

biodegradação e valorização da lenhina, o mais abundante polímero aromático na natureza

A biomassa vegetal é atualmente considerada uma fonte promissora de químicos, materiais e combustíveis.

Lígia O. Martins

Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier

Universidade Nova de Lisboa

lmartins@itqb.unl.pt

Website: www.itqb.unl.pt/research/biological-chemistry/microbial-enzyme-technology

As **biorefinarias lenhinocelulósicas** são plataformas que integram processos de conversão de biomassa vegetal, em bio-produtos, bio-energia e bio-combustíveis (1). Estas plataformas pretendem substituir as tradicionais refinarias de petróleo na obtenção de compostos semelhantes e/ou similares. A implementação das biorefinarias contribui para o estabelecimento da tão desejada bio-economia, que se apoia na sustentabilidade económica e ambiental dos processos industriais, através (i) da substituição de matérias-primas fósseis, por renováveis, o que leva a menores emissões de dióxido de carbono, com repercussões por exemplo, na diminuição do aquecimento global, e (ii) da utilização de agentes biológicos na conversão destas matérias-primas, micro-organismos ou enzimas, em reações amenas sob o ponto de vista físico-químico, energeticamente eficientes, e com níveis de poluição significativamente reduzidos.

Para serem economicamente viáveis as biorefinarias precisam primeiramente de superar a **recalcitrância do material lenhinocelulósico** à degradação, isto é têm de ser capazes de separar eficientemente os constituintes de biomassa vegetal vascular (a celulose, a hemicelulose e a lenhina), para as várias aplicações potenciais, da mesma forma que as refinarias de petróleo separam as suas frações. (2) A presença da matriz de lenhina, na estrutura da parede celular das plantas, onde a celulose e a hemicelulose estão imersas, tem sido reconhecida como o maior obstáculo para a desconstrução da parede celular das plantas (3). Esta resistência deve-se à composição e à estrutura heterogénea da lenhina, onde diferentes unidades fenil propanóides, formam uma matriz tridimensional, interligada por uma grande variedade de ligações resistentes do tipo éter e carbono-carbono (**Figura IA, IB**) (4). Torna-se assim urgente desenvolver estratégias de degradação eficiente da lenhina, e também da sua valorização. De facto, a lenhina é atualmente considerado um bio-resíduo das indústrias lenhinocelulósicas, sendo maioritariamente queimado para obtenção de energia. Por exemplo, embora a indústria de pasta de papel produza cerca de 50 milhões de toneladas de lenhina por ano, só cerca de 1 milhão de toneladas chega ao mercado dos químicos (5). A lenhina é o polímero aromático mais abundante na natureza e uma importante fonte renovável de vários compostos químicos aromáticos (benzeno, tolueno, xileno, vanilina, ácido vanílico e derivados fenólicos, entre outros) e materiais (resinas fenólicas, epóxidos, surfactantes,

adesivos, dispersantes, polímeros, entre outros) para a Indústria Química (6-8). O valor potencial de mercado para bio-produtos com base na lenhina é estimado em cerca de 12 bilhões de euros para o quinquénio 2020-2025, estando os compostos fenólicos e as fibras de carbono, posicionados para capturar o maior fatia de mercado (9). Tem sido feita uma forte aposta em investigação dedicada à conversão de lenhina em químicos de elevado valor acrescentado e precursores de combustíveis, utilizando várias aproximações físico-químicas, nomeadamente através de pirólise, oxidação e *hydrotreating* (10). No entanto, atualmente estas estratégias não se têm revelado muito eficientes na recuperação efetiva e ambientalmente equilibrada de monómeros aromáticos e novos (bio)processos precisam de ser desenvolvidos e implementados. A biocatálise, ou seja a utilização de sistemas enzimáticos, oferece uma ferramenta ambientalmente sustentável para a degradação e valorização da lenhina (11,12).

A **biodegradação da lenhina** é, em grande contraste com a biodegradação de outros polímeros biológicos abundantes na natureza (como por exemplo, a celulose ou o amido), realizada por um número relativamente limitado de microrganismos, utilizando mecanismos extracelulares, não-específicos e não-hidrolíticos (11). O grupo de microrganismos mais bem conhecido, envolvido na degradação de lenhina, são fungos pertencentes ao filo dos Basidiomycota, e designados por **fungos da podridão branca**. O branqueamento de biomassa vegetal pelos fungos da podridão branca, resulta de reações oxidativas que levam à remoção de lenhina, com retenção da estrutura fibrosa, branca, constituída essencialmente por celulose (**Figura IC**). Estes fungos produzem uma gama alargada de enzimas oxidativas extracelulares, com atividade lenhinolítica, que incluem lacases, várias peroxidases (de lenhina, de manganésio e versátil) e algumas outras enzimas, ditas de auxiliares, que atuam sinergisticamente no processo de degradação de lenhina. (13) Os processos biológicos envolvidos na degradação da lenhina são do tipo "*combustivo*", i.e. uma ação oxidativa não-específica catalisada por enzimas, leva a uma degradação subsequente, independente da atividade enzimática. (14) Nas reações de oxidação de grupos funcionais da lenhina, catalisadas pelas lacases ou peroxidases, formam-se tipicamente compostos radiculares, que devido à sua elevada reatividade, propagam uma variedade de

reações oxidativas não enzimáticas. A oxidação da lenhina pode também ser indireta, ou seja, ocorrer através de mediadores redox, moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que sofrem oxidação enzimática, formando, por sua vez radicais que vão atuar não enzimaticamente sobre as unidades da lenhina. Tem sido sugerido que alguns compostos fenólicos funcionam como mediadores "naturais", uma vez que são abundantes em ecossistemas onde ocorre a degradação de biomassa vegetal, uma vez que ao serem oxidados pelas lacases e, também peroxidases, formam radicais estáveis passíveis de oxidar unidades não-fenólicas da matriz tridimensional da lenhina, às quais as enzimas por exemplo, não têm acesso direto por impedimento estereoquímico (15).

Nos últimos anos, o laboratório de **Tecnologia Microbiana e Enzimática** do ITQB-UNL tem-se dedicado ao estudo de enzimas lenhínicas, nomeadamente lacases, peroxidases bacterianas e, mais recentemente, piranoses 2-oxidase. O potencial lenhíntico bacteriano está bastante menos estudado do que o dos fungos, mas o interesse das enzimas bacterianas prende-se em primeiro lugar, com a maior simplicidade da biologia das bactérias em contraste com a de fungos. Essa simplicidade reflete-se em aspetos determinantes para o seu estudo e aplicação como por exemplo, na maior rapidez de crescimento das bactérias, e na maior facilidade de clonagem de genes e expressão em hospedeiros heterólogos. Por outro lado, se considerarmos que a grande maioria das enzimas nativas não possui os níveis de atividade ou de robustez necessária para aplicações industriais, sendo necessário melhorar as suas propriedades enzimáticas, aplicando estratégias de engenharia de enzimas, também aqui, os sistemas bacterianos apresentam vantagens claras, uma vez que existem um maior número ferramentas de biologia molecular disponibilizadas para o fazer. Assim os objetivos de trabalho do laboratório que tenho liderado, têm sido, (1) expandir o número de enzimas lenhínicas conhecidas, providenciando a sua caracterização bioquímica, cinética e estrutural, e elucidando os seus mecanismos catalíticos e, (2) desenhar processos multi-enzimáticos para degradação e conversão de compostos aromáticos xenobióticos ou naturais, como a lenhina, incluindo a otimização de enzimas através de engenharia de proteínas, nomeadamente por evolução dirigida.

As **lacases** são enzimas que têm íões cobre nos seus centros catalíticos, pertencem família das enzimas designadas por "*Multicopper oxidases*" e, que, para além de apresentarem uma grande diversidade de substratos, utilizando desde compostos fenólicos, a polifenóis, aminas aromáticas, tióis, entre outros, requerem unicamente oxigénio como co-substrato, o que constitui uma vantagem, face à vasta maioria de enzimas do tipo oxidoreductivo, uma vez que o oxigénio é relativamente barato e encontra-se disponível com facilidade (16). Vários estudos pioneiros permitiram-nos elucidar aspetos fundamentais das propriedades de lacases bacterianas através de estratégias de investigação multidisciplinares utilizando como sistema modelo a enzima CotA-lacase de *Bacillus subtilis*. Por exemplo, técnicas de mutagénese foram utilizadas para substituir resíduos de aminoácidos catalíticos, e permitiram estudar, o efeito da diferente acessibilidade do solvente aos centros de cobre, a importância das interações eletrostáticas na modulação do potencial redox (17), os mecanismos moleculares envolvidos na incorporação de cobre (18), e ainda da redução de oxigénio a água [(19) e referências incluídas]. A identificação e estudo de lacases de microrganismos hipertermófilos, que crescem otimamente em habitats onde as temperaturas superam os 80°C, mostrou pela primeira vez, enzimas com uma elevada atividade para a oxidação de metais e uma estabilidade intrínseca elevada, portanto, com potencial para explorar em aplicações biotecnológicas [(20) e referências incluídas]. Estudámos ainda a utilização das lacases na **degradação de unidades não fenólicas de lenhina**, recorrendo a sistemas de lacases acoplados a mediadores "naturais" (isto é, compostos fenólicos derivados de lenhina) (21); comparámos a ação de diferentes mediadores na oxidação de unidades de lenhina

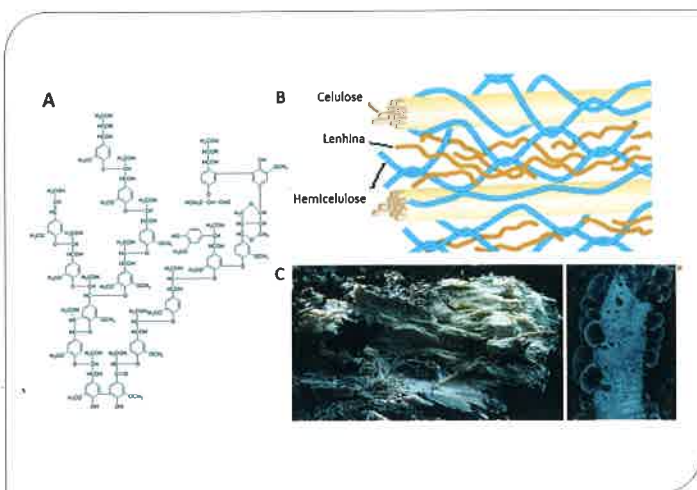


Figura 1 Estrutura e composição da lenhina (A) e do material lenhinoceulósico (B). Branqueamento de material lenhinoceulósico por fungos da podridão branca (C).

não fenólicas, utilizando duas enzimas com propriedades diferentes, a CotA-lacase bacteriana e uma enzima de origem fúngica. Concluímos que mais importante que a enzima utilizada e, portanto que as suas propriedades intrínsecas, a capacidade catalítica destas, na conversão das unidades não fenólicas, depende essencialmente da natureza química e das propriedades dos próprios mediadores. O mediador oxidado com menor eficiência por qualquer das enzimas em estudo, metilseringato, foi aquele que resultou em níveis de conversão mais elevados das unidades não-fenólicas de lenhina. Concluímos assim que a capacidade de conversão depende principalmente da estabilidade dos radicais fenoxil formados após oxidação enzimática dos mediadores. Verificámos ainda, que, quanto maior o rácio entre a concentração de mediador e de composto não fenólico, maiores são os níveis finais de conversão. Isto deve-se ao facto de os produtos radicalares formados se envolverem em vias degradativas competitivas. As enzimas bacterianas pelo facto de apresentarem um pH ótimo alcalino, por exemplo a CotA-lacase apresenta ainda atividade a pH de 10-11, apresentam vantagens consideráveis em processos de deslignificação e obtenção de frações de lenhina de baixo peso molecular, solúveis em água, quando comparadas com enzimas de origem fúngica (22).

Identificámos e caracterizámos novas **peroxidases hémicas bacterianas**, pertencentes a uma nova família designado por "*Dye-decolourising peroxidases*" (**DyP-peroxidases**) [(23) e referências incluídas], assim designadas por serem capazes de eficientemente descolorarem corantes sintéticos de elevado potencial redox. Esta família de peroxidases tem uma sequência primária, estrutura e aparentemente mecanismos catalíticos diferentes de todas as outras peroxidases descritas (24-26). São enzimas que também apresentam uma grande variedade de substratos, oxidando não só corantes do tipo antraquinónico e azo, mas também compostos fenólicos e não fenólicos e íões metálicos. Estas características fazem pensar que estas enzimas possam substituir as peroxidases fúngicas lenhínicas em aplicações biotecnológicas relacionadas com as biorefinarias. Mais recentemente, caracterizámos pela primeira vez uma **piranose 2-oxidase** de origem bacteriana (27). As piranoses 2-oxidase são flavoproteínas, que catalisam a oxidação do carbono 2 de aldopiranosos, como a glucose, galactose ou xilose, com redução concomitante de O_2 a H_2O_2 e, que apresentam, um grande interesse biotecnológico; estas enzimas são consideradas enzimas lenhínicas "*auxiliares*", que a par com as glioxal, aril-alcool oxidases, geram peróxido de hidrogénio enzimaticamente, que será utilizado em reações catalisadas pelas peroxidases na oxidação da lenhina (15).

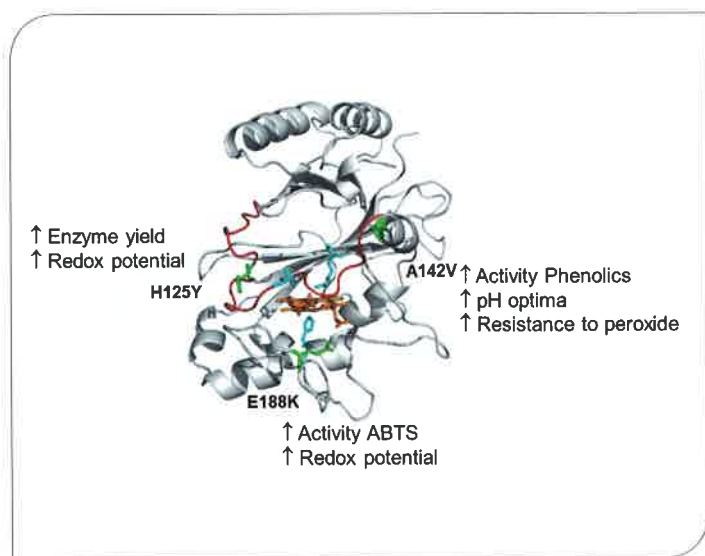


Figura 2 Evolução da enzima DyP-peroxidase; a introdução de 3 mutações após três gerações, resultou numa enzima com propriedades melhoradas sob o ponto de vista de produção, catalítico e de estabilidade (29).


A aplicação de técnicas inovadoras de engenharia de proteínas, nomeadamente de **evolução dirigida**, que combinam a geração de diversidade enzimática, através mutagenese aleatória, com um rastreio adequado para uma propriedade de interesse, permitiu-nos modificar as propriedades de várias enzimas. Estas aproximações permitiram por exemplo, modificar a especificidade de uma metaloxidase hipertermófila, que após introdução de 10 mutações, em quatro gerações de mutagenese, seguida de rastreio, aumentou 100 vezes a sua especificidade para substratos orgânicos, (28) e de uma DyP-peroxidase que após introdução de 3 mutações em três ciclos de evolução, aumentou a sua produtividade 2 vezes, apresentou um pH ótimo a 8.5, quatro unidades acima do apresentado pela enzima parental, mostrou resistência à inativação por peróxido de hidrogénio e uma atividade 10 a 100 vezes superior para compostos fenólicos, amins aromáticas e lenhina "kraft" (29). Os resultados obtidos utilizando esta estratégia de engenharia têm sido muito promissores abrindo perspectivas para modificações/evoluções adicionais de forma a melhorar propriedades consideradas limitantes para a aplicação de enzimas em processos industriais.

Por fim, considerando que as enzimas lenhínicas estudadas apresentam um espectro de atividades alargado, investigámos a **utilização destas enzimas na degradação e detoxificação de corantes sintéticos**, que são poluentes orgânicos xenobióticos, e que persistem no ambiente [(30) e referências incluídas] e, numa colaboração estabelecida com a Prof. Maria Paula Robalo (ISEL/IST-UL), foi ainda possível mostrar a utilidade das lacases bacterianas na **conversão de uma variedade de amins aromáticas**, em vários compostos aromáticos homo e heterocíclicos que apresentam atividade biológica relevante; em antibióticos e outros agentes antibacterianos, pesticidas, corantes, biosensores, servindo ainda, de blocos para a síntese de materiais orgânicos semi-condutores ou com características eletrofotográficas (31-35).

Agradecimentos: Agradeço a todos os estudantes e colaboradores que contribuíram para os estudos mencionados. Estes trabalhos foram suportados pelos projetos europeus, SOPHIED (FP6-NMP2-CT-2004-505899), BIORENEW (FP6-2004-NMP-NI-4/026456) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (POCI/BIO/57083/2004, PTDC/BIO/72108/2006, PTDC/AGR-CFL/103840/2008, PEst-OE/EQB/LA0004/2011, PTDC/BBE/0122/2014).

Referências

- Kamm, B., and Kamm, M. (2004) Principles of biorefineries. *Applied microbiology and biotechnology* 64, 137-145.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., and Foust, T. D. (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315, 804-807.
- Gall, D. L., Ralph, J., Donohue, T. J., and Noguera, D. R. (2017) Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. *Curr Opin Biotechnol* 45, 120-126.
- Adler, E. (1977) Lignin Chemistry - Past, Present and Future. *Wood Science and Technology* 11, 169-218.
- Essery, M. (2017) First higher-value chemical derived from lignin to hit market in 2021. in *Lux Research*, www.luxresearchinc.com/news-and-events/press-releases/read/first-higher-value-chemical-derived-lignin-hit-market-2021.
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., Davison, B. H., Dixon, R. A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A. K., Saddler, J. N., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., and Wyman, C. E. (2014) Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* 344, 1246843.
- Brujininx, P. C. A., and Weckhuyen, B. M. (2014) Biomass conversion: Lignin up for break-down. *Nature Chemistry* 6, 1035-1036.
- Zakzeski, J., Brujininx, P. C., Jongerijs, A. L., and Weckhuysen, B. M. (2010) The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical reviews* 110, 3552-3599.
- Smith, P., Chem, M., and Cline, S. (2016) Biorefinery value chain outputs. in *Final Report, NARA, USDA*.
- Xu, C., Arancon, R. A., Labidi, J., and Luque, R. (2014) Lignin depolymerisation strategies: towards valuable chemicals and fuels. *Chemical Society reviews* 43, 7485-7500.
- Martinez, A. T., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, M. J., del Rio, J. C., and Gutierrez, A. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol* 20, 348-357.
- Chen, Z., and Wan, C. (2017) Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renew Sustainable Energy Rev* 73, 610-621.
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for biofuels* 6, 41.
- Kirk, T. K., and Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41, 465-505.
- Ruiz-Duenas, F. J., and Martinez, A. T. (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology* 2, 164-177.
- Martins, L. O., Durao, P., Brissos, V., and Lindley, P. F. (2015) Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cell Mol Life Sci* 72, 911-922.
- Durao, P., Bento, I., Fernandes, A. T., Melo, E. P., Lindley, P. F., and Martins, L. O. (2006) Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *J Biol Inorg Chem* 11, 514-526.
- Durao, P., Chen, Z., Fernandes, A. T., Hildebrandt, P., Murgida, D. H., Todorovic, S., Pereira, M. M., Melo, E. P., and Martins, L. O. (2008) Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem* 13, 183-193.
- Brissos, V., Chen, Z. J., and Martins, L. O. (2012) The kinetic role of carboxylate residues in the proximity of the trinuclear centre in the O₂ reactivity of CotA-laccase. *Dalton Trans* 41, 6247-6255.
- Fernandes, A. T., Damas, J., Soares, C. M., Todorovic, S., Huber, R., Pogni, R., and Martins, L. O. (2010) The Multicopper Oxidase

- from the Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows Nitrous Oxide Reductase Activity. *FEBS J* 277, 3176-3189.
21. Rosado, T., Bernardo, P., Koci, K., Coelho, A. V., Robalo, M. P., and Martins, L. O. (2012) Methyl syringate: an efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. *Bioresource Technol* 124, 371-378.
 22. Hamalainen, V., Gronroos, T., Suonpaa, A., Hekkila, M. W., Romein, B., Ihalainen, P., Malandra, S., and Birikh, K. R. (2018) Enzymatic processes to unlock the lignin value. *Front Bioeng Biotechnol* 6.
 23. Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., and Martins, L. O. (2014) New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 2053-2065.
 24. Sugano, Y. (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* 66, 1387-1403.
 25. Mendes, S., Brissos, V., Gabriel, A., Catarino, T., Turner, D. L., Todorovic, S., and Martins, L. O. (2015) An integrated view of redox and catalytic properties of B-type PpDyP from *Pseudomonas putida* MET94 and its distal variants. *Archives of biochemistry and biophysics* 574, 99-107.
 26. Mendes, S., Catarino, T., Silveira, C., Todorovic, S., and Martins, L. O. (2015) Catalytic mechanism of BsDyP an A-type dye-decolourising peroxidase: neither aspartate nor arginine is individually essential for peroxidase activity. *Catalysis Science & Technology* 5, 5196-5207.
 27. Mendes, S., Banha, C., Madeira, J., Santos, D., Miranda, V., Manzanera, M., Ventura, M. R., van Berkel, W. J. H., and Martins, L. O. (2016) Characterization of a bacterial pyranose 2-oxidase from *Arthrobacter siccolerans*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 10.1016/j.molcatb.2016.1011.1005.
 28. Brissos, V., Ferreira, M., Grass, G., and Martins, L. O. (2015) Turning a hyperthermostable metallo-oxidase into a laccase by directed evolution. *ACS Catalysis* 5, 4932-4941.
 29. Brissos, V., Tavares, D., Sousa, A. C., Robalo, M. P., and Martins, L. O. (2017) Engineering a Bacterial DyP-type Peroxidase for Enhanced Oxidation of Lignin-Related Phenolics at Alkaline pH *ACS Catalysis* 7, 3454-3465.
 30. Mendes, S., Robalo, M. P., and Martins, L. O. (2015) Bacterial Enzymes and Multi-Enzymatic Systems for Cleaning-up Dyes from the Environment in *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Waste Waters* (Singh, S. N. ed.), Springer. pp 27-55.
 31. Sousa, A. C., Martins, L. O., and Robalo, M. P. (2013) Laccase-catalysed homocoupling of primary amines towards the biosynthesis of dyes. *Adv. Synth. Catal.* 355, 1857-1865.
 32. Sousa, A. C., Oliveira, M. C., Martins, L. O., and Robalo, M. P. (2014) Towards the rational biosynthesis of substituted phenazines and phenoxazinones by laccases. *Green Chem.* 16, 4127-4136.
 33. Sousa, A. C., Piedade, M. F. M. M., Martins, L. O., and Robalo, M. P. (2015) An enzymatic route for the synthesis of carbazole frameworks using bacterial CotA laccase. *Green Chemistry* 17, 1429-1433.
 34. Sousa, A. C., Piedade, M. F. M. M., Martins, L. O., and Robalo, M. P. (2016) Eco-friendly synthesis of indo dyes mediated by a bacterial laccase. *Green Chem.* 18, 6063-6070.
 35. Sousa, A. C., Oliveira, M. C., Martins, L. O., and Robalo, M. P. (2018) A Sustainable Synthesis of Asymmetric Phenazines and Phenoxazinones Mediated by CotA-Laccase. *Adv Synth Catal* 360, 575-583. 

Coberturas fotovoltaicas PV

Carregamento de veículos elétricos com energia fotovoltaica



Contato Sul Portugal
 nromao@circutor.com
 (+351) 960 118 366

Contato Norte Portugal
 cflores@circutor.com
 (+351) 914 449 063



circutor.pt

Tecnologia para a eficiência energética