

Capítol 13

Producció d'una nova tirosinasa en *A.niger* i avaluació del potencial d'aplicació en el blanqueig de pastes per a paper

RESUM

La tirosinasa és una oxidoreductasa amb varies aplicacions biotecnològiques conegudes però que no s'ha aplicat mai en el blanqueig de pasta de paper. Recentment han aconseguit clonar el gen de la tirosinasa de *Pycnoporus sanguineus* al fong *A. Niger* el qual la produeix extracel·lularment, el què permet augmentar-ne la seva producció i aïllament per a posteriors aplicacions biotecnològiques.

En el present capítol primerament es produeix suficient quantitat d'aquesta tirosinasa en fermentador a partir d'*A.niger* i posteriorment es realitzen diferents assaigs d'aquesta sobre la pasta avaluant tant la seva estabilitat durant el tractament així com l'efecte que produeix en deslignificar i blanquejar. S'assagen mediadors ja que la tirosinasa podria actuar sobre la pasta a través d'un sistema tirosinasa-mediador degut a les seves similituds amb la lacasa, però els resultats obtinguts no són del tot satisfactoris ja que els mediadors assajats no són oxidats per la tirosinasa. De tota manera, la tirosinasa es manté estable durant les condicions de tractament i la presència de pasta sembla que li faci algun efecte degut a que n'augmenta la seva activitat i l'absorbeix. Per últim, quan la tirosinasa és aplicada en presència d'L-Dopa i en presència de lacasa es produeixen lleugers efectes en l'Ik i la blancor el que fa que sigui interessant continuar la recerca sobre l'aplicació d'aquest enzim en el blanqueig de pastes.

13.1 INTRODUCCIÓ

Els enzims són proteïnes que posseeixen la capacitat de catalitzar reaccions específiques de substrat. Són classificats segons la seva funció i són dividits en sis grans classes: oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerases i lligases. Les oxidoreductases poden ser dividides en 4 grups: oxidases, deshidrogenases, peroxidases i oxigenases. Basant-se en el producte format durant la catàlisi, les

oxidases poden ser dividides en dos grups: oxidases productores d'aigua (les que contenen coure) i oxidases productores de peròxid d'hidrogen (les que contenen FAD- (flavina adenina dinucleòtid) o FMN – (coenzim flavina mononucleòtid)).

Tant la lacasa com la tirosinasa es troben entre les oxidases que contenen coure. Les tirosinases són enzims que posseeixen un centre binuclear de coure i pertanyen al grup de metal·loproteïnes de tipus III. La lacasa catalitza l'oxidació dels p-difenols amb la concurrent reducció de l'oxigen a aigua mentre que la particularitat de les tirosinases és catalitzar l'o-hidroxilació dels monofenols (activitat monofenolasa o cresolasa) i la conseqüent oxidació dels resultants o-difenols a o-quinones reactives (activitat difenolasa o catecolasa), utilitzant oxigen molecular per a les dues reaccions tal com es mostra a la Figura 13-1. EL rang de substrats de la tirosinasa inclou els substrats fisiològicament importants com tirosina i L-DOPA (L-dopamina), i també altres fenols i difenols, pèptids i proteïnes. El mecanisme d'acció de les tirosinases encara no és perfectament conegut, però se sap que l'oxidació dels orto-difenols per la tirosinasa implica una cinètica del tipus Michaelis-Menten, mentre que l'oxidació dels monofenols es caracteritza per un període de latència (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Aquesta fase de latència pot ser abolida afegint una feble quantitat d'o-difenols (Espin i Wichers, 2001).

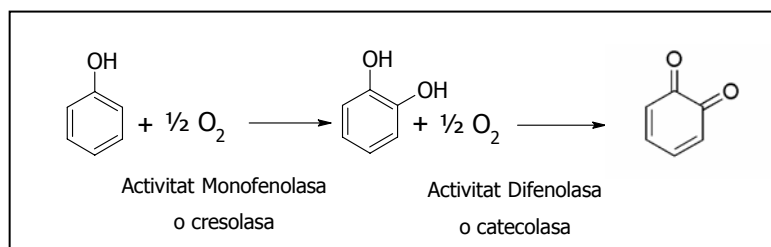


Figura 13-1. Mecanisme d'oxidació de la tirosinasa

De tirosinases n'hi ha en mamífers, en invertebrats, plantes i microorganismes. En els fongs, les tirosinases són generalment associades amb la formació i estabilitat de les espores, en mecanismes de defensa i virulència i també en pigmentació (Kurahashi i Pontzen, 1998). Més recentment, potencials aplicacions biotecnològiques de les tirosinases han fet créixer l'interès en l'aïllament de nous gens de tirosinasa i el desenvolupament de sistemes d'expressió heteròloga per a la producció a llarga escala.

Últimament, s'han estudiat membres del gènere *Pycnoporus* entre els basidiomicets per la seva habilitat de produir gran quantitat de lacasa (Herpoël *et al.*, 2000; Lomascolo *et al.*, 2002). Recentment s'ha demostrat que les espècies de *Pycnoporus*

cinnabarinus i *Pycnoporus sanguineus* són també capaces de produir tirosinasa intracel·lular. El fet que la producció de tirosinasa sigui intracel·lular dificulta la seva aplicació biotecnològica ja que es fa difícil obtenir-ne en grans quantitats, i a més, hi ha el problema de la purificació posterior. La tirosinasa de *P.sanguineus* ha estat purificada i caracteritzada (Halaouli *et al.*, 2005) i s'ha aconseguit produir en *Aspergillus Niger* aconseguint que l'enzim sigui secretat en quantitat important al medi extracel·lular dels cultius d' *A.niger*, la qual cosa facilita els estudis moleculars i el seu aïllament per a les aplicacions biotecnològiques (Halaouli *et al.*, 2006). Aquesta tirosinasa produïda en *A. niger* mostra efectivitat en varies aplicacions biotecnològiques, com bioconversió in-vitro de o-difenols a antioxidants més forts, i cross-linking de proteïnes (Halaouli *et al.*, 2005).

No hi ha cap estudi anterior d'aplicació de tirosinasa en el blanqueig de pastes, però varis indicis i la seva semblança amb les lacases fan pensar que el blanqueig de pastes pot ser una altra de les seves aplicacions biotecnològiques. La tirosinasa és un enzim molt semblant a la lacasa ja que les dues són oxidoreductases que contenen coure, oxiden els fenols, i presenten pesos moleculars elevats (tirosinasa: 45KDa i lacasa: 70KDa).

En aquest capítol es produeix primerament suficient quantitat de tirosinasa en *A.niger* i posteriorment s'aplica la tirosinasa sobre la pasta d'eucaliptus, avaluant tant la seva estabilitat durant el tractament així com el seu efecte en deslignificar i blanquejar la pasta. D'una banda, es planteja la possibilitat que la tirosinasa també necessiti de la presència d'un mediador per a difondre's a l'interior de les fibres de la pasta i oxidar les porcions fenòliques i no fenòliques d'aquestes i d'altra banda també s'aplica la tirosinasa en presència d'L-Dopa i de lacasa i NHA.

13.2 MATERIALS I MÈTODES

13.2.1 Producció de tirosinasa

L'objectiu d'aquest apartat és produir tirosinasa en una quantitat suficient per a realitzar els posteriors assaigs d'aquest estudi, aquesta producció es realitza als laboratoris de l'INRA (Marsella, França).

Primer de tot cal sembrar plaques de petri amb *A. niger* per tal que aquest produeixi les espores les quals contenen la tirosinasa, a la Figura 13-2 (a) s'observa una fotografia d'un cos esporífer amb les seves espores. Una vegada el fong hagi envaït tota la placa tal com s'observa a la Figura 13-2 (b), es recuperen les espores i es realitza la producció de tirosinasa en fermentador durant 13 dies. Durant els 13 dies es

realitza el seguiment de l'evolució de l'activitat monofenolasa i difenolasa de la tirosinasa, així com el seguiment de l'evolució de la producció de proteïnes i del pH. De la mostra final es realitza un gel d'electroforesi SDS-Page per tal de veure si la tirosinasa hi és present així com per veure la resta de proteïnes que ha produït el fong.

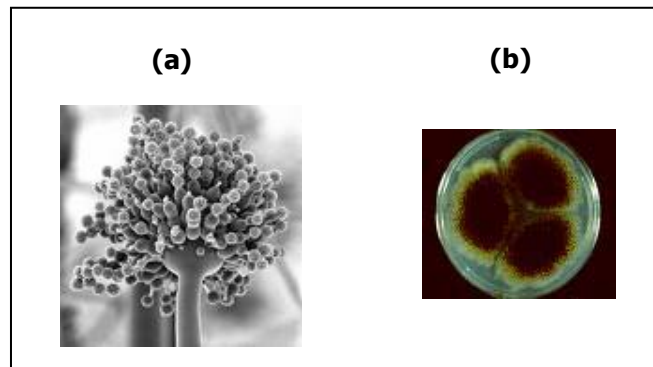


Figura 13-2. Cos esporífer (a) i cultiu d'*A.niger* en placa de petri (b)

Tot el material utilitzat s'esterilitza prèviament en un autoclau a alta pressió i temperatura (120°C) durant 20 minuts.

13.2.1.1 Cultiu *Aspergillus Niger*

Es sembra el fong *Aspergillus Niger*, que ha estat transformat amb el gen de la tirosinasa de *Pycnoporus sanguineus* (Halaouli *et al.*, 2006), en plaques de petri per a què creixi durant 13 dies i produeixi les espores que contindran la tirosinasa. Les condicions del medi de cultiu són les següents: Asp A+N pH 5,5 (1 x): (NaNO₃, KCl, KH₂PO₄), glucosa (10 g l⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0,002 M), oligoelements (1 x): (ZnSO₄·7H₂O, H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, FeSO₄·7H₂O, CoCl₂·6H₂O, CuSO₄·5H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, EDTA-Na₂·2H₂O).

13.2.1.2 Recuperació i recompte d'espores

Es recuperen les espores amb aigua destil·lada i algunes gotes de Tween, i es realitza el recompte d'espores. En el fermentador es necessiten 10⁵ espores per mL per a una bona producció.

13.2.1.3 Producció de la tirosinasa en fermentador

La producció de tirosinasa es realitza en un fermentador de 8 litres provinent d'aire comprimit i regulació de temperatura. En aquest reactor s'hi afegeixen les espores necessàries en el següent medi de cultiu estèril: Asp A-P (NaNO₃, KCl), glucosa (500 g

I^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M), oligoelements, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 g l^{-1}), tampó citrat-fosfat (0,1 M pH 6,5) i es realitza la fermentació durant 13 dies a 30°C i un pH de 5,5 regulat amb àcid cítric 1M.

Activitat tirosinasa

Pel seguiment de l'activitat tirosinasa al llarg dels 13 dies, s'extreu cada dia una petita quantitat de mostra del fermentador i se'n mesura l'activitat monofenolasa i difenolasa. L'activitat monofenolasa correspon a la velocitat d'oxidació d' 1,25 mM d' L-tirosina en tampó fosfat de sodi (50mM, pH 6,8) a 30°C determinat a 484 nm ($\epsilon = 22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en presència de 5 mM d'MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona) i de L-DOPA tal que $[\text{L-DOPA}]/[\text{L-tir}]=0,057$. L'activitat difenolasa correspon a la velocitat d'oxidació de 4,2 mM d' L-DOPA en tampó fosfat de sodi (50 mM, pH 6,8) a 30°C determinat a 484 nm ($\epsilon = 22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en presència de 5 mM d' MBTH.

Concentració de proteïnes

La dosificació de les proteïnes es realitza seguint la tècnica de Bradford mitjançant el reactiu Biorad. S'utilitzen cubetes de metacrilat d'1 mL. Primerament es realitza una recta patró amb BSA (albúmina sèrica bovina) a diferents concentracions (5, 10, 15 i 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El blanc consisteix en aplicar 800 μl d'aigua i 200 μl de reactiu, i la mostra consisteix en afegir la mostra problema a la dilució corresponent enlloc de l'aigua. Una vegada afegit el reactiu, s'agita, es deixa reposar 10 minuts i es realitza la mesura d'absorbància a 595 nm.

Passats els 13 dies de la fermentació, es filtra la fermentada, es recupera el sobrenedant i es concentra per ultrafiltració tal com s'especifica al capítol 2 de materials i mètodes. Seguidament se'n determina l'activitat tirosinasa i es realitza el gel de proteïnes SDS-Page (gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat de sodi). Aquest sobrenedant concentrat és el que s'utilitzarà pels posteriors assaigs per la qual cosa es congela amb el 15% de glicerol.

Anàlisi electroforètic

Es realitza un anàlisi d'electroforesi de proteïnes en condicions desnaturalitzants: SDS-Page. L'electroforesi es realitza sobre gels d'acrilamida al 10% segons el mètode de Laemmli, (1970). Abans de ser carregada sobre el gel, la mostra es dilueix dues vegades en la solució de Laemmli (tampó Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8 contenint 1% (p/v) d'SDS, 5% (v/v) de β -mercaptoetanol, 25% (v/v) de glicerol, i 0,01% (p/v) de blau de bromofenol, seguidament es desnaturalitza escalfant-la a 100°C durant 5 minuts. La mostra es carrega a diferents concentracions (μg): 4, 10, 20 i 40. El tampó de

migració és un tampó Tris-HCl 24,8 mM, pH 6,8, que conté 14,4 g/l de glicina i 0,5 g/l d'SDS. Les mostres es fan migrar 1 hora a 30 mA i 120 V, i després 2h a 60 mA i 200 V. Una mescla de proteïnes de masses moleculars conegudes (α -lactoalbúmina (14,4 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa), anhidrasa carbònica (30 KDa), ovalbúmina (45 KDa), albúmina bovina sèrica (66 KDa) i fosforilasa b (97,4 KDa)) és utilitzada com a marcador de pes.

Les proteïnes són revelades per una coloració al nitrat d'argent (blue) durant tota la nit. El gel es decolora amb una solució amb 250 mL de metanol l⁻¹, 70 mL d'àcid acètic l⁻¹ i 680 mL l⁻¹ d'aigua destil·lada.

13.2.2 Potencial redox i RPE

Es disposa de tirosinasa purificada anteriorment la qual es concentra per diaflow i es porta per analitzar el potencial redox al CNRS ("Centre national de la recherche scientifique", Marsella, França).

Per a realitzar aquests anàlisis la proteïna ha d'estar molt concentrada per a poder-la detectar, és a dir, el lloc actiu de l'enzim ha de ser accessible per a què intercanviï amb l'elèctrode. Per tant no hi poden haver contaminants a la mostra com altres proteïnes o pigments. L'enzim s'ha de detectar en l'UV-Visible i per tant hauria de ser de color blau com la lacasa, la qual cosa dependrà dels coures presents en els llocs actius.

13.2.3 Tractament amb tirosinasa sobre la pasta d'eucaliptus

13.2.3.1 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.

13.2.3.2 Enzims

L'enzim principal utilitzat en aquest estudi ha estat una tirosinasa de *P.sanguineus* que ha estat clonada a *A.Niger* (Halaouli *et al.*, 2006), i s'ha produït tal com s'ha descrit anteriorment.

S'ha utilitzat una xilanasa per l'etapa de pretractament enzimàtic. La xilanasa utilitzada (Pulzyme 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 µmol de sucre reductor (mesurat com a equivalents de xilosa) de xilà per minut a 50°C i pH 5.

També s'ha utilitzat la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* produïda per l'INRA (Marsella, França) de la soca monocariòtica hiperproductora ss3.

13.2.3.3 Possibles mediadors per a la tirosinasa

Degut a la semblança de la tirosinasa amb la lacasa, es proven alguns dels mediadors més efectius en un sistema lacasa-mediador per a deslignificar la pasta com l'HBT (1-hidroxibenzotriazol) i l'NHA (N-hidroxiacetanilida) (Camarero *et al.*, 2004; Poppius-Levlin *et al.*, 2001) així com l'alcohol veratrílic (AV) el qual s'utilitza en el mètode per detectar la lignina peroxidasa (Arora i Gill, 2001). L'HBT i l'AV han estat subministrats per Sigma-Aldrich i l'NHA ha estat sintetitzat segons Oxley, *et al.*, 1989, per l'Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II".

Per a realitzar aquests assaigs s'afegeixen en cubetes de metacrilat els diferents mediadors a diferents concentracions (preparades amb tampó fosfat de sodi pH 6,8) i seguidament s'hi afegeix la tirosinasa. Si els mediadors són oxidats per la tirosinasa s'observarà un canvi de color a la mostra degut a la formació dels radicals dels mediadors. Una altra manera de veure si s'oxiden els mediadors és mesurant l'absorbància de la mostra des del moment en què s'hi afegeix la tirosinasa a la longitud d'ona del radical corresponent per a cadascun. Aquesta longitud d'ona (λ) pel radical de l'HBT és a 408 nm (Ander i Messner, 1998), pel radical NHA és 350 nm (tal com s'ha determinat en el capítol 11) i pel veratraldehid que és el producte oxidat de l'alcohol veratrílic és 310 nm (Arora i Gill, 2001).

13.2.3.4 Estabilitat de la tirosinasa durant les condicions de tractament

S'ha seguit l'evolució de l'activitat de la tirosinasa al llarg de 4 hores en presència i absència dels mediadors HBT, NHA i AV i en presència o absència de pasta. Els tractaments es realitzen en erlenmeyers a 30°C, amb tampó fosfat de sodi a pH 6,8 i amb agitació de 190 rpm. Cada hora s'extreu una mostra de lleixiu i es realitza la mesura de l'activitat de la tirosinasa segons s'ha descrit a l'apartat 13.2.1.3.

Han estat 8 els tractaments realitzats: 1- tirosinasa sola, 2- tirosinasa amb HBT, 3- tirosinasa amb NHA, 4- tirosinasa amb AV, 5- tirosinasa amb pasta, 6- tirosinasa amb HBT i pasta, 7- tirosinasa amb NHA i pasta i 8- tirosinasa amb AV i pasta. La concentració de tirosinasa és d'1 U/mL (o bé de 20 U/gps), les concentracions dels mediadors utilitzades són de 9,9 mM (o 3% sps) per l'HBT, de 3,3 mM (o 1% sps) per

a l'NHA i de 3 mM (o 1% sps) per a l'AV. Els tractaments amb pasta es realitzen amb 1 gps al 5% de consistència.

En els tractaments on hi ha mediadors es segueix l'evolució de l'oxidació d'aquests, per això es mesura l'absorbància del lleixiu a 408 nm en els tractaments amb HBT, a 350 nm per als tractaments amb NHA i a 484 nm per als tractaments amb AV (aquest últim es realitza a 484 ja que a 310 nm també hi poden interferir altres productes).

13.2.3.5 Assajos sobre la pasta d'eucaliptus: Aplicació de la tirosinasa amb mediadors

En aquest apartat s'aplica la tirosinasa a la pasta d'eucaliptus amb l'objectiu de veure si aquesta és capaç de deslignificar-la o blanquejar-la amb el mateix mecanisme d'oxidació que la lacasa, és a dir, oxidant un mediador que actuaria d'intermediari redox i que aquest, un cop oxidat per la tirosinasa oxidaria la lignina de la pasta, tal com es mostra a la Figura 13-3.

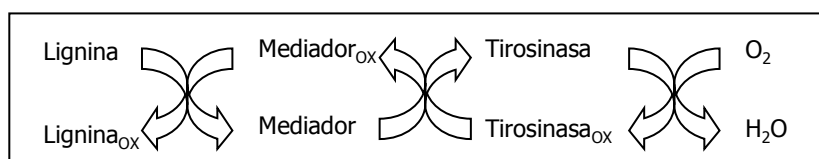


Figura 13-3. Esquema de la possible actuació de la tirosinasa sobre la pasta

Els mediadors utilitzats en aquest estudi són l'NHA i l'AV. Per tal d'estudiar els efectes en les propietats de les pastes es realitza paral·lelament un blanc, i per tant són tres les seqüències que s'han realitzat:

- XT₀E: seqüència que correspon al blanc
- XT_{NHA}E: seqüència on el mediador utilitzat a l'etapa T ha estat l'NHA
- XT_{AV}E: seqüència on el mediador utilitzat a l'etapa T ha estat l'alcohol veratrílic

La metodologia seguida per a cada etapa s'indica a continuació:

Etapa de pretractament enzimàtic (X)

Els pretractaments amb xilanasa (X) es realitzen sobre 10 gps, 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 lleixius.

Etapa de tractament amb tirosinasa (T)

El tractament T es realitza sobre 10 gps, amb 20 U/gps d'activitat difenolasa de la tirosinasa (s'afegeix l'extracte de la fermentació), al 4 % de consistència, a pH 6,8, a 30°C, 0,1 % de tween 20, i durant 4 hores amb agitació i a 100 KPa de pressió d'O₂. La quantitat d'NHA i d'AV és d'1% sps.

Pel tractament del blanc (T₀), l'etapa T es realitza sense mediadors i a les mateixes condicions, però abans d'afegir-hi l'extracte de la fermentació, aquest es bull a 100°C durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar les proteïnes, de tal manera que no hi haurà activitat tirosinasa.

Després del tractament T es filtra la pasta, es recuperen els lleixius i es renta amb aigua destil·lada abans de realitzar-hi l'extracció alcalina.

Etapa d'extracció alcalina (E)

L'etapa d'extracció alcalina es realitza sobre 10 grams de pasta seca, al 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 recuperant els lleixius, es renta amb aigua destil·lada i se'n caracteritzen les seves propietats.

13.2.3.6 Assajos sobre la pasta d'eucaliptus: Aplicació de la tirosinasa amb L-DOPA

Pels tractaments que es realitzen en aquest no s'afegeix l'extracte de la fermentació directament sinó que abans aquest es concentra per ultrafiltració, seguidament s'extreuen els pigments mitjançant sulfat de protamina, es centrifuga i finalment es concentra per diaflow. Al capítol 2 de materials i mètodes s'especifica detalladament la metodologia seguida en cada cas. Es realitzen les següents seqüències de blanqueig:

- T_DE
- T_D+LE
- T_D+L_{NHA}E

Els tractaments T_D es realitzen amb 5 gps, al 5% de consistència a pH 5 ajustat amb tampó tartrat 50 mM, a temperatura de 50°C, i afegint una petita quantitat d'L-DOPA (0,14 mM) durant el tractament. En aquest cas s'afegeix 20 U/gps d'activitat monofenolasa, al 0,1 % de tween 20, amb O₂ durant 4 hores.

El tractament T_D+L es realitza de la mateixa manera però s'afegeix 20 U/gps de lacasa i al tractament T_D+L_{NHA} s'hi afegeix a més l'NHA a l'1%_{sps}.

L'etapa d'extracció alcalina (E) es realitza de la mateixa manera que s'ha especificat a l'apartat anterior.

13.2.3.7 Propietats de les pastes

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

A partir de l'índex kappa s'ha calculat tant per cent de disminució de l'Ik segons l' Eq. 13-1.

$$\text{Disminució Ik (\%)} = \frac{\text{Ik}_i - \text{Ik}_f}{\text{Ik}_i} * 100 \quad \text{Eq. 13-1}$$

on,

Ik_i= índex kappa de la pasta inicial

Ik_f= índex kappa final de la seqüència després de l'etapa E

13.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest estudi en primer lloc es du a terme la producció de tirosinasa en fermentador, avaluant la seva activitat i producció de proteïnes. Posteriorment s'aplica la tirosinasa produïda en pastes d'eucaliptus.

13.3.1 Producció de tirosinasa en fermentador

La producció de tirosinasa es realitza en un fermentador a partir de les espores obtingudes del cultiu d'*A.niger* tal com es mostra a la Figura 13-4. Durant els 13 dies de fermentació s'avaluen l'activitat tirosinasa i la producció de proteïnes, i l'últim dia es realitza un anàlisi electroforètic.

Tal com s'observa a la Figura 13-4, l'extracte de la fermentació que s'obté té un color negrós degut al pigment que produeix *A.niger* (com ja s'ha dit, la tirosinasa en els fongs està relacionada amb la pigmentació).



Figura 13-4. Fermentador amb *A.niger* en creixement

13.3.1.1 Evolució de l'activitat tirosinasa i de la producció de proteïnes

A la Figura 13-5 està representada l'evolució de l'activitat monofenolasa, difenolasa i de la concentració de proteïnes des del tercer a l'últim dia de la fermentació.

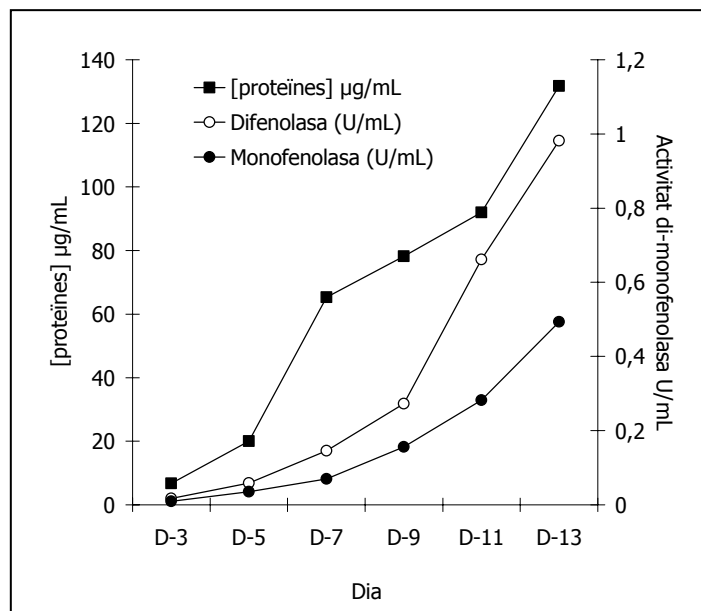


Figura 13-5. Evolució de l'activitat di i monofenolasa i de la concentració de proteïnes en el fermentador

Tant les dues activitats tirosinasa com la concentració de proteïnes augmenten a mesura que passen els dies com a conseqüència que el fong està creixent i produint proteïnes, entre elles la tirosinasa. També s'observa que l'activitat difenolasa és sempre aproximadament el doble a la monofenolasa, tal com està descrit per Halaouli *et al.*, 2005. La fermentació s'atura el tretzè dia en el qual s'arriba a una activitat difenolasa de 0,98 U/mL, a una activitat monofenolasa de 0,49 U/mL i a una concentració de proteïnes de 131,75 µg/mL. El pH es manté estable al llarg dels dies entre 5,5 i 6.

13.3.1.2 Anàlisi electroforètic

A la Figura 13-6 es mostra el gel d'electroforesi SDS-Page de l'extracte del fermentador després de filtrar-lo. Als dos extrems del gel s'hi ha aplicat un marcador (Blue) on hi ha un patró de proteïnes a uns pesos moleculars coneguts. Les quatre línies del centre corresponen a la mostra a diferents concentracions de l'extracte del fermentador, de 4 a 40 µg/mL. En les quatre línies s'hi pot observar que a la mostra hi ha varies proteïnes de diferents pesos moleculars, les quals han estat produïdes per *A.Niger* durant el seu creixement, entre elles es troba la tirosinasa recombinant la qual correspon a la banda de 48 KDa (Halaouli *et al.*, 2005).

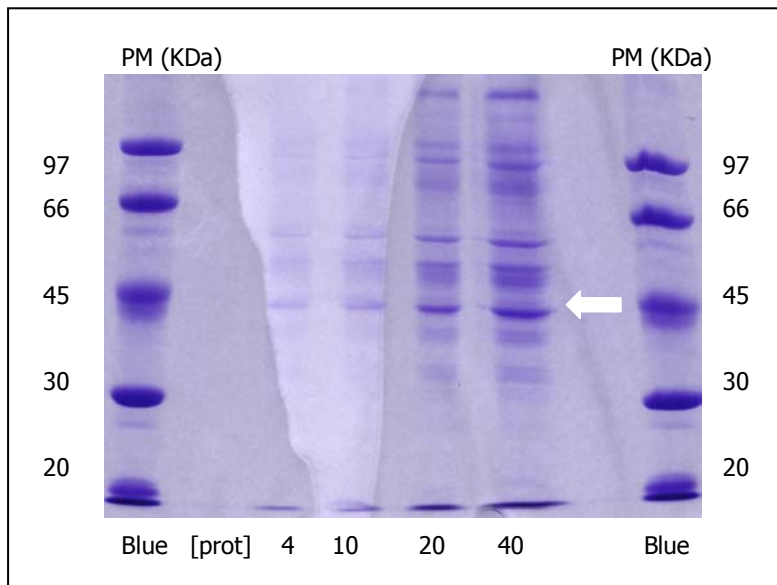


Figura 13-6. Gel d'electroforesi SDS-Page de la fermentada al cap de tretze dies

A partir dels resultats d'electroforesi, es pot dir que la tirosinasa està present a l'extracte obtingut i és una de les proteïnes majoritàries produïdes pel fong, però aquesta no és pura ja que en l'extracte també hi són presents les altres proteïnes que

el fong ha produït així com el pigment. Per a realitzar els primers assajos preliminars sobre la pasta s'utilitza aquest extracte ja que no cal la proteïna pura, i les altres proteïnes presents se sap que no tenen activitat oxidasa, la presència de la qual podria dificultar la interpretació de resultats ja que els efectes a la pasta podrien ser deguts a aquestes i no a la tirosinasa. Sí que hi ha xilanasa i ferulat esterasa, aquesta última s'ha vist en un treball anterior que no afecta a la pasta d'eucaliptus, d'altra banda, la xilanasa sí que pot produir efecte sobre la pasta com un lleuger descens en l'Ik o un lleuger augment en la blancor.

Després d'haver filtrat l'extracte de la fermentació, es concentra encara més per ultrafiltració. Finalment s'aconsegueix produir suficient quantitat de tirosinasa recombinant en *A.niger* aconseguint una producció d'1,6 U difenolasa per mL (o bé 0,7 U monofenolasa per mL) i s'obtenen 1347 U difenolasa i 528 U monofenolasa. Aquesta quantitat de tirosinasa obtinguda és suficient per a realitzar els primers estudis preliminars d'aplicació de tirosinasa sobre la pasta d'eucaliptus.

13.3.2 Potencial redox i RPE

S'intenta mesurar el potencial redox de la tirosinasa a pH 4 i pH 5 però no es pot mesurar el seu potencial redox ja que l'elèctrode no l'oxida en el potencial redox assajat (E/V: 0-1250). Al revés que la lacasa, la tirosinasa no és blava. Per a fer el potencial redox de la tirosinasa s'hauria de fer per valoració UV-Visible, però per això cal que la tirosinasa absorbeixi en la longitud d'ona del visible, ja que sinó no es pot fer (el potencial redox es podria fer oxidant i reduït).

La Ressonància Paramagnètica Electrònica (RPE) és una tècnica espectroscòpica sensible a electrons desaparellats. Això és, generalment, un radical lliure, per a molècules orgàniques o un ió d'un metall de transició, si és un compost inorgànic. En funció de les seves propietats espectroscòpiques i magnètiques els centres de coure dels metal·loenzims es classifiquen en 3 categories: tipus I, tipus II i tipus III. Els tipus I i II són centre paramagnètics que posseeixen electrons, és a dir, tenen un moment magnètic permanent que si s'hi aplica un camp magnètic homogeni, s'obté un espectre de RPE característic. D'altra banda, els centres de coure de tipus III són units de manera antiferromagnètica la qual cosa impedeix la detecció d'aquests coures per RPE (Solomon *et al.*, 1996). La tirosinasa té un centre binuclear de coure de tipus III, per tant, no és detectable per RPE mentre que sobre la lacasa només es detecten 2 dels 4 coures del centre actiu de l'enzim per RPE.

Així doncs, no ha estat possible ni detectar el potencial redox de la tirosinasa ni realitzar un espectre de RPE.

13.3.3 Tractament amb tirosinasa sobre la pasta d'eucaliptus

En primer lloc s'avalua l'estabilitat de la tirosinasa a les condicions del tractament amb diferents mediadors, i posteriorment es realitza l'estudi de l'aplicació en pasta. D'una banda es planteja la possibilitat que la tirosinasa actuï sobre la pasta a través d'un sistema tirosinasa-mediador i d'altra banda s'aplica la tirosinasa amb L-Dopa al mateix temps que es planteja la teoria que la tirosinasa pugui actuar com un mediador per a la lacasa o el sistema lacasa-mediador.

13.3.3.1 Possibles mediadors per a la tirosinasa

Es decideix assajar amb tres mediadors: HBT, NHA i AV, l'estructura química dels quals es mostra a la Figura 13-7, aquests mediadors són efectius en els sistemes lacasa-mediador. L'assaig consisteix en afegir la tirosinasa a les cubetes de metacrilat on hi ha els diferents mediadors i mesurar l'absorbància. S'observa que no varia l'absorbància a la longitud d'ona del radical corresponent, la qual cosa indica que els mediadors assajats HBT, NHA i AV no són oxidats per la tirosinasa. Tampoc són oxidats si s'afegeix L-DOPA a la solució.

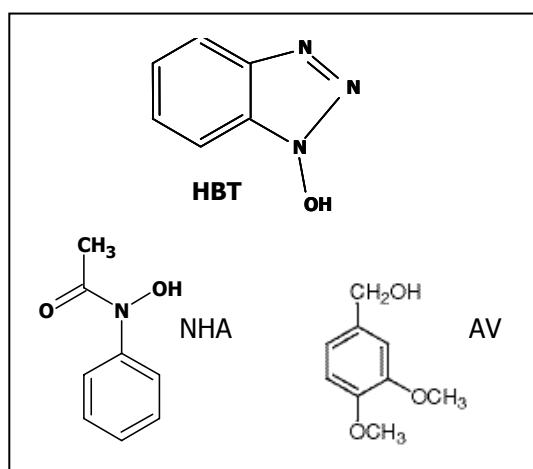


Figura 13-7. Estructura química de l'HBT, NHA i AV

S'ha de tenir en compte el potencial redox dels mediadors així com el de la tirosinasa ja que per a què l'enzim oxidi el mediador (o bé la lignina de la pasta), el substrat ha de tenir un potencial redox inferior.

13.3.3.2 Estabilitat de la tirosinasa durant les condicions de tractament

Els resultats de l'evolució de l'activitat difenolasa de la tirosinasa al llarg de les 4 hores d'incubació a 30°C a pH 6,8 en presència o absència de mediadors i en presència o absència de pasta es mostren a la Figura 13-8 (a-d)

A la Figura 13-8 (a) es mostra l'evolució de l'activitat difenolasa quan la tirosinasa és incubada sense la presència de mediadors, sola o amb pasta. Quan és incubada sense pasta, la primera hora disminueix lleugerament la seva activitat, a la segona augmenta lleugerament i es manté constant fins a la quarta hora. Quan és incubada amb pasta l'efecte al llarg de les quatre hores és el mateix, però l'activitat està per sobre de quan és incubada sense pasta.

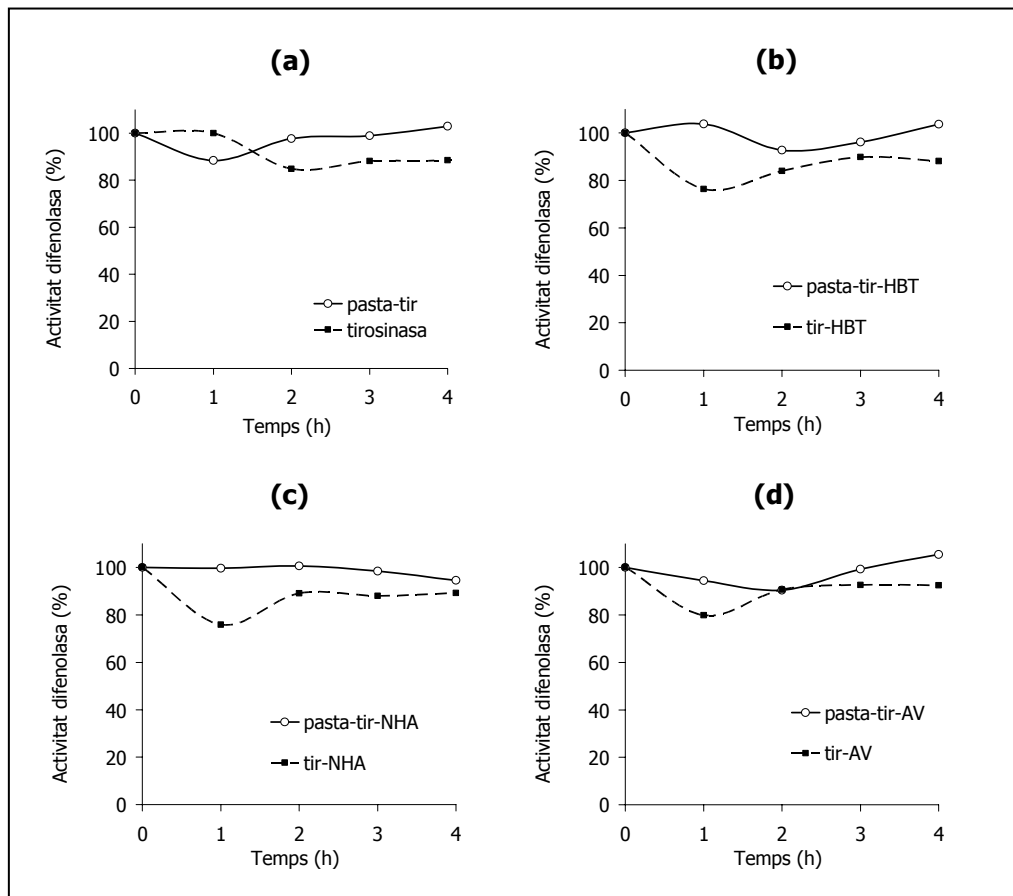


Figura 13-8. Activitat difenolasa (%) al llarg de les 4 hores en presència o absència de pasta: tirosinasa (a), tirosinasa amb HBT (b), tirosinasa amb NHA (c) i tirosinasa amb AV (d)

S'ha vist a l'apartat anterior que la tirosinasa no oxida els mediadors HBT, NHA i AV, però s'han assajat igualment els tractaments d'estabilitat per tal de veure què passa en presència de pasta (Figura 13-8 (b-d)). El que s'observa en els casos on la tirosinasa és incubada en presència de mediadors és el mateix que quan la tirosinasa és incubada sola, l'activitat tirosinasa es manté constant al llarg de les quatre hores i en presència de pasta l'activitat és lleugerament superior, el fet d'incubar-la amb mediadors no afecta a la seva activitat. Teòricament, els responsables d'inactivar els enzims són els radicals que es formen quan els mediadors són oxidats, si no s'oxiden és d'esperar que la tirosinasa no s'inactivi quan és incubada amb mediadors.

S'ha mesurat també l'Absorbància a 408 nm, 350 nm i 484 nm dels tractaments amb HBT, NHA i AV respectivament, i els resultats es mostren a la Figura 13-9 (a-c).

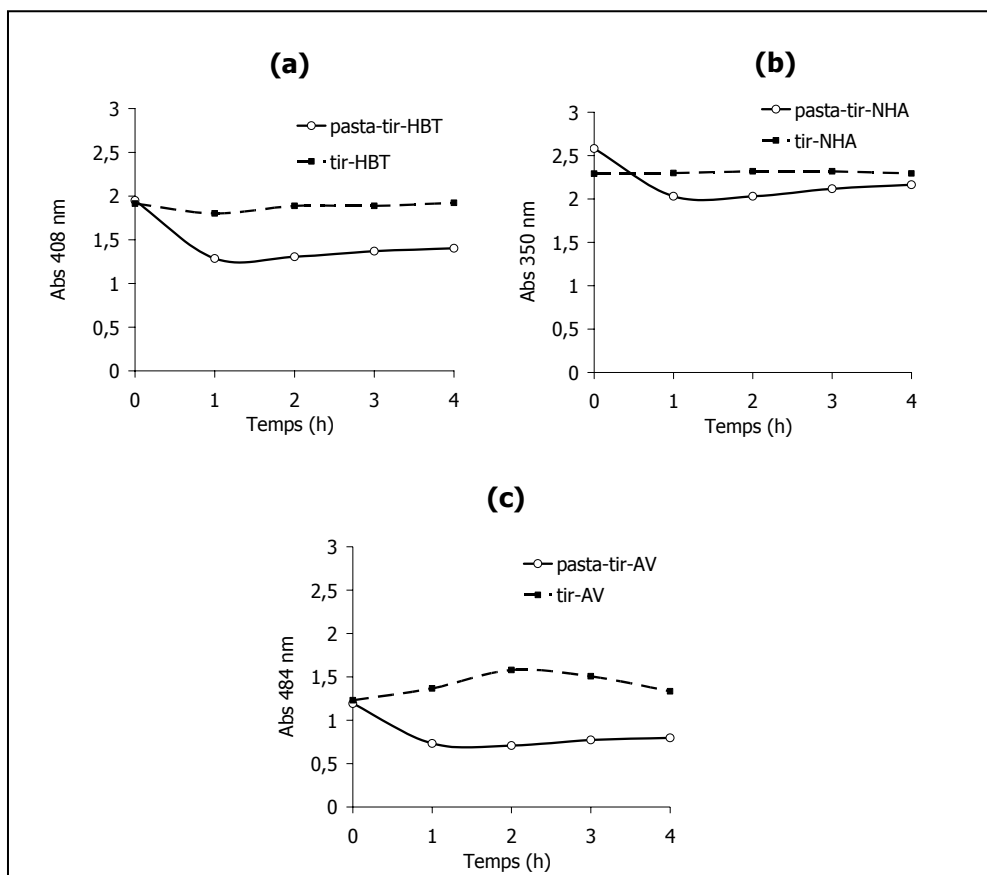


Figura 13-9. Absorbància dels tractaments amb mediadors amb pasta o sense a 408 nm (a), a 350 nm (b), i a 484 nm (c)

El punt 0 correspon al moment en el qual tots els components del tractament són afegits, en aquest punt l'absorbància ja és alta i és deguda a l'extracte obtingut de la fermentació el qual conté tirosinasa juntament amb altres proteïnes i pigments. Les proteïnes absorbeixen al UV-Visible, però els pigments serien els responsables d'aquesta absorció a diferents longituds d'ona.

Com s'ha vist anteriorment els mediadors no s'oxiden, per tant l'absorbància mesurada no és deguda a aquests. En els tractaments sense pasta, l'absorbància es manté estable al llarg de les quatre hores, mentre que en presència de pasta disminueix durant la primera hora i es manté estable i inferior als tractaments sense pasta al llarg de les 4 hores. El fet que en la pasta l'absorbància sigui menor, deu ser degut a que el pigment de l'extracte és absorbit per la pasta.

Com a conclusió d'aquest apartat, es pot dir que la tirosinasa no s'inactiva quan és incubada durant 4 hores a 30°C i pH 6,8, i el fet d'aplicar-hi pasta en fa incrementar la seva activitat. A més, l'extracte té algun efecte sobre la pasta ja que la pasta l'absorbeix.

13.3.3.3 Assajos sobre la pasta d'eucaliptus: Aplicació de la tirosinasa amb mediadors

En apartats anteriors s'ha vist que la tirosinasa no oxida als mediadors però que tampoc és inactivada per aquests. Així que la presència dels mediadors pot ser que no li faci cap efecte positiu però tampoc no n'hi farà cap de negatiu, per tant s'aplica una etapa T a la pasta d'eucaliptus utilitzant l'NHA i AV com a mediadors en seqüències XTE.

A la Figura 13-10 es presenten els resultats d'índex kappa i blancor després de l'etapa E de la pasta crua inicial així com de les 3 seqüències realitzades, que són la seqüència del blanc (XT_0E) i les dues seqüències on hi ha la tirosinasa amb el mediador corresponent: NHA ($XT_{NHA}E$) i AV (XT_{AVE}).

La seqüència del blanc XT_0E provoca una deslignificació de l'11% respecte la pasta inicial i fa augmentar la blancor 4,6 %ISO degut a l'efecte conjunt del pretractament amb xilanasa, d'estar 4 hores a les condicions de T_0 i de l'extracció alcalina de continuació. Segons els resultats de les seqüències on hi ha la tirosinasa amb el corresponent mediador, l'índex kappa no varia respecte el blanc però la blancor sí que és lleugerament superior (0,4 %ISO superior en $XT_{NHA}E$ i 0,7 %ISO superior en XT_{AVE} respecte el blanc).

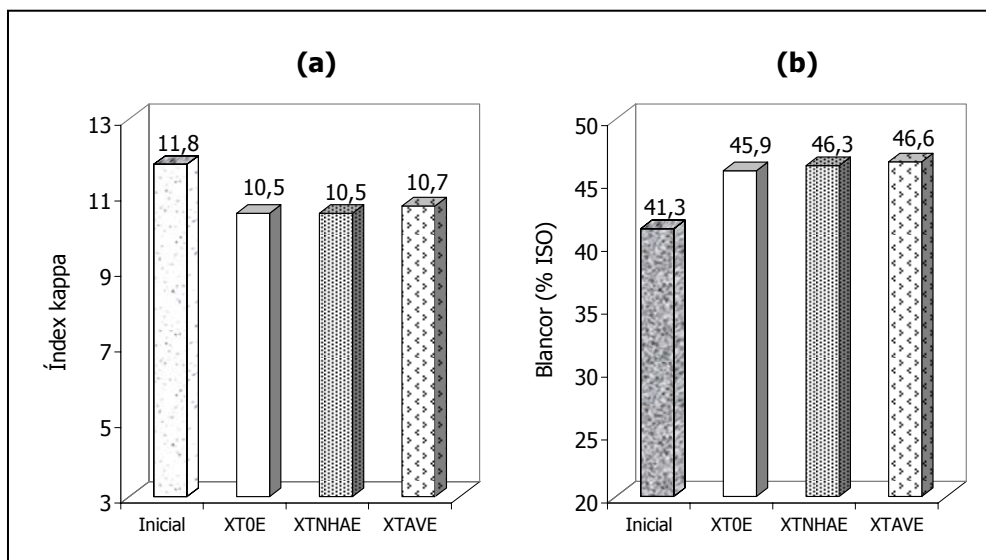


Figura 13-10. Índex kappa (a) i blancor (b) de la pasta inicial i de les tres experiències realitzades

Es pot dir doncs, que el tractament amb tirosinasa no fa disminuir la lignina de la pasta ja que no baixa l'índex kappa, però sí que sembla tenir un lleuger efecte sobre la blancor.

És estrany que augmenti la blancor ja que en principi, si la tirosinasa ha actuat, aquesta forma quinones les quals resulten de l'oxidació dels o-difenols les quals són colorejades, i per tant seria més d'esperar que la blancor de les pastes hagués disminuït. La possible explicació seria que la tirosinasa no ha actuat ja que al no haver-hi L-DOPA no s'ha activat l'activitat monofenolasa o potser perquè no eren les condicions adequades, i els efectes d'augment de blancor serien produïts per l'activitat xilanasa present a l'extracte.

La possible actuació de la tirosinasa en presència d'un mediador és una teoria, però que no ha funcionat amb els mediadors assajats i a les condicions assajades. Per a que la lacasa oxidi el mediador el potencial redox d'aquest ha de ser similar o inferior. El fet que no es pugui determinar el potencial redox de la tirosinasa dificulta la interpretació/justificació dels resultats.

13.3.3.4 Assajos sobre la pasta d'eucaliptus: Aplicació de la tirosinasa amb L-DOPA

Com ja s'ha dit anteriorment, la tirosinasa té una activitat monofenolasa i una activitat difenolasa, el seu mecanisme de reacció no és encara perfectament conegut, però se sap que l'oxidació dels orto-difenols per la tirosinasa implica una cinètica del tipus Michaelis-Menten, mentre que l'oxidació dels monofenols es caracteritza per un període de latència (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Aquesta fase de latència pot ser abolida afegint una feble quantitat d'o-difenols (Espin i Wichers, 2001).

Per aquest motiu es realitzen assajos sobre la pasta afegint una petita quantitat d'L-Dopa (L-dopamina) que és un o-difenol substrat de la tirosinasa ja que aquest podria ser un dels motius pels quals en els tractaments anteriors la tirosinasa no ha funcionat. D'una banda es realitza una etapa amb tirosinasa i L-Dopa (T_D), i d'altra banda es planteja la possibilitat que la tirosinasa actuï com a mediador de la lacasa o d'un sistema lacasa-mediador ja que la tirosinasa podria formar difenols degut a la seva activitat monofenolasa els quals serien oxidats per la lacasa, així, es realitza una etapa amb tirosinasa i L-Dopa afegint lacasa al mateix tractament (T_D+L) i una etapa amb tirosinasa, L-Dopa i el sistema lacasa-mediador utilitzant l'NHA com a mediador (T_D+L_{NHA}).

Per tal d'avaluar els efectes d'aquests tractaments es mesuren les propietats d'índex kappa i blancor després d'una etapa d'extracció alcalina. Els resultats de les tres seqüències realitzades així com de la pasta inicial es mostren a la Figura 13-11. Segons els resultats obtinguts es pot dir que realitzar una etapa amb tirosinasa sola i L-Dopa seguit d'una etapa d'extracció alcalina (seqüència T_{DE}) produeix disminució de l'Ik respecte la pasta inicial (1,8 unitats) però no produeix cap efecte en la blancor. Al afegir lacasa al tractament (seqüència T_{D+LE}) l'Ik disminueix lleugerament respecte la pasta inicial (0,5 unitats) i la blancor també disminueix (1%ISO); d'altra banda, si s'afegeix lacasa i NHA (seqüència $T_{D+L_{NHA}E}$) és on es produeixen més efectes ja que l'Ik disminueix (2,6 unitats respecte l'inicial) i la blancor augmenta el 3,8%ISO.

D'aquests resultats es pot dir que sembla que la tirosinasa produeixi algun efecte sobre la pasta ja que quan és aplicada sola es produeix una disminució de l'Ik. D'altra banda, quan s'afegeix lacasa al tractament disminueix l'efecte que es produeix en l'Ik i també disminueix la blancor de la pasta, aquest comportament és degut probablement a que s'han format quinones que queden a la pasta i li donen color. Per últim, quan s'ha afegit lacasa i NHA al tractament amb tirosinasa i L-Dopa, és on es produeix més efecte en disminuir l'Ik i en augmentar la blancor, però l'efecte és inferior al que es produeix quan el sistema L_{NHA} sense tirosinasa ni L-Dopa s'aplica sobre la pasta tal

com s'ha obtingut al capítol 12 on amb un tractament L_{NHA} a pH 4 s'obté un Ik de 8,4 i una blancor del 48,6%ISO, aquest comportament és degut a que s'han format quinones potser a causa de l'L-Dopa.

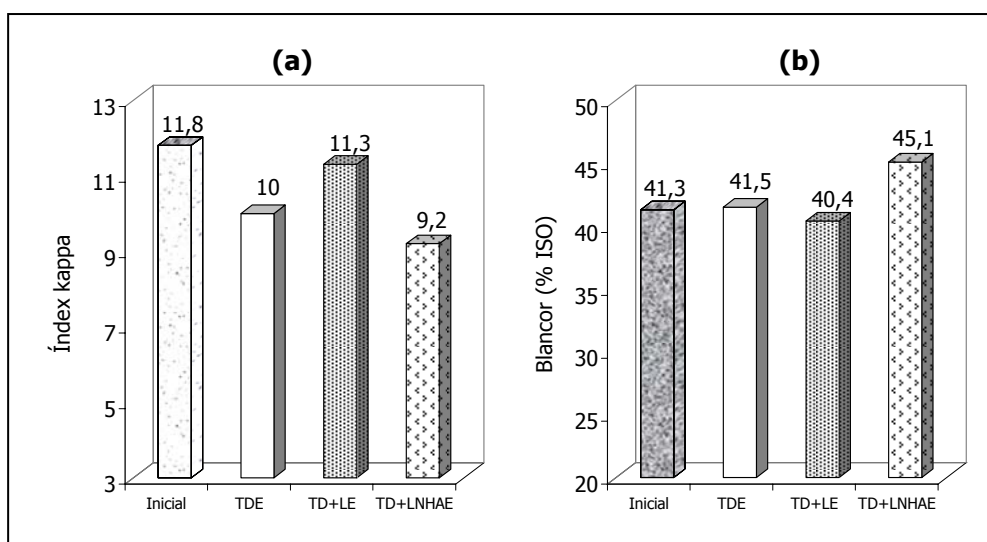


Figura 13-11. Índex kappa (a) i blancor (b) de la pasta inicial i dels tres tractaments amb tirosinasa i L-Dopa

Per tal de poder extreure conclusions d'aquests tractaments s'hauria de realitzar una etapa amb peròxid d'hidrogen (P) posterior per tal d'extreure les quinones que s'haurien format.

13.4 CONCLUSIONS

S'ha aconseguit produir suficient quantitat de tirosinasa en fermentador a partir d'*Aspergillus niger* fent créixer el fong en un fermentador durant tretze dies. Al llarg dels dies se segueix l'evolució de la producció de tirosinasa mesurant les activitats di i monofenolasa al mateix temps que se segueix l'evolució de la producció de proteïnes. Per electroforesi SDS-Page es mostra que la tirosinasa no és la única proteïna produïda per *A. Niger* però sí que n'és una de les majoritàries.

Una vegada es disposa de suficient quantitat de tirosinasa s'avalua la capacitat d'aquesta de deslignificar i blanquejar la pasta kraft d'eucaliptus. D'una banda es planteja la possibilitat que aquesta pugui actuar a través d'un sistema tirosinasa-mediador, i per això primer de tot s'estudia si la tirosinasa és capaç d'oxidar els mediadors HBT, NHA i AV que són coneguts mediadors i efectius per la lacasa. S'obté

que la tirosinasa no oxida els mediadors assajats ja que espectrofotomètricament no s'observa la formació del corresponent radical. En els assajos d'estabilitat de la tirosinasa durant les condicions d'aplicació sobre la pasta (T) s'observa que aquesta es manté estable i que la presència de pasta en fa augmentar la seva activitat, a més, la pasta absorbeix l'extracte a l'interior. Un tractament T amb NHA o AV sobre pasta no produeix deslignificació de la pasta tot i que la blancor augmenta lleugerament.

D'altra banda, també es planteja la possibilitat que la tirosinasa pugi actuar com un mediador de la lacasa o del sistema lacasa-mediador, i per això s'aplica la tirosinasa en presència d'L-Dopa i de lacasa i NHA. En aquests tractaments es produeixen efectes en disminuir l'Ik i en augmentar la blancor tot i que la formació de quinones dificulta la interpretació dels resultats.

La utilització de la tirosinasa en diferents aplicacions biotecnològiques ha estat ja descrita però aquest treball correspon al primer estudi preliminar d'aplicació de tirosinasa en el blanqueig de pasta de paper. Tot i que els resultats no han estat del tot satisfactoris, cal continuar la recerca provant altres mediadors i/o altres condicions d'aplicació.

13.5 REFERÈNCIES

- Ander, P. i Messner, K. (1998) Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques* 12(3):191-195.
- Arora, D.S. i Gill, P.K. (2001) Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 28(7-8):602-605.
- 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.
- Espin, J.C. i Wichers, H.J. (2001) Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544:289-300.
- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.C., Asther, M. i Lomascolo, A. (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology* 98:332-343.
- Halaouli, S., Record, E., Casalat, L., Hamdi, M., Sigoillot, J., Asther, M. i Lomascolo, A. (2006) Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot

fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:580-589.

Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. i Asther, M. (2000) Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters* 183(2):301-306.

Kurahashi, Y. and Pontzen, R. (1998) Carpropamid: a new melanin biosynthesis inhibitor. *Pflanzenschutz-Nachr Bayer* 51:245-256.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lomascolo, A., Cayol, J.L., Roche, M., Guo, L., Robert, J.L., Record, E., Lesage-Meessen, L., Ollivier, B., Sigoillot, J.C. i Asther, M. (2002) Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycological Research* 106:1193-1203.

Oxley, P.W., Adger, B.M. i Sasse, M.J. (1989) N-acetyl-N-phenyl-hydroxylamine via catalytic transfer hydrogenation of nitrobenzene using hydrazine and rhodium on carbon. *Organic Syntheses* 67:187-191.

Poppius-Levlin, K., Tamminen, T., Kalliola, A. i Ohra-Aho, T. (2001) Characterization of residual lignins in pulps delignified by laccase/N-hydroxyacetanilide. *ACS Symposium Series* 785:358-372.

Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F. i Garcia-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimia et Biophysica Acta* 1247:1-11.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M. i Machonkin, T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96:2563-2605.