Marco Orlandi[a], Claudia Crestini[b], Raffaele Saladino[c]
[a]Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio
Università di Milano-Bicocca
marco.orlandi@unimib.it
[b]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche
Università di Roma-Tor Vergata
crestini@uniroma2.it
[c]Dipartimento Agrochimico Agrobiologico
Università della Tuscia
saladino@unitus.it

TRATTAMENTI ENZIMATICI PER LA FUNZIONALIZZAZIONE DELLA LIGNINA E DELLE FIBRE LIGNOCELLULOSICHE

Per sviluppare l'utilizzo delle biomasse è necessario ampliare gli utilizzi industriali della lignina. Le possibili strategie per la valorizzazione della lignina passano attraverso due principali direzioni, definibili come una funzionalizzazione selettiva del polimero o una depolimerizzazione ossidativa, per sintetizzare dei composti monomerici opportunamente derivatizzati. Si riporta una breve rassegna di processi enzimatici che comportano l'attivazione dell'ossigeno per ottenere una funzionalizzazione ossidativa della lignina.

I residui lignocellulosici dell'agricoltura e delle foreste possono costituire la principale risorsa rinnovabile per lo sviluppo delle bioraffinerie che, grazie alla ricerca di prodotti ad alto valore aggiunto, possono costituire una valida alternativa a basso impatto ambientale rispetto alle convenzionali raffinerie ad oli minerali.

Nonostante l'uso di biopolimeri quali la cellulosa, il principale componente del materiale lignocellulosico, sia ormai sufficientemente sviluppato, la lignina, il secondo biopolimero più abbondante in natura (rappresenta circa il 15-30% delle biomasse), è tuttora sottoutilizzata in quanto viene impiegata solo come sorgente di energia chimica in processi di termovalorizzazione. Altre applicazioni industriali mature della lignina riguardano il suo utilizzo come filler in compositi, come compo-

nente in binders o coatings, o come tensioattivo o disperdente. Fino ad oggi il suo potenziale come sorgente di fenoli per la produzione di biopolimeri ad alto valore aggiunto non è stato sufficientemente sviluppato. Il motivo principale della scarsa valorizzazione dei residui di lignina è la loro eterogeneità chimica. Le lignine sono infatti dei polifenoli caratterizzati da una complessa rete formata da tre principali unità fenilpropanoidiche legate tra loro attraverso una serie di differenti legami intermonomerici. La mancanza di sequenze ripetitive di specifici legami intermonomerici e di specifiche subunità rende la caratterizzazione strutturale e la valorizzazione delle lignine una sfida importante per i chimici (Fig. 1).

I più abbondanti legami intermonomerici nelle lignine native sono i legami definiti come legami β-O-4', eteri arilgliceroli (45-48% nelle conifere), legami β-5, fenilcumarani (9-12%), legami β-β,' pinoresinolo, legami 5-5'-α-β-O-4', dibenzodiossocine (5% nelle conifere) ed i difenileteri 4-O-5' (3,5-8%) [1]. Oltre a queste sottostrutture, sono anche presenti nella lignina subunità lignaniche. Inoltre nelle lignine ottenute dai processi dell'industria cartaria si forma anche un'apprezzabile quantità di strutture condensate come i legami 5-5'. Queste unità sono recalcitranti ai trattamenti ossidativi (Fig. 2)

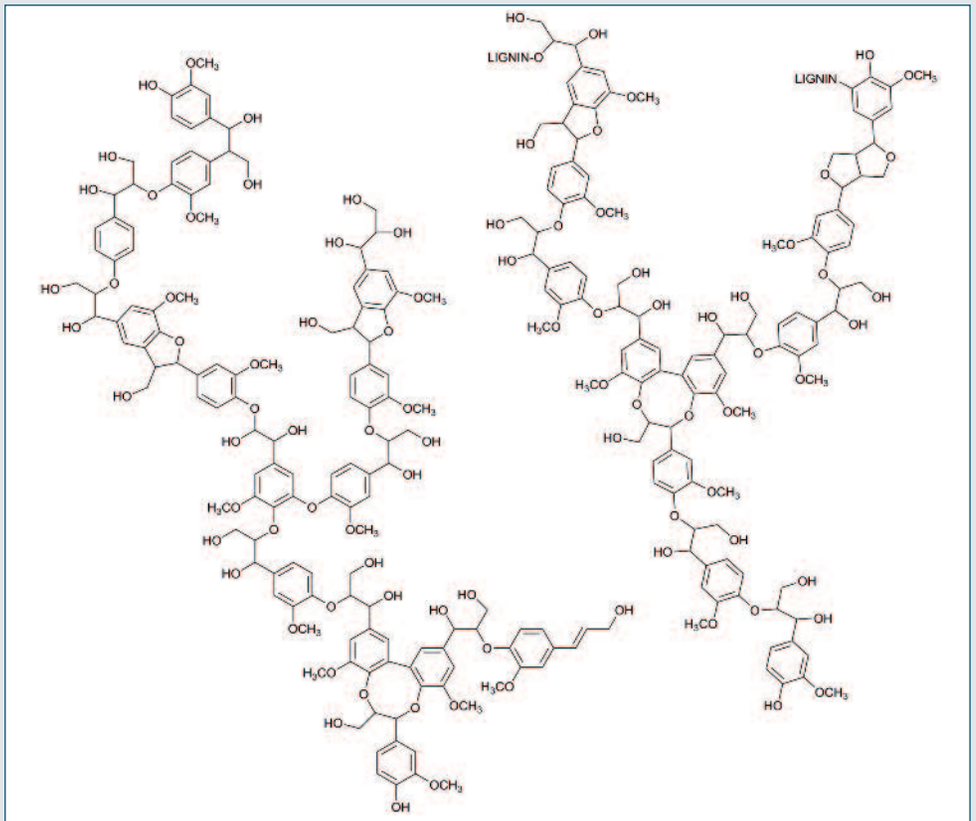

Fig. 1 - Struttura chimica della lignina

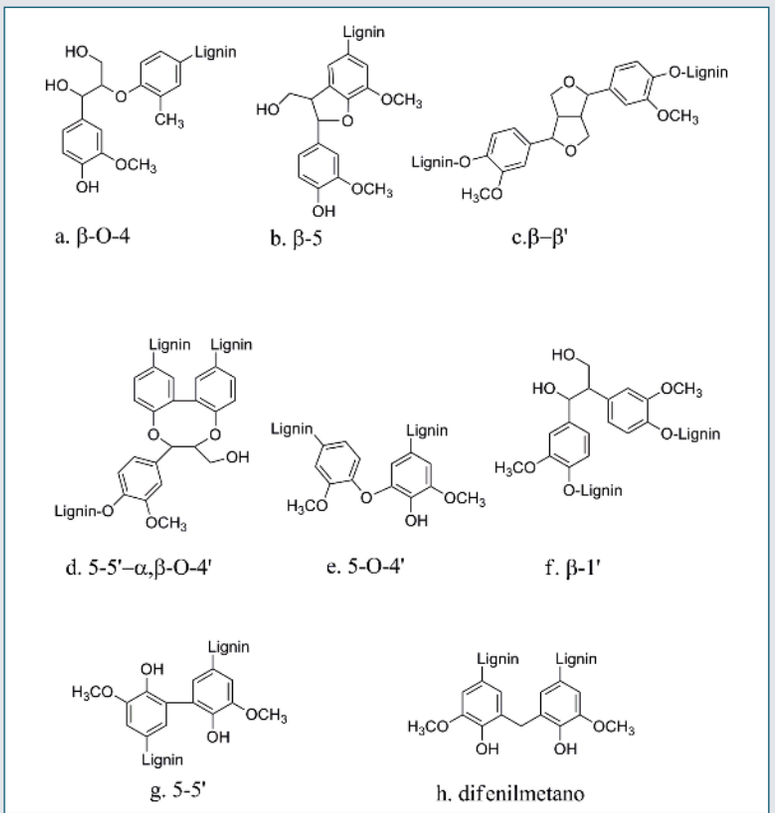

Fig. 2 - Principali legami intermonomerici presenti nella lignina

Le possibili strategie di valorizzazione della lignina sono principalmente rivolte verso due direzioni: la prima prevede la funzionalizzazione selettiva del polimero in modo da aumentarne la sua compatibilità e le sue prestazioni nei compositi e nei materiali polimerici, la seconda prevede una depolimerizzazione selettiva della lignina in modo da ottenere composti monometrici polifunzionali che possono essere utilizzati come "feedstocks" per l'industria dei polimeri, in alternativa ai building blocks derivati dall'industria del petrolio. In quest'ottica negli ultimi anni è stata dedicata un'attenzione particolare agli studi sulle ossidazioni selettive sulla lignina. Questo è dovuto in particolare alla presenza di un'elevata quantità di gruppi funzionali, quali gruppi alcolici sulle catene laterali e gruppi fenolici oltre alle posizioni benziliche che possono essere facilmente ossidate. Sulla base di queste considerazioni si riporta una selezione di processi ossidativi catalizzati da laccasi che posso essere rilevanti per ottenere una funzionalizzazione ossidativa della lignina.

Le laccasi [1.10.3.2] sono ossidasi multirame che catalizzano la riduzione dell'ossigeno ad acqua. L'enzima contiene quattro centri contenenti rame, un tipo 1 Cu (T1), un tipo 2 Cu (T2) ed una coppia binucleare di tipo 3 (T3) [2, 3]. I siti T2 e T3 formano un cluster trinucleare di rame dove l'ossigeno viene ridotto [4]. L'atomo

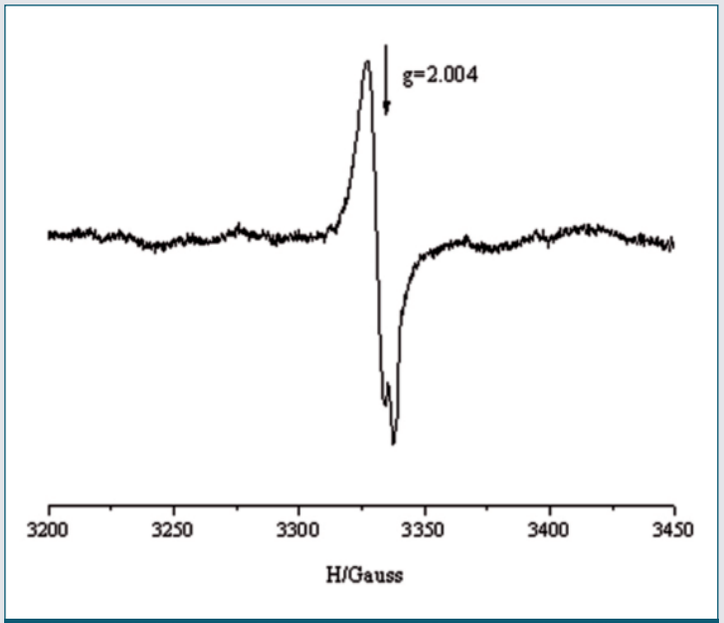

Fig. 3 - Banda X dello spettro EPR registrato a 123 K su un campione di lignina dopo ossidazione in acqua con laccasi ed ossigeno ad 1 bar di pressione per 60 minuti

di Cu T1 ossida il substrato ridotto e trasferisce l'elettrone agli atomi di rame nei centri T2 e T3. Le laccasi sono catalizzatori capaci di ossidare sistemi fenolici attraverso un processo di elettron-transfer che genera un radical-catione, il quale, attraverso un processo di rapida deprotonazione, genera un fenossi radicale reattivo [5]. Il fenossi radicale intermedio che si forma durante questo processo può disproporzionare ulteriormente e, conseguentemente, iniziare la degradazione della lignina [6]. Le laccasi, inoltre, mostrano un'alta resistenza termica (stabili a circa 60 °C) [7], bassa specificità di substrato ed alta velocità di ossidazione, tutte caratteristiche che rendono questi enzimi dei candidati ideali per lo sviluppo di efficaci processi di modificazione della lignina [7-9]. I potenziali redox delle laccasi dipendono dalle specie fungine che sono state utilizzate per la loro produzione, ma in ogni caso l'ossidazione di substrati in cui il gruppo fenolico non sia libero, come nel caso del metossibenzene, è impedita dal loro alto potenziale redox e richiede quindi la presenza di mediatori radicalici come l'1-idrossibenzotriazolo (HBT) o il 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) [10-12]. Infatti è stato dimostrato che le laccasi in presenza di HBT generano il radicale ossibenzotriazolico che è in grado di ossidare composti modello della lignina sia fenolici sia non fenolici [13] attraverso l'estrazione di un atomo di idrogeno piuttosto che attraverso un processo di elettron-transfer [14].

Il ruolo delle ossidazioni con laccasi e con un sistema laccasi mediatori è stato studiato per esempio sulla lignina kraft. Le analisi al ^{31}P-NMR sulla lignina trattata con un opportuno derivatizzante al fosforo [15-18], dopo trattamenti con laccasi e con sistemi laccasi mediatori, hanno mostrato che si possono ottenere significative modificazioni della struttura della lignina sia a livello qualitativo, sia a livello quantitativo. In particolare è stato evidenziato come i trattamenti ossidativi con laccasi inducano processi ossidativi sulla catena laterale, come dimostrato dalla riduzione dei gruppi alcolici ed anche accoppiamenti ossidativi, come dimostrato dall'incremento delle unità fenoliche condensate. In presenza del sistema laccasi mediatori, oltre all'aumento degli accoppiamenti ossidativi e delle ossidazioni sulle catene laterali della lignina, si è osservata una significativa rottura degli anelli aromatici. In ogni caso l'uso industriale delle laccasi e dei sistemi laccasi mediatori è limitato sia dalla necessità di riciclare gli enzimi, sia dalla loro non elevata stabilità [19]. Per risolvere questi problemi in letteratura sono riportati parecchi esempi di immobilizzazione delle laccasi [20-24]. Recentemente un'innovazione nello sviluppo dell'immobilizzazione delle laccasi prevede l'impiego della tecnica "layer by layer"(LbL) [25-28]. In questo processo la laccasi è stata immobilizzata su particelle di alluminio attraverso reazioni di silanizzazione seguita da cross-linking con glutaraldeide seguendo alcune classiche reazioni riportate in letteratura [21, 29]. Le laccasi immobilizzate sono state ricoperte da strati alternati di poli(allilammina)idrocloruro e polistirene sulfonato. Il LbL coating dell'enzima è risultato mantenere l'attività enzimatica dell'enzima libero ed ha incrementato la stabilità dell'enizima immobilizzato rispetto all'enzima libero. Per questo motivo il sistema laccasi LBL si è dimostrato in grado di ossidare la lignina con risultati migliori rispetto all'uso delle laccasi non immobilizzate [30].

In letteratura esistono molteplici studi sul meccanismo di azione degli enzimi ossidativi sia sulla lignina sia sulle fibre lignocellulosiche ricche di lignina [31-34]. Tipicamente, l'effetto delle laccasi su diversi tipi di lignina è stato studiato valutando il consumo di ossigeno, l'effetto della modificazione sulla struttura chimica della lignina e/o sulle proprietà fisiche della lignina, o studiando la formazione dei radicali [31, 35]. Per quanto riguarda la formazione e la concentrazione dei radicali sulla lignina trattata con laccasi si è osservato, che, dopo il trattamento si è formata un'elevata concentrazione di fenossiradicali identificati attraverso la spettroscopia di risonanza elettronica (EPR). Si è osservato che i parametri dello spettro EPR delle lignine trattate con laccasi corrispondevano a quelli riportati in letteratura per i fenossiradicali (g = 2.004 e ΔHpp = 9 G) (Fig. 3) [36].

La concentrazione dei fenossi radicali è risultata essere costante durante per tutte le due ore dell'analisi [37] (Fig. 4).

Le laccasi sono anche state utilizzate per attivare la lignina sulla super-

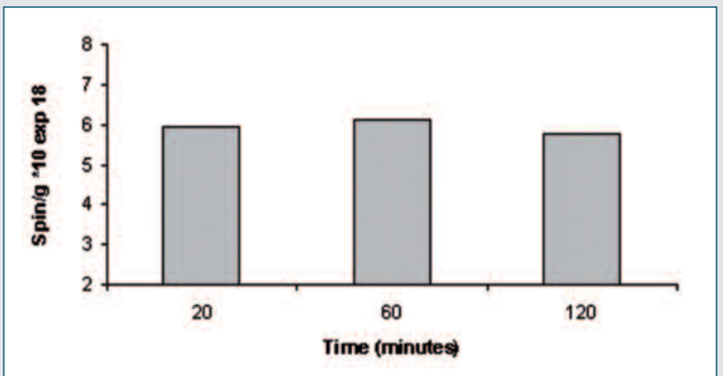

Fig. 4 - Concentrazione di fenossiradicali generati sulla lignina dal trattamento con laccasi

ficie delle fibre lignocellulosiche ricche in lignina in modo da migliorarne alcune proprietà, quali la resistenza e l'idrofobicità, tramite reazioni di grafting radicalico. In letteratura esistono vari esempi di trattamento con laccasi di pulp provenienti da processi termomeccanici (TMP) [38], da fibre a densità media (MDF) [39] e da pulp provenienti da processi chimici kraft [40]. Per valutare l'ottimizzazione delle condizioni di reazione e lo studio del meccanismo di ossidazione, è stata valutata una correlazione lineare tra formazione dei radicali ed il consumo di ossigeno. Questa correlazione è risultata esistere nel caso dell'ossidazione delle fibre di legno [39], ma non nel caso delle fibre ottenute da un processo meccanico [41]. Recentemente è stato dimostrato che le laccasi hanno una reattività più elevata in quelle fibre che contengono una percentuale maggiore di lignina sulla superficie.

Sulla base di queste considerazioni la reattività di differenti tipi di pulp è stata valutata tramite spettroscopia di risonanza elettronica di spin (EPR) e si è osservato come la scala di reattività sia la seguente TMP<CTMP<SWKP~HWKP (Fig. 4). Gli altri fattori che influenzano la reattività delle reazioni con le laccasi sono il pH ed il dosaggio della laccasi.

Una più completa panoramica dei possibili trattamenti a basso impatto ambientale per funzionalizzare la lignina è riportata in alcuni articoli pubblicati recentemente [42].

Bibliografia

[1] W. Boerjan *et al., Annual Review Of Plant Biology,* 2003, **54**, 519.
[2] J.L. Cole *et al., Journal of American Chemistry Society,* 1990, **112**, 9534.
[3] E.I. Solomon, M.D. Lowery, *Science,* 1993, **259**, 1575.
[4] B. Reinhammer, B. Malstrom, in Copper Proteins, T.G. Spiro (Ed.), Wiley-Interscience, New York, 1981, p. 109.
[5] E.S. Caldwell, C. Steelink, *Biochim. Biophys. Acta,* 1969, **189**, 420.
[6] K. Lundquist, P. Kristersson, *Biochem. J.,* 1985, **229**, 277.
[7] H.P. Call, I. Mucke, *J. Biotechnol.,* 1997, **53**, 163.
[8] Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture, T.K. Kirk, H.-M. Chang (Eds.), Butterworths, Stoneham, 1990.
[9] T. Higuchi, *Wood Sci. Technol.,* 1990, **24**, 23.
[10] G. Elegir *et al., Enzyme and Microbial Technology,* 2005, **37**, 340.
[11] O.V. Morozova *et al., Applied Biochemistry And Microbiology,* 2007, **43**(4), 523.
[12] R. Bourbonnais, M.G. Paice, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 1992, **36**, 823.
[13] A. Potthast *et al.,* Proc. Int. Symp.Wood Pulping Chem.; H.P. Call, I. Mucke, *J. Biotechnol.,* 1997, **53**, 163.
[14] M. Fabbrini *et al., J. Mol. Catal. B.,* 2002, **16**, 231.
[15] D.S. Argyropoulos, *Res. Chem. Intermed.,* 1995, **21**, 373.
[16] A. Granata, D.S. Argyropoulos, *J. Agric. Food Chem.,* 1995, **33**, 375.
[17] Z.H. Jiang *et al., Magn. Res. Chem.,* 1995, **43**, 1538.
[18] D.S. Argyropoulos, *J. Wood Chem. Technol.,* 1994, **14**, 45.
[19] S. Rodriguez Couto *et al., Appl. Catal.,* 2007, **329**, 156.
[20] B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.,* 2004, **35**, 126.
[21] Y.K. Cho, J.E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.,* 1979, **21**, 461.
[22] E. Abadulla *et al., Appl. Environ. Microb.,* 2000, **6**, 3357.
[23] S. Ryan *et al., Enzyme Microb.Technol.,* 2003, **33**, 766.
[24] A. Kandelbauer *et al., Biotechnol. Bioeng.,* 2004, **87**, 552.
[25] C. Held *et al., Environ. Chem. Lett.,* 2005, **3**, 74.
[26] G. Decher *et al., Thin Solid Film,* 1992, **210-211**, 831.
[27] C. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem. Int. Ed.,* 2004, **43**, 3762.
[28] D. Rochefort *et al., J. Electroanal. Chem.,* 2008, **617**, 53.
[29] M. Di Serio *et al., Catal. Today,* 2003, **79-80**, 333.
[30] C. Crestini *et al., Appl. Catal. A: Gen.,* 2010, **372**, 115.
[31] H. Wariishi *et al., Biochem.,* 1988, **27**, 5365.
[32] H. Wariishi *et al., Biochem.,* 1992, **31**, 4986.
[33] H. Wariishi *et al., Biochem.,* 1989, **28**, 6017.
[34] C. Crestini *et al., Bioorg. Med. Chem.,* 2000, **8**, 433.
[35] C. Felby *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 1997, **48**, 459.
[36] D.N.S. Hon, Chemistry, Y. Lin, C.W. Dence (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1992, p. 284.
[37] S. Grönqvist *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 2005, **67**, 489.
[38] S. Grönqvist *et al., Holzforschung,* 2006, **60**, 503.
[39] Y.C. Felby *et al., Holzforschung,* 1997, **51**, 281.
[40] R. Chandra, A. Ragauskas, *Enzyme Microbial Technol.,* 2002, **30**, 855.
[41] A. Suurnäkki *et al., Enzyme Microbial Technol.,* 2010, **46**(3-4), 153.
[42] C. Crestini *et al., Catalysis Today,* 2010, **156**, 8.

ABSTRACT

Enzymatic Treatments for the Functionalization of Lignin and Lignocellulosic Fibers

Novel processing methods and product concepts are required to extend the role of lignin for future biomass and biofuel applications in emerging platforms such as the biorefinery. The possible strategies of lignin valorisation are focused into two main directions, namely the selective functionalisation of the lignin polymer or in its oxidative polymerization to get polyfunctional monomeric compounds. Here we report a short panel of enzymatic processes group for the activation of the environmental friendly oxidants oxygen in the oxidative functionalization of lignin.