



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

Ligniinin mallikomponenttien entsymaattinen valorisaatio

Konsta Rekinen

PROSESSITEKNIIKAN TUTKINTO-OHJELMA

Kandidaatintyö

Kesäkuu 2021

TIIVISTELMÄ

Ligniinin mallikomponenttien entsymaattinen valorisaatio

Konsta Rekinen

Oulun yliopisto, Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2021, 38 s.

Työn ohjaajat yliopistolla: Idamaria Romakkaniemi, Juha Ahola

Tässä tutkielmassa perehdytään ligniiniin ja sen mallikomponenttien valorisaatioon, sekä siitä saatavien fenolisten yhdisteiden hyötykäyttöön. Ligniini on epätavallisen rakenteen omaava polyfenoli, joka on selluloosan jälkeen kasvin yleisin rakennekomponentti. Ligniinin muodostumisreaktiossa radikaaliyhdisteet liittyvät toisiinsa luoden epäsymmetrisen kolmiulotteisen polymeerin. Ligniinin monimutkaisessa rakenteessa esiintyy useita yksinkertaisia fenoleita, joita voidaan erottaa yhdisteestä ja käyttää lukuisissa reaktioissa lähtöaineina. Erotus on kuitenkin haastavaa, joten ligniinin pääkäyttökohde onkin energiantuotannossa poltettuna.

Lehtipuiden ligniinissä esiintyy kahta erilaista aromaattista ydintä: guajasyyli- ja syringyyliydintä. Näistä ytimistä voidaan vastaavasti johtaa guajakolia (2-metoksifenoli) ja syringolia (2,6-dimetoksifenoli). Guajakolista voidaan vuorostaan johtaa 3-metoksi-L-tyrosiinia, jota lääketieteellisyydessä käytetään aihiolääkkeenä L-dopa syöpälääkkeelle. L-tyrosiinijohdannaisten synteesiä katalysoidaan käyttämällä tyrosiinifenolilyaasi entsyymiä (TPL). TPL tarvitsee toimiakseen pyridoksaali 5'-fosfaattia (PLP) kofaktorina. TPL kykenee katalysoimaan reversiibeliä reaktiota, jossa fenoli, pyruvaatti ja ammoniumioni reagoivat muodostaen L-tyrosiinin johdannaisia. Reaktiossa voidaan käyttää entsyymien GMO-varianttia M379V, joka on todistetusti soveltuvin variantti reaktiolle, jossa fenolina toimii guajakoli.

Lehtipuiden ligniinin aromaattisista johdannaisista, guajakolista ja syringolista, voidaan guajakolia hyödyntää L-tyrosiinijohdannaisten muodostumisreaktiossa substraattina. Syringoli kuitenkin vaikuttaa tyrosiinifenolilyaasin toimintaan eri tavalla kuin guajakoli, mikä on tässä tutkielmassa mielenkiinnon kohteena.

Kokeellisessa osuudessa tutkitaan guajakolin reagoitua 3-metoksi-L-tyrosiiniksi, sekä syringolin mahdollista vaikutusta entsyymien toimintaan. Tämän lisäksi tutkinnan alla on entsyymien olomuodon vaikutus reaktioon, sekä koejärjestelyistä syntyvä virheprosentti. Syringolin vaikutusta tarkastellaan kolmesta reaktiosta, joissa syringolin konsentraatiot ovat eri suuruksia. Reaktioissa fenolisena substraattina toimi guajakoli. Reaktioiden lähtöaineet olivat puhtaita kemikaaleja.

Koetuloksia tarkastellessa keskitytään kokeiden reaktionopeuksiin, sekä substraattien kulutuksiin ja konversioihin. Astiassa, jossa syringolia ei ollut ollenkaan, havaittiin stabiilimpi reaktionopeus, sekä suurempi substraatin kulutus. Virheprosenttien mittauksissa arvot pysyivät viitteiden sisällä, joten voidaan olettaa tuloksien olevan luotettavia. Entsyymien olomuotojen vaikutuksen tutkinnassa huomattiin entsyymien kokosolumuodolla olevan suurempi tuotto, kuin entsyymien kylmäkuivatulla lysaatilla.

Näillä tuloksilla voidaan tulevaisuudessa optimoida erilaisia reaktiosarjoja, joissa on tarkoituksena käyttää ligniiniä synteettisen reaktion lähtöaineena. Tämän lisäksi koesarjojen tuloksia voidaan käyttää apuna määrittäessä tarpeellista entsyymien olomuotoa tulevissa koesarjoissa.

Asiasanat: Guajakoli, Syringoli, Ligniini, Tyrosiinifenolilyaasi, Biokonversio

ABSTRACT

Enzymatic valorization of lignin model compounds

Konsta Rekinen

University of Oulu, Degree Programme of Process Engineering

Bachelor's thesis 2021, 38 pp.

Supervisors at the university: Idamaria Romakkaniemi, Juha Ahola

This study examines lignin and its valorization, as well as the utilization of phenolic compounds derived from it. Lignin is an unusually structured polyphenol that, after cellulose and hemicellulose, is the most common structural component of a plant. In the lignin formation reaction, radical compounds bond together to form an asymmetric three-dimensional polymer. There are several simple components in the complex structure of lignin that can be separated from the compound and used as raw materials in numerous reactions. However, breaking lignin into its basic components is challenging, so the main use of lignin is in energy production as fuel.

There are two different nuclei in lignin derived from hardwood: guaiacyl and syringyl nuclei. Guaiacol (2-methoxyphenol) and syringol (2,6-dimethoxyphenol) are phenolic compounds that can be derived from these nuclei, respectively. Similarly, 3-methoxy-L-tyrosine, which is used in the pharmaceutical industry as a prodrug for the anti-cancer drug L-dopa, can be synthesized from guaiacol. The synthesis of L-tyrosine derivatives is catalyzed using the enzyme tyrosine phenol lyase (TPL). TPL requires pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as a cofactor to function. TPL can catalyze a reversible reaction in which phenol, pyruvate, and ammonium ion react to form an L-tyrosine derivative. The GMO variant of the enzyme, M379V, can be used in the reaction, which has been proven to be the most suitable variant for a reaction where guaiacol is the main phenolic substrate.

Out of the phenolic derivatives from hardwood lignins, guaiacol and syringol, guaiacol can be utilized as a substrate in the formation of L-tyrosine derivatives. However, the way syringol behaves around tyrosine phenol lyase differs from guaiacol, which is the main point of interest in this study's experimental section.

The experimental part of the study examined the reaction of guaiacol to 3-methoxy-L-tyrosine, as well as the possible effects of syringol on the enzyme. In addition to this, the enzyme's forms effect on the reaction, as well as the error rate of the experiments, were under investigation. To examine the effect of syringol, three reactions were performed with different concentrations of syringol. In the reactions, the phenolic substrate was guaiacol. The substances in the reactions were pure chemicals.

Examination of the results focused on the reaction rates of the experiments, as well as the consumption and conversions of the substrates. In a vessel without syringol, a more stable reaction rate was observed, as well as higher consumption than in vessels to which syringol had been added. In the error rate measurements, the values remained within the references, so the results can be assumed to be reliable. In the study of the effect of enzyme states, it was found that the whole cell form of the enzyme produces a higher yield than the enzyme as lyophilized lysate.

These results can be used to optimize various reaction series in the future with the intention of using lignin as a source of substances. In addition, the results of the experiments can be used to help determine the state of the enzyme required for future reactions.

Keywords: Guaiacol, Syringol, Lignin, Tyrosine phenol lyase, Bioconversion

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYSLUETTELO

MERKINNÄT JA LYHENTEET

| | |
|---|----|
| 1 Johdanto | 7 |
| 2 Ligniinin entsyymattainen hyödyntäminen..... | 8 |
| 2.1 Ligniinin rakenne | 8 |
| 2.2 Ligniinin fenoliset yhdisteet..... | 11 |
| 2.3 Entsyymattainen valorisaatio | 12 |
| 3 Kromatografinen analyysi..... | 14 |
| 4 Materiaalit ja menetöt | 16 |
| 4.1 Koejärjestelyt | 16 |
| 4.1.1 Työliuokset | 16 |
| 4.1.2 Tyrosiinifenolilyyaasin rehydraus | 17 |
| 4.1.3 Näytteiden analysointi | 18 |
| 4.2 Syringolin vaikutuksen tarkastelu | 19 |
| 4.3 Koejärjestelyiden virheen arviointi | 19 |
| 4.4 Entsyymien eri olomuodot | 20 |
| 4.5 Kaavakokoelma..... | 21 |
| 5 Tulosten tarkastelu | 22 |
| 5.1 Syringolin vaikutus guajakolin konversioon..... | 22 |
| 5.2 Virheen estimointi..... | 28 |
| 5.3 Kokosoluentsyymien vaikutus | 30 |
| 6 Johtopäätökset..... | 32 |
| 7 Yhteenveto | 34 |
| LÄHDELUETTELO..... | 36 |

MERKINNÄT JA LYHENTEET

| | |
|---------------|---|
| DAD, D | Diode-Array Detector |
| GMO | Geenimuunneltu organismi |
| GUA | Guajakoli |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography (Korkean erotuskyvyn nestekromatografia) |
| J | Kylmäkuivattu lysaatti |
| K | Entsyimin kokosolumuoto |
| KPi | Kaliumfosfaatti |
| PLP | Pyridoksaali 5'-fosfaatti |
| PYR | Pyruvaatti |
| R | Reaktionopeus |
| RID, R | Refractive Index Detector |
| rpm | Kierroksia minuutissa |
| SYR | Syringoli |
| TPL | Tyrosiinifenolilyaasi |
| U | Entsyimin aktiivisuus ($\mu\text{mol}/\text{min}$) |
| X | Konversio |

1 JOHDANTO

Biopohjaiset vaihtoehdot kemiallisesti valmistettaville aineille ovat kasvavassa suosiossa nyky-yhteiskunnassa ja useita tutkimuksia suoritetaan kasvipohjaisille materiaaleille yhä tiheämmin. Kasvimaailmasta kotoisin oleva ligniini on ollut kiinnostuksen kohteena biotekniikan maailmassa sen hyvän esiintyvyyden vuoksi.

Ligniini on selluloosan jälkeen kasvin yleisin rakennekomponentti. Kasvilajikkeesta riippuen sen rakenteesta on 18–30 % ligniiniä. Ligniinin tehtävä on vahvistaa kasvin rakennetta, sekä suojella kasvia haitoilta, kuten tietyiltä lahottavilta mikrobilajikkeilta. Rakenteeltaan ligniini on erittäin heterogeeninen molekyyli, ja se on prekursori useille johdannaisille sen monimutkaisen ja laajan rakenteen vuoksi. Ligniinin hyötykäyttäminen on kuitenkin erittäin vaativaa sen kompleksin rakenteen vuoksi. Tämän vuoksi ligniini on tällä hetkellä laajalti sivuutettu luonnontuote, ja tutkielman kirjoitushetkellä sitä hyödynnetäänkin pääasiassa polttoaineena energiantuotannossa. (Saake et al., 2007; Lebo et al., 2001)

Ligniinistä voidaan johtaa useita fenolisia yhdisteitä, joita käytetään esimerkiksi lääketeollisuudessa prekursoreina useille lääkeaineille. Ligniinin aromaattisista komponenteista voidaan syntetisoida L-tyrosiinin johdannaista, joiden käyttö syöpälääkkeinä on ollut usean tutkimuksen kohteena. Lääketeollisuuden kemialliset prosessit ovat raskaita ympäristölle niiden synteettisten raaka-aineiden vuoksi, joten ligniini on raaka-aineena ekologinen vaihtoehto ja todennäköisesti vähentää huomattavasti teollisuusjätettä, kuten myös saasteita. L-tyrosiinin johdannaista syntetisoidaan fenolin, pyruvaatin ja ammoniumionin reaktiossa. Tätä reaktiota katalysoidaan entsyymillä, joka on luonnonmukaisempi vaihtoehto verrattuna synteettisiin katalyytteihin. (Seisser et al., 2010)

Tässä tutkielmassa tarkastellaan ligniiniä yleisesti, sekä sen komponenttien hyötykäyttöä. Tarkoituksena on tarkastella ligniinin käyttöä L-tyrosiinin johdannaisten synteessissä mallintamalla ligniiniä puhtailla monofenolisilla kemikaaleilla.

2 LIGNIININ ENTSYMAATTINEN HYÖDYNTÄMINEN

Ligniini, peräisin latinankielisestä sanasta lignum (puu), on putkilokasveissa esiintyvä amorfinen polyfenolinen yhdiste. Putkilokasveissa esiintyvistä kolmesta pääaineesta, selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini, on ligniini toiseksi yleisin aine. (Saake et al., 2007)

Ligniini on suurin uusiutuva lähde aromaattisille yhdisteille, ja sitä voidaan mahdollisesti käyttää useiden aromaattisten kemikaalien raaka-aineena. Tämä tarjoaisi ekologisemman vaihtoehdon laajalti käytetyille maaöljypohjaisille BXT-yhdisteille, eli bentseenille, xyleenille ja toluenille. (Sun et al., 2018)

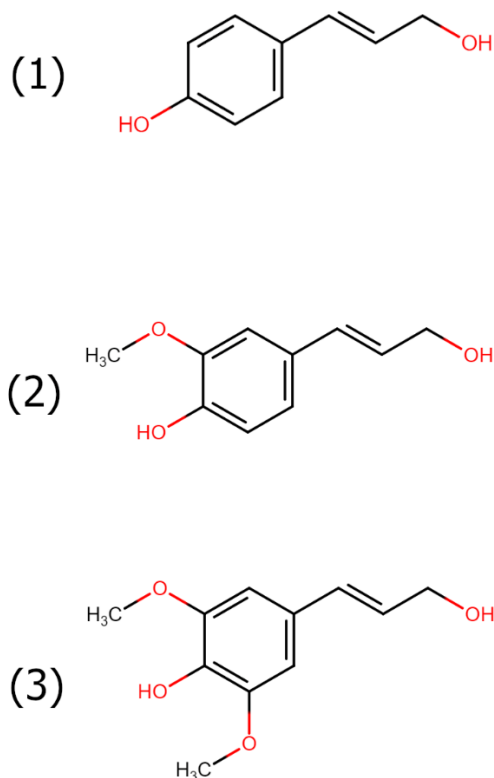
Paperiteollisuudelle ligniini on haluatonta ainetta, sillä ligniini muuttuu kellertäväksi ilman kanssa kontaktissa, joka ei ole lopputuotteessa hyväksi. Vanha sanomalehtipaperi on usein kellertävää ligniinin huonon eristämisen vuoksi. Tämän vuoksi paperiteollisuudessa ligniini eristetään puukuiduista kemiallisesti muuntamalla ligniiniä vesiliukoiseen muotoon, jonka jälkeen ligniini pystytään eristämään selluloosasta helpommin. Aineen rajallisten käyttökohteiden vuoksi ylijäämä ligniini yleensä poltetaan energiantuotannossa. (Saake et al., 2007; Lebo et al., 2001)

2.1 Ligniinin rakenne

Ligniinillä on useita eri tarkoituksia kasvin olemassaolon kannalta. Ligniini on luonteeltaan lipofiili ja liukenee ainoastaan rasvoihin. Tämä tekee ligniinistä hydrofobisen yhdisteen. Ligniinin hydrofobisen luonteen vuoksi kasvisolu ei ylikyllästy vedellä, joten solun rakenne on jäməkämpä, täten vahvistaen kasvin yleistä rakennetta. Tämän ohessa ligniini kuljettaa vettä kaikkialle kasviin. Kasvin läpi kulkiessa vesi kuljettaa tärkeitä mineraaleja ja ravinneaineita. Ligniini täten auttaa kasvin ravinnonsaannissa. Ligniini sitoo hemiselluloosan kanssa kasvin soluja toisiinsa, luoden vahvan komposiittirakenteen, joka kestää hyvin puristusta, iskuja ja taivutusta. Ligniini on myös luonnostaan antimikrobinen yhdiste, joten ligniini auttaa kasvia puolustautumaan haitallisia mikro-organismeja vastaan ja täten hidastaa kasvin lahoamista. (Saake et al., 2007; Lebo et al., 2001)

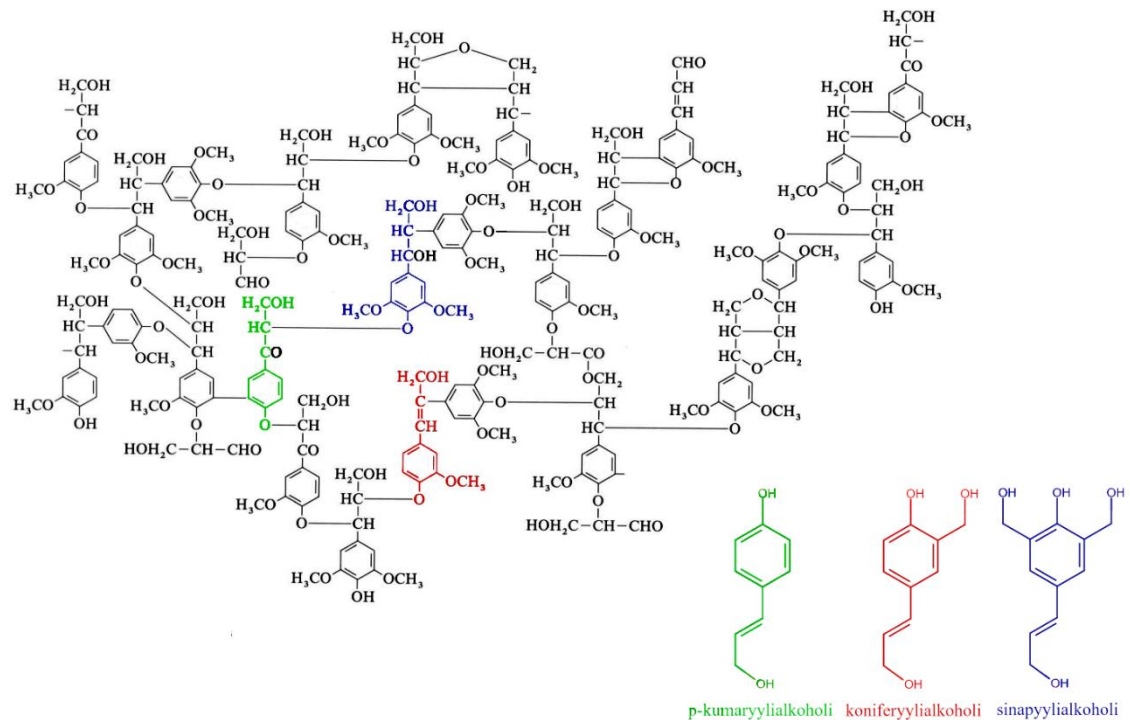
Havupuussa voi olla ligniiniä jopa 33 %, kun taas lehtipuissa 25 % ja ruohossa voi ligniiniä esiintyä 24 %. Putkilokasveissa ligniini esiintyy keskilamellissa suurimmassa konsentraatiossa, toisin sanoen soluseinien välisessä tilassa. Keskilamellin ligniinikonsentraatio voi olla jopa 70 %, mutta kasvin suurin ligniinivara ei kuitenkaan esiinny siellä. Suurin osa kasvin ligniinistä sijaitsee toissijaisissa soluseinissä. Toissijaisissa soluseinissä voi olla jopa 80 % kasvin ligniinivarannoista. Tämän vuoksi toissijainen soluseinä on yksi putkilokasvin vahvimmista rakenneosista, ja vahvistaa täten koko kasvia. (Saake et al., 2007)

Polymeerinä ligniini on sattumanvaraisesti haarautunut ja eroaa muista luonnonomaisista polymeereistä. Tätä voidaan selittää tarkastelemalla ligniinin rakenneosia. Ligniinin rakenneosien prekursorit, monolignolit, ovat monomeerisia alkoholeja, joita esiintyy ligniinin rakenteessa kolmea erilaista: p-kumaryylialkoholi (1), koniferyylialkoholi (2) ja sinapyylialkoholi (3). Prekursorit ovat esiteltynä kuvassa 1. (Lebo et al., 2001)



Kuva 1. Ligniinissä esiintyvät monolignolit.

Ligniinin sattumanvarainen rakenne juontuu sen biosynteesistä. Ligniinin biosynteesissä kasvin monolignolit dehydrautuvat, jonka jälkeen näiden monofenolien pohjalta syntyneet radikaaliyhdisteet liittyvät toisiinsa. Radikaalien välituotteiden vuoksi ligniini saa epätasaisen muodon. Tämä sattumanvarainen pariutuminen johtaa kolmiulotteiseen polymeeriin. Ligniinin sattumanvarainen rakenne on havainnollistettuna kuvassa 2. (Lebo et al., 2001)



Kuva 2. Pyökin ligniinin rakenne. Monolignolit korostettuna. Muokattu Nimz, 1974.

Kasveissa esiintyvien rakenneosien perusteella voi syntyä useita eri polymeerityyppejä. Lehtipuille ominaista ligniiniä kutsutaan guajasyyli-syringyyli ligniiniksi. Tämä ligniinityppi koostuu koniferyyli- ja sinapyylialkoholeista vaihtelevilla seossuhteilla. Ruohossa esiintyvät ligniinit ovat myös koniferyyli- ja sinapyylialkoholeihin pohjautuvia guajasyyli-syringyyli ligniinejä, mutta niissä voi esiintyä pieniä määriä p-kumaryyliperäisiä komponentteja. Havupuut sisältävät suuria määriä koniferyylialkoholia, ja niiden ligniinit rakentuvat myös pääasiassa koniferyylialkoholista. Havupuissa esiintyvä guajasyyli-ligniini koostuukin 90 % koniferyylialkoholista, ja loput 10 % on p-kumaryyliä. (Lebo et al., 2001; Azadi et al., 2013)

Ligniinin hiiliatomien väliset sidokset ovat pääosin happisilloja, ja ligniini sisältää hyvin monta eetteriryhmää. Ligniinin rakenteessa on useita eri funktionaalisia ryhmiä muun muassa fenolisia hydroksyyliä, alifaattisia hydroksyyliä, ja bentsyyli alkoholeja, joiden ansiosta ligniini pystyy reagoimaan useiden eri aineiden kanssa. Tavanomaisimmat liitokset ligniinin polymerisointiprosessissa ovat β -O-4-aryylieetterisidoksia. (Azadi et al., 2013)

2.2 Ligniinin fenoliset yhdisteet

Puussa esiintyvä ligniini on erittäin heterogeeninen yhdiste, jonka rakenteessa esiintyy kahta erilaista aromaattista ydintä: guajasyyli- (4-hydroksi-3-metoksifenyyli) ja syringyyli- (3,5-dimetoksi-4-hydroksifenyyli) ydintä. Ligniinin rakenne vaihtelee hyvin paljon eri puutyypin välillä; havupuuligniineissa on vain guajasyyliä, kun taas lehtipuuligniineissa esiintyy molempia guajasyyli- ja syringyyliyksiköitä. (Asmadi et al., 2011)

Pyrolyysipohjaiset menetelmät ovat hyviä ligniinin fenolisten yhdisteiden erottamisessa ja muuntamisessa biokemikaaleiksi. Pyrolyysillä tarkoitetaan kemikaalin rakenteen hajottamista korkeissa lämpötiloissa ja lähes hapettomissa olosuhteissa. Puun nopealla pyrolyysillä voidaan tuottaa suuria määriä orgaanista nestettä, joka sisältää useita ligniinipohjaisia aromaattisia kemikaaleja, jotka voidaan myöhemmin erottaa komponenteiksi. Kuitenkin huonon selektiivisyyden vuoksi vaadittavat erotusprosessit ovat vaivalloisia ja kalliita, mikä rajoittaa pyrolyyttisten metodien käytäntöä. (Kawamoto, 2017; Asmadi et al., 2011)

Pyrolyysi yhdistettynä kromatografian ja massaspektrometrian kanssa tarjoaa hyödyllistä tietoa ligniinin rakenteesta. Analyysistä voidaan nähdä, että ligniinistä erotettavat guajakoli (2-metoksifenoli) ja syringoli (2,6-dimetoksifenoli) voidaan tuottaa lehtipuiden ligniineistä. Nämä johdannaiset sisältävät useita kaksoisyhdisteitä, ketoniryhmiä ja hydroksyyliyksiköiden p-sijainneissa olevia alkyylisivuketjuja. Fenoleiden rakenteita tarkastelemalla voidaan määrittää syringyyli ja guajasyyli komponenttien suhde toisiinsa, ja täten voidaan todeta, että guajakoli ja syringoli voidaan tuottaa lehtipuuligniinin pohjalta syringyyli- ja guajasyyliyksiköistä. (Asmadi et al., 2011)

2.3 Entsymaattinen valorisaatio

Ligniinin fenolisista yhdisteistä voidaan syntetisoida useita aineita, joita voidaan käyttää esimerkiksi lääketeollisuudessa. Näistä aineista puhtaat L-tyrosiinijohdannaiset ovat prekursoreita syöpälääkkeille. Johdannaisia voidaan käyttää myös biokemiallisina merkkiaineina aineenvaihdunnassa, ja ne ovat tärkeitä aminohappoja synteettisessä biologiassa. 3-metoksi-L-tyrosiini on yksi pääasiallisista biokemiallisista tunnusmerkeistä aromaattisen L-aminohappodekarboksylaasin vajeesta ihmiskehossa. 3-metoksi-L-tyrosiini toimii L-dopan aihiolääkkeenä, ja muuntuu aineenvaihdunnassa inertistä aineesta aktiiviseksi lääkeaineeksi. Aine on L-dopaa huomattavasti stabiilimpi ja sitä voidaan hyödyntää Parkinsonin-taudin hoidossa. (Seisser et al., 2010; Dennig et al., 2015)

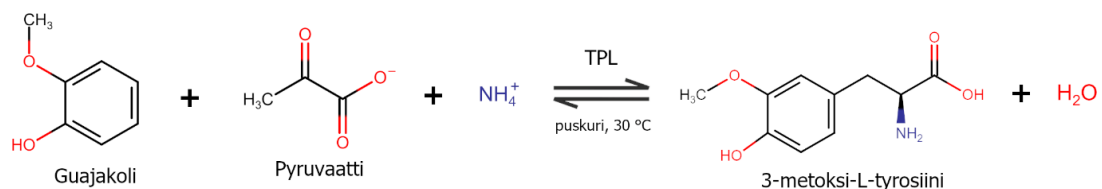
Johdannaisten synteesi on monivaiheinen prosessi, jossa yksinkertaisista lähtöaineista muodostuu kompleksisia tuotteita de novo -synteessissä. Synteessissä tuotteeksi muodostuu rasemaatti, jonka hyödynnettävät komponentit voidaan erottaa jatkojalostuksella. Synteessin helpotukseksi voidaan hyödyntää biokatalyyttistä C-C-liitöntä käyttäen tyrosiinifenolilyaasi entsyymiä edellyttäen, että fenoliset lähtöaineet ovat reaktiolle soveltuvia. (Dennig et al., 2015)

Tyrosiinifenolilyaasi (TPL) on monitoiminen entsyymi, joka voi katalysoida pyruvaatin, fenolin ja ammoniumionin välistä reaktiota muodostaen L-tyrosiinia ja sen johdannaisia. TPL voi katalysoida useita reaktioita, mukaan lukien reversiibeilejä hydrolyyttisiä katkaisuja (β -eliminaatiosarjoja), β -korvausreaktioita ja hävittämisreaktioita. TPL tarvitsee kofaktorikseen pyridoksaali 5'-fosfaattia (PLP), ja entsyymi voidaan aktivoida käyttäen joko ammoniumionia tai metallista kofaktoria. Tunnettuja entsyymien inhibiittoreita ovat o- ja m-substituoidut fenolit, L-alaniini, L-fenyyialaniini ja natriumkationi. TPL-entsyymi koostuu neljästä kemiallisesti samanlaisesta alayksiköstä, jotka ovat järjestäytyneet kahteen katalyyttiseen dimeeriin. Alayksiköt sitovat neljä PLP-molekyyliä jokaista tetrametriä kohti. (Henderson et al., 1999; Raboni et al., 2010)

Entsyymiä on eristetty monista eri bakteerilajikkeista, mutta suurin osa tutkimuksista entsyymien parissa on keskittynyt enterobakteereihin (*Erwinia herbicola* ja *Citrobacter intermedius*) ja termofiilisiin bakteereihin (*Symbiobacterium toebii* ja *Symbiobacterium thermophilum*) niiden suurien aktiivisuuksien vuoksi. TPL-entsyymiä esiintyy kuitenkin eniten enterobakteereissa.

Entsyymiä voidaan tuottaa rekombinanttiproteiininä bakteerilajikkeissa syöttämällä entsyymiä koodaava plasmidi tarkasteltuun kasvatusisäntään, joka aloittaa entsyymien koodaamisen solun sisällä. Tämän jälkeen soluseinä rikotetaan ja valmistetut entsyymit kerätään. Vaikkakin tyrosiinifenolilyaasin katalyyttiset ominaisuudet ja sen erotuksen yksinkertaisuus ovat hyviä muihin entsyymeihin verrattuna, ovat sen heikko katalyyttinen aktiivisuus ja stabiilius rajoittavia tekijöitä entsyymien mahdollisissa käyttökohteissa. (Henderson et al., 1999; Xu et al., 2019)

Tässä työssä on käsitelty TPL-entsyymien GMO-varianttia M379V, joka on kokeellisesti määritetty soveltuvaksi 3-metoksi-L-tyrosiinin synteesille guajakolista (Seisser et al., 2010). Variantti on valmistettu *Citrobacter freundii* -organismien tyrosiinifenolilyaasia koodaavasta geenistä ja sitä voidaan kultivoida *Escherichia coli* -soluissa. M379V:ssä entsyymien pinnalla olevan aktiivisyöhykkeen aminohappoja on korvattu pienemmillä aminohapoilla, jotta vyöhykkeen pinta-ala olisi laajempi ja jotta fenoliselle substituutille olisi enemmän tilaa entsyymien pinnalla. Variantin pH-optimi on kokeellisesti määritetty välille 8–9 ja substratin konsentraation ollessa 55 mM saavutetaan entsyymien suurin aktiivisuus. Optimiolosuhteissa reversiibelin reaktion suunta on tuotteita kohti ja vastakkaisuuntaista reaktiota esiintyy vähemmän. Kokeissa suoritettu reaktio on esitettyä kuvassa 3. (Seisser et al., 2010)



Kuva 3. 3-metoksi-L-tyrosiinin muodostumisreaktio. Muokattu Seisser et al., 2010.

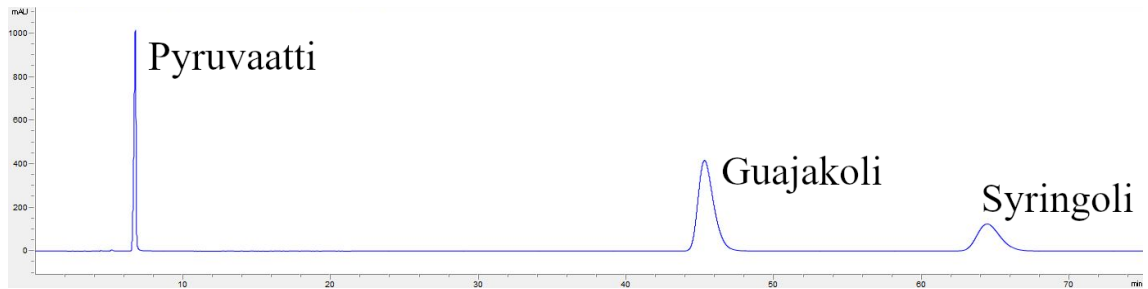
3 KROMATOGRAFINEN ANALYYSI

Kromatografialla tarkoitetaan analyysitekniikoita, joilla voidaan erotella seoksen eri molekyylilajikkeita toisistaan. Tekniikoiden periaate pysyy samana kaikilla varianteilla; molekyylilajikkeet ovat näytteessä, joka koostuu analyyyteistä ja matriiseista. Analyytit ovat tarkastelun kohteina olevia molekyylejä, kun taas matriisit koostuvat muista näytteen komponenteista. Kromatografisessa erottelussa näyte lisätään ”liikkuvaan faasiin”, joka ohittaa ”paikallaan olevan” faasin, mikä kerää liikkuvassa faasissa olevia molekyylilajikkeita samalla päästäen molekyylit takaisin virtaan tietyin väliajoin. Seurauksena liuenneet komponentit poistuvat systeemistä tietyn kokoisina keskittyminä, jonka myötä seoksen komponenteissa tapahtuu erotus. (Moldoveanu et al., 2012)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) paikallaan oleva faasi on huokoisia partikkeleita täynnä oleva kolonni, jonka läpi nestemäinen liikkuva faasi (eluentti) liikkuu. Liuotettavat partikkelit lisätään liikkuvaan faasiin pieninä tilavuuksina kromatografisen kolonnin päädyssä. (Moldoveanu et al., 2012)

Liikkuvan faasin edetessä siihen liuenneet partikkelit havaitaan eluentin poistuessa kolonnista. Liuenneet molekyylit erottuvat liikkuvan faasin komponenteista tietyillä fysikaaliskemiallisilla tavoilla (UV-heijastus, taitekerroin, fluoresenssi, moolimassa ja fragmentointi massaspektrometrissä), joiden avulla laitteisto pystyy erottamaan molekyylit toisistaan. (Moldoveanu et al., 2012)

Analyysissä virtauksen koostumusta mitataan detektoreilla, joita tässä työssä käytetään kahta erilaista: DAD (Diode-Array Detector) ja RID (Refractive Index Detector). DAD analysoi näytteen UV-valon läpäisevyyttä, kun taas RID analysoi näytteen taitekerrointa. Laitteiston havaitessa molekyylit, emittoituu detektorista sähköinen impulssi. Tämä sähköinen signaali rekisteröidään graafisesti, ja tätä impulssivastetta kutsutaan kromatogrammiksi. Seoksen komponentit ovat kromatogrammissa esiteltyinä piikkeinä, jotka kuvaavat aineen retentioaikaa, eli komponentin kulkuaikaa laitteiston läpi. Kromatogrammin muodostamia piikkejä esiteltyinä kuvassa 4. (Moldoveanu et al., 2012)



Kuva 4. Pyruvaatin, guajakolin ja syringolin muodostamat piikit kromatogrammilla.

HPLC:ssä analyytit erotetaan toisistaan ja matriisista mahdollisimman hyvin. Kun analyytit erotetaan toisistaan, niiden vyöhykkeet kromatogrammilla vaihtelevat leveydessä. Näiden vyöhykkeiden leveys indikoi aineiden erotuksen helppoutta. Kun aine rekisteröityy kromatogrammille kapealla vyöhykkeellä, on se helpompi erottaa muista aineista verrattuna komponenttiin, jonka vyöhyke on leveämpi. (Moldoveanu et al., 2012)

Kromatogrammin piikeillä voi olla eri korkeuksia riippuen useista tekijöistä, kuten seoksen ainemäärästä, injektoidun näytteen tilavuudesta ja detektorin herkkyudesta. Piikkien pinta-alan korreloitua aineen määrän mukaan, voidaan HPLC:tä käyttää kvantitatiiviseen tutkimukseen tiettyjen kalibrointien jälkeen. HPLC on täten erinomainen tekniikka erotusprosesseissa ja määrällisissä tutkimuksissa jopa erittäin komplekseja seoksia tutkittaessa. (Moldoveanu et al., 2012)

Tässä työssä tehdyt kokeet on analysoitu käyttäen korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. Laitteisto oli kalibroitu mittaamaan näytteiden pyruvaatin ja fenolisten yhdisteiden konsentraatioita.

4 MATERIAALIT JA METODIT

Laboratoriokokeissa tarkasteltiin L-tyrosiinijohdannaisen muodostumista ammoniumionista, pyruvaatista ja fenolista. Reaktiossa fenolina toimi guajakoli. Reaktiota katalysoitiin TPL entsyymillä GMO-variantilla M379V.

Alussa tarkoituksena oli tarkastella guajakolin muokkautumista hyödynnettäviksi aineiksi ja tutkia syringolia mahdollisena sijaisubstraattina. Alustavat koevalmistelut kuitenkin indikoivat, että entsyymillä aktiivisuus syringolia kohtaan on hyvin alhainen verrattuna muihin fenoleihin. Täten kokeissa tutkittiin syringolin vaikutusta TPL entsyymiin guajakolin muokkautumisen lisäksi.

4.1 Koejärjestelyt

Koesarjoja suoritettiin kolme kappaletta. Ensimmäisessä sarjassa suoritettiin kontrollikoe, sekä tutkittiin guajakolin reagoitua pyruvaatin kanssa, kuten myös syringolin mahdollista vaikutusta reaktion etenemiseen. Seuraavassa sarjassa määritettiin menetelmän virheitä toistokokeilla, ja kolmannessa tutkittiin entsyymillä eri olomuotojen vaikutusta reaktioon. Koetta varten reaktioastiaan lisättiin natriumpyruvaatin liuosta ja fenolisia yhdisteitä. Reaktioastiassa käytettiin kaliumfosfaattipuskuria (KPi-puskuri), joka toimi astiassa reaktiomediumina.

4.1.1 Työliuokset

Guajakolin ja pyruvaatin työliuokset valmistettiin taulukossa 1 olevien arvojen mukaan. Aineet sekoitettiin halutuissa määrin MilliQ-veteen, mutta syringolin huonon liukenevuuden vuoksi oli aine ensin valmistettava huumareessa tarkasti hienontaan. Fenolisten aineiden liuksista valmistettiin myöhemmin halutut seokset reaktioita varten. Työliuoksia lisättiin kokeissa reaktioastiassa olevaan puskuriliuokseen halutuissa määrin, jotta reaktiotilavuudeksi saataisiin 10 ml. Aineiden lisäämisen jälkeen oli 10 ml reaktiotilavuudessa 46 mM pyruvaattia ja 23 mM fenolisia yhdisteitä. Fenolisten yhdisteiden lisääminen käynnisti reaktion reaktioastiassa.

Taulukko 1. Reaktiön työliuokset.

| Aine | Tilavuus (ml) | Konsentraatio (mol/l) | Aineen määrä (g) |
|---------------|---------------|-----------------------|------------------|
| Guajakoli | 50 | 0,1 | 0,62 |
| Syringoli | 50 | 0,1 | 0,77 |
| Na-Pyruvaatti | 25 | 1 | 2,75 |

4.1.2 Tyrosiinifenolilyaasin rehydraus

Reaktioissa toimi TPL-entsyymien GMO-variantti M379V. Entsyymiä käytettiin kylmäkuivattuna lyaattina, kuten myös kokosolumuodossa. Kokosolumuodossa entsyymi oli kasvatusisännän *E. coli* bakteerin sisällä ja reaktioon lisättiin kyseinen entsyymien sisältävä solu pelkän entsyymien sijasta. Kokosoluentisyymien isännän *E. coli* biologisen uhkan vuoksi oli valmisteluissa käytetyt välineet steriloitava autoklaavissa, jotta bakteeri ei pääsisi ympäristöön.

Entsyymiä tarvitsevia reaktioita varten mitattiin entsyymiä reaktiutilavuuksiin 30 mg, jotta reaktion entsyymipitoisuudeksi saataisiin 3 mg/ml reaktiutilavuuden ollessa 10 ml. Entsyymipitoisuuden ollessa 3 mg/ml on entsyymien aktiivisuus 0,28 U. Tämä koskee entsyymien kokosolumuotoa, sekä entsyymien kylmäkuivattua lyaattia. Entsyymien olomuotojen sama aktiivisuus helpottaa reaktioiden vertailua keskenään, sekä vahvistaa tulosten oikeellisuutta.

Koska entsyymit olivat säilössä kuivattuina, oli niiden kolmiulotteinen funktionaalinen muoto palautettava. Palautus suoritettiin rehydraamalla entsyymeitä 0,07 M KPi-puskuriliuoksessa (pH 8). Puskuriliuos sisälsi kaliumfosfaattien lisäksi ammoniumionia (NH_4^+) ja pyridoksaali 5'fosfaattia (PLP), jotka ovat tarpeellisia entsyymien toiminnalle. Koska puskuriliuos toimi reaktioissa reaktiomediumina, käytettiin rehydrausastioita myös reaktioastioina, jotta liuoksen siirtelylle ei olisi tarvetta. Puskurin pH oli 8, joka ohjasi reaktion kulkua lopputuotteiden suuntaan, joten paluureaktiota tapahtui astiassa erittäin vähän.

Puskuriliuoksen ammoniumionin pitoisuus reaktiossa oli 180 mM ja PLP:n pitoisuus reaktiossa oli 0,04 mM. Rehydraus suoritettiin lisäämällä reaktioastioihin haluttu määrä entsyymiä, sekä vaadittava määrä puskuriseosta, jonka jälkeen reaktioastiat sijoitettiin Thermomixeriin (Eppendorf, Hampuri, Saksa) inkuboitumaan puoleksi tunniksi 30°C lämpötilaan 750 rpm sekoitusnopeudella. Puskuriliuos laimentui 0,05 mM KPi-pitoisuuteen substraattien, sekä muiden yhdisteiden, lisäämisen jälkeen.

4.1.3 Näytteiden analysointi

Näytteenottoa varten mitattiin näyteastioihin pieni määrä rikkihappoa reaktion pysäytystä varten. Rikkihapon tullessa kontaktiin entsyymien kanssa entsyymi denaturoituu, eli toisin sanoen menettää aktiivirakenteensa ja reaktio pysähtyy. Reaktion pysähtyttyä voidaan mitata seoksen koostumus tietyllä ajanhetkellä.

Reaktion pysäytyksen jälkeen väliastiaan lisättiin MilliQ-vettä, jotta näytetilavuudeksi saatiin 1,5 ml. Tämä mahdollisti analyysin HPLC-laitteistolla, sillä laimennetun näytteen happopitoisuus mukaili laitteistossa käytetyn eluentin happopitoisuutta. Näytteet sekoitettiin perusteellisesti ja suodatettiin näyteastioihin 0,45 µm suodattimen läpi, jonka jälkeen näyte sijoitettiin analyysilaitteistoon. Näytteitä otettiin ajanhetkillä: 0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h ja 24 h.

Tässä työssä tehdyt kokeet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) (Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, USA). HPLC-laitteisto oli varustettuna DAD- ja RID-detektoreilla. DAD (Diode-Array Detector) analysoi näytteen UV-valon läpäisevyyttä, kun taas RID (Refractive Index Detector) analysoi näytteen taitekerrointa. Molemmilla detektoreilla pystyttiin määrittämään näytteissä olevien fenolisten yhdisteiden ja pyruvaatin määrät.

Kolonnina analyysissä toimi IC Sep ICE-coregel 87H3 organic acids column (300 x 7.8 mm) (Transgenomic, Omaha, NE, USA), jonka läpi virtaavana eluenttina käytettiin 0,005 molaarista rikkihappoa (H₂SO₄). Eluentti virtasi kolonnin läpi nopeudella 0,8 ml/min 60°C lämpötilassa. Eluenttiin injektointiin näytettä 10 µl alkuperäisestä 1,5 ml näytteestä.

4.2 Syringolin vaikutuksen tarkastelu

Ensimmäisessä kokeessa tarkastelun kohteena oli guajakolin muokkautuminen hyödynnettäväksi aineiksi ja syringolin mahdollinen vaikutus reaktioon. Kokeessa käynnistettiin kolme yhtäaikaista reaktiota, joista otettiin näytteet tietyin ajanvälein.

Reaktiot käynnistettiin falcon-putkissa ja sijoitettiin Thermomixeriin inkuboitumaan 30°C lämpötilaan 750 rpm sekoitusnopeudella. Jokaisessa putkessa tapahtui oma reaktionsa. Ensimmäisessä putkessa suoritettiin kontrollireaktio, jossa guajakoli reagoi natriumpyruvaatin kanssa ilman entsyymien vaikutusta. Tässä testissä tarkasteltiin mahdollisia spontaaneja reaktioita fenolisten substraattien välillä ilman entsyymien vaikutusta. Reaktion tulosten pohjalta määritettiin nollatilanne, jota verrattiin tulevien entsyymattisten reaktioiden tuloksiin. Toisessa falcon-putkessa oli tarkkailussa guajakolin entsyymattinen reaktio ilman syringolia, ja kolmannessa oli syringoli-guajakoli liuosta entsyymien kanssa. Putkiin, joissa esiintyi useampaa kuin yhtä fenolia, mitattiin fenolisia yhdisteitä 50/50 seossuhteella.

4.3 Koejärjestelyiden virheen arviointi

Toisessa kokeessa oli tarkastelussa yleisistä koejärjestelyistä johtuva mahdollinen virheprosentti. Kokeessa käynnistettiin kolme kappaletta identtisiä reaktioita, joista otettiin näytteitä tietyin väliajoin. Tuloste pohjalta muodostettiin yksi keskiarvoinen tulossarja, jonka arvoista laskettiin keskimääräiset virheprosentit koejärjestelyille. Muodostettuja virheprosentteja ja keskihajontoja käytettiin kaikkien tutkielmassa syntyneiden tulosten analysointiin.

Koe sekä sen valmistelut suoritettiin lähes samalla tavalla kuin ensimmäisessä koesarjassa. Eroavana tekijänä oli fenolisten aineiden seossuhteen muutos. Ensimmäisessä kokeessa fenolit esiintyivät seoksessa 50/50 suhteessa, joka oli hyvä seossuhde syringolin mahdollisten inhiboivien ominaisuuksien vertailuun. Tässä kokeessa kuitenkin syringolin vaikutuksella ei ollut suurta merkitystä, joten syringolin määrä reaktiossa laskettiin kahteen prosenttiin, fenolin mahdollisen vaikutuksen säilyttämiseksi.

4.4 Entsyymien eri olomuodot

Kolmannessa kokeessa tarkasteltiin entsyymien olotilan vaikutusta reaktioihin. Kokeessa käytettiin tyrosiinifenolilyaasin kylmäkuivattua lysaattia, jota käytettiin edeltävissä reaktioissa, kuten myös entsyymien kokosolumuotoa. Entsyymien kokosolumuotoa hyödynnettiin jauhemaisen lysaatin lisäksi, sillä kokosolumuodolla voi olla stabiloiva vaikutus entsyymien toiminnalle ja täten voi kasvattaa reaktionopeutta. Entsyymien kokosolumuodon stabiloiva vaikutus on kuitenkin spekulatiivista ja väittämälle ei ole vankkoja todisteita kyseisen reaktion osalta. Kokeen tuloksista voidaan muodostaa johtopäätöksiä entsyymien toiminnasta, sekä selvittää kokosolumuodon mahdollisia vaikutuksia reaktion etenemiseen.

Kokosoluentisyymien laskennallinen aktiivisuus oli sama kuin kylmäkuivatulla lysaatilla (0,28 U), eli katalyyttisten ominaisuuksien puolesta reaktiot ovat keskenään verrattavissa. Kokeessa tarkoituksena oli replikoida pyrolyytisesti tuotettavan bioöljyn koostumusta, joten fenolisia substraatteja lisättiin reaktioastiaan 85/15 seossuhteella, joista guajakolia oli 85 % ja syringolia 15 %. Reaktiossa guajakolin pitoisuus oli 23 mM, sama kuin ensimmäisissä reaktioissa, mikä mahdollisti vertailun ensimmäisessä reaktiosarjassa suoritettujen kokeiden kanssa. (Du et al., 2013)

Kokosoluentisyymi oli säilössä jäädytettynä, joten entsyymi oli sulatettava käyttöä varten. Sulatus tapahtui siirtämällä entsyymi hitaasti huoneenlämpöön ensin pitämällä sitä jääkaapissa muutaman tunnin, jonka jälkeen entsyymi siirrettiin sulamaan huoneenlämpötilaan. Kokosoluentisyymiä rehydraatessa oli varmistettava, että entsyymi sekoittuu kunnollisesti puskuriliuoksen joukkoon, joten se oli huolella sekoitettava puskuriliuokseen ennen Thermomixeriin lisäämistä. Rehydraus suoritettiin samalla metodilla kuin edeltävissä kokeissa.

4.5 Kaavakokoelma

Kokeiden tarkastelussa hyödynnettiin reaktionopeuksia, jotta reaktion kulkua pystyttäisiin tarkastelemaan luotettavasti, sekä määrittämään reaktioiden välisiä eroja. Reaktionopeus laskettiin yhtälöllä 1.

$$R = \frac{n}{L \cdot \text{min}}, \quad (1)$$

missä R on reaktionopeus [$\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$],
 n on kuluneen substraatin ainemäärä [μmol],
 L on reaktiotilavuus [L] ja
 min on kulunut aika minuutteina.

Konversiota käytettiin virheprosenttien tarkastelussa, kun haluttiin määrittää reaktioiden yleiset keskihajonnat. Konversio laskettiin yhtälön 2 avulla.

$$X = \frac{c_1 - c_n}{c_1} * 100\%, \quad (2)$$

missä X on konversio [%],
 c_1 on substraatin alkukonsentraatio [g/l] ja
 c_n on substraatin konsentraatio tietyllä ajanhetkellä [g/l].

5 TULOSTEN TARKASTELU

Kokeiden tulokset ovat esitettyinä alla taulukoina ja graafeina. Tulokset on mitattu nestekromatografialaitteistolla, ja kahdella eri detektorilla. Tulokset on esitetty ainekohtaisesti lyhenteillä: PYR. (pyruvaatti), GUA. (guajakoli) ja SYR. (syringoli). Eri detektorit on esitetty aineen nimen perässä lyhenteellä R. (RID) tai D. (DAD). Entsyymien olomuoto on esitetty lyhenteellä J. (jauhe) tai K. (kokosolu). Tulosten nimikkeet ovat muotoa AINE-DETEKTORI-ENTSYYMI, esimerkkinä GUA-D-J.

5.1 Syringolin vaikutus guajakolin konversioon

Reaktioissa tarkasteltiin syringolin mahdollista haittavaikutusta entsyymien toimintaan ja vastaavasti guajakolin kulutukseen. Merkitään guajakolin reaktiota lyhenteellä G, ja reaktiota syringolin vaikutuksen alaisena lyhenteellä G+S. Reaktiossa G on guajakolia 23 mM, kun taas reaktiossa G+S on guajakolia puolet reaktion G määrästä, eli 11,5 mM. Tämä vaikeuttaa reaktioiden tulosten tarkastelua, sillä guajakolia on reaktioissa eriävä määrä. Reaktio G on kuitenkin verrattavissa muiden koesarjojen reaktioihin.

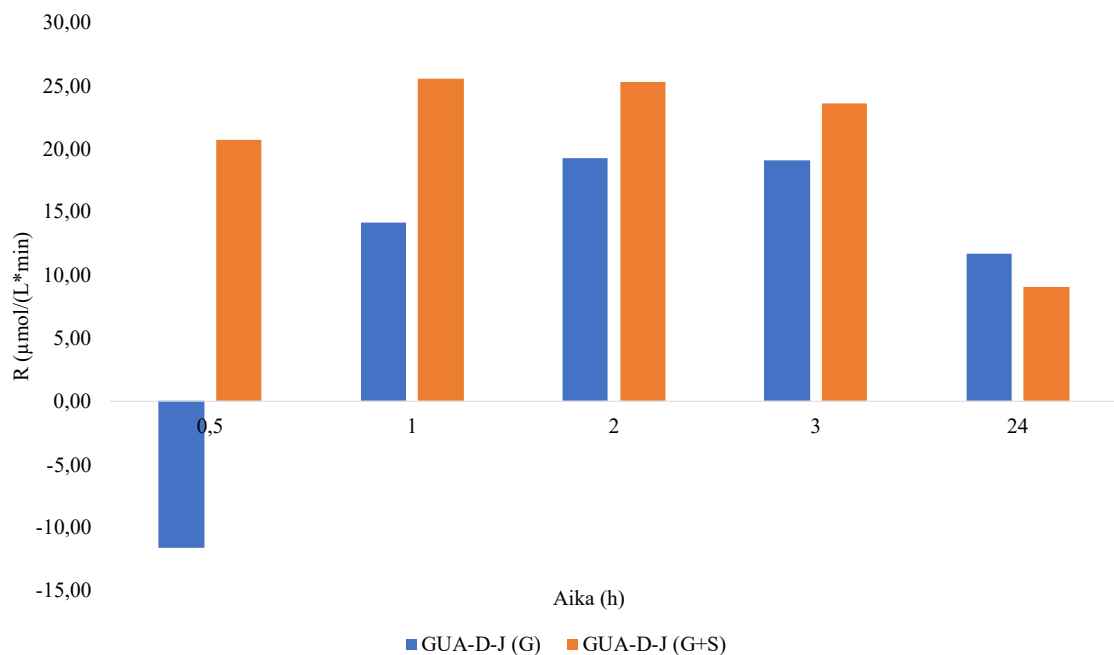
Analysoidaan ensin guajakolin reaktiota. Tulokset kuvaavat normaaliolosuhteissa tapahtuvaa entsyymaattista konversiota, minkä arvoja verrataan syringolin vaikutuksen alaisena tapahtuneeseen reaktioon. Reaktion kulkua analysoitiin näytteiden substraattikonsentraatioiden mukaan, kuten myös niiden pohjalta laskettujen reaktionopeusarvojen perusteella.

Guajakolin kulutus seuraa molemmilla detektoreilla entsyymaattisille reaktioille ominaista käyrää, joka voidaan selittää substraatin määrän vähenemisellä. Substraatin määrän vähentyessä hidastuu myös reaktio. Eri detektoreilla mitatuissa näytteissä esiintyy eroja, mutta nämä erot eivät ole suuria. Koska detektoreiden väliset erot ovat vähäpätöisiä, valitaan tarkasteluun DAD:illä analysoidut tulokset esityksen tiivistämiseksi.

Taulukossa 2 on reaktionopeuksia mitattuna eri ajanhetkillä. Kuva 5 on taulukon 2 tulosten pohjalta muodostettu graafinen esitys, joka havainnollistaa reaktionopeuksien muutosta ajan suhteen.

Taulukko 2. Reaktionopeus (yhtälö 1) reaktiossa G ja reaktiossa G+S.

| Reaktio | 0,5 h | 1 h | 2 h | 3 h | 24 h |
|--|--------|-------|-------|-------|-------|
| G ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) | -11,59 | 14,17 | 19,28 | 19,09 | 11,70 |
| G+S ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) | 20,68 | 25,52 | 25,31 | 23,59 | 9,04 |



Kuva 5. G ja G+S reaktionopeuksia. Reaktionopeudet laskettu tiettyjen ajanhetkien substraatin kulutuksen mukaan.

Reaktio G, jossa ainoana fenolina oli guajakoli, on stabiilimpi kuin reaktio G+S. Reaktio G:n reaktionopeus on hitaampi verrattuna syringolin kanssa toteutettuun reaktioon, mutta se pysyy maltillisena kaikissa näytteissä. Tuloksissa ei ole havaittavissa piikkejä reaktionopeuksissa, joten voidaan olettaa reaktion olevan stabiili. Reaktio G reaktionopeuden negatiivinen arvo puolen tunnin kohdalla on selitettävissä reaktion epästabiiliudella reaktion alkuhetkillä, sekä tietyillä mittausteknisillä muuttujilla ja virheillä.

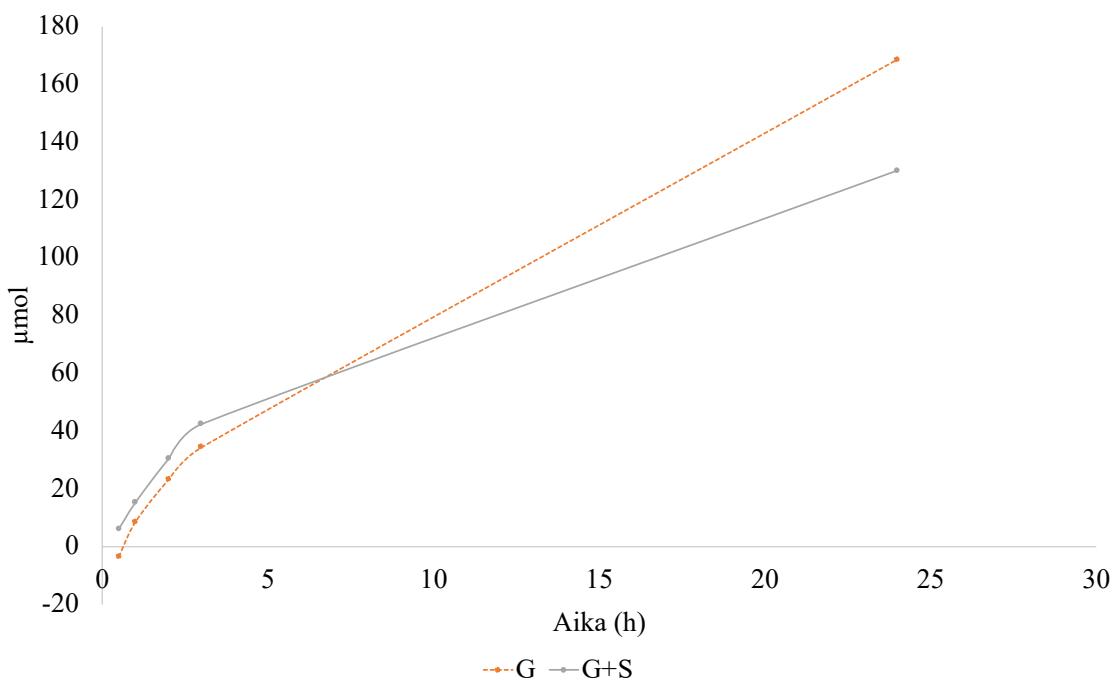
Reaktiossa G+S on havaittavissa suuri reaktionopeuden kiihtyminen ensimmäisissä näytteissä, joka kuitenkin laskee rajusti reaktion viimeisissä näytteissä. Reaktiossa G+S reaktionopeus romahtaa dramaattisesti 24 h kohdalla. Tätä ei ole havaittavissa guajakolin reaktiossa, jossa reaktionopeus liikkuu maltillisemmin.

Kokeiden välisiä eroja on myös substraattien kulutuksissa. Guajakolin kulutus on suurempi reaktiossa, jossa syringolin vaikutusta ei ole. Taulukossa 3 on guajakolin kulutuksia eri ajanhetkillä. Reaktioiden kulutukset muuttuvat yhdenmukaisesti reaktionopeuksien kanssa. Reaktiossa G on substraatin kulutus hitaampaa ensimmäisissä näytteissä, mutta viimeisessä näytteessä on ainetta kulunut enemmän verrattuna reaktioon G+S.

Taulukko 3. Guajakolin kulutus eri reaktioissa.

| Reaktio | 0,5 h | 1 h | 2 h | 3 h | 24 h |
|-------------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|
| G (μmol) | -3,48 | 8,50 | 23,13 | 34,36 | 168,52 |
| G+S (μmol) | 6,20 | 15,31 | 30,37 | 42,46 | 130,18 |

Tämä on myös havainnollistettuna kuvassa 6, jossa molempien reaktioiden eteneminen on esitetty graafisesti. Näytteenoton toimienpiteiden takia voidaan mahdollisesti selittää taulukkojen 2 ja 3 negatiiviset tulokset, mutta kulutuksien ja reaktionopeuksien erot kokeiden välillä ovat huomattavan suuret, jota ei voi täysin pohjustaa mittausteknisiin seikkoihin. Oletetaan, että reaktioiden välillä olevat erot kulutuksissa ja reaktionopeuksissa ovat lähtöisin muualta, kuin mittausvirheistä. On kuitenkin muistettava reaktioiden eriävät guajakolin konsentraatiot, joten tulosten erot voidaan myös selittää eroilla reaktioiden välillä.



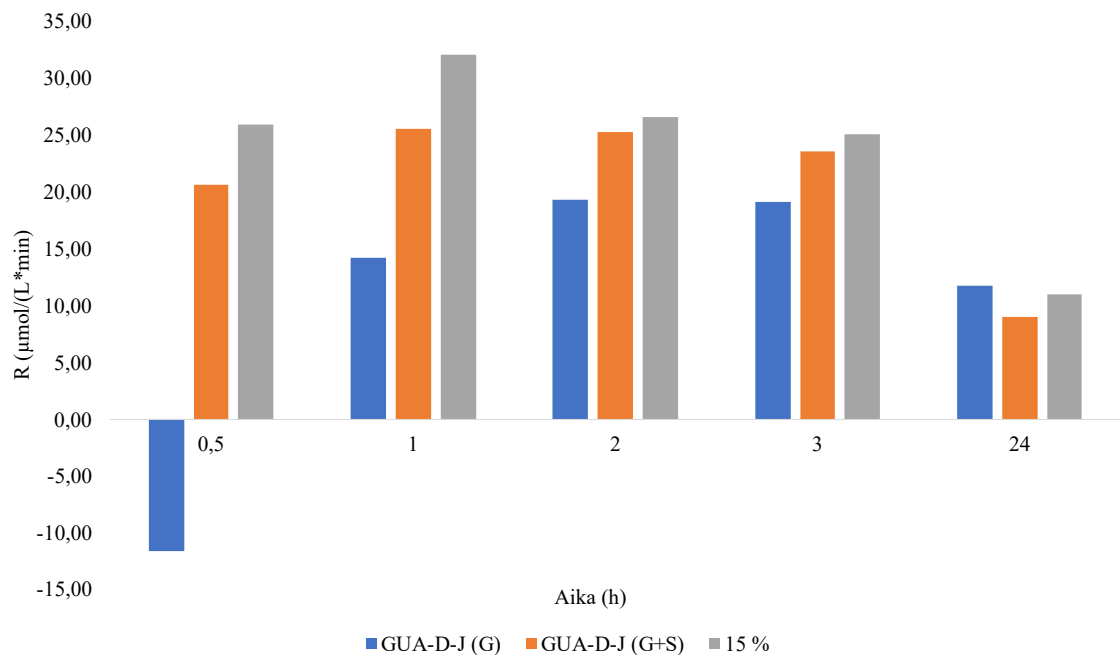
Kuva 6. Guajakolin kulutus eri reaktioissa.

Tuloksia tarkastelemalla voidaan tehdä useita johtopäätöksiä reaktioita koskien. Reaktiossa G reaktionopeus on maltillisempi, ja reaktio kestää paljon kauemmin, kuin reaktiossa G+S. Reaktion G substraattikulutus on myös huomattavasti suurempi kuin reaktiossa G+S. Nämä seikat indikoivat entsyymin toiminnan stabiiliutta reaktiossa G.

Analysoitaessa reaktioita voidaan tarkasteluun ottaa myös tuloksia muista reaktioista. Reaktioissa oli fenolisia yhdisteitä seoksessa 23 mM. Täten reaktiossa G guajakolia 23 mM, kun taas reaktiossa G+S oli fenolisten yhdisteiden pitoisuus jaettuna tasaisesti guajakolin ja syringolin välillä. Tämä pitoisuuksien ero kokeiden välillä luo vääristävän kuvan tuloksissa, kun guajakolia on reaktiossa G kaksi kertaa enemmän, kuin reaktiossa G+S.

Otetaan siis tarkasteluun muiden reaktioiden tuloksia, jotta tulosten tulkinta olisi mahdollisimman kattavaa. Kokeessa, jossa tutkittiin entsyymin olomuodon vaikutusta, oli fenolisista substraateista 15 % syringolia, jonka vaikutusta pystytään vertaamaan edeltäviin kokeisiin. Tämän lisäksi reaktiossa olleen guajakolin määrä on yhtä suuri, kuin reaktiossa G. Virheprosenttien tarkastelussa syringolia oli myös mukana, mutta koska fenolin määrä oli häviävän pieni, ja koska kokeita suoritettiin useita, on vaikea luotettavasti verrata koesarjan tuloksia muihin kokeisiin.

Verrataan siis kylmäkuivatun lysaatin kulutusta ja reaktionopeutta kokeiden G ja G+S kanssa. Merkataan virheprosenttikokeen reaktiota nimikkeellä '15 %'. Kokeiden reaktionopeudet ovat esitettyinä graafisesti kuvassa 7.

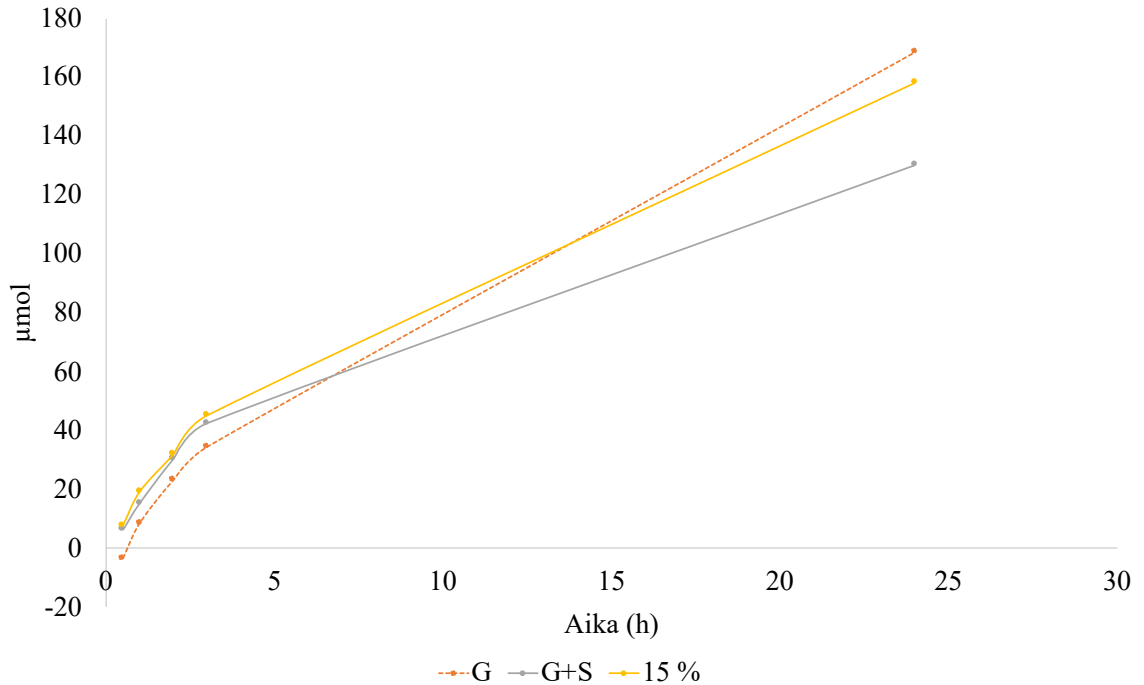


Kuva 7. Reaktioiden G, G+S, ja '15 %' reaktionopeuksia.

'15 %' reaktionopeudessa on havaittavissa sama ilmiö kuin G+S reaktiossa. Reaktionopeus kasvaa 15 % syringolipitoisuudessa räjähtävällä vauhdilla verrattuna pelkän guajakolin reaktioon. Kiinnostavaa reaktiossa '15 %' on kuitenkin reaktionopeuden kovempi kiihtyminen verrattuna reaktioon G+S, kuten myös reaktionopeuden hitaampi lasku verrattuna reaktioon G+S. Reaktion nopeus kiihtyy nopeammin kuin reaktiossa G, ja laskee hitaammin kuin reaktiossa G+S.

Tätä voidaan selittää myös syringolin pienellä tehostavalla efektillä reaktionopeudessa, mutta syringolin tuoma epästabiilius tulee näkyviin reaktion myöhemmissä vaiheissa. Viimeisessä näytteessä 24 h kohdalla reaktioiden G ja 15 % reaktionopeudet ovat lähes samat, mutta reaktio G:n reaktionopeus on hiukan suurempi. Huomattavissa on myös sama romahdus 3 h näytteen ja 24 h näytteen välillä, jossa reaktionopeus putosi 15 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$, kun taas reaktiossa G pudotus oli 7 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$.

Yleisesti vaikuttaa, että pieni syringolin määrä on hyödyksi reaktionopeuden tehostamisessa. Syringolin vaikutus on kuitenkin havaittavissa jälleen reaktion kulutuksia tarkastellessa. Kulutukset on hahmoteltu graafisesti kuvassa 8.



Kuva 8. Guajakolin kulutukset eri seossuhteilla.

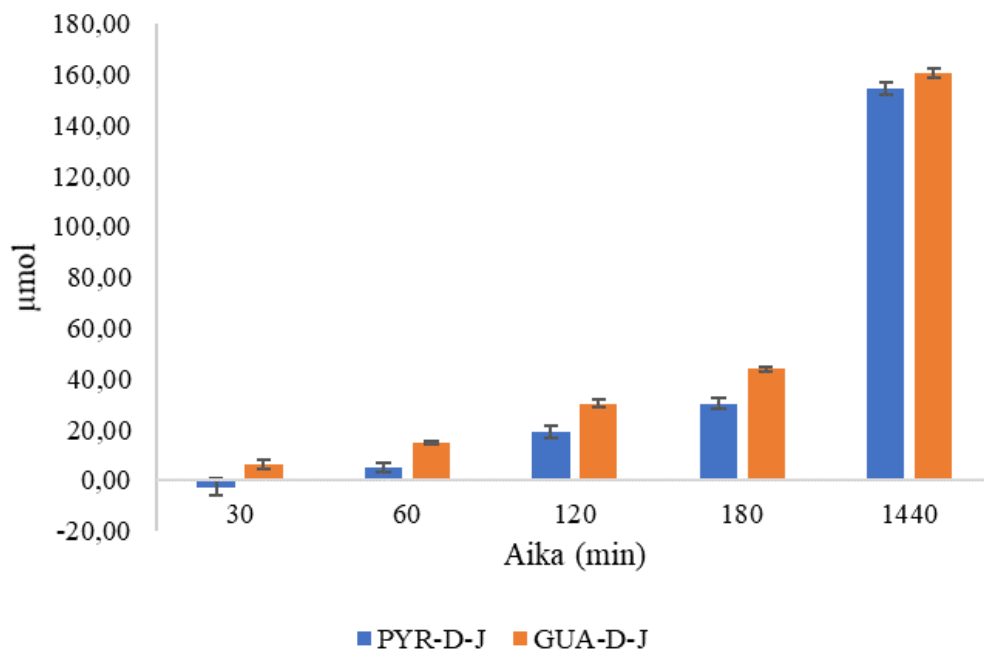
Kulutuksissa on havaittavissa syringolin vaikutus substraatin kulutukseen. Vaikka syringolia oli vähemmän olomuotokokeissa tehdyssä reaktiossa, on kulutuksen pudotus suuri suhteessa reaktioon, jossa oli pelkästään guajakolia. Reaktioiden alussa on 15 % reaktiolla huomattavissa suurempi kulutus, kuin reaktiolla G. Reaktionopeuden romahtaessa 3 h ja 24 h välillä kuitenkin huomataan syringolin luoma vaikutus. Kulutus reaktiossa G on suurempi viimeisessä näytteessä, kuin reaktiossa '15 %'.

Kulutuksien ja reaktionopeuksien erot jäävät keskihajontojen ulkopuolelle, jotka on mitattu virheprosenttien testeissä. Erot tuloksissa juontuvat siis koejärjestelyistä riippumattomista syistä. Voidaan siis pitää reaktioiden tuloksia luotettavina. Tulokset vahvistavat väitettä, että syringoli tehostaa reaktionopeutta, vaikkakin vain väliaikaisesti. Entsyymien toiminta on guajakolin reaktiossa stabiileinta ja tarjoaa parhaimman tuoton kolmesta reaktiosta. Syringolin hienovarainen lisääminen reaktioon voi tuoda nopeuttavan efektin, jos pitkäjänteisemmän reaktion järjestämiselle ei ole riittävästi aikaa.

Ottaen huomioon erot substraattien kulutuksissa ja reaktionopeuksissa, kuten myös reaktioiden stabiiliuserot, voidaan olettaa, että syringolilla on haitallinen vaikutus substraatin konversioon guajakolin entsyymaattisessa reaktiossa L-tyrosiinijohdannaiseksi. Tämä tosin pätee ainoastaan reaktioihin, joille on varattu runsaasti reagointiaikaa. Syringolin hienovarainen lisäys reaktioastiaan voi tehostaa substraatin konversiota lyhyen aikaa, mutta reaktion tehokkuus kärsii pidemmällä aikavälillä.

5.2 Virheen estimointi

Koesarjassa suoritettujen kokeiden tuloksista muodostettiin koottu taulukko, jonka pohjalta pystyttiin laskemaan tulosten keskiarvot. Kuvassa 9 on esitettynä reaktioiden keskimääräisiä substraattien kulutuksia, minkä lisäksi graafissa on esitelty kulutuksien keskihajonnat. Taulukossa 4 on havainnollistettu reaktioiden pohjalta laskettuja konversioita tietyillä ajanhetkillä, sekä niiden keskihajonnat. Näistä keskihajonnoista laskettiin reaktioiden mahdolliset virheprosentit. Kokeessa analyyttien konsentraatiot määritettiin ainoastaan DAD detektorilla.



Kuva 9. Reaktioiden substraattien keskiikulutukset. Keskihajonnat havainnollistettuna virhepalkein.

Taulukko 4. Reagenttien keskimääräiset konversiot (yhtälö 2) sekä vastaavat keskihajonnat.

| Aine | 0,5 h | 1 h | 2 h | 3 h | 24 h |
|--------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| PYR-D-J (%) | $-0,6 \pm 0,7$ | $1,1 \pm 0,4$ | $4,1 \pm 0,5$ | $6,5 \pm 0,4$ | $33,2 \pm 0,5$ |
| GUA-D-J (%) | $2,6 \pm 0,8$ | $6,1 \pm 0,2$ | $12,5 \pm 0,5$ | $18,0 \pm 0,4$ | $66,1 \pm 1,1$ |

Tulosten keskihajonnat pysyivät hallittuina eikä yhdessäkään mittauksessa ollut huomattavan suurta poikkeamaa. Konversioiden keskihajontojen ollessa maltillisia kaikissa mittapisteissä indikoi reaktioiden tulosten oikeellisuutta. Konversiota voidaan heijastaa alkuperäisiin tuloksiin, kuten myös niiden pohjalta muodostettuihin laskentoihin. Tapauksessa, jossa keskihajonnat ovat huomattavan suuret, voitaisiin olettaa tuloksien olevan yleisesti epäluotettavia.

Guajakolin konversio 3-metoksi-L-tyrosiiniksi pienellä määrällä syringolia oli hyvin tehokasta syringolin vaikutuksesta huolimatta. Suuri määrä guajakolista ja pyruvaatista muuntui tuotteiksi. Mittauksissa keskiarvoltaan suurin poikkeama oli reaktion ensimmäisissä näytteissä, mikä voidaan selittää reaktion alkuvaiheen epästabiiliuudella sekä kiihtyvällä reaktionopeudella.

Virheprosentit kuitenkin pienentyvät ajan myötä substraattien määrän vähentyessä ja reaktion hidastuessa, joka on selvästi huomattavissa taulukossa 5, jossa on esitettynä reaktioiden kulutusten keskimääräiset virheet. Voidaan olettaa reaktioiden alkupäistä otettujen näytteiden tulosten olevan vähemmän luotettavia kuin tulosten, jotka on otettu 24 h kohdalla.

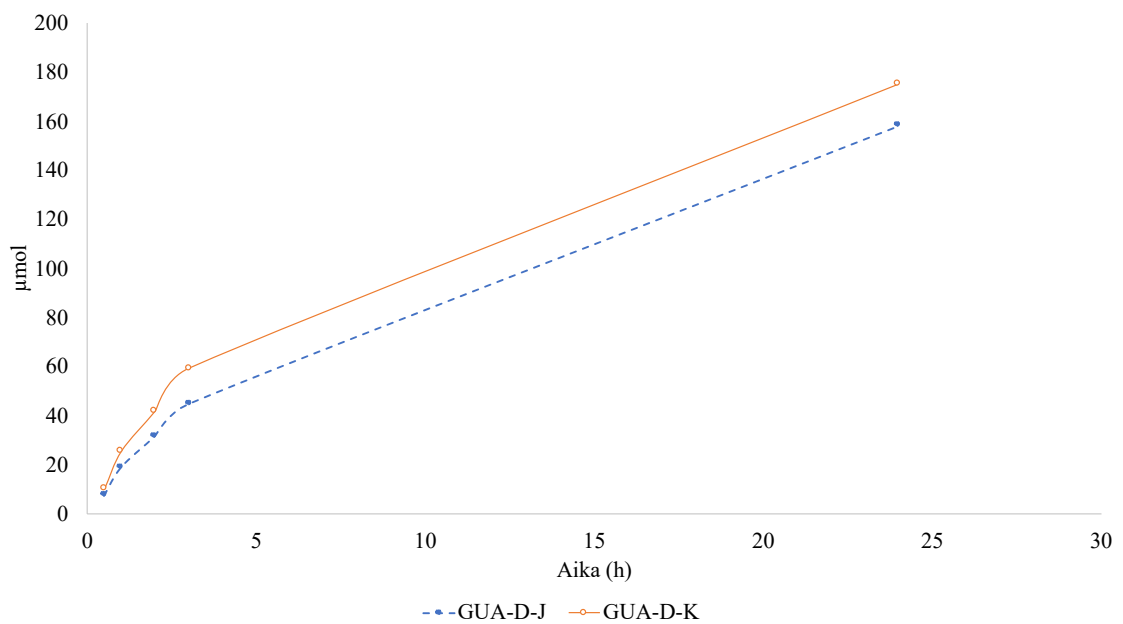
Taulukko 5. Reagenttien kulutuksen virheprosentit.

| Aine | 0,5 h | 1 h | 2 h | 3 h | 24 h |
|--------------------|---------|-------|-------|------|------|
| PYR-D-J (%) | -117,24 | 37,77 | 14,31 | 6,49 | 1,49 |
| GUA-D-J (%) | 33,09 | 3,36 | 4,12 | 1,76 | 1,28 |

5.3 Kokosoluentisyymien vaikutus

Reaktioissa, joissa tutkittiin entsyymien eri olomuotojen vaikutusta, oli havaittavissa hienoisia eroja substraattien kulutusten välillä. Kokosoluentisyymillä substraatin kulutus oli yleisesti korkeampi, kuin kylmäkuivatulla jauhemaisella lysaatilla. Kuva 10 on graafinen esitys eri reagenttien kulumisesta reaktioissa.

Aineiden kulutukset voidaan mahdollisesti selittää entsyymien ympärillä olevan soluseinän tarjoamalla suojatulla tilalla, joka suojaa entsyymien toimintaa mahdollisilta inhiboivilta elementeiltä. Tämän lisäksi reagenttien läheisyys soluseinän sisällä tehostaa katalyytin toimintaa huomattavasti. Tulosten pohjalta voidaan olettaa, että entsyymien olomuodolla on mahdollinen vaikutus reaktion tehokkuuteen mahdollisesti entsyymien toimintaa stabiloimalla. Nimikkeissä K tarkoittaa kokosolua ja J jauhemaisista lysaattia.

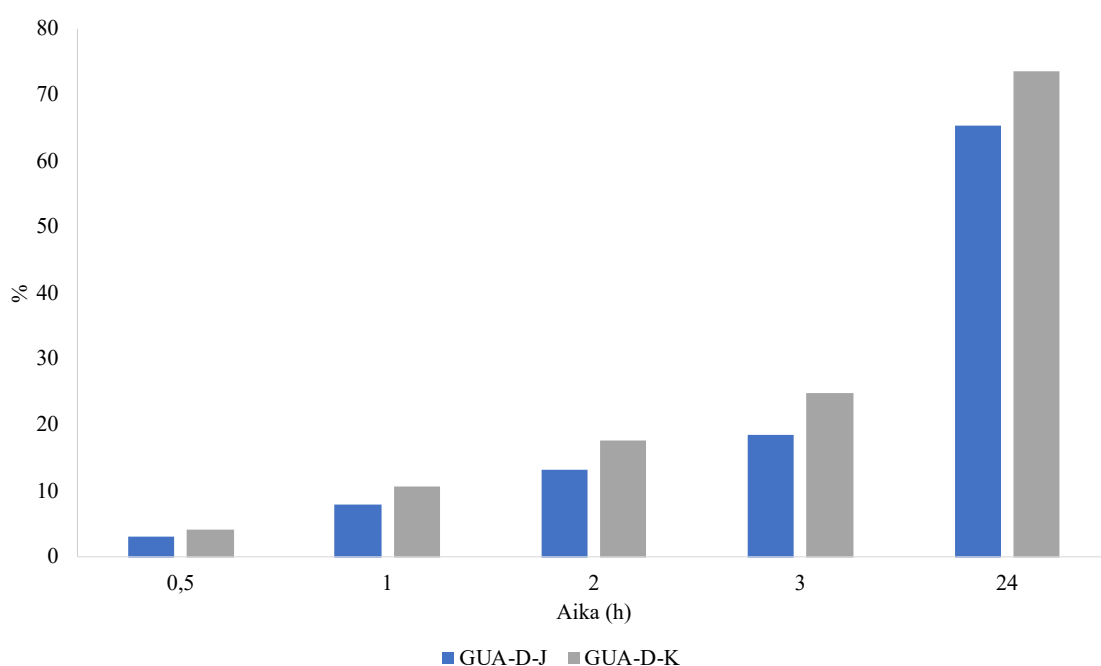


Kuva 10. Guajakolin kulutukset entsyymien eri olomuodoilla.

E. colin stabiloiva vaikutus voidaan nähdä myös konversiota tarkastellessa. Diode Array Detectorilla mitattujen tulosten pohjalta lasketut konversiot ovat esiteltyinä taulukossa 6. sekä graafisesti kuvassa 11.

Taulukko 3. Substraatin konversiot (yhtälö 2) entsyymien eri olomuodoilla.

| Aine | 0,5 h | 1 h | 2 h | 3 h | 24 h |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GUA-D-K (%) | 4,26 | 10,71 | 17,57 | 24,91 | 73,40 |
| GUA-D-J (%) | 3,20 | 7,93 | 13,16 | 18,61 | 65,26 |



Kuva 11. Guajakolin konversiot (yhtälö 2) entsyymien eri olomuodoilla.

Kokosolventsiymillä ei ole havaittavissa suurta vaikutusta reaktion lähtötaipaleella, mutta olomuodon vaikutus tulee ilmi reaktion edetessä. Tunnin kohdalla on havaittavissa jo lähes kolmen prosentin ero konversioiden välillä, kun verrataan kokosolun ja lyaatin välistä reaktiota. Ero vain kasvaa lähestyttäessä viimeistä näytettä, jolloin konversioiden ero on jo lähes kymmenen prosenttia.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämä työ keskittyi L-tyrosiinijohdannaisien entsyymattiseen synteesiin guajakolista, pyruvaatista sekä ammoniumionista. Samalla tarkasteltiin syringolin mahdollista vaikutusta reaktioon. Reaktiota katalysoitiin tyrosiinifenolilyaasi entsyymillä, josta tutkittiin kahta eri olomuotoa ja niiden vaikutuksia erillisessä testissä. Reaktiot analysoitiin HPLC-laitteistolla, jonka pohjalta pystyttiin muodostamaan laskennalliset tulokset ja tekemään johtopäätökset.

Tulosten pohjalta voidaan olettaa syringolin omaavan hienoisia inhibiittorin ominaisuuksia. Tämä on nähtävissä hidastuneella reaktionopeudella 24 h näytteiden kohdalla, joskin reaktio etenee nopeammin ensimmäisissä näytteenotoissa. Tämä voi indikoida myös syringolin mahdollista reaktion tehostusta, mutta tämä voidaan kiistää tarkastelemalla aineen kulutusta.

Guajakolia on kulunut 24 h näytteiden kohdalla huomattavasti vähemmän reaktioissa, joissa syringolia oli mukana. Syringolin ollessa läsnä reaktioastiassa guajakolia kuluu alussa nopeammin, mutta lopputuloksena fenolia kuluu vähemmän verrattuna reaktioon, jossa substraatti on yksin astiassa. Tämä voidaan vahvistaa entsyymien olomuotoja vertailevan kokeen tulosten pohjalta. Kun reaktiossa on fenolisten aineiden määrästä 15 % syringolia, tapahtuu samanlainen tehostava vaikutus kuin reaktiossa G+S. Tämä kuitenkin kestää reaktion ensimmäisten tuntien ajan, ja hiipuu ajan kanssa. Sama peilautuu reaktioiden kulutuksissa, jossa reaktion G substraattikulutus on suurempi, kuin reaktiossa 15 %. Kulutus on kuitenkin pienempi ensimmäisten tuntien aikana reaktiossa G, joten syringolin tehostava vaikutus voi olla hyödyksi, jos reaktioon lisätään syringolia pienissä määrin.

Virheprosentin estimoinnissa ei ilmennyt huomattavaa virhettä, joten voidaan olettaa kyseisille kokeille tehdyt koejärjestelyt hyviksi. Keskihajonnan vaihtelu voi johtua useista tekijöistä, kuten pipetoinneista ja sekoituksista, mutta ulkopuolisesta virheestä ei ollut indikaatioita kokeiden tuloksissa. Reaktioiden virheprosentit olivat suuria reaktioiden alussa, mutta pienivät loppua kohti. Tätä voidaan selittää reaktion epästabiiliudella, sillä reaktiot kiihtyivät alkuvaiheissansa huomattavan nopeaa tahtia.

Optimaaliselle synteesille on mahdollista käyttää entsyymien kokosolumuotoa. Kokosolumuodon stabiloiva vaikutus on selvästi havaittavissa tuloksia tarkastellessa. Vaikka entsyymi on sama molemmissa reaktioissa, on *E. coli* soluseinämän tarjoamalla suojalla mahdollinen positiivinen vaikutus reaktiotehokkuuteen, ja sen pohjalta konversioon. Lysaatti tarjoaa myös parannettua reaktionopeutta verrattuna reaktioon ilman entsyymiä, mutta kahdesta mahdollisesta vaihtoehdosta on kokosolumuoto tehokkaampi.

7 YHTEENVETO

Tässä työssä tutkittiin kasvibiomassasta saatavan ligniinin fenolisten komponenttien hyötykäyttöä, sekä kyseisten komponenttien muokkautumista L-tyrosiinin johdannaisiksi. Kasvibiomassasta saatavan ligniinin rakenne luonnonmukaisena polymeerinä on kompleksi ja laaja. Radikaalien yhdisteiden reaktiosta syntynyt polymeeri sisältää useita fenolisia yhdisteitä ja sitä voidaan hyödyntää lähteenä useille eri reaktiokomponenteille. Ligniinin monolignoleista pystytään johtamaan esimerkiksi tässä työssä tarkasteltua guajakolia, sekä syringolia. Yhdisteiden johtaminen ligniinistä on kuitenkin vaivalloista, joten ligniinin käyttö pohjautuu pääosin energiantuotantoon polttamalla.

Tyrosiinifenolilyaasi (TPL) on entsyymi, jota käytetään katalyyttinä L-tyrosiinijohdannaisten muodostumisreaktiossa. TPL katalysoi reversiibeliä reaktiota, jossa fenoli, pyruvaatti ja ammoniumioni reagoivat muodostaen L-tyrosiinijohdannaista. Entsyymi tarvitsee kofaktoriksi pyridoksaali 5'-fosfaattia (PLP). Tässä tutkimuksessa käytettiin entsyymien GMO-varianttia M379V, joka oli soveltuvin variantti reaktioon, jossa fenolisenä substraattina toimi guajakoli. Reaktioissa käytettiin TPL entsyymien kahta eri olomuotoa, jotta myös entsyymien olomuodon vaikutus reaktionopeuteen voitiin määrittää. Reaktioissa käytettiin entsyymiä kylmäkuivattuna lyaattina, sekä kokosolumuodossa.

Kokeellisessa osuudessa syntetisoitiin L-tyrosiinijohdannaista guajakolista ja tarkasteltiin syringolin mahdollista vaikutusta reaktioon. Reaktioissa käytetyt fenoliset komponentit olivat puhtaita kemikaaleja, joilla mallinnettiin ligniinistä peräisin olevien komponenttien toimintaa. L-tyrosiinijohdannaisten synteesissä voidaan käyttää useita fenolisia substraatteja, mutta varhaiset kokeet osoittivat entsyymien aktiivisuuden syringolia kohtaan erittäin vähäiseksi. Syringoli ei täten sovellu synteesissä lähtöaineeksi. Ligniinissä kuitenkin esiintyy molempien guajakolin ja syringolin prekursoreita, joten on tärkeä tarkastella L-tyrosiinijohdannaisten reaktiota guajakolista, kun reaktiossa esiintyy molempia guajakolia ja syringolia.

Reaktioista otetut näytteet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC). Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa injektoidaan tutkittavaa näytettä eluenttiin, joka analysoidaan sen kulkiessa laitteiston läpi. Analysointi tapahtuu eri detektoreilla, joiden toiminta pohjautuu aineen fysikaaliskemiallisten muutosten tarkkailuun. Detektorin havaitessa aineen eluentissa, kyseinen aine rekisteröityy graafisesti piikkinä kromatogrammille, jonka pinta-alasta voidaan määrittää aineen tarkka konsentraatio näytteessä.

Reaktiot osoittivat syringolilla olevan haittavaikutusta guajakolin synteesiin 3-metoksi-L-tyrosiiniksi, sekä kulutuksen, että reaktionopeuden suhteen. Syringolilla on kuitenkin lyhytaikainen reaktionopeutta tehostava vaikutus, joka voi osoittautua hyödyksi pienillä aikaväleillä järjestetyissä kokeissa. Tämä johtuu luultavasti syringolin vaikutuksesta, joka tekee TPL entsyymien toiminnasta epästabiliia. Tämä efekti ei kuitenkaan säily, vaan vaikutus vähenee kolmen tunnin reagointiajan jälkeen. Virheprosenttikokeissa havaittiin virheprosenttien olevan suuria ensimmäisissä näytteissä, mutta pienentyvän reaktion loppua lähentyessä. Kokeissa todettiin myös kokosolventisyymien olevan tehokkaampi vaihtoehto jauhemaisen lysaatin sijaan, vaikkakin entsyymi on kokosolumuodossansa vaikeasti hävitettävä.

LÄHDELUETTELO

Asmadi, M., Kawamoto, H., & Saka, S. (2011). Thermal reactions of guaiacol and syringol as lignin model aromatic nuclei. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 92(1), 88–98. doi:10.1016/j.jaap.2011.04.011

Azadi, P., Inderwildi, O. R., Farnood, R., & King, D. A. (2013). Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 506–523. doi:10.1016/j.rser.2012.12.022

Dennig, A., Busto, E., Kroutil, W., & Faber, K. (2015). Biocatalytic One-Pot Synthesis of l-Tyrosine Derivatives from Monosubstituted Benzenes, Pyruvate, and Ammonia. *ACS Catalysis*, 5(12), 7503–7506. doi:10.1021/acscatal.5b02129

Du, L., Wang, Z., Li, S., Song, W., & Lin, W. (2013). A Comparison of Monomeric Phenols Produced from Lignin by Fast Pyrolysis and Hydrothermal Conversions. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 11(1), 1–11. doi:10.1515/ijcre-2012-0085

Henderson, D. P., & Toone, E. J. (1999). Aldolases. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 367–440. doi:10.1016/b978-0-08-091283-7.00088-6

Kawamoto, H. (2017). Lignin pyrolysis reactions. *Journal of Wood Science*, 63(2), 117–132. doi:10.1007/s10086-016-1606-z

Lebo, S. E., Gargulak, J. D., & McNally, T. J. (2001). Lignin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. doi:10.1002/0471238961.12090714120914.a01.pub2

Moldoveanu, Ș. & David, V. (2012). *Essentials in modern HPLC separations*. Elsevier.

H. H. Nimz, *Angew. Chem.* 86 (1974) 336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 313.

Raboni, S., Spyrakis, F., Campanini, B., Amadasi, A., Bettati, S., Peracchi, A., ... Contestabile, R. (2010). *Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes: Catalysis*,

Conformation, and Genomics. *Comprehensive Natural Products II*, 273–350. doi:10.1016/b978-008045382-8.00140-4

Saake, B., & Lehnen, R. (2007). Lignin. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. doi:10.1002/14356007.a15_305.pub3

Seisser, B., Zinkl, R., Gruber, K., Kaufmann, F., Hafner, A., & Kroutil, W. (2010). Cutting Long Syntheses Short: Access to Non-Natural Tyrosine Derivatives Employing an Engineered Tyrosine Phenol Lyase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 352(4), 731–736. doi:10.1002/adsc.200900826

Sun, Z., Fridrich, B., de Santi, A., Elangovan, S., & Barta, K. (2018). Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. *Chemical Reviews*, 118(2), 614–678. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00588

Xu, S., Zhang, Y., Li, Y., Xia, X., Zhou, J., & Shi, G. (2019). Production of L-tyrosine using tyrosine phenol-lyase by whole cell biotransformation approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 131, 109430. doi:10.1016/j.enzmictec.2019.109430

Yamada, H., Kumagai, H., Kashima, N., Torii, H., Enei, H., & Okumura, S. (1972). Synthesis of L-tyrosine from pyruvate, ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 370–374. doi:10.1016/s0006-291x(72)80148-7