

## Capítol 12

### **Recerca de mediadors naturals produïts durant el creixement *P. cinnabarinus* sobre la fusta. Aplicació a la pasta d'eucaliptus**

#### **RESUM**

El basidiomicet *P.cinnabarinus* té la capacitat de créixer sobre la fusta de Pi i degradar-ne la lignina de manera natural. Aquest fong produeix la lacasa al medi extracel·lular i es creu que podria degradar la lignina mitjançant un sistema lacasa-mediador natural ja que algunes substàncies produïdes durant la biodegradació de la lignocel·lulosa o durant el metabolisme secundari dels fongs podrien actuar com a mediadors naturals. En aquest treball s'avalua la presència d'aquestes substàncies en un cultiu del fong sobre la fusta de pi, aplicant el sobrenedant del cultiu sobre la pasta d'eucaliptus en una seqüència XLE. Els resultats demostren que l'índex kappa disminueix lleugerament mentre que no es veuen efectes en la blancor. Per aquest motiu, cal identificar per LC-MS, GC-MS els possibles productes fenòlics en el sobrenedant que puguin actuar com a mediadors naturals sobre la pasta.

#### **12.1 INTRODUCCIÓ**

Les lacases són oxidoreductases ligninolítiques les quals per si soles només poden actuar sobre les fraccions fenòliques de la lignina però en presència d'alguns compostos sintètics com l'ABTS, l'HBT o l'NHA que actuarien de mediadors redox, es pot ampliar la seva acció als substrats no fenòlics. Existeixen alguns estudis que confirmen el potencial de l'anomenat sistema lacasa-mediador per a blanquejar diferents tipus de pastes (Bourbonnais i Paice, 1995; Nelson *et al.*, 1998; Sealey i Ragauskas, 1998; Garcia *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2004). De tota manera, varis aspectes han de ser solucionats abans de la seva implantació industrial. Entre ells, l'elevat cost dels mediadors sintètics i els possibles problemes de toxicitat d'alguns dels mediadors (com els compostos N-OH) i dels seus productes de reacció.

Una manera de solucionar aquest problema podria ser l'ús de mediadors naturals (potencialment barats i no contaminants). De fet, la capacitat dels fongs de la

podridura blanca que només secreten lacases com enzims oxidatius i la importància d'aquests enzims en la degradació de la fusta sembla indicar la presència d'un sistema lacasa-mediador d'origen natural. El paper dels radicals lliures que resulten de l'oxidació dels mediadors sintètics per la lacasa en l'oxidació dels sistemes lacasa-mediador dóna suport a la suposició que els substrats típics de la lacasa que formen radicals poden també reaccionar com a possibles mediadors. Compostos involucrats en la degradació natural de la lignina pels fongs de la podridura blanca podrien ser produïts a causa de l'oxidació de la lignina o directament del metabolisme secundari dels fongs (Eggert *et al.*, 1996 (b); Johannes i Majcherczyk, 2000).

Entre els fongs de la podridura blanca, el fong *Pycnoporus cinnabarinus* (un basidiomicet obtingut de la putrefacció del pi), representa un bon candidat per a estudiar-ne la degradació de la lignina ja que presenta gran habilitat per a degradar-la eficientment i a més posseeix un sistema ligninolític senzill ja que produeix lacasa però no produeix ni lignina peroxidasa ni manganès peroxidasa (Eggert *et al.*, 1996 (a)).

L'àcid 3-hidroxiantranílic de *P.cinnabarinus* va ser el primer mediador natural de la lacasa descrit (Eggert *et al.*, 1996 (b)) tot i que el seu paper en la biodegradació de la lignina no ha estat confirmat (Li *et al.*, 2001) i l'existència d'altres mediadors fúngics ha estat també proposada (Gutiérrez *et al.*, 1994). Johannes i Majcherczyk, (2000) comenten que alguns compostos, ja sigui produïts pel fong o bé presents durant la biodegradació dels substrats de la lignocel·lulosa, actuen de mediadors per a oxidació d'hidrocarburs aromàtics policíclics en la lacasa de *Trametes versicolor*. Recentment, varis compostos fenòlics derivats de la lignina han estat descrits com a mediadors eficients per a decolorar diferents tipus de colorants utilitzant la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (Camarero *et al.*, 2005). Camarero *et al.*, (2007) van estudiar per primera vegada la deslignificació i blanqueig de la pasta de paper utilitzant alguns d'aquests compostos fenòlics naturals i Gutiérrez *et al.*, (2007) demostren també per primera vegada l'eliminació de compostos lipofílics de la pasta utilitzant aquests compostos com a mediadors naturals de la lacasa.

L'objectiu d'aquest capítol és fer créixer *P.cinnabarinus* sobre la fusta de pi per a què aquest creixi i degradi la lignina de manera natural i seguidament aplicar el sobrenedant del cultiu a la pasta d'eucaliptus. Si la pasta d'eucaliptus es deslignifica voldrà dir que hi ha algun producte dins dels lleixius que haurà actuat com a mediador natural. Posteriorment cal dur a terme un estudi analític mitjançant una combinació de cromatografia líquida, cromatografia de gasos i espectrometria de masses (LC-MS, GC-MS) per tal d'identificar el possible mediador.

## 12.2 MATERIALS I MÈTODES

### 12.2.1 Incubació del fong amb la fusta

La fusta utilitzada han estat birutes de Pi Marítim subministrades pel CTP (Grenoble, França), a la Figura 12-1 (a) es mostra una fotografia d'una plantació de pi. El microorganisme utilitzat per a que creixi sobre les birutes de pi marítim ha estat el fong *Pycnoporus cinnabarinus*, ja que aquest fong creix de manera natural sobre els arbres tal com es mostra a la Figura 12-1 (b).



**Figura 12-1. Plantació de pi (a) i el fong *pycnoporus cinnabarinus* creixent sobre un tronc (b)**

A partir d'una placa de petri amb la soca monocariòtica hiperproductora ss3 de *P. cinnabarinus* s'ha realitzat un precultiu del fong en un medi especial de lacases per a què produeixi el miceli. El medi conté (en g l<sup>-1</sup>): maltosa (20), extracte de llevat (1), tartrat disòdic (2,3), tartrat diamònic (1,842), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,33), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,07), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,046), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,035), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,007) i solució de vitamines (1mL l<sup>-1</sup>). La incubació es du a terme a 30°C durant 12 dies, en vials que contenen 200 mL de medi i 5 porcions del cultiu de *P. cinnabarinus*. S'utilitzen 4 vials.

Passats els 12 dies es recuperen els quatre micelis filtrant-los mitjançant un embut i una malla, s'hi afegeixen 200 mL d'aigua estèril i els micelis es lisen mitjançant un mesclador ultratòrax (13000 rev min<sup>-1</sup>). Es preparen 3 erlenmeyers de 2 litres i en cadascun s'hi afegeix: 80 mL del miceli del fong triturat, 100 mL de medi de cultiu

estèril de *P.cinnabarinus* descrit anteriorment i 45 grams humits de birutes estèrils de Pi Marítim (que corresponen aproximadament a 20 grams secs). Es deixen incubar a l'estufa a 30°C amb agitació contínua de 120 rev min<sup>-1</sup> durant 23 dies.

Una vegada passats els 23 dies d'incubació, es premia el contingut dels 3 erlenmeyers amb una premsa a una pressió de 15 bars i es recupera el sobrenedant del cultiu del qual se'n mesura el pH final i l'activitat lacasa. Aquest sobrenedant és el que s'aplicarà directament sobre la pasta com una etapa L per tal de veure si conté mediadors naturals.

L'activitat de la lacasa es determina mesurant l'oxidació del 5mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic àcid) (ABTS) amb el tampó tartrat de sodi 50mM pH4 a 30°C durant 30 segons. La formació del catió radical de l'ABTS és monitoritzat a 420 nm ( $\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una unitat d'activitat enzimàtica és definida com la quantitat d'enzim que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de substrat per minut.

### 12.2.2 Aplicació a la pasta d'eucaliptus

Per tal de veure si hi ha algun producte en el sobrenedant que pugui ser capaç d'actuar com a mediador natural, aquest s'aplica com a etapa L en la pasta d'eucaliptus i si hi ha un augment de la deslignificació o de la blancor de les pastes en comparació amb el blanc, voldrà dir que hi ha algun producte en el sobrenedant que actua com a mediador natural.

S'han realitzat dues seqüències de blanqueig:

- XL<sub>0</sub>E: seqüència corresponent al blanc
- XLE

La metodologia seguida s'indica a continuació.

#### 12.2.2.1 Matèria prima

La pasta utilitzada ha estat pasta crua kraft d' *Eucalyptus globulus*, produïda a la fàbrica ENCE (Pontevedra, Espanya) amb un índex kappa d' 11,8 i una blancor del 41,3 %ISO.

#### 12.2.2.2 Etapa de pretractament enzimàtic (X)

La xilanasa utilitzada (Pulpzyme HC) ha estat subministrada per NOVOZYMES® i presenta una activitat de 332 U/mL, on una unitat d'activitat enzimàtica és definida

com la quantitat d'enzim que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sucre reductor (mesurat com a equivalents de xilosa) de xilà per minut a 50°C i pH 5.

Els pretractaments amb xilanasa (X) es realitzen sobre 10 gps (grams de pasta seca), amb 3 U/gps de xilanasa, al 5 % de consistència i pH 4 (ajustat amb tampó tartrat de sodi 50 mM), 0,1 % de tween 20, a 50°C i durant 2 hores amb agitació.

Després del tractament amb xilanasa es filtra la pasta i es recuperen els lleixius.

#### **12.2.2.3 Etapa de tractament amb el sobrenedant (L)**

El tractament L es realitza sobre 10 gps, amb 20 U/gps de lacasa al 5 % de consistència, pH 4 (s'ajusta el sobrenedant a pH 4 amb HCl), 0,1 % de tween 20, a 50°C i durant 4 hores amb agitació i a 100 KPa de pressió d'O<sub>2</sub>.

La lacasa que s'afegeix és la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* produïda per l'INRA (Marsella, França) de la soca monocariòtica hiperproductora ss3, amb una activitat d'1,95 U/mg.

Pel tractament del blanc (L<sub>0</sub>), l'etapa L es realitza a les mateixes condicions, però no s'hi afegeix lacasa i enlloc del sobrenedant s'afegeix tampó tartrat de sodi 50mM a pH4.

Després del tractament L es filtra la pasta, es recuperen els lleixius i es renta amb aigua destil·lada abans de realitzar-hi l'extracció alcalina.

#### **12.2.2.4 Etapa d'extracció alcalina (E)**

L'etapa d'extracció alcalina (E) es realitza sobre 10 gps, amb 2% de NaOH, al 5 % de consistència ajustada amb aigua destil·lada, a 70°C durant 90 minuts amb agitació.

Després de l'etapa E es filtra la pasta, es recuperen els lleixius i es renta amb aigua destil·lada. Finalment, se'n caracteritzen les seves propietats.

#### **12.2.2.5 Propietats de les pastes**

Per a la caracterització de les pastes s'ha determinat l'índex kappa i la blancor després de l'etapa E segons les normes ISO-302 i ISO-3688 respectivament.

A partir de l'índex kappa s'ha calculat el tant per cent de disminució de l'Ik o deslignificació segons l' Eq. 12-1.

$$\text{Disminució } I_k (\%) = \frac{I_{k_i} - I_{k_f}}{I_{k_i}} * 100 \quad \text{Eq. 12-1}$$

on,

$I_{k_i}$  = índex kappa de la pasta inicial

$I_{k_f}$  = índex kappa final de la seqüència després de l'etapa E

### 12.2.3 Recerca dels mediadors potencials

Recentment s'han realitzat alguns estudis per tal d'identificar compostos fenòlics naturals que puguin actuar com a mediadors de la lacasa i aquests s'han assajat sobre les pastes:

Camarero *et al.*, (2005) van assajar diferents mediadors naturals en la decoloració de diferents tipus de colorants obtenint que els aldehids fenòlics, les acetones, els àcids i els ésters relacionats amb les tres subunitats de lignina són els millors mediadors, incloent l'àcid p-cumàric, la vanil·lina, l'acetovanil·lona, el metil vainillat i per sobre de tots, el siringaldehid i l'acetosiringona. Aquests últims compostos són mediadors especialment prometedors i potencialment barats per aplicacions industrials.

Posteriorment, Camarero *et al.*, (2007) van seleccionar l'acetosiringona, el siringaldehid i l'àcid p-cumàric com a mediadors redox de la lacasa; van analitzar la deslignificació enzimàtica amb aquests mediadors naturals a la pasta d'eucaliptus després d'una etapa de peròxid d'hidrogen i els resultats obtinguts els van comparar amb la deslignificació que es produeix utilitzant l'HBT. L'àcid p-cumàric va resultar ser el menys efectiu, mentre que amb els altres dos van obtenir resultats interessants. Gutiérrez *et al.*, (2007) assagen els mateixos mediadors naturals com a mediadors de la lacasa per a extreure compostos lipofílics de les pastes i obtenen que amb el siringaldehid es produeix un efecte semblant al que produeix l'HBT.

En aquest treball cal identificar noves molècules naturals susceptibles d'actuar com a mediadors d'oxidoreducció, i per això s'haurien d'investigar compostos de tipus fenòlic produïts durant la biodegradació de la lignocel·lulosa o durant el metabolisme secundari dels fongs mitjançant una combinació de cromatografia líquida, cromatografia de gasos i espectrometria de masses (LC-MS, GC-MS). Aquests assajos es duen a terme a l'IRD ("Institut de Recherche pour le développement") a Marsella, França.

## 12.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 12.3.1 Incubació del fong amb la fusta

L'objectiu d'aquest apartat és que el fong creixi sobre la fusta de pi i de manera natural la degradi. El fong produirà la lacasa com a conseqüència del seu metabolisme primari i a més s'espera que es produeixin diferents productes en el cultiu ja sigui degut al seu metabolisme secundari o bé degut a la biodegradació de la lignocel·lulosa, els quals actuarien com mediadors naturals per a la lacasa facilitant la degradació natural de la lignina del pi.

Un cop realitzada la incubació s'obté un sobrenedant del cultiu que presenta un pH de 6,2 i una activitat de la lacasa en els lleixius d'1,35 U/mL, el que demostra que el fong ha produït lacasa.

### 12.3.2 Aplicació a la pasta d'eucaliptus

Per tal de veure si en els lleixius també hi ha compostos fenòlics que actuarien com a mediadors naturals, s'aplica el sobrenedant del cultiu a la pasta d'eucaliptus en una seqüència XLE. Es compara la deslignificació i blanqueig produïda per aquesta seqüència després de l'etapa E amb el que es produeix en la seqüència control (XL<sub>0</sub>E). Els resultats d'índex kappa i blancor de les experiències XL<sub>0</sub>E i XLE mesurats després de l'etapa E així com de la pasta inicial es mostren a la Figura 12-2 (a i b).

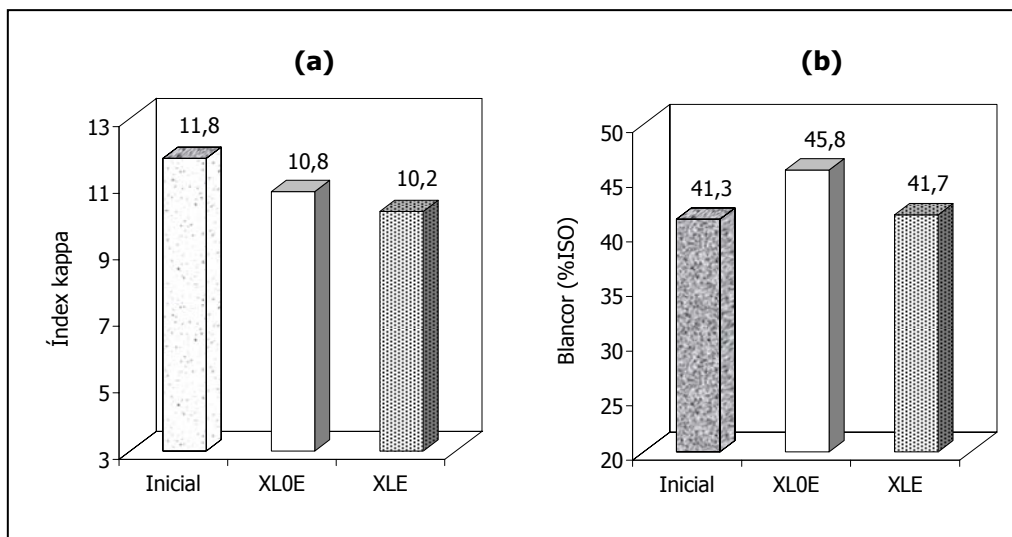


Figura 12-2. Índex kappa (a) i blancor (b) de la pasta inicial i de les seqüències XL<sub>0</sub>E i XLE

Els resultats de la Figura 12-2 mostren que la seqüència del blanc XL<sub>0</sub>E provoca respecte la pasta inicial, una deslignificació del 8% i un augment de blancor de 4,5% ISO, degut a l'efecte conjunt del pretractament amb xilanasa, de l'etapa L<sub>0</sub> (que en principi no ha d'aportar gaire) i de l'extracció alcalina. Si es compara la seqüència XLE amb la seqüència del blanc XL<sub>0</sub>E, el tractament amb els lleixius presenta un índex kappa inferior (0,7 U Ik) el què equival a dir que el tractament XLE augmenta la deslignificació respecte el blanc un 6%; en canvi, la blancor del tractament XLE és inferior que a la seqüència control i igual a la pasta inicial.

La lacasa sola no fa disminuir l'IK, sinó que en alguns casos s'ha vist que augmenta degut a que la lacasa produeix una polimerització de la lignina (Bourbonnais, et al. 1995). Es pot dir per tant, que la major disminució en l'índex kappa del tractament amb lleixius respecte el blanc és perquè a dins dels lleixius hi ha algun producte que ha actuat com a mediador natural eliminant lignina de la pasta.

Tot i veure's disminució en l'índex kappa, els efectes no són massa pronunciats la qual cosa es pot justificar ja que les propietats s'han mesurat després de l'etapa E. Segons Camarero *et al.*, (2007) després de l'etapa E gairebé no es veuen efectes en les propietats de les pastes al tractar-les amb mediadors naturals mentre que després de l'etapa P els efectes es veuen més intensificats.

La blancor de la pasta tractada amb el sobrenedant és inferior a la blancor de la seqüència control. Això podria ser degut a la presència de productes oxidats en el sobrenedant del cultiu que podrien donar color, o bé a que a la pasta s'han creat grups cromòfors a la lignina. Per comprovar aquesta segona part es decideix realitzar una mesura de les coordenades cromàtiques L\*a\*b\* (Taula 12-1).

**Taula 12-1. Valors de L\*a\*b\* de la pasta inicial i de les dues seqüències**

	L*	a*	b*
<b>Inicial</b>	79,6	2,0	16,2
<b>XL<sub>0</sub>E</b>	82	1,6	15,2
<b>XLE</b>	80	2,0	16,5

La coordenada L\* és indicativa de la lluminositat de la mostra, de tal manera que com més alta sigui aquesta més lluminosa és. Com més alta és la coordenada a\* més vermella és la mostra i com més alta és la b\* més groga és. S'observa que el blanc XL<sub>0</sub>E és més lluminós que XLE, però XLE té les coordenades a\* i b\* més altes, el què indica que la pasta d'aquesta seqüència és més vermella i més groga, és a dir, té més intensitat de color. Aquest fet suggeriria la possible formació de grups cromòfors de la lignina i també la conseqüent presència d'alguna substància dins la pasta que ha



actuat com a mediador natural de la lacasa.

### 12.3.3 Recerca dels mediadors potencials

Cal dur a terme un estudi analític mitjançant una combinació de cromatografia líquida, cromatografia de gasos i espectrometria de masses (LC-MS, GC-MS) per tal d'identificar els possibles mediadors. L'objectiu és identificar el producte i seguidament sintetitzar-lo i aplicar-lo sol sobre la pasta. Aquest estudi està actualment en procés a l'IRD i encara no s'ha aconseguit identificar aquesta substància.

## 12.4 CONCLUSIONS

S'ha fet créixer el miceli del fong *Pycnoporus cinnabarinus* en fusta de pi marítim de tal manera que el fong de manera natural creixi sobre la fusta i produeixi lacasa juntament amb altres productes que facilitarien la degradació de la lignina actuant com un sistema lacasa-mediador natural. Al cap de 23 dies es recupera el sobrenedant del cultiu i es comprova que hi ha activitat lacasa produïda pel fong. Per tal de veure si també hi ha substàncies capaces d'actuar com a mediadors naturals, s'aplica el sobrenedant directament a la pasta d'eucaliptus en una seqüència XLE i els resultats es comparen amb una seqüència control XL<sub>0</sub>E. Tot i que no es veuen efectes en la blancor de la pasta, l'índex kappa sí que és inferior el què fa pensar que algun producte dels lleixius ha actuat com a mediador natural. Per tal d'identificar aquesta substància es realitza un anàlisi per LC-MS, GC-MS.

## 12.5 REFERÈNCIES

- Bourbonnais, R. i Paice, M. (1995) Enzymatic delignification of krat pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal* 79(5):199-204.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P. i Yaguchi, M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5):1876-1880.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martinez, M.J. i Martinez, A.T. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35(2-3):113-120.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. i Martínez, A.T. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):1775-1784.

- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A.T., Romero, J., Gutiérrez, A. i del Río, Jose C. (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1264-1271.
- Eggert, C., Temp, U. i Eriksson, K.-L. (1996 (a)) The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4):1151-1158.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. i Eriksson, K.L. (1996 (b)) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391(1-2):144-148.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. i Vidal, T. (2003) Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57(5):513-519.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A. i Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde Production and Aryl-Alcohol Oxidase and Dehydrogenase Activities in Ligninolytic Fungi of the Genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6):1783-1788.
- Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., Del Río, J.C. i Martínez, A.T. (2007) Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental Science and Technology* 41(11):4124-4129.
- Johannes, C. i Majcherczyk, A. (2000) Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):524-528.
- Li, K., Horanyi, P.S., Collins, R., Phillips, R.S. i Eriksson, K.L. (2001) Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme and Microbial Technology* 28(4-5):301-307.
- Nelson, P.J., Chin, C.W.J., Viikari, L. i Tenkanen, M. (1998) Use of a laccase mediator stage in bleaching eucalypt kraft pulps. *Appita Journal* 51(6):451-455.
- Sealey, J. i Ragauskas, A.J. (1998) Investigation of laccase/N-hydroxybenzotriazole delignification of kraft pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18(4):403-416.