

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Riin Kont

**Nisuõlgede hüdrotermilise eeltötluse käigus
moodustuvad tugevad tsellulaasi inhibiitorid**

Magistritöö

Juhendaja: PhD Priit Väljamäe

TARTU 2013

SISUKORD

| | |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 3 |
| SISSEJUHATUS | 4 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 6 |
| 1.1. Lignotselluloos | 6 |
| 1.1.1. Tselluloos | 6 |
| 1.1.2. Hemitselluloos | 8 |
| 1.1.3. Ligniin | 11 |
| 1.2. Bioetanooli tootmine lignotselluloosest biomassist | 11 |
| 1.2.1. Lignotselluloosse biomassi eeltöötlus | 12 |
| 1.2.2. (Ligno)tselluloosi hüdroolüüs | 15 |
| 1.2.3. Ksülaanide ja ksülo-oligosahhariidide inhibeeriv mõju tsellulaasidele | 16 |
| 2. MATERJAL JA METOODIKA | 18 |
| 2.1. Materjalid ja ensüümid | 18 |
| 2.2. Metoodika | 19 |
| 2.2.1. Inhibitorsete oligosahhariidide eraldamine ja puhastamine vedelfraktsioonist | 19 |
| 2.2.2. IOS-ide iseloomustamine | 20 |
| 2.2.3. <i>TrCel7A</i> ja <i>TrCel7B</i> inhibitsioon MUL substraadil | 21 |
| 2.2.4. Inhibiitorite ensümaatilise degradatsioon | 22 |
| 2.2.5. Vedelfraktsiooni poolse <i>TrCel7A</i> inhibitsiooni hindamine tselluloosil | 23 |
| 3. TULEMUSED JA ARUTELU | 24 |
| 3.1. <i>TrCel7A</i> aktiivsust inhibeerivate molekulide identifitseerimine | 24 |
| 3.1.1. <i>TrCel7A</i> inhibitsioon eeltöödeldud nisuõlgede vedelfraktsiooni poolt | 24 |
| 3.1.2. Inhibiitorite eraldamine ja identifitseerimine vedelfraktsioonist | 26 |
| 3.2. IOS-id CBH (<i>TrCel7A</i>) ja EG (<i>TrCel7B</i>) inhibiitorina | 31 |
| 3.3. Inhibiitorite ensümaatilise degradatsioon | 33 |
| 3.3.1. IOS-ide degradatsioon tsellulaaside poolt | 33 |
| 3.3.2. Vedelfraktsiooni töötlemine tsellulaasidega | 36 |
| KOKKUVÕTE | 38 |
| SUMMARY | 39 |
| KIRJANDUSE LOETELU | 41 |
| LIHTLITSENTS | 47 |

KASUTATUD LÜHENDID

^{14}C -BC – ^{14}C märgistatud bakteriaalne tselluloos (^{14}C *bacterial cellulose*)

AFEX – *ammonia fiber explosion*

ARP – *ammonia recycle percolation*

At – *Acremonium thermophilum*

BCA – bitsinkoonhape (*bicinchoninic acid*)

BG – β -glükosidaas

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CBH – tsellobiohüdrolaas (*cellobiohydrolase*)

DP – polümeerisatsiooniaste (*degree of polymerisation*)

EG – endoglükanaas

ESI-MS – elektropihustusionisatsioon massispektromeetria (*electrospray ionization mass spectrometry*)

GOS – glüko-oligosahhariidid

HPLC - kõrgsurvevedelikkromatograafia (*high-pressure liquid chromatography*)

IOS – inhibitoorsed oligosahhariidid

MUG – 4-metüül-umbelliferüül- β -glükosiid

MUL – 4-metüül-umbelliferüül- β -laktosiid

N188BG – Novozyme188 β -glükosidaas

pNPL – para-nitrofenüül- β -laktosiid (*4-nitrophenyl β -lactoside*)

Ta – *Thermoascus aurantiacus*

T. reesei ja Tr – *Trichoderma reesei*

XOS – ksülo-oligosahhariidid (*xylo-oligosaccharides*)

SISSEJUHATUS

Tänapäeval toodetakse enamuse mootorikütustest nafta baasil ning nende suures mahus kasutamine on üheks oluliseks põhjuseks järjest suureneva inimtekkelise CO₂ emissioonile. Kahanevad naftavarud ja järjest kasvav energiavajadus on viimasel aastakümnel taas intensiivistanud taastuvate biokütuste väljatöötamist (Himmel jt., 2007; Ragauskas jt., 2006).

Üheks alternatiivseks mootorikütuseks naftasaadustele peetakse bioetanooli. Tänapäeval toodetakse maailmas enamuse bioetanoolist teravilja-, maisitärklise ja suhkruroo mahla baasil. Toiduotstarbelistele taimedele on bioetanooli tootmisel perspektiivseks alternatiiviks lignotselluloosne biomass. Sellisel juhul on võimalik toormena kasutada näiteks erinevat tüüpi metsa-, puidu- ja paberitööstuse ning ka põllumajanduse jääke (Lynd jt., 2008). Sarnaselt nafta rafineerimisele arendatakse lignotselluloosel biomassil põhinevat biorafineerimise kontseptsiooni, mis võimaldaks lisaks mootorikütusele toota lisaväärtusega kemikaale ja soojusenergiat (Ragauskas jt., 2006). Kuigi lignotselluloosne biomass on tänu suurele hulgale ja kiirele taastuvusele looduses suhteliselt odav tooraine, on bioetanooli tootmiskulud veel liialt suured, et konkureerida nafta baasil toodetavate mootorikütustega (Himmel jt., 2007).

Lignotselluloosist bioetanooli tootmiseks on taime rakukesta polüsahhariidid tselluloos ja hemitselluloos vaja lagundada fermenteeritavateks suhkruteks. Need biopolümeerid on taime rakukestas aga keerulise ja heterogeense matriksi koostises, mis takistab nende ensümaatilist hüdrolyüsi. Seetõttu tuleb enne hüdrolyüsi läbi viia biomassi eeltöötlus, et „avada“ rakukesta struktuur ja muuta polüsahhariidid hüdrolyütilistele ensüümidele kättesaadavamateks.

Paraku moodustuvad eeltötluste käigus erinevad inhibiitorid. Nii on näidatud ligniinist vabanevate aromaatsete ühendite ja hemitselluloosist vabanevate monosahhariidide dehüdratatsioonil moodustuvate furaanaldehüüdide inhibeerivat mõju fermenteerivatele mikroorganismidele (Jönsson jt., 2013). On näidatud ka, et kui eeltötluse järgselt ei lahutata vedelfraktsiooni, mis sisaldab eeltötluse käigus lahustunud komponente, on ka sellele järgnev eeltöödeldud biomassi suhkrustamine väiksema saagisega (McMillan jt., 2011). Seega mõjuvad eeltötluse käigus vabanevad komponendid inhibeerivalt ka hüdrolyütilistele ensüümidele, mida kompenseeritakse lisatavate ensüümide suurema hulgaga (Yang ja Wyman, 2008). Ensüümide hulga vähendamiseks on vaja välja töötada efektiivsemad ensüümsegud. Selleks tuleb aga detailselt tunda eeltötluse käigus moodustuvaid ensüümide inhibiitoreid,

mida on siiani kvantitatiivselt väga vähe uuritud (Selig jt., 2008; Qing ja Wyman, 2011a; Qing jt., 2010).

Meie esialgsed uurimistulemused näitasid, et nisuõlgede hüdrotermilise eeltötluse järgselt eraldatud vedelfraktsioon inhibeerib tugevalt tselluloosi lagundamise võtmeensüümi *TrCel7A* aktiivsust. Käesoleva töö eesmärgiks on vedelfraktsioonis sisalduvate inhibiitorite eraldamine ja iseloomustamine.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Lignotselluloos

Lignotselluloos on taimede rakukesta põhikomponent ja moodustab seega looduses peamise osa kogu taastuvast biomassist. Lignotselluloos koosneb valdavalt tselluloosist, hemitselluloosist ja ligniinist. Lisaks sisaldab lignotselluloos veel pektiini (ca 2 %) ja rakukesta koostisesse kuuluvaid valke (Joshi jt., 2011).

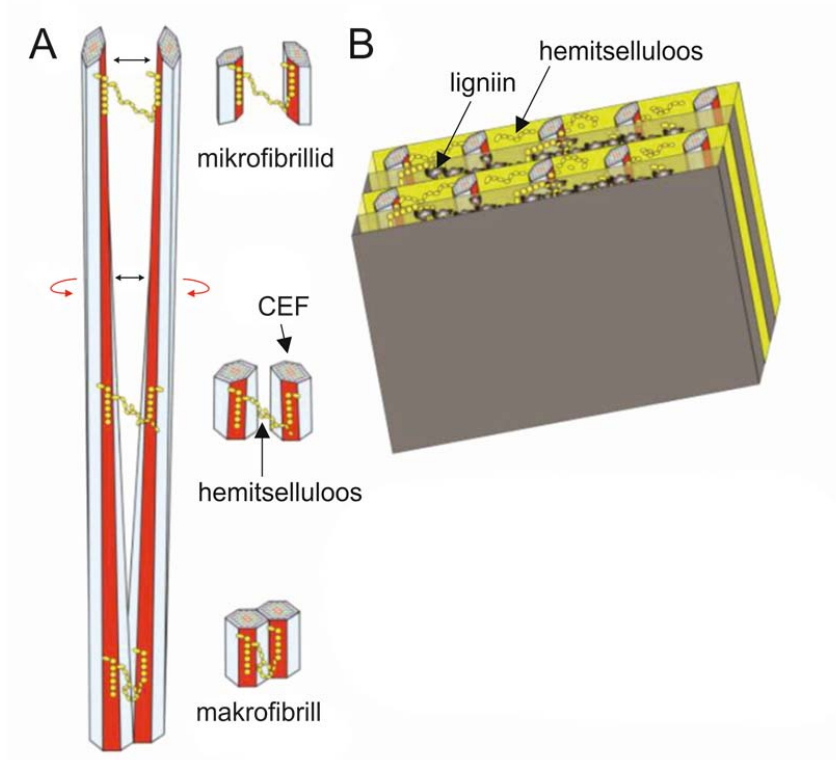
Tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini täpne osakaal varieerub nii erinevatesse sugukondadesse kuuluvate taimede puhul kui ka erinevates taimekudedes, kuid ligikaudu moodustavad need vastavalt 45 %, 30 % ja 25 % taime kuivmassist (Zaldivar jt., 2001; Carpita ja Gibeaut, 1993). Tselluloos, hemitselluloos ja ligniin moodustavad omavahel tiheda ja läbipõimunud heterogeense maatriksi (joonis 1B), mis annab taime rakukestale struktuuri, poorsuse ja mehhaanilise tugevuse.

1.1.1. Tselluloos

Tselluloos kui taime rakukesta peamine komponent on meie planeedil kõige levinum biopolümeer, mida toodetakse looduses suurusjärgus 10^{10} tonni aastas (Goyal jt., 1991). Lisaks taimedele, kes on peamised tselluloosi produtseerijad, on võimelised tselluloosi sünteesima ka mõned loomad (näiteks tunikaadid) ja bakteriliigid (näiteks *Gluconobacterium xylinium*). Arvatakse, et aeroobsed bakterid toodavad tselluloosi mati moodustamiseks, et püsida vedelik-õhk piiripinnal ja kaitseks üleliigse ultravioletkiirguse eest. Erinevalt taimsest tselluloosist on bakterite poolt toodetud tselluloos homogeenne, mis tähendab, et see ei sisalda teisi polümeerseid komponente (Iguchi jt., 2000).

Tselluloos koosneb β -1,4-glükosiidsete sidemete kaudu ühendatud püranoosides vormis D-glükoosi monomeeridest. Kuna iga järgnev glükoosi molekul paikneb eelnevaga võrreles 180 kraadise nurga all, ei ole kordusühikuks polümeeris mitte glükoos vaid glükoosi dimeer – tsellobioos (Gardner ja Blackwell, 1974). Ahela otstes paiknevad glükoosijäägid on teineteisest keemiliselt erinevad: redutseerivas otsas esineb tasakaal tsüklilise poolatsetaalse ja

avatud aldehüüdse vormi vahel, mitteredutseeriva otsa glükoosijääk on aga alati tsüklilises vormis (Lynd jt., 2002).



Joonis 1. Taimede sekundaarses rakukestas moodustavad tselluloos, hemitselluloos ja ligniin tiheda läbipõimunud maatriksi. A. Tselluloosi elementaarfibrill (CEF) moodustub teineteise suhtes paralleelselt asetsevatest tselluloosiahelatest. Hemitselluloosi vahendusel ühendatud elementaarfibrille nimetatakse mikrofibrillideks. Tselluloosi makrofibrillist räägitakse, kui lisaks hemitselluloosi kaudu seotusele on tselluloosi elementaarfibrillid ka omavahel ineterakteerunud. **B.** Taime sekundaarse rakukesta struktuur koosneb üksteise suhtes paralleelselt paigutunud tselluloosi elementaarfibrillidest, mis interakteerudes hemitselluloosiga moodustavad omaette fibrillaarse kihi (kollaste kihtidena). Ligniini on kondenseerunud tselluloosi kihtide vahele ning on kovalentsete sidemete kaudu seotud hemitselluloosiga, moodustades ligniin-hemitselluloos kihte (hallide kihtidena). Joonis on modifitseeritud kujul pärit Ding jt., 2012 lisamaterjalidest.

Sünteesitud tselluloosiahelad on hargnemata. Ahelate pikkus, mida väljendatakse polümeerisatsiooni astmena (DP – *degree of polymerisation*), varieerub olenevalt tselluloosi päritolust vahemikus 300-10000 (Klemm jt., 2005). Kümnete tselluloosiahelate samaaegne süntees rakumembraanis tagab teineteise suhtes nende paralleelse paigutuse ja koheselt kõrgemat järku kristalliliste struktuuride – tselluloosi elementaarfibrillide – moodustumise. Seetõttu üksikuid tselluloosiahelaid taimede rakukestas ei esine. Kristallstruktuuri

stabiliseerivad üle hüdroksüülrühmade nii tselluloosiahelate sees kui ahelate vahel moodustuvad vesiniksidemed ja püranoosi ringide hüdrofoobsete osade vahel tekkivad van der Waalsi jõud (Lynd jt., 2002). Tselluloosi elementaarfibrille, mis on omavahel hemitselluloosi kaudu ühendatud, nimetatakse mikro fibrillideks. Mitut vahetult seotud elementaar fibrilli kompleksis hemitselluloosiga nimetatakse aga makro fibrilliks (Ding jt., 2012) (joonis 1A).

Tänu jäigale ja korrapärasele struktuurile on tselluloos vees lahustumatu ja ensümaatilisele hüdrolyüsile raskesti allutatav substraat. Siiski ei paikne tselluloos rakukestas üksnes kristallilisel kujul ning sisaldab ka amorfseid piirkondi. Amorfsele tselluloosile on iseloomulik ahelatevaheline nõrgem seondumine, mistõttu paiknevad ahelad ebakorrapäraselt, on pinges all või poolikud ning seetõttu hüdrolaasidele paremini kättesaadavad (Fleming jt., 2001).

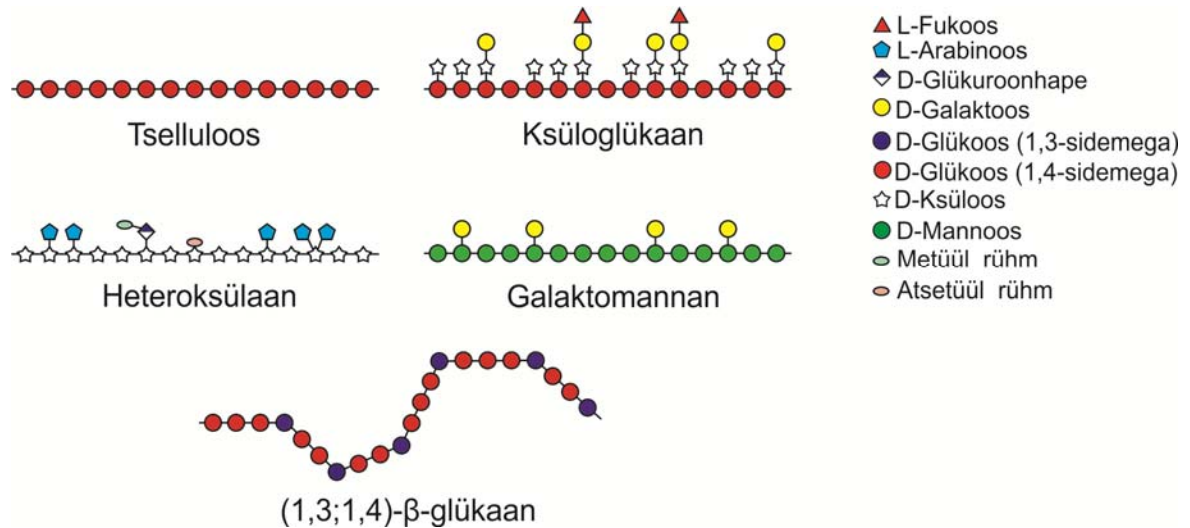
1.1.2. Hemitselluloos

Hemitselluloosid on heterogeenne rühm mittetselluloosid taimeomaseid polüsahhariide. Hemitselluloosid on tihti heteropolüsahhariidid ja nende ahelad on võrreldes tselluloosiga lühemad, võivad olla hargnenud või sisaldada peaahelas erinevat tüüpi sidemeid. Nimetatud struktuurilised iseärasused pärsivad ahelate korrapärasest paigutumist üksteise suhtes ja soodustavad geelilaadse struktuuri moodustumist tselluloosi elementaar fibrillide ümber (Burton ja Fincher, 2012; Burton jt., 2010; Carpita ja Gibeaut, 1993).

Peaahela koostise ja keemilise struktuuri alusel võib hemitselluloosid jagada nelja peamisesse gruppi, mis omakorda sisaldavad alajaotusi (Burton jt., 2010; Ebringerová, 2006) (joonis 2):

- ksülaanid
 - glükuronok sülaanid
 - arabinok sülaanid
 - (glükurono)arabinok sülaanid
 - (arabino)glükuronok sülaanid
 - heterok sülaanid
- mannaanid
 - glükomannaanid

- galaktomannaanid
- heteromannaanid
- ksüloglükaanid
- (1,3;1,4)- β -glükaanid (*mixed-linkage beta-glucans*)



Joonis 2. Hemitseelluloosid on tselluloosiga võrreldes heterogeense koostisega. Molekulaarse ja keemilise ehituse alusel jagatakse hemitseelluloosid 4 peamiseks rühma: ksülaanid, mannaanid, ksüloglükaanid ja (1,3;1,4)- β glükaanid. Joonis on modifitseeritud kujul pärit artiklist Burton jt., 2010.

Erinevate hemitseellulooside osakaal varieerub kaheiduleheliste ja üheiduleheliste taimerühmade vahel. Kaheidulehelistes taimedes on enim esindatud ksüloglükaanid (Burton ja Fincher, 2012). Domineerivad hemitseelluloosid üheiduleheliste taimede (mille hulka kuulub ka majanduslikult oluline sugukond kõrrelised) rakkestades on pigem heteroksülaanid ja (1,3;1,4)- β -glükaanid (Carpita ja Gibeaut, 1993). Kuna käesolevas töös uuritakse nisuõlgede eeltötluse käigus moodustunud inhibiitoreid, siis siinkohal on rõhuasetus peamiselt kõrrelistes enam levinud hemitseelluloosidel.

Ksülaanidele on iseloomulik ksülopüraanosi jääkidest koosnev peahel, milles ksüloosijäägid on omavahel ühendatud β -1,4-glükosiidse sideme kaudu. Alamklassidesse on ksülaanid jagatud peahelaga ühendatud suhkrujääkide alusel. Kõrrelistes on levinumad ksülaanide alamklassid arabinoksülaanid, (glükurono)arabinoksülaanid ja heteroksülaanid (Ebringerová, 2006). Arabinoksülaanides on L-arabiinooosi jäägid furanooses vormis ja need on ühendatud peahela D-ksüloosii jääkide C(O)2 ja/või C(O)3 aatomitega. Hargnemised peahelast võivad olla lühikesed, piirduda üksnes üksiku arabiinooisiga. Samas võib arabiinooosi

küljes olla omakorda veel ka fenoolne hape, näiteks feerulahape või kumariühape (Burton jt., 2010). Sellist tüüpi ksülaanid on enam levinud endospermis ja seda ümbritseva kesta koostises. Lignifitseerunud kudedes on pigem iseloomulik (D-glükurono)-L-arabino-D-ksülaanide esinemine (Ebringerová, 2006). Nendele on iseloomulik arabinoosi kaudu seotud glükuroonhapete paiknemine kõrvalahelas. Antud ksülaanide hulgas on täheldatud ka ksüloosijääkide osalist O-atsetüleeritust (Burton ja Fincher, 2012; Burton jt., 2010). Kolmandaks kõrrelistes levinud ksülaanide rühmaks on heterokksülaanid. Nende korral võivad asendusrühmad olla väga varieeruvad nii pikkuse kui koostise poolest, sisaldades nii monosahhariidide (arabinoosi, galaktoosi) jääke kui ka fenoolseid happeid (näiteks glükuroonhapet). Samuti võivad heterokksülaanide ahelad olla O-atsetüleeritud (Burton ja Fincher, 2012) (joonis 2).

Peale erinevat tüüpi ksülaanide on kõrreliste iseloomulik mannaanide esinemine. Mannaanid on levinud hemitselluloosi komponendid peamiselt säilituskudedes. Peamine mannaanide rühm kõrrelistes on galaktomannaanid. D-galakto-D-mannaanide peahela moodustavad β -1,4-glükosiidse sideme kaudu seotud mannopüranoosi jäägid, mis on erinevas ulatuses C(O)6 aatomite kaudu α -galaktopüranoosidega seotud (Burton jt., 2010; Ebringerová, 2006) (joonis 2).

Kolmas ja üksnes kõrreliste sugukonnale omane hemitselluloosi komponent on (1,3;1,4)- β -glükaanid. Erinevalt ksülaanidest ja mannaanidest ei ole need polümeerid hargnenud. Enamasti koosneb (1,3;1,4)- β -glükaani ahel tsellootriosüüli (DP3) ja tsellotetraosüüli (DP4) segmentidest, mis on omavahel seotud β -1,3-sideme kaudu (joonis 2). On näidatud ka kuni viieteistkümne β -1,4-sidemega seotud glükoosijäägi paiknemist kõrvuti. Samas ei paikne (1,3;1,4)- β -glükaani ahelas järjestiku kahte β -1,3-sidet ning polümeeri ahela redutseeriva kui ka mitteredutseeriva otsa viimased glükoosijäägid on ülejäänud ahelaga ühendatud alati β -1,4-sideme kaudu (Burton ja Fincher, 2012; Ebringerová, 2006; Lazaridou jt., 2004).

Lisaks ksülaanidele, mannaanidele ja (1,3;1,4)- β -glükaanidele on kõrrelistes esindatud ka ksüloglükaanid (2-5 %) (Ebringerová, 2006). D-ksülo-D-glükaanide peahelal koosneb tselluloosiga sarnaselt β -1,4-sidemega ühendatud glükoosijääkidest (joonis 2). Peahelast hargnevad ksüloosijäägid glükoosijääkide C(O)6 aatomitest α -glükosiidsete sidemete kaudu (Burton jt., 2010).

Mannaanidele, ksülaanidele ja ksüloglükaanidele omased asendusrühmad ja (1,3;1,4)- β -glükaanide ahelasiseste β -1,3-sidemete ebakorrapärane paigutus takistavad inter- ja

intramolekulaarsete vesiniksidemete moodustumist ja kristalliliste struktuuride teket. Seetõttu on hemitselluloosid hüdrolüütilistele ensüümidele paremini ligipääsetavad. Hemitselluloosidele omased hargnemised või erinevat tüüpi sidemed peaaelas suurendavad ka hemitselluloosete oligosahhariide lahustuvust vees (Burton ja Fincher, 2012; Burton jt., 2010).

1.1.3. Ligniin

Ligniin on heterogeenne klass polümeere, mida leidub taimede sekundaarsetes rakukestades ja mis moodustuvad 4-hüdoksüfenüülpropanoidide (monolignoolide) oksüdatiivsel polümerisatsioonil (Ralph jt., 2004). Enim levinud monolignoolid on koniferüül-, sinapüül- ja p-kumarüülalkohol. Eri taimerühmadele on omane erinev monolignoolide osakaal, kuid see varieerub ka taimeliikide ning rakutüüpide vahel (Vanholme jt. 2010; Billa jt., 1998). Lisaks kolmele peamisele monolignoolile on leitud nende erinevaid derivaate, mida esineb ligniini koostises vähemal määral. Ligniini heterogeensust tõstab veel asjaolu, et monolignoolid võivad lülituda polümeeri erinevate sidemete kaudu. Enam levinud sidemed ligniinis on β -O-4 ning ka C α -C β (Vanholme jt. 2010).

Tänu ligniiniahelate hargnemistele, ahelatevahelistele ristsidemetele ja kovalentsetele interaktsioonidele teiste rakukesta polüsahhariididega, on ligniin jäiga struktuuriga ja läbi põimunud teiste rakukesta komponentidega (Ralph jt., 2004). Kirjeldamiseks tselluloosi mikrofibrillide, hemitselluloosi ja ligniini paigutumist sekundaarses rakukestas, pakkusid Ding jt. hiljuti välja võileivalaadse struktuurimudeli (joonis 1B) ja näitasid, et ligniini esinemine rakukestas kahandab märgatavalt tselluloosiahelate kättesaadavust hüdrolüütilistele ensüümidele (Ding jt., 2012).

1.2. Bioetanooli tootmine lignotselluloosest biomassist

Bioetanooli tootmisprotsess lignotselluloosest biomassist koosneb kolmest järjestikusest etapist. Esmalt viiakse läbi biomassi eeltötlus, et muuta tselluloos ensüümidele

kättesaadavamaks. Teise etapina toimub ensümaatiline hüdroolüüs, mille käigus vabanevad monosahhariidid, mis on seejärel omastatavad mikroorganismidele, kes kolmandas etapis fermenteerivad suhkrud etanooliks.

1.2.1. Lignotselluloosse biomassi eeltöötlus

Eeltöötuse käigus taime rakukesta struktuuris toimuvad ümberkorraldused tõhustavad ensüümide ligipääsu tselluloosile ning suurendavad saagikust järgnevas hüdroolüüsi etapis. Peamised füüsikokeemilised eeltöötlusviisid saab jagada järgnevalt:

- aluseline eeltöötlus;
- organosolv eeltöötlus;
- happeline eeltöötlus;
- hüdrotermiline eeltöötlus;
- ioonvedelikega eeltöötlus.

Kõigi nimetatud meetodite kasutamisel toimuvad struktuurilised ümberkorraldused taime rakukesta struktuuris. Aluseline ja organosolv eeltöötlus on suunatud eelkõige ligniini eemaldamisele rakukestast, samas kui happelise ja hüdrotermilise eeltöötuse käigus lahustub peamiselt hemitselluloos (Kumar jt. 2009). Ioonvedelikega eeltöötuse eesmärgiks on aga tselluloosi muutmine amorfsemaks (Alvira jt., 2010).

Kuna ligniin takistab füüsiliselt ensüümide ligipääsu polüsahhariididele ning on näidatud ka tsellulaaside mitteproduktiivset seondumist ligniiniga, siis on välja töötatud eeltöötlusmeetodid ligniini eemaldamiseks rakukesta koostisest (Ding jt., 2012; Nakagame jt., 2010; Vanholme jt., 2010). Üheks võimaluseks on eeltöötuse läbiviimine aluselistes tingimustes, töödeldes lignotselluloosi näiteks lubjaga või ammoniaagi vesilahusega. Lubja eelisteks on madal hind ning omadus hemitselluloosi küljest eemaldada atsetüülühmi (Yang ja Wyman, 2007). Atsetüülühmade olemasolu takistab samuti ensümaatilise hüdroolüüsi kulgemist (Selig jt., 2009). Lubjaga töötlemine on sobiv madala liigniinisaldusega biomassi eeltöötluks (Wyman jt., 2005). Kõrge liigniinisaldusega puidu eeltöötlemiseks sobib aga ARP (*ammonia recycle percolation*) meetod, mis seisneb 10-15 %-lise ammoniaagi vesilahuse korduval juhtimisel läbi biomassi. ARP meetodiga on võimalik eemaldada ligniini väga kõrge efektiivsusega ja suurendada seeläbi ensümaatilise hüdroolüüsi saagikust (Yang ja Wyman,

2008; Wyman jt., 2005). Aluseliste meetodite hulgas on erandlikuks AFEX (*ammonia fiber explosion*), mis baseerub vedela ammoniaagiga kõrgel temperatuuril ja järsu rõhumuutusega töötlusel. AFEX eeltöötlusel rakukesta komponentide (tselluloosi, ligniini, hemitselluloosi) lahustumist ei toimu. Samas aga väheneb tselluloosi kristallilisus ja hemitselluloosi küljest vabanevad atsetüülrühmad. Samuti toimuvad ümberkorraldused hemitselluloosi ja ligniini struktuuris. AFEX meetod ei ole piisavalt efektiivne kõrge ligniinisaldusega biomassi eeltöötluks. Lisaks tuleb arvestada, et ammoniaagi kulu on võrdväärne töödeldava biomassi kogusega (1 kg biomassi eeltöötluks kulub 1-2 kg ammoniaaki), mistõttu tuleb eeltöötluksulude vähendamiseks seda kindlasti taaskasutada (Kumar jt., 2009; Wyman jt., 2005).

Sarnaselt aluseliste meetodite kasutamisega on efektiivne meetod ligniini eemaldamiseks ka organosolv eeltöötlus ehk töötlemine orgaaniliste solventidega. Lahustina kasutatakse peamiselt etanooli, metanooli, atsetooni, etüleen glükooli või tetrahüdrofurfurüül alkoholi. Meetodi peamiseks eeliseks on võimalus ekstraheerida kõrvalproduktina praktiliselt puhas ligniin, mida saab edaspidi kasutada keemiatööstuses. Lisaks on võimalik meetodit kombineerida happetöötluksuga, mis võimaldab eemaldada ka hemitselluloosi ning suurendada ensüümhüdrolüüsi saagikust. Peamiseks meetodi puuduseks on lisaenergia kulutamine, selleks et kasutatud solvent biomassist eraldada või seda peale eeltöötlust lahjendada, sest kõrges kontsentratsioonis inhibeerivad orgaanilised solvendid hüdrolüüsi ja fermentatsiooni. Lisaks on orgaanilised lahustid kallid ja neid tuleks meetodi tasuvuse eesmärgil taaskasutada (Alvira jt., 2010; Kumar jt., 2009).

Lahjendatud happega eeltöötlus ja hüdrotermiline eeltöötlus lõhuvad hemitselluloosi ja ligniini vahelisi sidemeid ning vabastavad reaktsiooni keskkonda peamiselt hemitselluloosi. Lahjendatud happega eeltöötlusel lagundatakse hemitselluloos peamiselt monosahhariideks. Hüdrotermilise eeltöötluks käigus vabaneb hemitselluloos peamiselt oligomeeridena (Pu jt., 2013). Viies eeltöötlust läbi kõrgemal temperatuuril, on võimalik vabanenud oligosahhariidid degradeerida järjest väiksemateks fragmentideks (Vegas jt., 2008). Kõrgemal temperatuuril toimub paralleelseselt oligosahhariidide degradatsiooniga aga ka lahustunud monomeeride dehüdratatsioon. Heksoosidest moodustuvad hüdroksümetüülfurfuraalid ja pentoosidest tekkivad furfuraalid inhibeerivad fermentatsiooni etapis mikroorganismide kasvu ning vähendavad seetõttu etanooli saagikust (Jönsson jt., 2013). Erinevalt hemitselluloosist jääb enamus ligniinist ja tselluloosist hüdrotermilise ja lahjendatud happega eeltöötluks käigus

lahustumata kujule. Siiski toimuvad ka tselluloosi ja ligniini struktuuris ümberkorraldused ja suureneb rakukesta poorsus. Nii hemitselluloosi fragmentatsioon ja lahustumine kui ka rakukestas toimuvad ümberkorraldused suurendavad tselluloosi kättesaadavust ensüümidele (Pu jt., 2013). Lahjendatud happega eeltötluseks kasutatakse sageli 0.4-2.0 %-list H_2SO_4 kontsentratsiooni ja temperatuuri 140-200 °C. Sarnaselt lahjendatud happega eeltötlusele toimub ka hüdrotermiline eeltötlus kõrgel temperatuuril, 140-220 °C juures. Hüdrotermiline eeltötlus on atraktiivne meetod tänu võimalusele viia eeltötlus läbi vesikeskkonnas ilma muid kemikaale lisamata. Hüdrotermilise eeltötluse muudavad efektiivseks kõrge temperatuuri mõjul vee pK_a väärtuse vähenemine ja protsessi käigus hemitselluloosist vabanenud orgaanilised happed (Pu jt., 2013).

Eelnevate kõrval on erandlikuks meetodiks eeltötlusioonvedelikega. Ioonvedelikud on orgaanilised soolad, mis koosnevad enamasti suurest orgaanilisest kationist ja väikesest anorgaanilisest anioonist ning on suhteliselt madalatel temperatuuridel vedelas olekus. Tänu ioonvedelike stabiilsetele ja mittetoksilistele omadustele nimetatakse neid rohelisteks kemikaalideks (*green chemicals*). Ioonvedelikud on termiliselt ja keemiliselt stabiilsed, mittesüttivad, omavad madalat aururõhku ning säilitavad vedela oleku laias temperatuuride vahemikus (Vancov jt., 2012). Näiteks 1-butüül-3-metüülimidasoolkloriid on vedelas olekus temperatuuride vahemikus 41-254 °C (Huddleston jt., 2001). Ioonvedelikega eeltötlus katkestab peamiselt mittekovalentseid interaktsioone tselluloosi, ligniini ja hemitselluloosi vahel ning ka polümeeride siseselt, samas aga praktiliselt ei vabasta lahustuvaid degradatsiooniprodukte. Ioonvedelikega tötluse käigus osa tselluloosi lahustub ning selle regenereerimiseks on tarvis lisada antisolventi, näiteks atsetooni, ioniseeritud vett või alkoholi. Regenereeritud tselluloos on amorfse struktuuriga ja poorne ning allub ensümaatilisele hüdrolüüsile paremini. Ioonvedelikega eeltötluse peamiseks puudusteks on ioonvedelike kõrge hind ja suure kontsentratsiooni korral nende inhibeeriv mõju ensüümidele. Seetõttu tuleks need eemaldada enne biomassi hüdrolüüsile suunamist ning korduvkasutada (Vancov jt., 2012; Alvira jt., 2010).

Tänapäeval toimub intensiivne eeltötlusmeetodite arendamine, nende omavaheline kombineerimine ja täiustamine. Erinevatel eeltötlusmeetoditel on omad eelised ja puudused ning siiani ei ole välja töötatud universaalset tehnoloogiat, mis oleks ühtviisi efektiivne erineva päritoluga lignotselluloosi eeltötluseks. Eeltötlusmeetodi valik sõltub nii konkreetsest biomassist kui ka bioetanooli tootmiseks kasutatavast tehnoloogiast. Tööstuse seisukohast on

lisaks eeltötluse efektiivsusele oluline ka selle protsessi maksumus. Seetõttu on sobiva meetodi valikul sageli määravaks eeltötluse efektiivsuse ja hinna suhe.

1.2.2. (Ligno)tselluloosi hüdroolüüs.

Looduses on kõige efektiivsemad lignotselluloosi lagundajad seened ja bakterid, kes toodavad nii tselluloosi, hemitselluloosi kui ka ligniini lagundavaid ensüüme, mida nimetatakse ühiselt tsellulolüütiliseks süsteemiks. Kõige enam on uuritud pehmemädanikseene *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) tsellulolüütilist süsteemi. *T. reesei* tsellulolüütilise süsteemi põhikomponendiks on tsellobiohüdrolaas (CBH) *TrCel7A*, mis moodustab 60 % seene poolt sekreteeritavate valkude hulgast. CBH *TrCel6A* moodustab sekreteeritavatest valkudest ca 20 %. Samuti sekreteerib seen ka viite endoglükanaasi (EG), koguhulgas ca 12 % ja nendest peamised on *TrCel7B* (EGI), *TrCel5A* (EGII) ja *TrCel12A* (EGIII). Lisaks sekreteerib *T. reesei* ka kahte β -glükosidaasi (BG), mis lagundavad tsellobioosi kaheks glükoosiks, ja erinevaid hemitsellulaase (Zhang ja Lynd, 2004).

TrCel7A on tselluloosiahela redutseeriva otsa spetsiifiline tsellobiohüdrolaas, mis katalüüsib β -1;4-glükosiidse sideme hüdroolüüsi. *TrCel7A* koosneb, sarnaselt paljudele teistele glükosüülhüdrolaasidele, kahest domeenist – suuremast katalüütilisest ja väiksemast tselluloosile seondumise domeenist. Kaks domeeni on omavahel ühendatud peptiidse linkeri abil. *TrCel7A* katalüütiline domeen sisaldab 50 Å pikkust tunnelikujulist aktiivtsenterit, kus on 10 seondumiskohta tselluloosiahelas järjestiku paiknevatele glükoosijääkidele (Divne jt., 1994). *TrCel7A* peamine hüdroolüüsiprodukt tselluloosi hüdroolüüsil on tsellobioos, mis on ka kõige tugevam siiani näidatud *TrCel7A* inhibiitor (Grano jt., 2004; Medve jt., 1998).

Teine *T. reesei* toodetud tsellobiohüdrolaas on mitteredutseeriva otsa spetsiifiline *TrCel6A*. Erinevalt *TrCel7*-st on *TrCel6A* aktiivtsentris 6 glükoosijäägi seondumiskohta ja aktiivtsenter on rohkem avatatud. Seetõttu seondub *TrCel6A* substraadiga nõrgemini ja omab võrreldes *TrCel7A*-ga madalamat protsessiivsust. Samas on *TrCel6A* võrreldes *TrCel7A*-ga tsellobioosi poolsest produktinhibitsioonist oluliselt vähem mõjutatud (Teeri, 1997; Murphy jt., 2013).

Erinevalt tsellobiohüdrolaasidest on endoglükanaasidele iseloomulik avatum vaokujuline aktiivtsenter, mis võimaldab läbi viia ahelasisest hüdroolüüsi. Võrreldes *TrCel7B* ja *TrCel5A*-

ga on *TrCel12A* tselluloosi hüdrolyüsil madalama aktiivsusega. *TrCel12A* märgatavalt madalamat aktiivsust on näidatud ka lahustuvate tsello-oligosahhariidide hüdrolyüsil (Karlsson jt., 2002). Lisaks tsellulaasele aktiivsusele omavad antud endoglükanaasid ka glükomannanaasid aktiivsust ning *TrCel7B* ja *TrCel12A* lisaks veel ka ksülanaasid aktiivsust (Karlsson jt., 2002, Biely jt., 1991).

Kasutades tsellulolüütilisi ensüüme üleekspresserivaid mikroorganismide tüvesid, toodetakse kommertsiaalseid tsellulaaside segusid eeltöödeldud lingotselluloosi tööstuslikuks degradatsiooniks. Tsellulaaside tootmise kõrge hind ning suured ensüümide kogused, mis lignotselluloosi efektiivseks hüdrolyüsiks kuluvad, on eeltöötuse kõrval säästliku bioetanooli tootmise peamised kitsaskohad (Merino ja Cherry, 2007). Pideva kommertsiaalsete tsellulaaside segude parendamisega – uute aktiivsuste lisamise ja olemasolevate aktiivsuste suurendamise ja täiendamise näol – on märgatavalt suurendatud lignotselluloosi lagundamise efektiivsust ning alandatud lisatavate tsellulaaside hulka. Näiteks kommertsiaalset preparatsiooni Celluclast, mis koosneb *T. reesei* tsellulaasidest, on täiendatud seene *Aspergillus niger* BG Novozymes®N188 lisamisega (Skovgaard ja Jørgensen, 2013). Viimasel ajal on kõrgendatud tähelepanu all ka oksüdatiivsete ensüümide roll lignotselluloosi lagundamisel (Beeson jt., 2012; Forsberg jt., 2011; Quinlan jt., 2011; Vaaje-Kolstad jt., 2010).

1.2.3. Ksülaanide ja ksülo-oligosahhariidide inhibeeriv mõju tsellulaasidele

Hüdrotermilise ja lahjendatud happega eeltöötuse käigus vabanevad reaktsiooni keskkonda peamiselt hemitselluloosi komponendid. Vabanenud ksülaan on suures osas fragmenteerunud erineva pikkusega ksülo-oligosahhariidideks (XOS – *xylo-oligosaccharides*) (Pu jt., 2013).

Ksülaanid ja XOS-id inhibeerivad tsellulaase, kuid tõenäoliselt on nende inhibitsioonimehhanism erinev (Baumann jt., 2011; Kabel jt., 2007). Ksülaanid seonduvad vahetult tselluloosiga ja takistavad seeläbi tselluloosi kättesaadavust tsellulaasidele. Ksülaanide seondumine tselluloosiga sõltub nii nende suurusest kui kujust. Suurema molekulmassiga ksülaanid seonduvad tselluloosile paremini ja minimaalselt peavad ksülaanifragmendid tselluloosiga seandumiseks olema DP-ga vähemalt 15. Samuti seonduvad tselluloosiga paremini vähem asendusrühmi sisaldavad ksülaanid (Kabel jt., 2007). Lisaks

ksülaanile inhibeerivad tselluloosi hüdroolüüsi ka ksüloos ja XOS-id (Qing jt., 2010). Lahustuvad ja mittelahustuvad ksülaanid kui ka DP 2-4 ksülooligomeerid inhibeerivad lisaks tsellulaaside segule ka individuaalseid tsellulaase (Zhang jt. 2012).

Peamiselt on uuritud XOS-ide poolset inhibitsiooni tselluloosi hüdroolüüsi võtmeensüümile Cel7A. Erinevalt polümeersest ksülaanist, on XOS-ide puhul välja pakutud Cel7A inhibitsiooni konkurentse inhibitsioonimehhanismi kaudu (Zhang ja Viikari, 2012, Baumann jt., 2011). XOS-ide seondumine *TrCel7A*-ga on näidatud seda tugevam, mida pikem oli XOS-ide pikkus, kusjuures maksimaalne seondumine saavutati olukorras, kus XOS-ide pikkus lähenes glükoosijäkide seondumiskohtade arvule *TrCel7A* aktiivtsentri tunnelis (Baumann jt., 2011). Seetõttu arvasid Baumann jt., et XOS-id, matkides tselluloosi ahela struktuuri, seonduvad üle *TrCel7A* aktiivtsentri tunneli (Baumann jt., 2011). Kuna aktiivtsentris on 10 glükoosijäägi seondumiskohta, siis XOS-ide DP kasvades 10-ni on võimalik kasutada järjest enamate glükoosijääkide seondumiskohtade seondumisenergiaid ja saavutada ensüümiga järjest tugevam interaktsioon (Baumann jt., 2011).

Eeltötluste käigus vabanevate hemitselluloosi ja ligniini degradatsiooniproduktide inhibeeriv toime fermenteerivatele mikroorganismidele on hästi teada (Jönsson jt., 2013; Palmqvist ja Hahn-Hägerdal, 2000). Üheks võimaluseks vähendada lahustuvate rakukesta komponentide pärssivat mõju fermentatsioonile, on eraldada eeltötluse järgselt vedelfraktsioon tahkest. Samas suurendamaks bioetanolitootmise saagikust, töötatakse välja inhibitsiooni suhtes tolerantsemaid geneetiliselt muundatud mikroorganismide tüvesid. Veelgi enam, välja on töötatud ka mikroorganisme, kes suudavad lisaks tselluloosi lagundamisel vabanevale glükoosile fermenteerida ka hemitselluloosi komponente ksüloosi ja arabinoosi (Joshi jt., 2011; Ragauskas 2006). Sellisel juhul ei ole aga enam otstarbekas eraldada vedelfraktsiooni tahkest fraktsioonist. Kui tahket fraktsiooni vedelfraktsioonist ei eraldata, jäävad edasise ensümaatilise hüdroolüüsi keskkonda ka vabanenud hemitselluloosi fragmendid, kaasaarvatud XOS-id. Erinevalt fermentatsiooni inhibiitoritest on eeltöödeldud biomassist eraldatud hemitselluloosi fragmentide inhibitoorset mõju tselluloosi hüdroolüüsile kvantitatiivselt väga vähe uuritud.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Materjalid ja ensüümid

Vedelfraktsioon saadi Jan Larsenilt Inbiconist (Frederica, Taani). Glükoos, Novozyme[®]188, Celluclast[®], veise seerumi albumiin (BSA – *bovine serum albumin*) ja madalmolekulaarsed mudelsubstraadid: 4-metüül-umbelliferüül- β -laktosiid (MUL), 4-metüül-umbelliferüül- β -glükosiid (MUG) ja para-nitrofenüül- β -laktosiid (pNPL) osteti Sigma-Aldrichist. Tsellobioos (puhtusega $\geq 99\%$) osteti Flukast. D-[U-¹⁴C] glükoos (262 mCi/mmol) osteti Hartmann Analytic GmbH-st. Sintsillatsioonikohteil osteti Merckist.

¹⁴C-märgistatud bakteriaalne tselluloos (¹⁴C-BC – ¹⁴C-*bacterial cellulose*) oli valmistatud H. Teugjase poolt, kasutades bakteri *Gluconobacterium xylinium* tüve ATCC 53582 (Velleste jt., 2010) ja [U-¹⁴C] glükoosiga rikastatud söödet (Jalak jt., 2012). ¹⁴C-BC spetsiifiline aktiivsus oli 450000 DPM/mg.

Ensüümid *TrCel7A*, *TrCel6A*, *TrCel7B*, *TrCel5A* ja *TrCel12A* olid puhastatud *T. reesei* QM 9414 kultuurifiltraadist vastavalt protokollidele (Kipper jt., 2005; Saloheimo jt., 1988; Bhikhabai jt., 1984; Håkansson jt., 1978). β -glükosidaas (*N188BG*) oli puhastatud Novozyme[®]188-st vastavalt protokollile (Sipos jt., 2010). *Ta* ksülanaas *TaXyn10A* puhastati *T. reesei* kultuurifiltraadist, mis oli saadud *TaXyn10A* heteroloogsel ekspressioonil *T. reesei* tüves, kus puudusid 4 peamist *T. reesei* tsellulaaside geeni. Valku *TaXyn10A* sisaldav kultuurifiltraat saadi Terhi Puranenilt Roal Oy-st (Rajamäki, Soome). *TaXyn10A* puhastati kultuurifiltraadi kuumutamise 60 °C juures 50 mM pH 6.0 naatrium fosfaat puhvrts. Kuumutamise tulemusena sadestunud *T. reesei* valgud eraldati tsentrifuugimise teel (Zhang jt., 2011a). Thermomix saadi samuti Terhi Puranenilt Roal Oy-st. Puhastatud *T. reesei* ksüloglükanaas (*TrXG* – *T. reesei xyloglucanase*) *TrCel74A* ja *T. reesei* atsetüülksülaanesteraas (*TrAXE* – *T. reesei acetylxyylanesterase*) saadi aga Matti Siika-aholt VTT-st (Espoo, Soome).

2.2. Metoodika

2.2.1. Inhibitorsete oligosahhariidide eraldamine ja puhastamine vedelfraktsioonist

2.2.1.1. Vedelfraktsiooni lahutamine geelfiltratsioonkromatograafia kolonnil

Enne geelfiltratsiooni kolonnile (Toyopearl HW40-F) kandmist vedelfraktsioon tsentrifuugiti (10000 x g) ja supernatant suruti läbi 0,2 µm PVDF filtri. Kolonnile (koguruumala 400 ml) kanti 1 ml proovi. Geelfiltratsioonkromatograafia viidi läbi ÄKTA Explorer kromatograafia süsteemis (GE Healthcare) 4 °C juures. Toyopearl HW40-F kolonn tasakaalustati ja proovi elueeriti veega voolukiirusel 0,5 ml/min. Fraktsioone koguti 2,5 ml kaupa.

2.2.1.2. Geelfiltratsiooni fraktsioonide analüüs

Kogutud geelfiltratsiooni fraktsioonides mõõdeti a) redutseerivate gruppide sisaldus, kasutades modifitseeritud bitsinkoonhappe (BCA – *bicinchoninic acid*) meetodit (Zhang ja Lynd, 2005; Velleste jt., 2010) ja b) inhibitsioonitugevus *TrCel7A* suhtes MUL substraadil.

Redutseerivate gruppide sisalduse määramiseks lisati 0,5 ml proovile 0,5 ml BCA reagenti. BCA reagent segati reagentidest A (77,7 mg BCA; 2,171 g Na₂CO₃; 0,968 g NaHCO₃; 40 ml vett) ja B (50 mg CuSO₄ x 5H₂O; 50,5 mg L-Seriini, 40 ml vett) suhtes 1/1. Segu kuumutati 30 minutit 75 °C juures ja proovide neeldumine mõõdeti Shimadzu UV-1601 PC spektrofotomeetril 560 nm juures. Redutseerivate otste sisaldus määrati ksüloosi kaliibrite alusel.

Inhibitsioonitugevus määrati 50 mM naatrium atsetaat puhvrts pH 5 juures, kuhu oli lisatud 0,1 g/l BSA-d. Reaktsiooni lõppruumala oli 1 ml ja reaktsioon viidi läbi mikrotsentrifuugi topsides, 35 °C juures. Fraktsioone lahjendati reaktsioonisegusse 100 korda, *TrCel7A* kontsentratsioon reaktsioonisegusse oli 10 nM, MUL- substraadi kontsentratsioon 5 µM. Reaktsioon käivitati MUL-i lisamisega ja peatati pärast 30 minutit inkubeerimist reaktsiooni lõppmahust 1/10 osa 1 M ammooniumhüdrosiidi lisamisega. Vabanenud MU

märke suhteline hulk detekteeriti fluorestsentsi mõõtmise teel kasutades Hitachi F-4500 fluorimeetrit ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 330 nm ja 450 nm.

Geelfiltratsiooni fraktsioone analüüsiti ka kõrgsurvevedelikkromatograafiat (HPLC – *high-pressure liquid chromatography*) kasutades. Selleks kasutati Aminex HPX-87P (BioRad, 5 µm, 250 mm x 7,8) kolonni ja Prominex HPLC süsteemi (Shimadzu), mis oli varustatud RID-10A (Shimadzu) detektoriga. RID-10A detekteerib molekule murdumisnäitaja alusel. Kolonni temperatuur oli 80 °C, detektori temperatuur 60 °C ja elueerimisel kasutati voolukiirust 0,6 ml/min. Fraktsioone koguti 0,3 ml kaupa ja analoogselt geelfiltratsiooni fraktsioonidele analüüsiti ka HPLC fraktsioonides sisalduvaid redutseerivaid gruppe ja inhibitsioonitugevust *TrCel7A* suhtes MUL-il.

Valitud geelfiltratsiooni fraktsioonid liideti ja kontsentreeriti vaakumkontsentraatoris. Kontsentraat puhastati HPLC-l eelnevalt kirjeldatud tingimustel. HPLC fraktsioonid, retentsioonijaga 8-10 minutit, liideti ja kontsentreeriti ning säilitati -18 °C juures enne kasutamist. Sellisel viisil isoleeritud materjal kannab töös läbivalt nimetust inhibitoorsed oligosahhariidid (IOS). IOS-ide kontsentratsiooni väljendati redutseerivate gruppide kontsentratsiooni alusel.

2.2.2. IOS-ide iseloomustamine

2.2.2.1. IOS-ide inhibitsioonitüübi määramine *TrCel7A* suhtes

Inhibitsioonitüübi määramiseks pNPL substraadil mõõdeti pNPL hüdrolüüsi algkiirusi kahel erineval IOS-ide kontsentratsioonil (0,1 µM ja 0,3 µM). Reaktsioone viidi läbi 50 mM, pH 5 naatrium atsetaat puhvril (sisaldas BSA-d 0,1 g/l) 35 °C juures 5 minutit. pNPL-i kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0,1-5 mM. Reaktsioonid käivitati *TrCel7A* (lõppkontsentratsioon 0,5 µM) lisamisega ja peatati reaktsioonide lõppmahust (1 ml) 1/10 osa 1 M ammooniumhüdroksiidi lisamisega. Vabanenud pNP märke suhteline hulk määrati neeldumise alusel Shimadzu UV-1601 PC spektrofotomeetril 414 nm juures.

2.2.2.2. IOS-ide monosahhariidse koostise määramine

IOS-ide monosahhariidne koostis määrati varem avaldatud protokollil alusel (Sluiter jt., 2004). IOS-e autoklaaviti 4 %-lise väävelhappega (1 atm 121 °C) 3 x 20 minutit. Autoklaavitud proovid neutraliseeriti CaCO₃ lisamisega, kuni saavutati pH 5-6. Tekkinud sade eemaldati tsentrifuugimise teel ja supernatant analüüsiti HPLC-l. Standarditena kasutatud monosahhariidide lahuseid töödeldi sarnaselt IOS-idele, et määrata materjali kadu happehüdrolüüsil (Sluiter jt., 2004).

2.2.2.3. IOS-ide oligosahhariidse koostise määramine

Elektropihustusionisatsioon massispektromeetrilised (ESI-MS – *Electrospray ionization mass spectrometry*) mõõtmised viidi läbi tellimustööna Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudis Proteoomika tuumiklaboris. Selleks valmistasime ette proovid, mis sisaldasid 100 µM IOS-e 10 mM, pH 5,5 ammoonium atsetaat puhvris. Ioniseeritud IOS-ide m/z määrati Thermo Electron LTQ Orbitrap classic massispektromeetriga (Thermo Electron, Bremen, Saksamaa), mis oli varustatud Proxeon nanoelektropihustus ionisatsioonallikaga (Proxeon, Odense, Taani). Massispekterid mõõdeti *Orbitrap* massianalüsaatoris vahemikus m/z 500 – m/z 2000, resolutsiooniga 100000. Massispektrid on saadud 10 skanneerimise tulemusel.

IOS-ide deatsetüleerimiseks inkubeerisime IOS-e (700 µM) 50 mM NaOH-ga üleöö 4 °C juures. Proovid neutraliseeriti (pH 6-ni) lisades 0.5 M äädikhapet. Deatsetüleeritud ja neutraliseeritud proov puhastati HPLC-l sarnaselt varem kirjeldatule ja analüüsiti ESI-MS-ga sarnaselt deatsetüleerimata proovile.

2.2.3. *TrCel7A* ja *TrCel7B* inhibitsioon MUL substraadil

Inhibitsioonitugevuse määramiseks MUL substraadil mõõdeti MUL hüdrolyüsi algkiirusi inhibiitorite juuresolekul ja puudumisel. Reaktsioone teostati 50 mM pH 5 naatrium atsetaat puhvris (sisaldas BSA-d 0,1 g/l) 35 °C juures. *TrCel7A* puhul oli ensüümi kontsentratsioon 10 nM ja MUL kontsentratsioon 5 µM. *TrCel7B* puhul oli ensüümi kontsentratsioon 10 nM ja MUL kontsentratsioon 20 µM. IOS-ide kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0-10 µM

(*TrCel7A* puhul) ja 0-200 μM (*TrCel7B* puhul). Tsellobioosi kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0-0,4 mM (*TrCel7A*) või 0-100 mM (*TrCel7B* puhul).

2.2.4. Inhibiitorite ensümaatiline degradatsioon

2.2.4.1. IOS-ide töötlus ensüümidega

Kõik katsed viidi läbi 35 °C juures 50 mM pH 5 naatrium atsetaat puhvrts, kuhu lisati 0,1 g/l BSA-d. IOS-e (100 μM) inkubeeriti erinevate ensüümide juuresolekul 2 tundi. Reaktsioon peatati 100 °C juures 20 minutit kuumutades. Kuumutatud proovid tsentrifuugiti (3 min, 10000 x g) ja supernatanti kasutati jääkinhibitsiooni määramiseks. Jääkinhibitsioon määrati mõõtes *TrCel7A* aktiivsust MUL substraadil, ensüümidega töödeldud IOS-ide juuresolekul analoogselt varem kirjeldatule. Tausta määramiseks kuumutati IOS-ide töötluks kasutatud ensüüme ilma IOS-e lisamata. IOS-ide töötluks kasutati järgnevaid ensüüme: *TrCel7A* (21 μM), *TrCel6A* (7 μM), *TrCel7B* (3,5 μM), *TrCel5A* (3,5 μM), *TrCel12A* (3,5 μM), *NI88BG* (1,75 μM), *TaXyn10A* (1,75 μM), *TrAXE* (0,1 μM), *TrXG* (0,1 μM). Lisaks kasutati IOS-ide töötlemiseks tsellulaaside segusid Celluclast+Novozyme®188 (vastavalt 1,75 FPU-d (*filter paper unit*)/ml ja 4,55 CBU-d (*cellobiase activity unit/ml*)) ja Thermomixi (2,8 mg/ml) (Skovgaard ja Jorgensen, 2013).

IOS-i töötlemisel *NI88BG*-ga ja *TaXyn10A*-ga varieerisime ensüümide kontsentratsiooni vahemikus 1,0 nM – 1,75 μM .

2.2.4.2. Vedelfraktsiooni töötlus ensüümidega

Vedelfraktsiooni töötlemiseks ensüümidega eemaldati esmalt hüdrotermilise eeltötluse käigus alles jäänud tahke fraktsioon. Selleks vedelfraktsioon tsentrifuugiti (3 minutit 10000 x g) ja suruti eemaldatud supernatant läbi 0,2 μm PVCF filtri. Et säilitada vedelfraktsiooni algne kontsentratsioon ka pärast ensüümide lisamist, kontsekreerisime vedelfraktsiooni 2 korda ning lahjendasime hiljem ensüümreaktsiooni segusse 2 korda.

Vedelfraktsiooni inhibitoorse mõju hindamise eelkatsetes (joonis 4) töödeldi vedelfraktsiooni enne inhibitsioonitugevuse määramist *NI88BG*-ga (0,1 μM) 48 tundi.

Vedelfraktsiooni happetöötlus viidi läbi 2 %-lise H₂SO₄ keskkonnas 121 °C juures 20 minuti jooksul ja neutraliseeriti seejärel NaOH lisamisega.

2.2.5. Vedelfraktsiooni poolse *TrCel7A* inhibitsiooni hindamine tselluloosil

TrCel7A inhibitsiooni hindamiseks kasutati substraadina ¹⁴C-BC-d (0,25 mg/ml). ¹⁴C-BC hüdrolüüsi viidi läbi ensüümseguga, mis koosnes *TrCel7A*-st (0,25 µM), *TrCel5A*-st (0,025 µM) ja *N188BG*-st (0,1 µM). Inhibiitorina lisati reaktsioonisegusse (40 % ruumala ulatuses) *N188BG*-ga töödeldud vedelfraktsiooni või happetöödeldud vedelfraktsiooni. Reaktsioon viidi läbi 50 mM naatrium atsetaat pH 5 puhvril (sisaldas 0,1 g/l BSA-d) 25 °C juures. 10, 30, ja 50 minuti möödudes võeti reaktsioonisegust 0,2 ml proovi ning lisati 20 µl-le NaOH-le, et reaktsioon peatada. Samuti viidi reaktsioon läbi ilma vedelfraktsiooni lisamiseta. Alles jäänud tselluloos eemadati tsentrifuugides (2 minutit, 10000 x g). 150 µl supernatanti segati 5 ml sintsilatsioonikokteiliga, misjärel mõõdeti radioaktiivsused (Perkin Elmer).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. *TrCel7A* aktiivsust inhibeerivate molekulide identifitseerimine

3.1.1. *TrCel7A* inhibitsioon eeltöödeldud nisuõlgede vedelfraktsiooni poolt

Nisuõlgede hüdrotermiline eeltöötlus teostati Taanis Inbiconi lignotselluloosest biomassist bietanooli tootmise piloottehasest (Petersen jt., 2009; Thomsen jt., 2008). Eeltöötlus viidi läbi vesikeskkonnas (vee ja nisuõlgede suhe 5:1), 195 °C juures 12 minuti jooksul. Eetöötluse järel eraldati tahke fraktsioon vedelfraktsioonist. 100 kg nisuõlgede hüdrotermilise eeltöötluse käigus saadi kokku 175 kg 35 %-lise kuivainesisaldusega tahket fraktsiooni ja 400 liitrit 3 %-lise kuivainesisaldusega vedelfraktsiooni.

Tabel 1. Nisuõlgede koostis enne eeltöötlust ja eeltöötluse järgne tahke fraktsiooni koostis^a.

| | Tselluloos ^b | Ksülaan ^b | Arabinaan ^b | Ligniin ^b | Tuhk ^b |
|-----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Töötlemata nisuõled | 36,4 | 23,5 | 2,9 | 20 | 4,7 |
| Eeltöödeldud nisuõled | 58,5 | 5,3 | 0,0 | 26,4 | 2,6 |

^a Määratud Inbiconi piloottehasest Taanis Jan Larseni poolt.

^b Komponentide vastavad osakaalud on esitatud protsendina kuivmassist.

Nisuõlgede algse polüsahhariidse koostise võrdlemisel hüdrotermilise eeltöötluse järgse tahke fraktsiooni koostisega selgus, et hemitselluloosi komponentide ksülaani ja arabinaani, mis moodustasid nisuõlgede kuivmassist algselt vastavalt 23,5 % ja 2,9 %, osakaal oli eeltöötluse käigus oluliselt langenud. Ksülaani oli järel 5,3 % ja arabinaani tahkes fraktsioonis enam ei esinenud. Hemitselluloosi osakaal oli vähenenud, kuna arabinaan ja suurem osa ksülaanist olid vabanenud reaktsiooni keskkonda lahustunud kujul. Samas oli tänu hemitselluloosi vabanemisele tselluloosi ja ligniini osakaal kuivmassis kasvanud vastavalt 36,4 %-lt 58,5 %-ni ja 20 %-lt 26,4 %-ni. See näitab, et enamus tselluloosist ja ligniinist oli jäänud tahkesse faasi (tabel 1).

Vedelfraktsiooni koostise analüüsil selgus, et suur osa eeltöötluse käigus vabanenud hemitselluloosist jäi reaktsiooni keskkonda oligomeersel kujul. Vedelfraktsioonis kõige enam esindatud suhkruid (ksüloosi (11,3 g/l) ja glükoosi (3 g/l) oli oligomeeride koostises vastavalt

81 % ja 88 %. Lisaks ksüloosile ja glükoosile sisaldas vedelfraktsioon veel arabinoosi, mannoosi ja galaktoosi, kuid nende hulk oligomeeride koostises jäi alla 1 g/l ja monosahhariididena esines neid vedelfraktsioonis enamasti alla 0,5 g/l (tabel 2).

Tabel 2. Eeltöödeldud nisuõlgede vedelfraktsiooni suhkruline koostis (g/l)

| | Glükoos | Ksüloos | Arabinoos | Galaktoos | Mannoos |
|-----------------------------------|---------|---------|-----------|-----------|---------|
| Kogusuhkur ^a | 3,4 | 11,3 | 1,2 | 0,8 | 0,8 |
| Monomeersed suhkrud | 0,4 | 2,1 | 0,5 | 0,1 | 0,4 |
| Oligomeersed suhkrud ^b | 3,0 | 9,2 | 0,7 | 0,7 | 0,4 |

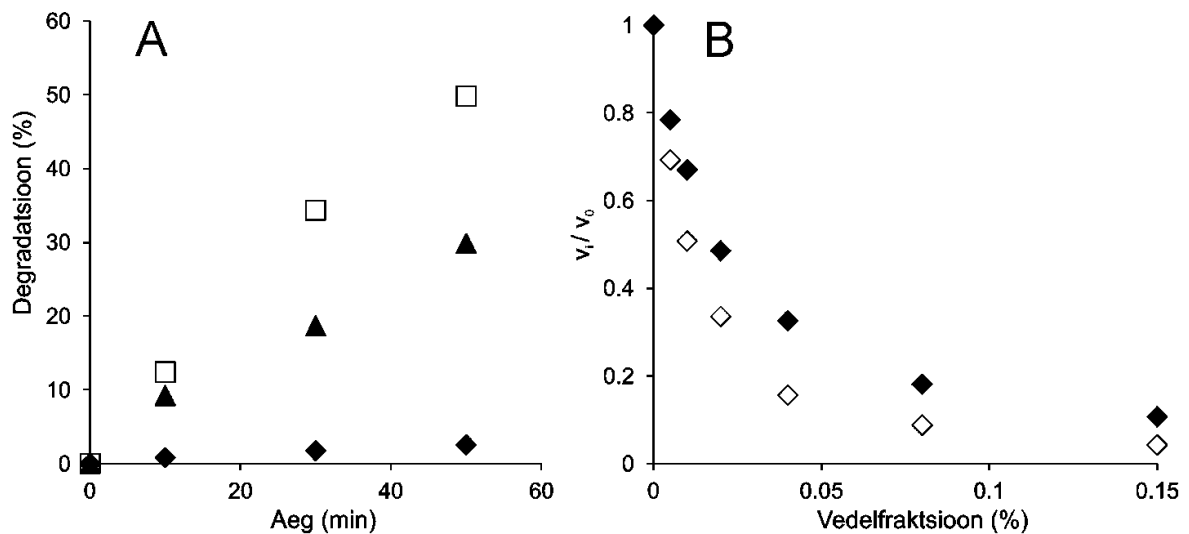
^aVedelfraktsiooni kogusuhkur sisaldas nii vedelfraktsioonis sisaldunud vabas monomeerses vormis suhkruid kui ka oligomeeride koostises esinevaid suhkrujääke. Vedelfraktsiooni kogusuhkur on määratud Taanis Inbiconi piloottehasel Jan Larseni poolt.

^boligomeerses vormis suhkrute osakaal vedelfraktsioonis on väljendatud kogusuhkru ja monomeerses vormis suhkrute vahena.

Eelkatsena uurisime vedelfraktsiooni inhibitoorset mõju *TrCel7A* aktiivsusele ¹⁴C-BC-I (katsed teostati H. Teugjase poolt). Vedelfraktsioonist oli eelnevalt eemaldatud sinna jäänud tahke osa. Kuna tellobioos on tugev *TrCel7A* inhibiitor, siis töödeldi vedelfraktsiooni ka *NI88BG*-ga, et eemaldada võimalik tsellobioosi poolne inhibitoorne mõju, (Murphy jt., 2013; Gruno jt., 2004). *NI88BG*-ga töödeldud vedelfraktsiooni lisamine (40 % reaktsiooni koguruumalast) põhjustas 90 %-lise aktiivsuse languse ¹⁴C-BC hüdrolüüsil *TrCel7A* ja *TrCel5A* segu poolt. Vedelfraktsiooni töötlemine kõrgel temperatuuril 2 %-lise H₂SO₄-ga aga vähendas inhibitsiooni, mille põhjal oletasime, et inhibitsioon võis olla põhjustatud oligosahhariidide poolt (joonis 3A).

Vedelfraktsiooni inhibitsiooni *TrCel7A*-le jälgiti ka mudelsubstraadil MUL. Selgus, et 10000 korda reaktsioonisegusse lahjendatud vedelfraktsioon vähendas *TrCel7A* aktiivsust MUL substraadil 50 % (joonis 3B). Vedelfraktsiooni töötlus *NI88BG*-ga vähendas inhibitsiooni 2 korda, kuid see jäi siiski piisavalt tugevaks, et seda saaks põhjendada ainult XOS-ide esinemisega vedelfraktsioonis (Baumann jt., 2011).

Vedelfraktsiooni tugev inhibeeriv mõju *TrCel7A*-le ka pärast *NI88BG*-ga töötlust ajendas meid identifitseerima vedelfraktsioonis sisalduvaid inhibitsiooni põhjustavaid komponente.

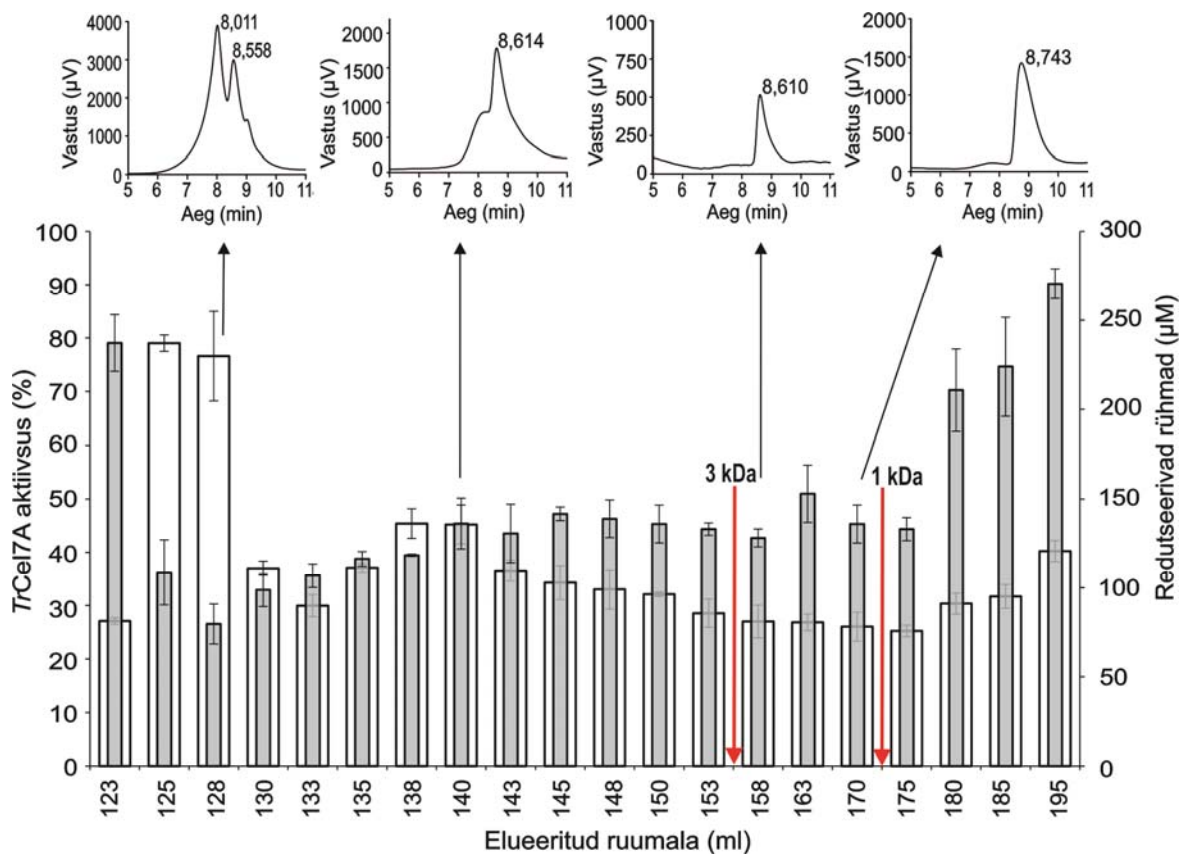


Joonis 3. Vedelfraktsioon on tugev *TrCel7A* inhibiitor nii ¹⁴C-BC-I kui ka MUL substraadil. A. ¹⁴C-BC-d (0,25 mg/ml) inkubeeriti *TrCel7A* (0,25 μM)/ EG (*TrCel5A*) (0,025 μM) /*NI88BG* (0,1 μM) ensüümseguga 25 °C juures vedelfraktsiooni lisamata (□); *NI88BG* töödeldud vedelfraktsiooni juuresolekul (◆) või väävelhappega töödeldud vedelfraktsiooni juuresolekul (▲). **B.** MUL substraati (5 μM) hüdrolüüsi 10 nM *TrCel7A*-ga 35 °C juures vedelfraktsiooni (◇) või *NI88BG* töödeldud vedelfraktsiooni juuresolekul (◆). v_i ja v_0 on MUL hüdrolüüsi algkiirused vastavalt vedelfraktsiooni juuresolekul ja puudumisel.

Vedelfraktsiooni *TrCel7A* inhibitsiooni katsed ¹⁴C-BC-I ja MUL substraadil on läbi viidud H. Teugjase poolt.

3.1.2. Inhibiitorite eraldamine ja identifitseerimine vedelfraktsioonist

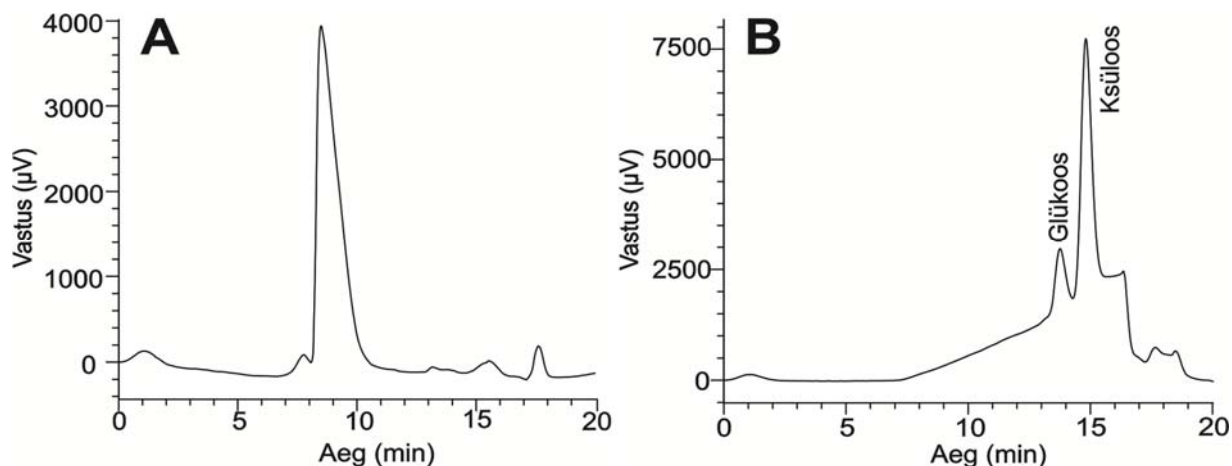
Inhibiitorite eraldamiseks vedelfraktsioonist kasutati geelfiltratsioonkromatograafiat. Kogutud fraktsioonides a.) määrati redutseerivate rühmade sisaldus, kasutades modifitseeritud BCA meetodit (Velleste jt.,2010; Zhang ja Lynd, 2005); b.) hinnati inhibiitorset mõju *TrCel7A*-le MUL hüdrolüüsil. Selgus, et inhibitsioon oli suure elueeritud ruumala ulatuses suhteliselt ühtlase tugevusega. *TrCel7A*-d inhibeerivad fraktsioonid jäid molekulmassi piirkonda 0,5-10 kDa, mis viitas sellele, et vedelfraktsioon sisaldas erineva molekulmassiga inhibiitorivaid komponente (joonis 4).



Joonis 4. Inhibiitorite lahutamine vedelfraktsioonist. Vedelfraktsioon lahutati, kasutades geelfiltratsioonkromatograafiat. Kogutud fraktsioonides mõõdeti redutseerivate rühmade sisaldus (hallid tulbad) ja inhibitsioonitugevus *TrCel7A*-le MUL substraadil. Inhibitsioonitugevuse määramiseks lahjendati fraktsioone reaktsioonisegusse 100 korda (valged tulbad). Geelfiltratsiooni fraktsioone analüüsiti HPLC-l ning osadele geelfiltratsiooni fraktsioonidele on lisatud vastavad HPLC kromatogrammid. Fraktsioonid, ruumala vahemikus 155,0-172,5 ml (märgitud punaste nooltega) ja molekulmassi vahemikus 1-3 kDa (fraktsioonid piiritletud punaste nooltega), liideti, kontsentreeriti vaakumkontsentraatoris ja puhastati HPLC-l. Joontega on piiratud standardhälve (mõõtmisi tehti kahes korduses).

Järgnevalt analüüsiti geelfiltratsiooni fraktsioone HPLC-l. Kogutud HPLC fraktsioonides määrati redutseerivate rühmade sisaldus ja fraktsioonide inhibeeriv mõju *TrCel7A*-le. *TrCel7A*-d inhibeerisid HPLC fraktsioonid, mis väljusid enne standardina kasutatud mono- ja disahhariide ning moodustasid ühiselt domineeriva piigi. Kuna geelfiltratsiooni fraktsioonide puhul, mis vastasid molekulmassile 3 kDa ja enam, olid HPLC kromatogrammidel inhibiitoreid sisaldavad piigid heterogeensemad (joonis 4), otsustasime edaspidi keskenduda geelfiltratsiooni fraktsioonidele molekulmassi piirkonnas 1-3 kDa. Need fraktsioonid vastasid järgnevale kriteeriumitele: a) moodustasid HPLC kromatogrammil inhibiitori

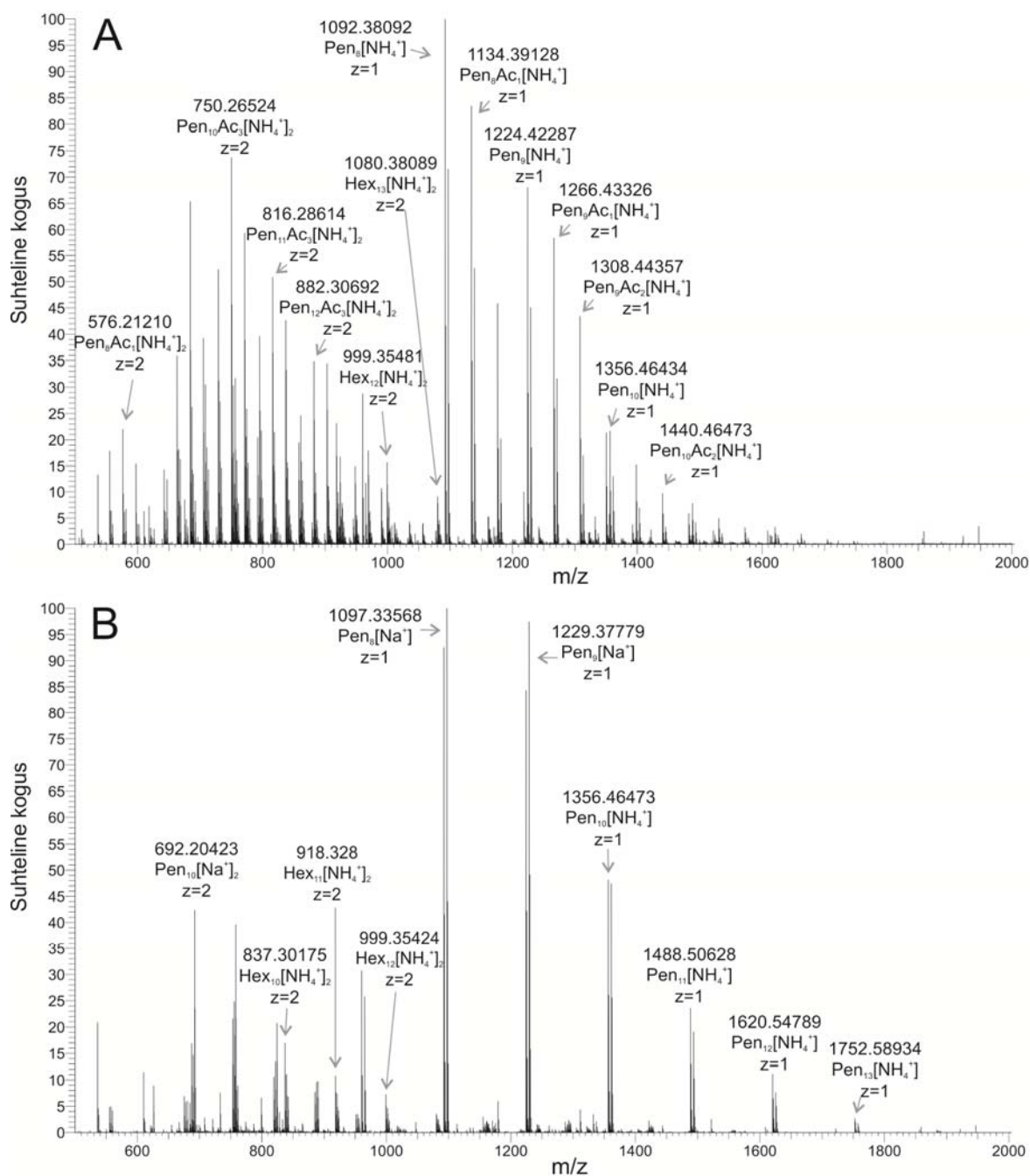
väljumispiirkonnas homogeense piigi, b) omasid sama tugevat inhibitsiooni *TrCel7A*-le, c) sisaldasid samas hulgas redutseerivaid rühmi (joonis 4). Need fraktsioonid kontsentreeriti vaakumkontsentraatoriga ning puhastati HPLC-l (joonis 5A).



Joonis 5. Vedelfraktsioonist eraldatud inhibiitorite monomeerse koostise määramine. A. HPLC kromatogramm liidetud ja HPLC abil puhastatud geelfiltratsiooni fraktsioonidest (joonisel 4 punaste noolte vaheline piirkond), mida kasutati edaspidises töös inhibiitorite identifitseerimiseks ja tsellulaaside inhibitsiooni kirjeldamiseks. **B.** HPLC kromatogramm inhibiitorite töötlemise järel 2 %-lise H_2SO_4 -ga näitab, et inhibiitorite peamised suhkruised koostisosad on ksüloos ja glükoos vahekorras 5/1.

Esmalt määrati HPLC-l puhastatud materjali monosahhariidne koostis. Selleks kasutati töötlemist H_2SO_4 -ga (Sluiter jt., 2004) ning hilisemat HPLC analüüsi. Standardina kasutati samadel tingimustel töödeldud monosahhariide. Leidsime, et *TrCel7A* inhibiitorid on oligosahhariidid, mis koosnevad ksüloosist ja glükoosist suhtes 5/1 (joonis 5B). Teisi vedelfraktsioonis sisaldunud monosahhariide (tabel 2) inhibiitorite koostises ei detekteeritud. Töö edasises osas kasutame inhibiitormolekulidele viitamisel nimetust inhibitoorsed oligosahhariidid (IOS).

IOS-ide oligosahhariidse koostise määramiseks kasutati ESI-MS-i. Massispektromeetriat kasutades ei ole paraku võimalik eristada ksüloosi sama molekulmassiga pentoosidest ja glükoosi heksoosidest. Eelnevalt HPLC abil määratud monosahhariidne koostis aga näitas, et IOS-ide põhikomponendid olid ksüloos ja glükoos (suhtes 5/1). Seetõttu võime oletada, et ESI-MS-iga IOS-ide koostises määratud heksoosid vastavad glükoosile ja pentoosid ksüloosile.



Joonis 6. IOS-ide koostise määramine ESI-MS abil. A) Algsete IOS-ide ja B) deatsetüleeritud IOS-ide ESI-MS analüüs näitas, et IOS-id on heterogeenne segu ksülo-oligosahhariididest (XOS) ja glüko-oligosahhariididest (GOS) DP-ga 7-16. Lisaks leiti, et XOS-id on erinevas ulatus atsetüleeritud (Ac). Eelnevalt määratud IOS-ide monosahhariidse koostise alusel (joonis 5) saab öelda, et ESI-MS abil oligosahhariidide koostises määratud pentoosid (Pen) vastavad ksüloosile ja heksoosid (Hex) glükoosile.

ESI-MS analüüsi tulemused kinnitasid IOS-ide heterogeenset olemust. IOS-id olid erineva pikkusega oligosahhariidid, mis olid lisaks erinevas ulatuses atsetüleeritud. Kuna

ksülotetraoosi mass on võrdne ühte atsetüülühma sisaldava glükotrioosi omaga, siis oli heksooside ja pentooside hulga ning atsetüleerituse määramiseks vaja atsetüülühmad oligosahhariidide küljest eemaldada. Atsetüülühmad eemaldati aluselise töötusega. Deatsetüleeritud IOS-ide ja algupäraste IOS-ide MS spektrite võrdlemine võimaldas kirjeldada IOS-ide koostist. IOS-id koosnesid kahte tüüpi oligosahhariididest: ksülo-oligosahhariididest (XOS-id) ja glüko-oligosahhariididest (GOS-id) DP-ga 7-16. XOS-id olid erinevas ulatuses atsetüleeritud, samas kui GOS-id atsetüülühmi ei sisaldanud (joonis 6).

Kõige tõenäolisemalt on isoleeritud IOS-id hemitsellulooset päritolu. Hüdrotermilise eeltöötuse käigus on hemitselluloos fragmenteerunud erineva pikkusega oligosahhariidideks. Pakume, et XOS-id on pärit ksülaani koostisest, mis on kõrrelistes levinud hemitselluloosi komponent (Burton ja Fincher, 2012). Sellisel juhul on ksüloosijäägid XOS-ide koostises omavahel seotud β -1,4-sideme kaudu. Arabinoos, mille hulk vedelfraktsiooni oligosahhariidide koostises oli 0,6 g/l, peaks samuti kuuluma ksülaani fragmentide koostisesse, kuid IOS-ide koostises arabinoosi ei detekteeritud (joonis 5). Arabinoos võis jääda XOS-ide koostisesse, mis ei kuulunud valitud ja omavahel liidetud geelfiltratsiooni fraktsioonide hulka. Samuti võis arabinoosi XOS-ide koostises olla nii vähe, et seda ei olnud võimalik tausta signaalist eristada.

Võrreldes XOS-idega on GOS-ide päritolu määramine keerulisem. Ühe võimalusena võiksid GOS-id olla fragmendid tselluloosist (tsello-oligosahhariidid), kuid sellele räägib vastu 7-st glükoosijäägigist koosnevatest tsello-oligosahhariididest pikemate oligomeeride lahustumatus vees (Zhang ja Lynd, 2005). Lisaks tselluloosile koosneb ka ksüloglukaanide peaaht glükoosijääkidest, kuid tänu samale sidemetüübile, mis tselluloosis, peaks ksüloosi asendusteta glükaani fragmentide lahustuvus olema võrdne tsello-oligosahhariidide omaga. Ksüloglukaanide lahustuvus küll tõuseb tänu kõrvalahelas paiknevatele ksüloosijääkidele, kuid siis oleksime pidanud GOS-ide koostises nägema ka ksüloosi. Kõige tõenäolisemalt on isoleeritud GOS-id fragmenteerunud (1,3;1,4)- β -glükaanid. Sellisel juhul moodustavad keskmiselt 3-4 kaupa β -1,4-sidemetega seotud glükoosijäägid segmente, mis on omakorda ühendatud β -1,3-sidemega. Erinevalt tsello-oligosahhariididest on (1,3;1,4)- β -glükaani fragmentide lahustuvus suurem ning sõltub β -1,4- ja β -1,3-sidemete vahetõrjast oligosahhariidis (Burton ja Fincher, 2012; Staudte jt., 1983). XOS-ide, GOS-ide ja tsello-oligosahhariidide eeldatavad struktuurid on toodud joonisel 8A.

3.2. IOS-id CBH (*TrCel7A*) ja EG (*TrCel7B*) inhibiitorina

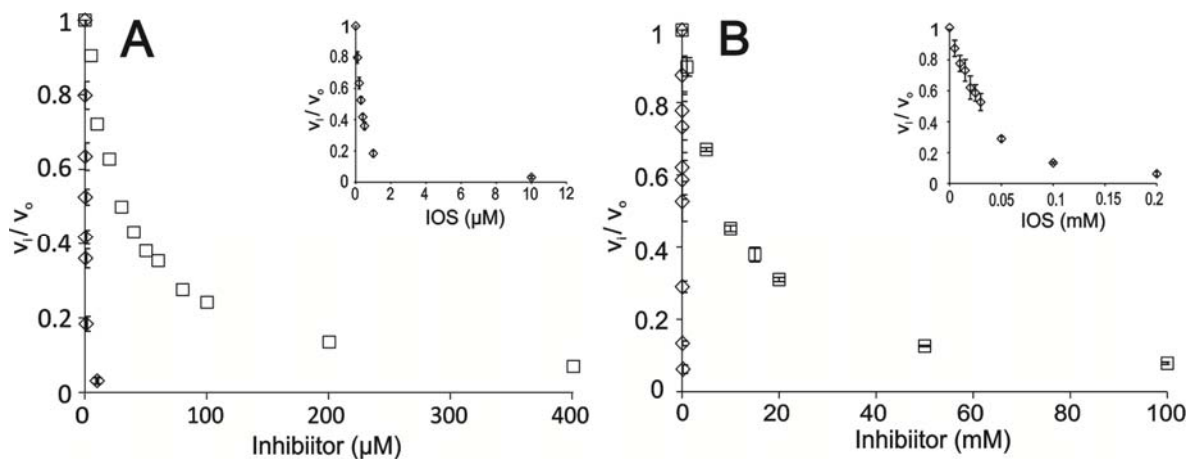
IOS-ide inhibitsiooni tsellulaasidele uuriti kasutades madalmolekulaarseid tselluloosi mudelsubstraate. IOS-ide kontsentratsiooni väljendati redutseerivate rühmade kontsentratsiooni kaudu. Inhibitsioonitüübi määramiseks kasutati pNPL substraati, mille kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0,1-5 mM. IOS-id olid kontsentratsiooniga 0,3 μM ja 1 μM . *TrCel7A* näiline K_M väärtus kasvas koos IOS-ide kontsentratsiooni kasvuga, samas kui k_{cat} jäi samaks, mis viitab konkurentsele inhibitsioonile.

Inhibitsiooni tugevust kirjeldame antud töös IC_{50} väärtusena. IC_{50} vastab inhibiitori kontsentratsioonile, mis vähendab reaktsiooni kiirust 50 %. IC_{50} väärtus määratakse kasutades ühte substraadi kontsentratsiooni ja varieerides inhibiitori kontsentratsiooni. Juhul kui tegu on konkurentse inhibitsiooniga ja kasutatud substraadi kontsentratsioon on vastavast K_M väärtusest palju madalam, siis on IC_{50} väärtus lähedane tõelisele K_i väärtusele (võrrandi liige $[S]/K_M$ muutub antud tingimustes tühiseks (võrrand 1)).

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (\text{võrrand 1})$$

Esmalt uurisime *TrCel7A* inhibitsiooni 5 μM MUL substraadil (*TrCel7A* K_M väärtus MUL substraadil on 300 μM (Voutilainen jt., 2008)). IOS-id inhibeerisid *TrCel7A*-d IC_{50} väärtusega $0,31 \pm 0,03 \mu\text{M}$, samas kui IC_{50} väärtus tsellobioosi korral oli $36 \pm 6 \mu\text{M}$ (joonis 7A). Seega olid IOS-id ligikaudu 100 korda tugevamad *TrCel7A* inhibiitorid kui tsellobioos, mis on üheks tugevamaks seni kirjeldatud *TrCel7A* inhibiitoriks.

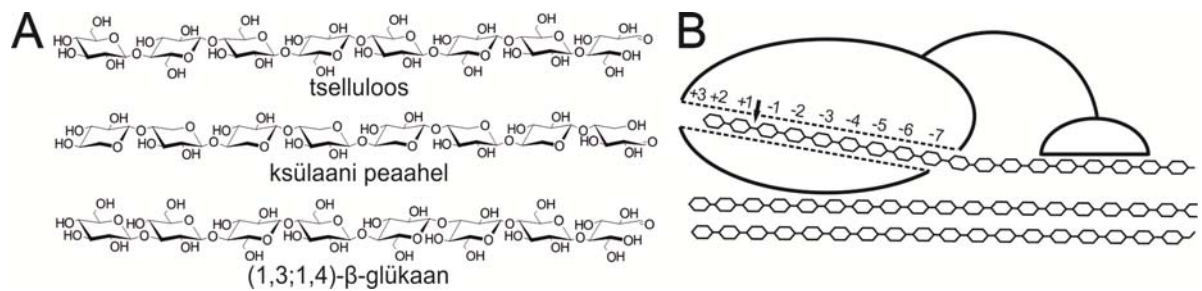
IOS-ide inhibitsioon määrati ka EG-le *TrCel7B*. Siin kasutasime 20 μM MUL kontsentratsiooni ning varieerisime IOS-ide kontsentratsiooni vahemikus 0-200 μM . IOS-id inhibeerisid *TrCel7B* aktiivsust MUL-il IC_{50} väärtusega $30 \pm 5 \mu\text{M}$. Võrreldes IC_{50} väärtusega tsellobioosi jaoks, mis on $8,9 \pm 0,4 \text{ mM}$ ilmnes, et IOS-id on ka *TrCel7B* jaoks tsellobioosiga võrreldes üle 100 korra tugevamad inhibiitorid (joonis 7B). Samuti uurisime *N188BG* inhibitsiooni mudelsubstraadil MUG, kuid *N188BG* ei olnud IOS-ide poolt (kuni 100 μM kontsentratsioon) inhibeeritud.



Joonis 7. IOS-ide ja tsellobioosi inhibitsioon *TrCel7A*-le ja *TrCel7B*-le MUL substraadil. A) CBH, *TrCel7A*, ja B) EG, *TrCel7B*. MUL hüdrolüüsi algkiirused mõõdeti inhibiitori puudumisel (v_0) ja inhibiitori juuresolekul (v_i). Inhibiitoriks oli tsellobioos (□) või IOS-id (◇). Katsed teostati 35 °C juures 50 mM pH 5 naatrium atsetaat puhvrts, mis sisaldas 0,1 g/l BSA-d. Veajooned põhinevad kolmes korduses mõõtmistel.

Baumann jt. uurisid isotermilise tiitrimise kalorimeetria abil XOS-ide seondumist *TrCel7A*-ga. Nad leidsid, et XOS-ide ahelapikkuse kasvades nende seondumisafiinsus *TrCel7A*-le suureneb. Kõige tugevamini seondusid ensüümiga kõige pikemad isoleeritud XOS-id ((ksüloos)₈/(ksüloos)₉/(ksüloos)₁₀ suhtes 1/1/1), mille pikkus ühtis enam-vähem *TrCel7A* aktiivtsentri tunneli omaga (Baumann jt., 2011). Võrreldes XOS-idega (DP 8-10) on IOS-ide K_d väärtus *TrCel7A*-ga seondumisel 10 korda väiksem (vastavalt 3,4 μM (Baumann jt., 2011) ja 0,31 μM) ja tsellobioosiga võrreles 100 korda väiksem (K_d tsellobioosile on 36 μM). Kuna *TrCel7A* aktiivtsentri tunnel sisaldab 10 glükoosijäägi seondumiskohta, siis võib IOS-ide kõrgem afiinsus olla seotud IOS-ide suurema DP-ga (joonis 8). Samuti tuleb arvestada sellega, et IOS-ide hulka kuuluvad nii XOS-id kui ka GOS-id. Viimased on oma struktuurilt tselluloosiga sarnasemad ja võivad moodustada ensüümiga soodsamaid interaktsioone. Siiani ei ole GOS-ide inhibitsiooni tsellulaasidele kirjeldatud.

Võrreldes CBH *TrCel7A*-ga, on EG *TrCel7B* tsellobioosi poolt märgatavalt vähem inhibeeritud. Seda seostatakse EG-de aktiivtsentri avatuma struktuuriga (Gruno jt., 2004). Sarnaselt tsellobioosile inhibeerivad ka IOS-id *TrCel7B*-d nõrgemini kui *TrCel7A*-d, kuid siiski 2 suurusjärku tugevamini kui tsellobioos.



Joonis 8. IOS-ide koostisesse kuuluvate GOS-ide ja XOS-ide peaaahela võimalik struktuur ja IOS-ide *TrCel7A* inhibeerimismehhanismi interpretatsioon. IOS-id on tõenäoliselt hemitselluloosi fragmenteerumise tulemusena moodustunud erineva pikkusega ksülo- (XOS) ja glüko-oligosahhariid (GOS). XOS-id on ksülaani komponendid ja GOS-id (1,3;1,4)-β-glükaani fragmenteerumise tagajärjel tekkinud oligomeerid. Kirjeldatud oligosahhariidid jäljendavad tselluloosi ahela struktuuri ja seonduvad *TrCel7A* aktiivsentri tunnelisse, hõivates kõik 10 glükoosijäägi seondumiskohta. Tulemuseks on tsellobioosist tugevam seondumine, kuna tsellobioos hõivab peamiselt ainult (+1/+2) seondumiskohad.

3.3. Inhibiitorite ensümaatiline degradatsioon

3.3.1. IOS-ide degradatsioon tsellulaaside poolt

Hemitselluloos ja sellest pärit oligosahhariidid on potentsiaalsed substraadid tsellulaasidele (Qing ja Wyman, 2011a). Seetõttu kontrollisime IOS-ide võimalikku degradatsiooni erinevate tsellulaaside poolt. Lisaks *T. reesei* peamistele tsellulaasidele, uurisime IOS-ide degradatsiooni *N188BG*, ksülaanasi *TaXyn10A* (Zhang jt., 2011a), atsetüülksülaanesteraasi *TrAXE* (Zhang jt., 2011b) ja ksüloglükanaasi *TrXG* (Benko jt., 2008) poolt. Selleks inkubeerisime IOS-e (100 μM) koos erinevate ensüümidega 35 °C juures 2 tundi. Ensüümtötluse mõju hindasime inhibitsioonitugevuse muutumise alusel. Referentsreaktsiooniks oli MUL hüdrolüüs *TrCel7A* poolt ja võrdlusena kasutasime ensüümidega töötlemata IOS-e. Tabelis 3 on esitatud IOS-ide jääkinhibitsiooni tugevus pärast antud ensüümidega töötlemist kahe tunni jooksul. Ensüümidega töödeldud IOS-ide jääkinhibitsioon on esitatud protsendina töötlemata IOS-ide inhibitsiooni suhtes. Ensüümide kontsentratsioonid IOS-ide töötlemiseks valiti selliselt, et need sarnaneksid ligikaudsete ensüümide kontsentratsioonidega lignotselluloosi hüdrolüüsil kõrge kuivaine sisalduse juures. Näiteks kui lignotselluloosi hüdrolüüsi viiakse läbi 35 %-lise kuivaine sisalduse juures ja

tsellulaase lisatakse 5 mg 1g kuivaine kohta, siis *TrCel7A* kontsentratsioon reaktsioonisegus on ligikaudu 20 μM , arvestades et *TrCel7A* moodustab *T. reesei* poolt sekreteeritavatest valkudest 60 % ja ensüümi molekulmass on ligikaudu 50 kDa. Eelnevast lähenemisest tulenevalt viisime IOS-ide degradatsiooni läbi suhteliselt kõrgetel ensüümide kontsentratsioonidel (tabel 3).

Tabel 3. IOS-ide ja LF-i *TrCel7A* jääkinhibitsioon ensüümidega töötlemise järgselt. *TrCel7A* inhibitsioon on mõõdetud MUL substraadil.

| Ensüüm | Ensüümi kontsentratsioon | Jääk inhibitsioon (%) | |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|
| | | IOS ^a | vedelfraktsioon ^b |
| - | - | 100 | 100 |
| <i>TrCel12A</i> | 3,5 μM | 3,0 \pm 0,8 | 45 \pm 10 |
| <i>TrCel7B</i> | 3,5 μM | 3,8 \pm 0,3 | 16 \pm 2 |
| <i>TaXyn10A</i> | 1,75 μM | 9,9 \pm 1,6 | 85 \pm 4 |
| <i>TrCel5A</i> | 3,5 μM | 13,1 \pm 2,1 | 43 \pm 1,4 |
| <i>TrCel7A</i> | 21 μM | 15,6 \pm 2,2 | 55 \pm 9 |
| <i>TrCel6A</i> | 7,0 μM | 24,9 \pm 3,6 | 49 \pm 8 |
| <i>N188BG</i> | 1,75 μM | 26,0 \pm 2,4 | 49 \pm 9 |
| Celluclast/N188 | 1,75 FPU/ml / 4,55 CBU/ml | p.m. ^c | 6,9 \pm 0,6 |
| Thermomix | 2,8 mg/ml (1,8 FPU/ml) | p.m. ^c | 3,1 \pm 0,3 |
| <i>TrAXE</i> | 0,1 μM | 96,8 \pm 0,1 | p.m. ^c |
| <i>TrXG</i> | 0,1 μM | 29,0 \pm 9,4 | p.m. ^c |

^a IOS-e (100 μM) töödeldi vastava ensüümiga 35 °C juures 2 tundi.

^b vedelfraktsiooni, algses kontsentratsioonis (tabel 2), töödeldi vastavate ensüümidega 35 °C juures 2 tundi.

^c pole määratud.

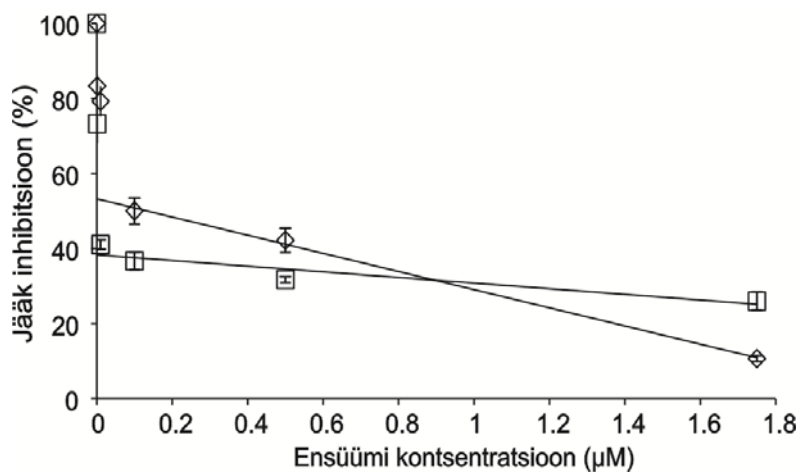
Standardhälve on arvutatud kolme katse alusel.

Kõik ensüümid, välja arvatud *TrAXE*, vähendasid märgatavalt IOS-ide inhibitsiooni mõju. IOS-ide *TrCel7A* inhibitsiooni vähendamisel olid kõige efektiivsemad *TrCel12A* ja *TrCel7B*

(tabel 3). Tõenäoliselt on *TrCel12A* ja *TrCel7B* efektiivsus IOS-ide degradatsioonil seotud nende ensüümide hemitselluloosse aktiivsusega (Varnai jt., 2011; Vlasenko jt. 2010; Karlsson jt., 2002; Biely jt.,1991). IOS-ide töötlus *TrAXE*-ga, mis eemaldab atsetüülühmi ksülaani küljest, ei mõjutanud *TrCel7A* inhibitsiooni. Seetõttu atsetüülühmad XOS-ide küljes kas ei mõjutanud IOS-ide seondumist *TrCel7A* aktiivtsentrisse või oli atsetüülühmi liialt vähe, et inhibitsiooni mõjutada.

Kuigi enamus ensüüme olid võimelised IOS-e lagundama, olid IOS-id ensüümidele suhteliselt kehvaks substraadiks. Näiteks IOS-ide (100 µM) inkubeerimisel 21 µM *TrCel7A*-ga 2 tundi, vähenes nende inhibitoorne mõju 70 % (tabel 3). See efekt saavutati aga tingimustes, kus IOS-e oli ensüümiga võrreldes ainult viie kordses ülehulgas. Madalamatel *TrCel7A* kontsentratsioonidel (nagu kasutati IC₅₀ määramisel), aga IOS-i degradatsiooni ei täheldatud ja seda isegi 2 päevase töötamise järel.

IOS-ide töötlemisel *TaXyn10A* ja *NI88BG* seguga, vähenes inhibitsioon *TrCel7A*-le ligikaudu 95 %. See on kooskõlas *TaXyn10A* ja *NI88BG* substraadi spetsiifilisustega ja IOS-e moodustavate oligosahhariidide monosahhariidse koostisega (joonis 5). Hindamaks GOS-ide ja XOS-ide osakaalu IOS-ide inhibitsioonil, töötlesime IOS-e *NI88BG* või *TaXyn10A* juuresolekul, varieerides ensüümide kontsentratsioone kolme suurusjärgu ulatuses. Piirkonnas, kus ensüümide kontsentratsioonid olid madalad, vähenes ensüümide kontsentratsioonide tõstmisel IOS-ide *TrCel7A* inhibitsioon järsult. Edasise ensüümide kontsentratsioonide kasvuga kaasnes aga IOS-ide inhibitoorse jõu lineaarne kuid vähem ulatuslik langus (joonis 9). Seetõttu pakume, et IOS-id jagunevad ensüümidele *TaXyn10A* ja *NI88BG* seguks kahest erinevast substraadist: heast ja kehvast substraadist. Hea substraat degradeeritakse kiiresti juba madalatel ensüümi kontsentratsioonidel, samas kui kehva substraadi degradatsioon on mittespetsiifiline ja aeglane ning toimub ensüümi kõrgematel kontsentratsioonidel. Aeglase degradatsiooni faasi lineaarne ekstrapoleerimine y-teljele peaks sellisel juhul võimaldama hinnata hea ja kehva substraadi osakaalu IOS-ide inhibitoorses mõjus *TrCel7A*-le. Joonisel 9 on näha, et kehva substraadi osakaal oli *TaXyn10A* ja *NI88BG* puhul vastavalt ligikaudu 60 % ja 40 %. Ensüümide spetsiifilisuste alusel oletame, et XOS-id on head substraadid *TaXyn10A*-le ja GOS-id *NI88BG*-le. Sellisel juhul jaguneb IOS-ide inhibeeriv mõju *TrCel7A*-le vastavalt 40 % ja 60 % ulatuses XOS-ide ja GOS-ide vahel. Arvestades, et glükoosi ja ksüloosi suhe IOS-ide koostises oli 5/1 (joonis 5B), siis võib arvata, et GOS-id peaksid olema enam kui 5 korda tugevamad *TrCel7A* inhibiitorid kui XOS-id.



Joonis 9. IOS-ide töötlemine *TaXyn10A* ja *NI88BG*-ga. IOS-e (100 µM) eeltöödeldi *TaXyn10A* (◇) või *NI88BG*-ga (□), varieerides ensüümide kontsentratsiooni vahemikus 1 nM - 1,75 µM, 50 mM pH 5,0 naatrium atsetaat puhvis juures (BSA-d (0,1 g/l)). Reaktsiooni viidi läbi 35 °C juures 2 tundi. Eeltötluse järel säilinud IOS-i poolset *TrCel7A* inhibitsiooni mõõdeti MUL substraadil ning väljendati protsendina töötlemata IOS-i poolt põhjustatud inhibitsiooni suhtes.

Sirged graafikul väljendavad IOS-ide degradatsioonikõverate lineaarset regressioonanalüüsi piirkonnas, kus kasutati kõrgemaid ensüümide kontsentratsioone (0,1 - 1,75 µM). Veajooned väljendavad kolme katse alusel arvutatud standardhälvet.

3.3.2. Vedelfraktsiooni töötlemine tsellulaasidega

Kuna IOS-ide töötlemine tsellulaasidega vähendas *TrCel7A* inhibitsiooni, siis hindasime ka vedelfraktsiooni inhibitoorse jõu võimalikku vähendamist tsellulaaside poolt. Referentsreaktsioonina kasutasime jällegi *TrCel7A* katalüüsitud MUL hüdrolyüüsi. Sarnaselt IOS-idele oli ka vedelfraktsiooni inhibitoorse jõu vähendamisel kõige efektiivsem *TrCel7B* (tabel 3). Teisest küljest, kui IOS-i degradatsioonil oli *TaXyn10A* üheks efektiivsemaks, siis vedelfraktsiooni töötlemisel osutus *TaXyn10A* kõige ebaefektiivsemaks. Tõenäoliselt sisaldab vedelfraktsioon lisaks IOS-idele ka teisi *TrCel7A* inhibiitoreid, mida ensüümid ei ole võimelised lagundama.

Vedelfraktsiooni töötlemiseks kasutati ka kahte tsellulaaside segu: Thermomixi ja Novozyme188-ga täiendatud Celluclasti. Thermomix sisaldab termostabiilseid ensüüme (*AtCel7A*-d (51 %), seene *Chaetomium thermophilum* *Cel6A*-d (17 %), *Cel5A*-d (13 %), endo-

ksülaanasi (14 %) ja *Ta* BG-d (5 %)). Seetõttu on võrreldes Celluclastiga saavutatud erinevate aktiivsuste parem temperatuuri- ja etanoolitaluvus (Skovgaard ja Jorgensen, 2013). Keskkonnatingimuste suhtes stabiilsemate ensüümide kasutamine võimaldaks tulevikus potentsiaalselt ühendada erinevaid bioetanooli tootmise etappe ning taaskasutada tsellulaase. Thermomixi lisatud endo-ksülaanaasne aktiivsus aga depolümeeriseerib ksülaani ja vähendab hemitselluloosi komponentide inhibeerivat mõju tsellulaasidele (Quing ja Wyman, 2011b).

Nii Novozyme188-ga täiendatud Celluclast kui ka Thermomix vähendasid *TrCel7A* inhibitsiooni vedelfraktsiooni poolt rohkem kui mistahes testitud individuaalne ensüüm (tabel 3). Kuigi vedelfraktsiooni inhibitoorne mõju vähenes märgatavalt, on allesjäänud mõneprotsendiline efekt siiski piisav inhibeerimaks *TrCel7A*. Kuigi vedelfraktsiooni töötlemine vähendas inhibitsiooni ligikaudu 100 korda, ei saa unustada, et 10000 korda lahjendatud vedelfraktsioon vähendas *TrCel7A* aktiivsust MUL-il 50 % (joonis 3B).

Kui hüdrotermilise eeltötluse järgselt vedelfraktsiooni tahkest fraktsioonist ei eraldata, siis toimub järgnev ensümaatiline suhkrustamine madalama efektiivsusega (Luterbacher jt., 2012; Yang jt., 2011; Studer jt., 2011). Käesolevas töös kirjeldatud IOS-id võivad moodustada olulise komponendi vedelfraktsioonist, mis inhibeerib tsellulaase suhkrustamise etapis. Eeltötluse järgne tahke fraktsiooni pesemine küll suurendab hüdrolyüüsi efektiivsust, kuid sellega kaasnev veekulu ei pruugi olla majanduslikult otstarbekas. Veelgi enam, vedelfraktsiooni komponendid, mis on jäänud tahke biomassi pooridesse, satuvad ka pärast pesemist hüdrolyüüsi etappi (Berson jt., 2006) Seetõttu võimaldab teadmine eeltötluse tulemusena vabanevate ja tsellulaase inhibeerivate lahustuvate komponentide olemasolust (nagu IOS) optimeerida ensüümsegusid moodustuvate inhibiitorite negatiivse mõju vähendamise suunas ning muuta bioetanooli tootmisprotsessi ökonoomsemaks.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös eraldati ja iseloomustati nisuõlgede hüdrotermilise eeltötluse käigus tekkivad tugevad tsellulaaside inhibiitorid.

Inhibiitorid lahutati nisuõlgede hüdrotermilise eeltötluse järel eraldatud vedelfraktsioonist geelfiltratsiooni kromatograafiat kasutades. Happega töödeldud inhibiitorite HPLC analüüsil selgus, et inhibiitorid on oligosahhariidid, mis koosnevad ksüloosist ja glükoosist suhtes 5/1. Lisaks monomeersele koostisele määrati ESI-MS analüüsil molekulide oligomeerne koostis. Inhibitoorsed oligosahhariidid olid segu kahest erinevat tüüpi oligomeeridest: ksülo-oligomeeridest ja glüko-oligomeeridest, polümeristasiooni astmega 7-16. Ksülo-oligosahhariidid olid lisaks erinevas ulatuses atsetüleeritud.

Keemilise koostise alusel pakume, et vedelfraktsioonist eraldatud inhibitoorsed oligosahhariidid on pärit hemitselluloosist. Ksülo-oligosahhariidid on suure tõenäosusega hüdrotermilise eeltötluse käigus vabanenud ksülaani fragmendid ja glüko-oligosahhariidid on tekkinud (1,3;1,4)- β -glükaani fragmenteerumise tulemusel.

Iseloomustatud oligosahhariidid olid tugevad inhibiitorid CBH *TrCel7A* ja EG *TrCel7B* jaoks. Võrreldes tsellobioosiga, mis on siiani üks kõige tugevam tsellulaaside inhibiitor, olid inhibitoorsed oligosahhariidid antud ensüümidele rohkem kui 100 korda tugevamad inhibiitorid.

Inhibitoorsed oligosahhariidid olid ka enamuste testitud hemitsellulaasidele ja *T. reesei* tsellulaasidele võimalikeks substraatideks, seda aga tingimustes, kus ensüümide kontsentratsioonid olid väga kõrged. Kõige efektiivsemad inhibitoorsete oligosahhariidide lagundajad olid EG-d *TrCel12A* ja *TrCel7B*. Ensüümidega töötlemine küll vähendas inhibitoorsete oligosahhariidide ja ka vedelfraktsiooni inhibitoorset mõju, kuid see jäi siiski piisavalt tugevaks, et pärssida tselluloosi ensümaatilise hüdrolüüsi võtmeensüümi *TrCel7A* aktiivsust.

Inhibitoorseid oligosahhariide ksülaanaasiga *TaXyn10A* ja β -glükosidaasiga *N188BG* degradeerides ning antud ensüümide substraadi spetsiifilisusi arvestades määrasime ksülo- ja glüko-oligosahhariidide osakaalu inhibitoorsete oligosahhariidide poolsest inhibitsioonist. Selgus, et glüko-oligosahhariid võivad olla ksülo-oligosahhariididest üle 5 korda tugevamad *TrCel7A* inhibiitorid, mis teeb neist huvitava uurimisobjekti edasiseks teadustööks.

Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw

Riin Kont

SUMMARY

Growing needs for alternative energy production have put a spotlight on lignocellulosic biomass as an abundant and renewable energy source. Pre-treatment of biomass is a prerequisite step in the efficient enzymatic conversion of lignocellulose to soluble sugars, which can be further fermented into various chemicals like ethanol. However, pre-treatment can result in the formation of compounds that are inhibitory for further enzymatic hydrolysis or fermentation.

In this study we isolated and characterized cellulase inhibitors from the liquid fraction (LF) of hydrothermal pre-treatment of wheat straw. Studied enzymes included cellulases of *Trichoderma reesei* along with β -glucosidase (BG) from *Aspergillus sp.* and xylanase (*TaXyn10A*) from *Thermoascus aurantiacus*. Observations, that treatment of LF with acid relieved the inhibition, indicated that inhibitory substances may be oligosaccharides. HPLC and mass-spectrometry analyses further suggested that the inhibitory oligosaccharides (IOS) consisted of the mixture of gluco-oligosaccharides (GOS) and xylo-oligosaccharides (XOS). XOS were also acetylated to different extent. Xylose to glucose ratio in IOS was 5/1 and the degree of polymerization ranged from 7 to 16. The IC_{50} value of IOS for cellobiohydrolase (CBH) *TrCel7A* acting on methylumbelliferyl-lactoside was $0.31 \pm 0.03 \mu\text{M}$ whereas IC_{50} value of cellobiose was $36 \pm 6 \mu\text{M}$. Thus, IOS were about 100 times stronger inhibitors than cellobiose, one of the most potent inhibitor of *TrCel7A* described so far. IOS were also strong inhibitors for endoglucanase (EG) *TrCel7B*. IC_{50} value of IOS for *TrCel7B* was found $30 \pm 5 \mu\text{M}$ whereas IC_{50} of cellobiose inhibition was $8.9 \pm 0.4 \text{ mM}$. *Aspergillus* BG was also tested for the inhibition but IOS up to $100 \mu\text{M}$ did not inhibit BG.

Strong inhibitory power is probably related to the active site architecture of *TrCel7A*. The active site tunnel of *TrCel7A* contains 10 glucose unit binding sites. By mimicking the structure of cellulose chain, IOS span through the active site tunnel of *TrCel7A*. Using the cumulative binding energy of all glucose unit binding sites, the interaction with the enzyme is

much stronger than in case of cellobiose that binds to the product binding sites (+1/+2) of the enzyme.

All studied enzymes were also able to slowly degrade IOS. Although high loadings of enzymes were used to mimic an industrial process, complete degradation of IOS was not achieved. Therefore, our results demonstrate that IOS inhibition must be considered in the attempts to improve individual cellulases by protein engineering as well as in the design of enzyme mixtures for lignocellulose degradation.

KIRJANDUSE LOETELU

Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ: **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** *Bioresour Technol* 2010, **101**:4851-4861.

Baumann MJ, Borch K, Westh P: **Xylan oligosaccharides and cellobiohydrolase I (TrCel7A) interaction and effect on activity.** *Biotechnol Biofuels* 2011, **4**:45.

Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA: **Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases.** *J Am Chem Soc* 2012, **134**:890–892.

Benkő Z, Siika-aho M, Viikari L, Reczey K: **Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates.** *Enzyme Microb Technol* 2008, **43**:109-114.

Berson RE, Young JS, Hanley TR: **Reintroduced solids increase inhibitor levels in a pretreated corn stover hydrolysate.** *Appl Biochem Biotechnol* 2006, **129-132**:612-620.

Bhikhabhai R, Johansson G, Pettersson G: **Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414.** *J Appl Biochem* 1984, **6**:336-345.

Biely P, Vrsanská M, Claeysens M: **The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose.** *Eur J Biochem* 1991, **200**:157-163.

Billa E, Koukios EG, Monties B: **Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods.** *Polym Degrad Stabil* 1998, **59**: 71–75.

Burton RA, Fincher GB: **Current challenges in cell wall biology in the cereals and grasses.** *Front Plant Sci* 2012, **3**:130.

Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB: **Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls.** *Nat Chem Biol* 2010, **6**:724-732.

Carpita NC, Gibeaut DM: **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.** *Plant J* 1993, **3**:1-30.

Ding SY, Liu YS, Zeng Y, Himmel ME, Baker JO, Bayer EA: **How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?** *Science* 2012, **338**:1055-1060.

Divne C, Ståhlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JKC, Teeri TT, Jones TA: **The threedimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** *Science* 1994, **265**:524–528.

- Ebringerová A: **Structural diversity and application potential of hemicelluloses.** *Macromol Symp* 2006, **232**: 1–12.
- Fleming K, Gray DG, Matthews S: **Cellulose crystallites.** *Chem Eur J* 2001, **7**: 1831-1835.
- Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunaes AC, Stenstrøm Y, MacKenzie A, Sørli M, Horn SJ, Eijsink VGH: **Cleavage of cellulose by a CBM33 protein.** *Prot Science* 2011, **20**:1479–1483.
- Gardner KH, Blackwell J: **The structure of native cellulose.** *Biopolymers* 1974, **13**:1975-2001.
- Goyal A, Ghosh B, Eveleigh D: **Characteristics of Fungal Cellulases.** *Bioresour Technol* 1991, **36**:31-50.
- Gruno M, Väljamäe P, Pettersson G, Johansson G: **Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **86**:503-511.
- Håkansson U, Fägerstam L, Pettersson G, Andersson L: **Purification and characterization of a low molecular weight 1,4-beta-glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* QM9414.** *Biochim Biophys Acta* 1978, **524**:385-392.
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD. **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** *Science* 2007, **315**:804-807.
- Huddleston JG, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD: **Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation.** *Green Chem* 2001, **3**:156-164.
- Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono M: **Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts.** *J Mater Sci* 2000, **35**:261-270.
- Jalak J, Kurašin M, Teugjas H, Väljamäe P: **Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited.** *J Biol Chem* 2012, **287**:28802-28815.
- Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO: **Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification.** *Biotechnol Biofuels* 2013, **6**:16.
- Joshi B, Bhatt MR, Sharma D, Joshi J, Malla R, Sreerama L: **Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments.** *Biotechnol Mol Biol Rev* 2011, **6**: 172-182.
- Kabel MA, Borne van den H, Vincken JP, Voragen AGJ, Schols HA: **Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose.** *Carbohydr Polym* 2007, **69**: 94–105.

Karlsson J, Siika-aho M, Tenkanen M, Tjerneld F: **Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*.** *J Biotechnol* 2002, **99**:63-78.

Kipper K, Väljamäe P, Johansson, G: **Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as "burst" kinetics on fluorescent polymeric model substrates.** *Biochem J* 2005, **385**:527-535.

Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A: **Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2005, **44**:3358-3393.

Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P: **Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production.** *Ind Eng Chem Res* 2009, **48**:3713–3729.

Lazaridou A, Biliaderis CG, Micha-Screttas M, Steele BR: **A comparative study on structure–function relations of mixed-linkage (1 → 3), (1 → 4) linear β-D-glucans.** *Food Hydrocolloids* 2004, **18**:837–855.

Luterbacher JS, Chew Q, Li Y, Tester JW, Walker LP: **Producing concentrated solutions of monosaccharides using biphasic CO₂–H₂O mixtures.** *Energy Environ Sci* 2012, **5**:6990-7000.

Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE, Davison B, Hamilton R, Himmel M, Keller M, McMillan JD, Sheehan J, Wyman CE. **How biotech can transform biofuels.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:169-172.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:506-577.

McMillan JD, Jennings EW, Mohagheghi A, Zuccarello M: **Comparative performance of precommercial celluloses hydrolyzing pretreated corn stover.** *Biotechnol Biofuels* 2011, **4**:29.

Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F: **Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **59**:621-634.

Merino ST, Cherry J: **Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007, **108**:95-120.

Murphy L, Bohlin C, Baumann MJ, Olsen SN, Sorensen TH, Anderson L, Borch K, Westh P: **Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases.** *Enzyme Microb Technol* 2013, **52**:163-169.

Nakagame S, Chandra RP, Saddler JN: **The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis.** *Biotechnol Bioeng* 2010, **105**:871-879.

- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition.** *Bioresour Technol* 2000, **74**:25–33
- Petersen ØM, Larsen J, Thomsen MH: **Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals.** *Biomass Bioenergy* 2009, **33**:834-840.
- Pu Y, Hu F, Huang F, Davison BH, Ragauskas AJ: **Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments.** *Biotechnol Biofuels* 2013, **6**:15.
- Qing Q, Wyman CE: **Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase.** *Bioresour Technol* 2011a, **102**:1359-1366.
- Qing Q, Wyman CE: **Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylooligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover.** *Biotechnol Biofuels* 2011b, **4**:18.
- Qing Q, Yang B, Wyman CE: **Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes.** *Bioresour Technol* 2010, **101**:9624-9630.
- Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, Krogh K, Jorgensen CI, Tovborg M, Anthonen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH: **Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:15079–15084.
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T: **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science* 2006, **311**:484-489.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH, Boerjan W: **Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids.** *Phytochem Rev* 2004, **3**:29–60.
- Saloheimo M, Lehtovaara P, Penttilä M, Teeri TT, Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G, Claeyssens M, Tomme P, Knowles JKC: **EG III a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme.** *Gene* 1988, **63**:11-21.
- Selig MJ, Adney WS, Himmel ME, Decker SR: **The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes.** *Cellulose* 2009, **16**:711-722.
- Selig MJ, Knoshaug EP, Adney WS, Himmel ME, Decker SR: **Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities.** *Bioresour Technol* 2008, **99**:4997-5005.

Sipos B, Benkő Z, Reczey K, Viikari L, Siika-aho M: **Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources.** *Appl Biochem Biotechnol* 2010, **161**:347-364.

Skovgaard PA, Jorgensen H: **Influence of high temperature and ethanol on thermostable lignocellulolytic enzymes.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013, **40**: 447-456

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D: **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** Laboratory analytical procedures. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2004.

Staudte RG, Woodward JR, Fincher GB, Stone BA: **Water-soluble (1→3), (1→4)-β-d-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. III. Distribution of cellotriosyl and cellotetraosyl residues.** *Carbohydr Polym* 1983, **3**:299-312.

Studer MH, Brethauer S, DeMartini JD, McKenzie HL, Wyman CE: **Co-hydrolysis of hydrothermal and dilute acid pretreated *Populus* slurries to support development of a high-throughput pretreatment system.** *Biotechnol Biofuels* 2011, **4**:19.

Teeri TT: **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of Cellobiohydrolases.** *Trends Biotechnol* 1997, **15**:160-167.

Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB: **Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis.** *Bioresour Technol* 2008, **99**:4221-4228.

Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu ZL, Zhai H, Sørli M, Eijsink VGH: **An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides.** *Science* 2010, **330**:219–222.

Vancov T, Alston AS, Brownb T, McIntosh S: **Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels.** *Renew Energ* 2012, **45**:1-6

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W: **Lignin Biosynthesis and Structure.** *Plant Physiol* 2010, **153**:895–905.

Varnai A, Huikko L, Pere J, Siika-aho M, Viikari L: **Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood.** *Bioresour Technol* 2011, **102**:9096-9104.

Vegas R, Kabel M, Schols HA, Alonso JL, Parajo JC: **Hydrothermal processing of rice husks: effects of severity on product distribution.** *J Chem Technol Biotechnol* 2008, **83**:965-972.

Velleste R, Teugjas H, Väljamäe P: **Reducing end-specific fluorescence labelled celluloses for cellulase mode of action.** *Cellulose* 2010, **17**:125-138.

- Vlasenko E, Schülein M, Cherry J, Xu F: **Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases.** *Bioresour Technol* 2010, **101**:2405-2411.
- Voutilainen SP, Puranen T, Siika-Aho M, Lappalainen A, Alapuranen M, Kallio J, Hooman S, Viikri L, Vehmaanpera J, Koivula A: **Cloning, expression, and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **101**:515-528.
- Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** *Bioresour Technol* 2005, **96**:1959-1966.
- Yang B, Dai Z, Ding S-Y, Wyman CE: **Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass.** *Biofuels* 2011, **2**:421-450.
- Yang B, Wyman CE: **Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol.** *Biofuels Bioprod Bioref* 2008, **2**:26-40.
- Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L: **Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **56**:17-34.
- Zhang J, Siika-aho M, Tenkanen M, Viikari L: **The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed.** *Biotechnol Biofuels* 2011b, **4**:60.
- Zhang J, Tang M, Viikari L: **Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases.** *Bioresour Technol* 2012, **121**:8-12.
- Zhang J, Tuomainen P, Siika-aho M, Viikari L: **Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis.** *Bioresour Technol* 2011a, **102**:9090-9095.
- Zhang J, Viikari L: **Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*.** *Bioresour Technol* 2012, **117**:286-291.
- Zhang YH, Lynd LR: **Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis.** *Biomacromolecules* 2005, **6**:1510-1515.
- Zhang, YH, Lynd, LR: **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **88**:797-824.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ RIIN KONT _____,

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 18.05.1987 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Nisuõlgede hüdrotermilise eeltötluse käigus moodustuvad tugevad tsellulaasi inhibiitorid _____,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ PRIIT VÄLJAMÄE _____,

(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ 27.05.2013 _____ (*kuupäev*)