

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS POR OXIDACIÓN DE LIGNINA CON LACASA INMOVILIZADA EN ALGINATO

OBTAINING AROMATIC COMPOUNDS THROUGH LIGNIN OXIDATION WITH LACCASE IMMOBILIZED IN ALGINATE

Ayerim Domínguez-González¹, Rosa Hernández-Soto^{1*}, J. Manuel Salgado-Román¹,
A. Nelly Ardila-Arias², J. Alfredo Hernández-Maldonado¹

¹Instituto Politécnico Nacional, UPIIG, Avenida Mineral de Valenciana No. 200 Fraccionamiento Industrial Puerto Interior, Silao de Victoria, Guanajuato México, C.P.

²Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Cra. 48, No.7-151, Medellín-Colombia. (autor:rosyhdez@yahoo.com)

RESUMEN

La lignina es un biopolímero abundante en la naturaleza, por su estructura polimérica es una fuente potencial de compuestos aromáticos con alto valor añadido en la industria química, alimentaria y farmacéutica. La lignina puede aprovecharse con procedimientos químicos y biológicos que la despolimerizan de forma gradual y selectiva. Las peroxidases y lacasas son enzimas usadas como agentes oxidantes en procesos de despolimerización oxidativa; pero el uso de H₂O₂ como aceptor secundario de electrones para incrementar el efecto oxidante de lacasa inmovilizada no se ha reportado. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad catalítica de lacasa inmovilizada (1.25 mUI) en perlas de alginato, con diámetro de partícula (Dp) de 3 mm, para obtener compuestos aromáticos por oxidación de lignina. Las reacciones se mantuvieron con agitación y temperatura controlada, el pH se varió y como aceptor secundario de electrones se utilizó H₂O₂. El diseño experimental fue factorial 3x4: tres valores de pH (5.8, 6.5 y 8.6) y cuatro concentraciones de H₂O₂ (25, 50, 75 y 100 mM); las pruebas se realizaron por triplicado. Con los datos se realizó ANDEVA y pruebas de comparación de medias (Tukey, p≤0.05). Con pH de 8.6 se obtuvo la mayor conversión de lignina a compuestos aromáticos: ácido benzoico (63.5 %), ácido vainillínico (25 %) y vainillina (11.5 %). El soporte de inmovilización de la enzima se desintegró y se disolvió en el medio en las reacciones catalizadas con pH superior a 7.0. Los resultados permiten sugerir que el grado de despolimerización de lignina con lacasa inmovilizada depende directamente de la concentración de H₂O₂ y del pH del medio.

ABSTRACT

Lignin is an abundant biopolymer in nature; because of its polymeric structure, it is a potential source of aromatic compounds with high added value in the chemical, food and pharmaceutical industries. Lignin can be used with chemical and biological procedures that depolymerize it in a gradual and selective manner. Peroxidases and laccases are enzymes used as oxidizing agents in processes of oxidative depolymerization; however, the use of H₂O₂ as secondary electron acceptor to increase the oxidizing effect of immobilized laccase is not reported so far. The objective of this study was to evaluate the catalytic capacity of laccase (1.25 mUI) immobilized in alginate pearls, with a particle diameter (Dp) of 3 mm, in order to obtain aromatic compounds from lignin oxidation. The reactions were kept with agitation and controlled temperature, the pH varied and H₂O₂ was used as secondary electron acceptor. The experimental design was factorial 3 x 4: three pH values (5.8, 6.5 and 8.6) and four concentrations of H₂O₂ (25, 50, 75 and 100 mM); the trials were performed in triplicate. ANDEVA was carried out with the data as well as means comparison tests (Tukey, p≤0.05). The highest conversion of lignin to aromatic compounds was obtained with a pH of 8.6: benzoic acid (63.5 %), vanillic acid (25 %) and vanillin (11.5 %). The immobilizing support for the enzyme was disintegrated and dissolved in the medium in the reactions catalyzed with a pH over 7.0. The results allow suggesting that the degree of lignin depolymerization with immobilized laccase depends directly on the concentration of H₂O₂ and the medium's pH.

Key words: laccase, lignin, enzyme degradation, immobilization, benzoic acid.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2016. Aprobado: septiembre, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 191-202. 2018.

Palabras clave: lacasa, lignina, degradación enzimática, inmovilización, ácido benzoico.

INTRODUCCIÓN

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas, es una macromolécula fenólica, está unida covalentemente a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, como hemicelulosas y pectinas (Johansson *et al.*, 2014). La estructura química de la lignina (Figura 1) consiste principalmente de tres unidades fenilpropanoides: alcohol coniferílico, cumárico y sinapílico (Bai *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014). Por su naturaleza polimérica es una fuente potencial de compuestos aromáticos, con valor agregado, que pueden emplearse en la industria alimenticia para la producción de vainillina y ácido vainillínico (Nagar *et al.*, 2010; Menon y Rao, 2011; Eudes *et al.*, 2014; Volokitina *et al.*, 2015) y la industria farmacéutica para la síntesis química de guayacol y catecol (Collinson y Thielemans, 2010; Menon y Rao, 2011).

INTRODUCTION

Lignin is one of the most abundant biopolymers in plants, it is a phenolic macromolecule, and is united covalently to cellulose and other polysaccharides of the cell wall, such as hemicelluloses and pectins (Johansson *et al.*, 2014). The chemical structure of lignin (Figure 1) consists primarily of three phenylpropanoid units: coniferyl, cumaric and sinapyl alcohol (Bai *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014). Because of its polymeric nature, it is a potential source of aromatic compounds with added value, which can be used in the food industry for the production of vanillin and vanillic acid (Nagar *et al.*, 2010; Menon and Rao, 2011; Eudes *et al.*, 2014; Volokitina *et al.*, 2015); and in the pharmaceutical industry for the chemical synthesis of guaiacol and catechol (Collinson and Thielemans, 2010; Menon and Rao, 2011).

In order to transform lignin, chemical and biological procedures were developed and depolymerize it in a selective and gradual manner. Among these there is the use of inorganic catalyzers,

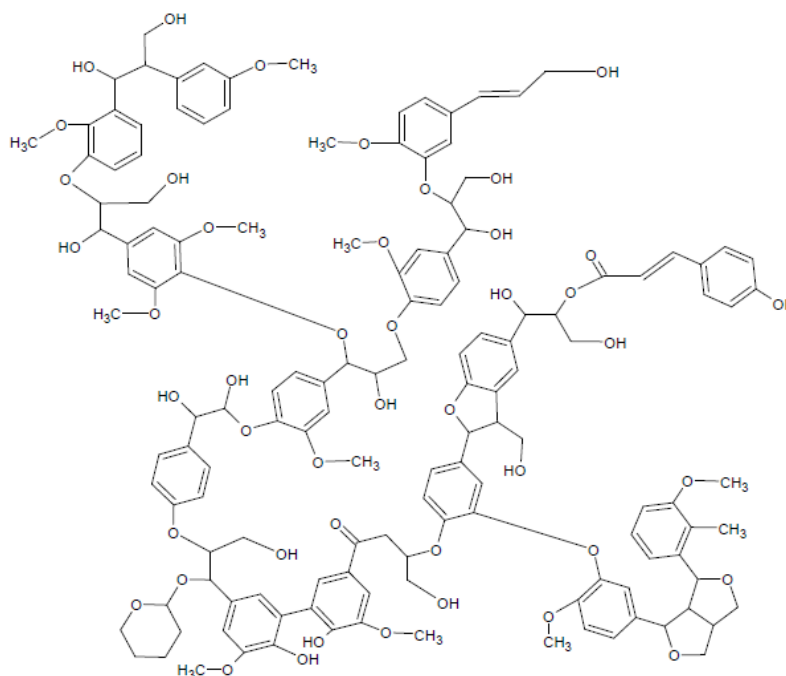


Figura 1. Estructura de la lignina (Jin *et al.*, 2014).
Figure 1. Structure of lignin (Jin *et al.*, 2014).

Para transformar la lignina se han desarrollado procedimientos químicos y biológicos que la despolimerizan de forma selectiva y gradual. Entre ellos está el uso de catalizadores inorgánicos, como MnO_2 , $\text{Zr}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ y $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (Collinson y Thielemans, 2010; Doherty y Mousavioun, 2010; Zhang *et al.*, 2014); no obstante, la catálisis heterogénea tiende a generar otros productos que deben purificarse para su uso. La degradación de lignina también se ha realizado con *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyanthus stercoreus* y *Phlebia radiata* (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006), que producen enzimas, principalmente lacasas y peroxidases, que catalizan la separación de los enlaces entre las subunidades de la lignina y causan su despolimerización gradual (Collinson y Thielemans, 2010).

Las lacasas (benzenediol:oxígeno oxidoreductasas E.C. 1.10.3.2) catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, utilizan oxígeno molecular como aceptor de electrones, y también oxidan ácidos metoxifenólicos (Forte *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2014), descarboxilan y degradan sus grupos metoxilo por desmetilación o desmetoxilación (Solomon *et al.*, 1996; Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006; Moilanen *et al.*, 2011; Polak y Jarosz, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2015). Algunas lacasas utilizan transportadores de electrones, para su acción catalítica, y otras no (Arana *et al.*, 2002; Ganachaud *et al.*, 2008; Forte *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2013). El objetivo de este estudio fue determinar si H_2O_2 , como mediador en el transporte de electrones, favorece la capacidad catalítica de lacasa inmovilizada en la despolimerización de lignina. La hipótesis fue que H_2O_2 , como aceptor secundario de electrones, incrementa el efecto oxidante de lacasa inmovilizada en alginato, en compuestos fenólicos y no fenólicos de lignina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los compuestos como ácido benzoico, ácido vainillínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, hidroquinona y vainillina (Sigma-Aldrich), lacasa de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2, 1.25 mIU, CAS 80498-15-3) y lignina (CAS 8068-05-1), y los demás, utilizados en el estudio fueron grado analítico o grado cromatográfico.

such as MnO_2 , $\text{Zr}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ and $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (Collinson and Thielemans, 2010; Doherty and Mousavioun, 2010; Zhang *et al.*, 2014); however, heterogeneous catalysis tends to generate other products that must be purified for their use. The degradation of lignin was also performed with *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyanthus stercoreus* and *Phlebia radiata* (Dávila and Vázquez-Duhalt, 2006), which produce enzymes, primarily laccases and peroxidases, which catalyze the separation of bonds between the subunits of lignin and cause their gradual depolymerization (Collinson and Thielemans, 2010).

Laccases (benzenediol:oxígeno oxidoreductasas E.C. 1.10.3.2) catalyze the oxidation of phenolic compounds and aromatic amines; they use molecular oxygen as an acceptor of electrons, and also oxidize methoxyphenolic acids (Forte *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2014), decarboxylize and degrade their methoxy groups from demethylation or demethoxylation (Solomon *et al.*, 1996; Dávila and Vázquez-Duhalt, 2006; Moilanen *et al.*, 2011; Polak and Jarosz, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2015). Some laccases use electron transporters for their catalytic action, and others do not (Arana *et al.*, 2002; Ganachaud *et al.*, 2008; Forte *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2013). The objective of this study was to determine if H_2O_2 , as mediator in electron transport, favors the catalytic capacity of immobilized laccase in the depolymerization of lignin. The hypothesis was that H_2O_2 , as secondary acceptor of electrons, increases the oxidizing effect of laccase immobilized in alginate, in phenolic and non-phenolic lignin compounds.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The compounds like benzoic acid, vanillic acid, *p*-cumaric acid, ferulic acid, hydroquinone and vanillin (Sigma-Aldrich), laccase from *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2, 1.25 mIU, CAS 80498-15-3) and lignin (CAS 8068-05-1), and the others used in the study were of analytic grade or chromatographic grade.

Preparation and activation of the alginate pearls

The sodium alginate pearls, with diameter of 3 mm, were prepared with the method by Pal and Khanum (2011). Two grams of the compound were dissolved in 100 mL of hot

Preparación y activación de las perlas de alginato

Las perlas de alginato de sodio, con diámetro de 3 mm, se prepararon con el método de Pal y Khanum (2011). Dos gramos del compuesto se disolvieron en 100 mL de agua desionizada caliente y para formar las perlas la solución se vertió por goteo en 0.2 M CaCl₂ a 4 °C. Para endurecerlas, las perlas se almacenaron 24 h en 0.02 M CaCl₂ a 4 °C. Luego, las perlas se separaron al filtrar la solución de CaCl₂ y se lavaron con agua desionizada, en proporción de 10 veces el volumen de CaCl₂. Para asegurar su activación las perlas se transfirieron a una solución de glutaraldehído al 9 % (v/v) y amortiguador de citrato (pH 5.0) y se mantuvieron en agitación por 90 min. Las perlas se almacenaron en glutaraldehído al 9 % (v/v) con amortiguador de citrato, a 4 °C por 24 h.

Determinación de actividad enzimática

La actividad de la lacasa se determinó por oxidación de ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato en amortiguador de acetato (0.1 M y pH 5) a 50 °C. En un tubo de ensayo se mezclaron 2.85 mL de la solución 0.5 mM de ABTS, solubilizado en amortiguador de acetato y 0.15 mL de enzima, se mantuvo 1 h a 30 °C. La reacción se detuvo en baño de hielo y la absorbancia se leyó a 420 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Jenway, model 6715). Una unidad de lacasa (mIU mL⁻¹) se definió como 1 μmol de ABTS oxidado por minuto (Childs y Bardsley, 1975).

Inmovilización de lacasa

Las perlas se separaron por filtración de la solución de glutaraldehído con amortiguador de citrato y se lavaron con agua desionizada. Luego, se colocaron en una solución de lacasa (1.25 mIU mL⁻¹), con agitación vigorosa por 1.5 h a temperatura ambiente. Las perlas de alginato con la enzima inmovilizada se almacenaron a 4 °C hasta su utilización (She *et al.*, 2010).

Activación biocatalítica de la enzima

Las perlas de alginato con enzima inmovilizada se transfirieron a amortiguador de fosfatos, al pH deseado (5.8, 6.5 y 8.6) y se adicionó solución de lignina (80 g), solubilizada previamente, a temperatura ambiente, en 100 mL de agua desionizada, a cada tratamiento. Inmediatamente se agregó la solución de H₂O₂, en las concentraciones establecidas, se inició la reacción enzimática a 25 °C y agitación (150 rpm) en un agitador orbital (ZHCHENE, ZHWY-200D model). La reacción se mantuvo por 24 h; cada 1.5 h se realizó un muestreo, y para cada muestra se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis (Janshekar *et al.*, 1981).

deionized water, and to form the pearls the solution was poured by dripping in 0.2 M CaCl₂ at 4 °C. To harden them, the pearls were stored for 24 h in 0.02 M CaCl₂ at 4 °C. Then, the pearls were separated by filtering the CaCl₂ solution and washed with deionized water in a proportion of 10 times the volume of CaCl₂. To ensure their activation, the pearls were transferred to a solution of glutaraldehyde at 9 % (v/v) and citrate buffer (pH 5.0) and were kept in agitation for 90 min. The pearls were stored in glutaraldehyde at 9 % (v/v) with citrate buffer at 4 °C for 24 h.

Determination of enzymatic activity

The activity of laccase was determined by oxidation of ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonate in acetate buffer (0.1 M and pH 5) at 50 °C. In a test tube, 2.85 mL of the 0.5 mM ABTS solution and 0.15 mL of enzyme were mixed in an acetate buffer, and kept for 1 h at 30 °C. The reaction was stopped by ice bath and the absorbance was read at 420 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Jenway, model 6715). One unit of laccase (mIU mL⁻¹) was defined as 1 μmol of ABTS oxidized per minute (Childs and Bardsley, 1975).

Immobilization of laccase

The pearls were separated by filtering of the glutaraldehyde solution with citrate buffer, and washed with deionized water. Then, they were placed in a solution of laccase (1.25 mIU mL⁻¹), with vigorous agitation for 1.5 h at room temperature. The alginate pearls with the immobilized enzyme were stored at 4 °C until their use (She *et al.*, 2010).

Biocatalytic activation of the enzyme

The alginate pearls with immobilized enzyme were transferred to phosphate buffer, at the desired pH (5.8, 6.5 and 8.6), and lignin solution was added (80 g), previously solubilized at room temperature, in 100 mL of deionized water, for each treatment. Immediately the solution of H₂O₂ was added, in the concentrations established, the enzymatic reaction began at 25 °C and agitation (150 rpm) in an orbital agitator (ZHCHENE, ZHWY-200D model). The reaction was kept for 24 h; every 1.5 h a sample was taken, and the absorbance was determined for each sample in the UV-Vis spectrophotometer (Janshekar *et al.*, 1981).

Catalytic activity controls

Two controls were included in each experimental process. These, according to what was established in the experimental

Controles de actividad catalítica

En cada proceso experimental se incluyeron dos testigos. Estos, de acuerdo a lo establecido en el diseño de experimentos, sin lacasa inmovilizada. El testigo sin H₂O₂ se mantuvo en las condiciones de reacción establecidas en el diseño de experimentos.

Cuantificación del consumo de H₂O₂

Solución 0.1 M de KMnO₄ se calentó hasta ebullición. De forma simultánea, una alícuota de 0.25 mL de agua oxigenada se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL y se aforó con agua desionizada. Luego, una alícuota de 1.25 mL de la solución de agua oxigenada se transfirió a un vaso de precipitado, se adicionaron 0.15 mL de H₂SO₄ 6 M y 1.25 mL de agua desionizada y se calentó a 60 °C. La titulación volumétrica de la solución de H₂O₂, con la solución estandarizada de permanganato, se mantuvo hasta la aparición de un color rosado permanente (Sant, 1956).

Cromatografía de capa fina

Para la separación preparativa por cromatografía de capa fina (CCF), de los productos de reacción, se utilizaron placas con gel de sílice (0.25 mm de espesor y 5 × 10 cm) como fase estacionaria e indicador de fluorescencia UV₂₅₄ (Merck AG, Darmstadt, Alemania); antes de usarse se calentaron (activaron) a 40 °C, por 1 h. La fase móvil fue agua: metanol (50 / 50, v / v) grado cromatográfico. Cincuenta mL de muestras y soluciones estándar de ácido benzoico, ácido vainillínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, hidroquinona y vainillina se aplicaron en diferentes carriles individuales de la placa. Antes de eluir, la cámara se saturó por 15 min, al finalizar la elución las placas se mantuvieron a 25-30 °C hasta la evaporación completa del disolvente, luego se observaron bajo luz ultravioleta, y la trayectoria de las muestras se detectó por fluorescencia. El factor de retención se calculó con la relación:

Factor de retención (Fr) = distancia recorrida por el estándar o la muestra / distancia recorrida por el disolvente.

Cuantificación de productos de reacción

Los productos de la reacción de despolimerización de lignina se cuantificaron con curvas de calibración de estándares de ácidos benzoico, vainillínico, *p*-cumárico y ferúlico, e hidroquinona y vainillina, en soluciones de hasta 2.5 mM. La absorbancia máxima de cada compuesto se determinó previamente en espectrofotómetro UV-Vis (Jenway, 6715), entre 250 y 350 nm.

design, without immobilized laccase. The control without H₂O₂ was kept under the conditions of reaction established in the experimental design.

Quantification of H₂O₂ consumption

The solution 0.1 M of KMnO₄ was heated up to boiling. Simultaneously, an aliquot of 0.25 mL of oxygenated water was transferred to a volumetric flask of 5 mL and was gauged with deionized water. Then, an aliquot of 1.25 mL of the oxygenated water solution was transferred to a precipitate cup, 0.15 mL of H₂SO₄ 6 M and 1.25 mL of deionized water were added, and this was heated at 60 °C. The volumetric titling of the H₂O₂ solution with the standardized permanganate solution was continued until the appearance of a permanent pink color (Sant, 1956).

Thin layer chromatography

For the preparative separation by thin layer chromatography (TLC) of the reaction products, silica gel plates (0.25 mm of thickness and 5 × 10 cm) were used as stationary phase and indicator of UV₂₅₄ fluorescence (Merck AG, Darmstadt, Germany); before using, they were heated (activated) at 40 °C, for 1 h. The mobile phase was water: methanol (50 / 50, v/v) chromatographic degree. Fifty mL of samples and standard solutions of benzoic acid, vanillic acid, *p*-cumaric acid, ferulic acid, hydroquinone and vanillin were applied in different individual lanes of the plate. Before eluting, the chamber was saturated for 15 min, at the end of the elution the plates were kept at 25-30 °C until complete evaporation of the solvent, then they were observed under ultraviolet light, and the trajectory of the samples was detected through fluorescence. The retention factor was calculated with the following relation:

Retention factor (Fr) = distance travelled by the standard or the sample / distance travelled by the solvent.

Quantification of reaction products

The products of the lignin depolymerization reaction were quantified with calibration curves of standards of benzoic, vanillic, *p*-cumaric and ferulic acids, and hydroquinone and vanillin, in solutions of up to 2.5 mM. The maximum absorbance of each compound was previously determined in UV-Vis spectrophotometer (Jenway, 6715), between 250 and 350 nm.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was factorial 3 × 4: three levels of pH (5.8, 6.5 and 8.6) and four levels of H₂O₂ concentration (25,

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue un factorial 3 x 4: tres niveles de pH (5.8, 6.5 y 8.6) y cuatro niveles de concentración de H₂O₂ (25, 50, 75 y 100 mM), las pruebas se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron con ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con MINITAB 16 (Minitab Inc. State College, Pennsylvania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La despolimerización de la lignina aumentó de manera proporcional con el pH del medio (Figuras 2 a 4). Con pH superior a 7.0 el soporte de inmovilización se desintegró y esto permitió que la lacasa se solubilizara en el medio y aumentara su actividad (Figura 4); así, a pH de 8.6 la concentración de derivados de lignina fue mayor que a pH 5.8 y 6.5. En estos últimos la enzima permaneció inmovilizada. Los rendimientos mayores de conversión fueron ácido benzoico 63.5 %, ácido vainillínico 25 % y vainillina 11.5 % y se obtuvieron a pH 8.6. El rendimiento de vainillina es comparable al 8.5 y 11.5 % reportados por Crestini *et al.* (2006), con metiltrioxorenio (MeReO₃) como catalizador y H₂O₂ como donador de oxígeno; pero, superó al 1.5 % reportado por Zheng *et al.* (2014), con zeolita como catalizador. Esto permite sugerir que la despolimerización de lignina con lacasa es factible.

50, 75 and 100 mM); the tests were carried out by triplicate. The results were analyzed with ANDEVA and the Tukey means comparison test ($p \leq 0.05$), with MINITAB 16 (Minitab Inc. State College, Pennsylvania).

RESULTS AND DISCUSSION

The depolymerization of lignin increased proportionally with the pH of the medium (Figures 2 to 4). With a pH higher than 7.0 the immobilization support was disintegrated and this allowed the laccase to be solubilized in the medium and to increase its activity (Figure 4); thus, at a pH of 8.6 the concentration of lignin derivatives was higher than at pH 5.8 and 6.5. In the latter, the enzyme remained immobilized. The higher yields of conversion were for benzoic acid 63.5 %, vanillic acid 25 %, and vanillin 11.5 %, and were obtained at pH 8.6. The yield of vanillin is comparable at 8.5 and 11.5 % reported by Crestini *et al.* (2006), with methyltrioxorhenium (MeReO₃) as catalyzer and H₂O₂ as oxygen donor; however, it exceeded the 1.5 % reported by Zheng *et al.* (2014), with zeolite as catalyzer. This allows suggesting that the depolymerization of lignin with laccase is feasible.

In the control reactions lignin oxidation was not observed with any pH or concentration of H₂O₂, which is why the oxidative power of the H₂O₂ decreased in these reactions, probably as a result of the

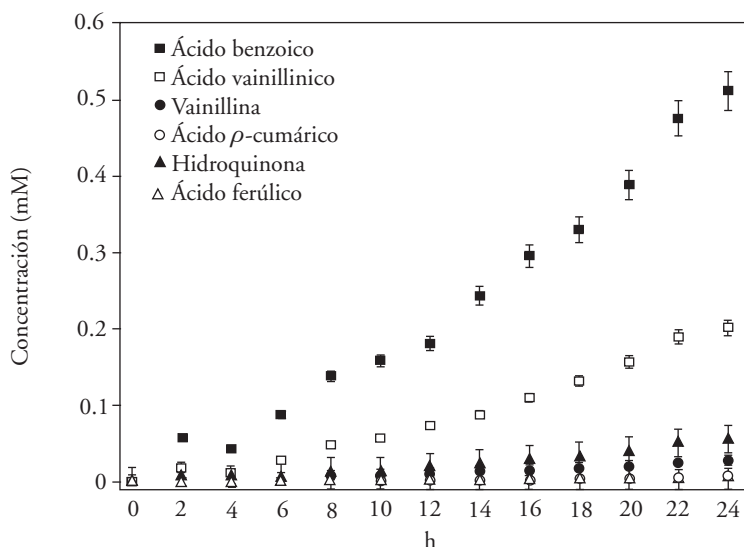


Figura 2. Producción de derivados de lignina a pH 5.8 y H₂O₂ 75 mM.
Figure 2. Production of lignin derivatives at pH 5.8 and H₂O₂ 75 mM.

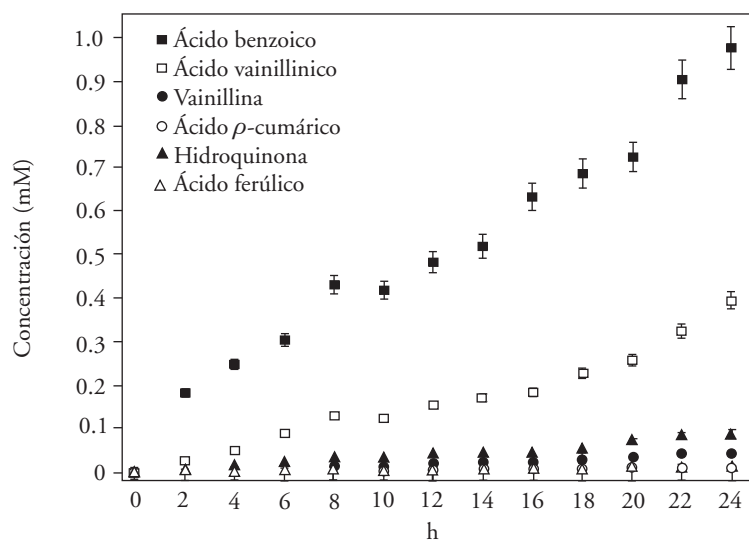


Figura 3. Producción de derivados de lignina a pH 6.5 y H₂O₂ 75 mM.
Figure 3. Production of lignin derivatives at pH 6.5 and H₂O₂ 75 mM.

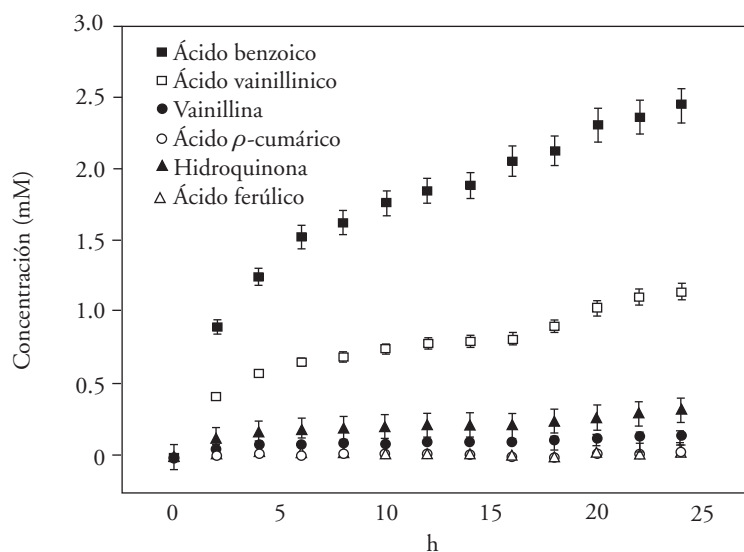


Figura 4. Producción de derivados de lignina a pH 8.6 y H₂O₂ 75 mM.
Figure 4. Production of lignin derivatives at pH 8.6 and H₂O₂ 75 mM.

En las reacciones testigo no se observó oxidación de lignina con ningún pH ni concentración de H₂O₂, por lo cual el poder oxidativo del H₂O₂ disminuyó en estas reacciones, probablemente por la concentración elevada de H₂O₂. De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2008), este compuesto en exceso captura radicales hidroxilo, lo que disminuye su capacidad oxidativa;

high concentration of H₂O₂. According to Rodríguez *et al.* (2008), this compound in excess captures hydroxyl radicals, which decreases their oxidative capacity; in addition, the speed of degradation of the H₂O₂ is also low, compared to some complex substances, which is why its use in combination with other oxidants is recommended.

además, la velocidad de degradación del H_2O_2 también es baja respecto a algunas sustancias complejas, por lo cual se recomienda usar en combinación con otros oxidantes.

La desintegración del soporte de inmovilización permitió que la enzima se solubilizara y el efecto de la concentración de H_2O_2 fue poco significativo (Figura 5), ya que la concentración de ácido benzoico, derivado principal de lignina en las reacciones catalizadas con lacasa, prácticamente se mantuvo constante, independiente de la concentración de H_2O_2 . En contraste, en las reacciones en las que la enzima permaneció inmovilizada la producción mayor de derivados de lignina dependió de la concentración de H_2O_2 ; así, a pH 5.8 la producción mayor se obtuvo con 75 mM de H_2O_2 (Figura 6) y a pH 6.5 con 50 mM (Figura 7). Esto se debió a que la capacidad oxidativa del H_2O_2 es dependiente de pH, temperatura, concentración y tiempo de reacción. Por esto, conviene establecer la dosis óptima de H_2O_2 . Lo anterior confirmó que el pH del medio puede regular la deslignificación por oxidación. Al respecto, Ruuttunem y Vuorinen (2005) evaluaron catalizadores diferentes en la misma reacción y determinaron que la reactividad relativa de los catalizadores con los grupos fenólicos en la lignina incrementó al disminuir el pH.

The disintegration of the immobilization support allowed for the enzyme to be solubilized and the effect of the H_2O_2 concentration was scarcely significant (Figure 5), since the concentration of benzoic acid, main derivative of lignin in the reactions catalyzed with laccase remained practically constant, independent of the H_2O_2 concentration. In contrast, in the reactions where the enzyme remained immobilized the higher production of lignin derivatives depended on the H_2O_2 concentration; thus, at pH of 5.8 the highest production was obtained with 75 mM de H_2O_2 (Figure 6) and at pH of 6.5 with 50 mM (Figure 7). This is because the oxidative capacity of the H_2O_2 depends on pH, temperature, concentration and reaction time. Therefore, it is convenient to establish the optimal dose of H_2O_2 . This confirmed that the medium's pH is able to regulate the delignification through oxidation. In this regard, Ruuttunem and Vuorinen (2005) evaluated different catalyzers in the same reaction and determined that the relative reactivity of the catalyzers with the phenolic groups in lignin increased when the pH decreased.

Although the higher yields of lignin conversion were obtained with solubilized enzyme, and that the H_2O_2 concentration did not affect the catalytic activity of the enzyme significantly, it is possible to

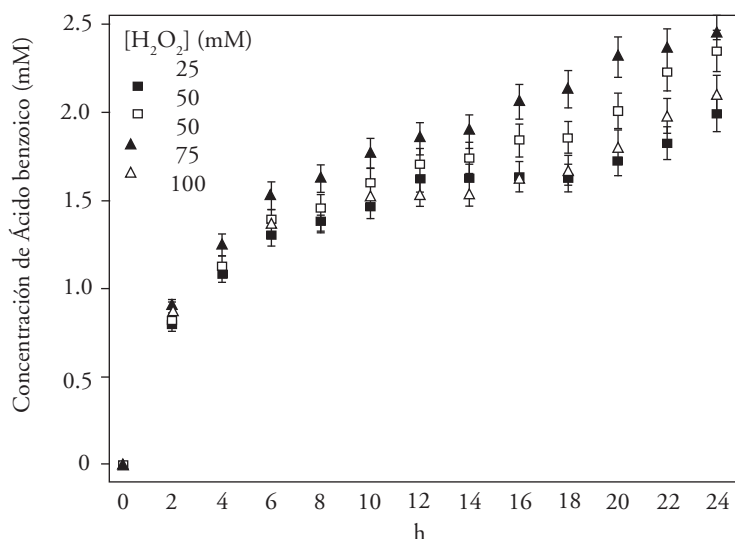


Figura 5. Efecto de la concentración de H_2O_2 en la producción de ácido benzoico a pH 8.6, con enzima soluble.

Figure 5. Effect of H_2O_2 concentration on the production of benzoic acid at pH of 8.6, with soluble enzyme.

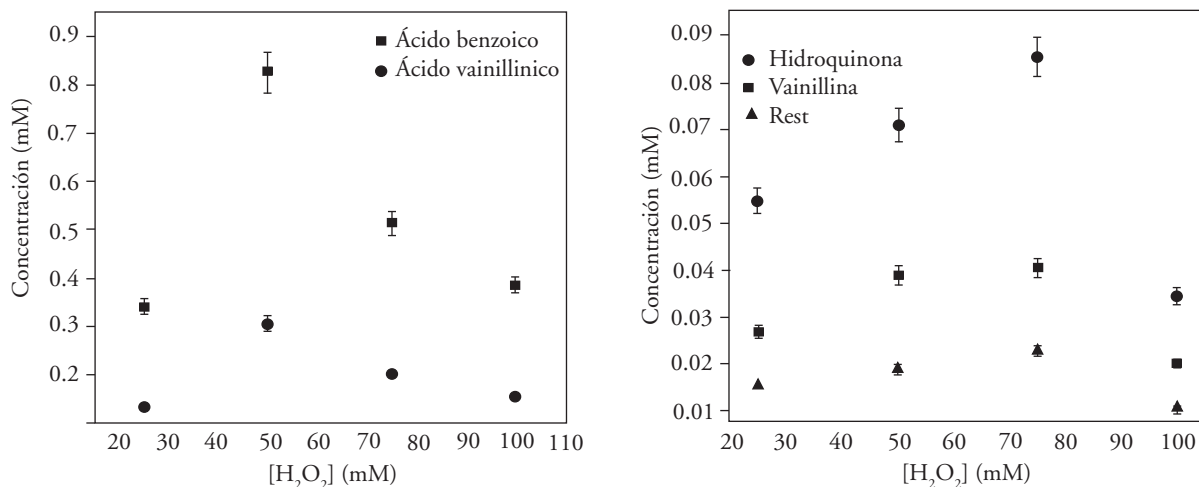


Figura 6. Efecto de la concentración de H_2O_2 en la producción de derivados de lignina a pH 5.8.
Figure 6. Effect of H_2O_2 concentration on the production of lignin derivatives at pH of 5.8.

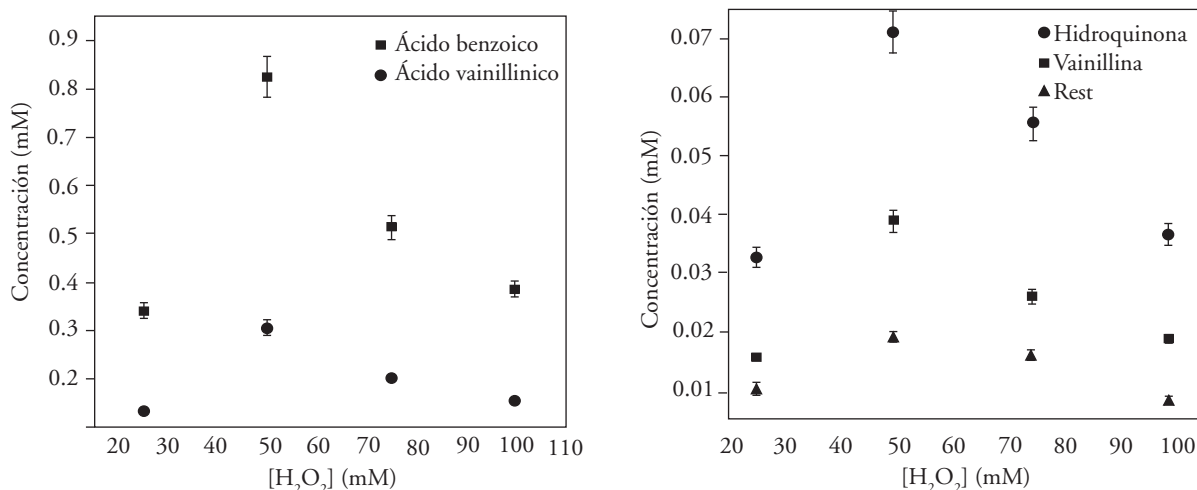


Figura 7. Efecto de la concentración de H_2O_2 en la producción de derivados de lignina a pH 6.5.
Figure 7. Effect of H_2O_2 concentration on the production of lignin derivatives at pH of 6.5.

A pesar de que los rendimientos mayores de conversión de lignina se obtuvieron con la enzima solubilizada y que la concentración de H_2O_2 no afectó significativamente la actividad catalítica de la enzima, es posible inferir actividad sinérgica de la lacasa con el H_2O_2 , ya que en las reacciones con la enzima inmovilizada se observó correlación directa entre el pH de la reacción y la concentración de H_2O_2 utilizada. Es decir, a mayor pH la concentración de H_2O_2 necesaria para mediar la catálisis de lignina será menor. Por lo tanto, la concentración de H_2O_2 necesaria para mediar la reacción a pH de 8.6 puede ser menor a 25 mM H_2O_2 . También debe

infer synergetic activity of laccase with H_2O_2 , since a direct correlation was observed in the reactions with the immobilized enzyme between the pH of the reaction and the concentration of H_2O_2 used. That is, at higher pH the concentration of H_2O_2 necessary to mediate the lignin catalysis will be lower. Therefore, the H_2O_2 concentration necessary to mediate the reaction at pH of 8.6 can be lower than 25 mM H_2O_2 . It should also be considered that the immobilized enzymes show lower catalytic activity than the soluble enzyme and this allows explaining partially the fact that in the reactions at pH of 8.6 the production of lignin derivatives was higher.

considerarse que las enzimas inmovilizadas muestran actividad catalítica menor que la enzima soluble y esto permite explicar parcialmente el hecho de que en las reacciones a pH 8.6 la producción de derivados de lignina fuera mayor.

El consumo de H_2O_2 indicó que a pH de 5.8 se consumió 89.4 % del H_2O_2 50 mM, en el medio líquido; y fue diferente al 93.5 % consumido cuando la concentración fue 75 mM (Cuadro 1). En las reacciones a pH 6.5 con H_2O_2 50 mM el consumo de H_2O_2 (95.2 %) fue mayor, que en las reacciones con 75 mM (82.3 %). Así, el consumo mayor de H_2O_2 , en las reacciones catalizadas por lacasa inmovilizada en perlas de alginato, coincidió con la conversión mayor de lignina en cada pH. Esto concordó con lo reportado por Solomon *et al.* (1996) y Boukari *et al.* (2011), quienes determinaron que el H_2O_2 facilitó la extracción y conversión de lignina a partir de materiales lignocelulósicos. También se observó que el este agente oxidante no provocó inhibición enzimática y que en todas las reacciones el consumo de H_2O_2 fue significativo.

CONCLUSIONES

La despolimerización de lignina, para obtener compuestos aromáticos, es posible con lacasa inmovilizada en perlas de alginato y H_2O_2 , como aceptor secundario de electrones, pues los rendimientos son comparables con los de otros procesos de despolimerización oxidativa; además, tiene la ventaja de ser un proceso seguro y limpio. La concentración de H_2O_2 influye significativamente en el rendimiento de conversión y tiene relación directa con el pH de la reacción. La acción de H_2O_2 es sinérgica con la lacasa inmovilizada en la despolimerización de lignina. Aunque durante la reacción se reduce prácticamente todo el H_2O_2 , la enzimática no se inhibe.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato, por la infraestructura y el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto. (SIP 20141238) y a la Red BIOCATEM por su apoyo.

Cuadro 1. Diferencia entre el H_2O_2 empleado en la reacción de hidrólisis de lignina y el cuantificado por titulación con permanganato de potasio.

Table 1. Difference between the H_2O_2 used in the lignin hydrolysis reaction and the one quantified from titling with potassium permanganate.

pH	H_2O_2 (mM)	Moles añadidos de H_2O_2	Moles finales de H_2O_2
5.8	50	8.12×10^{-5}	8.63×10^{-6}
	75	1.62×10^{-4}	1.06×10^{-5}
6.5	50	8.12×10^{-5}	3.93×10^{-6}
	75	1.62×10^{-4}	2.86×10^{-5}

Los factores analizados y su interacción fueron significativos ($p=0.02$) para el factor pH, 0.035 para factor concentración de H_2O_2 y 0.046 para la interacción pH x H_2O_2 . The factors analyzed and their interaction were significant ($p=0.02$) for the factor pH, 0.035 for the factor concentration of H_2O_2 and 0.046 for the interaction pH x H_2O_2 .

The consumption of H_2O_2 indicated that 89.4 % of the H_2O_2 50 mM was consumed at a pH of 5.8, in the liquid medium; and was different from the 93.5 % consumed when the concentration was 75 mM (Table 1). In the reactions at a pH of 6.5 with H_2O_2 50 mM, the consumption of H_2O_2 (95.2 %) was higher than in the reactions with 75 mM (82.3 %). Thus, the higher consumption of H_2O_2 , in the reactions catalyzed by laccase immobilized in alginate pearls, coincided with the higher conversion of lignin in each pH. This agreed with the report by Solomon *et al.* (1996) and Boukari *et al.* (2011) that the H_2O_2 facilitated the extraction and conversion of lignin from lignocellulosic materials. Besides, it was observed that this oxidizing agent did not provoke enzymatic inhibition and that in all the reactions the consumption of H_2O_2 was significant.

CONCLUSIONS

The depolymerization of lignin in order to obtain aromatic compounds is possible with laccase immobilized in alginate pearls and H_2O_2 as a secondary acceptor of electrons, since the yields are comparable to those of other oxidative depolymerization processes; in addition, it has the advantage of being a safe and clean process. The concentration of H_2O_2 influences significantly

LITERATURA CITADA

- Arana, A., A. Téllez, T. González, and A. González 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: Aplicaciones industriales de las lacasas. *BioTecnología* 7:40-55.
- Bai, X., K. H. Kim, R. C. Brown, E. Dalluge, C. Hutchinson, Y. J. Lee, and D. Dalluge. 2014. Formation of phenolic oligomers during fast pyrolysis of lignin. *Fuel* 128: 170–179.
- Boukari, I., C. Rémond, M. O'Donohue, and B. Chabbert. 2011. Effect of lignin content on a GH11 endoxylanase acting on glucuronoarabioxylan-lignin nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 89: 423-431.
- Childs, R. E., and W. G. Bardsley, 1975. The Steady-State kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid). *Biochem. J.* 145: 93-103
- Collinson, S., and W. Thielemans. 2010. The catalytic oxidation of biomass to new materials focus on starch, cellulose and lignin. *Coord. Chem. Rev.* 254: 1854-1870.
- Crestini, C., C. Caponi, D. S. Argyropoulos, and R. Saladino. 2006. Immobilized methyltrioxo rhenium (MTO)/H₂O₂ systems for the oxidation of lignin and lignin model compound. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 5292-5302.
- Dávila, G., and R. Vázquez-Duhalt. 2006. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquím.* XXX: 29-55.
- Doherty, W., and O. P. Mousavioun. 2010. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33: 259-276.
- Eudes, A., Y. Liang, P. Mitra, and D. Loqué. 2014. Lignin bioengineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 189-198
- Forte, S., J. Polak, D. Valensin, M. Taddei, R. Basosi, S. Vanhulle, A. Jarosz-Wilkolazka, and R. Pogni. 2010. Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 63: 116–120.
- Ganachaud, C., V. Garfagnoli, T. Tron, and G. Iacazio. 2008. Trimerisation of indole through laccase catalysis. *Tetrahedron Lett.* 45: 2476-2478.
- Janshekar, H., C. Brown, and A. Fiechter. 1981. Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta.* 130: 81-91
- Jin, S., Z. Xiao, C. Li, X. Chen, L. Wang, J. Xiang, W. Li, and C. Liang. 2014. Catalytic hydrodeoxygenation of anisole as lignin model compound over supported nickel catalysts. *Catal. Today.* 234: 125-132
- Johansson, K., T. Gillgren, S. Winstrand, L. Järnström, and L. Jönsson. 2014. Comparison of lignin derivatives as substrates for laccase-catalyzed scavenging of oxygen in coatings and films. *J. Biol. Eng.* 8:1-12
- Kim, S., S., C., P. Huh, J. Kumar, B. Kim, J. O. Lee, and F. Bruno. 2011. Polyoxometalate/laccase-mediated oxidative polymerization of catechol for textile dyeing. *Green Chem.* 9: 44-48.
- Lange, H., S. Decina, and C. Crestini. 2013. Oxidative upgrade of lignin – Recent routes reviewed. *Eur. Polym. J.* 49:1151-1173.
- Maijala, P., M. L. Mattinen, P. Nousiainen, J. Kontro, J. Asikkala, J. Sipila, and L. Viikari. 2012. Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 76: 59-67.
- the conversion yield and has a direct relationship with the pH of the reaction. The action of H₂O₂ is synergic with the laccase immobilized in lignin depolymerization. Although during the reaction practically all the H₂O₂ is reduced, and the enzymatic is not inhibited.
- End of the English version—
- *—
- Menon, V., and M. Rao. 2011. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Comb. Sci.* 38: 522-550.
- Moilanen, U., M. Kelloc, S. Galkin, and L. Viikari. 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme Microb. Tech.* 49: 492-498.
- Nagar, S., A. Mittal, D. Kumar, L. Kumar, and V. K. Gupta. 2010. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochem.* 12: 5-6.
- Pang, R., M. Li, and C. Zhang. 2015. Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation. *Talanta* 131: 38–45.
- Pal, A., and F. Khanum. 2011. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. *Process Biochem.* 46: 1316-1322.
- Polak, J., and W. A. Jarosz. 2012. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochem.* 19: 20-33.
- Rodríguez, T., D. Botelho, and E. Cleto. 2008. Tratamiento de efluentes industriales de naturaliza recalcitrante usando ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta. *Ver. Fac. Ing. Univ. Antioquia.* 46: 24-38.
- Rodrigues, P., C., Esteves, C. Egidio, and R. A. Rodrigues. 2012. Oxidation of lignin from eucalyptus globules pulping liquors to produce syringaldehyde and vanillin. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52: 4421-4428.
- Ruuttunem, K. and T. Vuorinen. 2005. Developing catalytic oxygen delignification for Kraft pulp: Kinetic study of lignin oxidation with polyoxometalate anions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44: 4284-4291.
- Sant, B. R. 1956. Thiocyanate interference in the permanganometry of hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta.* 15: 413-414.
- She, D., F. Xu, Z. Geng, R. Sun, J. G. Lloyd, and M. S. Baird. 2010. Physicochemical characterization of extracted lignin from sweet sorghum stem. *Ind. Crops Prod.* 32: 21-28.
- Solomon, E., U. Sundaram, and T. E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 7: 2563-2606.
- Volokitina, M., V., K. Bobrov, K. Piens, E. Eneyskaya, T. B. Tennikova, E. G. Vlach, and A. A. Kulminskaya. 2015. Xylan degradation improved by a combination of monolithic columns bearing immobilized recombinant β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100 and Grindamyl H121 β -xylanase. *Biotechnol. J.* 10: 210–221.

Zheng, A., Z. Zhao, S. Chang, Z. Huang, H. Wu, X. Wang, F. He, and H. Li. 2014. Effect of crystal size of ZSM-5 on the aromatic yield and selectivity from catalytic fast pyrolysis of biomass. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 383–384: 23–30.

Zhang, J., J. Teo, X. Chen, H. Asakura, T. Tanaka, K. Taramura, and N. Yan. 2014. A series of NiM (M = Ru, Rh, and Pd) bimetallic catalysts for effective lignin Hydrogenolysis in water. *ACS Catal.* 4: 1574–1583.