



[8] SCHEEL, C. Beyond sustainability. Transforming industrial zero-valued residues into increasing economic returns. *Journal of cleaner production*, 2016, vol. 131, str. 376-386.

[9] EIO and CfSD (2016), 2nd edition, Eco-innovate! A guide to eco-innovation for SMEs and business coaches. Eco-Innovation Observatory. Funded by the European Commission, DG Environment, Brussels. Dostopno na spletu: [https://www.sustainabilityexchange.ac.uk/files/me\\_eco-innovation\\_guide\\_2nd\\_edition\\_small.pdf](https://www.sustainabilityexchange.ac.uk/files/me_eco-innovation_guide_2nd_edition_small.pdf)

[10] XAVIER, A., et al. Eco-Innovation Maturity Model: A Framework to Support the Evolution of Eco-Innovation Integration in Companies. *Sustainability*, 2020, vol. 12, št.9, str. 3773.

[11] SMITH, D. EBOOK: Exploring Innovation. McGraw Hill, 2015, 337 str.

[12] FUKASAKU, Y. The need for environmental innovation indicators and data from a policy perspective. In: *Towards environmental innovation systems*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. str. 251-267.

[13] BRASIL, M. V. D. O., ABREU, M. C. S. D., SILVA FILHO, J. C. L. D. in LEOCÁDIO, A. L. Relationship between eco-innovations and the impact on business performance: an empirical survey research on the Brazilian textile industry. *Revista de Administração (São Paulo)*, 2016, vol. 51, str. 276-287.

[14] SEKARAN, U. in BOUGIE, R. *Research methods for business: A skill building approach*. John Wiley & sons, 2016.

[15] SINGER, T. *Business Transformation and the Circular Economy: A Candid Look at Risks and Reward*. 2017, Dostopno na spletu: <https://www.conference-board.org/topics/circular-economy/Linear-Economy-Shifts-to-Circular-Economy>

[16] HOJNIK, J. In Pursuit of Eco-innovation. *Koper: Založba Univerze na Primorskem*, 2017. 333 str.

[17] MAÇANEIRO, M. B., DA CUNHA, S. K. in BALBINOT, Z. Drivers of the adoption of eco-innovations in the pulp, paper, and paper

products industry in Brazil. *Latin American Business Review*, 2013, vol. 14, št.3-4, str. 179-208.

[18] HOJNIK, J. in RUZZIER, M. Drivers of and barriers to eco-innovation: a case study. *International Journal of Sustainable Economy*, 2016, vol. 8, št.4, str. 273-294.

[19] RYSZKO, A. Drivers and barriers to the implementation of eco-innovation in the steel and metal industry in Poland. In: *23rd International Conference on Metallurgy and Materials METAL*. 2014.

[20] LEITNER, S. M. *Eco-Innovation: Drivers, Barriers and Effects—A European Perspective*. wiiw Working Paper, 2018.

[21] KIEFER, C. P., DEL RIO GONZALEZ, P. in CARRILLO-HERMOSILLA, J. Drivers and barriers of eco-innovation types for sustainable transitions: A quantitative perspective. *Business Strategy and the Environment*, 2019, vol. 28, št. 1, str. 155-172.

# Produkti mikrobiološke razgradnje lignina

## Products of microbiological lignin degradation

►► Helena Plešnik<sup>1,2</sup>, Maja Zupan<sup>1</sup>, Jurij Trontelj<sup>2</sup>, Aleš Lapanje<sup>1</sup>, Tina Kosjek<sup>1</sup>

### IZVLEČEK

Lignin je kompleksen aromatski biopolimer, ki je v naravi prisoten v stenah rastlinskih celic, v velikih količinah pa nastaja kot odpadni produkt pridelave papirja in biogoriv. Skladno s konceptom krožnega gospodarstva in zelene tehnologije brez odpadkov je zanimanje za njegovo koristno uporabo v zadnjih letih precej zraslo, saj bi kot naravni vir aromatskega ogljika lahko predstavljal odlični vir za proizvodnjo materialov z dodano vrednostjo. Zato smo se osredotočili na okolju prijazno razgradnjo lignina z mikroorganizmi, in sicer smo preučevali ligninolitično aktivnost bakterijskih izolatov z lignolitično aktivnostjo. Ugotavljali smo, ali je pri izbranih pogojih prišlo do biorazgradnje lignina, in če je, kateri produkti so pri tem nastali. Tako smo na osnovi obstoječe literature definirali potencialne produkte bakterijske razgradnje lignina, za katere smo razvili tarčno analizo metodo s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrično detekcijo (LC-MS/MS). Naši vzorci so bili pridobljeni iz šaržnih reaktorjev, kamor je bil bakterijam kot vir ogljika dodan lignin, pri čemer smo predpostavili, da določitev katerega od produktov razgradnje potrjuje biorazgradnjo v vzorcu. Po optimizaciji pogojev razgradnje smo v vzorcih dokazali prisotnost treh razgradnih produktov lignina, in sicer 4-hidroksiacetofenona, acetovanilona in vanilinske kisline. Z LC-MS/MS smo izvedli tudi netarčno analizo, ki je pokazala, da je pri razgradnji lignina nastalo še veliko drugih produktov razgradnje. Naš naslednji korak bo njihova identifikacija s pomočjo visokoločljivostne MS.

**Ključne besede:** lignin, bakterijska razgradnja, tekočinska kromatografija, masna spektrometrija

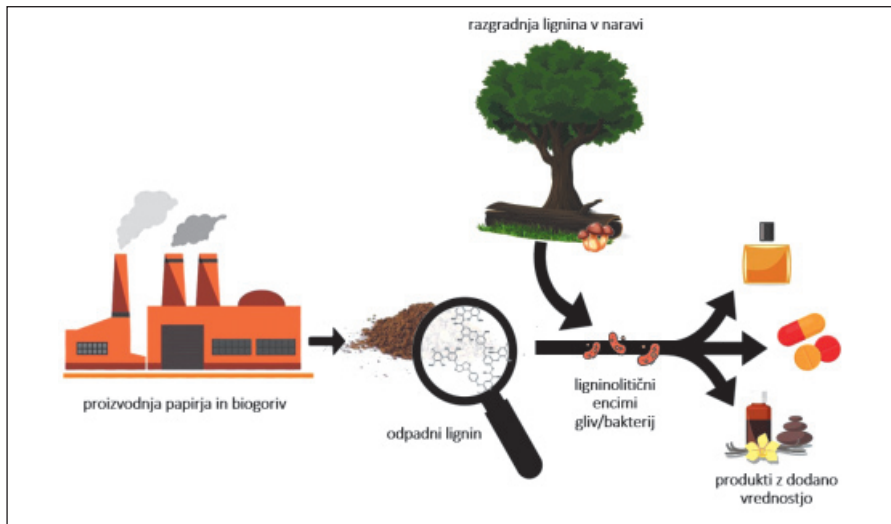
### ABSTRACT

*Lignin is a complex aromatic biopolymer present in nature as part of plant cell walls. It is generated in large quantities as a waste product in paper and biofuel industries. In the context of circular economy and green technologies, the interest in lignin valorisation has grown considerably in recent years. It is an abundant source of renewable aromatic carbon and could be a great source for producing value-added chemicals. Our research focuses on environmentally friendly bacterial degradation and studying the ligninolytic activity of the selected bacterial strains. Our objective was to determine whether biodegradation of lignin occurs under the selected conditions and the products generated in the process. Based on the existing literature, potential degradation products were defined and included in a targeted analytical method based on determination by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Our samples contained lignin treated with the laccase-producing bacterial strains in batch reactors and it was presumed that the detection of any of the potential degradation products in the sample proves biodegradation. After the optimisation of the biodegradation conditions, we confirmed the presence of three products of the bacterial lignin degradation in the samples: 4-hydroxyacetophenone, acetovanillone, and vanillic acid. We also performed a non-targeted LC-MS/MS analysis, which has shown the presence of many additional degradation products. Our next step is to identify them using high-resolution mass spectrometry*

**Keywords:** lignin, bacterial degradation, liquid chromatography, mass spectrometry

<sup>1</sup> Inštitut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana



Slika 1: Ideja o uporabi v naravi prisotnih mehanizmov biorazgradnje za valorizacijo odpadnega lignina / Figure 1: Idea of using naturally occurring biodegradation mechanisms to valorise waste lignin

Lignin, kompleksen in heterogen aromatski polimer, se skupaj s celulozo in hemicelulozo nahaja v stenah rastlinskih celic. Tam tvori močno prepleteno mrežasto strukturo, ki rastlini zagotavlja mehansko trdnost ter jo ščiti pred škodljivimi organizmi imenovano lignoceluloza (1). Sestavljen je iz fenilpropanoidnih aril-C3 enot, med sabo povezanih z eternimi in C-C vezmi. Nastane z radikalsko polimerizacijo iz prekursorjev koniferil, sinapil ter p-kumaril alkohola (2).

Deleži posameznih podenot v ligninu se od vrste do vrste precej razlikujejo. Lignin v trdem lesu vsebuje večinoma koniferil alkohol, v mehkem lesu vsebuje velik delež tako koniferil kot sinapil alkohola, v travah pa najdemo vse tri podenote. Podenote oz. osnovni gradniki so med sabo tudi različno povezane, najpogosteje z eternimi vezmi. Posledica te raznolikosti je visoka odpornost lignina na kemijsko in biokemijsko razgradnjo. K tej dodatno prispeva vezava ligninskega polimera na celulozo (3).

Vsako leto pri proizvodnji papirja kot stranskega produkta nastane okoli 50 milijonov ton lignina, vedno več pa ga nastaja tudi zaradi naraščajoče proizvodnje biogoriv (3). Kljub temu, da ima kot bogat obnovljiv vir aromatskih molekul precejšen potencial za predelavo v kemikalije in goriva z dodano vrednostjo, pa še vedno velja za odpadni produkt in služi kot nizkokakovostno gorivo za sežig. To je predvsem posledica zahtevnosti predelave lignina, ki je odporen na razgradnjo, ima heterogeno sestavo, nastali produkti pa zaradi strukturne heterogenosti zahtevajo obsežne postopke ločevanja in čiščenja.

Zanimanje za lignin in njegovo valorizacijo je zaradi energetske krize v zadnjih letih zelo naraslo. Raziskave so usmerjene predvsem v možnosti okolju bolj prijazne razgradnje s pomočjo mikroorganizmov. Nekatere glive in bakterije so razvile metabolne sisteme za učinkovito razgradnjo lignina, ki bi jih morda lahko

ciljano uporabili za razgradnjo odpadnega lignina v produkte z dodano vrednostjo. Do sedaj so bile podrobneje raziskane predvsem glive, in sicer glive bele in rjave trohnohe. Te lignin razgrajujejo z izločanjem številnih encimov, kot so peroksidaze ter lakaze (4). Kljub opravljenim obsežnim raziskavam pa glive za komercialne biokatalitične procese depolimerizacije lignina zaradi kompleksnosti njihovih encimov niso uporabne. Bakterijska razgradnja lignina je v primerjavi z glivno do sedaj precej manj raziskana, ker do sedaj poznamo le okoli 16 vrst bakterij, ki lahko tvorijo ligninolitične encime (5). Kljub temu bakterije zaradi enostavne kulture potencialno predstavljajo boljšo rešitev za uporabo lignina, poleg tega pa so stabilnejše v ekstremnih pogojih (nizek ali visok pH, temperatura, anaerobni pogoji), kar je dobrodošla prednost (6).

Bakterije proizvajajo številne oksidativne encime, ki sodelujejo pri depolimerizaciji in modifikaciji lignina in se nekoliko razlikujejo od glivnih encimov. Pomembno vlogo igrata predvsem dve večji skupini: bakterijske lakaze in peroksidaze (DyP) (7).

Peroksidaze tipa DyP so encimi iz družine hem peroksidaz, ki so prisotne v glivah, rastlinah, največ pa v bakterijah. Glede na njihovo strukturo oz. zaporedje aminokislin peroksidaze razvrščamo v štiri razrede, poimenovane A, B, C in D. Encimi razreda D so glivni, ostali so bakterijski. Pri nekaterih DyP peroksidazah je bila že dokazana ligninolitična aktivnost na dimernih modelih lignina, pri določenih pa celo na polimernem ligninu (4).

Lakaze so encimi, ki so v naravi zelo razširjeni. Prisotne so v višjih rastlinah, glivah, kot tudi v bakterijah in celo v insektih. Uvrščamo jih med polifenolne oksidazne encime. Delujejo tako, da katalizirajo oksidacijo substratov, ki so lahko fenolne ali pa nefenolne aromatske spojine, ob sočasni redukciji kisika do vode (8). Lakaze se med sabo po funkciji zelo razlikujejo, glede na oksidativno moč lahko namreč katalizirajo polimerizacijo lignina ali pa njegovo razgradnjo. Glivne lakaze so po odkritju veliko obetane, ker imajo v primerjavi z bakterijskimi višji redoks potencial, kar pomeni, da so zmožne oksidirati precej širši

nabor substratov. Vendar pa so pri ekstremnih pogojih večinoma nestabilne, kar otežuje ali celo onemogoča njihovo uporabo v nekaterih industrijskih procesih. Bakterijske lakaze so po molekularni zgradbi enostavnejše (brez posttranslacijskih modifikacij in z manj podenotami) in imajo dokazano veliko večjo termoinhalotoleranco, prav tako so zelo stabilne tudi v prisotnosti različnih inhibitorjev, zato se zdijo z vidika uporabe v industriji bolj obetavne (7, 9, 10). Ena izmed prednosti lakaz je tudi to, da pri reakcijah ne proizvajajo toksičnega vodikovega peroksida kot mnoge druge oksidaze (8). Danes jih že uporabljajo v papirni in tekstilni industriji, pri razvoju biosenzorjev in drugje (9).

V biorafinerijah je poskus valorizacije lignina in produktov njegove razgradnje zaradi velikih pridelanih količin postal ena izmed priorit. Pri razumevanju procesov razgradnje in preučevanju nastalih produktov pa je ključnega pomena natančno poznavanje njegove strukture. Ta je namreč zelo kompleksna in se glede na vir lignina tudi močno razlikuje. Za namen preučevanja strukture so zato že razvili številne analize metode, in sicer tako za analize celotne strukture kot tudi posameznih monomerov, preko analize produktov razgradnje. Pri preučevanju celotne strukture je mogoče s pomočjo spektroskopskih metod, kot so ultravijolična spektroskopija (UV), infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR) in jedrska magnetna resonanca (NMR), pridobiti informacije o tipih vezi ter funkcionalnih skupinah v makromolekuli lignina (13). Za določitev posameznih produktov razgradnje pa so v uporabi kromatografske metode (navadno plinska, pa tudi reverzno-fazna tekočinska kromatografija), sklopljene z masno spektrometrijo (13).

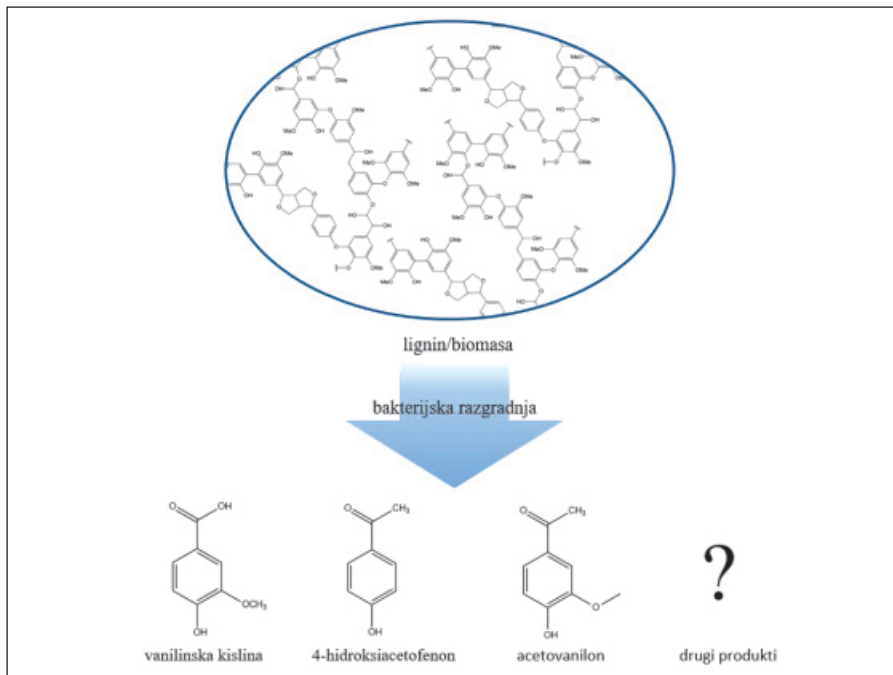
## NAŠA RAZISKAVA

je bila izvedena v okviru evropskega projekta APPLAUSE, namen katerega je bil preučevanje možnosti za koristno uporabo v Sloveniji rastočih tujerodnih rastlinskih vrst. Iz rizosfere (prsti ob korenini) tujerodnega japonskega dresnika so bile izolirane in genetsko karakterizirane bakterije z lignolitno aktivnostjo z zapisom gena iz skupine lakaz v genomu.

**Cilj naših raziskav je bil ugotoviti, če lahko te bakterije v laboratoriju razgradijo lignin, ter v kolikor razgradnja poteče, identificirati nastale produkte.**

Vzorci lignina, izpostavljenega izbranim bakterijskim sevom smo tako analizirali na tekočinskem kromatografu ultra visoke ločljivosti sklopljenem s tandemskim masnim spektrometrom (UHPLC-MS/MS), in sicer na dva načina, s tarčno in netarčno analizo.

S tarčno analizo je mogoče iskanje točno določenih spojin v vzorcu. Taka metoda nam omogoča, da prisotnost izbranih spojin z gotovostjo potrdimo ter tudi določimo njihovo koncentracijo v vzorcih. Metodo smo razvili in validirali na 14 fenolnih spojinah, ki smo jih na

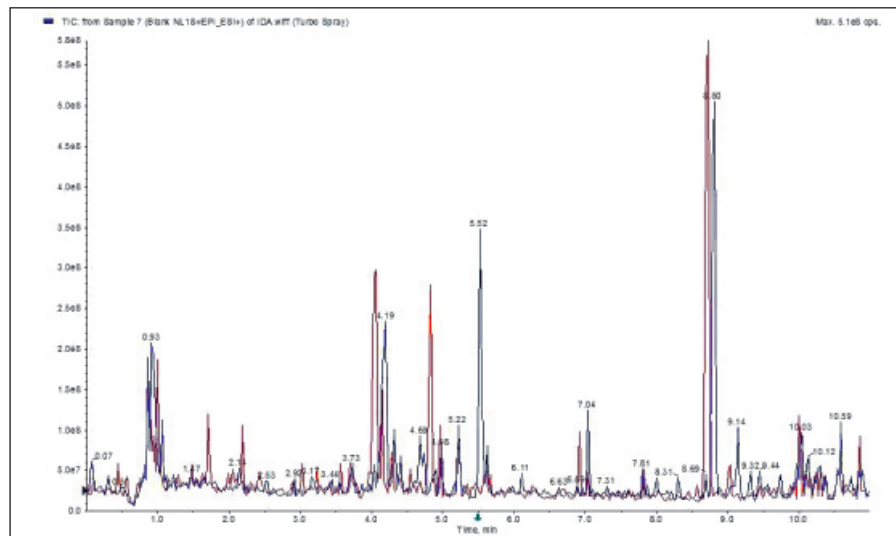


Slika 2: Bakterijska razgradnja lignina do identificiranih produktov / Figure 2: Bacterial degradation of lignin to the identified products

osnovi literature definirali kot potencialne produkte razgradnje lignina. V vzorcih iz gojišč po 6-dnevni inkubaciji lignina z bakterijami smo s tarčno analizo določili prisotnost treh izmed iskanih polifenolnih spojin: vanilinske kisline, 4-hidroksiacetofenona ter acetovanilona (Slika 2). Njihova odsotnost v kontrolnih vzorcih potrjuje, da dejansko predstavljajo produkte bakterijske razgradnje.

Z **netarčno analizo**, s katero je teoretično mogoče zaznati in identificirati vse spojine, prisotne v vzorcih, smo nato preverili še, ali so pri razgradnji poleg zgoraj omenjenih nastali tudi kateri drugi produkti. Zaznali smo večje število signalov za produkte biorazgradnje, ki jih bo v naslednji stopnji treba identificirati. Za točno identifikacijo ostalih prisotnih produktov iz podatkov netarčne analize so potrebne natančnejše informacije o njihovih masah, do katerih je mogoče priti le z analizo na visokoločljivostnem masnem spektrometru (HRMS). Z analizami, izvedenimi na našem instrumen-

Rezultati naše študije jasno nakazujejo, da testirani sevi bakterij pod ustreznimi pogoji razgrajujejo lignin v potencialno uporabne produkte. Med njimi smo identificirali vanilinsko kislino, 4-hidroksiacetofenon ter acetovanilon, vse lahko opišemo kot produkte z dodano vrednostjo. Njihova uporaba je namreč raznovrstna, med drugim se uporabljajo v farmacevtskih izdelkih, pa tudi kot arome in dišave. Kot produkti razgradnje sicer nastajajo še druge spojine, kar je razvidno iz rezultatov netarčne analize. Nadaljnji eksperimenti so predvideni na zmogljivejših instrumentih, in nam bodo omogočili določitev njihovih natančnih mas ter posledično identifikacijo. Bakterijska razgradnja ima torej potencial, da postane način za okolju prijazno pretvorbo odpadnega lignina v uporabne produkte, kar bo predmet naših nadaljnjih raziskav.



Slika 3: Primerjava kromatogramov slepega vzorca (moder signal) in enega izmed vzorcev po biorazgradnji (rdeč signal) / Figure 3: Comparison of chromatograms of a blank sample (blue signal) and one of the samples after biodegradation (red signal)

tu, ta torej ni mogoča, smo pa kljub temu pridobili nekaj dragocenih informacij. Očitne razlike med posnetimi kromatogrami vzorcev lignina pred in po inkubaciji z bakterijami (Slika 3) jasno nakazujejo, da je njihova sestava različna, kar je še dodaten dokaz, da je prišlo do biorazgradnje. Pridobljene informacije o približnih masah v vzorcih prisotnih spojin bomo uporabili kot izhodišče za nadaljnje delo na HRMS.

## Zahvala

Raziskave so bile izvedene v okviru projektov Applause (sporazum o dodelitvi sredstev št. UIA02-228), Greener (sporazum o dodelitvi sredstev št. 826312) in SurfBio (sporazum o dodelitvi sredstev št. 952379) ter programske skupine Agencije za raziskovalno dejavnost RS (P1-0143).

## VIRI IN LITERATURA

- [1] Schoenherr S., Ebrahimi M., Czermak P.: Lignin degradation processes and the purification of valuable products. *Lignin-Trends Appl.* 2018; 29-64
- [2] Bugg T. D., Ahmad M., Hardiman E., Rahmanpour R.: Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *NPR* 28, 2011; 1883-1896
- [3] Chen Z., Wan C.: Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renewable and sustainable energy reviews* 73, 2018; 610-621
- [4] De Gonzalo G., Colpa D. I., Habib M. H. M., Fraaije M.W.: Bacterial enzymes involved in lignin degradation; *Journal of biotechnology* 236, 2016; 110-119
- [5] Falade, A., Eyisi, O., Mabinya, L., Nwodo, U. and Okoh, A., 2017. Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens*. *Biotechnology Reports*, 16, pp.12-17.
- [6] Wang J., Liang J., Gao S: Biodegradation of Lignin monomers vanillic, p-coumaric, and syringic acid by the bacterial strain, *Sphingobacterium* sp. HY-H. *Current Microbiology* vol. 75, 2018; 1156-1164
- [7] Lee S, Kang M., Bae J-H., Sohn J-H., Sung B.H., Bacterial valorization of lignin: Strains, Enzymes, Conversion pathways, Biosensors and Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 2016; 209
- [8] Ulčnik A., Vaukner M., Tavzes Č., Pohleven F.: Glivne lakaze: Encimi neverjetnih sposobnosti; *Les* 63, 2011; 49-54
- [9] Fraaije M.W., van Bloois E.: Dyp-type peroxidases: A promising and versatile class of enzymes. *Enzyme Engineering* 1, 2012; 105
- [10] Mate D., Garcia-Ruiz E., Camarero S., Aldalde M.: Direct evolution of fungal laccases. *Current genomics*, vol. 12, 2011, 2012; 113-122
- [11] Verce M.: Izolacija in karakterizacija bakterijske lakaze. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, magistrsko delo, 2013
- [12] Christopher L. P., Yao B., Ji Y.: Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in energy research*, 2, 2014; 12
- [13] Lu Y., Lu Y-C, Hu H-Q, Xie F-J, Wei X-Y, Fan X.: Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods; *Journal of spectroscopy*, 2017