

Ilmari Laaksonen

# BAKTEERIT LIGNIININ HYÖDYNTÄMISESSÄ

Ympäristö- ja energiatekniikka  
Kandidaatintyö  
Toukokuu 2019

## TIIVISTELMÄ

Ilmari Laaksonen : Bakterit ligniinin hyödyntämisessä  
Kandidaatintyö  
Tampereen Yliopisto  
Ympäristö- ja Energiatekniikan kandidaatin tutkinto-ohjelma  
Pääaine: Ympäristöbiotekniikka  
Tarkastaja: Ville Santala  
Toukokuu 2019

---

Lignoselluloosa on hyvin käytetty raaka-aine monissa biojalostamoissa ja muissa teollisissa sovelluksissa, mutta ligniini on usein määritelty turhaksi ja prosesseja haittaavaksi osaksi lignoselluloosaa. Tämän takia useimmat puumassaa käsitelleet laitokset ovat pyrkineet erottamaan selluloosasta ligniini ja polttamaan sen energiaksi. Viimeisten vuosikymmenien aikana ligniinille ollaan pyritty löytämään hyödyllisempää käyttöä. Eräiden bakteerien huomattiin pystyvän sekä depolymerisoimaan että katabolisoimaan useille muille mikro-organismeille toksisia lignomeerejä. Bakteerien perimän muokkaaminen ja ymmärtäminen ovat nopeuttaneet niiden käytön yleistymistä uusissa bioprosesseissa. Merkittävimpiä tuotteita mitä bakteereilla voidaan ligniinistä tuottaa ovat  $\beta$ -ketoadiapaattisen reaktiopolon välituotteita tai lopullisia tuotteita, kuten vanilliini ja mukonaattihappo. Tässä työssä käydään läpi ligniinin rakenne, ligniinin hajottaminen bakteerien toimesta, bioprosessointi-mahdollisuudet näille reaktioille ja esimerkkejä ligniinistä saatavista tuotteista bakteerien avulla. Työn johtopäätöksenä on, että bakteereilla pystytään sekä teoriassa että käytännössä tuottamaan ligniinistä hyvin montaa eri arvokasta tuotetta ja että bakteereilla tulee täten olemaan hyvin merkittävä rooli tulevaisuuden bioteollisuudessa.

Avainsanat: Bakteri, ligniini, monolignooli, aromaattinen rengas,  $\beta$ -ketoadiapaatti, biopolttoaine, biopolymeerit.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

## ABSTRACT

Ilmari Laaksonen: Bacterial valorization of lignin  
Bachelors thesis  
Tampere University  
Environmental and Energy Engineering  
Major: Environmental Bioengineering  
Revisor: Ville Santala  
May 2019

---

Lignocellulose is a commonly used as a resource in many biorefineries and other industrial processes, but in these applications the lignin partition it is often deemed to be the useless part of the lignocellulose that usually only inhibits the traditional processes. Therefore, most often the lignin is separated from the actual lignocellulose mass and burned for the sake of efficiency. However, in the last few decades much research has been done to make better use of this waste material. Specific bacteria were discovered to be able to depolymerize and catabolize lignin at the same time, although lignin is usually considered toxic or inhibiting factor for most other bacteria. The use of microorganisms in lignin degradation processes has spread quickly due to pre-existing knowledge of how to alter their genome. Many valued products that bacteria produce from lignin mostly come from the  $\beta$ -ketoacid pathways intermediate or end products such as vanillin and muconic acid. This thesis describes the basic structure of lignin, lignin degradation by bacteria, potential bioprocesses and bioreactor models for these reactions and examples of what different products various bacteria can produce from lignin. The conclusion of this paper is that bacteria have a great variety of valuable products that can be produced both theoretically and practically and due to this, bacteria will have a great impact and role in future industrial use.

Keywords: Bacteria, lignin, monolignol, aromatic hydrocarbon,  $\beta$ -ketoacid, biofuel, biopolymers

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin OriginalityCheck service.

## SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO .....	1
2.	LIGNIININ RAKENNE .....	2
2.1	Makrorakenne.....	2
2.2	Monolignoolien rakenne.....	3
3.	LIGNIININ HAJOTTAMINEN .....	6
3.1	Depolymerisaatio .....	6
3.2	Aromaattisen renkaan hajottaminen .....	7
3.2.1	Aerobiset strategiat .....	9
3.2.2	Anaerobiset strategiat .....	11
4.	LIGNIININ TEOLLINEN KÄSITTELY.....	14
4.1	Biojalostamoiden ligniinin käsittely.....	14
4.2	Bioreaktorit ligniinin käsittelyssä .....	16
5.	BAKTEERIEN VALMISTAMAT TUOTTEET .....	18
5.1	Biopolttoaineet.....	20
5.2	Biopolymeerit ja niiden monomeerit .....	21
6.	YHTEENVETO.....	24
	LÄHTEET .....	25

## KUVA- JA TAULUKKOLUETTELO

<b>Kuva 1.</b>	<i>Kasvisolun soluseinän rakenne makro- ja mikromittakaavassa. Muokattu lähteestä [9].....</i>	<i>3</i>
<b>Kuva 2.</b>	<i>Ligniini- ja polysakkaridipolymeereissa useimmiten esiintyvät monolignoolit p-komaryyli (H), sinapyyli (S) ja koniferyyli alkoholi (G), muokattu lähteestä [2]. .....</i>	<i>4</i>
<b>Kuva 3.</b>	<i>Yleisimmät monolignoolien väliset sidokset (merkitty punaisella). "R" ryhmä voi olla joko monolignooli tai metoksi-ryhmä. ....</i>	<i>5</i>
<b>Kuva 4.</b>	<i>Mikrobien aromaattisten yhdisteiden lähteet ja niiden käsittelyyn käytettävät askeleet. Reaktioväylät on kirjoitettu punaiselle taustalle. [13].....</i>	<i>8</i>
<b>Kuva 5.</b>	<i>B-ketoadiapaattisessa reaktiopolun mahdolliset reaktioväylät ja niiden merkittävät tuotteet sekä reittiin tarvittavat reagenssit. [13].....</i>	<i>11</i>
<b>Kuva 6.</b>	<i>Biojalostamoiden etanolin tuotannon yksinkertaistettu prosessikaavio, jossa on esitetty kaksi mahdollista ligniinin erottelureittiä A ja B.....</i>	<i>15</i>
<b>Kuva 7.</b>	<i>Rasvahappoja varastoivan mikrobin ligniinin käsittelyn metabolinen reitti. Sinisellä alueella merkityt molekyylit, joista punaiset ovat arvokkaimpia, voidaan muokata geenimuokkauksella keräytymään mikrobissa. Muokattu lähteestä [31].....</i>	<i>20</i>
<b>Kuva 8.</b>	<i>Mukonaattihaposta mahdollisesti tuotettavat aineet. Lähes kaikki listatut tuotteet voidaan valmistaa helposti cis,cis-muodosta. Muokattu lähteestä [27].....</i>	<i>22</i>
<b>Kuva 9.</b>	<i>Mahdollisia PDC:stä valmistettavia polymeerisiä tuotteita, joilla on suuri markkina-arvo ja kysyntä. [36].....</i>	<i>23</i>
<b>Taulukko 1.</b>	<i>Esimerkkejä tuotteista, joita bakteerit pystyvät tuottamaan erilaisista ligniini-lähteistä. Kaikki ilmoitetut raaka-aineet ovat liukoisessa muodossa. ....</i>	<i>19</i>

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

$\beta$ -hiili	Toinen hiiliatomi orgaanisen molekyylin funktionalisestaryhmään sitoutuneesta hiiliketjusta.
CoA	Koentsyymi tai kofaktori A on orgaaninen molekyyli, joka voi aktivoida entsyymejä tai toimia funktionaalisten ryhmien kuljettajina.
Orto-	Aromaattinen muoto, jossa kaksi substituenttia eli funktionaalista ryhmää ovat sitoutuneena vierekkäisiin hiiliin (1 ja 2). Orto-halkaisussa molekyyli halkaistaan näiden hiilien välistä.
Meta-	Aromaattinen muoto, jossa kahden substituentin välissä on yksi tyhjä hiiliatomi (1 ja 3 tai 1 ja 5). Meta-halkaisussa aromaattinen molekyyli halkaistaan vain toisen substituentin vierestä.
ATP	Adenosiinitrifosfaatti toimii solujen energian kuljettana, mitä myös käytetään laskuissa energiayksikkönä. Energiaa muodostuu fosfaatti ryhmän irrotessa hydrolyyttisesti tuottaen noin 30.6 kJ/mol. Päinvastainen reaktio varastoi vastaavasti energiaa.
ADP	Adenosiinidifosfaatti on ATP:n kertaalleen hydrolysoitu muoto.
TAG	Kolmen arvoinen rasvahappomolekyyli (Triglyseryli), jota mikrobit tuottavat energiavarastoksi.
APL	Alkaalisesti esikäsitelty liuos, jota käytetään yleisesti lignoselluloosan käsittelyssä selluloosan erottamiseksi.

# 1. JOHDANTO

Ligniini ja selluloosa ovat maailman yleisimmät biopolymeerit, jotka molemmat ovat hyvin tärkeitä ja olennaisia rakennusaineita kasveissa ja puissa. Paperiteollisuudessa näistä polymeereistä käytetään ainoastaan selluloosaa ja ligniini pyritään poistamaan kokonaan selluloosasta, minkä takia paperin valmistuksen sivutuotteena syntyy hyvin paljon turhaa ligniiniä. Perinteisesti ligniini on käytetty heti tehtaan laitoksen sisällä energiantuotannossa sen korkean lämpöarvon ansiosta ja kyseistä biopolymeeriä ei ole sen enempää yritetty tutkia. Energian hyötykäytön parantuessa näillä tehtailla ei ole enää niin paljon tarvetta polttaa ligniiniä energiaksi, minkä ansiosta ligniinille on avautunut markkina-arvoa raaka-aineena muille tuotteille.

Nykyään ligniini on erittäin kiinnostava raaka-aine biopolttoaineiden ja arvokkaiden molekyylien, kuten vanilliinin, tuotannossa, jossa hyödynnetään bakteerien ominaisia metaboliareittejä. Bakteerien hyödyntäminen ligniinin käsittelyssä sai suurta suosiota tutkimusyhteisössä, kun Yoshihiro Katayama ryhmineen [1] löysi *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 bakteerin erään kraft-laitoksen jätevedestä vuonna 1986. Heidän suorittamassa jatkotutkimuksessa SYK-6:n huomattiin pystyvän metabolisoimaan ligniinijohdannaisia tuotteita, joita jätevedessä oli esiintynyt. Tämän bakteerin kataboliareaktioita tutkimalla saatiin selvitettyä ligniinin pilkkomiseen käytettyjen entsyymien ja katabolisten reittien geneettiset markerit. Näitä tietoja hyödyntämällä tutkimukset bakteerien hyödyntämiseen ligniinin käsittelyssä nopeutuivat huomattavasti, johtaen aiheen nopeaan kehitykseen ja lukuisiin uusiin tutkimuksiin aiheesta.

Tässä työssä käydään läpi ligniinin perusrakenne, bakteerien rooli sen hajottamisessa ja katabolisoinnissa, biolaitosten käytännöllisyys kyseisten reaktioiden tehostamisesta ja lyhyt katsaus tuotteista, joita ligniinistä voitaisiin tuottaa bakteerien avulla.

## 2. LIGNIININ RAKENNE

Kasvien ja puiden kasvisolut tuottavat ligniiniä saostamaan niiden soluseiniä, minkä ansiosta ne saavat ominaisen kovan ja vastustuskykyisen soluseinän rakenteensa. Kovan soluseinän lisäksi ligniini suojaa solua mikrobisilta hyökkäyksiltä hidastaen ja vaikeuttaen solun tuhoutumista. Solut jatkavat ligniinin tuottamista niiden kypsyttyäkin, jolloin sitä voidaan käyttää korjaavana tekijänä vahingoittuneissa soluseinän osissa. [2, 3]

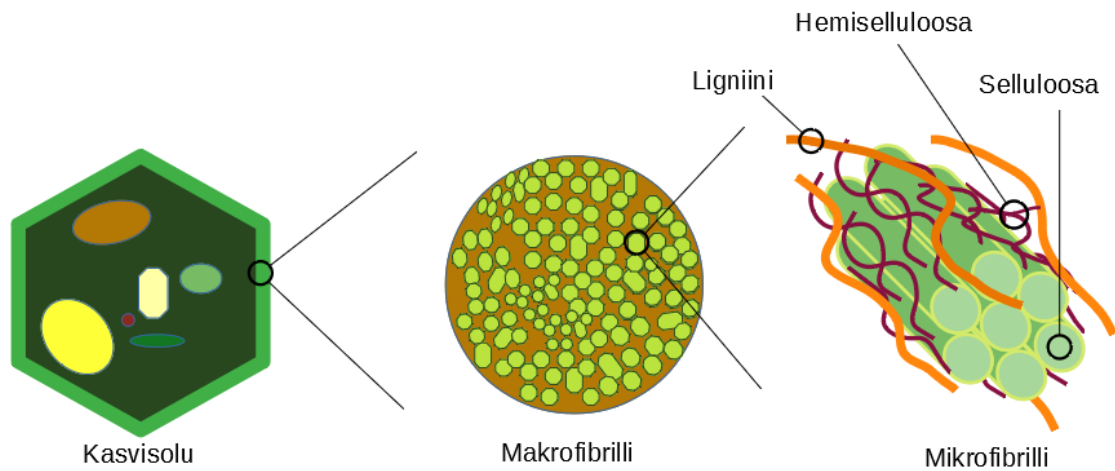
Ligniini on selluloosan ja hemiselluloosan lisäksi yksi suurimmista rakennepolymeereistä kasvisoluissa, joihin ligniini on sitoutunut. Ligniinin ja selluloosan välillä ei ole kemiallisia sidoksia, vaan ne ovat yhteydessä toisiinsa vain heikoilla vetysidoksilla. Vetysidokset ovat heikkoja sidoksia, jotka muodostuvat elektroniepätasapainoisten happi-, typpi- tai fluorivety-yhdisteiden välille. Elektronialijäämän aiheuttama posi-tiivisesti varautunut vety hakeutuu vastaavasti sitoutuneen hapen, typen tai fluorin elektroniylijäämästä aiheutuvan negatiivisen varauksen luokse. Näiden heikkojen elektrostaattisten voimien ansiosta ligniini ja selluloosa muodostavat ominaisen yhteisen muodon, mutta pystyvät silti liikkumaan toisistaan riippumatta systeemissä. Hemiselluloosa ja ligniini taas muodostavat kemiallisia sidoksia suurimmaksi osaksi niiden sivuketjujen välille. Kemialliset sidokset ovat vahvoja sidoksia, joissa kaksi atomia muodostavat elektroniensa välisen yhteyden. Näiden sidoksien takia lignoselluloosan ligniini useimmiten sisältää vähintäänkin pienen määrän jäänteenä hemiselluloosaa eli karbohydraatteja, vaikka ligniini eriteltäisiin tästä massasta. [4]

### 2.1 Makrorakenne

Ligniini esiintyy kasvisoluissa luonnossa 3D-verkostoituneena hyvin kompleksoituneena biopolymeerinä, joka sisältää useita erilaisia sidoksia muodostaen Kuvassa 1 esitetyn monimutkaisen ominaisrakenteen. Soluseinien rakenteet ovat hyvin riippuvaisia kasvi- ja puulajista, minkä takia yleensä ligniinistä puhuttaessa lajit yleistetään pehmeisiin eli havupuihin (Softwood), koviin eli lehtipuihin (Hardwood) ja ruohoihin. Koska näiden kolmen tyyppin sisällä on myös paljon vaihtelua, on hyvä tietää selluloosan, hemiselluloosan ja ligniinin massaosuus. Kasvillisen biomassan keskiarvoinen massajakauma on 40-50% selluloosaa, 25-30% hemiselluloosaa ja 15-20% ligniiniä [5]. Lajien ligniinirakenne ilmoitetaan samaan tapaan niiden monolignoolien



suhteilla. Esimerkiksi havupuilla, joiden ligniini rakentuu lähes ainoastaan koniferyylialkoholista, tämä suhde on 95% koniferyyli- ja 5% p-komaryylialkoholia [6, 7]. Vastaavasti kovilla puulajeilla nämä arvot ovat paljon tasalaatuisempia; 0-8% p-komaryyli-, 25-50% koniferyyli- ja 45-75% sinapylylialkoholia [7, 8].



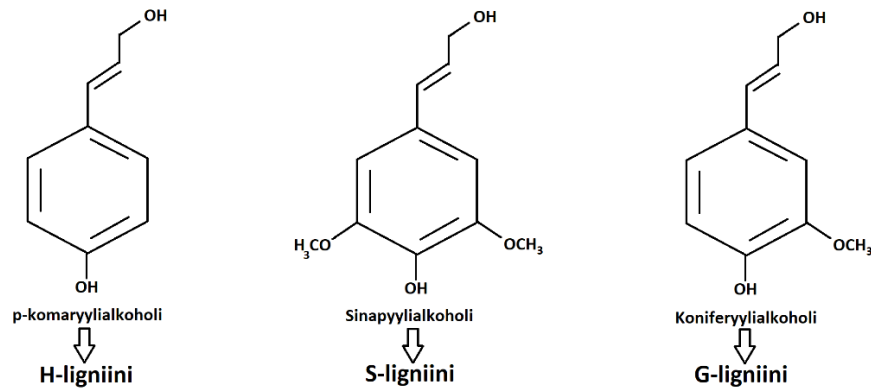
**Kuva 1.** Kasvisolun soluseinän rakenne makro- ja mikromittakaavassa. Muokattu lähteestä [9]

Monolignolien suhteelliset määrät vaikuttavat paljon kyseisen lajin solurakenteiden vahvuuteen, minkä takia ne tulisi huomioida käsittelyprosesseja suunniteltaessa. Ligniinin suhteellisen rakenteen lajien välinen heterogeenisyys on vaikuttanut huomattavasti sen aikaisempaan alhaiseen hyödyntämistasoon. Koska ligniinin käsittelyyn ei voitu rakentaa yleispätevää prosessia, joka olisi pystynyt käsittelemään erilaisia ligniini rakenteita, todettiin sen hyödyntämisen energiaksi olevan taloudellisempaa yleispätevällä polttotekniikalla.

## 2.2 Monolignoolien rakenne

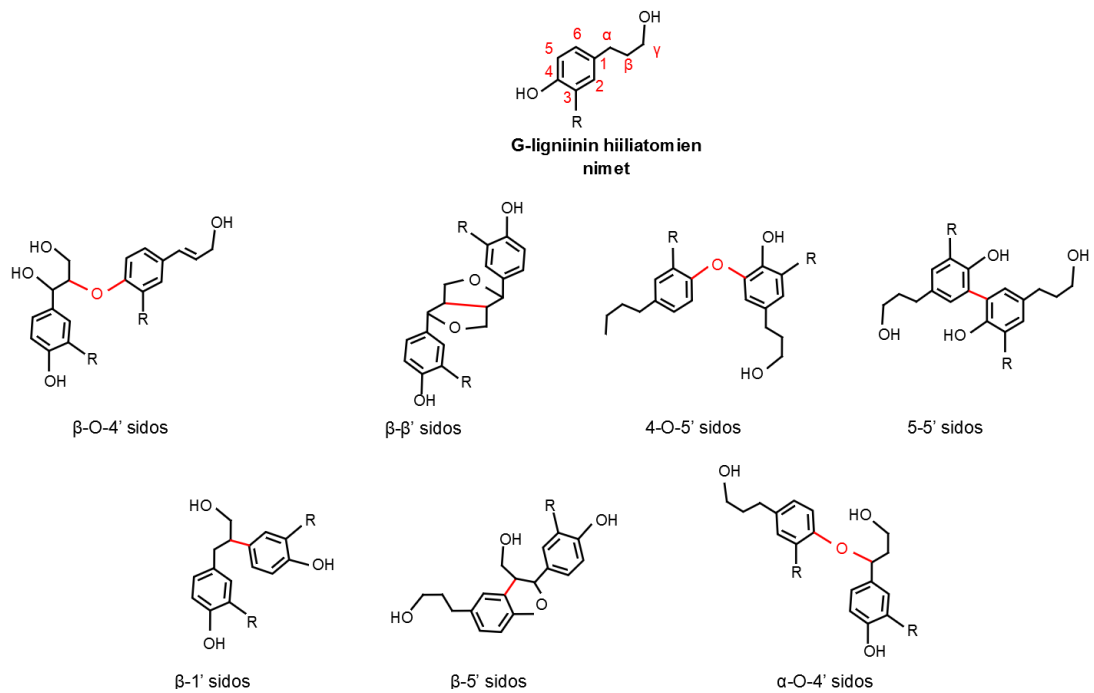
Ligniinin polymeerirakenne pohjautuu kolmeen monolignooliin eli ligniinin rakennemonomeereihin, jotka on esitetty Kuvassa 2. Kasvit syntetisoivat monolignoolia fenyylialaniinista hyödyntäen fenyylipropanoidireaktiopolun ensimmäisiä reaktioita, minkä jälkeen sen syntetisointi siirtyy kokonaan omalle polulle. Tietyn monolignoolityypin valmistumiseen liittyvien entsyymien tuottaminen riippuu kasvin geneeistä. Entsyymit toimivat tarkoissa ympäristöolosuhteissa, minkä takia esimerkiksi mesofiilinen eli 20 - 45°C ympäristössä elävä bakteeri käyttää erilaisia entsyymejä kuin termofiilinen eli yli 45°C ympäristössä elävä bakteeri. Kasvien käyttämät entsyymit siis riippuvat paljon

ympäristötekijöistä, kuten lämpötilasta, keskimääräisestä kasviin vaikuttavasta ulkoisesta voimasta (tuulesta tai aalloista) ja maan laadusta.



**Kuva 2.** Ligniini-polymeereissa useimmiten esiintyvät monolignoolit p-komaryyli (H), sinapyyli (S) ja koniferyylialkoholi (G), muokattu lähteestä [2].

Monolignoolien polymeeraatioketju alkaa fenoliryhmien oksidatiivisesta radikaalisoitumisesta, jossa monomeeri hapettuu menettäen yhden konjugaattinsa vedyistä. Muodostuneen monolignooliradikaalin delokalisoituneen elektronin ansiosta radikaali on hyvin stabiili ja pystyy yhdistymään muihin muodostuneisiin radikaaleihin. Monolignoolien on havaittu yhdistyvän kaikkein eniten  $\beta$ -hiilen sidosten avulla muihin radikaaleihin, minkä takia vallitsevat dimeerit ovat  $\beta$ -sidossjohdannaisia erityisesti pehmeissä puulajeissa. Yleisin mahdollinen dimeeri on  $\beta$ -O-4, jota useimmissa lajeissa on jopa puolet niiden ligniinin sisältämistä dimeereistä. Muiden dimeerien, joita on kuvassa 3 esitetty, suhteellinen osuus lajin ligniinissä ovat täysin riippuvaisia ympäristössä olevista kemikaaleista ja fyysisistä olosuhteista. Näitä muuttujia seuraamalla kasvit määrittävät niille ominaiset ominaisuudet, kuten kuinka taipuisa tai kestävä tulee niiden varren oltava niiden selviytyäkseen. [2]



**Kuva 3.** Yleisimmät monolignoolien väliset sidokset (merkitty punaisella). "R" ryhmä voi olla joko monolignooli tai metoksiryhmä.

Dimeerien orientoituminen on hyvin vapaata, sillä aromaattisten renkaiden lisäksi dimeereissä ei useimmiten ole kaksoisidoksia, jotka estäisivät monomeerien kiertymistä tehdäkseen uusia sidoksia toisten monomeerien tai dimeerien kanssa. Tämän takia valmis ligniinipolymeeri voi olla muodoltaan hyvin satunnainen. Polymerisoituminen tapahtuu dimeerin hapettumisella ja radikalisoitumisella kuitenkin vain yksi yksikkö kerrallaan, mikä aiheuttaa ligniinin hitaan polymeroitumisnopeuden.

Eri monolignolityypit (S, G, H) muodostavat erilaisia ligniinejä ja voivat osallistua polymeroitumiseen satunnaisesti keskenään tai hyvin tarkkaan eroteltuna. Näiden monolignolityyppien oligomeerien yhdistymisessä eli polymeroitumisketjun terminaatioissa voi ilmetä erilaisuuksia, jotka vaikuttavat paljon niiden polymeroitumisnopeuteen ja syntyneisiin polymeereihin. Esimerkiksi S-G oligomeerit eivät juurikaan terminoidu toisten S-G oligomeerien kanssa, mutta toisaalta G-oligomeerit yhdistyvät hyvin usein keskenään.

## 3. LIGNIININ HAJOTTAMINEN

Luonnon tiedetään kierrättävän ja hyödyntävän kaikkea elävää ainesta hyvin tehokkaasti joten loogisesti on järkevää hyödyntää luonnon omia keinoja ihmisten ongelmiin. Kaatunutta puuta lahottaa sekä sienet että bakteerit, minkä takia näitä molempia on tutkittu mahdollisina ratkaisuina ligniinin hajottamiseen ja hyödyntämiseen. Toisaalta sienten geenien hallinta ja proteiinisynteesi sekä niiden käyttö on vielä hyvin vaikeaa. Tämän takia useimmat tutkimukset kohdistuvat bakteereihin ja niiden hyödyntämiseen ligniinin hajottamisessa ja jalostamisessa.

Tällä hetkellä ligniinin hyödyntämisprosessit ovat teknisessä pullonkaulassa, jossa suurin ongelma on eri ligniinityyppien hyvin heterogeeninen rakenne [3]. Ligniinin heterogeenisyyden takia on hyvin vaikea kehittää tekniikkaa, jolla pystyttäisiin käsittelemään universaalista lignoselluloosaa yhdenlaisella mikrobiflooralla tai kemiallisella käsittelyllä. Suurin osa nykyisistä tutkituista ja käytetyistä menetelmistä vaativat esikäsittelyprosesseja biomassasta erotetun ligniinin hyödyntämiseen, minkä toteuttaminen vahingoittamatta muun biomassan hyödyllisiä hiilihydraatteja on haasteellista.

Ligniinin hyödyntämisprosessit voidaan jakaa prosesseihin, joissa mikrobien substraattina käytetään joko lähes täyspituisia ligniinipolymeerejä (suuri moolimassaista) tai pilkottuja ligniinin mono- ja oligomeerejä. Moolimassaltaan suuren ligniinin käyttö on paljon harvinaisempaa bakteerien luonnollisissa prosesseissa. Bakteerit toimivat useimmiten sienten kanssa puun lahottamisessa, missä ne voivat elää molempia hyödyttävässä eli mutualistisessa, vain toista hyödyttävässä eli kommensialistisessa tai joskus molempia haittaavassa eli antagonistisessa suhteessa. [10] Kommensialistisessa tai mutualistisessa suhteessa sienet depolymerisoivat suuria ligniiniketjuja, joita sienet ja bakteerit voivat hyödyntää hiilen lähteenään.

### 3.1 Depolymerisaatio

Ensimmäinen askel raakaligniinin eli lignoselluloosan konversiossa on ligniinipolymeerin depolymerisointi, joka tarkoittaa pitkän, haaroittuneen ja raskasmoolimassaisen ligniinin pienentämistä käytettävään kokoon. Lignolyttiset mikrobit hyödyntävät ligniinin depolymeroinnissa useimmiten vahvoja hapettavia solunulkoisia

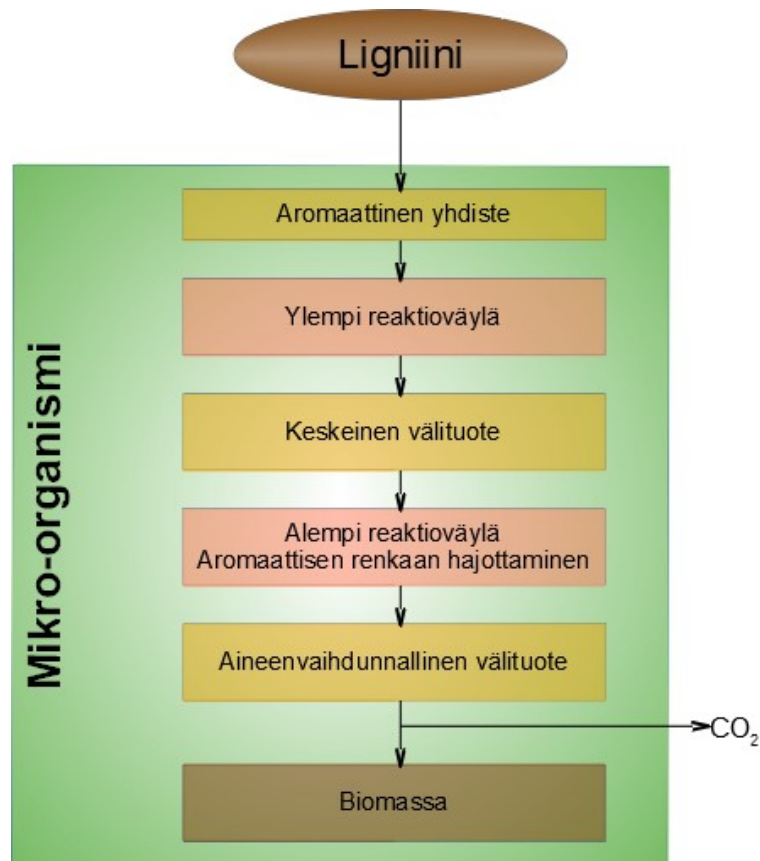
entsyymejä, kuten peroksidaaseja, manganaasioksidaaseja tai lakkaaseja. [8] Depolymeraatioreaktion tuottamat pienemmät välituotteet voidaan tämän jälkeen siirtää solun sisälle tai niiden käsittelyä voidaan jatkaa välittömässä läheisyydessä solun ulkopuolella.

Bakteerikannat, jotka pystyvät depolymerisoimaan ligniiniä, voidaan luokitella kolmeen pääluokkaan; actinomysetaaleihin,  $\alpha$ -proteobakteereihin, ja  $\gamma$ -proteobakteereihin. Bakteereilla on useita menetelmiä, joilla ne pystyvät hajottamaan suurempiakin paloja ligniinejä, mutta useimmat näistä menetelmistä ovat tehokkuudeltaan heikompia kuin sienten vastaavat menetelmät. Entsyymit ja vahvat hapettimet, kuten peroksidaasit, ovat bakteerien pääasialliset keinot ligniinin pilkkomiseen, mutta bakteerit kuten *Pseudomonas putida* mt-2 ja *Rhodococcus jostii* RHA1 pystyvät molemmat pilkkomaan ligniiniä ilman solunsisäisiä peroksidi-entsyymejä. Nämä bakteerit hyödyntävät todennäköisesti happea kuluttavia lakkaasi-entsyymejä tai solunulkoisia entsyymejä, jotka tuottavat peroksidit vasta reaktiopaikalla. [11] Näiden bakteerien on havaittu tuottavan tällä tavalla enemmän molekyylipainoltaan pieniä (low molecular weight, LMW) fenolisia tuotteita, jotka ovat bakteereille jatkokäsittelyissä huomattavasti helpokäyttöisempiä, kuin molekyylipainoltaan suuremmat (high molecular weight, HMW) tuotteet [12].

### 3.2 Aromaattisen renkaan hajottaminen

Aromaattinen rengas on molekyyli rakenne, joka sisältää kuusi hiiltä ja jonka elektronit ovat delokalisoituneet koko renkaan alueelle tehden siitä hyvin stabiilin rakenteen. Tästä syystä aromaattisen ryhmän sisältävät molekyylit ovat hyvin kestäviä luonnossa ja niiden luonnollinen hajoaminen on hidasta. Luonnollisten aromaattisten yhdisteiden lisäksi maassa esiintyy myös ihmisten tuottamia aromaattisia yhdisteitä, joita mikrobit pystyvät hyödyntämään joskin hyvin hitaasti.

Mikrobien ollaan havaittu käsittelevän aromaattisia yhdisteitä määrättyjen askeleiden kautta, kuten Kuvasta 4 käy ilmi. Aromaattisten yhdisteiden esiintyessä ympäristössä mikrobit pyrkivät aluksi valmistelemaan aromaattisen yhdisteen katkaistavaksi käyttäen niille ominaisia entsyymejä ja yhdisteitä joko hapettaakseen tai pelkistääkseen rengas-yhdisteen. Tätä prosessia kutsutaan perifeeriseksi eli ylemmäksi reaktioväyläksi ja tästä reaktiosta syntynyttä tuotetta keskeiseksi välituotteeksi, joka avataan keskeisessä eli alemmassa reaktioväylässä. [13]



**Kuva 4.** Mikrobien aromaattisten yhdisteiden lähteet ja niiden käsittelyyn käytettävät askeleet. Reaktioväylät on kirjoitettu punaiselle taustalle. [13]

Bakteereilla on itsessään neljä erilaista strategista keinoa käsitellä aromaattiset yhdisteet. Nämä neljä strategiaa voidaan nimetä niiden hapen ja energiankuljettajan käytön pohjalta aerobisiin, vähä-aerobisiin tai anaerobisiin ATP-riippuvaisiin ja ATP-riippumattomiin strategioihin. ATP eli adenosiinirifosfaatti on biologisten solujen energiakuljettaja, jota käytetään lähes kaikissa solujen metabolisissa reaktioissa. Bakteerilajit voivat useimmiten hyödyntää sekä aerobista että anaerobista strategiaa riippuen hetkellisestä hapen saatavuudesta ympäristössä. Tällaisia bakteereja kutsutaan fakultatiivisesti aerobisiksi eli bakteereiksi jotka käyttävät ensisijaisesti happea tuottaakseen ATP:ta, mutta pystyvät hyödyntämään myös anaerobista soluhengitystä eli fermentaatiota. Obligatooriset aerobit pystyvät soluhengittämään eli elämään vain hapellisissa ja vastaavasti obligatooriset anaerobit vain hapettomissa olosuhteissa.

Fakultatiiviset aerobit käyttävät aina ensisijaisesti hapellista soluhengitystä, koska aerobinen soluhengitys on huomattavasti tehokkaampaa kuin anaerobinen. Happea terminaalisina elektronien vastaanottajina hyödyntävät reaktiot tuottavat 36-38 ATP:ta yhden reaktiosyklin aikana, kun taas muut kuin happea käyttävät reaktiot tuottavat noin

2 ATP:ta. Jokaisessa strategiassa käytetään erilaisia entsyymejä, hapettimia ja pelkistimiä, joiden takia myös niiden reaktioväylät, välituotteet ja lopputuotteet eroavat toisistaan. [13] Seuraavissa kappaleissa esitellään kyseiset neljä strategiaa esimerkki reaktioineen bentsoaatin eli yksinkertaisimman aromaattisen renkaan katabolisoinnista.

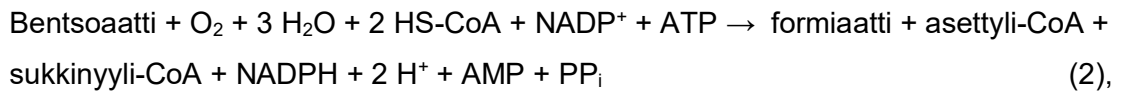
### 3.2.1 Aerobiset strategiat

Yleisin aerobinen strategia on altistaa rengas hapelle oksygenaasin avulla ylemmässä reaktioväylässä, minkä seurauksena ympäristön happi aktivoituu ja sitoutuu fenoliin. Fenolin hapettuminen ylemmässä reaktioväylässä tuottaa katekolia eli fenoli-dialkoholia keskeisenä välituotteena, mikä heikentää huomattavasti aromaattisen renkaan stabiilisuutta. Muodostuneen renkaan elektronipitoiset substituentit aktivoidaan alemmassa reaktioväylässä dioksygenaasilla. Tämän katalysoinnin ansiosta aromaattinen rengas voi pilkkoutua joko substituenttien välistä eli orto-sijainnista tai toisen substituentin vierestä eli meta-sijainnista. [13] Yhtälössä (1) on esitetty  $\beta$ -keto-adiapaattisen katekolin kautta kulkevan reitin kokonaisreaktio, missä bentsoaatti hapetetaan HS-CoA:n eli sitoutumattoman koentsyymin läsnäollessa:



Koentsyymi A (HS-CoA) on ATP:sta, beta-merkaptotyyliamiinista ja pantoteenihaposta koostuva orgaaninen molekyyli, joka osallistuu moniin metabolisiin reaktioihin ja kuljettaa aineita kuten asetyylejä soluissa. Bakteerit *Rhodococcus Erythropolis*, *Pseudomonas putidia* ja *Acinetobacter calcoaceticus* käyttävät esimerkiksi aerobista aromaattisen renkaan halkaisu strategiaa [14].

Toista aerobista strategiaa voidaan käyttää ympäristössä, jossa happea ei ole paljon saatavilla tai sen määrä vaihtelee hyvin paljon. Happea ei käytetä jokaisessa aromaattisen renkaan avaamisen vaiheessa vaan sitä käytetään ainoastaan epä-aromaattisen epoksidin muodostukseen bentsoyyl-CoA:n aromaattisessa renkaassa. Epoksidit kolmiatomisia heterosyklisiä eettereitä, jotka ovat hyvin reaktiivisia niiden steerisyydestä aiheutuvan jännityksen takia. Epoksidin muodostuminen epästabiloi bentsoaatin aromaattisen rakenteen, joka avataan dihydrodioli lyaasin avulla hydrolysoimalla [13]. Reaktioyhtälössä (2) bentsoaatti on avattu hyödyntämällä reaktiota [13]

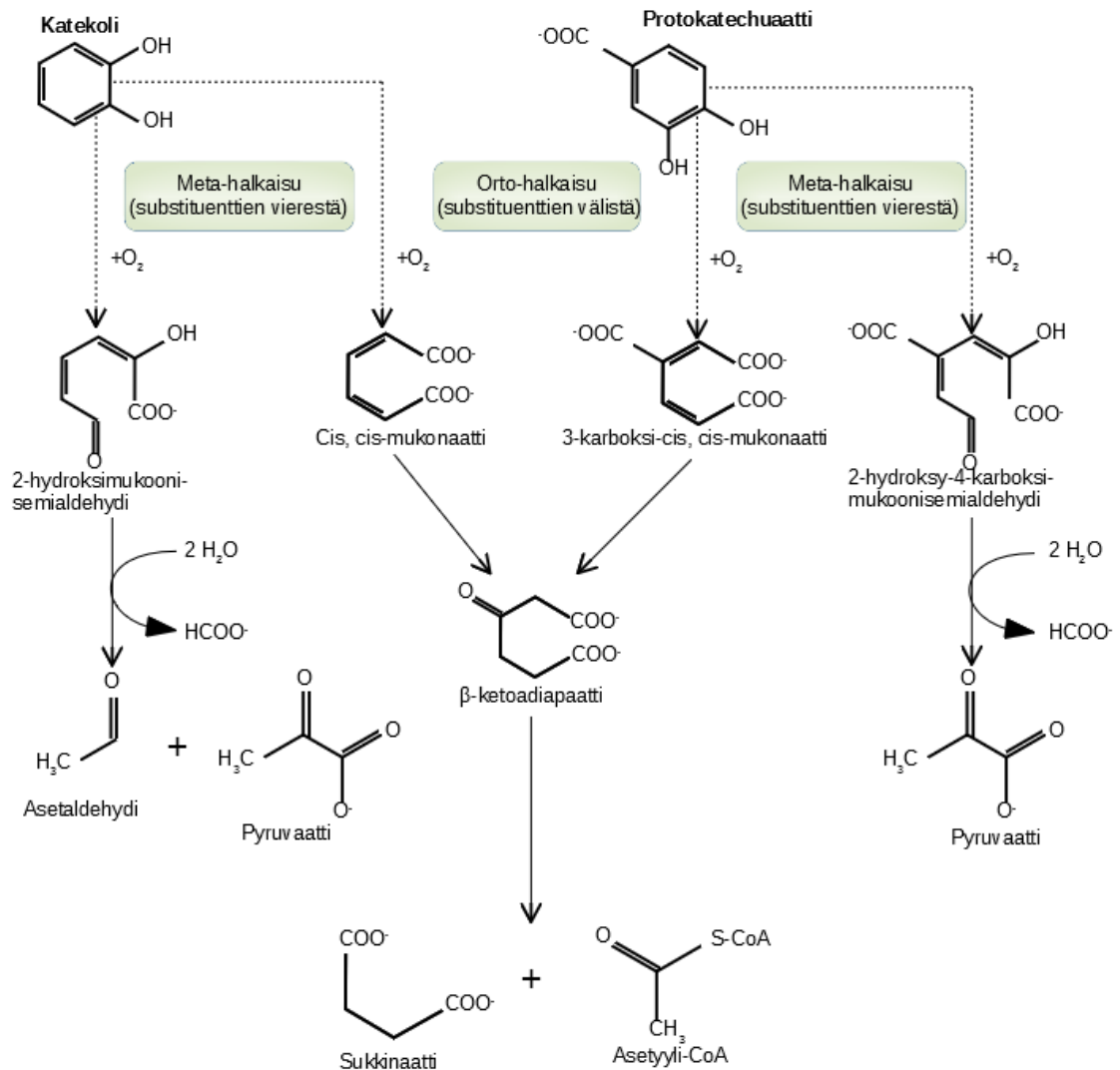


jossa happea ei tarvita yhtä paljon ( $2 \text{O}_2 \rightarrow 1 \text{O}_2$ ) kuin ensimmäisessä strategiassa. Adenosiini monofosfaatti eli AMP ja  $\text{PP}_i$  eli epäorgaaninen pyrofosfaatti ovat ATP:n hydrolyysin tuotteita ( $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$ ).

Useimmat tunnetut ligniiniä käsittelevät bakteerit katabolisoivat lignomeerijohdannaista katekolia tai protokatechuaattia halkaisemalla se *orto*-sijainnista [15]. Tätä Kuvassa 5 esitettyä katabolista reittiä kutsutaan  $\beta$ -ketoadiapaattiseksi reaktiopoluksi viitaten sen merkittävään metaboliittiin  $\beta$ -ketoadiapaattiin. Katekoli ja protokatechuaatti ovat molemmat hyvin yleisiä ligniinin depolymerisaatio- ja yksinkertaisten halkaisureaktioiden tuotteita, millä on hyvin samankaltainen rakenne Kuvassa 2 esitettyihin S- ja G-tyyppeihin.

Lignomeereillä on myös niiden ominaiset polut mitä pitkin ne tai niiden johdannaiset voidaan katabolisoida. Esimerkiksi S-lignomeeri ja sen johdannaiset katabolisoituu vain meta-halkaisulla ja ei koskaan muodosta katekolia tai protokatechuaattia, kun taas G-lignomeeri voi katabolisoitua sekä *orto*- että *metareittiä* pitkin [15]. Mikro-organismien lignomeerien käsittelyä monimutkaistaa myös evoluutiolliset tekijät, joiden takia kaikki mikro-organismit eivät käytä koko  $\beta$ -ketoadiapaattista reaktiopolkua. Jotkin organismit ovat kehittyneet käyttämään vain joko katekolia tai protokatechuaattia, sillä ne ovat karsineet toiseen reittiin tarvittavien entsyymien valmistuksesta vastaavat geenit [15].



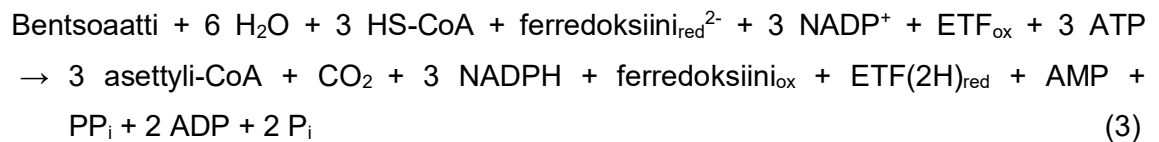


**Kuva 5.** *B-ketoadiapaattisessa reaktiopolun mahdolliset reaktioväylät ja niiden merkittävät tuotteet sekä reittiin tarvittavat reagenssit. [13]*

### 3.2.2 Anaerobiset strategiat

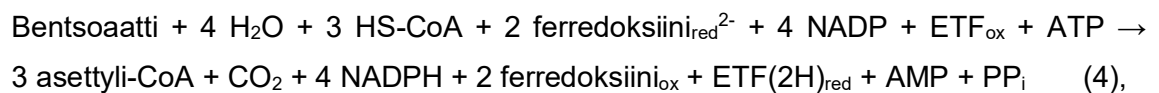
Aromaattinen rengas voidaan myös avata pelkistämällä sitä hyvin tarkassa ympäristössä, jossa vaaditaan hapeton ja vedetön tila sekä natriumioneja pelkistämään prosesseissa tapahtuvia reaktioita. Molemmat anaerobiset strategiat hyödyntävät bentsoyyli-CoA reduktasientsyymiä dearomisoinnissa. Reaktiossa bentsoyyli-CoA pelkistetään kahden-arvoisesti 1,5-dienolytyiksi, mutta tämä reaktio on hyvin paljon kemiallista energiaa vaativa endorkoninen reaktio ja vaatii aina hyvin eksergonisen eli eksotermisen vastareaktion toteutuakseen. [13]

Kolmas strategia hyödyntää solun stoikiometrista ATP:n hydrolyysia, jota katalysoi I-luokan bentsoyyli-CoA reduktaasi. Katalysaattorit ovat reaktioissa kulumattomia aineita, jotka alentavat tiettyjen katalysaattorille ominaisten reaktoiden aloittamiseen tarvitsemaa aktivoitumisenergiaa. I-luokan bentsoyyli-CoA reduktaasi esimerkiksi alentaa ainoastaan bentsoyyli-CoA:n pelkistymisreaktion aktivoitumisenergiaa. Solu saa tarvitsemansa energian joko yhteyttämällä tai anaerobisella hengityksellä, minkä takia vain fakultatiiviset anaerobit hyödyntävät tätä strategiaa. Anaerobisissa olosuhteissa bakteerit eivät voi käyttää happea terminaalisenä elektronin vastaanottajana, jonka takia niiden pitää käyttää muita vastineita. Esimerkkinä tällaisesta aineesta on ferredoksiini eli rautasulfaattinen proteiini, jota myös aerobiset eliöt käyttävät muissa hapetus-pelkistysreaktioissa. Kolmatta strategiaa hyödyntävässä reaktiossa [13]



aromaattinen bentsoaatti muutetaan kolmeksi asetyyli-CoA:ksi ilman happea. Esimerkkejä kolmatta strategiaa käyttävistä bakteereista ovat *Rhodopseudomonas palustris*, *Thauera aromatica* ja *Azoarcus evansii* [13].

Neljättä strategiaa käyttävät obligatoriset anaerobit ja fermentoivat bakteerit, joille ATP:n käyttö bentsoyyli-CoA:n pelkistämiseen olisi energiallisesta epäsuosiollista eli reaktio kuluttaisi enemmän ATP:tä kuin mitä se tuottaisi. Reaktiota on mahdotonta toteuttaa käyttäen I-luokan bentsoyyli-CoA reduktaasia, mutta II-luokan bentsoyyli-CoA reduktaasia käyttämällä mikrobi pystyy tuottamaan tarvitsemansa energian bentsoyyli-CoA:n pelkistykseen. ATP-riippumattoman pelkistyksen kokonaisreaktio on esitetty reaktioyhtälössä (4) [13]



mikä eroaa kolmannesta strategiasta sen energian tuottamisen suhteen. Toisin kuin reaktioyhtälössä (3), jossa reaktioon tarvittava energia tuotettiin 2 ATP molekyylin eksergonisella hydrolyysillä, reaktioyhtälössä (4) reaktioon tarvittava energia tuotettiin ylimääräisellä ferredoksiinin hapetus (ox) – pelkistys (red) reaktiolla.

Anaerobinen ligniinin käsittely on hyvin harvinaista, sillä ligniinin depolymerisaatio vaatii yleensä vahvojen oksidaasien ja ligaasien hyödyntämisen, joita anaerobiset organismit eivät voi tuottaa. Anaerobisissa sovelluksissa, esimerkiksi metaanin tuotannossa,

käytetään usein lignoselluloosaa, mutta useimmiten näissä sovelluksissa käytetyt prosessit tuottavat hyvin ligniinipitoista jäännettä. Suurin osa prosessien ulostulevasta ligniinistä on raskasmoolimassaista, sillä anaerobiset bakteerit pystyvät hyödyntämään vain yksinkertaisia lignomeerejä, jotka esiintyvät liuenneessa muodossa lignoselluloosassa. Tämän takia useimmat tutkimukset aiheesta [16-18] pyrkivät esikäsittämään ligniiniä pienempään ja liukoisempaan muotoon, jotta se voitaisiin kokonaan kuluttaa anaerobisissa reaktoreissa.

## 4. LIGNIININ TEOLLINEN KÄSITTELY

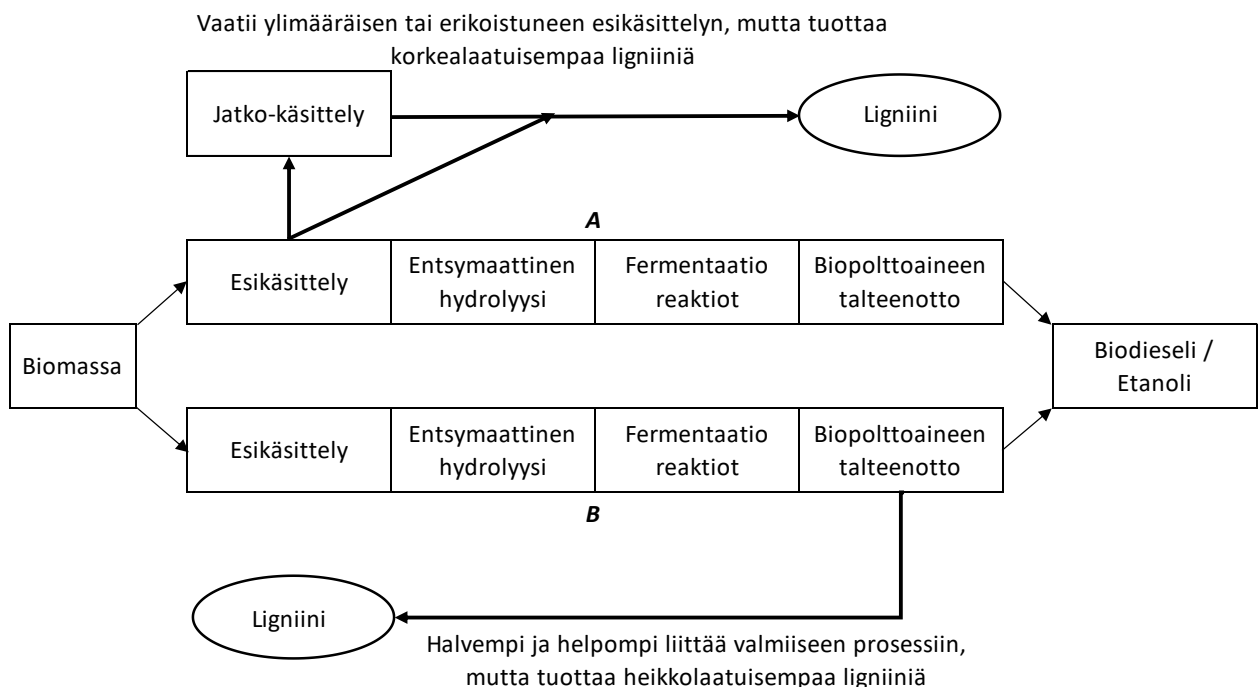
Ligniiniä käsitellään useimmiten lipeäkäsittelyn jälkeen polttamalla se energiaksi, mutta osassa prosesseista tämä liete voidaan ottaa talteen ja hyödyntää toisessa reaktorissa. Useimmat ligniinin käsittelyprosessit ovat ainoastaan lisättyjä reaktoreita tai prosesseja jo valmiiseen käsittelylaitokseen, minkä takia niiden hyödyntämä raaka-aine on hyvin spesifistä ja usein huonolaatuista. Tutkimusten ja trendien lisääntyessä ligniinin puoleen, kiinnostus sen käsittelyyn ja prosessointiin on kasvanut hyvin nopeasti. Viime vuosien aikana on suunniteltu ja rakennettu muutamia erikoistuneita lignoselluloosalaitoksia, joiden tarkoituksena on käsitellä tulevaa lignoselluloosamassaa tuottaakseen päämääräisesti ligniiniä. Samanaikaisesti uuden sukupolven bioprosessilaitokset, jotka tuottavat vihreitä tuotteita, kuten biopolttoaineita, samalla tuottavat yhä suuremman määrän ylijäämää ligniiniä lignoselluloosasta [19]. Raakaligniinin tarjonta todennäköisesti tulee siis nousemaan hyvin nopeasti lähivuosien aikana. Lisääntynyt tarjonta tulee myös kasvattamaan markkinallistarakoa ligniinikäsittelylaitoksille, joissa päämääräisesti muunnetaan ligniiniä hyödyllisiksi tuotteiksi.

Ensimmäinen asia mitä uusia biokäsittelylaitoksia suunniteltaessa tulisi tehdä on raaka-aineen analysointi, jonka pohjalta käsittelyprosessit suunnitellaan ja mitoitetaan. Kuten kappaleessa 2 mainittiin, monolignoolien suhde vaikuttaa hyvin paljon ligniinin ominaisuuksiin, ja täten tämä myös vaikuttaa sen mahdollisuuksiin prosessoida tehokkaasti.

### 4.1 Biojalostamoiden ligniinin käsittely

Biojalostamot ovat laitoksia, joissa biomassasta pyritään valmistamaan hyödyllisiä tuotteita, kuten polttoaineita, lämpö- ja sähköenergiaa tai biomuoveja. Biojalostamoissa voidaan hyödyntää sekä ylijäämäbiomassaa tai siihen erikseen kehitettyä tai rakennettua massaa, kuten jalostettuja puu- tai hyötykasvilajeja. Tutkimusten mukaan useimmat maat voisivat kasvattaa biomassan tuotantoa siten, ettei se vaikuttaisi tämänhetkisiin viljelyalueisiin ja että tämä tuotanto tulisi pysymään uusiutuvana [20]. USA on yksi merkittävimmistä maista, joissa voisi olla mahdollista toteuttaa näiden tutkimusten mukainen toiminta maan hyvin suuren koon ja ympäristöolosuhteiden ansiosta.

Lignoselluloosaa käyttävät biojalostamot yleisesti tuottavat biokaasua, biopolttoaineita tai sähköä tai jotain näiden kolmen yhdistelmää prosesseissaan. Biopolttoaineiden, eli biodieselin ja bioetanolin, tuotanto ja samalla kysyntä on tasaisesti kasvanut vuodesta 1980 asti [21], minkä takia ne ovat vieläkin yleisimpiä tuotteita uusissa biojalostamoissa. Etanolin tuotantoprosessi on kuvattu yksinkertaisesti Kuvassa 6, jossa on esitetty kaksi vaihtoehtoa ligniinin talteenotolle. Biomassaa esikäsitteltäessä ligniini voidaan eristää muusta biomassasta käyttämällä erikseen siihen tarkoitettuja prosesseja (A), kuten alkaliinisia tai organosolvaattisia esikäsittelyjä, joista saatu ligniini on hyvin korkealaatuista ja yhdenkaltaista polymeerirakenteeltaan.



**Kuva 6.** Biojalostamoiden etanolin tuotannon yksinkertaistettu prosessikaavio, jossa on esitetty kaksi mahdollista ligniinin erottelureittiä A ja B.

Ligniineroteltua biomassaa voidaan vielä hyödyntää tehokkaasti etanolin valmistuksessa. Toisena vaihtoehtona on fermentaation jälkeinen erottaminen (B), mikä on helpompi asentaa jo valmiiseen jalostamon tuotantoketjuun. Näin eritelty ligniini on usein huonolaatuista aikasempien hydrolyysi- ja fermentaatioentsyymien läsnäolon takia. [22] Kuten kappaleessa 3 mainittiin, mikrobit pystyvät hyödyntämään heterogeenistäkin ligniiniseosta, mutta se useimmiten vaatii usean eri mikrobilajin symbioosin toimiakseen tehokkaasti. Tämän takia tulevan käsiteltävän ligniinin toivottaisiinkin olevan mahdollisimman homogeenistä. Täten tehokkain biojalostamomalli bakteerien ligniini-

lähteeksi olisi Kuvan 6 reitin A mukainen ligniinin erottelu, ennen hydrolyysi- ja fermentaatioreaktioita.

Lignosulfaattierotuksessa biomassassa käsitellään rikkiatrioksidilla happamissa ja noin 130 - 160°C olosuhteissa. Lignoselluloosan esterisidokset hajoavat hapon ansiosta, minkä jälkeen depolymerisoitunut ligniini reagoi liuoksessa olevien sulfiittien kanssa muodostaen liukoisia sulfonaattiyhdisteitä. Näin muodostuneet lignosulfaatit omaavat tavallisesti hyvin korkean polydispersiteetin puulajista riippuen.

Kraft-prosessissa biomassassa keitetään natriumhydroksidi ja -sulfaatin kanssa, mikä erottaa biomassan mustaan ja valkoiseen liejuun. Valkoinen lieju sisältää suurimman osan biomassan selluloosasta, kun taas musta lieju sisältää ligniinin ja muiden orgaanisten aineiden jäänteet. Tässä prosessissa lignoselluloosamassan ligniinit depolymerisoituvat bakteerien lignolyttisten entsyymien tapaisesti  $\beta$ -0-4 sidoksista. Ligniini pystytään tämän jälkeen saostamaan mustasta liejusta, minkä jälkeen sitä kutsutaan kraft-ligniiniksi. Kraft-ligniinin polydispersiteetti on hieman alhaisempi kuin lignosulfaateilla, sillä näin syntyneet ligniinit ovat molekyylipainoltaan pienempiä.

Alkalisessa esikäsittelyssä lignoselluloosamassaan lisätään alkaliinista ainetta, kuten natriumhydroksidia, ja altistetaan seos lämmölle. Kyseinen prosessi on hyvin yksinkertainen, helposti skaalattava sekä halpa ylläpitää ja käyttää. Alkaliinisella esikäsittelyllä ligniini ja hemiselluloosa liukenevat ja samanaikaisesti molekyylien väliset esterisidokset alkavat de-esteröityä. Prosessissa polysakkaridit saostuvat raaka-aineesta kiinteinä aineina ja ligniini erottuu liuoksena, jota kutsutaan APL:ksi (alkaline pretreated liquid), mikä sisältää vielä pienen osan polysakkarideja ja asetaattia laajan ligniiniervalikoiman lisäksi. [23, 24]

## 4.2 Bioreaktorit ligniinin käsittelyssä

Bioreaktori on laite, jonka tarkoituksena on luoda optimaalinen elinympäristö biologisille reaktioille, joiden kulkua voidaan hallita vapaasti muuttamalla reaktorin pH:ta, lämpötilaa, kaasujen vaihtoa, liuenneen hapen määrää tai sekoitusolosuhteita. [25] Biologisten olentojen, kuten mikrobien, metaboliset reaktiot ovat herkempiä muuttujille, minkä takia bioreaktorit ovat huomattavasti monimutkaisempia ja vaativat paljon enemmän tarkkailua sekä olosuhteiden hallinnoimista kuin tavalliset kemialliset reaktorit.

Erillaisia bioreaktorimalleja on lukuisia, mutta hyvin yleistetyllä tasolla ne voidaan jakaa joko aktiiviliete- tai kantoainereaktoreiksi riippuen siitä sijaitsevatko mikrobit suspendoituneina vedessä vai jonkin kantoaineen pinnoilla. Reaktorit voidaan vielä erotella niiden ravinteensyötön mukaan kertasyöttöisiksi (batch), eräsyöttöisiksi (fed-batch) tai jatkuvasyöttöisiksi (continuous). Kertasyöttöreaktorit ovat yksinkertaisimpia ja usein käytettyjä tutkimuksissa, joissa etsitään bakteerikantaa metabolisoimaan valittua substraattia. Bioreaktorin valintaan ja suunnitteluun vaikuttaa kaikkein eniten käytetty mikro-organismi ja se mitä kyseisen mikro-organismien halutaan tekevän.

Ligniinin hyödyntämisessä halutaan yleisesti muuttaa ligniinin lignomeerit hyödyllisiksi tuotteiksi, jotka ovat suurimmilta osiltaan bakteerien lignomeerien katabolian välituotteita. Näitä välituotteita voidaan ottaa talteen jatkuvasti esimerkiksi keräämällä niitä liuoksesta jatkuvasyöttöisissä reaktoreissa tai estämällä niitä pilkkovien entsyymien tuotanto bakteereissa erä- tai kertasyöttöisissä reaktoreissa. Kertasyöttöisten reaktorien liittäminen jo toiminnassa oleviin lignoselluloosaa käsitteleviin laitoksiin olisi helposti toteutettavissa niiden helppokäyttöisyyden ja yksinkertaisuuden ansiosta. Jatkuvasyöttöisiä reaktoreita voidaan taas käyttää erillisissä ligniinikäsittely laitoksissa tuottamaan suuresta määrästä ligniinistä hyödyllisiä tuotteita.

Yhdistettyä bioprosessointi menetelmää (Consolidated bioprocessing, CBP) on ehdotettu olevan hyvä bioreaktorimalli ligniinin käsittelyyn [26-28]. Mallissa käsitellään APL-liuosta, jossa bakteerit samanaikaisesti depolymerisoivat ligniinipolymeeri pitoista liuosta että tuottavat siitä syntyneistä lignomeereista arvokkaita tuotteita yhdessä bioreaktorissa. Tällainen yhden astian ligniinin käsittely olisi taloudellisesti kannattava ja teknisesti helposti toteutettava ratkaisu. CBP bioreaktori malli on idealtaan hyvin yksinkertainen ja se voitaisiin toteuttaa useilla eri mikrobeilla, mutta bakteerien käyttöä suositaan tässä prosessissa, koska ne mukautuvat helpommin eri ympäristökäyttöihin kuin sienet. Mahdollisten eri bakteerilajien määrää CBP:ssa kuitenkin rajoittaa niiden kyky hajottaa ligniiniä sekä kuluttaa lignomeereja tehokkaasti samanaikaisesti. Salvachuan vuonna 2015 julkaistussa tutkimuksessa huomattiin esimerkiksi bakteerien *Citrobacter freundii*, *Bacillus megateriumin*, *Paenibacillus sp:n* ja *Bacillus subtiliksen* pystyvän tehokkaasti kuluttamaan raskaita ligniinipolymeeriketjuja typpirajoitetussa ympäristössä kymmeneen muuhun kantaan verrattuna [24]. Nämä neljä kantaa eivät kuitenkaan olleet yhtä tehokkaita katabolisoimaan lignomeereja, minkä takia niitä ei kannata käyttää yksinään CBP:ssa. Tutkimuksessa parhaiten soveltuivat kannat: *P. putida* KT2440, *P. putida* mt-2, *R. jostii*, *Amycolatopsis sp.*, ja *Acinetobacter sp*, joiden todettiin olevan hyviä kandidaatteja tuleviin tutkimuksiin CBP:n käytöstä.

## 5. BAKTEERIEN VALMISTAMAT TUOTTEET

Bakteerien aiheuttama ligniinidegradaatioketju on hyvin pitkä ja lignomeeri käy läpi monta muotoa ennen kuin sen metabolisointi on täysin valmis. Metaboliareitin aikana syntyneitä erilaisia välituotteita voidaan hyödyntää sellaisenaan tai jatkokäsitellä niistä muita arvokkaita kemikaaleja.

Bakteerilajit ovat keskenään hyvin erilaisia niiden metaboliareiteltään, jopa lajinsa sisällä, minkä lisäksi ne pystyvät mukautumaan ympäristöönsä suhteellisen nopeasti evoluution avulla. Tällainen nopea evoluutio on mahdollista bakteerien pienen koon, yksinkertaisuuden ja nopean lisääntymisen ansiosta. Bakteerilajeilla on tosin niille ominaiset kasvumediumit ja ominaislämpötila-alueet, missä ne selviytyvät parhaiten eivätkä aktiivisesti hakeudu niitä vastaisiin ympäristöihin. Bakteereja suositaan monimutkaisemmissa ja vaativammassa prosesseissa erityisesti niiden kestävyys ja monimuotoisuuden takia. Ensimmäinen vaihe bakteerien hyödyntämisessä tämänkaltaisissa prosesseissa, on niiden kykyjen ja metaboliareittien tutkiminen sekä ymmärtäminen. Nykyään tiedetään monta bakteerilajia ja -kanta, jotka pystyvät selviytymään olosuhteissa, joissa ainoana hiilen lähteenä toimii lignomeerit tai lignoselluloosa.

Viime vuosikymmenien aikana on tehty useita tutkimuksia monilla bakteereilla ja ligniinin lähteillä ja joista muutamissa on hyödynnetty bakteerien kehitys- tai muokkausmenetelmiä. Yleisimpiä menetelmiä ovat esimerkiksi kontrolloitu evoluutio ja adaptaatio, joissa mikro-organismit altistetaan niille haitallisiin ympäristöihin ja annetaan niiden yrittää selviytyä. Selviytyneet organismit valitaan viljeltäväksi ja altistetaan uudelleen haitallisille tekijöille, toistaen prosessia kunnes organismeista on kehittynyt täysin ympäristöön sopeutunut kanta.

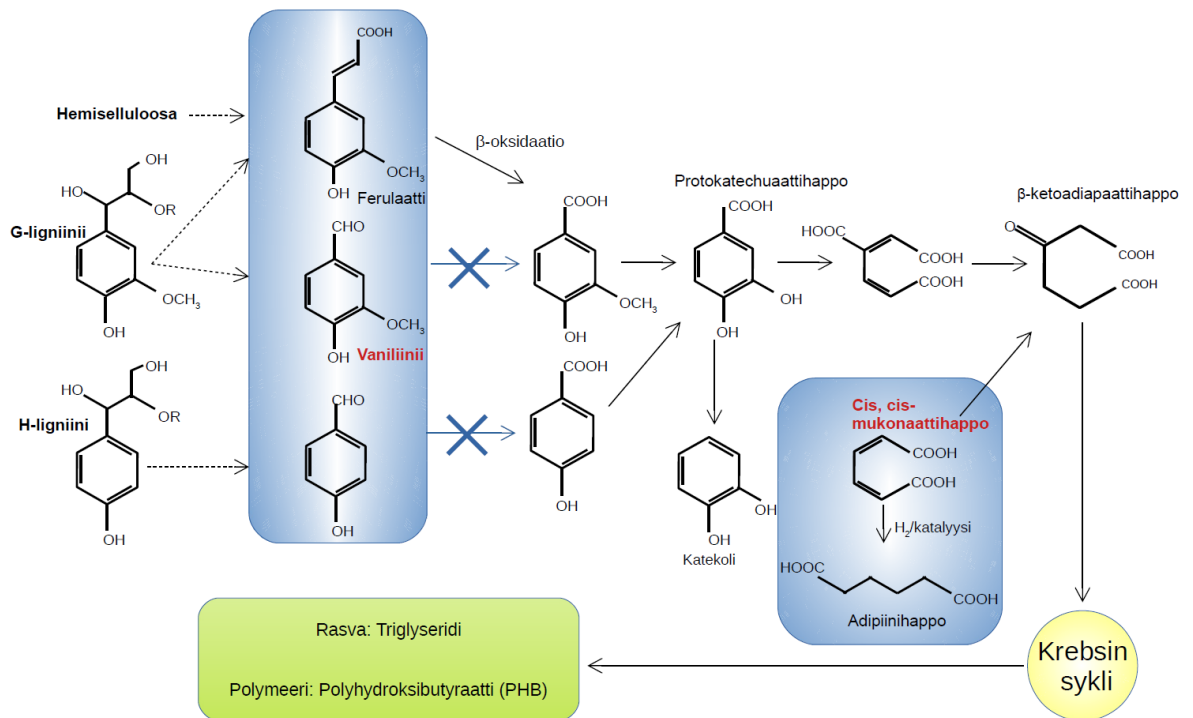
Tiettyä tuotetta, kuten biodieselin, tuotantoa suunniteltaessa on tärkeää valita sellainen bakteerilaji ja -kanta, joka pystyy tehokkaasti hyödyntämään käytettyä ligniinilähdettä. Kuten kappaleessa 2 mainittiin, jokaisella kasvilajilla on ainutlaatuinen ligniinijakauma, mikä vaikuttaa hyvin paljon sitä hyödyntävän bakteerin tehokkuuteen ja tuotteiden tuottoon. Kuitenkin itse depolymerisointi tai käytetty esikäsitelyprosessi vaikuttaa ligniinin laatuun ja täten bakteerin tehokkuuteen hyödyntää sitä. Taulukossa 1 on esitelty erilaisia tuotteita, joita bakteereilla voidaan muodostaa erinäisistä niille sopivista ligniinilähteistä.



**Taulukko 1.** Esimerkkejä tuotteista, joita bakteerit pystyvät tuottamaan erilaisista ligniinilähteistä. Kaikki ilmoitetut raaka-aineet ovat liukoisessa muodossa.

Tuote	Raaka-aine	Bakteerilaji	Lähde
1-undeceni	Ferulaatti	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	[29]
Adipiinihappo	APL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	[19]
Cis,cis-mukonaatti happo	Hydrolisoitu ligniini	<i>Pseudomonas putida</i> MA-9	[30]
Maitohappo	p-Komaryylihappo	<i>Pseudomonas putida</i> KT-2440-CJ122	[31]
Metaani	Hydrolisoitu ligniini	Anaerobiset lajit	[31]
P-Hydroksidi- bentsoehappo	p-Komaryylihappo	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	[31]
Polyhydroksyaalkaonaatti (PHA)	Kraft-ligniini	<i>Cupriavidus basilensis</i> B-8	[31]
Pyrogallushappo	Syringic acid	<i>Escherichia coli</i>	[31]
Pyruvaatti	p-Komaryylihappo	<i>Pseudomonas putida</i> KT-2440-CJ122	[31]
Triglyseridi (TAG)	Organosolvaattinen ligniini	<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 1069	[32]
Vanilliini	Lignoselluloosa	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	[33]

Hyvin merkittävä tekniikka mikrobien teollisessa hyödyntämisessä on metabolia-muokkaus, jonka yleisyys on kasvanut yhtä nopeasti kuin mikrobien genomien tunnettavuus on yleistynyt. Metabolisella muokkauksella pyritään sulkemaan tai avaamaan metaboliareittejä, joita mikrobi ei tavallisesti käytä, tai yksinkertaisesti kasvattamaan halutun aineen tuotantoa ja varastointia solussa. Kuvassa 7 on esitetty varastorasvoja keräävän bakteerin teoreettinen metaboliareitti, jossa bakteeri käyttää lignomeerejä ja hemiselluloosaa hiilen lähteenä tuottaakseen lipidejä. Tässä mallissa on esitetty mahdollisia tuotteita tai polun reittejä, joita voidaan geenimuokkauksella estää (kuvassa sinisellä raksilla merkitty) tai tehostaa.



**Kuva 7.** Rasvahappoja varastoivan mikrobin ligniinin käsittelyn metabolinen reitti. Sinisellä alueella merkityt molekyylit, joista punaiset ovat arvokkaimpia, voidaan muokata geenimuokkauksella keräytymään mikrobissa. Muokattu lähteestä [34]

Geenimuokkauksella voidaan merkittävästi vaikuttaa bakteerien toimintaan, jonka esimerkiksi eräs tutkimusryhmä teki *Rhodococcus jostii* RHA 1 bakteerille. Tutkimuksessa tältä bakteerilta poistettiin geenit, jotka vastasivat vanilliini-hydrogenaasin ja vanillaatti-demetylaasin tuotannosta. [33] Geenien poisto pysäytti bakteerin lignoselluloosan katabolian vanilliinimolekyyliin, mikä tarkoitti vanilliinin alkavan kertyvän systeemissä eikä välittömästi hajoavan keskinäisen reaktiopolon toiseksi välituotteeksi.

## 5.1 Biopolttoaineet

Bakteerien geenimuokkauksen yleistyessä mahdollistuu yhä useamman bakteerilajin ja kannan hyödyntäminen ligniinikäsittelyssä. Tämä kasvu samalla avaa mahdollisuuden useampien arvotuotteiden valmistamiseen ligniinistä taloudellisesti järkevään hintaan. Biopolttoaineet ovat useimmiten ensimmäinen asia mitä ihmisille tulee mieleen teollisesta bioteknologiasta, minkä ansiosta sen arvo ja tärkeys on yleisesti tunnettu. Tämän takia ligniinistä tuotettavat biopolttoaineet ovat merkittäviä tuotteita, joiden markkina-arvo ja tunnettavuus voivat samalla nostattaa toistenkin ligniinistä tuotettujen tuotteiden mainetta. Bakteerien valmistamaa biopolttoainetta pystyttäisiin markkinoimaan muiden biokonversiotuotteiden kanssa hyvin ympäristöystävällisenä ja

kestävänä valintana [5] muihin biopolttoaineisiin verrattuna, sillä sitä voitaisiin tuottaa valmiiksi hukkaan heitettävästi materiaalista.

Biopolttoaineen valmistuksessa käytetään pääsääntöisesti rasvoja tai öljyjä tuottavia mikro-organismeja (yli 20% kuivapainosta on lipidejä [35]), joiden tavallinen metabolinenreitti esiteltiin Kuvassa 7. Rasvojavarastoivien bakteerien lipidi massaosuus on yleensä 20-40%, mutta kasvua rajoittavissa olosuhteissa tämä osuus voi olla jopa 70%. Mikroleviin verrattuna, joilla tavallinen lipidi massaosuus on välillä 1-70%, bakteerit ovat huonompia lipidien varastojia, mutta ne ovat huomattavasti nopeampia kasvamaan ja paljon sopeutuvampia ympäristöön tehden niistä tehokkaampia lipidien tuottajia. Suurin ongelma bakteerisessa biodieselin valmistuksessa on kerääntyneiden lipidien talteenotto, sillä lipidit kerääntyvät bakteerien solukalvolle vaikeuttaen niiden eristystä solusta. [35] Viime vuosien aikana useita menetelmiä on testattu, esimerkiksi elektrokemiallista [36], manothermosonikaatiota [37] ja ultrasonikaatiota [38], jotka ovat näyttäneet lipidien talteenottamisen olevan mahdollista, mutta energiallisesti haastavaa biodieselin valmistuksen kannalta. Polttoaineen valmistuksessa on tärkeää, että tuotetulla polttoaineella on enemmän energiallista arvoa kuin mitä sen tuottamiseen on kulutettu. Aikaisemmin mainituissa tutkimuksissa käytetyt prosessit olivat kuluttaneet lähes yhtäpaljon energiaa, kuin mitä tuotetusta ja käsitellystä biodieselistä olisi saatu hyödynnettyä.

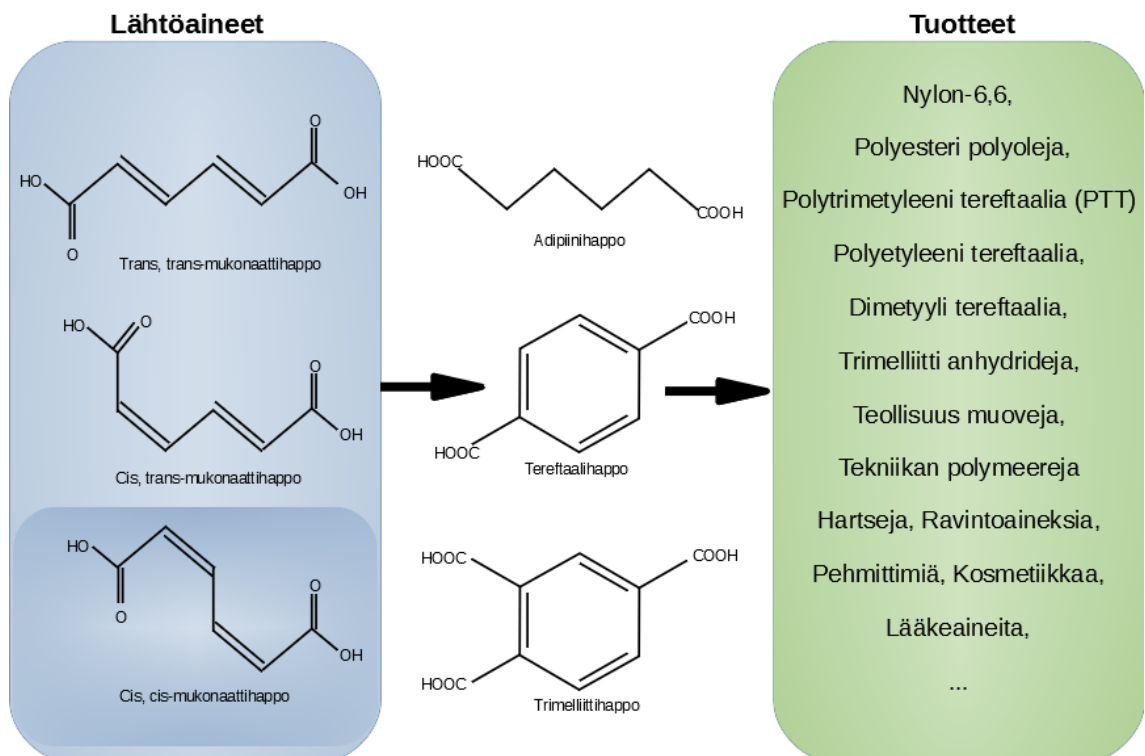
Mikro-organismien tuottama biodieseli ei aina kuitenkaan ole homogeenista tai rakenteeltaan yleispätevään käyttöön sopivaa. Esimerkiksi logistiikan käyttöön sopivan biodieselin tulisi olla mahdollisimman tyydyttynyttä rakenteeltaan, jonka tarkan tyydytyn/tydyttymättömän rakenteen raja-arvo vaihtelee käyttöalueesta (EU ja USA) riippuen. Bakteerien tuottamat lipidit riippuvat hyvin paljon bakteerikannasta ja ympäristöolosuhteista, mutta luonnostaan bakteerit tuottavat tyydyttymättömiä happoja yli 20°C lämpötiloissa [35].

## 5.2 Biopolymeerit ja niiden monomeerit

Polyhydroksyalkaonaatti eli PHA on kerännyt suosioita viime vuosikymmenien aikana sen yleiskäytännöllisyyden ja biotuotantomahdollisuuden ansiosta. Esimerkiksi PHA:lla on paljon käyttöä kudosteknologisissa tuotteissa sen bioyhteensopivuuden takia, eli toisin sanoen biologiset systeemit eivät torju sitä, koska se tunnustetaan turvalliseksi osaksi systeemiä. Bakteerit itsessään tuottavat PHA:ta toimiakseen niiden energianvarastona ravinteita rajoittavissa olosuhteissa lipidien tavoin.

PHA:n tuottaminen tavallisimpien biojalostamoiden ligniinivirrasta on osoittautunut vaikeaksi luonnollisille bakteereille. Parhaimmat kaksi lajia *Pseudomonas putidia* KT-2440 ja *Cupriavidus basilensis* B-8 pystyivät tuottamaan ainoastaan 1.0 g ja 0.327 g PHA:ta litraa substraattia kohden [31]. Tuotannon kasvattamiseen tulisi käyttää siis erikseen suunniteltua esikäsitteilyprosessointia tai tarkoituspäistä bioreaktorimallia, kuten CBP:tä.

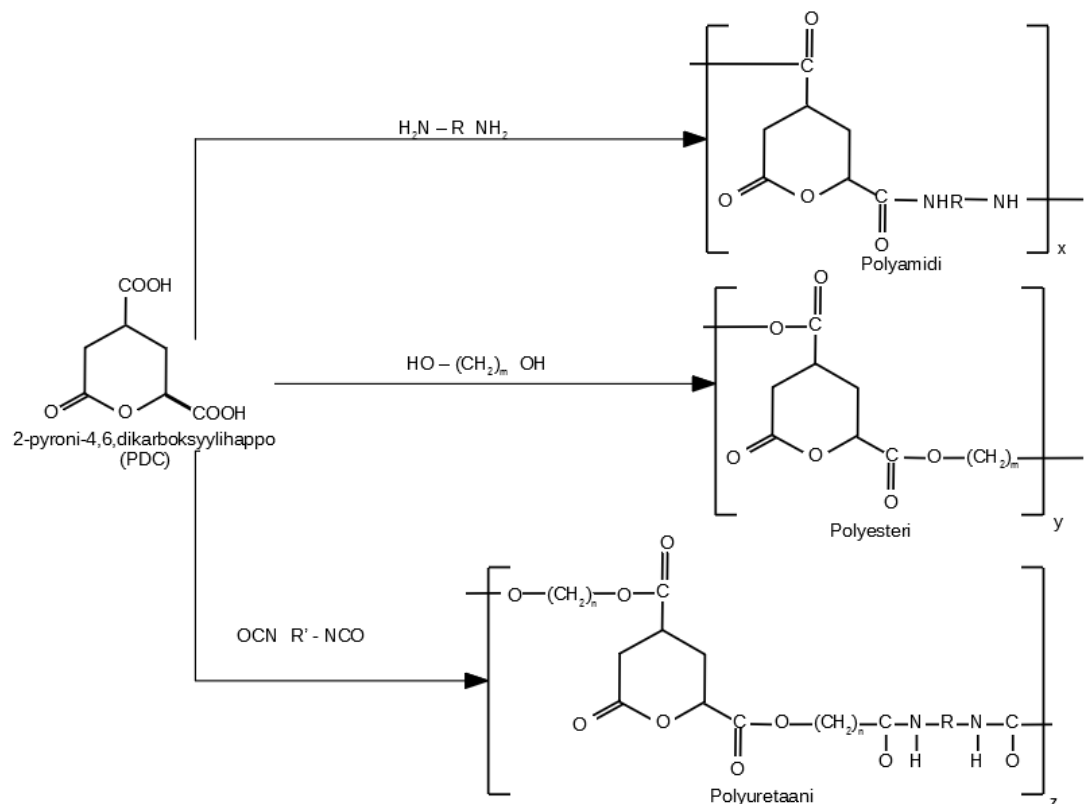
Cis,cis-muconic happoa (mukonaattihappo) voidaan käyttää moniin eri tuotteisiin, joita on esitetty Kuvassa 8, tehden siitä hyvin arvokkaan ja merkittävän bakteeriperäisen molekyylin. Mukonaattihappo on yksi välituotteista  $\beta$ -ketoadiabaatti reaktiopolulla, mikä tekee siitä myös hyvin yleisen välituotteen ligniiniä käsittelevien bakteerien joukossa nostaan sen hyödyntämisarvoa. Adipiinihappo on arvokkain mukonaattihapon johdannainen, sillä siitä voidaan valmistaa esimerkiksi nylonia tai pehmittimiä (plasticizers). Sillä on arvioitu tällä hetkellä olevan vuodessa noin 2.6 miljoonan tonnin kysyntä, jonka arvioidaan nousevan useita prosentteja vuosittain [19].



**Kuva 8.** Mukonaattihaposta mahdollisesti tuotettavat aineet. Lähes kaikki listatut tuotteet voidaan valmistaa helposti cis,cis-muodosta. Muokattu lähteestä [30]

PHA:n ja mukonaattihapon lisäksi PDC (2-pyroni 4, 6-dikarboksyylil happo) on tarkasti tutkittu molekyyli, mitä voidaan käyttää raaka-aineena biopolymeerien valmistuksessa. PDC on yksi *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6:n metaboliareitin (Protocatechuate 4,6-halkaisureitti) välituotteista, joita tämä bakteeri tuottaa ligniinijohdannaisista tuotteista. [3] Muiden välituotteiden tavoin PDC kulutetaan hyvin nopeasti sen muodostuttua, minkä takia sen tuotantoa ja pidättäytymistä bakteereissa pyritään parantamaan metabolisella muokkauksella. Otsuka ja Shigero ryhmään [39] siirsivät SYK-6:sta eritetyt geenit ligAB ja ligC, jotka vastaavasti tuottavat protocatechuaatti 4,5-dioksygenaasia ja 4-kar-boksi-2-hydroksymukonaatti-6-semialdehydi dehydrogenaasia soluissa, *P. putida*an-PpY1100 *E.colin* avulla. Muokatun *P. putidan* huomattiin tuottavan PDC:tä, muttei kuluttavan sitä johtuen siitä, että PDC ei luonnostaan kuulunut bakteerin tavalliseen metaboliaan. [39]

PDCstä voidaan valmistaa useita arvokkaita polymeerijohdannaisia, joista kolme merkittävintä on esitetty Kuvassa 9. Molekyylin karboksyyliiryhmiä (-COOH) muuttamalla siitä voidaan muodostaa biohajoavaa polyesteristä muovia tai esimerkiksi vaahto-muoveissa käytettyä polyuretaania.



**Kuva 9.** Mahdollisia PDC:stä valmistettavia polymeerisia tuotteita, joilla on suuri markkina-arvo ja kysyntä. [39]

## 6. YHTEENVETO

Ligniinin hyödyntäminen on yleistynyt viimeisten vuosikymmenien aikana paljon ja erityisesti mikro-organismien käyttö uusissa sovelluksissa on ollut hyvin suosittua. Bakteerit eivät käsittele ligniiniä yhtä tehokkaasti, mutta ne ovat huomattavasti monikäyttöisempiä, mukautuvampia ja kestävämpiä kuin niitä vastaavat lahottajasienet. Bakteerien perimä on myös paljon tunnetumpi, minkä takia tiedeyhteiskunta keskittyykin bakteerien hyödyntämiseen ligniinin käsittelyssä sienien sijaan.

Biotuotteiden kysyntä tulee hyvin todennäköisesti kasvamaan merkittävästi tulevaisuudessa ilmastonmuutoksesta johtuvan ympäristöystävällisyys trendin myötä. Biopolttoaineet ja biopolymeerit ovat merkittävimpiä ja tunnetuimpia tuotteita suurelle osalle ihmisistä, minkä takia onkin järkevää kehittää mikrobiologisia sovelluksia näiden valmistamiseen. Bakteerien käyttöä rajoittaa vielä niiden heikko tuotto prosentti laboratorioskaalassa ja mahdollisten pilottireaktoreiden olosuhteiden ja tuotteiden erotuksien optimointi.

Useimmat tutkimukset ovat osoittaneet aktinobakteerin *R. jostii* ja proteobakteerien *P. putidan* sekä *Acinetobacteriai* sp.n olevan hyvin potentiaalisia bakteereja ligniiniä käsittelevissä bioprosesseissa. *P. putida* KT-2440 on erityisesti ollut tutkittavana kantana suurimmassa osassa ligniinin käsittelyä koskevissa tutkimuksissa ja on usein osoittautunut tehokkaimmaksi lajiksi verrattuna muihin. Kaikkia bakteereja ei kuitenkaan käytetä erityisesti tuottamaan jotain tiettyä tuotetta vaan niitä voidaan myös käyttää päämääräisesti vain kuluttamaan ligniiniä raaka-aineesta. Esimerkiksi lisäämällä biokaasureaktorin inokulaattiin anaerobista ligniinin kuluttajaa *Tolumonas lignolytica* sp. nov. [40] voidaan lignoselluloosainen raaka-aine kuluttaa lähes kokonaan reaktorissa, mikä muuten lähtisi reaktorista kulumatta.

Yleiskatsaus viime vuosikymmenien tutkimuksista osoittaa bakteerien tulevan olemaan hyvin todennäköisesti merkittävässä roolissa tulevaisuuden teollisuudessa. Bakteerit pystyvät tuottamaan hyvin kirjavan määrän erillaisia arvokkaita tuotteita lähestulkoon hukkaan heitettävästä raaka-aineesta, joka on sekä maailman toiseksi yleisin biomateriaali että uusiutuva raaka-aine.

## LÄHTEET

- [1] G.T. Beckham, Lignin Valorization: Emerging approaches, The Royal Society of Chemistry, 2018, 228-233 p.
- [2] R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan, Lignin Biosynthesis and Structure, Plant Physiology, Vol. 153, Iss. 3, 2010, pp. 895-905.
- [3] G.T. Beckham, C.W. Johnson, E.M. Karp, D. Salvachua, D.R. Vardon, Opportunities and challenges in biological lignin valorization, Current opinion in biotechnology, Vol. 42, 2016, pp. 40-53.
- [4] Hongzhang Chen, Biotechnology of Lignocellulose, in: Anonymous (ed.), Biotechnology of Lignocellulose, Springer Netherlands, Netherlands, 2014, pp. 25-71.
- [5] Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, Progress in Energy and Combustion Science, Vol. 38, Iss. 4, 2012, pp. 522-550. <https://www.sciencedirect-com.libproxy.tut.fi/science/article/pii/S036012851200007X>.
- [6] M. Lawoko, Lignin polysaccharide networks in softwood and chemical pulps, Royal Institute of Technology, 2005, Available: <http://libris.kb.se/resource/bib/10009932>.
- [7] H. Hatakeyama, T. Hatakeyama, Lignin Structure, Properties, and Applications, in: Anonymous (ed.), Biopolymers, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 1-63.
- [8] O.Y. Abdelaziz, D.P. Brink, M.F. Gorwa-Grauslund, Biological valorization of low molecular weight lignin, Biotechnology Advances, Vol. 34, Iss. 8, 2016, pp. 1318-1346. <https://www.sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0734975016301288>.
- [9] P. Schulze, Lignin Separation from Ethanol Water Pulping Liquors, Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems, 2018, .
- [10] S.R. Johnston, L. Boddy, A.J. Weightman, Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi, FEMS Microbiology Ecology, Vol. 92, Iss. 11, 2016, <https://academic.oup.com/femsec/article/92/11/fiw179/2403112>.
- [11] T.D. Bugg, M. Ahmad, E.M. Hardiman, R. Singh, The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 22, Iss. 3, 2011, pp. 394-400. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166910001977>.
- [12] M. Ahmad, C.R. Taylor, D. Pink, K. Burton, D. Eastwood, G.D. Bending, T.D.H. Bugg, Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders, Molecular bioSystems, Vol. 6, Iss. 5, 2010, pp. 815. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567767>.
- [13] G. Fuchs, M. Boll, J. Heider, Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four, Nature Reviews Microbiology, Vol. 9, Iss. 11, 2011, pp. 803-816.

- [14] C.S. Harwood, R.E. Parales, The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity, *Annual Review of Microbiology*, Vol. 50, Iss. 1, 1996, pp. 553.
- [15] O.Y. Abdelaziz, D.P. Brink, J. Prothmann, K. Ravi, M.Z. Sun, J. Garcia-Hidalgo, M. Sandahl, C.P. Hulteberg, C. Turner, G. Liden, M.F. Gorwa-Grauslund, Biological valorization of low molecular weight lignin, *Biotechnology Advances*, Vol. 34, Iss. 8, 2016, pp. 1318-1346.
- [16] B.K. Ahring, R. Biswas, A. Ahamed, P.J. Teller, H. Uellendahl, Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment, *Bioresource Technology*, Vol. 175, 2015, pp. 182-188. <https://www.sciencedirect.com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0960852414015041>.
- [17] R.J. Banu, S. Sugitha, R. Yukes Kannah, S. Kavitha, I.T. Yeom, *Marsilea* spp.—A novel source of lignocellulosic biomass: Effect of solubilized lignin on anaerobic biodegradability and cost of energy products, *Bioresource Technology*, Vol. 255, 2018, pp. 220-228. <https://www.sciencedirect.com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0960852418301172>.
- [18] J.M. Triolo, S.G. Sommer, M.R. Weisbjerg, X.Y. Jiang, H.B. Moller, A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential, *Bioresource Technology*, Vol. 102, Iss. 20, 2011, pp. 9395-9402. <https://www.sciencedirect.com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0960852411009527>.
- [19] D.R. Vardon, M.A. Franden, C.W. Johnson, E.M. Karp, M.T. Guarnieri, J.G. Linger, M.J. Salm, T.J. Strathmann, G.T. Beckham, Adipic acid production from lignin, *Energy and Environmental Science*, Vol. 8, Iss. 2, 2015, pp. 617-628.
- [20] R.D. Perlack, L.M. Eaton, A.F. Turhollow Jr, M.H. Langholtz, C.C. Brandt, M.E. Downing, R.L. Graham, L.L. Wright, J.M. Kavkewitz, A.M. Shamey, US billion-ton update: biomass supply for a bioenergy and bioproducts industry, 2011, .
- [21] M. Janssen, Market potential of biorefinery products, in: Anonymous (ed.), *Systems Perspectives on Biorefineries 2012*, 2012, pp. 26.
- [22] A.J. Ragauskas, G.T. Beckham, M.J. Bidy, R. Chandra, F. Chen, M.F. Davis, B.H. Davison, R.A. Dixon, P. Gilna, M. Keller, P. Langan, A.K. Naskar, J.N. Saddler, T.J. Tschaplinski, G.A. Tuskan, C.E. Wyman, Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery, *Science*, Vol. 344, Iss. 6185, 2014, pp. 709.
- [23] T.H. Kim, J.S. Kim, Y.Y. Lee, A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, Vol. 199, 2016, pp. 42-48. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415011918>.
- [24] D. Salvachúa, E.M. Karp, C.T. Nimlos, D.R. Vardon, G.T. Beckham, Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria, *Green Chemistry*, Vol. 17, Iss. 11, 2015, pp. 4951-4967. <https://www.osti.gov/biblio/1235421>.
- [25] P.C.B. Fernandes, Bioreactor, *Access Science*, 2017, <https://www-accessscience-com.libproxy.tut.fi/content/bioreactor/083975>.



- [26] Xiaopeng Wang, Lu Lin, Junde Dong, Juan Ling, Wanpeng Wang, Hongling Wang, Zhichao Zhang, Xinwei Yu, Simultaneous Improvements of Pseudomonas Cell Growth and Polyhydroxyalkanoate Production from a Lignin Derivative for Lignin-Consolidated Bioprocessing, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 84, Iss. 18, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030226>.
- [27] M. Palazzolo, M. Kurina-Sanz, Microbial utilization of lignin: available biotechnologies for its degradation and valorization, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32, Iss. 10, 2016, pp. 1-9. <https://search.proquest.com/docview/1814287842>.
- [28] T. Zuroff, W. Curtis, Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 93, Iss. 4, 2012, pp. 1423-1435. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278256>.
- [29] Jin Luo, Tapio Lehtinen, Elena Efimova, Ville Santala, Suvi Santala, Synthetic metabolic pathway for the production of 1-alkenes from lignin-derived molecules, *Microbial Cell Factories*, Vol. 18, Iss. 1, 2019, pp. 48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30857542>.
- [30] N. Xie, H. Liang, R. Huang, P. Xu, Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnology advances*, Vol. 32, Iss. 3, 2014, pp. 615-622.
- [31] Z. Xu, P. Lei, R. Zhai, Z. Wen, M. Jin, Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganisms, metabolic pathways, and bio-products, *Biotechnology for Biofuels*, Vol. 12, Iss. 1, 2019, <https://search.proquest.com/docview/2183403454>.
- [32] Bioconversion of lignocellulosic pretreatment effluent via oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069, *Biomass and Bioenergy*, Vol. 72, 2015, pp. 200-205. <https://www-sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0961953414004917>.
- [33] P.D. Sainsbury, E.M. Hardiman, M. Ahmad, H. Otani, N. Seghezzi, L.D. Eltis, T.D.H. Bugg, Breaking Down Lignin to High-Value Chemicals: The Conversion of Lignocellulose to Vanillin in a Gene Deletion Mutant of *Rhodococcus jostii* RHA1, *ACS Chemical Biology*, Vol. 8, Iss. 10, 2013, pp. 2151-2156.
- [34] T. Bugg, R. Rahmanpour, Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals, *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 29, 2015, pp. 10-17. <https://www-sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S1367593115000721>.
- [35] Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renewable Energy*, Vol. 34, Iss. 1, 2009, pp. 1-5. <https://www-sciencedirect-com.libproxy.tuni.fi/science/article/pii/S0960148108001468>.
- [36] G. Zhang, R.D. Tyagi, J. Chen, J. Li, X. Zhang, P. Drogui, X. Dong, Lipid Extraction From Oleaginous Microorganism with Electrochemical Method, *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 120, Iss. 11, 2018, pp. n/a. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201800215>.
- [37] Manothermosonication as a useful tool for lipid extraction from oleaginous microorganisms, in: *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, pp. 216-221.

[38] Ultrasonication assisted lipid extraction from oleaginous microorganisms, in: Bioresource Technology, 2014, pp. 253-261.

[39] Y. Otsuka, M. Nakamura, K. Shigehara, K. Sugimura, E. Masai, S. Ohara, Y. Katayama, Efficient production of 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid as a novel polymer-based material from protocatechuate by microbial function, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 71, Iss. 5, 2006, pp. 608-614.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322989>.

[40] A.F. Billings, J.L. Fortney, T.C. Hazen, B. Simmons, K.W. Davenport, Genome sequence and description of the anaerobic lignin-degrading bacterium *Tolumonas lignolytica* sp. nov. Standards in Genomic Sciences, Vol. 10, 2015, [https://search-proquest-](https://search-proquest-com.libproxy.tuni.fi/docview/1772049111/citation/91E50462AAAE44E2PQ/1?accountid=14242)

[com.libproxy.tuni.fi/docview/1772049111/citation/91E50462AAAE44E2PQ/1?accountid=14242](https://search-proquest-com.libproxy.tuni.fi/docview/1772049111/citation/91E50462AAAE44E2PQ/1?accountid=14242).