

UDK: 630*813.11

Modela nastanka ligninskega polimera

Models of formation of lignin polymer

avtorji **Jožica GRIČAR, Primož OVEN, Katarina ČUFAR**, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina, Cesta VIII/34, SI-1000 Ljubljana, SLO

izvleček/Abstract

V članku sta opisana dva modela nastanka ligninske makromolekule. Model naključnega povezovanja predpostavlja nastanek lignina s slučajnostnim povezovanjem fenolnih monomernih radikalov z ligninskim polimerom. Po modelu proteinskega usmerjanja proces ligninske polimerizacije v celoti vodijo specifični usmerjevalni proteini, ki vodijo nastanek posameznih vezi. Navedene so kritične sodbe in znanstvena mnenja o obeh modelih.

In paper, two models of formation of lignin macromolecule are described. Random coupling model suggests lignin formation process through coupling of monomer radicals to growing lignin polymer in a near-random fashion. According to the dirigent protein model, process of lignin polymerization is fully controlled by specific dirigent proteins that direct formation of individual bonds. Critical judgments and scientific opinions of both models are given.

Ključne besede: lignin, biosinteza, modeli, lignani, radikalno povezovanje, usmerjevalni proteini

Keywords: lignin, biosynthesis, models, lignans, radical coupling, dirigent proteins

Lignin in lignifikacija

Proces lignifikacije zajema biosintezo monolignolov, njihov transport v celično steno ter polimerizacijo fenil propanskih molekul v končno makromolekulo lignina (Hatfield in Vermerris 2001). V energijsko zelo potratnem biosinteznem procesu nastane heterogeni ligninski polimer z visokim razmerjem C/H in C/O, kar se odraža v visoki kalorični vrednosti (Boudet 2000). Lignin je mogoče definirati s kemijskega stališča (kemijska zgradba) ali funkcijskega, ki poudari njegovo vlogo v rastlinskem tkivu. Kemijsko gledano je lignin fenolni polimerni material, sestavljen iz treh cinamil alkoholov oziroma monolignolov: p-kumaril, koniferil ter sinapil alkoholov, ki se razlikujejo po številu metoksi skupin (slika 1) (Adler 1977, Freudenberg in Sidhu 1961, Fengel in Wegener 1989, Sakakibara 1991, Dence in Lin 1992, Terashima 2000). Poleg tega so v ligninski polimer vključene tudi druge komponente, npr. hidroksi cinamil aldehidi, hidroksi cinamil acetati, hidroksi cinamil p-hidroksibenzoati, hidroksi cinamil p-kumarati, hidroksi cinamatni estri itd. (Sederoff in sod. 1999, Boudet 2000, Hatfield in Vermerris 2001, Raes in sod. 2003). Ker tridimenzionalni ligninski polimer nima pravilno razvrščenih in ponavljajočih se enot, je mogoče njegovo kompleksno strukturo predstaviti le z

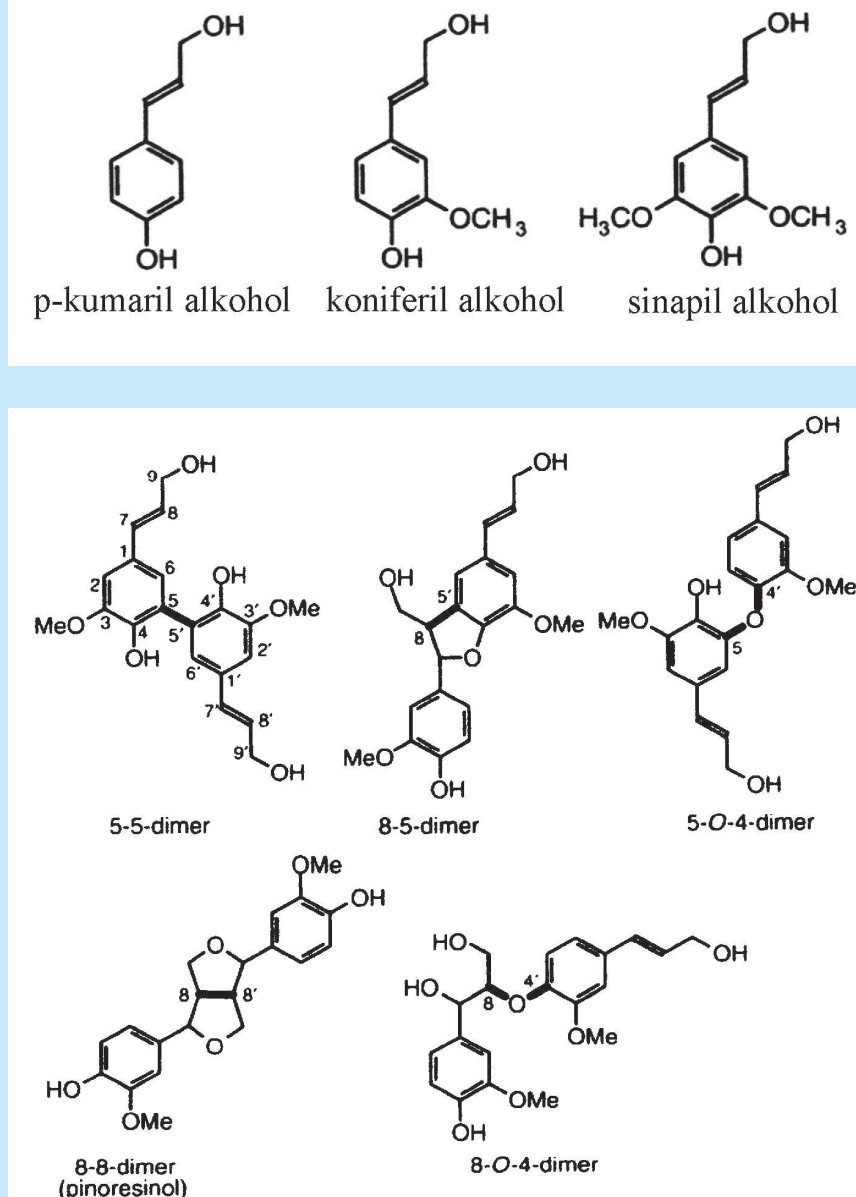
modeli. S funkcijskega stališča daje hidrofobni lignin rastlinski celici ustrezno mehansko trdnost, zaradi hidrofobnih celičnih sten omogoča transport vode v vaskularnih celicah, preprečuje degradacijo polisaharidov itd. (Ralph in sod. 1998, Boudet 2000, Önnerud in sod. 2002, Raes in sod. 2003). Monolignoli se z rastočim oligomerom (polimerom) oksidativno povezujejo prek radikalov in tvorijo različne vezi (slika 1b). V nativnih ligninih so najpogostejše 8-O-4 vezi (50-70 %), pri ligninih, pridobljenih in vitro z mešanjem koniferil alkohola, vodikovega peroksida ter peroksidaze, pa 8-8 in 8-5 vezi. Trenutno obstajata dve teoriji oziroma modela, ki skušata razložiti nadzor in združevanje radikalov ter s tem nastanek ligninske makromolekule (Adler 1977, Fengel in Wegener 1989, Guan in sod. 1997, Ralph in sod. 1998, Lewis 1999, Boudet 2000, Burlat in sod. 2001, Donaldson 2001, Hatfield in Vermerris 2001, Rouhi 2001).

Prvi model, sprejet že v 50 letih prejšnjega stoletja, je model naključnega povezovanja (ang. "random coupling model"). Model predpostavlja nastanek lignina z naključnim povezovanjem fenolnih monomernih radikalov z rastočim ligninskim polimerom. Količina in tip fenolnih monomerov razpoložljivih na mestu lignifikacije ter njihovo radikalno povezovanje je

kemijsko nadzorovano. Radikale tvorijo oksidacijski encimi (peroksidaze, druge oksidaze) (Fengel in Wegener 1989, Hatfield in Vermerris 2001, Rouhi 2001). Drugi model, ki je novejši in se je pojavil ob koncu devetdesetih let prejšnjega stoletja, je model proteinskega usmerjanja (ang. "*dirigent protein model*"). Proces ligninske polimerizacije v celoti vodijo specifični usmerjevalni (dirigentni) proteini z usmerjanjem nastanka posameznih vezi (slika 1). Glavni zagovorniki te teorije Lewis, Davin in Sarkanen (Gang in sod. 1999, Lewis 1999, Davin in Lewis 2000) so prepričani, da narava ne bi prepustila oblikovanja tako pomembne makromolekule, kot je lignin, zgolj naključju in da mora pri nastanku lignina iz monolignolov obstajati podoben biokemični nadzor, kot je pri lignanih.

Model naključnega povezovanja

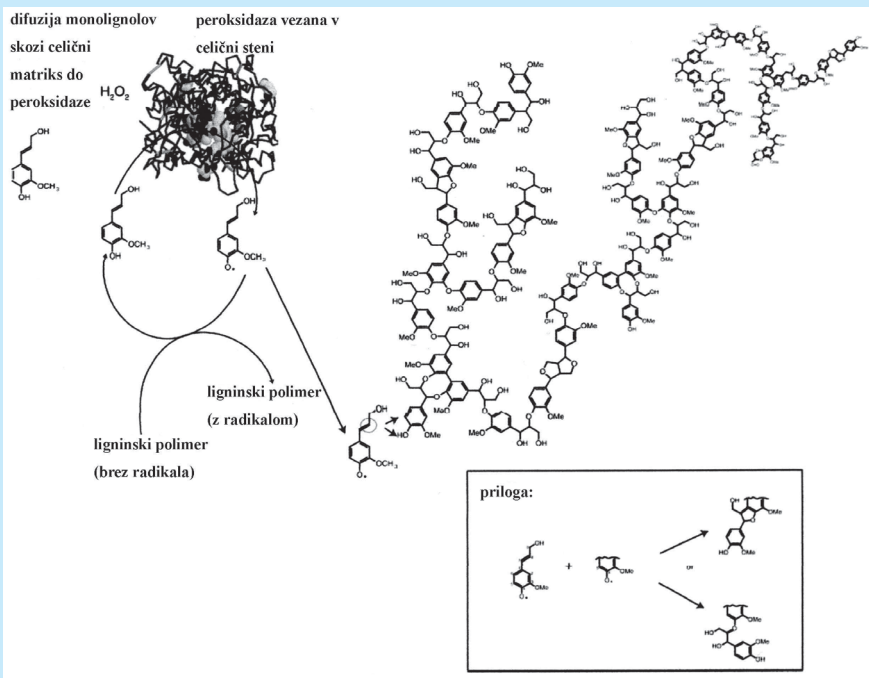
Do razlik med razporeditvijo vezi pri in vitro ter in vivo ligninih naj bi prišlo zaradi neke vrste usmerjanega povezovanja pri slednjih. Pri in vitro sistemu navkljub poskusom počasnega dodajanja monolignolov rastočemu polimeru prevladuje dimerizacija monomerov (Hatfield in Vermerris 2001). Situacija ne posnema dejanskega nastanka lignina in vivo, kjer je proces odvisen od monolignolov, ki vstopijo v stenski matriks in nato difundirajo do mesta inkorporacije. Stenski matriks naj bi vplival na oblikovanje lignina (Guan in sod. 1997, Hatfield in Vermerris 2001). Odlaganje lignina v celični steni se najprej prične v združenih srednjih lameli v številnih posamičnih mestih in se nadaljuje z dodajanjem potoligninskih monomerov rastočim ligninskim molekulam. V sekundarni celični steni lignifikacija poteka z odlaganjem protoligninskih monomerov v smeri celuloznih mikro-



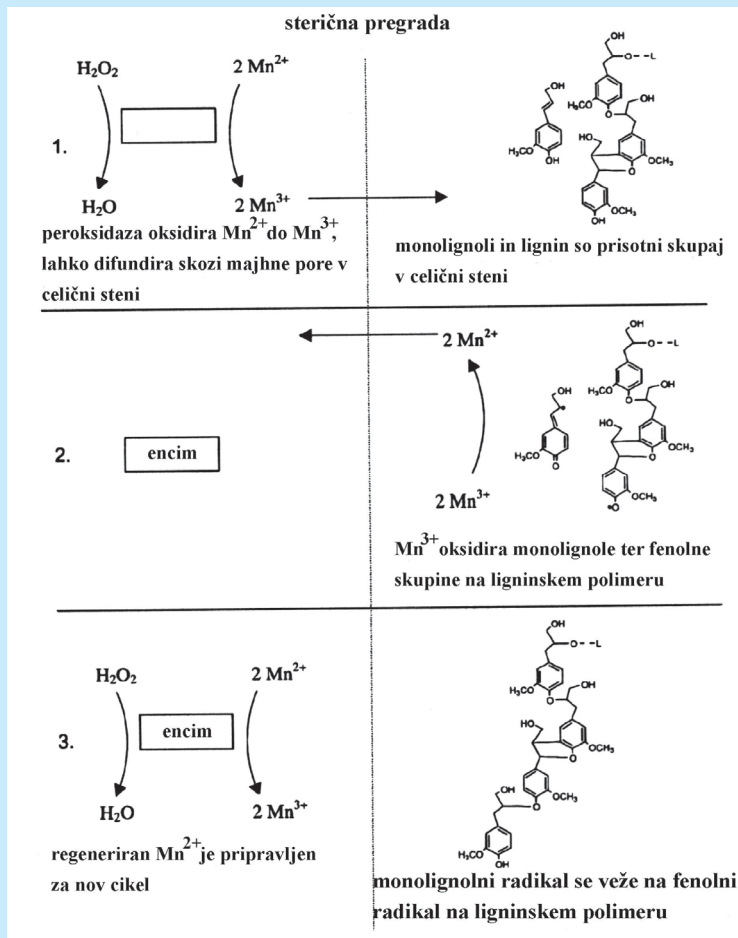
□ Slika 1. Glavni trije monolignoli v nativnih ligninih in potencialni dimeri, ki bi jih usmerjevalni proteini morali tvoriti (Hatfield in Vermerris 2001)

fibril, ki fizično omejujejo odlaganje lignina v prečni smeri (Donaldson 1994, 2001). Ligninska polimerizacija iz zunanjih predelov celične stene proti lumnu oziroma plazemski membrani naj bi omogočila citoplazmi nadzor nad zgradbo lignina ter njegovo monomerno sestavo v različnih slojih celične stene (Burlat in sod. 2001). Porazdelitev vezi pri in vitro ligninih sintetiziranih s polisaharidi ali brez njih je raz-

lična. Z nadzorovanjem stopnje difuzije kot potencialne vloge celičnega matriksa le-ta vpliva na oblikovanje lignina s postopnim povezovanjem monolignolov z rastočim polimerom. Lignin naj bi po tej teoriji nastal predvsem s kontinuiranim dodajanjem monolignolov rastočemu polimeru, ne pa s povezovanjem monolignolov v dimere, kakor to predpostavlja model proteinskega usmerjanja. Z dimerizacijo ko-



□ Slika 2. Shema nastanka lignina po modelu naključnega povezovanja (Hatfield in Vermerris 2001)



□ Slika 3. Shema ligninske polimerizacije, modificirana po Westermarkovi (1982, Önnerrud in sod. 2002)

niferil alkoholov naj bi nastal bodisi 8-8 dimer (pinoresinol) ali pa dimer z nenasičeno stransko verigo (8-5 ali 8-O-4 dimer). Pri iglavcih vsi ti dimeri skupaj predstavljajo največ 6 % lignina. Po Adlerju (1977) pa okrog 95 % lignina ne nastane iz dimerizacijskih reakcij. Doslej identificirani usmerjevalni proteini, ki so jih določili, naj bi le uravnavali povezovanje monolignolov v dimere. Po modelu naključnega povezovanja tip ter količino monolignolov na mestu lignifikacije nadzorujejo oblikovanje lignina (Sederoff in sod. 1999, Hatfield in Vermerris 2001). Ta model predpostavlja difuzijo monolignolov in vodikovega peroksida skozi stenski matriks do encimov (peroksidaze, druge oksidaze in lakaze) kot katalizatorjev, pri čemer nastane monolignolni radikal. Novo nastali radikal potem najprej difundira do ligninskega polimera, kjer se z radikalom poveže na polimer (slika 2). V primeru, da na ligninskem polimeru ni radikala, monolignolni radikal prenese svoje visoko oksidacijsko stanje na polimer in prosto difundira nazaj do encimov, kjer pride do ponovne oksidacije in nato do nastanka nove ligninske vezi (Hatfield in Vermerris 2001).

Westermark (1982) in kasneje Önnerrud in sod. (2002) so predlagali nekoliko drugačen koncept kemijsko nadzorovane ligninske polimerizacije, kjer encimi niso v neposrednem stiku z ligninskimi monomeri. Po Westermarkovi (1982) naj bi bil primarni oksidant za fenolne skupine na ligninu in monolignolih kompleks Ca_2+ in superoksidnega aniona, ki naj bi ga tvoril redoks encim. Önnerrud in sod. (2002) so sintetizirali ligninske oligomere, pri čemer se je manganov oksalat najprej oksidiral iz Mn(II) v Mn(III) s peroksidazo, nato pa se ponovno reduciral do Mn(II) s simultano oksidacijo ligninskih monomerov do radikalov med

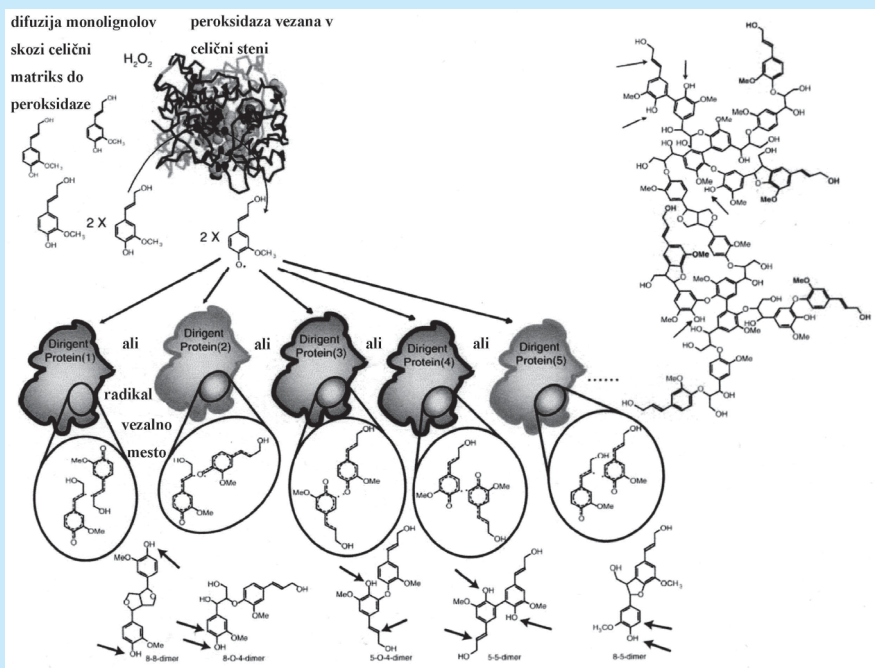
seboj povezanih s kovalentnimi vezmi (slika 3). Manganove peroksidaze so sprožile polimerizacijo monolignolov brez neposrednega stika med encimom in monolignolom. Mn(II) oksalat naj bi rabil kot nekakšen nosilec redoks potenciala. Uporabljena manganova peroksidaza je encim gliv, vpletenih v biodegradacijo lignina. Obstoj takšnih encimov v rastlinah ni potrjen. V poskusu so ugotovili, da je prišlo do polimerizacije lignina z mehanizmom radikalskega prenosa. Manganov ion naj bi bil zelo verjeten za radikalski nosilec, saj je eden najobilnejših kovinskih ionov v lesu in je porazdeljen dokaj homogeno v lesnih celicah (Önnerud in sod. 2002). Možni kandidat je tudi superoksidni anion v kompleksu s kalcijevim ionom, verjetni pa so še drugi kovinski ioni kakor tudi organske molekule (Westermarck 1982, Önnerud in sod. 2002).

Model proteinskega usmerjanja

Po teoriji proteinskega usmerjanja je edina razlaga za visok delež 8-O-4 vezi v ligninu prisotnost specifičnih usmerjevalnih proteinov. Usmerjevalni proteini naj ne bi bili katalitsko aktivni med biosintezo lignanov, pač pa naj bi zgolj usmerjali povezovanje dveh monomernih radikalov in s tem tvorili dimere z enojno regio- in stereo- konfiguracijo, iz česar naj bi nastali optično aktivni produkti (Lewis 1999, Davin in Lewis 2000). Lignanom in ligninom so skupni zgoraj omenjeni prekurzorji, sicer pa so njihove fiziološke vloge različne. Heterogeni lignini so strukturne komponente celičnih sten vaskularnih tkiv, medtem ko so lignani vključeni v različne obrambne mehanizme rastlin in imajo lahko antioksidativne, protivirusne, bakteriocidne, antifungicidne in citotoksične lastnosti (Davin in Lewis 2000, Burlat in sod. 2001). Lignani so navadno optično aktivni. Vplivajo lah-

ko na trajnost rastlinskega tkiva, barvo in kvaliteto. Lignani so tipični dimeri (pogoste 8-8 vezi, ravno tako 8-5 in 8-O-4 vezi), pa tudi višji oligomeri (Gang in sod. 1999, Ralph in sod. 1998, Burlat in sod. 2001, Rouhi 2001). Lewis (1999) se zaveda, da so lignini in lignani produkti različnih metabolnih poti. Vendar pa bi moral biti njihov biokemizem podoben, glede na to, da tudi pri drugih procesih, kjer delujejo enaka načela proteinske kemije, iz identičnih monomerov nastanejo mnogovrstni produkti. Donaldson (1994, 2001) je pri ultrastrukturnem proučevanju lignificirajočih celičnih sten traheid pri boru *Pinus radiata* zasledil, da se odlaganje lignina prične v številnih diskretnih mestih, najbolj oddaljenih od plazemske membrane v diferencirajoči se celični steni. Lignifikacija se je končala z dodajanjem ligninskih monomerov rastočim ligninskim delcem, dokler se niso združili. Ligninska biosinteza se je pri boru *Pinus radiata* začela v bližini prvotne celične plošče v združenih srednji lameli. Začetna mesta je bilo v kasnejših fazah lignifikacije zaslediti tudi v primarni in sekundarni celični steni (Donaldson 1994). Na podlagi teh spoznanj so Gang in sod. (1999) skleпали, da je nadzor ligninske biosinteze v bližini teh diskretnih mest začetek odlaganja lignina. Začetek ligninske polimerizacije bi lahko bil nadzorovan z razporeditvijo monolignolnih ali oligolignolnih radikalskih vezalnih mest, ki naj bi določala monomerno sestavo in zaporedje povezav med enotami (Gang in sod. 1999, Sederoff in sod. 1999). Ta mesta naj bi nastala v celični steni med oblikovanjem primarne celične stene. Takšno prostorsko in časovno lokalizacijo v nastajajoči celični steni naj bi bilo zaslediti tudi za številne proteine (Gang in sod. 1999, Lewis 1999). Skozi podoben osnovni mehanizem, odgovoren za regio- in stereo- specifično mo-

nolignolno radikalsko povezovanje pri biosintezi lignanov, naj bi razporejeni usmerjevalni proteini usmerjali tudi primarno strukturo zmetka ligninske verige. Med nastankom ligninov in lignanov naj bi bila ključna konceptualna razlika: usmerjevalni proteini naj bi pri ligninih usmerjali nastanek makromolekulske konfiguracije za razliko od usmerjevalnih proteinov, vključenih v nastanek dimernih lignanov. Ko je zametek ligninske verige oblikovan, le-ta ne more difundirati stran od dirigentnih mest, pač pa se z dehidrogenativno vključitvijo ustreznih monolignolov v t.i. "šablonski polimerizaciji" replicira (Guan in sod. 1997, Gang in sod. 1999). Do sedaj so odkrili številne gene, ki nosijo zapis za te proteine v različnih rastlinah (Lewis 1999, Davin in Lewis 2000). Vendar pa so le pri enem izmed določenih proteinov uspeli dokazati njegovo aktivnost predvsem pri tvorbi 8-8 dimera (pinoresinola) (Lewis 1999). Protein, ki bi usmerjal nastanek najpogostejših 8-O-4 vezi med monolignoli v ligninu, zaenkrat ni poznan. Ravno tako ni nobenega dokaza o obstoju proteinov, ki bi usmerjali oblikovanje lignina. Če bi bilo povezovanje radikalov v procesu lignifikacije resnično biokemično usmerjano s proteini, bi po tej teoriji moral za vsako vez med dvema monolignoloma in rastočim ligninskim polimerom obstajati specifični usmerjevalni protein (slika 4). Za vse vezi v ligninu, vključno z monolignoli, bi potem potrebovali več kot 50 proteinov (Hatfield in Vermerris 2001). Ko je začetni polimer lignina že oblikovan, naj bi le-ta deloval kot šablona za radikale, nastale iz monolignolov, ki bi se polimerizirali, in tvorijo ligninsko verigo (Guan in sod. 1997, Gang in sod. 1999, Burlat in sod. 2001). Prepis primarne ligninske verige s šablonsko polimerizacijo naj bi omogočal ligninu rast iz zunanjšega področja celične stene



□ Slika 4. Shema nastanka lignina po modelu proteinskega usmerjanja (Hatfield in Vermerris 2001)

ali nad stopnjo nastajanja radikalov (Ralph in sod. 1998, Hatfield in Vermerris 2001). S tem naj bi rastlina sama usmerjala proces lignifikacije celičnih sten, kar je z metabolnega stališča tudi bolj smiselno. Hatfield in Vermerris (2001) dvomita, da bi rastlina tako skrbno nadzorovala strukturo lignina z usmerjevalnimi proteini namesto s preprostim kemijskim nadzorom. Proteinski nadzor bi zahteval nenehno tvorbo različnih prekurzorjev, kar bi bilo za rastlino potratno (Sederoff in sod. 1999). Znanstvenika (Hatfield in Vermerris 2001) menita, da bi oblikovanje lignina z naključnim in neurejenim povezovanjem enot za rastlino pomenilo prednost pri obrambi pred patogenimi organizmi, saj ravno zaradi tega glive in insekti niso sposobni razviti hidrolitskih encimov za njihovo degradacijo.

proti plazmalemi, čeprav o tem ni nobenih dokazov (Sederoff in sod. 1999). Če je t.i. "šablonska hipoteza" pravilna, bi moral iz dodanega homopolimera *in vitro* sistemu nastati sintetični ligninski polimer, sestavljen le iz enega monolignola z enim tipom vezi oziroma vsaj s polimerom s kratkimi ponavljajočimi se enotami. Dodajanje različnih tipov monolignolov na sam sistem ne bi smelo vplivati, saj bi šablona morala izbrati le monolignol, iz katerega bi nastal izvorni homopolimer (Rouhi 2001, Hatfield in Vermerris 2001).

Primerjava obeh teorij

Po drugi teoriji naj bi bilo torej nastajanje lignina z vodenjem usmerjevalnih proteinov visoko stereo- in regio- nadzorovana sinteza z optično aktivnimi enotami. Vendar pa številni fragmenti iz naravnih ligninov ne kažejo nobene optične aktivnosti (Ralph in sod. 1998, Sederoff in sod. 1999). Torej bi morala obstajati še druga sku-

pina usmerjevalnih proteinov z nasprotno stereo- in regio- specifičnostjo, s čimer bi nastala racematna zmes oziroma racemat med seboj povezanih produktov v ligninski molekuli (Ralph in sod. 1998, Lewis in Davin 2000). Za vse vezi v ligninu bi tako rastlina potrebovala kar dvakrat več usmerjevalnih proteinov, kar bi lahko pomenilo prednost pri obrambni funkciji. Alternativno bi lahko v okviru šablonske hipoteze naslednji polimer kazal natančno nasprotno optično aktivnost, s čimer bi nastala racematna zmes (Gang in sod. 1999, Lewis 1999, Lewis in Davin 2000). Po Lewisu (1999) specifična povezava med dvema monomeroma (8-O-4) kaže na regioselektivnost, ki ne more biti pojasnjena s staro teorijo. Drugi trdijo, da je regioselektivnost mogoče doseči v kemijskem sistemu (Sederoff in sod. 1999, Hatfield in Vermerris 2001, Rouhi 2001). Selektivnost zahteva le rastlinski skrbni nadzor nad preskrbo z monomeri (vključno z encimi) v lignificirajočem se območju celične stene in/

Teorija specifičnih usmerjevalnih proteinov je kljub pomanjkanju neposrednih dokazov o resničnem nadzoru proteinov na kemijsko strukturo že omenjena v novejših knjigah (npr. Taiz in Zeiger 2002). Temu rastlinski fiziolog Hatfield (Rouhi 2001) ostro nasprotuje, saj naj bi ljudje s pomanjkljivim znanjem biokemije in kemijske zgradbe celične stene te teorije ne jemali enakovredno stari teoriji, pač pa sprejeli kot novo teorijo. Proces oblikovanja lignina po prvi teoriji naj ne bi zahteval popolnega nadzora, saj je mogoče s tipom monolignola ter dodajanja monolignolov rastočemu polimeru brez težav razložiti strukturne lastnosti lignina. Pri sintezi monolignolov ter njihovem transportu v celično steno naj bi obstajal metabolni nadzor. Modela naključnega povezovanja kljub novim ugotovitvam ter teorijam zaenkrat ni mogoče ovreči. Zanimivo je, da so različna tkiva v rastlini sposobna doseči razlike v sestavi lignina. Ali je to rezultat različne ekspresije ligninskih biosinteznih genov, nadzora nad transpor-

tom monolignolov skozi citoplazmo ali nadzora nad kemijskimi pogoji v celični steni, zaenkrat ni mogoče odgovoriti. Proteinsko dirigentna teorija je zanimiva hipoteza, vendar pa so za njeno dokončno potrditev in sprejetje potrebni ključni eksperimentalni dokazi za potrditev vloge usmerjevalnih proteinov pri oblikovanju ligninskih polimerov. Brez dokazov pa je razširitev lignanske dirigentno proteinske teorije na lignine brezpredmetna. Doslej znani rezultati kažejo na to, da je lignin prej produkt kemijsko ne pa biokemijsko nadzorovanih reakcij radikalnega povezovanja. Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo mogoče razložiti dejansko vlogo usmerjevalnih proteinov, ki je lahko dosti širša kot le oblikovanje lignanov. V celični steni je na stotine proteinov, katerih funkcija ni poznana, zato bi za resnično vpletenost proteinov bilo treba dokazati nujnost in zadostnost določenega proteina za specifičen korak v procesu lignifikacije. Rastline so več kot očitno razvile zelo prefinjen proces oblikovanja ligninskih polimerov brez neposrednega strukturnega nadzora in ne le z natančnim uravnavanjem dovoda monolignolov do mest lignifikacije (Ralph in sod. 1998, Sederoff in sod. 1999, Hatfield in Vermerris 2001, Rouhi 2001).

□

literatura

1. **Adler E. 1977.** Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Science and Technology*, 11: 169-218
2. **Boudet A.M. 2000.** Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 1/2: 81-96
3. **Burlat V., Kwon M., Davin L.B., Lewis N.G. 2001.** Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry*, 57: 883-897
4. **Davin L.B., Lewis N.G. 2000.** Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 123: 453-461
5. **Dence C.W., Lin S.Y. 1992.** Introduction. V: *Methods in lignin chemistry*. Lin S.Y., Dence C.W. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 3-19
6. **Donaldson L.A. 1994.** Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Science and Technology*, 28: 111-118
7. **Donaldson, L.A., 2001.** Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57: 859-873
8. **Fengel D., Wegener G. 1989.** *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, Walter de Gruyter: 613 str.
9. **Freudenberg K., Sudhu G.S. 1961.** Zur Kenntnis des Lignins der Buche und der Fichte. *Holzforschung*, 15: 33-39
10. **Hatfield R., Vermerris W. 2001.** Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, 126: 1351-1357
11. **Gang D., Costa M.A., Fujita M., Dinkova-Kostova A.T., Wang H.-B., Burlat V., Martin W., Sarkanen S., Davin L.B., Lewis N.G. 1999.** Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 6, 3: 143-151
12. **Guan S.-Y., Mlynár J., Sarkanen S. 1997.** Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol on macromolecular lignin templates. *Phytochemistry*, 45, 5: 911-918
13. **Lewis N.G. 1999.** A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 153-162
14. **Önnerud H., Zhang L., Gellerstedt G., Henriksson G. 2002.** Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell*, 14: 1953-1962
15. **Ralph J., Hatfield R.D., Sederoff R.R., MacKay J.J. 1998.** Order and randomness in lignin and lignification: is a new paradigm for lignification required? *Research Summaries, US Dairy Forage Research Center*: 39-41
16. **Rouhi A.M. 2001.** Only facts will end lignin war. Data, not verbiage, will determine if new lignin biosynthesis model will prevail. *Chemical and Engineering News*, 2: 52-56
17. **Sakakibara A. 1991.** Chemistry of lignin. In: David N.-S.Hon, Shiraishi N. (ed) *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York: 113-175
18. **Sederoff R.R., MacKay J.J., Ralph J., Hatfield R.D. 1999.** Unexpected variation in lignin. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 145-152
19. **Taiz L., Zeiger E. 2002.** *Plant physiology*. Third edition. Sinauer Associates, Inc, Publishers, Sunderland, Massachusetts: 690 str.
20. **Terashima N. 2000.** Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. V: *New horizons in wood anatomy. Proceedings of the 4th. Pacific Regional Wood Anatomy Conference*. Kim Y.S. (ed). Kwangju, Korea, Chonnam National University Press: 169-180
21. **Westermarck U. 1982.** Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical - a possible lignification reaction in wood. *Wood Science and Technology*, 16: 71-78