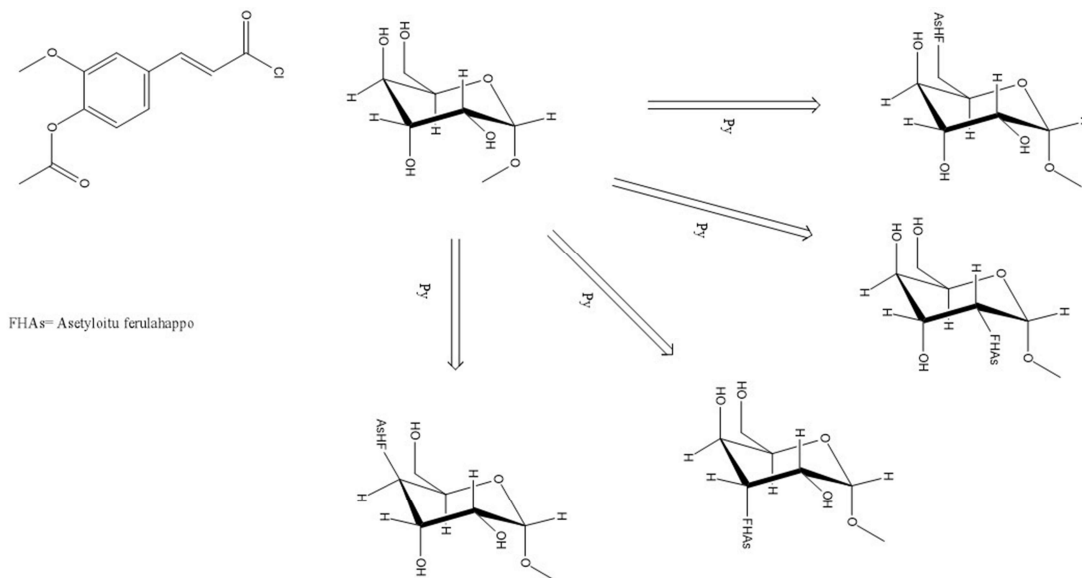
Taulukko 3. Metyyli-4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen synteesi.

Lähtöaine	MW(g/mol)	m(g)	n(mol)	V(ml) d(g/ml)
4-O-asetyyliferulahappokloridi	254,67	1,0	0,0039	-
Metyyli- α -D-glukopyranosidi	194,18	2,3	0,012	-
Pyridiini	79,10	29,4	0,37	30 / (0,98)
4-Dimetyyliaminopyridiini	122,17	0,16	0,0013	-
Tuote	MW(g/mol)	m(g) / Saanto (%)	n(mol)	teor.m. (g)
Metyyli-4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseos	413,21	2,1 / (130 %)	0,0034	1,61

Aluksi liuotettiin metyyli- α -D-glukopyranosidi kolvissa pyridiiniin ja lisättiin reaktion katalyytti 4-dimetyyliaminopyridiini. Reaktio suoritettiin pitämällä kolvia jäävesihauteessa ja lisäämällä suojattu ferulahappokloridi tasaisesti noin 15 minuutin aikana. Sekoitusta jatkettiin jäävesihauteessa vielä puolitoista tuntia, jonka jälkeen sekoitettiin vielä kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Ylimääräinen pyridiini haihdutettiin atseotrooppina tolueenin kanssa. Toimenpidettä jatkettiin lisäten tolueenia ja jatkaen haihdutusta, kunnes pyridiinin hajua ei enää merkittävästi haistettu. Tämän jälkeen liuotettiin tuote 10:1 dikloorimetaani:metanoli -seokseen ja suodatettiin sintterin läpi. Saatu suodos haihdutettiin ja annettiin kuivua vetokaapissa. Tuotteesta mitattiin sekä ^1H -, että ^{13}C -NMR tuotteen vahvistamiseksi, nämä liitteissä 3 ja 4.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -asetoni): δ 2.27(s, 3H), 3.20 (s, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.39 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.48 (m, 2H), 4.66(d, 1H), 6.86 (d, 1H), 7.14 (d, 1H), 7.30 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.88 (d, 1H)

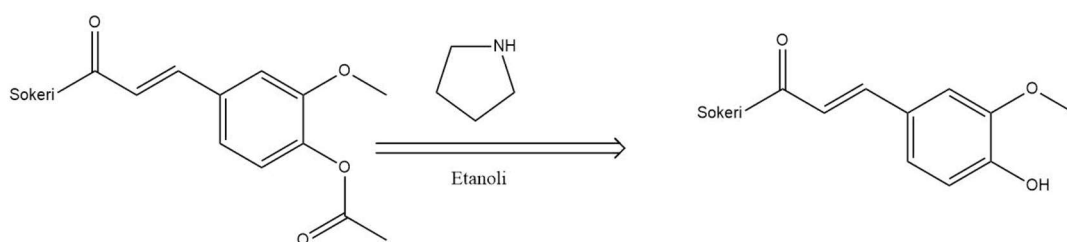
$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, d_6 -asetoni): δ 17.7, 52.7, 53.7, 67.4, 67.8, 68.1, 69.5, 69.8, 71.3, 71.5, 94.7, 97.5, 109.8, 115.3, 119.3, 124.8, 143.3, 149.3, 165.2, 167.7



Kuva 26. Metyyli-4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen synteesi

3.2.5 Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen synteesi

Asetyyli suojarjhmä poistettiin metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksesta reaktiolla pyrrolidiinin kanssa, jota lisättiin reaktion tehostamiseksi 2,5-kertainen määrä lähtöaineeseen verrattuna, kuva 27. Reaktion lähtöaineet sekä tuote nähtävissä taulukosta 4.



Kuva 27. Metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen deasetylointi.

Taulukko 4. Metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen deasetylointi.

Lähtöaine	MW(g/mol)	m(g)	n(mol)	V(ml) d(g/ml)
Metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseos	413,21	2,0	0,0048	-
Etanoli	46,07	15,8	0,34	20 / (0,79)
Pyrrolidiini	71,12	0,86	0,012	1,0 / (0,86)
Tuote	MW(g/mol)	m(g) / Saanto (%)	n(mol)	teor.m. (g)
Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseos	370,35	0.87 (49 %)	0,0023	1,78

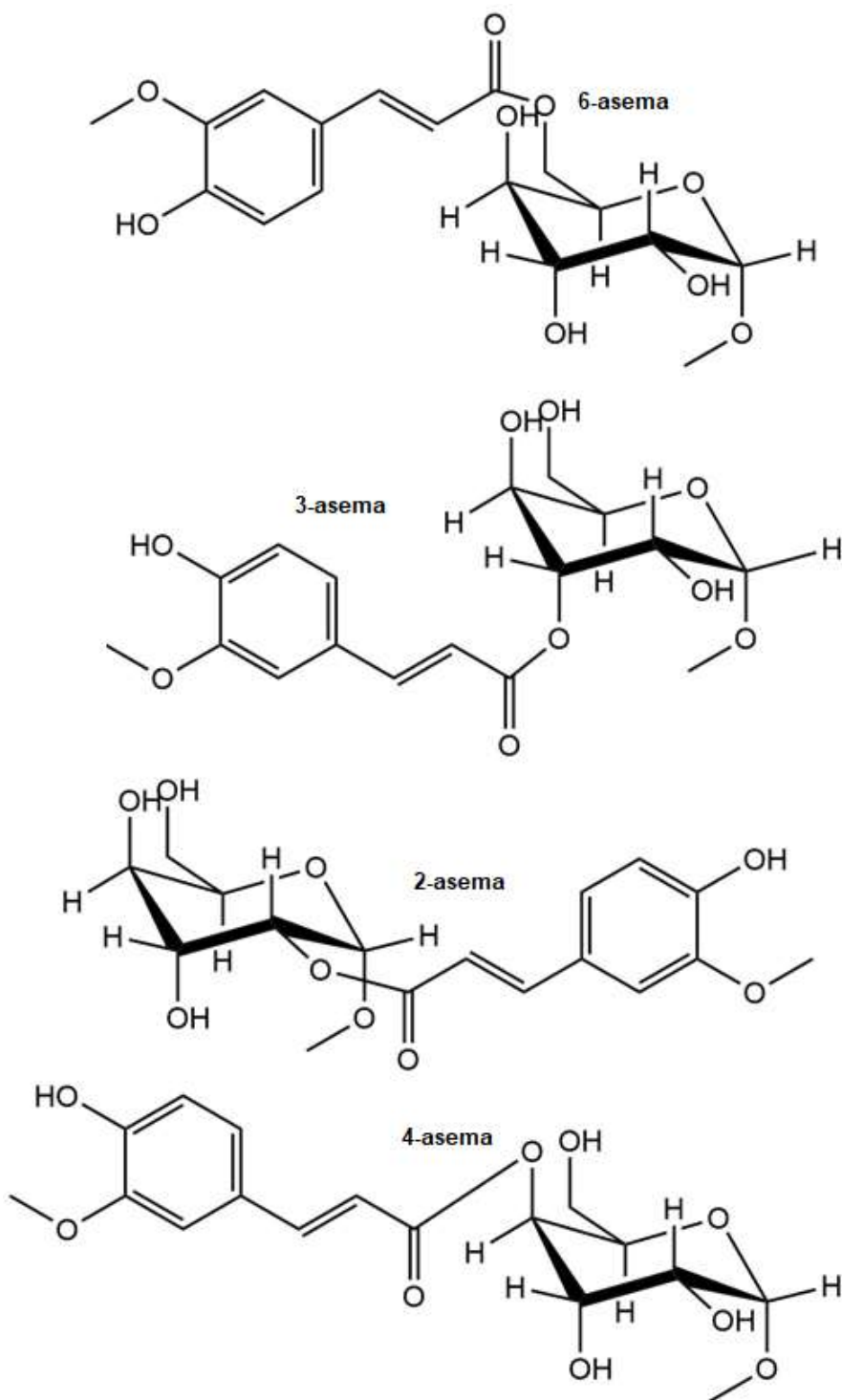
Reaktio tehtiin sekoittamalla metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseos ja pyrrolidiini etanolin ollessa liuottimena, kolvissa noin 4 tunnin ajan. Reaktion etenemistä seurattiin TLC-kromatografialla. Tuotteesta haihdutettiin liuottimet, minkä jälkeen tuote liuotettiin pieneen määrään etanolia ja eluoiitiin 5x3,8 cm silikapylvään läpi etanolilla. Fraktiot kerättiin ja tunnistettiin TLC-kromatografialla ja näistä valittiin fraktiot, joiden voitiin todeta olevan metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseosta. Valitut fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin, minkä jälkeen tuoteseos puhdistettiin käyttäen automaattista EZ Prep flash nestekromatografialaitteistoa RediSep® 12g silikapylväällä (1.950 x 7.485 cm). Eluointi tehtiin dikloorimetaani:metanoli -seoksella, kasvattaen metanolin osuutta ajon aikana 0%-10% 20min aikana, liite 7. Fraktiot kerättiin talteen, haihdutettiin ja tunnistettiin ^1H -, ja ^{13}C -NMR:n avulla, liitteet 5-6.

Deasetyloinnin jälkeen saatiin metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseos, joka koostui pääasiassa 4 erilaisesta tuotteesta, joita erotti ferulahapon sitoutuminen metyyli- α -D-glukopyranosidin 2-, 3-, 4- tai 6-asemaan. Lopullisen tuotteen rakenteet on havainnollistettu kuvassa 28, jossa on esitetty ferulahappo metyyli- α -D-glukopyranosidin eri positioissa.

Liitteessä 7 voidaan nähdä kuinka metanolin osuuden kasvattaminen ajoliuoksessa saa metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen eroteltua muista epäpuhtauksista, lopputuote näkyy viimeisenä piikkinä, alleviivattuna vihreällä (fraktiot 33–36 kuvassa). Lopputuotteen fraktiosta 33–36 mitattiin sekä ^1H -NMR-, että ^{13}C -NMR-spektrit tuotteen varmistamiseksi. ^1H -NMR-spektri liite 5 ja ^{13}C -NMR-spektri liite 6.

^1H -NMR (300 MHz, d_6 -asetoni): δ 3.37 (s, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.39 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.48 (m, 2H), 4.66(d, 1H), 6.42 (d, 1H), 6.93 (d, 1H), 7.18 (d, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.63 (d, 1H)

^{13}C -NMR (500 MHz, d_6 -asetoni): δ 54.5, 54.7, 55.7, 61.7, 63.7, 69.0, 70.1, 70.8, 71.1, 71.2, 71.4, 72.4, 72.6, 72.7, 73.8, 74.4, 97.5, 100.2, 110.6, 110.7, 114.8, 115.0, 115.4, 123.4, 126.7, 145.3, 146.1, 149.4, 166.8, 167.0



Kuva 28. Syntetisoidun metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen mahdolliset tuotteet.

3.3 Esterisidoksen katkaisu entsyymaattisesti käyttäen esteraaseja

Syntetisoidun metyyli metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen esterisidoksen katkaisu tehtiin käyttäen neljää eri esteraasia: *AnFAE A*, *AnFAE B*, *AnFAE C* sekä *AnFAE D*. Kyseisillä entsyymeillä määritettiin myös substraattispesifisyys käyttäen 10 erilaista kanelihapon metyyli- tai etyyliesteriä. Lisäksi mitattiin näiden entsyymien aktiivisuus ($\mu\text{M}/\text{min}$) kyseisillä substraateilla. Lopuksi tutkittiin valittujen esteraasien kyky hajottaa itse syntetisoidun malliyhdisteen metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen esterisidoksia. Sekä mainitun 10 metyyliesterin, että metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin reaktioseoksen valmistus tehtiin samalla metodilla, joka on esitettyä seuraavassa osiossa.

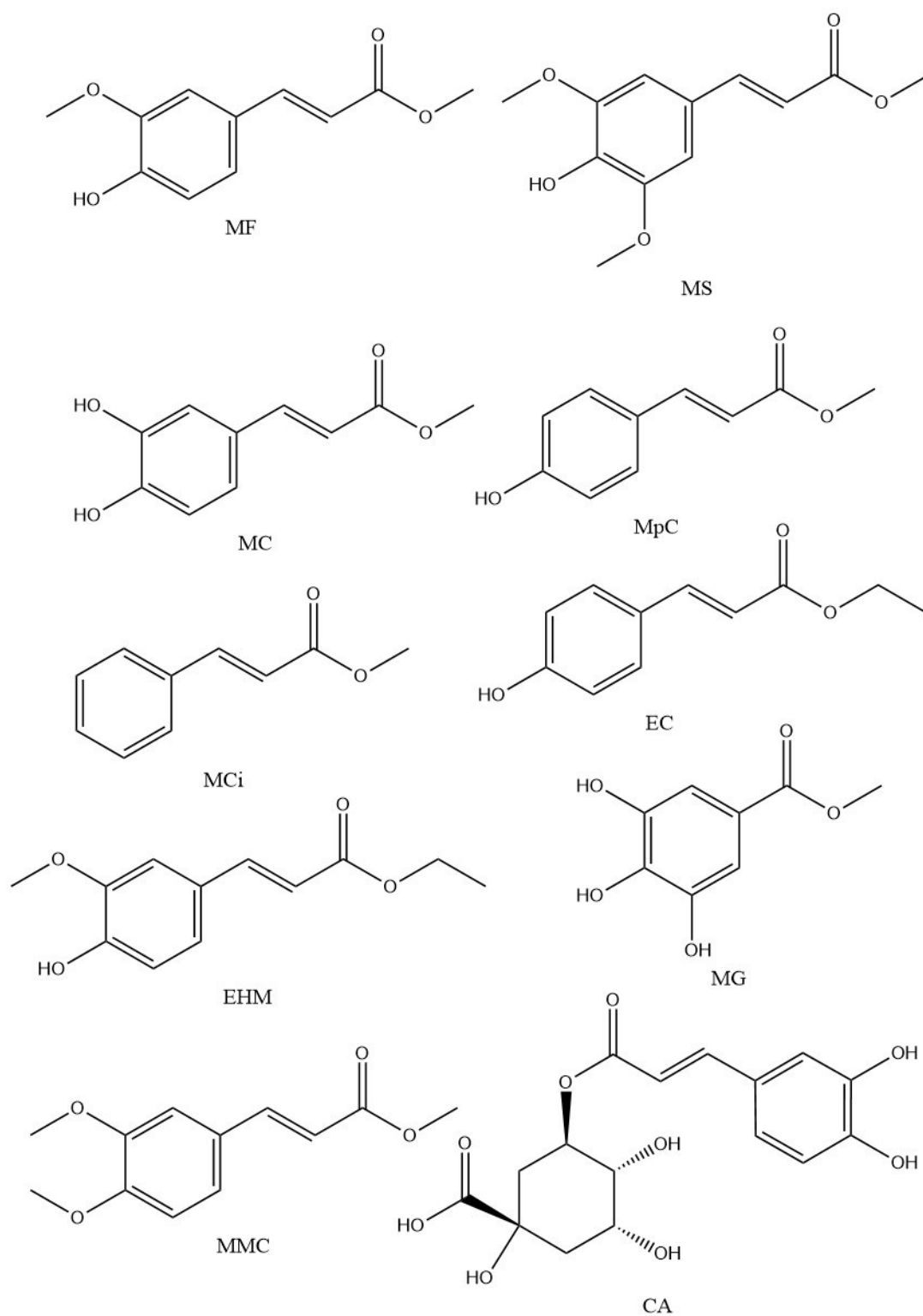
3.3.2 Metyyli- ja etyyliesterit substraatteina

Työssä testatut substraatit olivat metyyliferulaatti (MF), metyyliisinaapaatti (MS), metyylikaffeatti (MC), metyylikumaraatti (MpC), metyyliisinnamaatti (MCi), etyylikumaraatti (EC), etyyli-4-hydroksi-3-metoksisinnamaatti (EHM), metyyli 3,4-dimetoksisinnamaatti (MMC), klorogeenihappo (CA) ja metyyligallaatti (MG), esitettyä kuvassa 29.

Substraateista ja niiden vastaavista hapoista tehtiin 1 mM kantaliuokset 100 mM MOPS (pH 6) (3-morfoliinipropaani-1-sulfonihappo) puskuriliuoksella. Näistä kaikista tehtiin laimennosarjat kalibrointikäyriä varten, jossa laimennettava liuos valmistettiin lisäämällä 0.95 ml 100 mM MOPS (pH 6) puskuria ja 0.05 ml substraatin tai vastaavan hapon kantaliuosta. Kalibrointisarja mitattiin HPLC laitteistolla, kullekin yhdisteelle spesifisellä UV-aallonpituudella (320 nm: MF, MS, MC, MMC, EHM, CA; 308 nm: MpC, EC; 280 nm: MCi, MG). Kalibrointisuoran konsentraatiot ja HPLC-laitteiston vaste näyttää lineaarisen suhteen ja mahdollistaa täten analyytin pitoisuuden määrittämisen interpoloimalla kalibrointisuorasta.

Kantaliuoksista valmistettiin reaktioseos lisäämällä 1.5 ml näytevialiin, jossa oli 0.85 ml 100 mM MOPS puskuria, 0.1 ml kasvatusliuoksen supernatanttia (*AnFAE A*, *B*, *C* tai *D*) ja 0.05 ml substraattikantaliuosta. Reaktioseoksia sekoitettiin 37 °C lämpötilassa

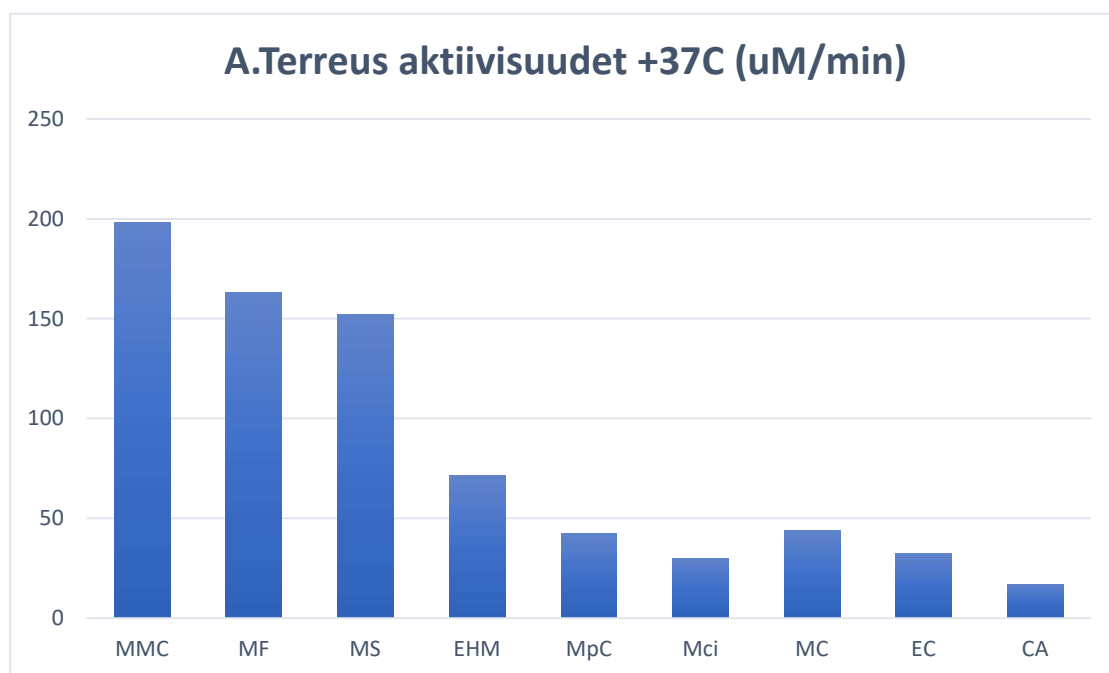
ja näytteet reaktion etenemisestä otettiin eri aikapisteiden kohdalla, riippuen entsyymin osoittamasta aktiivisuudesta reaktiossa. Reaktiossa seurattiin metyyli- tai etyyliesterin vastaavan hapon muodostumista tietyn ajan kuluessa. Reaktioajoissa oli suurta vaihtelua minuuteista tunteihin. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 0.1 ml 80:20 0,1% trifluoroetikkahappoa MilliQ vedessä (TFA) : asetoniiriili (ACN) -seosta. Kaikki näytteet suodatettiin ja mitattiin Agilent 1260 Infinity HPLC-nestekromatografialaitteistolla käyttäen kolonnina Kinetex 2.6u C18 100A (Phenomenex) kaikille substraateille paitsi CA ja MG, joille käytettiin kolonnina InfinityLab Poroshell 120 SB-AQ, sillä kyseisten substraattien erottelussa vastaavasta hapostaan tarvittiin vesiliukoisille yhdisteille paremman erotuskyvyn omaava kolonni. Kaikki metyyli- ja etyyliesterien HPLC-mittaukset tehtiin isokraattisella metodilla, jossa ajoliuksena oli 80:20 0,1% TFA (MilliQ H₂O) ja ACN.



Kuva 29. Kanelihappojen metyyli- ja etyyliesterit.

Kanelihappojen metyyli- ja etyyliesterien reaktioiden spesifisyys- ja aktiivisuusmittauksia varten käytettiin samaa metodologia kuin aiemmissa koejärjestelyissä. Sama toistettiin myös käyttäen tunnetusti reaktiivista *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) esteraasia, jotta tutkittavia entsyymejä voitiin verrata *A. terreuksen* katalysoimiin vastaaviin reaktioihin. Taulukossa 5 on kuvattuna *A. terreuksen* aktiivisuutta 9 eri substraatilla, sillä entsyymi ei ollut reaktiivinen MG:n kanssa.

Taulukko 5. *A. terreus* esteraasin aktiivisuudet 9 eri substraatilla.



Neljän testattavan esteraasin *AnFAE A*, *AnFAE B*, *AnFAE C* sekä *AnFAE D* aktiivisuutta analysoitiin käyttäen samoja substraatteja kuin *A. terreus* -esteraasilla yllä, sillä substraatille MG ei yhdestäkään esteraasista löydetty esteraasiaktiivisuutta. Taulukosta 6 voidaan nähdä karkea arviointi esteraasien aktiivisuuksista.

Taulukko 6. *AnFAE A*, *AnFAE B*, *AnFAE C* ja *AnFAE D* aktiivisuudet.

Substraatti Entsyymi	MF	MS	MC	Mci	MpC	EC	EHM	MMC	CA	MG
<i>AnFAE A</i>	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	N/A	N/A
<i>AnFAE B</i>	++	N/A	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	N/A
<i>AnFAE C</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	N/A	N/A
<i>AnFAE D</i>	*	N/A	*	*	*	*	N/A	*	N/A	N/A

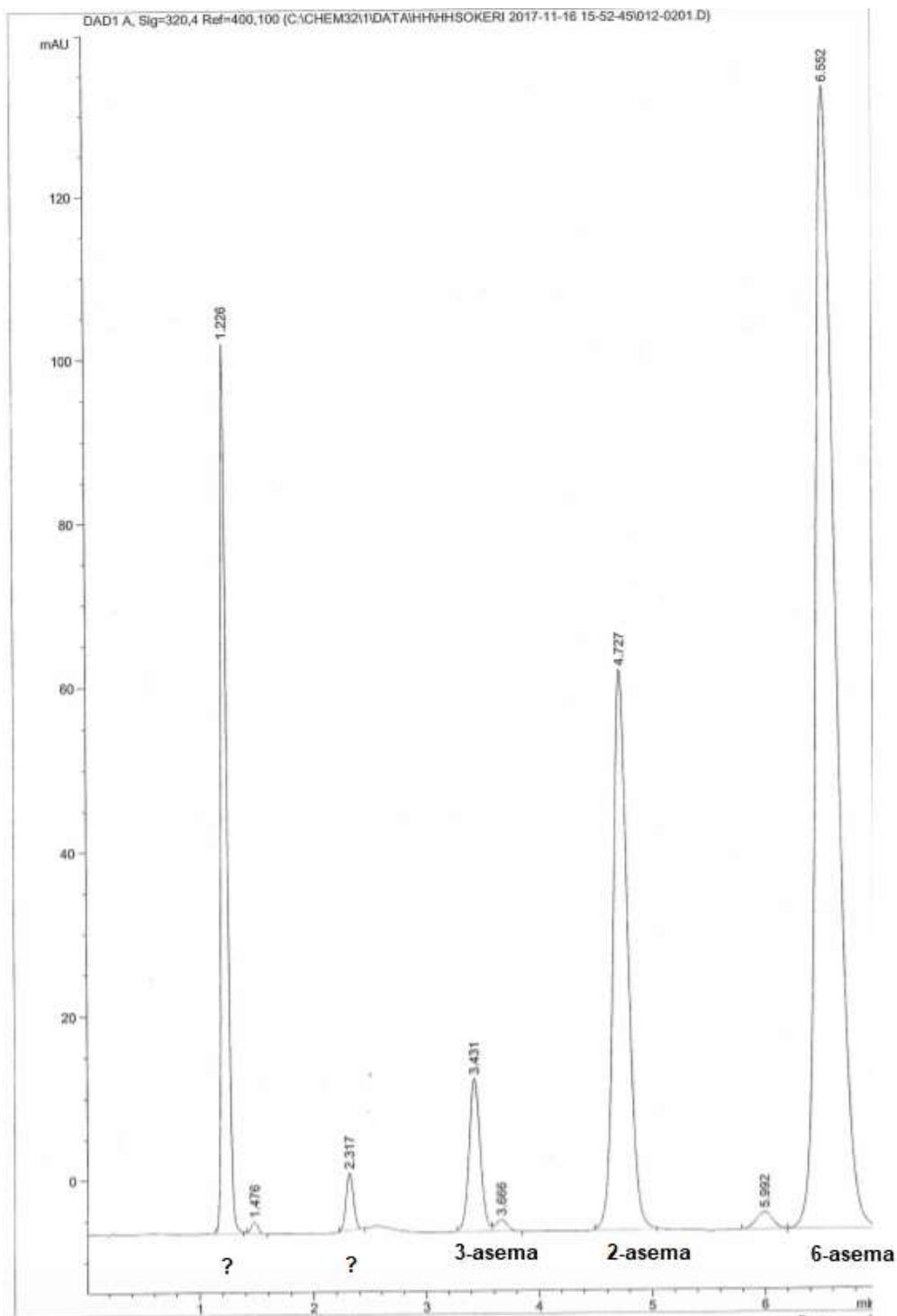
Taulukossa 6, on luokiteltu aktiivisuus seuraavasti: N/A = ei havaittavaa aktiivisuutta, * = havaittavaa aktiivisuutta (alle 10 uM/min), + = aktiivinen (yli 10 uM/min), ++ = hyvin aktiivinen (yli 1mM/min), +++ = erittäin aktiivinen (yli 10 mM/min). Luokittelu perustuu keskinäisiin vertailuihin sekä *A. terreuksen* tuloksiin. Jokaiselle entsyymille on tehty vielä aktiivisuuskuvaaja ja nämä löytyvät liitteistä 8–11. *AnFAE D* -esteraasin heikko aktiivisuus muihin tutkittaviin esteraaseihin verrattuna herätti kysymyksen siitä, mikä on ollut kyseisen entsyymin kunto koetta suoritettaessa tai oliko mahdollisesti entsyymin konsentroidi epäonnistunut.

3.3.3 Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen esterisidosten katkaisu

Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen kantaliuos oli 1 mg/ml (0,27 mM) 10:90 ACN : 0,1% TFA (MilliQ H₂O), ja reaktioseoksen valmistus tehtiin kuten muille substraateille. Analyysi tehtiin isokraattisesti käyttäen 90 : 10 0,1% TFA (MilliQ H₂O) : ACN ajoliuksena. Syntetisoidun metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen esterisidoksen hajottamisessa oli ensisijaisesti kiinnostuttu substraattispesifisyydestä, sekä mistä asemasta (2-, 3-, 4-, vai 6-) esterisidos katkeaa. Hypoteesinä oli, että ferulahapon irtoamisen järjestys tapahtuisi samalla logiikalla kuin synteessin aikana kiinnitys. Kiinnitysvaiheessa helpommin saatavilla oleva metyyli α -D-glukopyranosidin

primäärinen hydroksyyli-ryhmä oli suosituin kiinnityskohta ferulahapolle ja samalla tavalla myös entsyymien reagoissa sen olisi helpoin katalysoida hajoaminen sille positiolle, joka on helpoiten saatavilla.

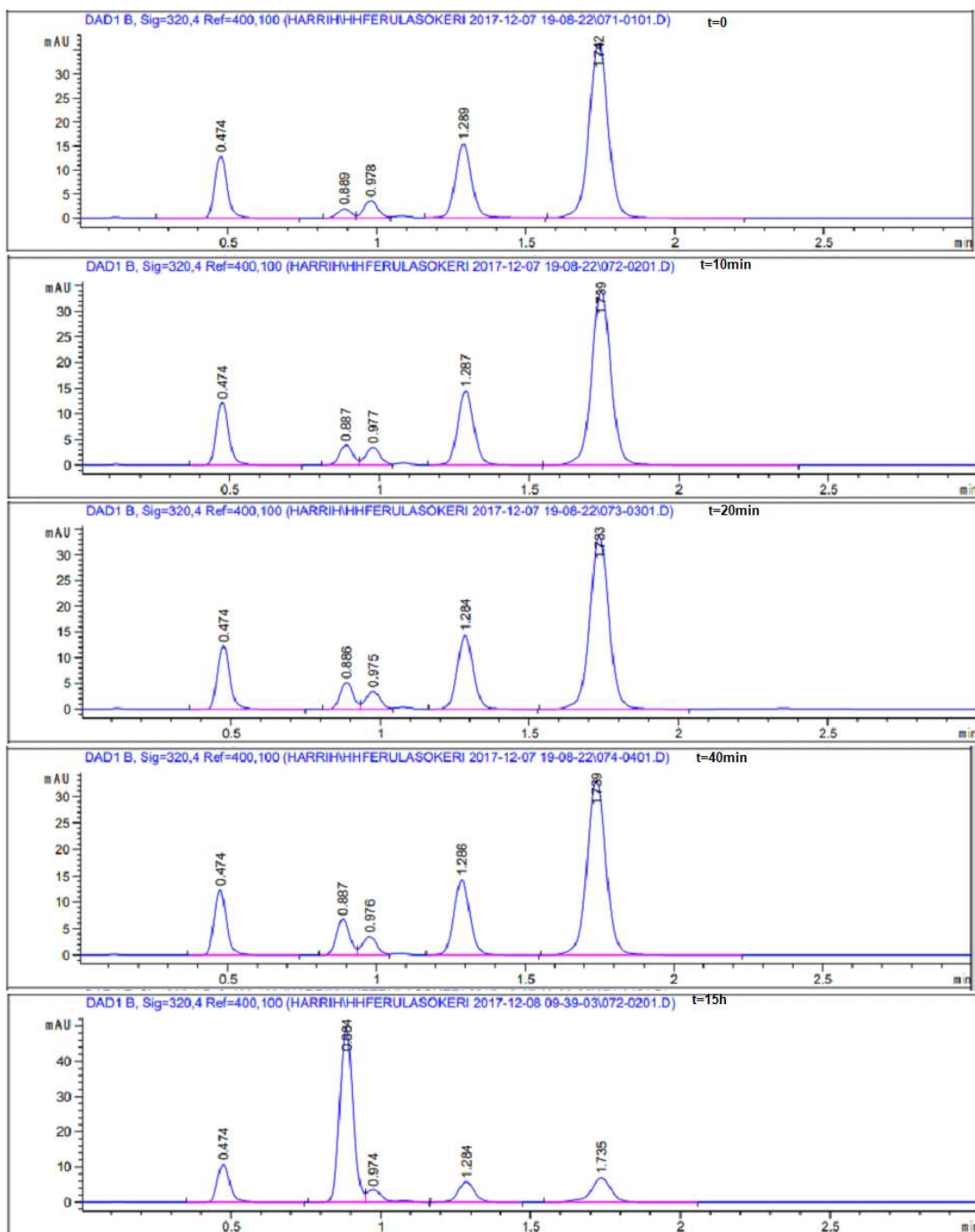
Ensin tuoteseos analysoitiin HPLC:lla, kuva 30, josta voitaisiin verrata, missä kohtaa toisiinsa nähden eri asemista esteröityneet metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeerit eluutuvat. Oletuksena on, että 6-asema olisi yleisin, sen ollessa myös regiokemiallisesti helpoiten saavutettavissa, tästä seuraavat olisivat 2-asema, 3-asema ja viimeisenä 4-asema, kun kyseessä olisi kineettisesti kontrolloitu reaktio. Vertailu yhdisteinä oli saatavilla metyyli 2-feruloyyli- α -D-glukopyranosidi sekä metyyli 6-feruloyyli- α -D-glukopyranosidi, joilla voitiin identifioida nämä kaksi asemaa isomeerisen seoksen analyysistä. Lisäksi kuvasta 30 voidaan nähdä, mitkä asemista voidaan vahvistaa aiheesta jo tehdyn kirjallisuuden perusteella. Osaa positiosta voidaan verrata suoraan Kylli et al, (2008) tekemään tutkimukseen metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidista, ja vahvistaa 6-, 2- ja 3-asema.⁶⁰ Tutkimuksessa Kylli et al (2008), mainitsevat että 4-aseman piikki tulisi vasta 6-aseman piikin jälkeen, mikäli sitä on muodostunut.



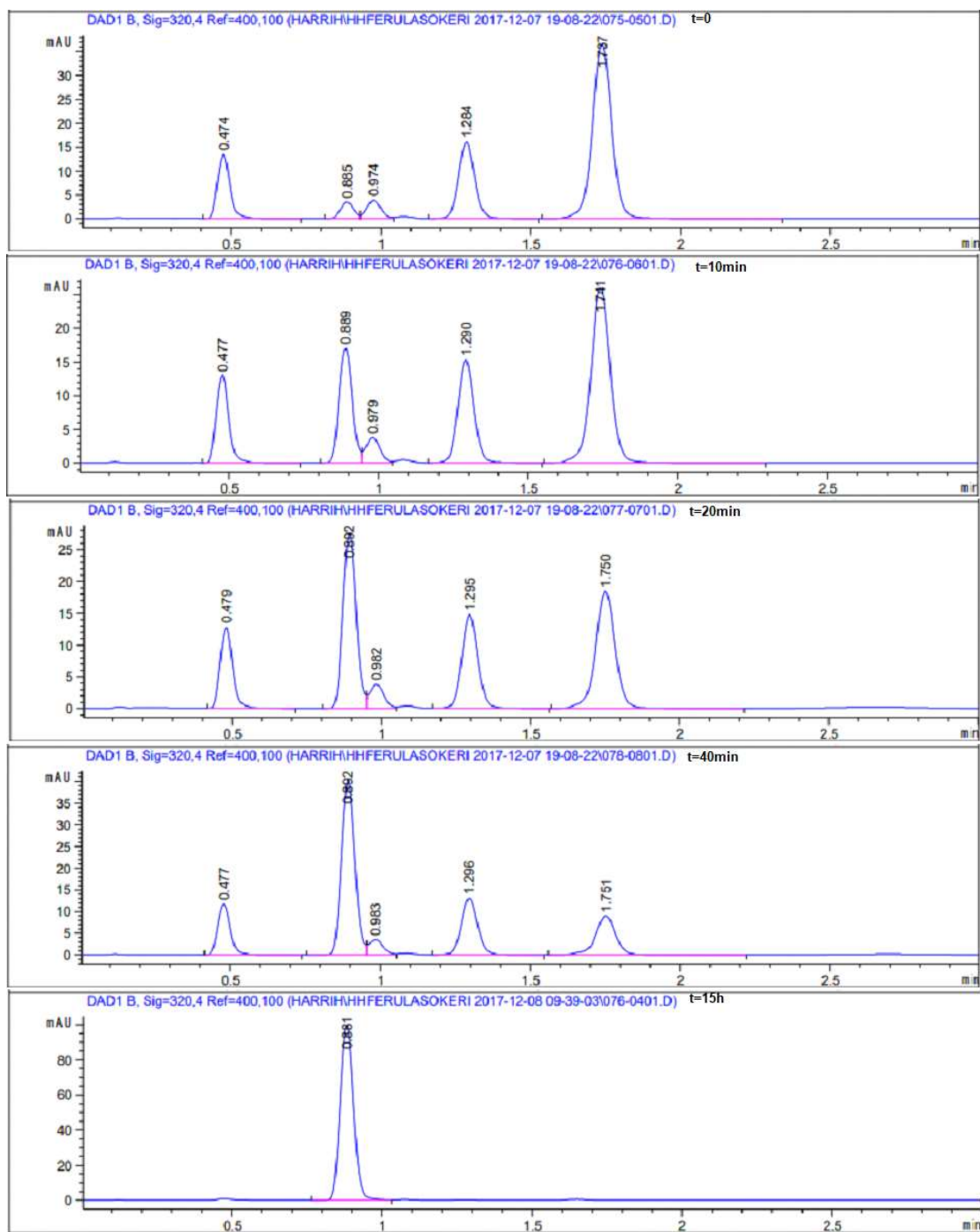
Kuva 30. Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi seoksen isomeerien asemat.

Kaikki metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen hajottamisreaktion entsyymiliuokset on laimennettu 1:1000 samalla MOPS-puskurilla, mikä on kuvattu kohdassa tutkimus, menetelmät ja laitteistot. *AnFAE* A:n reaktion eteneminen on esitettyä kuvassa 31, ja *AnFAE* B:n reaktion

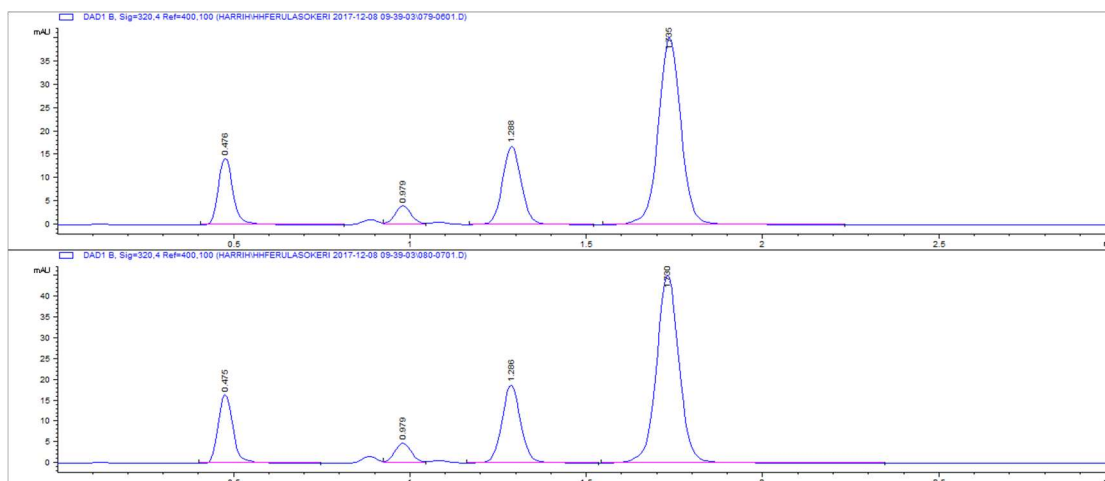
eteneminen on esitetty kuvassa 32. *AnFAE* C ja D eivät reagoineet metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen kanssa tarpeeksi, että 15 h kokeen aikana olisi huomattu mitään merkittävää muutosta, näistä esitettynä kuvissa 33 ja 34. Kuten kuvista 31 ja 32 huomataan ja verrataan kuvaan 30, huomataan että toiseksi korkein tunnistamaton piikki ei mitta-asteikkoon verrattuna muutu yhtään, joten kyseessä on mahdollisesti liuotinpiikki.



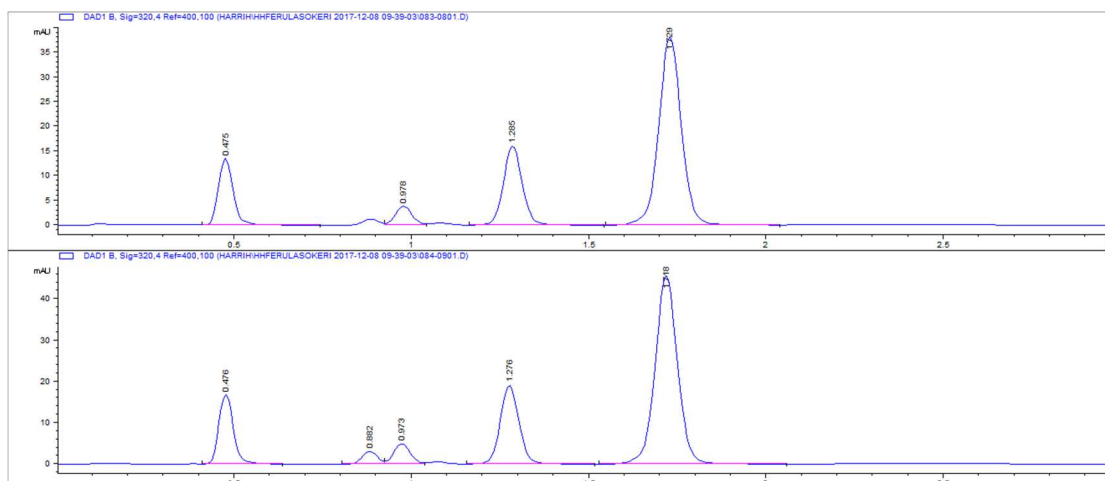
Kuva 31. AnFAE A vaikutus metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseokseen ja vapaan ferulahapon määrään.



Kuva 32. AnFAE B vaikutus metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen ja vapaan ferulahapon määrään



Kuva 33. *AnFAE C* vaikutus metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidi isomeeriseoksen ja vapaan ferulahapon määrän, 2–15 h välillä.



Kuva 34. *AnFAE D* esteraasin vaikutus metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen ja vapaan ferulahapon määrään, 2–15 h.

Ainakin *AnFAE D* antaa pientä viitettä kuvassa 34 että pidemmällä reaktioajalla se mahdollisesti pystyisi hajottamaan hiilihydraatin ja ferulahapon välisiä esterisidoksia. Kuvista 31 sekä 32 nähdään, että *AnFAE A* sekä varsinkin *AnFAE B* pystyvät melko tehokkaasti katkaisemaan hiilihydraatin ja ferulahapon välisiä esterisidoksia. Kuvaajasta 31 ei voi suoraan nähdä, missä asemassa sijaitsevaa esterisidosta, 6-, 4-, 3- vai 2-, entsyymi hajottaa ensimmäisenä. Kuten itse esterisidoksen muodostuessa positio 6 on sokerissa steerisesti helpoiten saavutettavissa. ja luultavasti vaikuttaa vahvasti

siihen, että suurin osa ferulahapoista on sitoutunut juuri tähän asemaan. Samalla logiikalla esterisidoksen katkaisussa voidaan olettaa, että 6-asema olisi steerisesti helpoin katkaista ja täten suurimmalta osin seoksessa hajotus keskittyisi ensin 6-asemaan. Tämä hypoteesi näyttää toteutuvan kuvaa 32 seuratussa, jossa *AnFAE B* oli hieman nopeampi hajottamaan tätä esterisidosta ja kuvasarjasta nähdään, että aluksi ainoastaan 6-aseman piikki (noin 1.750 min kohdalla) pienenee. Näyttäisi siltä, että muut esteri-isomeerit alkavat hajota merkittävästi vasta, kun 6-aseman esterisidos on katkaistu.

3.4 Yhteenveto

Kasvien biomassaa on tutkittu jo monta sataa vuotta, ja sitä on onnistuttu hyödyntämään kauan ennen luonnontieteellistä tutkimusta. Kasvien biomassan makrorakenteiden tutkimus on ollut pitkään sekä tieteen että teollisuuden tutkittavana ja niistä varsinkin ligniini on ollut keskeisenä aiheena, johtuen sen monimutkaisuudesta sekä toistaiseksi vähäisestä hyödynnettävyydestä. Ligniinin tutkimus on edennyt sen rakenteesta aina biosynteesiin sekä entsyymaattiseen hajottamiseen. Tutkielmassa käsitellään keskeisiä osia ligniinin biosynteesistä, rakenteesta sekä ligniinin muodostamista sidoksista biomassan hiilihydraatteihin. Ligniinin rakenteiden sekä näiden biomassan makrorakenteiden välisten sidosten ymmärtämisellä, voidaan kehittyä myös biomassan entsyymaattisen hajottamisen kanssa. Peroksidaasien vaikutukset ligniinin rakenteissa on melko hyvin tutkittu ja ymmärretty, mutta realistisia teollisia sovellutuksia ei ole toistaiseksi saavutettu. Esteraasien osuutta varsinkin LCC:n muokkauksessa tutkitaan paljon ja mahdollinen hyöty entsyymaattisesta hajotuksesta on varmasti yhteydessä erilaisten entsyymien yhtäaikaiseen käyttöön.

Melko paljon tutkimustietoa on jo saatavilla LCC yhdisteiden synteeseistä sekä niiden sidosten entsyymaattisesta hajottamisesta esteraaseilla. Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen synteesi ja myöhemmin hajottaminen esteraasien avulla on mielenkiintoinen prosessi, sillä se havainnoi ferulahapon ja ferulahappoesterien merkitystä luonnossa.

Esteraasit *AnFAE* A, B ja C hajottivat kaikki tehokkaasti kanelihappojen metyyli- ja etyyliestereitä. *AnFAE* D:n heikko kyky hajottaa substraatteja herätti epäilyksiä mikä on ollut kyseisen entsyymin kunto reaktioiden suoritushetkellä. Esteraasien *AnFAE* A, B, C ja D kyky hajottaa metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen esterisidoksia selvitettiin ja huomattiin, että *AnFAE* A ja B hajottivat esterisidoksia, kun taas *AnFAE* C ja D eivät olleet aktiivisia. Tulos oli hieman yllättävä, koska kaikki kyseisistä entsyymeistä olivat olleet aktiivisia kun metyyliferulaattia käytettiin substraattina.

Tämän lisäksi oli mielenkiintoista huomata kuinka hallitseva metyyli 6-O-feruloyyli- α -D-glukopyranosidin osuus on muihin mahdollisiin asemiin verrattuna (2-, 3- ja 4).

Esteraasien ja niiden kyky hajottaa esterisidoksia varsinkin biokemiallisia sovelluksia varten vaatii vielä paljon lisätutkimusta, jotta voidaan ymmärtää tarkemmin niiden toimintamekanismeja. Myös esterisidosten merkitys lignoselluloosan rakenteessa ja biosynteesissä, sekä biomassan jalostuksessa on erittäin tärkeä ja on varmasti vielä jatkossakin mielenkiintoinen tutkimuksen aihe kasvien kemiassa.

4. Lähteet

- (1) McCann, M. C.; Bush, M.; Milioni, D.; Sado, P.; Stacey, N. J.; Catchpole, G.; Defernez, M.; Carpita, N. C.; Hofte, H.; Ulvskov, P.; Wilson, R. H.; Roberts, K. Approaches to Understanding the Functional Architecture of the Plant Cell Wall. *Phytochemistry* **2001**, *57* (6), 811–821. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00144-3).
- (2) Upton, B. M.; Kasko, A. M. Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2275–2306. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00345>.
- (3) Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2010**, *14* (2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>.
- (4) Mäkelä, M. R.; Marinović, M.; Nousiainen, P.; Liwanag, A. J. M.; Benoit, I.; Sipilä, J.; Hatakka, A.; de Vries, R. P.; Hildén, K. S. Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Adv. Appl. Microbiol.* **2015**, *91*, 63–137. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.001>.
- (5) Zhang, Z.; Song, J.; Han, B. Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (10), 6834–6880. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00457>.
- (6) Dilokpimol, A.; Mäkelä, M. R.; Aguilar-Pontes, M. V.; Benoit-Gelber, I.; Hildén, K. S.; De Vries, R. P. Diversity of Fungal Feruloyl Esterases: Updated Phylogenetic Classification, Properties, and Industrial Applications. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0651-6>.
- (7) Loqué, D.; Scheller, H. V.; Pauly, M. Engineering of Plant Cell Walls for Enhanced Biofuel Production. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *25*, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.018>.
- (8) Pauly, M.; Keegstra, K. Plant Cell Wall Polymers as Precursors for Biofuels. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2010**, *13* (3), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.009>.
- (9) Howard, R.L., Abotsi, E., Van Rensburg, E.L.J., Howard, S. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African J. Biotechnol.* **2003**, *2* (12), 702–733.
- (10) Zhao, Y.; Shakeel, U.; Saif Ur Rehman, M.; Li, H.; Xu, X.; Xu, J. Lignin-Carbohydrate

- Complexes (LCCs) and Its Role in Biorefinery. *J. Clean. Prod.* **2020**, *253*, 120076. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120076>.
- (11) Pauly, M.; Keegstra, K. Cell-Wall Carbohydrates and Their Modification as a Resource for Biofuels. *Plant J.* **2008**, *54* (4), 559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x>.
- (12) Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. *Int. Microbiol.* **2002**, 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>.
- (13) Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H. P.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- (14) Scheller, H. V.; Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61* (1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>.
- (15) Chio, C.; Sain, M.; Qin, W. Lignin Utilization: A Review of Lignin Depolymerization from Various Aspects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *107* (December 2018), 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.008>.
- (16) Emiliani, G.; Fondi, M.; Fani, R.; Gribaldo, S. A Horizontal Gene Transfer at the Origin of Phenylpropanoid Metabolism. *Biol. Direct* **2009**, *4* (7).
- (17) Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54* (1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.
- (18) Marriott, P. E.; Gómez, L. D.; Mcqueen-Mason, S. J. Unlocking the Potential of Lignocellulosic Biomass through Plant Science. *New Phytol.* **2016**, *209* (4), 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13684>.
- (19) Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M. A.; Barceló, A.; Amaya, I.; Medina, M. I.; Alonso, F. J.; De Forchetti, S. M.; Tigier, H.; Valpuesta, V. A Tomato Peroxidase Involved in the Synthesis of Lignin and Suberin. *Plant Physiol.* **2000**, *122* (4), 1119–1127. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1119>.
- (20) Blee, K. A.; Choi, J. W.; Connell, A. P. O.; Schuch, W.; Lewis, N. G.; Bolwell, G. P. A Lignin-Specific Peroxidase in Tobacco Whose Antisense Suppression Leads to Vascular Tissue Modification. *Plant Physiol.* **2003**, *64*, 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00212-7).
- (21) Zhao, Q.; Nakashima, J.; Chen, F.; Yin, Y.; Fu, C.; Yun, J.; Shao, H.; Wang, X.; Wang, Z.; Dixon, R. A. LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for

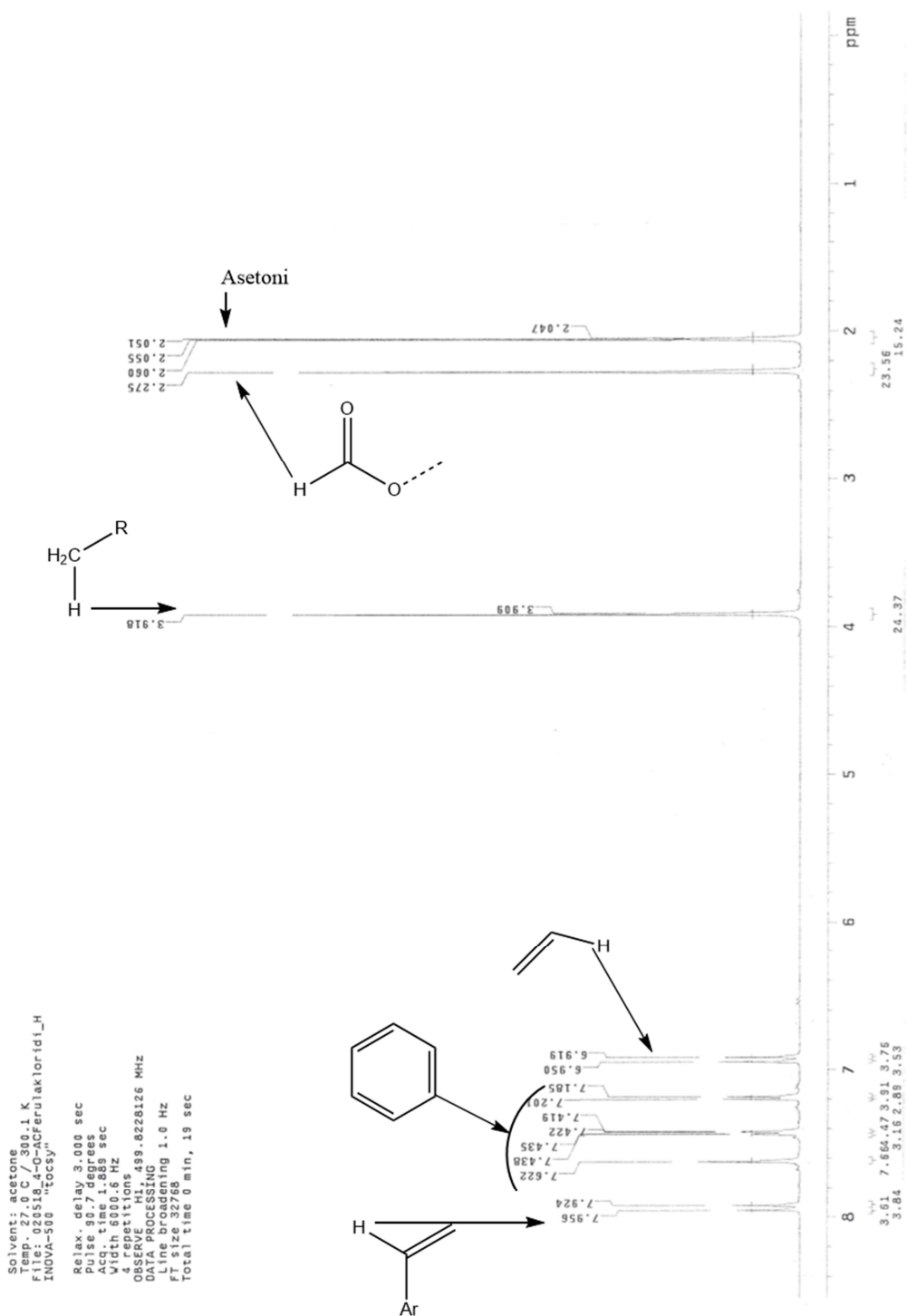
- Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. **2013**, 25 (October), 3976–3987. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117770>.
- (22) Liu, C.; Cai, Y.; Zhang, X.; Gou, M.; Yang, H. Tailoring Lignin Biosynthesis for Efficient and Sustainable Biofuel Production. **2014**, 1154–1162. <https://doi.org/10.1111/pbi.12250>.
- (23) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Paul, F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W. Lignins : Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenyl- Propanoids. **2004**, 29–60.
- (24) Tarasov, D.; Leitch, M.; Fatehi, P. Biotechnology for Biofuels Lignin – Carbohydrate Complexes : Properties , Applications , Analyses , and Methods of Extraction : A Review. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1262-1>.
- (25) Watanabe, Takashi; Kaizu, Sumiko; Koshijima, T. Binding Sites of Carbohydrate Carbohydrate Complex" Moieties from Pinus toward Lignin Densiflora in "Lignin-Wood. *Chem. Lett.* **1986**, No. C, 1871–1874.
- (26) Kajikawa, H.; Y, H. K.; Kondo, T.; Jodai, K. Degradation of Benzyl Ether Bonds of Lignin by Ruminant Microbes. **2000**, 187, 15–20.
- (27) Balakshin, M.; Capanema, E.; Gracz, H.; Chang, H.; Jameel, H. Quantification of Lignin-Carbohydrate Linkages with High-Resolution NMR Spectroscopy. *Planta* **2011**, 233 (6), 1097–1110. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1359-2>.
- (28) Giumarella, Nicola; Lawoko, M. Structural Basis for the Formation and Regulation of Lignin-Xylan Bonds in Birch. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, No. 4, 5319–5326. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>.
- (29) Ishikawa, H.; Schubert, W. J.; Nord, F. F. Investigations on Lignins and Lignification. XXVII. The Enzymic Degradation of Softwood Lignin by White-Rot Fungi. *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, 100 (11), 131–139.
- (30) Baldrian, P. Fungal Laccases-Occurrence and Properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, 30 (2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
- (31) Hatakka, A. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. *Microbiol. Rev.* **1994**, 13, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.042>.
- (32) Higuchi, T. Mechanisms of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi. *Plant Cell Walls Polym.* **1989**.
- (33) Crestini, C.; Argyropoulos, D. S. On the Role of 1-Hydroxybenzotriazole as Mediator in

- Laccase Oxidation of Residual Kraft Lignin. *Oxidative delignification Chem. Fundam. Catal. ACS Symp. Ser.* **2001**, 785, 373–390. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2001-0785.ch023>.
- (34) Hammel, K. E.; Jensen, K. A.; Mozuch, M. D.; Landucci, L. L.; Tien, M.; Pease, E. A. Ligninolysis by a Purified Lignin Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (17), 12274–12281.
- (35) Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin-Degrading Enzyme from Phanerochaete Chrysosporium: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81 (8), 2280–2284. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.8.2280>.
- (36) Doyle, W.; Blodig, W.; Veitch, N.; Piontek, K.; Smith, A. Two Substrate Interaction Sites in Lignin Peroxidase Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **1998**, 37 (43), 15097–15105. <https://doi.org/10.1021/bi981633h>.
- (37) Hammel, K.; Tien, M.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. Mechanism of Oxidative C Alpha-C Beta Cleavage of a Lignin Model Dimer by Phanerochaete Chrysosporium Ligninase. Stoichiometry and Involvement of Free Radicals. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (14), 8348–8353.
- (38) Enoki, Akio; Goldsby, Gwendolyn; Gold, M. β -Ether Cleavage of the Lignin Model Compound 4-Ethoxy-3-Methoxyphenylglycerol- β -Guaiacyl Ether and Derivatives by Phanerochaete Chrysosporium. *Arch. Microbiol.* **1981**, 129, 141–145.
- (39) Miki, Keiji; Renganathan, V.; Gold, M. H. Mechanism of β -Aryl Ether Dimeric Lignin Model Compound Oxidation by Lignin Peroxidase of Phanerochaete Chrysosporium. *Biochemistry* **1986**, 25, 4790–4796.
- (40) Renganathan, V.; Miki, K.; Gold, M. H. Role of Molecular Oxygen in Lignin Peroxidase Reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986, pp 155–161. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90459-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90459-5).
- (41) Schoemaker, H E; Harvey, P.J.; Bowen, R. M.; Palmer, J. M. On the Mechanism of Enzymatic Lignin Breakdown. *FEBS Lett.* **1985**, 183 (1).
- (42) Hammel, K. E.; Cullen, D. Role of Fungal Peroxidases in Biological Ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, 11 (3), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.003>.
- (43) Lundell, T. K.; Mäkelä, M. R.; Hildén, K. Lignin-Modifying Enzymes in Filamentous Basidiomycetes - Ecological, Functional and Phylogenetic Review. *J. Basic Microbiol.* **2010**, 50 (1), 5–20. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900338>.

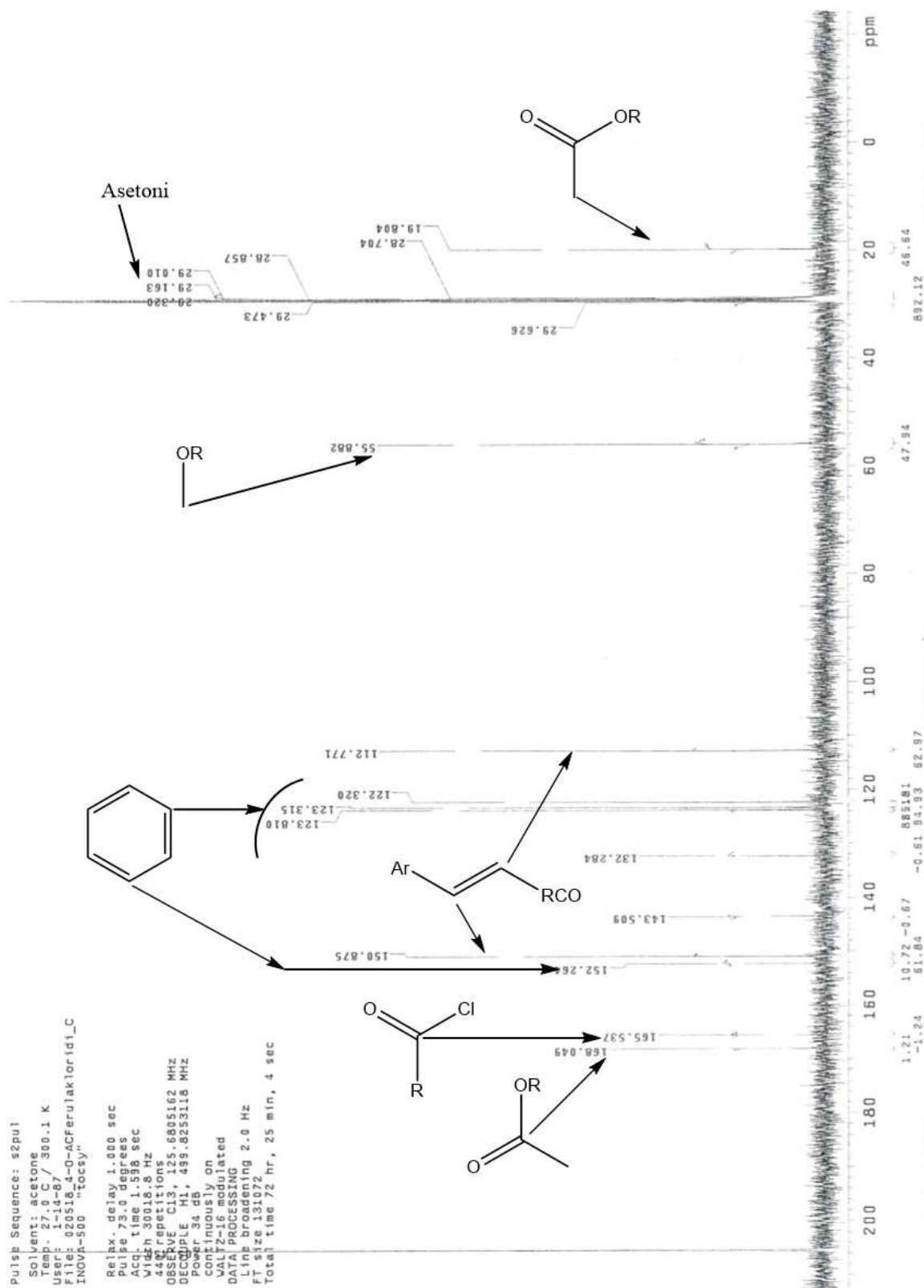
- (44) Blanchette, R. A.; Krueger, E. W.; Haight, J. E.; Akhtar, M.; Akin, D. E. Cell Wall Alterations in Loblolly Pine Wood Decayed by the White-Rot Fungus, *Ceriporiopsis Subvermispora*. *J. Biotechnol.* **1997**, *53* (2–3), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01674-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01674-X).
- (45) Hofrichter, M. Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30* (4), 454–466. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2).
- (46) Bao, W.; Fukushima, Y.; Jensen, K.; Moen, M.; Hammel, K. Oxidative Degradation of Non-Phenolic Lignin during Lipid Peroxidation by Fungal Manganese Peroxidase. *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 297–300.
- (47) Kapich, A. N.; Jensen, K. A.; Hammel, K. E. Peroxyl Radicals Are Potential Agents of Lignin Biodegradation. *FEBS Lett.* **1999**, *461* (1–2), 115–119. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01432-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01432-5).
- (48) Martínez, Á. T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M. J.; Gutiérrez, A.; Del Río, J. C. Biodegradation of Lignocellulosics: Microbial, Chemical, and Enzymatic Aspects of the Fungal Attack of Lignin. *Int. Microbiol.* **2005**, *8* (3), 195–204. <https://doi.org/im2305029> [pii].
- (49) Ruiz-Dueñas, F. J.; Morales, M.; García, E.; Miki, Y.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. Substrate Oxidation Sites in Versatile Peroxidase and Other Basidiomycete Peroxidases. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60* (2), 441–452. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern261>.
- (50) Jiang, Y.; Morley, K. L.; Schrag, J. D.; Kazlauskas, R. J. Different Active-Site Loop Orientation in Serine Hydrolases versus Acyltransferases. *ChemBioChem* **2011**, *12* (5), 768–776. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000693>.
- (51) Wong, D. W. . Feruloyl Esterase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *133*, 87–112.
- (52) de Vries, Ronald P; Visser, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65* (4), 497–522. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497>.
- (53) Wyman, C. E. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics and Opportunities. *Bioresour. Technol.* **1994**, *50*, 3–16.
- (54) G. Williamson', C. B. F. and P. A. K. Specificity of Ferulic Acid (Feruloyl) Esterases. *Enzymol. cell-wall Degrad.* **1998**.
- (55) Crepin, Valerie F; Faulds, Craig N; Connerton, I. F. Production and Characterization of the *Talaromyces Stipitatus* Feruloyl Esterase FAEC in *Pichia Pastoris*: Identification of

- the Nucleophilic Serine. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *29*, 176–184.
- (56) You, T.; Zhang, L.; Zhou, S.; Xu, F. Structural Elucidation of Lignin – Carbohydrate Complex (LCC) Preparations and Lignin from *Arundo Donax* Linn. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *71*, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.070>.
- (57) Kroon, P. A.; Garcia-cones, M. T.; Fillingham, I. J.; Hazlewood, G. P.; Williams, G. Release of Ferulic Acid Dehydrodimers from Plant Cell Walls by Feruloyl Esterases ¹. **1999**, *434* (September 1998), 428–434.
- (58) Ralet, M.-C.; Faulds, C. B.; Williamson, G. Degradation of Feruloylated Oligosaccharides from Sugar-Beet Pulp and Wheat Bran by Ferulic Acid. *Carbohydr. Res.* **1994**, *6215* (94), 257–269.
- (59) Ralph, J.; Helm, R. F.; Quideau, S.; Hatfield, R. D. Lignin-Feruloyl Ester Cross-Links in Grasses. Part 1. Incorporation of Feruloyl Esters into Coniferyl Alcohol Dehydrogenation Polymers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, No. 21, 2961–2969. <https://doi.org/10.1039/P19920002961>.
- (60) Kylli, P.; Nousiainen, P.; Biely, P.; Sipilä, J.; Tenkanen, M.; Heinonen, M. Antioxidant Potential of Hydroxycinnamic Acid Glycoside Esters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (12), 4797–4805. <https://doi.org/10.1021/jf800317v>.

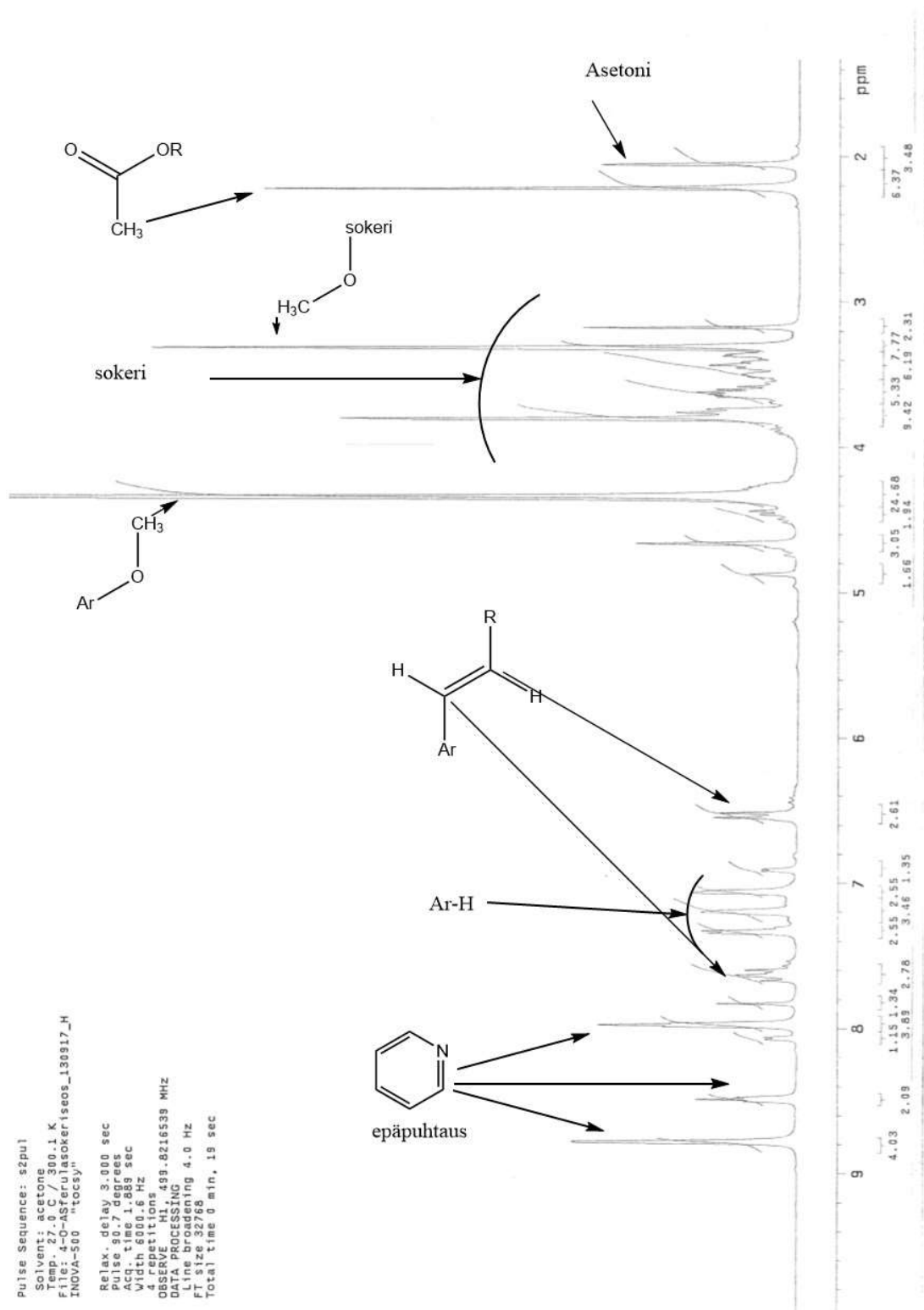
5. Liitteet

Liite 1. 4-O-asetyyliferulahappokloridin ¹H-NMR spektri.

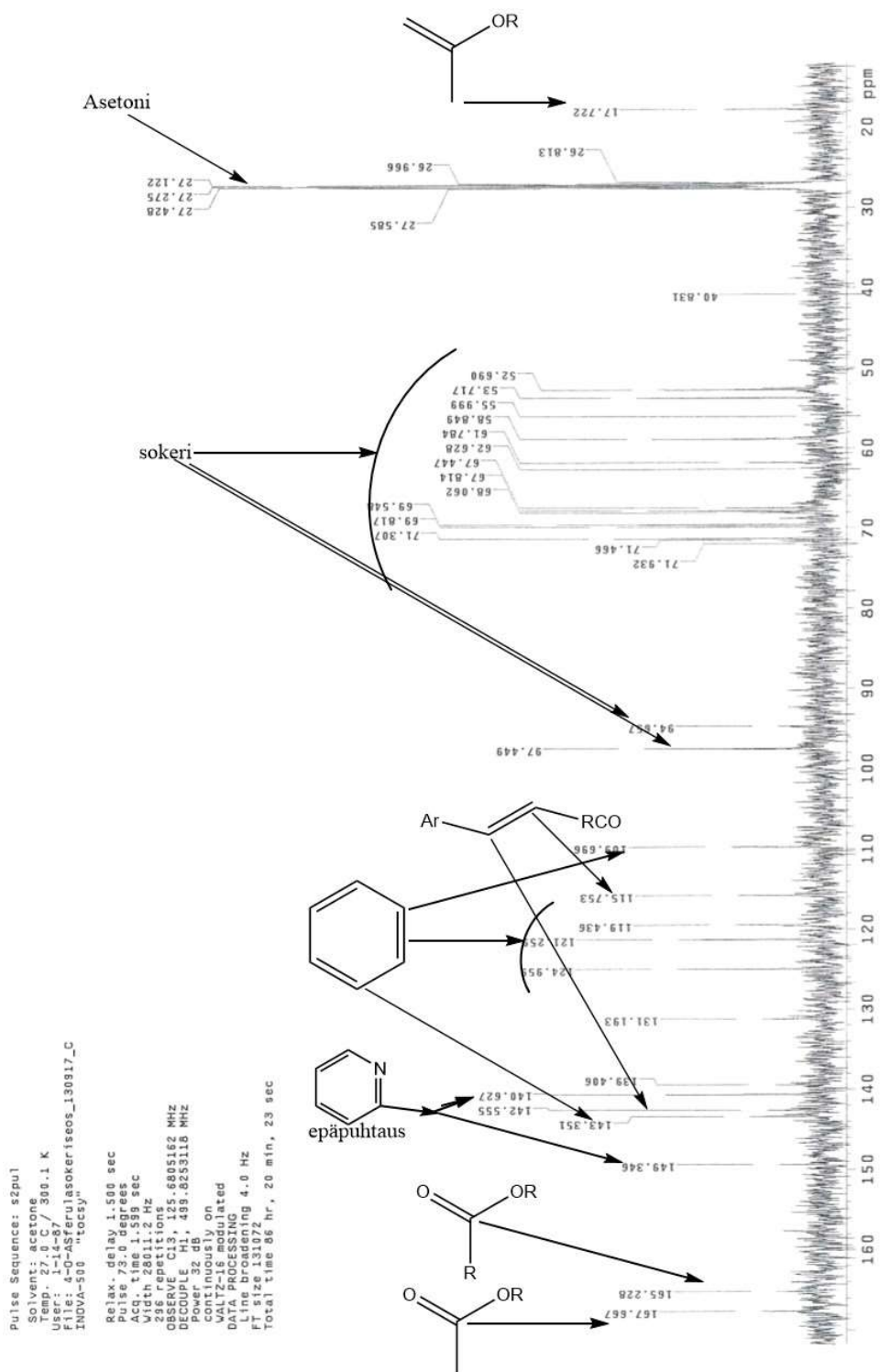
Liite 2. 4-O-asetyyliferulahappokloridin ^{13}C -NMR spektri.



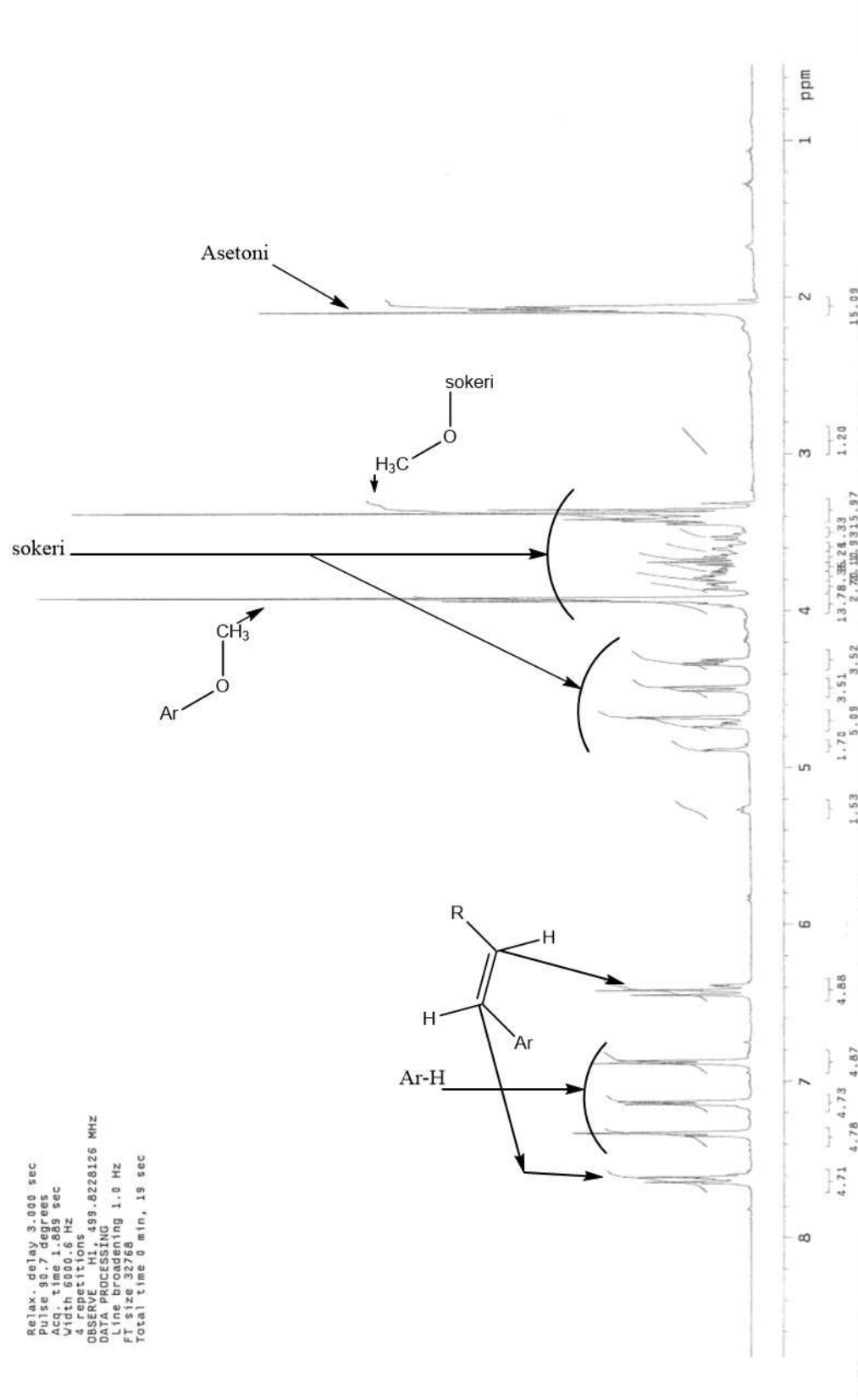
Liite 3. Metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen ^1H -NMR.



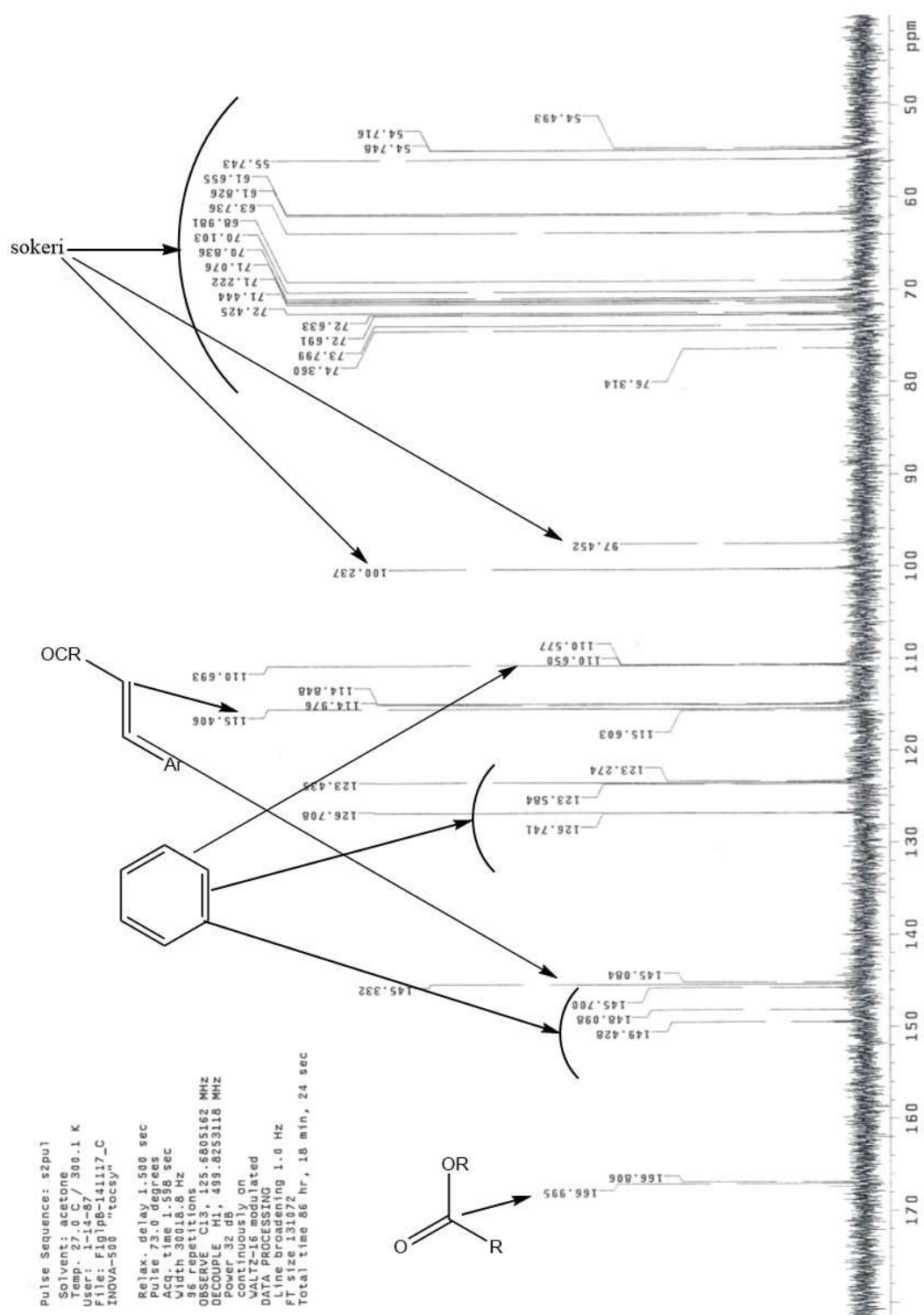
Liite 4 Metyyli 4-O-asetyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen ^{13}C -NMR.



Liite 5. Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen $^1\text{H-NMR}$.



Liite 6. Metyyli feruloyyli- α -D-glukopyranosidin isomeeriseoksen ^{13}C -NMR.



Liite 7. EZ Prep flashkromatografia lopputuotteelle.

Sample: fglepseos021017f11t13

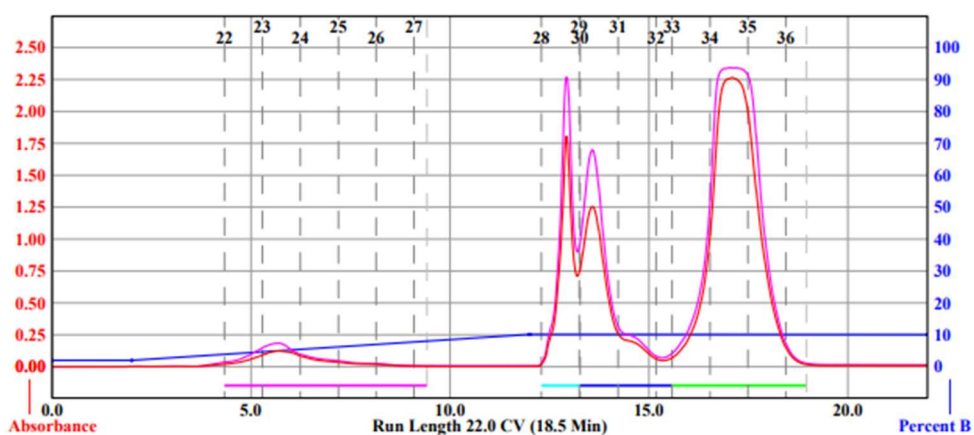
EZ Prep

Monday 02 October 2017 02:29AM

RediSep Column: Silica 12g
 SN: E041508B92AA56 Lot: 271832405Z
 Flow Rate: 20 ml/min
 Equilibration Volume: 3.0 CV
 Initial Waste: 0.0 CV
 Air Purge: 0.5 min
 Solvent A: Dichloromethane
 Solvent B: Methanol

Peak Tube Volume: 16 ml
 Non-Peak Tube Volume: 16 ml
 Loading Type: Solid
 Wavelength 1 (red): 254nm
 Peak Width: 1 min
 Threshold: 0.20 AU
 Wavelength 2 (purple): 280nm

Run Notes:

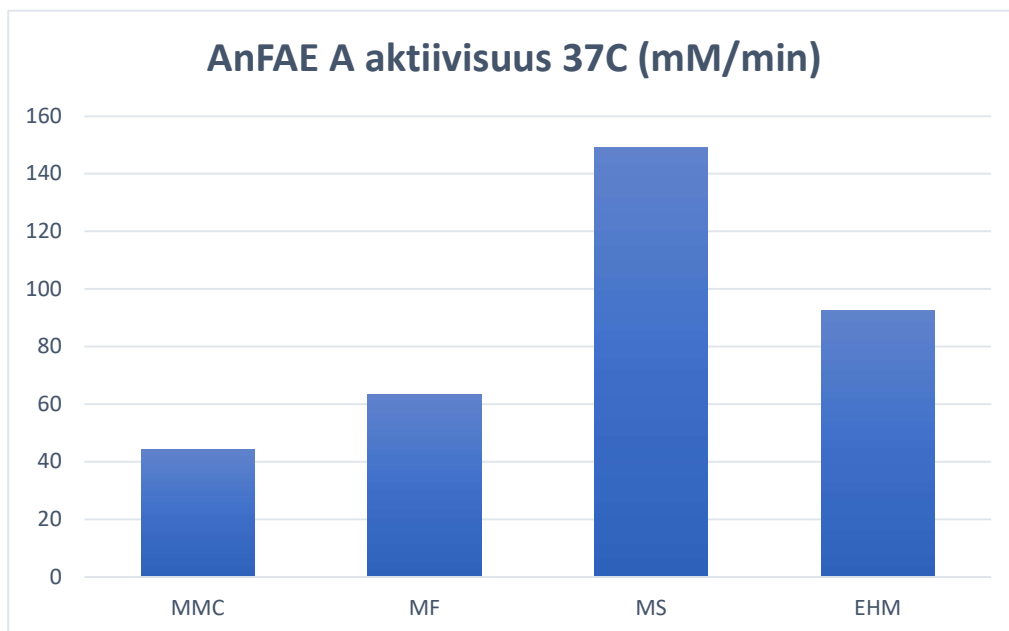


Rack A					Peak #	Start Tube	End Tube
71	72	73	74	75	1	A:22	A:27
70	69	68	67	66	2	A:28	A:29
61	62	63	64	65	3	A:30	A:32
60	59	58	57	56	4	A:33	A:36
51	52	53	54	55			
50	49	48	47	46			
41	42	43	44	45			
40	39	38	37	36			
31	32	33	34	35			
30	29	28	27	26			
21	22	23	24	25			
20	19	18	17	16			
11	12	13	14	15			
10	9	8	7	6			
1	2	3	4	5			

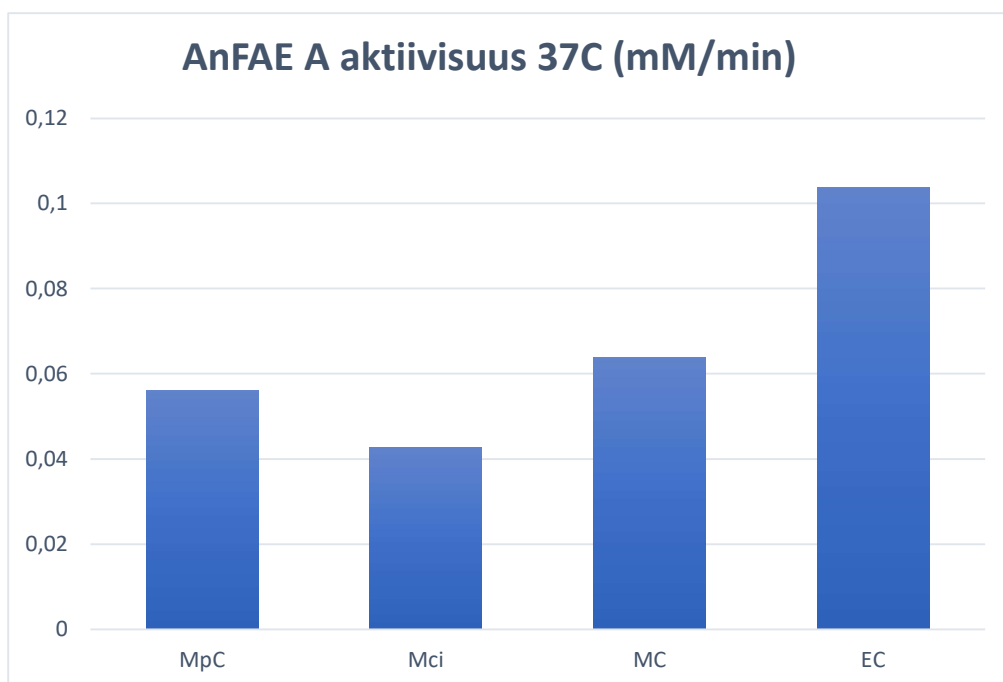
Duration	%B	Solvent A	Solvent B
0.0	2.0	Dichloromethane	Methanol
2.0	2.0	Dichloromethane	Methanol
10.0	10.1	Dichloromethane	Methanol
10.0	10.0	Dichloromethane	Methanol

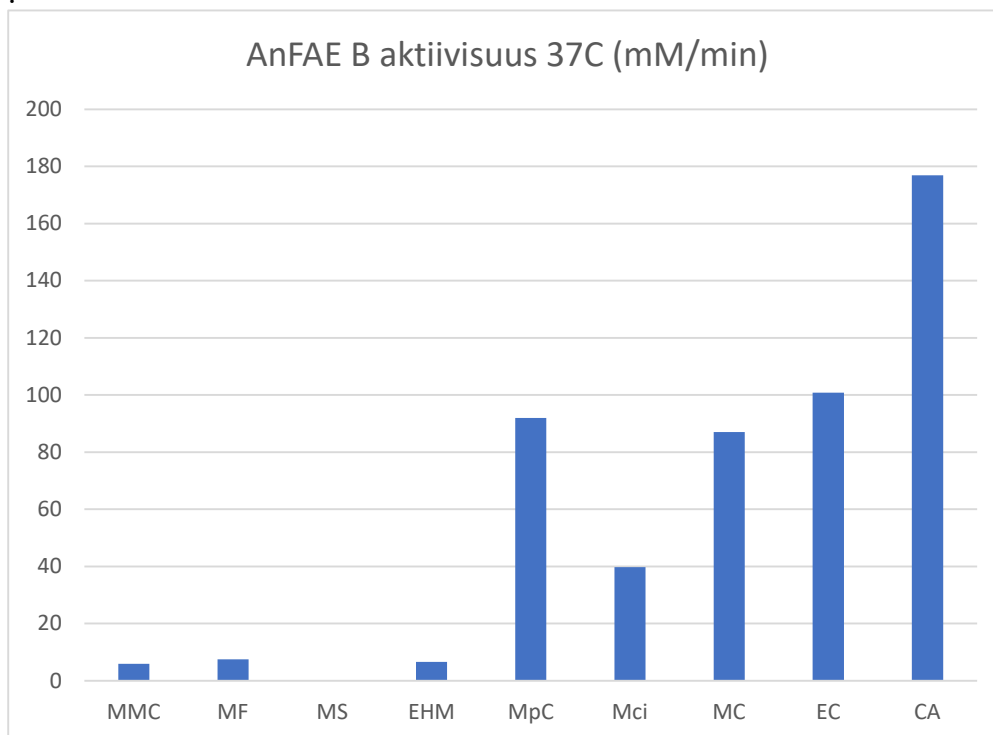
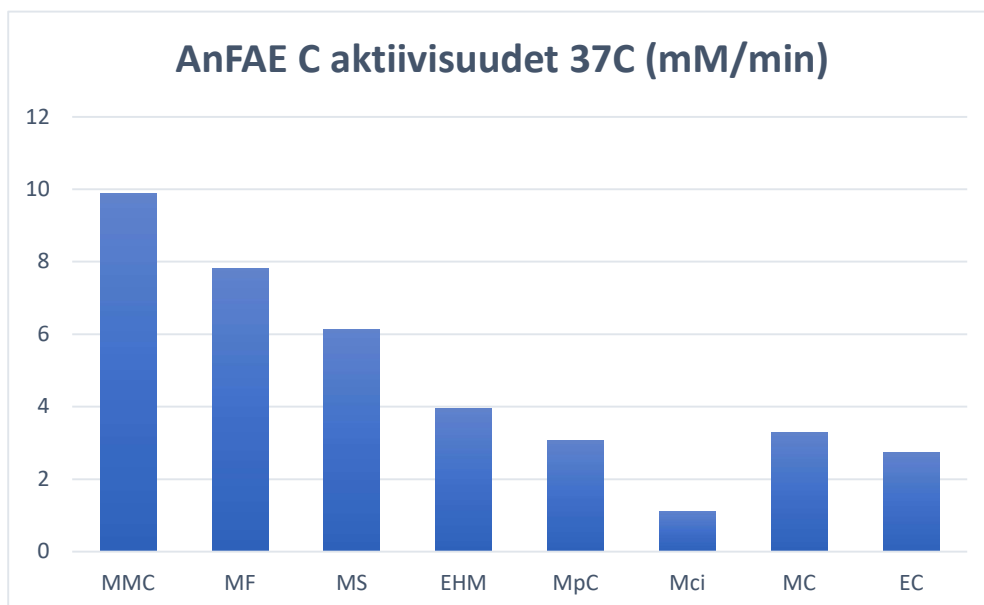
16 mm x 150 mm Tubes

Liite 8. *AnFAE A* aktiivsus MF, MS, MMC ja EHM.



Liite 9. *AnFAE A* aktiivsus MpC, MCI, MC ja EC.



Liite 10. *AnFAE B* aktiivisuus kaikilla substraateilla.**Liite 11.** *AnFAE C* aktiivisuudet 37C kaikilla substraateilla.

Liite 12. AnFAE D aktiivisuus kaikilla substraateilla.