



Laboratório de Enzimologia

Departamento de Biologia Microbiana

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBICAS
CONVERSoras DE LIGNINA**

Aluna: Rosália Loriani de Santana

Orientadora: Eliane Ferreira Noronha

Co-orientadora: Brenda Rabello de Camargo

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Brasília, 2025

Rosália Loriani de Santana

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBICAS
CONVERSoras DE LIGNINA**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Departamento de Biologia Microbiana, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para defesa no programa de mestrado em Biologia Microbiana.

Orientadora: Eliane Ferreira Noronha
Co-orientadora: Brenda Rabello de Camargo

Brasília, 2025

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBICAS CONVERSoras DE LIGNINA

Rosália Loriani de Santana

Orientador(a): Dr^a. Eliane Ferreira Noronha

Co-orientador(a): Dr^a. Brenda Rabello de Camargo

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana para obtenção do título de Mestre.

Banca Examinadora:

✓ Membro interno: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida (UnB).

✓ Membro externo: Dr. Fernando Kahrin Cardoso da Costa (Embrapa).

✓ Suplente: Dr^a. Dasciana de Sousa Rodrigues (UnB).

Brasília, DF

Março de 2025

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof^a.

Dr^a. Eliane Ferreira Noronha. Apoio (CNPq e FAP-DF).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBICAS
CONVERSoras DE LIGNINA

ROSÁLIA LORIANO DE SANTANA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida – Universidade de Brasília – UnB

(Membro interno)

Dr. Fernando Kahrin Cardoso da Costa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EMBRAPA - Agroenergia

(Membro externo)

Dr^a. Dasciana de Sousa Rodrigues – Universidade de Brasília - UnB

Membro interno (Suplente)

Profa. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha – Universidade de Brasília - UnB

(Orientadora / Presidente)

BRASÍLIA – DF

2025

*Àquela que sempre foi meu
porto seguro, minha fonte de
inspiração para ser uma
pessoa melhor e nunca desistir,
minha mãe.*

*Àquele que foi meu amigo,
meu confidente e amado
irmão, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a minha família Lúcia e Rodrigo Daniel (eternamente Niel no meu coração), por todas as vezes que precisei de apoio, inspiração, forças e até broncas, para que eu chegasse tão longe. Tudo que eu adquiri e aprendi, foi por vocês. Eu nunca vou esquecer de tudo que fizeram a vida toda por mim, hoje eu sou quem sou por conta da nossa família maravilhosa e cheia de amor, que eu tive tanta sorte em ter caído de paraquedas. Agradeço a minha maravilhosa Belinha, pois apesar de longe, sempre estive no meu coração, seus 11 anos conosco foram de muitas risadas, amor, carinho e eu vou te amar pra sempre, sempre será meu bebezinho. Muito obrigada por tudo e eu nunca desejaria outra família na minha vida. Eu os amo tanto que nunca será possível expressar em palavras.

Agradeço as pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer neste percurso, João Holanda, Vinicius Rocha e Natan Oliveira. João, meu amigo, nunca achei que seríamos tão próximos (uma pequena desavença, por conta de um equívoco meu quanto a uma cantora), agradeço por ser meu amigo, me apoiado e me ensinado tanto, você é com certeza um profissional exemplar, um amigo fiel e um irmão que a vida me deu, obrigada! Vinicius Rocha, uma pessoa tão carinhosa, linda e cheia de energia e conhecimentos para compartilhar. Agradeço tanto por seu apoio nos meus momentos mais difíceis e dolorosos, você foi como um refrigerio perante a todas as tensões da vida e dos problemas, eu considero você um dos meus melhores amigos, meu muito obrigada! Natan Oliveira, eu agradeço muito por você me ouvir em tantos momentos difíceis, sobre coisas que nunca foram fáceis de serem ditas, com você sempre foi a pessoa que estive lá para ouvir. No início, achei que não seríamos amigos (culpa da sua blusa amarela), mas ainda bem que pudemos contornar esse pequeno equívoco e encontrar tantas coisas em comum (principalmente o sofrimento nos experimentos), eu o admiro pela sua resiliência, perseverança e inteligência, meu amigo você logo passará em concurso, acredite e muito obrigada por tudo!

Agradeço às doutoras Jéssica Pinheiro e Tayná Frederico pela ajuda nas minhas pesquisas, na compreensão dos meus surtos e no apoio nos meus momentos mais difíceis. Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar, a me fornecer conhecimento e me ajudar quando tudo parecia perdido, muito obrigada! Obrigada ao Dr. Pedro Hamann, que apesar de ter conhecido a pouco tempo, já me proporcionou conhecimentos, risadas, sustos e aprendizados, muito obrigada!

Agradeço a todos os ICs que estiveram no laboratório e fizeram parte da minha jornada de ensino e aprendizado, quantas vezes não aprendemos juntos? Quantas vezes não fomos apoio um do outro? Agradeço a paciência comigo, o apoio e a alegria que trouxeram aos meus dias! Um agradecimento especial aos ICs Jailson, Artur e Yasmin, por me ajudarem, fazerem café e me apoiarem em tantos momentos de incerteza e dificuldades, muito obrigada! Da mesma maneira, agradeço a todos os estagiários do laboratório, pois em algum momento todos me ajudaram em algo e espero ter contribuído com todos com algum conhecimento que lhes seja necessário na vida. Seja um

conhecimento científico ou de vida, espero que saibam que se precisarem de algo que eu possa ajudar, estarei sempre aberta a ajudar!

Agora uma pessoa que nunca achei que seria tão necessária na minha vida, uma pessoa que não achei que iríamos nos aproximar e nos tornar além de co-orientadora, mas uma amiga, uma confidente, uma mulher forte, determinada, inteligente e bonita. Brenda Rabello, você é maravilhosa, nunca deixe que ninguém ameace toda a luz que carrega, pois você ilumina todos os ambientes em que entra, assim como iluminou a minha vida, acadêmica e pessoal. Minha amada amiga e incrível co-orientadora, lhe desejo não só o melhor da vida, como também todas as felicidades e conquistas que uma mulher forte como você merece, muito obrigada por tudo!

Agradeço a pessoas amigas que estiveram me apoiando, mesmo que longe, mesmo que sem poder ver com frequência, que me ouviram e me apoiaram, me ensinaram. Obrigada a minhas amigas, Evanice e Taíse, nos vimos tão pouco nesses últimos anos, mas vocês sempre foram minhas grandes amigas, sempre me apoiaram e tiveram orgulho de mim, assim como eu me orgulho das duas, mulheres fortes, determinadas, corajosas e inteligentes, muito obrigada. Obrigada Thaís, minha grande irmã, já temos 10 anos de amizade e nunca nos perdemos uma da outra, apesar de todas as dificuldades, aprendemos juntas a amar e apoiar. Obrigada por todo o apoio, consideração, carinho e dedicação, mesmo longe, eu apoio você, saiba que mesmo a quilômetros, somos irmãs! Obrigada Heloyanne, minha amiga, já temos 7 anos de amizade e eu não sei até hoje como que um sorteio de grupo foi nos tornar amigas tão próximas, como podemos ser tão parecidas e tão diferentes ao mesmo tempo? Como sabemos exatamente o que a outra pensou e sentiu mesmo sem dizer uma palavra? A vida me deu uma irmã tão incrível, eu te considero minha irmã mais nova, da qual eu posso compartilhar meus erros e acertos e posso acompanhar sua trajetória de vida, te apoiando o máximo que conseguir. O meu muito obrigada por tudo amiga, por tudo! Obrigada Cristine, por tudo que me ensinou para que eu chegasse até aqui, obrigada por me indicar e ter paciência comigo, obrigada por me apoiar e sempre conversar comigo sobre a vida e como posso ser uma profissional melhor. Obrigada por acreditar em mim! Obrigada por tudo!

Como não poderia agradecer a uma pessoa tão importante em todo o processo? A pessoa que se arriscou a receber uma pessoa desconhecida, me ensinou não só a aprender sobre o que eu precisava, mas como ser uma profissional melhor, me confiou responsabilidades, exigiu de mim e me ensinou a ser mais madura e profissional. A pessoa que teve paciência de me explicar 10x a mesma coisa quando eu não entendia e me corrigiu todas as vezes que foram necessárias. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor, prof^a Eliane Noronha. Eu agradeço por todo o carinho, compreensão nos meus momentos de completo surto, de cobrança nos meus momentos de dispersão e de apoio nos meus momentos de desânimo. Eu agradeço por tudo e principalmente pela oportunidade de compartilhar seu grupo, seus conhecimentos e sua vivência comigo. Obrigada!

Agradeço a banca de mestrado, Dr. João Ricardo, Dr. Fernando Kahrin e Dr^a. Dasciana de Sousa, pela oportunidade, pela paciência e pela contribuição para o aprimoramento deste trabalho e o meu crescimento profissional, muito obrigada! Aos

órgãos de fomento, muito obrigada pelo suporte financeiro na realização deste projeto, sem isso essa pesquisa não seria possível, ao CNPq, à FAP-DF, pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa de mestrado, os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a Universidade de Brasília por tudo que me proporcionou, a estrutura técnica, ao conhecimento proporcionado pelos professores e professoras, a habilidades profissionais adquiridas, a arquitetura tão cheia de vida natural e a oportunidade de participar de tudo, muito obrigada!

Apoio Financeiro

Este projeto foi realizado por meio do apoio financeiro das agências de fomento CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) e com a concessão de bolsa de estudos fornecida pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

"A ciência, meu rapaz, está feita de erros, mas são erros que vale a pena cometer, pois nos levam pouco a pouco à verdade."

"Nada pode resistir à vontade humana quando se quer com firmeza."

— *Júlio Verne, Vinte Mil Léguas Submarinas*

"Se você acha que é difícil, continue. O melhor pode estar logo à frente."

— *Agatha Christie, O Mistério de Sittaford*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	14
Abstract	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Lignina natural	16
1.2. Ligninas técnicas	18
1.3. Aplicações industriais da lignina	20
1.4. Enzimas lignolíticas	21
1.5. Degradação de lignina por microrganismos aeróbios	24
1.6. Degradação de lignina por bactérias anaeróbias	27
1.7. Rúmen bovino como ambiente para prospecção de bactérias anaeróbicas	28
2. Justificativa	31
3. Objetivo gerais	32
3.1. Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Consórcio microbiano conversor de lignina	32
4.1.1. Isolamento de bactérias	33
4.1.2. Análise do consumo de lignina pelos isolados bacterianos	34
4.2. Descoloração e Degradação	34
4.2.1. Descoloração de lignina Kraft	34
4.2.2. Degradação de lignina Kraft	35
4.2.3. Determinação da temperatura de crescimento	35
4.2.4. Técnica de Coloração de Gram	36
4.2.5. FTIR	36
4.3. Identificação molecular	37
4.3.1. Amplificação do gene rRNA 16S	37
4.6. Análise do secretoma	38
4.6.1. Dosagem de proteínas	39
4.6.2. Análise do perfil proteico	39

4.6.2.1. Precipitação de proteínas por TCA e TCA/Acetona	39
4.6.2.2. Avaliação comparativa de metodologias de precipitação	40
4.6.2.3. Métodos de remoção da lignina	41
4.7. Análise Estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Isolamento de bactérias com atividade lignolíticas	41
5.2. Análise de descoloração e degradação de lignina Kraft	42
5.3. Caracterização dos isolados bacterianos	49
5.3.1. Caracterização morfológica	49
5.3.2. Temperatura de crescimento	51
5.3.3. FTIR	54
5.4. Identificação molecular	59
5.5. Análise do perfil proteico	62
5.5.1. Precipitação de proteínas por TCA e TCA/Acetona	65
5.5.2. Avaliação comparativa de metodologias de precipitação	66
5.5.3. Métodos de remoção da lignina	69
6. Perspectivas	70
7. Conclusões	71
8. Referências bibliográficas	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPPA - Canadian Pulp and Paper Association

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

ESI - Ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*)

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

HRMS – Espectrometria de massa de alta resolução (*High-Resolution Mass Spectrometry*)

KL – Kraft Lignin

KLY – Lignina Kraft com extrato de levedura (*Kraft Lignin with Yeast Extract*)

LiP - Lignina Peroxidases (*Lignin Peroxidases*)

MetaCyC - MetaCyc Metabolic Pathways Database

MnP - Manganês Peroxidase (*Manganese Peroxidase*)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OD - Densidade ótica (*Optical Density*)

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PVPP - Polivinilpolipirrolidona (*Polyvinylpyrrolidone*)

RPM - Rotação por minuto (*Revolutions Per Minute*)

TCA - Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic Acid*)

TL - Lignina Técnica (*Technical Lignin*)

UV – Ultravioleta (*Ultraviolet*)

VP - Peroxidase Versátil (*Versatile Peroxidase*)

XG (RCF) - Força centrífuga relativa (*Relative Centrifugal Force*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental para análise do secretoma do isolado IY 2-3. 41
- Figura 2.** Curva de crescimento dos isolados do grupo 1 (A), valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo 1 (B) e valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo 1 (C) Valores relativos de degradação da lignina kraft pelos isolados do grupo 1. (D) Observação visual da descoloração do meio de cultivo, (CN) controle negativo (meio não inoculado), IY 2-2, IY 2-3, IY 2-4, IY 2-5, IY 2-8, IY 2-9, IY 2-10, IY 2-11, ICE 3, ICE 5 e ICE 6 isolados cultivados separadamente em meio de cultura redutor, após 1 dia de crescimento (D). 47
- Figura 3.** Curva de crescimento dos isolados do grupo III (A), valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo III (B), e valores relativos de degradação da lignina kraft pelos isolados do grupo III (C). Observação visual da descoloração do meio de cultivo, (CN) controle negativo (meio não inoculado), IL 2-2, IL 2-3, IL 2-4, IL 2-5, IL 2-6, IL 2-7, IL 2-8, IL 2-9 são os isolados cultivados separadamente no mesmo meio de cultura, após 1 dia de crescimento (D). 49
- Figura 4.** Análise da coloração de Gram dos isolados (IY 2-3, IY 2-8, IY 2-9, IY 2-10 e IL 2-9) por microscopia óptica no aumento de 100x. A) IY 2-3, bactéria gram positiva. B) Isolado IY 2-8, bactéria gram negativa. C) Isolado IY 2-9, bactéria gram positiva. D) Isolado IY 2-10, bactéria gram positiva. E) Isolado IL 2-9, bactéria gram positiva. 53
- Figura 5.** Comparação de crescimento em cinco diferentes temperaturas de cultivo (28, 37, 45, 50 e 60°C) de cinco isolados do consórcio. A) Gráfico comparativo do crescimento dos 5 isolados nas cinco temperaturas, após 24 horas de cultivo. B) Gráfico comparativo da descoloração realizada pelos isolados 5 isolados em cinco temperaturas diferentes de crescimento, após 24 horas de cultivo. Barras verticais indicam desvio. As letras acima das barras representam diferenças significativas entre as amostras de cada isolado e as 5 temperaturas testadas para cada um, letras iguais representam que não há diferença estatística entre os tratamentos, o valor de p tem que ser $p < 0,05$, para ser considerado significativo nesta análise. 56
- Figura 6.** Para melhores análises dos vales no espectro FTIR, o espectro foi ampliado entre 3000 e 600 cm^{-1} . Em azul está representada a amostra controle (sem tratamento). Em vermelho está representado o espectro gerado pelas modificações causadas pelo isolado IY 2-10 em 24 horas de crescimento, a 37°C. Em amarelo está representado o espectro gerado pelas modificações causadas pelo isolado IY 2-3 em 24 horas de crescimento, a 37°C. 60
- Figura 7.** Fluxograma de todos os tratamentos utilizados no secretoma do isolado IY 2-3. A) Tratamento inicial com métodos de precipitação de proteínas mais comuns. B) Concentração de amostras por saturação com sulfato de amônio em duas concentrações (70% e 80%) seguida de testes da amostra concentrada em 6 diferentes métodos de precipitação de proteínas. C) Remoção da lignina por meio de 4 métodos de retirada da lignina, utilizando a precipitação da lignina por meio da saturação por sulfato de amônio (40%), utilização de PVPP e acidificação do sobrenadante até o pH 3,0. 66
- Figura 8.** Imagens de todos os tratamentos realizados no secretoma do isolado IY 2-3 em géis de poliacrilamida 12% corados com nitrato de prata. A) Gel com as amostras de dois métodos de precipitação de proteínas com duas variações, (M) Marcador de peso molecular com tamanhos conhecidos de proteínas,

método TCA/Acetona 10%, método TCA/Acetona 20%, método TCA 10%, método TCA 20%. B) Proteínas precipitadas utilizando 6 métodos diferentes, da amostra concentrada com 70% de saturação de sulfato de amônio, (M) Marcador de peso molecular, método acetona 1:1, acetona 4:1, etanol 80%, TCA 20%, TCA/acetona 20% e metanol/clorofórmio. C) Proteínas precipitadas utilizando 6 métodos diferentes, da amostra concentrada com 80% de saturação de sulfato de amônio, (M) Marcador de peso molecular, método acetona 1:1, acetona 4:1, etanol 80%, TCA 20%, TCA/acetona 20% e metanol/clorofórmio. D) Proteínas precipitadas do sobrenadante do isolado IY 2-3 tratado com 3 métodos para retirada da lignina. (M) Marcador de peso molecular, (CN) controle negativo (amostra sem tratamento), (pH 3,0) amostra acidificada com HCL (1M) até o pH 3,0, (S.A 40%) amostra tratada com saturação de sulfato de amônio a 40%, (PVPP 5%) amostra tratada com PVPP (5%). Imagem do sobrenadante do isolado IY 2-3 após os 3 tratamentos, em comparação com o sobrenadante sem nenhum tratamento. I) Controle negativo (sem tratamento), II) Amostra acidificada com HCL (1M) até o pH 3,0, III) Amostra tratada com PVPP (5%), IV) amostra tratada com saturação de sulfato de amônio a 40%.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados do consórcio microbiano degradador de lignina kraft 45
- Tabela 2.** Análise comparativa do crescimento dos isolados bacterianos e de suas atividades sobre lignina expressas em taxas (%) de descoloração e degradação. 51
- Tabela 3.** Tabela dos números de ondas em cm^{-1} referente aos vales de maior intensidade, adquiridos após o cultivo com os isolados IY 2-3 e IY 2-8 sobre a lignina kraft, após 1 dia de crescimento bacteriano. Apresentando os grupos funcionais associados aos vales e as possíveis modificações causadas pelas bactérias sobre a lignina kraft. (-) ausência do vale e (+) presença do vale. 58
- Tabela 4.** Tabela com todos os isolados em ordem de maior taxa de descoloração para menor, com a morfologia de vários isolados que foram testados, a possível identificação a partir do sequenciamento obtido, o tamanho do *amplicon* disponibilizado no banco de dados NCBI, a cobertura em pares de base (PB) e em porcentagem (%) e pôr fim a identidade (%). 63

RESUMO

A crise mundial de acúmulo de resíduos tóxicos, traz à tona a necessidade de uma forma sustentável de utilização de compostos resultantes de processos industriais, como a lignina kraft é produzida por indústrias produtoras de polpa de papel e celulose, a partir do tratamento de biomassa lignocelulósica. A lignina é uma fonte de compostos aromáticos de interesse industrial por ser renovável. Estudos anteriores reportaram que no rúmen bovino há uma microbiota diversa e altamente especializada na degradação da lignocelulose, indicando que estas comunidades microbianas podem ser constituídas por microrganismos conversores deste tipo de biomassa e assim com potencial em processos industriais que utilizam lignocelulose como matéria-prima. O presente estudo, tem como objetivo identificar e caracterizar bactérias anaeróbias capazes de desconstruir lignina kraft visando agregar valor à lignina. Foram obtidos 19 isolados bacterianos a partir de consórcio bacteriano coletado de rúmen bovino, todos foram cultivados em meio redutor contendo lignina kraft e suplementados com glicose, 0,5%. A capacidade de descoloração e degradação da lignina foi avaliada por espectrofotometria, e as modificações estruturais na lignina foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Além disso, foi realizada a identificação molecular dos isolados por sequenciamento do gene rRNA 16S, e o secretoma bacteriano foi analisado para identificar proteínas envolvidas no processo de degradação. Dos 19 isolados, 18 apresentaram atividade de descoloração da lignina, com taxas de descoloração superiores a 50% para a maioria dos isolados. O isolado IY 2-3 destacou-se com a maior taxa de descoloração (66,6%) e degradação (42,07%) após 24 horas de cultivo. A análise de FTIR revelou modificações significativas na estrutura da lignina, indicando a quebra de ligações C-C e C-O, especialmente nos grupos guaiacil e siringil. A identificação molecular sugeriu a presença de bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Enterococcus*, com potencial para degradação de lignina. A análise do secretoma do isolado IY 2-3 revelou a presença de proteínas nas faixas de 70-50 kDa e 30-20 kDa, indicando a liberação de enzimas envolvidas na degradação da lignina. Este estudo demonstrou que bactérias anaeróbias isoladas do rúmen bovino possuem capacidade de degradar lignina kraft, com destaque para o isolado IY 2-3. A suplementação com glicose foi essencial para o crescimento bacteriano e a atividade de degradação. As modificações estruturais na lignina observadas por FTIR sugerem diferentes mecanismos de degradação entre os isolados. A identificação de proteínas no secretoma abre caminho para futuros estudos sobre as enzimas envolvidas nesse processo. Esses resultados indicam o potencial de aplicação dessas bactérias em processos industriais para a valorização de resíduos de lignina.

Palavras-chave: Consórcios microbianos, Lignina kraft, Degradação anaeróbia de lignina, Bactérias lignolíticas, Enzimas lignolíticas.

ABSTRACT

The global crisis of toxic waste accumulation highlights the need for a sustainable approach to utilizing compounds resulting from industrial processes, such as kraft lignin produced by pulp and paper industries from lignocellulosic biomass treatment. Lignin is a source of aromatic compounds of industrial interest due to its renewability. Previous studies have reported a diverse and highly specialized microbiota in bovine rumen for lignocellulose degradation, suggesting that these microbial communities may consist of organisms capable of converting such biomass with potential applications in industrial processes using lignocellulose as raw material. This study aims to identify and characterize anaerobic bacteria capable of deconstructing kraft lignin to add value to lignin. Nineteen bacterial isolates were obtained from a bacterial consortium collected from bovine rumen, all cultured in reducing medium containing kraft lignin supplemented with 0.5% glucose. The lignin discoloration and degradation capabilities were evaluated by spectrophotometry, and structural modifications in lignin were analyzed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Additionally, molecular identification of isolates was performed using 16S rRNA gene sequencing, and bacterial secretomes were analyzed to identify proteins involved in the degradation process. Out of the 19 isolates, 18 showed lignin discoloration activity, with discoloration rates exceeding 50% for most isolates. Isolate IY 2-3 stood out with the highest discoloration rate (66.6%) and degradation (42.07%) after 24 hours of cultivation. FTIR analysis revealed significant modifications in the lignin structure, indicating the cleavage of C-C and C-O bonds, especially in guaiacyl and syringyl groups. Molecular identification suggested the presence of bacteria from the genera *Klebsiella* and *Enterococcus*, with potential for lignin degradation. Secretome analysis of isolate IY 2-3 revealed the presence of proteins in the ranges of 70-50 kDa and 30-20 kDa, indicating the release of enzymes involved in lignin degradation. This study demonstrated that anaerobic bacteria isolated from bovine rumen have the capability to degrade kraft lignin, with isolate IY 2-3 showing significant potential. Glucose supplementation was essential for bacterial growth and degradation activity. Structural modifications in lignin observed by FTIR suggest different degradation mechanisms among isolates. The identification of proteins in the secretome paves the way for future studies on enzymes involved in this process. These results indicate the potential application of these bacteria in industrial processes for the valorization of lignin residues.

Keywords: Microbial consortia, Kraft lignin, Anaerobic lignin degradation, Ligninolytic bacteria, Ligninolytic enzymes."

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lignina natural

A biomassa vegetal representa a maior fração de matéria orgânica do planeta, sendo assim a maior fonte renovável de carbono. A cada ano, são produzidas mais de 200 bilhões de toneladas de biomassa não alimentar (Nandal; Arora; Virmani, 2021). A biomassa é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose corresponde a aproximadamente 38-50% dessa composição e é um homopolímero composto por unidades de *D*-glicose unidas por ligações β -1-4. A hemicelulose corresponde a 23-32%, composta por diferentes monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Abdelaziz *et al.*, 2020).

A lignina por sua vez corresponde a 15-35% da biomassa vegetal e é uma macromolécula de estrutura complexa, constituída principalmente por unidades de fenilpropano em que as mais comuns são guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil (Abdelaziz *et al.*, 2020; Li, Ningjian *et al.*, 2022). As unidades de fenilpropano são ligadas por meio de ligações C-C e C-O e se mantêm ligadas à fração de carboidrato por ligações éter (Shu *et al.*, 2021).

A lignina é um elemento estrutural essencial para as plantas terrestres, intimamente associada a funções de resistência e proteção (Kim; Kim, 2018). A lignina desempenha a função de sustentação de plantas vasculares, permitindo que tecidos como o xilema possam existir, conferindo funções de rigidez, resistência e impermeabilização às paredes celulares vegetais. Assim, possibilitam que essas células suportem a pressão negativa necessária para o transporte de água e minerais da raiz para as partes distais das plantas (Renault; Werck-Reichhart; Weng, 2019).

A recalcitrância da biomassa vegetal causada principalmente pela lignina, ocorre pela presença de múltiplas ligações químicas que ligam a hemicelulose e a celulose à estrutura da lignina formando um complexo lignina-carboidrato, ou seja, uma matriz lignocelulósica de difícil degradação (Zhao *et al.*, 2020). Sendo assim, a lignina possui a

função de proporcionar maior recalcitrância, impermeabilidade e uma proteção adicional contra patógenos na planta (Nandal; Arora; Virmani, 2021).

Inicialmente, a lignina é polimerizada a partir de três unidades principais: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico e somente após a polimerização da lignina dentro da planta que esses álcoois são modificados para as conhecidas unidades de fenilpropano abundantes da estrutura da lignina, denominados *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Renault; Werck-Reichhart; Weng, 2019). A polimerização dessa estrutura é feita pela ligação desses produtos por ligações inter-unitárias dispostas de forma variada entre vários tipos de tecidos e espécies de plantas (Chen; Wan, 2017).

É conhecido que os conteúdos H-G-S são variados entre as espécies vegetais das quais são polimerizadas, sendo assim a lignina pode ser classificada em três grupos dependendo do tipo de origem vegetal, como lignina de madeira macia, madeira dura e gramíneas. A lignina oriunda de madeira macia é principalmente composta por alta quantidade de guaiacil (G), a lignina proveniente da madeira dura é rica no conteúdo de guaiacil e siringil (G-S) ligados entre si, proporcionando maior rigidez a sua estrutura e pôr fim a lignina presente em gramíneas, que apresenta maior quantidade de *p*-hidroxifenil (H), mas as outras duas unidades estão misturadas entre si (G-S) (Li, Changzhi *et al.*, 2015; Ponnusamy *et al.*, 2019).

A biomassa vegetal, devido à sua composição, é amplamente utilizada na indústria, os carboidratos (celulose e hemicelulose) são decompostos em açúcares simples e aplicados em diversos campos da bioenergia, bioetanol e síntese química (Hou *et al.*, 2024). Porém, anteriormente à sua utilização, a lignina precisa ser removida em uma etapa denominada pré-tratamento, que consiste em tratamentos que podem ser físico-químicos ou biológicos. Dessa forma, a lignina atualmente é pouco utilizada e por muito tempo foi considerada um rejeito de indústrias de papel e biocombustíveis, tendo sua utilização mais comum na indústria na geração de energia por meio da incineração (Priyadarshi *et al.*, 2024).

No entanto, a lignina também representa um composto de alto valor agregado, apresentando na sua composição compostos de interesse industrial. Porém, o maior desafio na sua utilização é conseguir desconstruir a lignina utilizando processos de baixo custo e eficientes, e ainda sustentáveis, na intenção de diminuir impactos ambientais causados pelo acúmulo e descarte de resíduos (Shorey *et al.*, 2024). Com esse objetivo, métodos de desconstruir essa biomassa de forma sustentável, estão cada vez mais sendo

o foco de estudos, que englobam a utilização da biotecnologia na busca e implementação de processos acessíveis (Priyadarshi *et al.*, 2024; Renault; Werck-Reichhart; Weng, 2019).

1.2. Ligninas técnicas

A lignina é removida para o acesso às frações de interesse da biomassa lignocelulósica (celulose e hemicelulose) e é utilizada em diversos ramos da indústria, como conversão em polpa de papel e celulose, biocombustíveis e outros bioprodutos (Zainith *et al.*, 2019). O processo de polpação de papel e celulose utiliza um pré-tratamento de retirada da lignina presente na parede vegetal, que pode ser feito por combinação de tratamento térmico, alta pressão e utilização de etapas químicas (Ravi *et al.*, 2019; Tomani, 2010). A indústria de polpação de papel e celulose é uma das principais indústrias que utilizam biomassa lignocelulósica, por conta disso é uma das principais produtoras de subprodutos dessa biomassa (Abdelaziz *et al.*, 2020; Rammala; Zhou, 2022).

As ligninas são produzidas como subproduto após os procedimentos destes pré-tratamentos. A lignina resultante deste processo é denominada lignina técnica e diferentes processos podem gerar vários tipos de ligninas técnicas. Dependendo do método utilizado a lignina resultante do processo pode ou não conter enxofre. As ligninas mais produzidas são: a lignina kraft, organosolv, soda, os lignossulfonatos e lignina hidrolisada (Priyadarshi *et al.*, 2024).

Atualmente, a comercialização dos produtos da lignina é derivada dos lignossulfonatos, participando da produção de ligantes, dispersantes, emulsificantes ou sequestrantes. Outra aplicação comum da lignina técnica é de estabilização de asfalto e aditivos de cimento no mercado de engenharia civil (Lawoko; Samec, 2023; Li, Qi *et al.*, 2023). Sabendo da sua estrutura química complexa e rica em compostos aromáticos, a indústria manifesta grande interesse na sua utilização, mas para isso é necessário que ocorra um tratamento que atualmente é químico e de alto custo. Cada lignina técnica apresenta características diferentes relacionadas ao tipo de tratamento que promovem diferentes modificações na sua estrutura (Kienberger *et al.*, 2021).

As indústrias de papel e celulose produzem a lignina kraft como subproduto, essa lignina possui baixo teor de enxofre e apresenta natureza alcalina. Outras ligninas como a organosolv e lignosulfonatos são produzidas por diferentes processos e possuem

propriedades de impurezas e peso molecular diferentes (Kienberger *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2018).

A lignina kraft é gerada após o processo de polpação da celulose, que em resumo utiliza uma mistura de hidróxido de sódio (NaOH) e uma solução de sulfeto de sódio (Na₂S), sob altas temperaturas de cozimento (150°-180°), para quebrar as ligações éter entre a lignina e a celulose e assim pode separar as frações de celulose dos outros componentes que ficam dissolvidos no chamado licor negro. (Baruah *et al.*, 2018; Kumar, Adepu Kiran; Sharma, 2017)

O isolamento da lignina do licor negro é realizado por meio do amplamente estabelecido método de *lignoboost*, que por sua vez necessita da acidificação do licor negro para pH 2, utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄), como esse processo gera uma lignina altamente alcalina, a acidez faz com que a lignina precipite e após essa etapa ela é separada das outras frações por filtração (Lawoko; Samec, 2023; Tomani, 2010).

Esse método de extração da lignina promove a quebra de ligações gerando uma lignina mais degradada e que possui diferentes pesos moleculares se distanciando da conformação original ou até mesmo de outras ligninas técnicas (Lawoko; Samec, 2023). As modificações mais comuns resultantes do processo químico severo que a lignina passa, ocorrem principalmente pelo aumento de grupos hidroxila fenólicos, de estruturas condensadas e aumentos em ligações bifenil. O aumento significativo de ligações C-C promove maior recalcitrância à molécula, acarretando em mais dificuldade de despolimerizar a estrutura (Jönsson; Martín, 2016; Li, Mi; Pu; Ragauskas, 2016).

A previsão do acúmulo de lignina pelas indústrias de papel e polpação de celulose para o ano de 2025, no Brasil é de 2,5 milhões de toneladas, revelando assim a abundância desse resíduo, e a urgência de estabelecimento de novas tecnologia da reutilização de forma sustentável (Dessbesell *et al.*, 2020; Kumar, Adarsh; Chandra, 2020).

Dependendo do tratamento aplicado para retirar a lignina, as modificações estruturais podem ser irreversíveis. O processo organosolv utiliza solventes orgânicos como etanol, ácido acético, ácido fórmico e ácidos peroxiorgânicos são aplicados a biomassa e submetidos a altas temperaturas (190 °C), as ligações éster são rompidas e a lignina resultante desse processo, fica dissolvida no solvente utilizado (Bajwa *et al.*, 2019). Este método é menos abrasivo na separação da lignina dos outros componentes de interesse e comumente utilizada no tratamento da biomassa para a produção de biocombustíveis (Baruah *et al.*, 2018).

Há também o processo em que se obtém os lignossulfonatos, nesse processo há o acréscimo de sulfito (SO_3^{2-}) e bissulfitos (HSO_3^-) à biomassa lignocelulósica. O produto desse processo é uma lignina sulfonada e degradada, contendo grandes números de grupos como hidroxila, carboxílicos, sulfúricos e fenólicos, apresentando altas taxas de cinzas e aumento no peso molecular em comparação aos outros métodos (Li, Mi; Pu; Ragauskas, 2016; Shorey *et al.*, 2024).

Dessa forma, o método de extração da lignina pode ocasionar o aumento considerável da recalcitrância, degradação ou presença de compostos químicos proporcionando maiores dificuldades de produzir produtos de interesse a partir da molécula de lignina (Shorey *et al.*, 2024). Contudo, a utilização de microrganismos tem gerado maior interesse pelos processos que podem ser aplicados, de menor custo e maiores possibilidades de utilização desses subprodutos.

1.3. Aplicações industriais da lignina

Como mencionado anteriormente, o acúmulo de resíduos têm sido o propulsor para pesquisas acerca de tecnologias sustentáveis e aplicações biotecnológicas. Após a implementação das diretrizes da economia circular, o enfoque é reutilizar todos os rejeitos gerados após o processamento da matéria-prima, a fim de que possa diminuir os impactos causados pelo acúmulo de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (Bocken *et al.*, 2016; Mies; Gold, 2021). A intenção é circular o máximo de frações possíveis a partir da matéria-prima extraída do meio ambiente, evitando o acúmulo de resíduos, investindo assim em tratamentos mais sustentáveis da biomassa e em produtos menos agressivos aos ecossistemas (Mies; Gold, 2021).

A lignina kraft representa a maior fração de lignina produzida (85%) e a sua reutilização é principalmente na geração de energia pela incineração. Contudo a lignina apresenta grande potencial de aplicação industrial (Nandal; Arora; Virmani, 2021). Inovações tecnológicas a partir da lignina vem sendo exploradas como por exemplo na produção de solventes para descontaminação de águas residuais ou derramamento de petróleo em ambientes naturais. Assim como, a utilização da lignina organosolv incorporada em tintas e vernizes para redução da vaporização de fluidos viscosos, utilizada neste contexto, como melhoria de um produto pré-existente (Yadav *et al.*, 2022).

A aplicação de lignina também é associada ao ramo da engenharia civil, como na produção de porcelana e tijolos ou como aditivo no concreto em construções. A

capacidade de segregação e imobilização de metais pesados também foi descrita como uma possível aplicação da lignina (Mestre, 2007). Outra aplicação visada atualmente é sua utilização como estabilizador do solo, pois o solo estabilizado utilizando essa possibilidade foi relatado com resultados promissores, como melhores propriedades mecânicas do solo, como a redução do tamanho e volume dos poros levando a uma maior resistência mecânica (Wang *et al.*, 2020).

A lignina é visada principalmente como precursor de uma série de outros compostos a partir da sua desconstrução. Alguns dos produtos químicos interessantes para a indústria, são: ácido 4-hidroxifenilático e 3-fenilático, ácido fenilacético, vanilina, siringaldeído, guaiacol, fenol, e poli-hidroxicanoatos. De maneira semelhante, a lignina pode ser usada para sintetizar outros compostos como diferentes tipos de termoplásticos (Lee *et al.*, 2019).

Dessa maneira, a lignina apresenta grande potencial de aplicação industrial com foco em diferentes produtos liberados de vários tipos de ligninas técnicas produzidas por indústrias. A utilização de microrganismos na indústria vem sendo cada vez mais recorrente, para diversas aplicações. Tanto para a produção de insumos e fármacos comerciáveis, como para a remediação de compostos nocivos ao meio ambiente (Saharan *et al.*, 2024; Silva; Ribeiro, 2024). Insumos produzidos por microrganismos são amplamente comerciáveis atualmente, o que gera o interesse de identificar e caracterizar microrganismos em consórcio ou isolados e as enzimas com capacidade lignolítica para produção de coquetéis enzimáticos (Aishwarya; Yadav; Goyal, 2024).

1.4. Enzimas lignolíticas

Os microrganismos conseguem desconstruir a lignina por meio de hidrólise enzimática. O mecanismo básico da despolimerização da lignina é muito parecido entre fungos e bactérias, em que enzimas oxidativas são as peças-chave nesse processo. Estas enzimas atuam nas ligações covalentes da estrutura da lignina que une as três principais unidades de fenilpropano que são ligadas em sua estrutura por ligações éter (β -O-4, 4-O-5) e carbono-carbono (5-5, β -5, β - β , β -1) (Kim, Jae-Young *et al.*, 2015; Wilhelm *et al.*, 2019). Diversas enzimas que são produzidas por fungos, também foram encontradas sendo produzidas por bactérias. As modificações ou a degradação causada por bactérias envolvem enzimas oxidativas pertencentes a famílias de atividade auxiliar (AA). As mais

descritas são: manganês peroxidase, ligninas peroxidase, lacases, entre outras enzimas auxiliares (Barreiro; Oliveira; Pauleta, 2023b; Kumar, Rajesh *et al.*, 2022).

Como mencionado, para a degradação da lignina é necessário um repertório de várias enzimas atuando sobre a biomassa, muitas delas são enzimas redox-ativas e classificadas em enzimas com atividade auxiliar (AA). As principais enzimas de atividades auxiliares pertencem principalmente a família AA1 e AA2, seguida de enzimas da família AA4, que tem correlação com a oxidação ou redução de compostos derivados da lignina, a família AA5 e a AA6 contém oxidases e redutases que podem fazer parte do processo e por fim as famílias AA3 e AA7 que apresentam enzimas que podem participar da degradação da lignina por meio de reações de *Fenton* (Lombard *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018).

As lacases são enzimas que pertencem a superfamília AA1 de proteínas multicobre que tem atividade contra monofenóis e estruturas *p*-difenois. Já foram encontradas sendo produzidas por fungos, bactérias, plantas e insetos (Khatami *et al.*, 2022). Elas possuem quatro íons de cobre distribuídos em seus sítios ativos. Conhecidas por sua atividade sobre uma ampla gama de substratos fenólicos, as lacases necessitam da presença de moléculas intermediárias que agem como doadores de elétrons, geralmente ela utiliza a molécula de oxigênio como doador para sua ação sobre substratos. Essas características possibilitam a ação dessas enzimas em diversos substratos e reduzem oxigênio em moléculas de água, por isso são consideradas enzimas sustentáveis. As lacases têm muitas funções que podem ser da síntese da lignina nas plantas, como a sua degradação, utilizada pelos microrganismos (de Gonzalo *et al.*, 2016; Khatami *et al.*, 2022).

As ligninas peroxidase (LiPs) são proteínas que contém uma estrutura heme com íon ferro central, possui também íons ferrosos em sua estrutura, necessários para que ocorra a reação. Essas enzimas também dependem de cofatores que vão agir como doadores de elétrons na catálise da redução do substrato e neste caso, o cofator mais comum é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Barreiro; Oliveira; Pauleta, 2023; Kharayat; and Thakur, 2012). Essas enzimas têm capacidade de oxidar locais de potencial redox alto, que envolvem anéis aromáticos ativos de forma moderada. Se o tamanho dos substratos de lignina influencia na eficiência da enzima em catalisar a quebra lignina, em casos em que o tamanho dos substratos for menor, estes podem ser facilmente degradados. Essas enzimas foram amplamente estudadas associadas à sua produção por fungos, principalmente *Phanerochaete chrysosporium*. As bactérias descritas como

produtoras desta enzima são *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces cinnamoneus*, *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp (Weng; Peng; Han, 2021)

Outra enzima conhecida e muito presente da desconstrução da lignina é a Manganês Peroxidase (MnP), essa enzima é semelhante a lignina peroxidase, ambas são heme-proteínas e a desconstrução da lignina depende de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como doador de elétrons nas suas etapas (Kumar, Rajesh *et al.*, 2022). Mas diferente da LiP, ela precisa de um mediador para manter sua atividade, que nesse caso é o Mn²⁺. A catálise se inicia com a ligação do H₂O₂ ao íon de ferro presente no grupo heme, que então oxida o Mn²⁺ para Mn³⁺, esse íon então vai realizar a clivagem de ligações C α -C β na estrutura da lignina (Benavides *et al.*, 2024). Esta enzima tem a capacidade de remover grupos metil em compostos fenólicos, contribuindo para a produção de moléculas menores (Zhou *et al.*, 2024). Algumas bactérias já foram relatadas como capazes de secretar MnP, dentre elas a *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp., *Brevibacillus thermoruber* e *Arthrobacter* sp (Weng; Peng; Han, 2021).

Além das mais amplamente analisadas, as peroxidases versáteis (VP) foram encontradas em vários gêneros fúngicos, alguns deles são representantes comuns da podridão branca. Ela possui as propriedades catalíticas das anteriormente mencionadas e podem clivar compostos não aromáticos também de alto potencial redox e algumas outras de menor potencial, as VPs também oxidam o Mn²⁺ para Mn³⁺ (Vasina *et al.*, 2017). Uma característica importante dessa enzima é que ela tem a capacidade de oxidar corantes azo e outros compostos na ausência de mediadores e já foi usada para reduzir a recalcitrância da sacarificação da palha de milho e melhorar a hidrólise enzimática da celulose (Savinova *et al.*, 2023):

Além dessas enzimas mais descritas na literatura, há outras enzimas que apresentam um papel central na degradação da lignina exercida por bactérias. Atualmente as β -eterases estão intimamente envolvidas no processo de desconstrução e consumo da lignina, assim como outros compostos fenólicos (Weng; Peng; Han, 2021). Essas enzimas têm a capacidade de clivar ligações β -aril éter e bifenil muito presentes na lignina e estão se tornando cada vez mais foco de estudos pois tem a capacidade de decompor lignina de alto peso molecular em frações de menor peso. Este processo também é de muito interesse pois é um processo não oxidativo (H. Bugg, 2024).

Uma bactéria descrita como capaz de expressar essa proteína na degradação de lignina é a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 que apesar de ser uma bactéria aeróbia, apresentou esse processo não oxidativo na degradação da lignina. Devido ao alto teor de

ligações β -O-4 presentes na estrutura complexa da lignina, a quebra dessas ligações é crítica para a sua despolimerização (Sonoki *et al.*, 2002).

Além dessas enzimas mencionadas, outras podem estar envolvidas no processo de desconstrução da lignina, por exemplo, a álcool oxidase, glioxal oxidase são enzimas auxiliares que fornecem H_2O_2 para a ação das peroxidases, ou a superóxido dismutase que tem capacidade de clivar as ligações aril-C α e C α -C β presentes em sua estrutura. Como mencionado antes, é necessário que mais estudos sejam realizados para que possamos ter maior elucidação quanto ao processo de desconstrução da lignina em ambientes anóxicos, para poder aplicar novos produtos biotecnológicos que além de serem mais sustentáveis, poderão promover diversas aplicações industriais diferentes (H. Bugg, 2024; Silva, Jéssica P. *et al.*, 2021).

1.5. Degradação de lignina por microrganismos aeróbios

As características químicas da lignina promovem às plantas proteção e sustentação, como mencionado anteriormente. Por esse motivo que em ambientes naturais, a despolimerização da biomassa lignocelulósica é realizada pela associação de diversos microrganismos agindo em sinergia, na liberação de diversas enzimas extracelulares e promovem a despolimerização da biomassa em fragmentos menores que então são absorvidos pelos microrganismos (Brink *et al.*, 2019).

A despolimerização da lignina foi amplamente descrita por organismos aeróbios, em ambientes naturais a presença de fungos filamentosos que estão comumente associados à podridão branca, podridão parda e podridão mole, encontradas principalmente em florestas são os organismos mais encontrados (Andlar *et al.*, 2018). Os fungos que foram identificados são naturalmente especializados na decomposição de lignina e a ação desses fungos da podridão branca foi extensivamente analisada. Os fungos que pertencem ao complexo patogênico da podridão branca têm maior capacidade de degradação da lignina natural do que dos outros complexos patogênicos (Kato *et al.*, 2024; Kumar, Vikas *et al.*, 2024).

Dos fungos da podridão branca, entre as espécies descritas com atividade lignolítica, os principais são de espécies de ascomicetos e basidiomicetos. As espécies *Ceriporiopsis*, *subvermispora*, *Phellinus pini*, *Ganoderma australe* e *Phlebia tremellosa*, se destacam como capazes de degradar lignina e hemicelulose mutuamente. Outras espécies conseguem despolimerizar as três unidades principais da biomassa

lignocelulósica, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolos*, *Heterobasidion annosum* e *Irpex lacteusare* se destacam (Weng; Peng; Han, 2021). Sendo que o *Phanerochaete chrysosporium*, um organismo modelo na degradação da lignina, tem sido utilizado no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Esses fungos utilizam principalmente enzimas oxidativas que decompõem a lignina por meio da clivagem de ligações C-C e ligações éter (Singh *et al.*, 2011).

Os representantes da podridão parda são especializados na decomposição da madeira macia, esta como mencionado anteriormente, é rica em unidades de guaiacol e menos quantidades das outras unidades. Estes fungos têm potencial de hidrolisar rapidamente as frações correspondentes a celulose e hemicelulose e conseguem oxidar parcialmente a lignina. Os fungos da podridão parda não utilizam enzimas para a decomposição da lignina, utilizam na verdade quinonas e hidroquinonas para o rompimento de ligações pela reação química de oxidação de *Fenton* extracelular (Bugg *et al.*, 2011). Já os fungos da podridão mole têm maior preferência a madeira dura, atacando principalmente as unidades de siringil, embora os fungos tenham sido extensivamente estudados, os meios de decomposição da lignina por representantes do complexo patogênico de podridão mole não foram totalmente esclarecidos (Rese *et al.*, 2025; Weng; Peng; Han, 2021).

Após intensa procura e identificação de fungos associados a decomposição da lignina, as bactérias começaram a se tornar o foco de estudos que buscavam entender o papel de bactérias e a capacidade lignolítica exercidas por elas. Estudos relatam que a ação bacteriana ocorre frequentemente em consórcios microbianos agindo em sinergia na liberação de diversas enzimas para a total degradação da lignina em ambientes naturais (Sumranwanich *et al.*, 2024; Xu, Zhaoxian *et al.*, 2019). De modo que a recente busca por bactérias lignolíticas têm se tornado mais frequente, fato que se deve à sua versatilidade bioquímica e baixo custo de produção em larga escala (Khan; Ahring, 2019; Weng; Peng; Han, 2021).

Muitas bactérias lignolíticas foram encontradas em diferentes habitats, como solo, madeira em decomposição, intestinos de animais, estações de tratamento de águas residuais de indústrias e principalmente presentes no solo. Dessa forma, se pode encontrar diversas espécies de bactérias lignolíticas em florestas, associadas a uma comunidade microbiana na decomposição de biomassa lignocelulósica. Análises de bioinformática sobre comunidades bacterianas confirmam uma alta proporção de genes associados a degradação da lignina e sugerem a possibilidade de enzimas diferentes e vias metabólicas

ainda não conhecidas na sua degradação (BUGG et al., 2011a). Bactérias pertencentes aos filos *Actinomycetota*, *Proteobacteriota* e *Firmicutes* são frequentemente associadas à capacidade de decompor lignina e frações da biomassa vegetal (Bugg et al., 2011).

Uma ampla gama de bactérias aeróbicas, foram descritas com capacidades lignolíticas diferentes, utilizando diferentes enzimas oxidases. Bactérias dos filos *Proteobacteriota* e *Actinomycetota* são muito comuns com atividade lignolítica, gêneros como *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Nocardia* contém vários representantes presentes no solo e em consórcios microbianos que em sinergia decompõem a biomassa lignocelulósica (Bugg et al., 2011). O filo *Actinomicetos* contém bactérias aeróbicas com capacidade lignolítica. Entre elas as *Streptomyces viridosporus* T7A., *Pandoraea* sp., *Citrobacter freundii* (FJ581026), *Rhodococcus jostii* RHA1, *Bacillus* sp e *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 foram cultivadas em lignocelulose e diversas enzimas oxidativas comuns na decomposição da lignina e outros compostos foram identificadas (Asina et al., 2016; Yadav et al., 2022).

Apesar dos fungos serem considerados ótimos organismos com atividade lignolítica, as bactérias possuem diferentes enzimas e possíveis vias metabólicas que geram outros produtos de degradação da lignina. As bactérias possuem muitas formas para degradar a lignina, algumas como as psicrotólicas tem capacidade de degradação em ambientes mais frios, outras conseguem degradar a lignina como única fonte de carbono disponível, mas há outras que necessitam da presença de uma fonte de carbono mais simples para conseguir degradar a lignina (Jiang et al., 2020).

Dessa forma, as bactérias têm aumentado o interesse em relação a sua utilização na indústria, pois será possível utilizar as mesmas em uma ampla faixa de temperaturas e pH, gerando também uma ampla gama de produtos de interesse (Grgas et al., 2023). Entretanto, a despolimerização da lignina por bactérias não foi totalmente compreendida e existem muitas lacunas de conhecimento a serem avaliadas. Assim, o uso da biotecnologia na aplicação de tecnologias limpas para a conversão da lignina pode ainda contribuir para agregar valor a esse resíduo na liberação dos compostos químicos de aplicação industrial (Gao et al., 2024).

1.6. Degradação de lignina por bactérias anaeróbias

Como foi relatado anteriormente, as bactérias podem disponibilizar diversos produtos a partir da lignina, e são alvo de estudos constantes, sendo principalmente

descritas enzimas e vias metabólicas atuantes em ambientes aeróbios. Contudo, existem outros ambientes que contêm uma vasta diversidade microbiológica que não há presença de oxigênio, ou a disponibilidade dele é muito baixa. Organismos que sobrevivem em ambientes assim são anaeróbios, microaerófilos e anaeróbios facultativos (Weng; Peng; Han, 2021). Bactérias anaeróbias já foram identificadas com atividade lignolítica, contudo, como as enzimas e recursos para degradação eram classicamente oxidativos, ou seja, dependente de oxigênio ou espécimes reativos de oxigênio, a degradação em ambiente anaeróbio se tornou uma lacuna de conhecimento a ser compreendida.

De maneira que bactérias de ambientes anaeróbios começaram a ser estudadas e foi compreendido que a degradação da lignina em ambiente anaeróbico é consideravelmente melhor do que em ambientes contendo oxigênio. Como a lignina é rica em grupos metoxi, em ambientes anaeróbios um dos principais processos de degradação é a desmetoxilação, assim como ocorrem também a clivagem no anel aromático e a metanogênese (Ahring *et al.*, 2015; Khan, Muhammad Usman; Ahring, 2019). Este último só é realizado por comunidades microbianas metanogênicas que consomem produtos de degradação da lignina, realizadas por outros microrganismos em ambiente anóxico (Kato, Souichiro *et al.*, 2015).

Das bactérias lignolíticas descritas em ambientes anaeróbios, várias são bactérias anaeróbias facultativas. Um exemplo clássico de bactéria anaeróbia na desconstrução da lignina é a *Enterobacter lignolyticus* SCF1, essa bactéria foi isolada de solo florestal e um estudo conseguiu relatar que ela produziu enzimas oxidativas na degradação da lignina (DeAngelis *et al.*, 2011). Outras cepas que foram encontradas foram as *Tolumonas lignolytica* BRL6-1 e *Klebsiella sp.* BRL6-2, ambas foram descritas com atividades lignolíticas e várias enzimas envolvidas no processo de degradação foram identificadas, assim como a *Acetoanaerobium sp.* WJDL-Y2 que foi isolada e identificada a partir do lodo de uma fábrica de papel e celulose (Billings *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016; Woo *et al.*, 2014).

Também isoladas de lodo de fábricas de papel e celulose, as bactérias *Bacillus altitudinis* SL7, *Bacillus aryabhatai*, *Serratia liquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus velezensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida* e *Ochrobactrum* foram exemplos de bactérias anaeróbias que conseguiram atingir diferentes taxas de degradação e descoloração de ligninas técnicas (Haq *et al.*, 2016; Khan, Sanam Islam *et al.*, 2021; Kumar, Rajesh *et al.*, 2022a, b; Raj; Reddy; Chandra, 2007; Xu, Zhaoxian *et al.*, 2018; Zainith *et al.*, 2019a).

Os exemplos acima demonstram o potencial das bactérias anaeróbias na capacidade de degradação da lignina com a liberação de diferentes produtos. Porém, pouco é conhecido sobre as enzimas atuantes no processo de degradação da lignina em ambientes anóxicos ou com baixíssimas concentrações do mesmo. Assim como, ainda é preciso elucidar as possíveis vias metabólicas que possam estar envolvidas no processo, na intenção de ajudar a preencher essas lacunas de conhecimento e agregar mais valor ao subproduto industrial que é a lignina.

1.7. Rúmen bovino como ambiente para prospecção de bactérias anaeróbias

Como visto, juntamente com a necessidade de estudar e buscar compreender bactérias anaeróbias na decomposição da lignina, vários ambientes anaeróbios estão sendo analisados, e um desses ambientes é o intestino de diversos animais, vertebrados ou invertebrados, que geralmente se alimentam de biomassa lignocelulósica (Mizrahi; Wallace; Morais, 2021). Animais herbívoros dependem da digestão da biomassa vegetal por microrganismos, já que não possuem genes para expressar enzimas que podem hidrolisar a parede celular vegetal. Esses microrganismos colonizam o trato gastrointestinal de animais e são eles que possuem os genes que podem ser expressos em enzimas responsáveis por decompor a biomassa e disponibilizar os polissacarídeos para a nutrição desses animais (Lee, Chol Gyu *et al.*, 2020).

Alguns animais vertebrados desenvolveram um órgão especializado nessa decomposição, que é o rúmen, em seu sistema digestivo anaeróbico adequado para diversas comunidades microbianas diferentes. Vários animais vertebrados ruminantes possuem o rúmen como esse órgão especializado (Silva *et al.*, 2024). O rúmen bovino é o primeiro e maior compartimento do estômago de ruminantes, nesse compartimento ocorre principalmente a fermentação microbiana da biomassa lignocelulósica, essencial para a digestão dos ruminantes e a sua nutrição por meio da degradação da biomassa lignocelulósica (Connolly *et al.*, 2024).

Por conta disso, o rúmen é um ambiente microaerofílico descrito como naturalmente enriquecido por bactérias com capacidade de despolimerização da biomassa lignocelulósica, de forma que também é naturalmente enriquecida para a presença de microrganismos anaeróbios com capacidade de degradar lignina. Alguns estudos mostraram uma degradação parcial da lignina no rúmen bovino (Gharechahi *et al.*, 2023).

A diversidade microbiana do rúmen é composta principalmente por bactérias, havendo a presença de protozoários ciliados em abundância, fungos anaeróbicos e a presença de uma comunidade bem estabelecida de arqueias metanogênicas (Gharechahi *et al.*, 2023). Contudo, a maior diversidade e riqueza da comunidade, pertence às bactérias que representam os componentes mais funcionalmente importantes do rúmen. Cada rúmen pode ter sua composição e estrutura das comunidades microbianas alteradas, fatores como a alimentação, clima, práticas agrícolas e estado de saúde do animal. Independentemente da espécie do animal, as bactérias são componentes principais das comunidades do rúmen, juntamente com as arqueias que são essenciais para a diminuição parcial da pressão causada pelo acúmulo de hidrogênio, sendo essa característica essencial para a fermentação da biomassa vegetal (Wallace *et al.*, 2019).

Portanto, o rúmen tem uma comunidade microbiana bem estabelecida, que é colonizada principalmente por bactérias dos filos *Bacteroidota* e *Bacillota* (antigo *Firmicutes*) em indivíduos adultos. Espécies pertencentes aos dois filos correspondem a 80% das comunidades do rúmen. Outros filos que ocorrem em menor abundância no rúmen são *Verrucomicrobiota*, *Fibrobacteriota*, *Proteobacteria*, *Synergistota* e *Planctomycetota*. Embora ocorram com menor frequência que os outros filos, esses representantes desempenham diversos papéis essenciais (Gharechahi *et al.*, 2023; Wallace *et al.*, 2019).

Entre essas espécies, somente algumas têm o potencial de degradar os polissacarídeos complexos em monômeros de carboidratos, disponibilizando para os membros que não possuem as enzimas necessárias conseguirem metabolizar os produtos de degradação resultantes do processo. Ou seja, os microrganismos agem em sinergia para decompor a biomassa, liberando enzimas para a decomposição da parede celular vegetal e liberando os produtos mais simples para assimilação dos outros microrganismos (Gharechahi *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2024).

Apesar dos extensos estudos da microbiota do rúmen em vários animais herbívoros, poucas informações foram adquiridas quanto à atividade de bactérias que conseguem degradar lignina ou as enzimas utilizadas nesse processo. Em Silva *et al.* (2024) foi confirmada a ação de um consórcio microbiano coletado do rúmen bovino, com atividade de degradação da lignina kraft. Onde o consórcio, sem adição de outra fonte de carbono alternativa, apresentou taxas de descoloração de 29% após dois dias de crescimento em meio de cultura anaeróbico. O mesmo consórcio foi cultivado em meio contendo lignina e extrato de levedura e após esse incremento, a descoloração aumentou

para 40%. Corroborando com a literatura que afirma a necessidade de algumas bactérias, a presença de outra fonte de carbono mais simples.

Neste mesmo trabalho, a amostra era composta principalmente com representantes dos filos *Bacillota* (antigo *Firmicutes*) (amostra do rúmen), correspondendo a aproximadamente 37% de abundância, seguido do filo *Bacteroidota* correspondendo a aproximadamente 48% e Proteobacteria com aproximadamente 10%. Após o enriquecimento com lignina a composição do consórcio se modificou, com prevalência do filo Proteobacteria com aproximadamente 96% de abundância e no enriquecimento contendo lignina e extrato de levedura a prevalência era de 94% de abundância, seguido de *Bacillota* com 4,37% (Silva *et al.*, 2024).

Contudo, quais microrganismos são os principais responsáveis na degradação da lignina dentro do rúmen, as possíveis enzimas e vias metabólicas utilizadas pelas bactérias, ainda não foram totalmente elucidados, necessitando de mais estudos e buscas por respostas neste âmbito.

2. JUSTIFICATIVA

A economia circular tem como princípio ressignificar o modo como empresas projetam produtos e encaram os resíduos e tem como objetivo eliminar a produção de resíduos permitindo que os materiais circulem e que a cadeia produtiva tenha um menor impacto ambiental. A biocatálise se insere na economia circular, conciliando o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matéria prima renovável e a preservação ambiental. A expansão de sua utilização bem como a capacidade de produção no Brasil é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado, por tecnologias limpas que norteiam os processos produtivos internacionais. A lignina é gerada como resíduo por atividade de indústrias que utilizam lignocelulose como matéria-prima, como as de produção de polpa de papel e celulose e sucroalcooleira. A maior parte dessa lignina técnica (95%) é incinerada para produzir energia e vapor. Esta aplicação, no entanto, não aproveita ao máximo o potencial de geração de produtos deste material, uma vez que a lignina representa uma importante fonte renovável de compostos aromáticos, como a vanilina, guaiacol e fenol, entre outros.

O nosso grupo de pesquisa trabalha na prospecção e aplicação de bactérias para desconstrução de lignina visando agregar valor a este material hoje produzido como

rejeito em indústrias que utilizam lignocelulose como matéria-prima. Microrganismos com atividade sobre esta macromolécula também têm potencial para aplicação no tratamento de resíduos e rejeitos contendo lignina, e hidrocarbonetos como plásticos, que impactam severamente ambientes aquáticos no Brasil. No presente estudo a meta central é a caracterização de isolados bacterianos que possuem capacidade de conversão de lignina kraft em ambiente anaeróbio, na intenção de contribuir com conhecimento científico para posterior aplicação biotecnológica dessas linhagens ou enzimas secretadas visando agregar valor a rejeitos de lignina provenientes da indústria.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar isolados bacterianos obtidos de consórcio microbiano conversor de lignina proveniente de rúmen bovino.

3.1. Objetivos específicos

- I- Identificar bactérias anaeróbias isoladas a partir consórcio microbiano conversor de lignina kraft;
- II- Analisar os isolados bacterianos quanto ao consumo de lignina kraft como fonte de carbono;
- III- Analisar as modificações na estrutura da lignina exercida pelos isolados com maior atividade por FTIR;
- IV- Analisar diferentes métodos de preparo do secretoma do isolado que obtiver a maior taxa de descoloração em lignina kraft;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Consórcio microbiano conversor de lignina

O consórcio microbiano utilizado como fonte de bactérias anaeróbias conversoras de lignina foi obtido pelo crescimento de amostras líquidas do rúmen de bovinos da raça Holandesa e cultivado em meio líquido redutor em atmosfera anaeróbia conforme descrito em Ticona *et al.* (2020). O enriquecimento foi realizado em duas condições de cultivo. Na primeira condição foi utilizado o meio de cultura anaeróbio redutor contendo lignina como fonte de carbono e na segunda condição foi adicionado extrato de levedura. Dois consórcios foram gerados a partir do enriquecimento com e sem extrato de levedura (KLY e KL) e foram analisados como descrito no trabalho Silva *et al.* (2024). O consórcio foi armazenado a -80 °C em frascos de anaerobiose contendo meio de cultura anaeróbio redutor suplementado com glicerol (20% v/v), garantindo a manutenção em ambiente anaeróbico. A Coleta de amostra biológica e o cultivo dos microrganismos destas amostras estão devidamente registrados como atividade de pesquisa na plataforma SISGEN do IBAMA. A lignina Kraft, utilizada como fonte de carbono neste estudo, foi doada pelo Professor Francides Gomes da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - USP - ESALQ. Essa lignina foi recuperada do licor negro industrial de eucalipto híbrido (das espécies; *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus Urophylla*) através do processo de LignoBoost® (Tomani, 2010).

4.1.2. Isolamento de bactérias

Para o isolamento de bactérias anaeróbias degradadoras de lignina do consórcio microbiano coletado do rúmen bovino, foram realizados dois enriquecimentos, o primeiro consistiu no cultivo do consórcio em meio de cultura anaeróbio redutor contendo somente lignina kraft como fonte de carbono (KL) e um meio contendo lignina kraft e suplementado com extrato de levedura (KLY). A partir desse enriquecimento foi realizado o isolamento das bactérias em meio de cultura redutor sólido, para 1 L: KH₂PO₄ (1,5 g), Na₂HPO₄ (2,5 g), (NH₄)Cl (0,5 g), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g), NaHCO₃ (0,5 g), MgCl₂ (0,09 g), Solução Mineral (5 mL), Solução de Vitaminas (500µL), NaOH (0,2M) (10 mL), Na₂S₉H₂O (100 µL), Cisteína (0,125 g) e 15g.L⁻¹ de fitagel, 0,35% (p/v), contendo 0,35%

lignina kraft (p/v) e a outra variação continha 0,35% lignina kraft (p/v) e extrato de levedura (3,0 g) (p/v).

O cultivo dos consórcios KL e KLY foram realizados em meio redutor sólido contendo lignina e o suplementado com extrato de levedura, respectivamente. Após 2 dias de crescimento no meio líquido para enriquecimento, foram coletadas alíquotas de 100 μL de ambas as amostras e cultivadas por semeadura nos correspondentes meios sólidos. Após 2 dias de incubação a 37°C as colônias bacterianas que cresceram foram selecionadas de acordo com a sua morfologia (tamanho e forma), coletadas individualmente e em seguida re-inoculadas, por semeadura, em meio sólido, posteriormente foram realizadas três passagens no meio correspondente para cada isolado bacteriano. Os isolados obtidos foram armazenados em meio de cultura líquido redutor e glicerol (concentração final 20%) foi acrescentado após o crescimento dos isolados e mantidos a -80°C.

4.1.3. Análise do consumo de lignina pelos isolados bacterianos

Para cultivar os isolados e testar a capacidade conversora de lignina foi usado o mesmo meio de cultura anaeróbio redutor, para 1 L: KH_2PO_4 (1,5 g), Na_2HPO_4 (2,5 g), $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ (0,5 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), NaHCO_3 (0,5 g), MgCl_2 (0,09 g), Solução Mineral (5 mL), Solução de Vitaminas (500 μL), NaOH (0,2M) (10 mL), $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_{20}$ (100 μL), Cisteína (0,125 g) e 15g.L⁻¹ de fitagel, 0,35% (p/v), contendo 0,35% lignina kraft (p/v) e a outra variação continha 0,35% lignina kraft (p/v) e extrato de levedura (3,0 g) (p/v).

. O inóculo dos isolados que ficam armazenados em -80°C, foi feito em 50mL de meio de cultura anaeróbio líquido e estéril com o auxílio de seringa de insulina (1 mL) e agulha estéreis, uma alíquota correspondendo a 1% da quantidade de meio foi adicionada ao meio de cultura. Um frasco foi reservado para ser o controle negativo (não inoculado) e foi colocado as mesmas condições de cultivo. Os meios inoculados e o controle foram incubados a 37°C em estufa e o crescimento bacteriano foi avaliado por curva de crescimento. Para acompanhar o crescimento foram coletadas alíquotas de 500 μL por 4 dias seguidos de cultivo. Dos 500 μL , 100 μL de amostra foram diluídos 10x contra água MilliQ. Dessa diluição, 200 μL foram colocados em uma placa de Elisa em triplicata técnica e levados a espectrofotômetro, ajustado para medir 600 nm. A partir dos valores de absorbância foi construída uma curva de crescimento.

4.2. Descoloração

4.2.1. Descoloração de lignina Kraft

A capacidade de descoloração de cada isolado bacteriano foi avaliada por meio da mensuração da intensidade de cor do meio de cultivo contendo lignina kraft, que foi realizada de acordo com o método utilizado no trabalho de Silva *et al.*, (2024), que foi baseado no método da Associação Canadense de Celulose e Papel (CPPA) (1974). Para tanto, os isolados foram cultivados em meio de cultura contendo 0,35% de lignina kraft e 0,5% de glicose como fontes de carbono, alíquotas das culturas foram retiradas a cada 24 horas por até 4 dias de incubação, centrifugadas a 10.319 xg (Força centrífuga relativa) por 10 minutos. Do sobrenadante foi coletado 100µL e estes diluídos 10X em tampão fosfato (Na₂HPO₄–NaH₂PO₄, 0,100M com pH 7,6) e transferidos em triplicata técnica para uma placa de Elisa para leitura de absorbância a 465nm.

Os valores de absorbância foram transformados em unidades de coloração (CU) utilizando a fórmula: $CU = 500 * A1/A2$, onde A1 é a absorbância A465 da solução padrão de platina-cobalto 500 CU (0,126) e A2 é a absorbância das amostras. Após adquirir os valores das unidades de coloração, o valor inicial de coloração foi descontado de cada tempo de coleta para ver a progressão de descoloração. Por fim os valores de unidades de coloração reduzidos foram transformados em valores relativos de descoloração de cada isolado e comparado com o meio de cultura não inoculado (controle) (Barapatre; and Jha, 2017; Ojha; Tiwari, 2016; Silva *et al.*, 2024).

4.2.3. Determinação da temperatura de crescimento

O efeito da temperatura no crescimento dos cinco isolados bacterianos escolhidos foram testados em meio de cultura anaeróbico redutor líquido suplementado com glicose. Os isolados foram incubados a temperaturas diferentes (28°C, 37°C, 45°C, 50°C e 60°C) por 24 horas. Para fim de comparação, a densidade ótica, descoloração e degradação de lignina foram medidas como explicado anteriormente, para comparar a população de células e a descoloração da lignina em cada temperatura.

4.2.4. Técnica de Coloração de Gram

Os isolados escolhidos foram cultivados e selecionados para um teste de coloração de Gram, após 24 horas de cultivo uma alíquota foi coletada e diluída 10x ou 20x e uma gota foi colocada em uma lâmina de vidro e seca, somente até o líquido evaporar. Foi seguido o protocolo de coloração de Gram, onde a amostra seca foi coberta pelo corante de cristal violeta, por 1 min., lavada com água destilada delicadamente e coberta por uma solução fixadora (lugol: iodo – iodeto) por 1 min., lavada com etanol 70% por 10-15 segundos, e enxaguada com água destilada. Por fim a amostra foi coberta com uma solução corante de fucsina por 1 min e lavada com água destilada e avaliada em microscópio.

4.2.5. FTIR

A análise das alterações estruturais da macromolécula de lignina foi realizada por meio do método de FTIR (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier). Para realização deste método foi realizado um cultivo de 2 isolados (IY 2-3 e IY 2-10) com 24 horas de crescimento. O pH do meio cultivado foi ajustado para 7.0 e centrifugado a 10.956 xg por 10 min, o meio de cultura não inoculado foi usado como controle. O sobrenadante foi liofilizado e seco em estufa por 24 horas a 60°C, após secas as amostras foram maceradas em cadinho e armazenadas para análise. As amostras em pó foram submetidas à análise no FTIR, por um espectrômetro *ALPHA FT-IR Brunner*, configurado para o modo de refletância total atenuada (ATR). O equipamento foi configurado para 24 varreduras nos espectros em uma faixa de 3.000 a 600 cm⁻¹. O espectro gerado é em transmitância (%) e os picos são comparados com a amostra controle e com a literatura para identificar as modificações causadas pelos isolados.

4.3. Identificação molecular

4.3.1. Amplificação do gene rRNA 16S

A identificação molecular dos isolados do consórcio foi realizada por meio da extração do DNA genômico. Para isso foi realizado um cultivo dos isolados em 50 mL

de meio de cultura suplementado com glicose e lignina Kraft e incubado a 37°C por 4 dias. O meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos a 10.319 xg. O sobrenadante foi armazenado para análises posteriores. O pellet foi utilizado para a extração de DNA genômico por meio da utilização do kit *DNeasy PowerSoil Pro*, seguindo as orientações do fabricante (QIAGEN).

A amplificação do gene referente ao RNA ribossomal 16S (1500 pb) foi realizada por meio de PCR (reação em cadeia de polimerase), para a reação de PCR foram selecionados: 10 ng de DNA genômico, os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') na concentração final de 0,5 µM, o DNTP (desoxinucleotídeos trifosfato) foi adicionado na concentração final de 0,2 mM e os reagentes do kit *GoTaq®G2 DNA Polymerase* foram utilizados para a amplificação do gene e as quantidades utilizadas foram calculadas a partir das instruções do fabricante (PROMEGA).

Os parâmetros no termociclador foram ajustados para: 1º estágio a 95°C por 5 min, 2º estágio a 95°C por 30 seg., 51°C por 30 seg. e 72°C por 2:30 min, neste estágio ocorreram 30 ciclos e o 3º estágio com 72°C por 5 minutos e finalizando a 10°C. Para verificar o produto de PCR foi realizado um gel de agarose a 1% com TAE 1X, um marcador de tamanho de fragmentos de DNA conhecidos (Sigma) foi usado para comparação com a amostra e avaliar se o tamanho do fragmento de PCR correspondia ao esperado. Foi acrescentado 1µL ao marcador e as amostras separadamente, um tampão de amostra 6x e colocado a 5µL de produto de PCR nos poços do gel imerso em TAE 1X. A corrida foi estabelecida para ocorrer na primeira meia hora a 80V, após meia hora a voltagem foi ajustada para 100V. A corrida só foi interrompida no momento em que o tampão de amostra aparecia próximo ao final do gel.

O gel foi corado com brometo de etídeo e revelado em fotodocumentador sob luz ultravioleta (UV). A purificação das amostras de PCR para o sequenciamento e identificação molecular foram realizadas utilizando o kit *QIAEX II® Gel Extraction Kit*, seguindo as orientações do fabricante (QIAGEN). Os amplicons referentes ao gene 16S de 11 dos 19 isolados foram amplificados e purificados. As amostras foram enviadas para sequenciamento tipo Sanger pela empresa *Macrogen - Humanizing Genomics*.

As sequências de ambos os métodos foram analisadas no software *Geneious - Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis* e as sequências de boa qualidade foram comparadas ao banco de dados *Silva*. Para os isolados que obtiveram a

classificação taxonômica de gênero e espécie, árvores genealógicas foram utilizadas a fim de comparar com bactérias descritas e visualizar os graus de parentesco entre elas.

4.6. Análise do secretoma

Para a análise do secretoma do isolado IY 2-3, foi realizado um delineamento experimental para comparação de diversos métodos de preparação de amostra e precipitação de proteínas, para determinar o método mais eficiente para analisar o secretoma de bactérias anaeróbias cultivadas em lignina kraft (Figura 1).

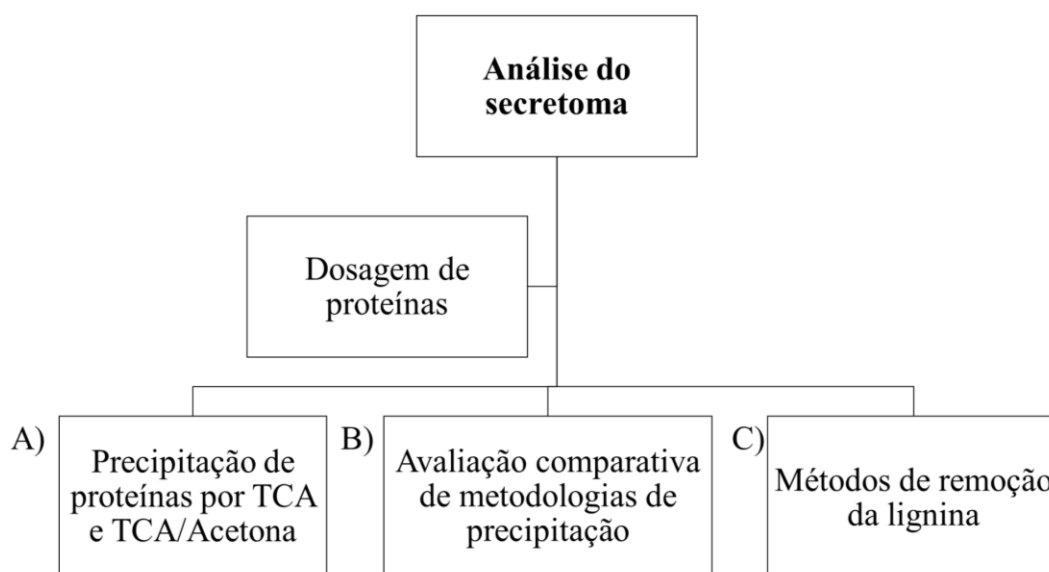


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental para análise do secretoma do isolado IY 2-3.

Como mostrado no fluxograma, os experimentos começaram com a dosagem de proteínas e após estabelecer o melhor método de dosagem de proteínas, foram realizados 3 experimentos comparativos, em que o primeiro consiste na precipitação das proteínas por protocolos mais utilizados para precipitação de proteínas (TCA e TCA/Acetona) (Figura 1A), em seguida foi realizada a concentração das proteínas por sulfato de amônio em duas porcentagem de saturação (70% e 80%) (Figura 1B), por fim foram realizados 3 testes a fim de remover a lignina do sobrenadante e poder acessar mais facilmente as proteínas do secretoma (Figura 1C).

4.6.1. Dosagem de proteínas

Para a análise do secretoma, inicialmente foi realizado o cultivo em meio anaeróbico redutor líquido por 24 horas de crescimento, após isso, o meio de cultura foi centrifugado a 10.956 xg por 10 min, para a retirada de células e partículas em suspensão. O sobrenadante foi separado e dialisado utilizando uma membrana de 3,5 kDa *SnakeSkin™ Dialysis Tubing*, seguindo as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific). Foi realizada a dosagem de proteínas utilizando o método descrito por Bradford (1976). Para descontar os valores de absorvância do meio de cultura, foi necessário utilizar um meio de cultura estéril, dialisado e diluído para atingir o mesmo valor de absorvância do referente ao valor de descoloração atingido pelo isolado (465 nm). De maneira que as interferências causadas pelo meio de cultura seriam descontadas do valor atingido pelo secretoma do isolado, assim quantificando as proteínas presentes no secretoma.

4.6.2. Análise do perfil proteico

4.6.2.1. Precipitação de proteínas por TCA e TCA/Acetona

Para uma análise inicial do perfil proteico do isolado IY 2-3 foram utilizados dois protocolos padrão de precipitação de proteínas. Para esta análise, a quantidade de amostra utilizada foi correspondente a obtenção do equivalente a 200 µg de proteínas do secretoma. Para a precipitação das proteínas foram utilizados os métodos de TCA (ácido tricloroacético) (75% inicial) e TCA/Acetona (75% final) como agentes desnaturantes de proteínas. Os cálculos foram realizados para que a solução estoque fosse diluída na amostra e suas concentrações finais fossem de 10 e 20%.

Para o método contendo somente TCA como agente desnaturante, a amostra foi mantida a 4°C por 4 horas, após esse período, as amostras foram centrifugadas a 18.516 xg por 30 minutos a 4°C e lavado com acetona 100% duas vezes. Para avaliar os perfis, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

No segundo método utilizando TCA/Acetona como agente desnaturante as amostras foram mantidas a -20°C *overnight*, em seguida foram centrifugadas a 8000 xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em uma solução de acetona 60%, seguido de lavagens em um gradiente de concentração de

acetona (70%, 80%, 90% e 100%) (YADAV, 2020). Por fim, a amostra foi seca à temperatura ambiente e os precipitados foram analisados por uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.6.2.2. Avaliação comparativa de metodologias de precipitação

Após a análise prévia do secretoma utilizando TCA, o secretoma do isolado IY 2-3 foi concentrado 10x por meio de precipitação por sulfato de amônio utilizando dois valores de saturação (70% e 80%) (BURGESS, 2014), após essa precipitação a amostra foi centrifugada a 18.516 xg por 30 minutos a 4°C e dialisada para a retirada do sulfato de amônio, utilizando uma membrana de 3,5 kDa *SnakeSkin™ Dialysis Tubing*, seguindo as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific). Após a diálise a amostra concentrada foi submetida a precipitação de proteínas com a utilização de 6 métodos diferentes, com a intenção de avaliar o melhor método para análise do perfil proteico do secretoma deste isolado.

Para esta comparação de métodos 1 mL de amostra concentrada (tanto com 70% quanto 80% de saturação) foi submetida a cada um dos 6 métodos de precipitação de proteínas, os métodos escolhidos foram: Acetona (1:1), Acetona (4:1), etanol (80%) , TCA (20% final), TCA/Acetona (20% final) e metanol/clorofórmio, com adaptações (HANSSON et al., 2004), as amostras foram lavadas com acetona 100% e secas em temperatura ambiente. A fim de comparação, as amostras precipitadas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE), para visualização das bandas de proteína, o gel foi submetido ao método de revelação com nitrato de prata.

4.6.2.3. Métodos de remoção da lignina

Foram testados três métodos para remover a lignina e seus produtos do secretoma: precipitação com sulfato de amônio (40% de saturação) conforme Burgess (2014), adição de 5% de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e acidificação do sobrenadante a pH 3,0 com HCl 1M (Zhu; Theliander, 2015). As amostras foram mantidas a 4 °C durante a noite, centrifugadas a 10.956 xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, o sobrenadante foi dialisado usando membrana *SnakeSkin™* 3,5 kDa (ThermoFisher).

Após a diálise, as proteínas foram precipitadas com acetona (4:1), submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% e reveladas pelo método de coloração com nitrato de prata.

4.7. Análise Estatística

A análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando ANOVA (Análise de Variância unidirecional) e submetidas ao cálculo de Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de bactérias com atividade lignolíticas

Um total de 150 colônias bacterianas crescidas em condições anaeróbias foram obtidas a partir do consórcio KLY. Destes 11 isolados (Grupo I, tabela 1) cresceram em meio líquido redutor contendo lignina kraft e extrato de levedura como fonte de carbono. No isolamento a partir do consórcio KL foram obtidas 32 colônias em meio redutor sólido e após a semeadura, 8 isolados cresceram em meio líquido redutor (Grupo II, tabela I). Assim, das amostras de consórcio iniciais, KL e KLY, foram adquiridos 19 isolados bacterianos com potencial de desconstrução da lignina, utilizando a mesma como fonte de carbono com a suplementação de glicose.

Tabela 1. Isolados do consórcio microbiano degradador de lignina kraft

	Grupo I	Grupo II
Isolados	IY 2-2	IL 2-2
	IY 2-3	IL 2-3
	IY 2-4	IL 2-4
	IY 2-5	IL 2-5
	IY 2-8	IL 2-6
	IY 2-9	IL 2-7
	IY 2-10	IL 2-8
	IY 2-11	IL 2-9
	ICE 3	
	ICE 5	
	ICE 6	

5.2. Análise de descoloração de lignina Kraft

Dos 19 isolados analisados, 18 apresentaram crescimento e descoloração no primeiro dia de cultivo (Figura 2 A e B). Os isolados do grupo I, obtidos a partir do consórcio KLY, cresceram e atingiram a fase estacionária e maior atividade de descoloração após 1 dia de cultivo (Figura 2 A). De maneira que o crescimento dos isolados promoveu a precipitação parcial da lignina, causada pela acidificação do meio de cultura exercida pelas bactérias cultivadas. O crescimento de oito isolados do grupo II (IY 2-4, IY 2-5, IY 2-9, IY 2-10, IY 2-11, ICE 3, ICE 5 e ICE 6) levou à modificação do meio de cultura, sendo observadas precipitação da lignina e turbidez (Figura 2D). Para os isolados IY 2-2, IY 2-3 e IY 2-8, foi observada uma precipitação parcial da lignina, assim como pouca suspensão de células bacterianas (Figura 2D).

A lignina kraft é solúvel em meio de cultura alcalino, tornando visualmente o meio mais escuro, como apresentado no controle negativo (Figura 2D), diferentemente do verificado após crescimento bacteriano. Dos 11 isolados do grupo I, 10 apresentaram taxas de descoloração acima de 50%, sendo que somente o IY 2-4 apresentou taxa de descoloração abaixo de 50%. A suplementação com glicose possibilitou que os isolados do consórcio tivessem valores maiores de descoloração do que o próprio consórcio KLY (40% de descoloração), demonstrado no trabalho anterior (SILVA et al., 2024).

O consórcio microbiano KLY obteve a máxima de crescimento no segundo dia de cultivo (OD600 próxima a 3) (SILVA et al., 2024), enquanto os isolados desse consórcio apresentaram crescimento máximo no primeiro dia de cultivo em meio redutor suplementado com glicose. Os isolados IY 2-3, ICE 6, IY 2-9, IL 2-2 e IL 2-3 foram os que apresentaram maior crescimento bacteriano, todos com descoloração superior a 50%. Sugerindo que a atividade de descoloração pode estar ligada diretamente ao crescimento bacteriano, assim como à capacidade do isolado de utilizar lignina como fonte de carbono. Devido à complexidade da lignina, o meio de cultura para o crescimento de bactérias frequentemente é suplementado com outras fontes de carbono mais simples. Por exemplo, estudos anteriores demonstram que bactérias como *Tolumonas lignolytica* BRL6-1 e *Enterobacter lignolyticus* SCF1 realizam a despolimerização da lignina em ambientes anóxicos quando cultivadas em meio suplementado com outras fontes de carbono (glicose 0,2% e xilose 0,05%) (Billings et al., 2015; DeAngelis et al., 2011).

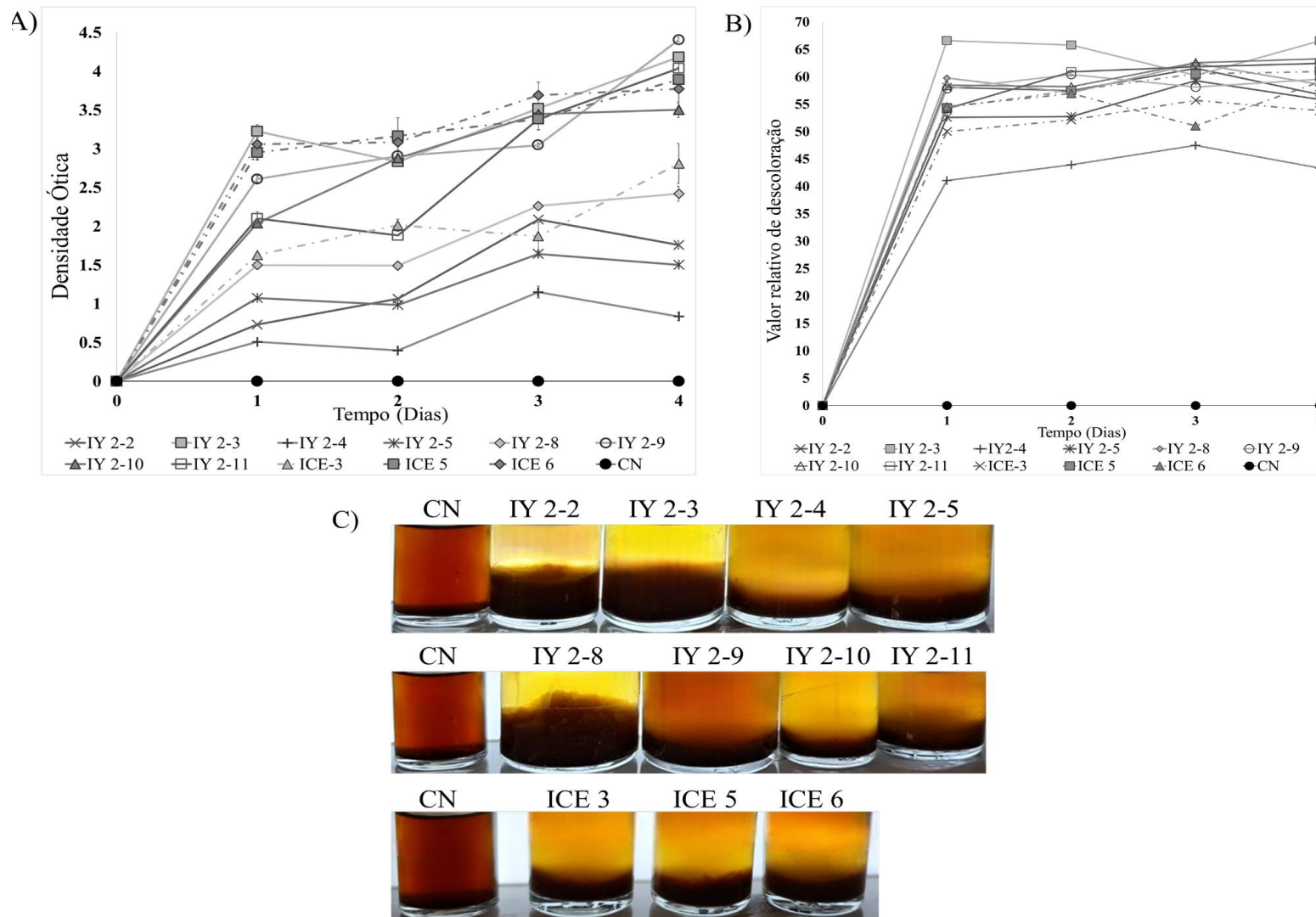


Figura 2. Curva de crescimento dos isolados do grupo 1 (A), valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo 1 (B) e valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo 1 (C) Valores relativos de degradação da lignina kraft pelos isolados do grupo 1. (D) Observação visual da descoloração do meio de cultivo, (CN) controle negativo (meio não inoculado), IY 2-2, IY 2-3, IY 2-4, IY 2-5, IY 2-8, IY 2-9, IY 2-10, IY 2-11, ICE 3, ICE 5 e ICE 6 isolados cultivados separadamente em meio de cultura redutor, após 1 dia de crescimento (D).

Além disso, foi relatado para a bactéria *Klebsiella aerogenes* TL3 a importância da suplementação com glicose não só para facilitar o crescimento bacteriano, mas também para a sua utilização como aceitador final de elétrons em ambientes anaeróbios. Nesse contexto, essa bactéria degradadora de lignina foi cultivada em meio redutor contendo, em suplementação à lignina alcalina, triptona (1 g/L) e glicose (1 g/L) para possibilitar seu crescimento (Tu et al., 2024).

Tu et al. (2024) relataram resultados semelhantes para *Klebsiella aerogenes* TL3, que atingiu a OD máxima em 12 horas e promoveu 17,8% de descoloração em meio suplementado com glicose. Embora a degradação em ambientes anaeróbios ocorra mais rapidamente do que em condições aeróbicas, ela tende a ser incompleta, resultando na formação de diversos subprodutos a partir da despolimerização. Por outro lado, Xu et al. (2018) observaram que, embora as bactérias demorem mais para decompor a lignina em ambiente anaeróbico, esse processo é mais completo do que em condições aeróbicas. Apesar do crescimento contínuo de alguns isolados após 24 horas, os valores de descoloração permaneceram estáveis. Isso sugere que as bactérias podem ter passado a metabolizar subprodutos gerados na fase inicial do cultivo.

Dos oito isolados do grupo II (consórcio KL), todos cresceram em meio redutor suplementado. Seis deles atingiram a fase estacionária após um dia, enquanto dois apresentaram crescimento prolongado: o isolado IL 2-3 cresceu até o quarto dia ($OD_{600} = 2,4$) e o IL 2-2 atingiu seu pico no terceiro dia ($OD_{600} = 2,49$) (Figura 3A). As diferenças no crescimento também se refletiram na alteração do meio de cultura. Os isolados IL 2-2 e IL 2-3 causaram precipitação parcial da lignina, tornando o meio turvo e ácido — comportamento semelhante ao observado nos oito isolados do grupo I. Já os outros seis isolados (IL 2-4, IL 2-5, IL 2-6, IL 2-7, IL 2-8 e IL 2-9) deixaram o meio apenas turvo, com descoloração visual reduzida (Figura 2C).

IL 2-2 e IL 2-3 apresentaram atividade de descoloração superior aos demais isolados do grupo II, com valores significativamente maiores que os dos demais seis. Alguns isolados não promoveram qualquer descoloração visual ou precipitação da lignina (Figura 3D); nesses casos, a descoloração só foi detectável por meio da análise espectrofotométrica (absorbância a 465 nm) (Figura 3B). Três isolados (IL 2-4, IL 2-6 e IL 2-8) não apresentaram atividade de descoloração no primeiro dia de crescimento. Desses, dois não mostraram atividade em nenhum dos dias avaliados. O isolado IL 2-8 apresentou descoloração apenas no terceiro dia (12,24%), com valor máximo no quarto dia (12,92%).

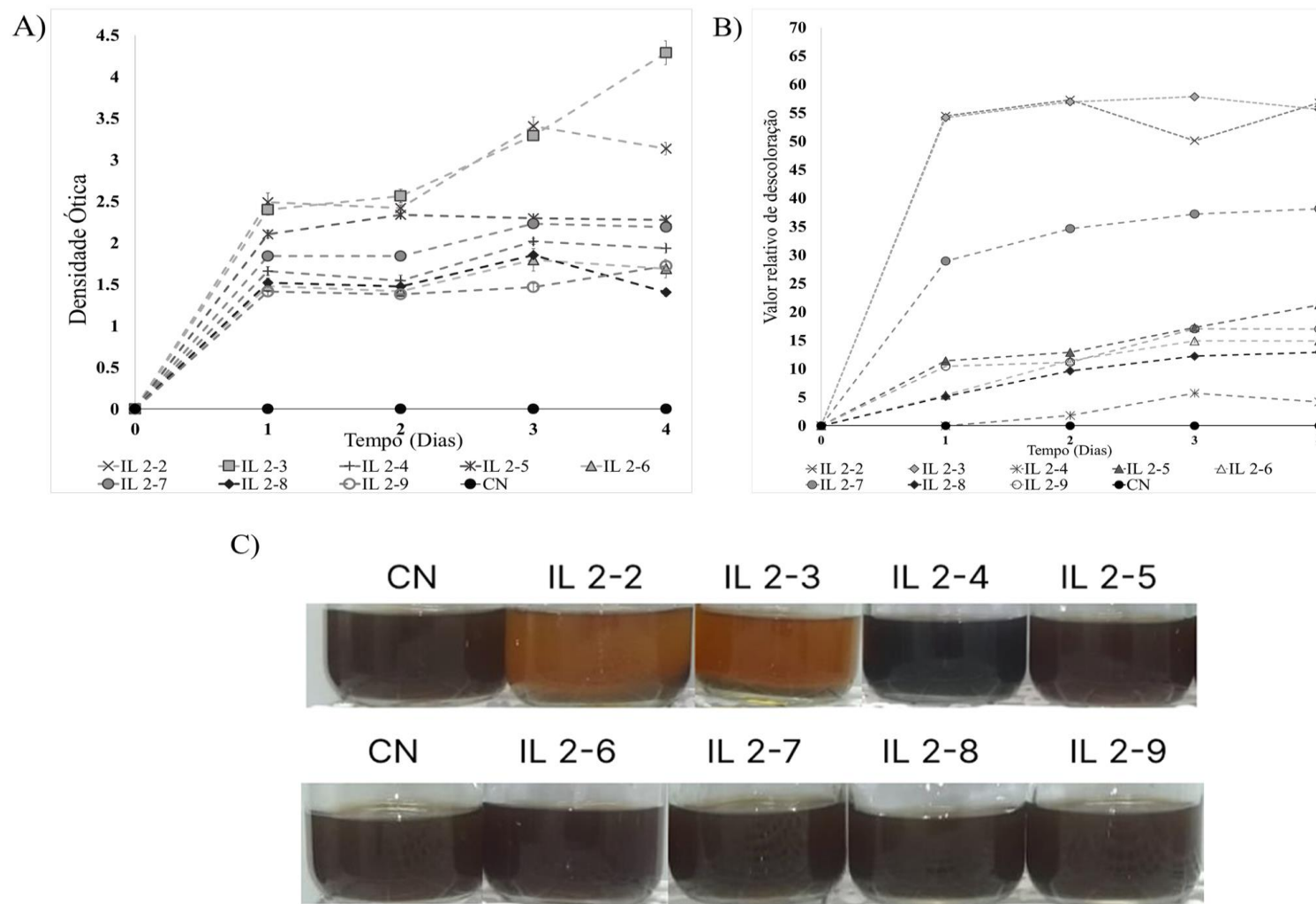


Figura 3. Curva de crescimento dos isolados do grupo II (A), valores relativos de descoloração da lignina kraft pelos isolados do grupo III (B), e valores relativos de degradação da lignina kraft pelos isolados do grupo III (C). Observação visual da descoloração do meio de cultivo, (CN) controle negativo (meio não inoculado), IL 2-2, IL 2-3, IL 2-4, IL 2-5, IL 2-6, IL 2-7, IL 2-8, IL 2-9 são os isolados cultivados separadamente no mesmo meio de cultura, após 1 dia de crescimento (D).

Esse padrão sugere que a bactéria pode ter utilizado a glicose como fonte primária de carbono nos primeiros dias, iniciando a modificação da lignina apenas após o terceiro dia, quando possivelmente começou a despolimerização e a utilizar como fonte secundária de carbono. Este grupo foi isolado a partir do consórcio KL, que também apresentou uma menor taxa de descoloração em 4 dias de crescimento (29%) (SILVA et al., 2024). Contudo, após a suplementação com glicose, dois isolados se destacaram na descoloração da lignina e os outros 6 isolados não obtiveram as mesmas atividades sobre a lignina. Esse resultado obtido pode estar relacionado ao tempo de cultivo, pois algumas bactérias lignolíticas como por exemplo *Enterobacter hormaechei* SCF1 e *Pseudomonas putida* KT2440 já foram descritas anteriormente por apresentarem uma atividade de descoloração máxima em 7 dias (Salvachúa et al., 2015; Zhang et al., 2021). Esses resultados podem indicar que essas bactérias apresentam mecanismos diferentes de degradação da lignina.

O maior crescimento entre todos os 19 isolados foi do isolado IY 2-3 (OD600 3,23) juntamente com a maior taxa de descoloração (66,6%). Outros isolados do grupo I obtiveram valores de crescimento aproximados, ICE 6 e ICE 5 (OD600 3,06 e 2,95, respectivamente), e apresentaram menor valor de descoloração (54,35% e 50,02%, respectivamente). No mesmo sentido, o isolado IY 2-10 apresentou crescimento em lignina (OD600 2,04), com valor aproximado aos isolados IY 2-9 e IY 2-11 (OD600 2,61 e 2,1) e adquiriu uma taxa de descoloração com valor aproximado ao do isolado IY 2-3 (58,48%) (Tabela 3). Esse resultado pode indicar que essas bactérias não quebram anéis aromáticos presentes na composição da lignina kraft, mas possuem atividades que realizam modificações e quebras em ligações que não comprometem os anéis presentes na estrutura da lignina (KHAN; AHRING, 2019).

O isolado IY 2-2 apresentou o segundo menor crescimento entre todos os isolados adquiridos (OD600 0,73), contudo sua atividade de descoloração (50,04%) foi muito próxima à do isolado IY 2-10 (58,08%). O isolado que apresentou o menor crescimento entre todos os isolados foi o IY 2-4 (OD600 0,51), mas sua taxa de descoloração (41,08%) foi aproximada à do isolado ICE 5 (50,02%) (Tabela 3).

Do grupo II, o isolado IL 2-2 foi o que apresentou a maior taxa de descoloração, correspondendo a 54,46%, seguido pelo IL 2-3 com taxa de descoloração de 54,19% (Tabela 3).

Tabela 2. Análise comparativa do crescimento dos isolados bacterianos e de suas atividades sobre lignina expressas em taxas (%) de descoloração e degradação.

Isolado	Crescimento 24 horas	Descoloração 24 horas
IY 2-3	3,23	66,6
IY 2-8	1,5	59,8
IY 2-10	2,04	58,48
IY 2-2	0,73	58,08
IY 2-9	2,61	57,8
IY 2-11	2,1	54,57
IL 2-2	2,49	54,46
ICE 6	3,06	54,35
IL 2-3	2,4	54,19
ICE 3	1,63	54,15
IY 2-5	1,07	52,6
ICE 5	2,95	50,02
IY 2-4	0,51	41,08
IL 2-7	1,84	28,96
IL 2-5	2,11	11,42
IL 2-9	1,41	10,46
IL 2-6	1,48	5,38
IL 2-8	1,52	5,16
IL 2-4	1,66	0

Os valores de descoloração de lignina em torno de 50% foram mais frequentemente encontrados em bactérias lignolíticas aeróbicas. Como por exemplo a bactéria *Burkholderia* sp. H801 que atingiu 49,8% de degradação de lignina kraft em 6 dias de crescimento a 35°C, outra atividade próxima de descoloração foi registrada pela bactéria aeróbica *Bacillus* sp. sobre águas residuais de indústria de papel e celulose, após 6 dias de cultivo, ela atingiu 61% de descoloração (Raj; Reddy; Chandra, 2007; Zhang, Wen; Liu, 2022).

Dessa forma, é possível ver que esses isolados, crescidos em condições anaeróbicas, têm grande potencial na modificação da lignina, o que pode resultar em uma possível aplicação industrial. Pois, para a utilização de organismos aeróbios no tratamento de águas residuais de indústrias de papel e celulose, seria necessário adicionar oxigênio e isto torna mais onerosa a utilização de organismos no tratamento de efluentes. Por esse motivo, bactérias anaeróbicas têm sido uma possibilidade de grande interesse para indústrias. Após avaliar o crescimento e as taxas de descoloração, foi realizada a escolha de isolados para seguir com os próximos experimentos, a fim de entender mais sobre os

processos utilizados por esses microrganismos na decomposição da lignina.

A escolha dos isolados foi realizada dando prioridade aos isolados que obtiveram maior taxa de descoloração nas primeiras 24 horas de crescimento. Inicialmente foram escolhidos 4 isolados (IY 2-3, IY 2-8, IY 2-9 e IY 2-10), posteriormente o isolado IL2-9 foi escolhido por conta da sua possível identificação molecular (Tabela 2). Após a caracterização dos isolados, foram selecionados 3 isolados (IY2-3, IY 2-8 e IY 2-10), devido a suas altas taxas de descoloração diferentes e a pureza verificada na análise de coloração de Gram. Eles foram escolhidos para análises de modificação na estrutura da lignina. Finalmente, o isolado IY2-3 foi selecionado para análise inicial do secretoma principalmente pela sua alta taxa de descoloração adquirida em pouco tempo de cultivo.

5.3. Caracterização dos isolados bacterianos

5.3.1. Caracterização morfológica

Para uma análise prévia dos 5 isolados escolhidos, foi realizada uma coloração de Gram, que consiste em uma análise histológica diferencial para classificar bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, sendo baseada nas diferenças estruturais da parede celular bacteriana. Este método também foi utilizado para avaliar a pureza das amostras para as próximas análises. Dos 5 isolados selecionados para análises subsequentes 4 são Gram-positivas (IY 2-3, IY 2-9, IY 2-10 e IL 2-9) e o isolado IY 2-8 é Gram-negativo (Figura 5).

Os cinco isolados analisados apresentaram morfologias distintas sob microscopia óptica após coloração de Gram, sendo que todos foram classificados como Gram-positivos. O isolado IY 2-3 apresentou cultura pura, com células organizadas em cadeias curtas, características de cocos do tipo estreptococo, com coloração violeta intensa e homogênea (Figura 4A). O isolado IY 2-8 mostrou uma disposição celular em agrupamentos irregulares, típicos de estafilococos, com células esféricas bem definidas e também coradas em violeta, confirmando a coloração Gram-positiva, apesar da variação morfológica observada em relação aos demais.

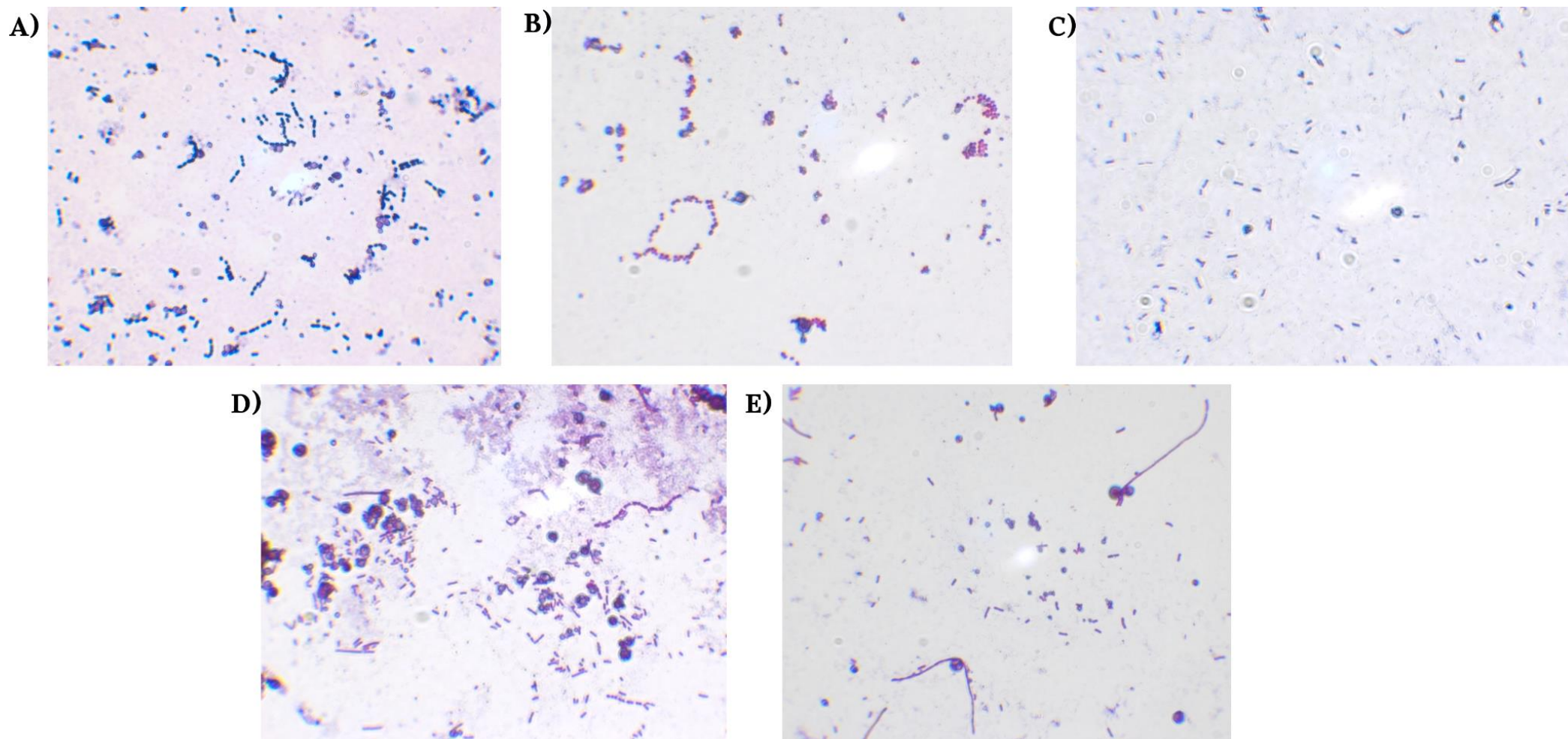


Figura 4. Análise da coloração de Gram dos isolados (IY 2-3, IY 2-8, IY 2-9, IY 2-10 e IL 2-9) por microscopia óptica no aumento de 100x. A) IY 2-3, bactéria gram positiva. B) Isolado IY 2-8, bactéria gram negativa. C) Isolado IY 2-9, bactéria gram positiva. D) Isolado IY 2-10, bactéria gram positiva. E) Isolado IL 2-9, bactéria gram positiva.

O isolado IY 2-10 apresentou morfologia semelhante à de IY 2-3, com células em formato de cocos dispostas em cadeias curtas, igualmente coradas em violeta, sugerindo estrutura típica de estreptococos Gram-positivos. O isolado IL 2-9 apresentou maior complexidade morfológica, exibindo duas formas celulares distintas na mesma lâmina. A primeira correspondia a estruturas filamentosas longas, com ramificações visíveis e coloração Gram-positiva. A segunda forma celular, embora visível na amostra, não pôde ser descrita com precisão devido à baixa resolução da imagem obtida. Ainda assim, ambas as morfologias presentes foram coradas em violeta, confirmando a classificação como Gram-positivas.

O resultado gerado pelo isolado IL 2-9 pode nos levar a pensar em duas hipóteses, a primeira é de que ocorra a presença de mais de uma espécie de bactéria no meio de cultura e isso levaria a necessidade de refazer o isolamento para essa bactéria, outra possibilidade é que essa bactéria seja formadora de esporos. Pois as bactérias com morfologia filamentosa são amplamente descritas no Filo *Actinomycetota*, e algumas delas têm a capacidade de formar esporos para se protegerem de ambientes hostis e de dispersão (Brink *et al.*, 2019).

Diversas bactérias com atividade sobre lignina foram descritas como pertencentes aos filos *Actinomycetota* e *Firmicutes* que possuem poucos ou nenhum representante gram-negativo. Apesar do Filo *Actinomycetota* não ser um dos mais abundantes no rúmen, já foram descritos representantes presentes no rúmen e contém diversas bactérias lignolíticas identificadas, como dos gêneros: *Streptomyces*, *Rhofococcus*, *Amycolatopsis*, *Nocardia* e *Micromonospora* (Gharechahi *et al.*, 2023).

Contudo, a ampla abundância de representantes do filo *Proteobacteria* descrito por Silva, (2024), era esperado encontrar mais isolados gram-negativos, contudo representantes do filo *Firmicutes* são na sua maioria gram-positivos e este filo é um dos filos mais presentes em análises de metagenoma de rúmen. Após o enriquecimento em lignina kraft realizado em SILVA *et al.*, 2024, a prevalência de representantes do filo *Proteobacteria* foi de 95% de abundância relativa, dessa forma, foi esperado que mais bactérias gram-negativas com atividade sobre lignina, tivessem sido isoladas.

Este tipo de análise preliminar relacionada às características morfológicas é muito importante para corroborar com a identificação molecular e ter maior acurácia quanto a identificação de cada bactéria (Al-Dhabi; Esmail; Valan Arasu, 2021).

5.3.2. Temperatura de crescimento

Os cinco isolados escolhidos foram cultivados no mesmo meio de cultura líquido redutor contendo lignina kraft suplementado para medir o efeito da temperatura no crescimento bacteriano e na taxa de descoloração após um dia de cultivo. Os cinco isolados (IY 2-3, IY 2-8, IY 2-9, IY 2-10 e IL 2-9) cultivados em uma faixa de temperatura (28, 37, 45, 50 e 60°C) apresentaram crescimento nas temperaturas de 28 e 37°C, e todos conseguiram descolorir nessas duas temperaturas, contudo foi notável a diminuição da atividade de descoloração para os isolados IY 2-9 e IL 2-9. Já a 37°C todos cresceram e descoloriram a lignina, sendo esta a temperatura de maior atividade de descoloração para IY 2-3, IY 2-8, IY 2-9 e IY 2-10 (Figura 5A e B). Dos 5 isolados essa também é a temperatura que os consórcios foram cultivados inicialmente (SILVA *et al.*, 2024). Assim como o isolamento também foi realizado nessa temperatura.

O isolado IY 2-3 apresentou crescimento em 28°, 37° e 60°C (OD₆₀₀ 1,04, 1,56 e 0,507, respectivamente), com o melhor crescimento a 37°C, e não obteve crescimento nas temperaturas de 45 e 50°C (Figura 5A). Os valores de descoloração obtidos não foram significativamente diferentes entre 28 (54,74%) e 37°C (55%), com um pequeno acréscimo de descoloração a 37°C. Nas outras temperaturas testadas não houve incremento nas taxas de descoloração. Deixando explícita a melhor condição de cultivo para taxas de descoloração, sendo 37°C (Figura 5B).

O isolado IY 2-8 apresentou crescimento em todas as temperaturas testadas de 28, 37, 45, 50 e 60°C, não havendo diferença estatística entre elas (Figura 5A). Já sua atividade de descoloração ficou restrita a 28, 37 e 45°C. Onde apresentou diferenças significativas, com prevalência da maior atividade em 37°C, dessa forma é possível atribuir que para a atividade de descoloração e crescimento, a temperatura ideal é 37°C (Figura 5B).

O isolado IY 2-9 apresentou crescimento em 3 das 5 temperaturas testadas, a 28, 37 e 45°C, em que o melhor crescimento foi tanto 28°C quanto 45°C. Na temperatura de 37°C foi obtida a maior taxa de descoloração. Mesmo na melhor temperatura do crescimento bacteriano não houve incremento nos valores de descoloração, assim é possível inferir que pode não haver uma correlação direta entre a melhor temperatura de crescimento com melhor temperatura para descoloração. Porém, na faixa de temperatura em que há crescimento do isolado ocorre também a descoloração, o que demonstra a

modificação da lignina mesmo contendo uma fonte mais simples de carbono no meio de cultivo que é a glicose.

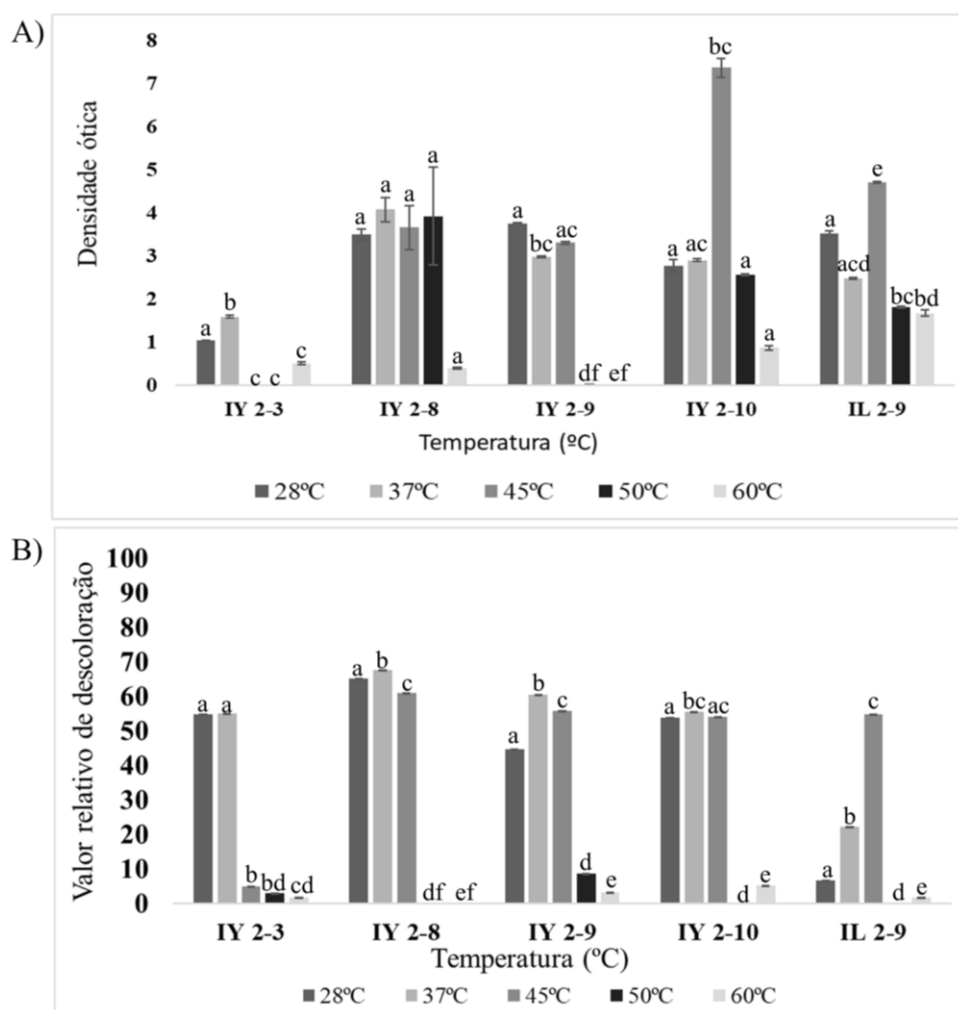


Figura 5. Comparação de crescimento em cinco diferentes temperaturas de cultivo (28, 37, 45, 50 e 60°C) de cinco isolados do consórcio. A) Gráfico comparativo do crescimento dos 5 isolados nas cinco temperaturas, após 24 horas de cultivo. B) Gráfico comparativo da descoloração realizada pelos isolados 5 isolados em cinco temperaturas diferentes de crescimento, após 24 horas de cultivo. Barras verticais indicam desvio. As letras acima das barras representam diferenças significativas entre as amostras de cada isolado e as 5 temperaturas testadas para cada um, letras iguais representam que não há diferença estatística entre os tratamentos, o valor de p tem que ser $p < 0,05$, para ser considerado significativo nesta análise.

O isolado IY 2-10 obteve um resultado similar, pois a bactéria obteve um melhor crescimento a 45°C (OD₆₀₀ 7,4), mas a maior taxa de descoloração encontrada foi a 37°C (55,40%), com diferenças significativas entre todas as temperaturas testadas. A segunda maior taxa foi a 45°C (54,11%), seguida da temperatura de 28°C (53,68%), demonstrando

mais uma vez que a maior densidade de células não está diretamente relacionada à taxa de descoloração.

Por fim, o isolado IL 2-9 obteve crescimento em todas as temperaturas testadas, com maior crescimento a 45°C (OD₆₀₀ 4,7), assim como o IY 2-10. Nas taxas de descoloração, houve claramente um incremento na taxa de descoloração a 45°C (54,64%), em comparação com 37°C de onde foi isolado (22,24%). Este resultado foi preocupante, pois o isolado apresentou descoloração a mais ou menos 10.46% anteriormente e esse incremento pode ter sido ocasionado pela presença de outra bactéria em consórcio com o isolado IL 2-9. Como visto também na coloração de gram (Figura 4E), possivelmente duas ou mais bactérias estejam degradando a lignina juntas, essa colaboração é consistente com a literatura. Bactérias conseguem degradar a lignina de forma eficiente em consórcio com outras bactérias ou fungos. O rúmen bovino necessita de um consórcio bem consolidado de vários microrganismos para decompor a biomassa vegetal (DeAngelis *et al.*, 2011; Xu, Zhaoxian *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2017). Algumas bactérias são adaptadas a sobreviverem em uma ampla faixa de temperaturas e pH, de maneira que aumenta o interesse de utilização das bactérias na indústria (Weng; 2021).

Após a análise da caracterização dos isolados, foi constatada uma possível contaminação presente na amostra do isolado IL 2-9, então não foram realizados mais experimentos, pois o objetivo principal é encontrar e caracterizar bactérias isoladas do rúmen na decomposição especificamente de lignina.

5.3.3. FTIR

A análise de FTIR foi utilizada para analisar mudanças nos componentes da lignina causada pelos isolados IY2-3 e IY 2-10 após 1 dia de crescimento, na melhor temperatura para atividade de descoloração (37°C). Foram verificados diversos vales em todas as amostras (CN, IY 2-3 e IY 2-10) (Figura 6). Os vales identificados nas amostras entre 1800 e 600 cm⁻¹ correspondem a uma região de impressão digital da estrutura da lignina. Um vale surgiu após o cultivo dos isolados, sendo o primeiro isolado (IY 2-3) que apresentou um vale novo em relação à amostra controle (figura 6). É possível observar que o vale em torno de 1076 não estava presente na amostra controle, mas apareceram na amostra do IY 2-13, com diferentes profundidades. O segundo isolado (IY 2-10) apresentou os mesmos vales novos em relação ao branco. A presença do surgimento

deste vale pode indicar alongamento nas ligações C-O, essas bandas indicam que os grupos guaiacil (G) e siringil (S) foram degradados e convertidos em compostos mais simples, como éteres, fenóis e álcoois, em ambas as amostras tratadas com os isolados, indicando que esteja ocorrendo modificações de degradação nessas ligações (Khan, Sanam Islam *et al.*, 2022).

Na imagem 6, consta os espectros obtidos pela análise de FTIR, onde é possível verificar mudanças na estrutura da lignina exercida pelos dois isolados. Ambos os isolados apresentaram modificações na estrutura da lignina em relação ao controle, assim como entre si. Os principais vales apresentados na amostra controle foram: 853, 948, 1030, 1108, 1456, 1512, 1580, 2364, 2890 e 2941. Um vale novo que surgiu após o cultivo em ambos os isolados testados, o vale fica em torno de 1076 (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela dos números de ondas em cm^{-1} referente aos vales de maior intensidade, adquiridos após o cultivo com os isolados IY 2-3 e IY 2-8 sobre a lignina kraft, após 1 dia de crescimento bacteriano. Apresentando os grupos funcionais associados aos vales e as possíveis modificações causadas pelas bactérias sobre a lignina kraft. (-) ausência do vale e (+) presença do vale.

Nº de ondas (cm ⁻¹)	Controle	IY 2-3	IY 2-10	Grupo funcional	Referência
853	+	+	+	C=C -H	(Lima, 2023) e (Silva et al, 2024)
948	+	+	+	Grupos G e S	(Kumar et al., 2015)
1030	+	+	+	C-H e C=O	(Lima, 2023)
1076	-	+	+	Deformação C-O em álcool secundário e éter alifático	(Khan et al., 2022)
1108	+	+	+	Vibrações de alongamento C-O em grupos de álcool - Guaiacil COH e siringil COH	(Pandey, 1969) e (Kostryukov et al., 2023)
1456	+	+	+	Alongamento das ligações C=C	(Khan et al., 2022)
1512	+	+	+	Alongamento das ligações C=C	(Liu et al., 2014)
1580	+	+	+	Alongamento das ligações C=C	(Liu et al., 2014)
2364	+	+	+	Absorção de CO ₂	(Huang et al., 2024)
2890	+	+	+	Alongamento C-H em metil	(Kumar et al., 2015)
2941	+	+	+	-OCH ₃	(Lima, 2023)

O vale em torno de 853 obteve uma modificação crítica em relação ao branco, ambos os isolados obtiveram o aprofundamento do vale, mas ficou mais evidente no isolado IY 2-10 do que no IY 2-3 (Figura 6). Indica o alongamento das ligações C=C

presentes no esqueleto da lignina, o que pode indicar que o isolado IY 2-10 está utilizando mecanismos que afetam drasticamente essas ligações, enquanto que o isolado IY 2-3, pode utilizar outras formas de degradar a lignina. Como os anéis aromáticos da lignina apresentam esse tipo de ligações e muitos grupos fenólicos contendo ligações duplas entre C=C, pode indicar que esse organismo está realizando a quebra dos anéis aromáticos (Lima, 2023; Silva *et al.*, 2024).

O vale em torno de 948 também apresentou essa característica quanto às modificações causadas pelo isolado IY 2-10, o vale ficou bem mais profundo na amostra deste isolado do que do IY 2-3, mesmo que o IY 2-3 também tenha modificado a amostra inicial e obtido um vale menor. Essa região indica que os grupos guaiacil e siringil da estrutura da lignina sofreram degradação e possivelmente foram convertidos em compostos mais simples durante o processo de crescimento e degradação dos isolados sobre a lignina kraft (Kumar *et al.*, 2015).

Outro vale interessante foi o que se encontra em torno de 1030, na amostra controle ele se mostrava bem sutil e na amostra tratada com o isolado IY 2-3 mostrou claramente o aprofundamento deste vale, ao contrário do tratamento realizado pelo isolado IY 2-10, que consistiu em diminuir tanto seu tamanho, que o vale quase não aparece no espectro. Esse vale indica principalmente o rompimento de ligações C-H e C=O, abundantes na lignina. As ligações C-H são do grupo alifático presentes na cadeia da lignina, muitas vezes estão ligadas a grupos álcool e em ligações C-O entre um componente e outro e as ligações C=O são ainda mais presentes na estrutura da lignina, pois estão associadas aos anéis aromáticos e possivelmente a presença desse vale e o aprofundamento causado pelo isolado IY 2-3, mostra que esse isolado também fornece a degradação dessas ligações e confirma a ação do isolado IY 2-10 quanto a degradação de anéis, pois esse vale foi quase que totalmente removido do espectro (Lima, 2023).

O vale em torno de 1456 se apresentava pequeno e pouco agudo, após o tratamento com os isolados, apresentou um vale mais profundo e agudo no isolado IY 2-3, no isolado IY 2-10 ele se aprofundou mais, mas não se tornou tão agudo. Outro vale que sofreu modificações e se diferiu do controle e entre os isolados, foi em torno de 1512. Na amostra controle se mostrou um vale relativamente profundo e agudo, na amostra tratada com o isolado IY 2-3 esse pico se tornou ainda mais profundo e mais agudo e na amostra tratada com o isolado IY 2-10, causou a diminuição da profundidade do vale e o tornou menos agudo que o controle.

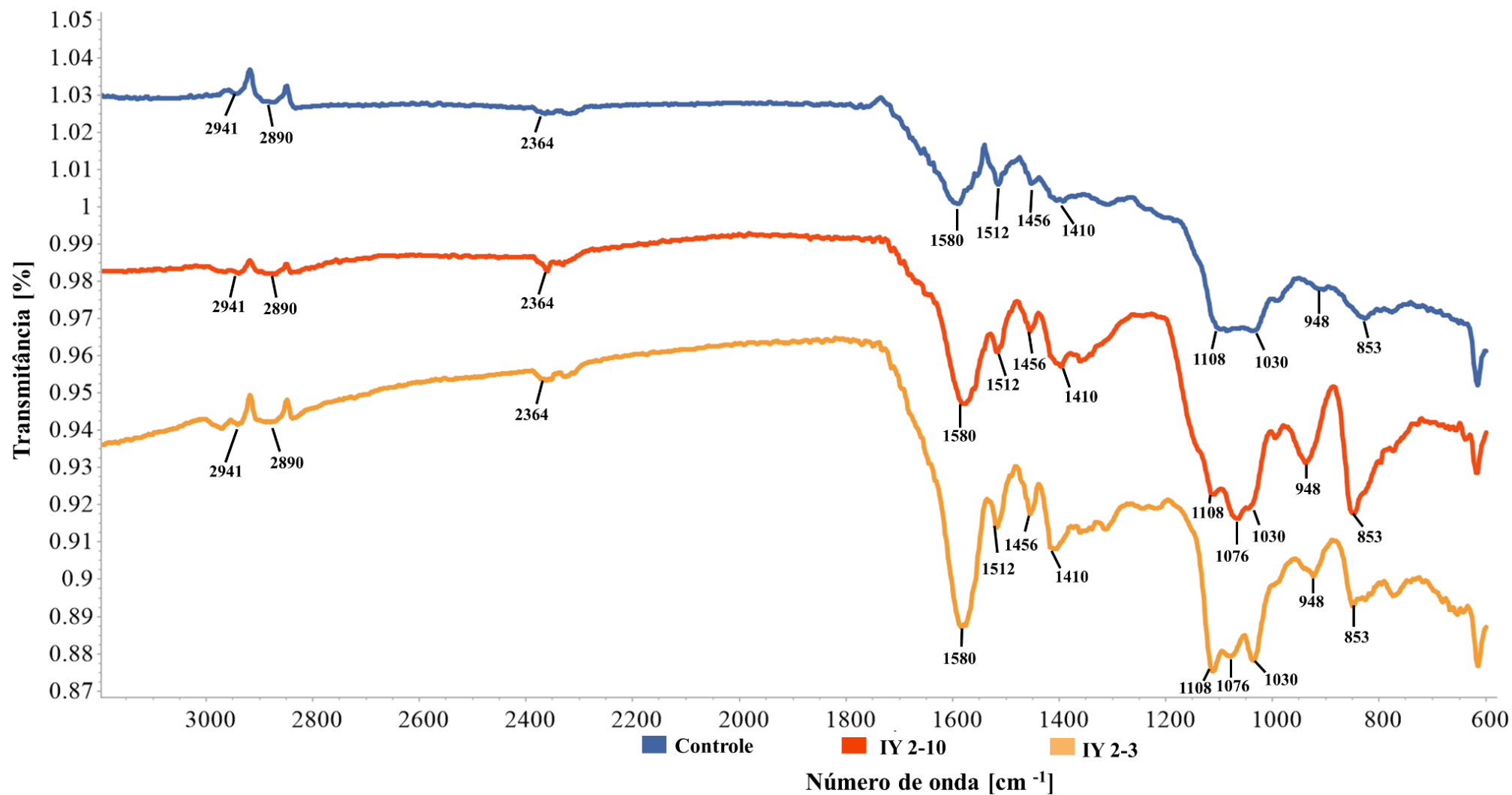


Figura 6. Para melhores análises dos vales no espectro FTIR, o espectro foi ampliado entre 3000 e 600 cm^{-1} . Em azul está representada a amostra controle (sem tratamento). Em vermelho está representado o espectro gerado pelas modificações causadas pelo isolado IY 2-10 em 24 horas de crescimento, a 37°C. Em amarelo está representado o espectro gerado pelas modificações causadas pelo isolado IY 2-3 em 24 horas de crescimento, a 37°C.

O vale em torno de 1580 sofreu intensas mudanças, foi o vale mais modificado em toda a análise. Na amostra controle esse vale já era profundo e ligeiramente agudo, já na amostra tratada com o isolado IY 2-3, esse vale ficou intensamente profundo e agudo, foi o vale mais evidente em todas as amostras (Khan *et al.*, 2022). Na amostra do IY 2-10 ocorreu o aprofundamento deste vale de forma intensa, contudo menos aguda. A região entre 1600 e 1400 estão entre as regiões onde se consegue observar a maior quantidade de modificações na estrutura da lignina. Essas regiões correspondem ao alongamento das ligações C=C no esqueleto aromático da lignina e também indicam degradação de anéis aromáticos, nas amostras foram observados o aprofundamento dos vales em comparação com a amostra controle, isso pode indicar que o mecanismo utilizado por ambas as bactérias afetem essas ligações até o rompimento, contudo o isolado IY 2-10 apresentou maior atividade de rompimento do que o isolado IY 2-3, isso pode indicar que o isolado IY 2-3 pode afetar essas ligações, mas o isolado IY 2-10 possui uma capacidade de degradar os anéis aromáticos no mesmo período de crescimento que o isolado IY 2-3 (Khan *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2014).

Houve também a presença de outros vales em torno de 2364, na amostra controle apresentou um vale pequeno e arredondado. Após o tratamento com isolado IY 2-10 foi possível verificar o aprofundamento deste vale, assim como sua forma que ficou intensamente aguda, diferente do tratamento do isolado IY 2-3, neste vale a modificação causada por esse isolado foi visível, contudo foi bem menor que o isolado IY 2-10 e o vale continuou arredondado. A região referente a 2360 e 2340 não está relacionada a modificações na estrutura da lignina, mas a presença de CO₂, formando dois vales com aparência de “w”, o CO₂ absorve fortemente nessa faixa do espectro, o que pode estar indicando que os isolados estejam liberando CO₂ no processo de degradação da lignina, seja ele oxidativo ou fermentativo (Huang *et al.*, 2024).

Próximo a 3000 cm⁻¹ houve modificações diferentes entre as amostras controle e tratada com os isolados. Como por exemplo, em torno de 2941 e 2890 um vale que era arredondado e bem aparente, se mostrou menor na amostra tratada com o isolado IY 2-10 (Figura 6). Modificações nessa região sugerem que grupos O-H, metoxi e metil estejam sendo rearranjados ou degradados pelos isolados, por exemplo, o isolado IY 2-3 apresentou um leve aprofundamento do vale 2941 e leve diminuição do vale 2890, o que pode indicar atividade nessa região, mas o isolado IY 2-10, diminuiu drasticamente ambos os vales, mostrando mecanismos de ação mais intensos em ligações O-H (Kumar *et al.*, 2015; Lima, 2023).

Após esta análise, podemos afirmar que ambos os isolados possuem a capacidade de modificação na estrutura da lignina em ambiente anaeróbio, e os dados aqui analisados confirmam os dados de descoloração e degradação realizados anteriormente. Também é possível inferir sobre a presença de outros produtos de degradação diferente entre ambos os isolados (IY 2-3 e IY 2-10) e o aprofundamento na identificação dos produtos de degradação se faz necessária quanto a possível aplicação desses isolados em ambientes industriais.

5.4. Identificação molecular

O sequenciamento de Sanger foi realizado nos fragmentos de DNA (1500 pb) do gene rRNA 16S de todos os 19 isolados do consórcio, utilizando os primers universais 27F e 1492R. Infelizmente não foi possível chegar a nível de espécie em nenhuma das amostras com confiabilidade, pois os sequenciamentos não obtiveram boa qualidade para confirmar as sequências das bases e ocasionando em diversos microrganismos de diferentes espécies e em alguns casos não foi possível verificar nem o filo da qual o isolado pertence.

O sequenciamento de *amplicons* de diferentes isolados adquiriram um trecho muito curto de sequências que poderiam ser analisadas. Dessa forma não foi possível analisar os isolados quanto a espécie, mas alguns isolados apresentaram uma sequência relativamente maior (300 pb), assim possibilitou uma análise aproximada dos gêneros.

Das análises que foi possível analisar, foram verificados dois filios, *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Estes filios já foram amplamente descritos com representantes que possuem capacidade de degradar lignina e outras frações da biomassa lignocelulósica e são filios muito encontrados em rúmen bovino. Este resultado era esperado, pois a presença de representantes do filo *Proteobacteria* foi confirmada na amostra do consórcio microbiano do qual essas bactérias foram isoladas, correspondendo a ~95% de abundância no consórcio KLY e ~98% no consórcio KL (Silva *et al.*, 2024).

Dos 19 isolados, 7 foram identificados como pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Destes 7 isolados, 3 foram do grupo I (IY 2-4, IY 2-5, IY 2-9 e ICE 3) e mais 3 isolados do grupo II (IL 2-3, IL 2-8 e IL 2-9). Dois gêneros diferentes foram encontrados, sendo eles *Klebsiella* e *Escherichia*. Ambos os gêneros encontrados pertencem à mesma família

Enterobacteriaceae, no consórcio KLY não apresentou grande abundância (Tabela 4) (Silva *et al.*, 2024).

Tabela 4. Tabela com todos os isolados em ordem de maior taxa de descoloração para menor, com a morfologia de vários isolados que foram testados, a possível identificação a partir do sequenciamento obtido, o tamanho do *amplicon* disponibilizado no banco de dados NCBI, a cobertura em pares de base (PB) e em porcentagem (%) e pôr fim a identidade (%).

Isolado	Morfologia	Gram	Identificação	Tamanho do amplicon (PB) - Banco de dados	Cobertura (PB)	Cobertura (%)	Identidade (%)
IY 2-3	Estreptococos	Positiva	-	-	-	-	-
IY 2-8	Estafilococos	Negativa	-	-	-	-	-
IY 2-10	Estreptococos	Positiva	-	-	-	-	-
IY 2-2	-	-	<i>Enterococcus</i>	1211	1211	84.3	96.9
IY 2-9	Estreptococos	Positiva	<i>Escherichia</i>	1430	773	54.1	99.2
IY 2-11	-	-	-	-	-	-	-
IL 2-2	Diplococos/bacilo	Positiva	-	-	-	-	-
ICE 6	Estreptococos	Positiva	-	-	-	-	-
IL 2-3	-	-	<i>Klebsiella</i>	-	1402	98.9	99.6
ICE 3	Filamentosa/estreptococos	Positiva	<i>Escherichia</i>	-	313	35.4	94.9
IY 2-5	-	-	<i>Escherichia</i>	-	1073	75.2	98.6
ICE 5	-	-	-	-	-	-	-
IY 2-4	Estreptococos	Positiva	<i>Escherichia</i>	1449	502	34.6	99.4
IL 2-7	-	-	-	-	-	-	-
IL 2-5	-	-	-	-	-	-	-
IL 2-9	Estreptococos	Positiva	<i>Klebsiella</i>	1423	547	74.7	98
IL 2-6	-	-	-	-	-	-	-
IL 2-8	-	-	<i>Klebsiella</i>	1418	252	17.8	100
IL 2-4	Cocos/diplococos	Positiva	-	-	-	-	-

O gênero *Klebsiella* possui diversas espécies de bactérias com atividade lignolítica comprovada, dentre elas já foi descrita a bactéria isolada de amostras mofo foliar *Klebsiella pneumoniae* no trabalho de Xu *et al.*, (2018) com atividade de degradação sobre lignina kraft e corantes que imitam produtos de degradação da lignina em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (Xu *et al.*, 2018). . No trabalho de Tu *et al.*, (2024), outra espécie desse mesmo gênero foi descrita recentemente, isolada a partir de intestino de cupim, a *Klebsiella aerogenes* TL3, demonstrou a necessidade da presença de glicose para degradar lignina kraft em ambiente anaeróbico, mostrando que é possível que alguns dos isolados que vieram de intestinos podem ter atividade sobre lignina.

Já o gênero *Escherichia* não foi tão amplamente descrito com atividade de degradação da lignina, mas é um gênero amplamente descrito em ambientes anaeróbicos

do trato digestivo de diferentes animais, como o rúmen no caso dos bovinos ou o intestino como no rúmen. Bactérias da espécie *Escherichia coli*, foram descritas com essa atividade após a clonagem e expressão de enzimas com atividade lignolíticas provenientes de rumen de búfalo (Zhang, Kun *et al.*, 2024).

O segundo filo que foi encontrado foi *Firmicutes*, que também condiz com a literatura quanto a presença muito marcante em rúmen bovino e várias bactérias isoladas já foram identificadas com potencial de degradar lignina, tanto em ambientes aeróbicos como também em anaeróbicos (Gharechahi *et al.*, 2023). Só foi possível identificar um gênero pertencente a esse filo, que foi o gênero *Enterococcus*, a presença de representantes desse gênero também era esperada, pois

Na amostra do consórcio KLY o filo *Firmicutes* teve abundância de (~4%) e o gênero mais abundante foi *Enterococcus* (~3%), esse é um gênero comumente encontrado no rúmen, contudo não foram encontradas muitas espécies com atividade confirmada para degradação da lignina, embora seja um gênero muito presente em rúmen e com atividade confirmada para degradação de celulose, por exemplo, elas podem produzir endoglucanases, exoglucanases ou β -glucosidase e representam um importante componente para a degradação da biomassa, contudo não foram encontradas bactérias desse gênero com atividade explícita sobre a lignina (Gu *et al.*, 2024; Li, Junfeng *et al.*, 2018).

Após avaliar todos os parâmetros (Tabela 4), é importante salientar que os sequenciamentos obtidos não foram de boa qualidade e em fragmentos muito menores do que o amplicon do gene rRNA 16S (1500 pb), utilizando os primers universais 27F e 1492R. Por isso, será necessário refazer os sequenciamentos para adquirir sequências de melhor qualidade e uma identificação de maior confiabilidade.

5.5. Análise do perfil proteico

Para a análise do secretoma do isolado IY 2-3, foi necessário realizar diversos métodos pois não havia um método amplamente estabelecido na literatura para análises de secretoma de bactérias de ambientes anaeróbicos na degradação de lignina kraft. Por isso foram realizados vários métodos comparativos para conseguir avaliar o perfil de proteínas secretadas pela bactéria na degradação da lignina.

Inicialmente as proteínas foram dosadas com o método de Bradford, (1976), que consiste na interação das proteínas com o corante *Coomassie Blue G-250*. Essa interação ocorre por causa da estrutura do corante, que tem estrutura complexa e vários grupos funcionais que permitem a interação do corante com proteínas presentes nas amostras de interesse. Geralmente o reagente está sempre na forma catiônica e quando o corante se liga a alguma proteína, modifica a estrutura e altera a coloração para azul. Na amostra do secretoma do isolado IY 2-3, foi verificada a interferência de algum composto do meio de cultura com o reagente Bradford. Para resolver esse problema a amostra foi dialisada e as proteínas foram dosadas novamente.

Contudo a própria coloração da lignina apresentou interferência na dosagem de proteínas, para a retirada dessa interferência, foi utilizado o meio de cultura controle como branco e assim a amostra foi finalmente quantificada e o cálculo de precipitação foi realizado para a obtenção de 200 µg de proteínas na precipitação.

No fluxograma (Figura 7) é possível acompanhar a ordem de realização dos experimentos de tratamento de amostra a fim de encontrar o melhor método de análise de proteínas secretadas pelas bactérias nas condições utilizadas nesse trabalho. Inicialmente foram realizadas precipitações ácidas utilizando TCA em duas concentrações e TCA dissolvido em Acetona, também em duas concentrações (Figura 7A). A segunda metodologia foi realizada tanto para concentrar as proteínas, utilizando dois valores de saturação de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) distintos, quanto para comparação de diversos métodos de precipitação de proteínas com menor interferência da lignina. Foram utilizados 6 métodos diferentes de precipitação de proteínas e comparados tanto entre si como entre os valores de saturação por sulfato de amônio (Figura 7B).

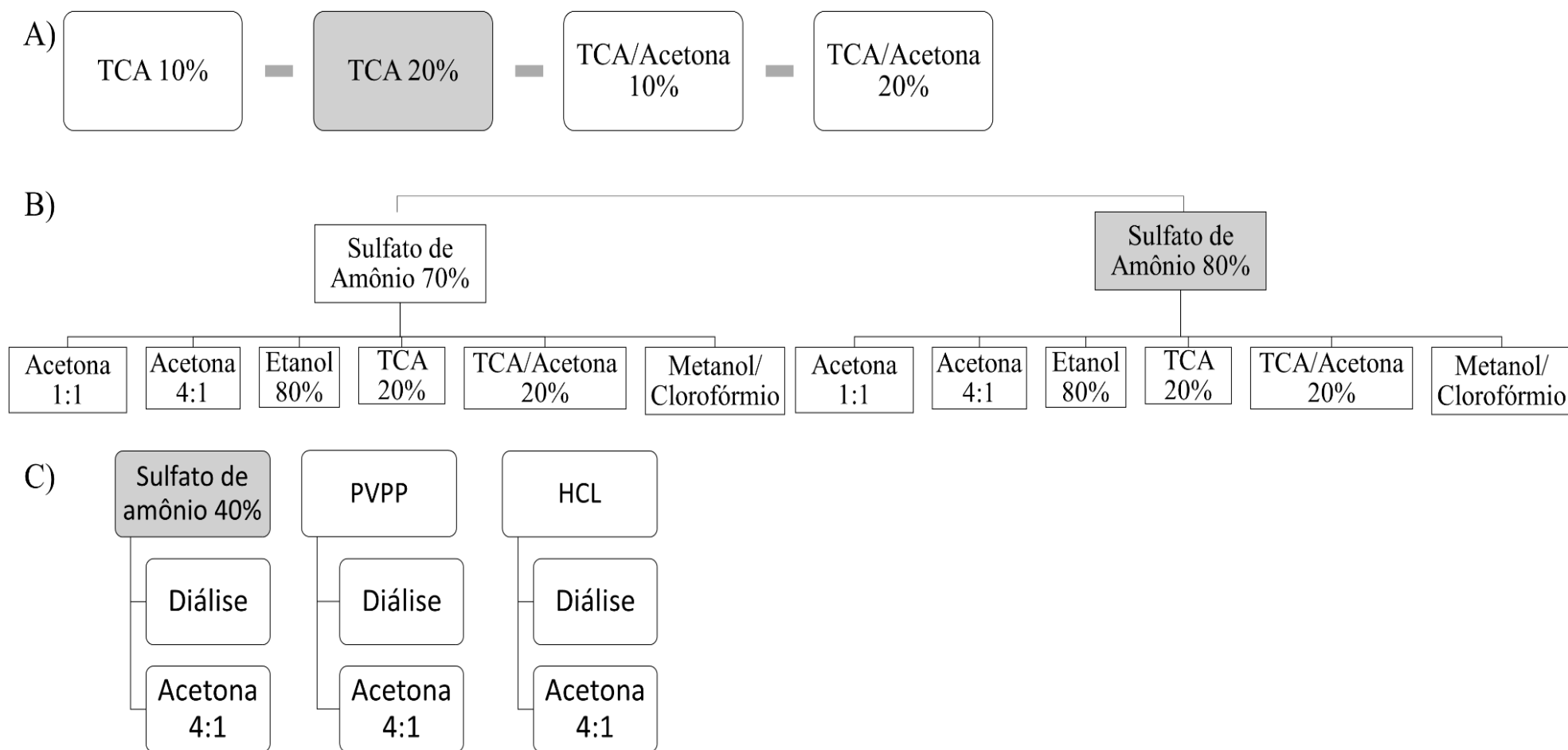


Figura 7. Fluxograma de todos os tratamentos utilizados no secretoma do isolado IY 2-3. A) Tratamento inicial com métodos de precipitação de proteínas mais comuns. B) Concentração de amostras por saturação com sulfato de amônio em duas concentrações (70% e 80%) seguida de testes da amostra concentrada em 6 diferentes métodos de precipitação de proteínas. C) Remoção da lignina por meio de 4 métodos de retirada da lignina, utilizando a precipitação da lignina por meio da saturação por sulfato de amônio (40%), utilização de PVPP e acidificação do sobrenadante até o pH 3,0.

Por fim foram testados 3 métodos para a retirada da lignina. O primeiro foi utilizado após a concentração de proteínas ter causado a precipitação de lignina, seguida do tratamento com PVPP e por fim a acidificação do sobrenadante utilizando HCL (Figura 7C). Todos os tratamentos foram analisados por gel de poliacrilamida 12%, por meio da intensidade das bandas e de menor interferência visual causada pela lignina, o melhor método foi definido (Figura 8).

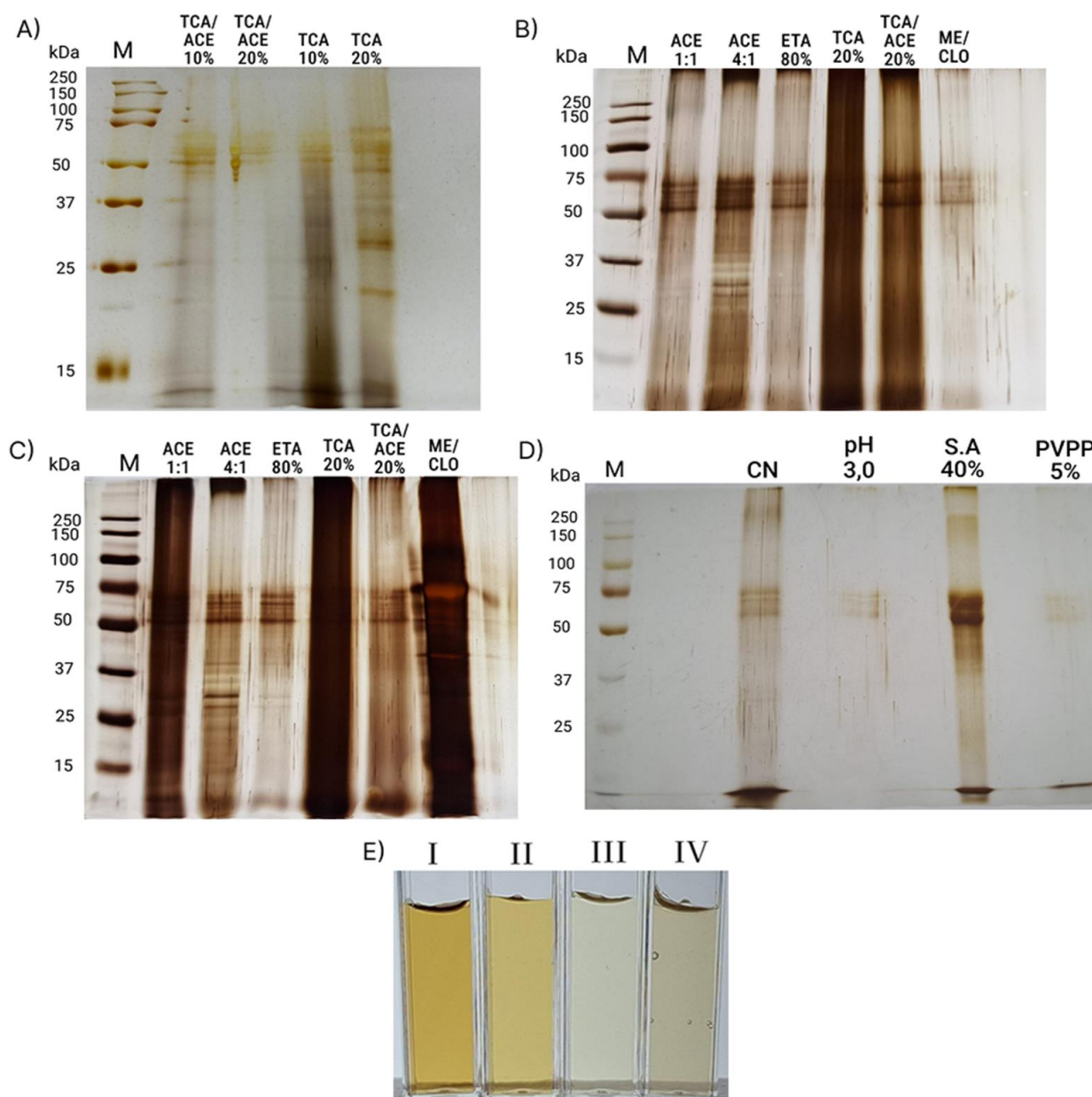


Figura 8. Imagens de todos os tratamentos realizados no secretoma do isolado IY 2-3 em géis de poliacrilamida 12% corados com nitrato de prata. A) Gel com as amostras de dois métodos de precipitação de proteínas com duas variações, (M) Marcador de peso molecular com tamanhos conhecidos de proteínas, método TCA/Acetona 10%, método TCA/Acetona 20%, método TCA 10%, método TCA 20%. B) Proteínas precipitadas utilizando 6 métodos diferentes, da amostra concentrada com 70% de saturação de

sulfato de amônio, (M) Marcador de peso molecular, método acetona 1:1, acetona 4:1, etanol 80%, TCA 20%, TCA/acetona 20% e metanol/clorofórmio. C) Proteínas precipitadas utilizando 6 métodos diferentes, da amostra concentrada com 80% de saturação de sulfato de amônio, (M) Marcador de peso molecular, método acetona 1:1, acetona 4:1, etanol 80%, TCA 20%, TCA/acetona 20% e metanol/clorofórmio. D) Proteínas precipitadas do sobrenadante do isolado IY 2-3 tratado com 3 métodos para retirada da lignina. (M) Marcador de peso molecular, (CN) controle negativo (amostra sem tratamento), (pH 3,0) amostra acidificada com HCL (1M) até o pH 3,0, (S.A 40%) amostra tratada com saturação de sulfato de amônio a 40%, (PVPP 5%) amostra tratada com PVPP (5%). Imagem do sobrenadante do isolado IY 2-3 após os 3 tratamentos, em comparação com o sobrenadante sem nenhum tratamento. I) Controle negativo (sem tratamento), II) Amostra acidificada com HCL (1M) até o pH 3,0, III) Amostra tratada com PVPP (5%), IV) amostra tratada com saturação de sulfato de amônio a 40%.

5.5.1. Precipitação de proteínas por TCA e TCA/Acetona

Inicialmente foram testados métodos de precipitação de proteínas na intenção de retirar a lignina e precipitar o máximo de proteínas possível, foram então utilizados os métodos de TCA em duas concentrações e uma solução de TCA/Acetona também em duas concentrações, como descrito anteriormente (Figura 7A).

Foi realizado o teste com diferentes metodologias para avaliação do melhor método de retirada da lignina para posterior análise do secretoma. Para isso, o secretoma do isolado IY 2-3 de 1 dia de crescimento foi utilizado para essa avaliação. Primeiramente, foi realizada a precipitação das proteínas utilizando dois métodos de TCA e TCA/Acetona. Entre as 4 variações desse experimento, o método utilizando somente TCA (20% final) para precipitar as proteínas se mostrou mais adequado, pois houve maior definição das bandas de proteínas no gel e menos interferência da lignina. As bandas mais bem definidas ficaram em torno de 70 e 50 kDa e entre 30 e 20 kDa (Figura 8A).

Na variação contendo TCA/Acetona 10%, foi possível ver as mesmas bandas de proteínas mencionadas, contudo em menor quantidade. Possivelmente esse método conseguiu precipitar menos proteínas e eliminar a maior parte da lignina presente no sobrenadante, contudo as lavagens progressivas podem ter diminuído ainda mais concentração de proteínas (Figura 8A). Assim como, a menor concentração de TCA pode ter fornecido um ambiente favorável para interações hidrofóbicas, pois a menor concentração do ácido pode ter causado uma desnaturação parcial das proteínas, o que ter possibilitado interações entre os produtos de degradação da lignina e as proteínas (Pradyawong et al., 2022).

Já o método de TCA/Acetona 20% resultou no menor rendimento das 4 variações, foi possível visualizar poucas bandas de proteínas em torno de 70 e 50 kDa, em comparação com os outros tratamentos as bandas e as bandas de proteínas entre 30 e 20 kDa não apareceram. O método de TCA/Acetona é utilizado principalmente na precipitação de proteínas de plantas, como as plantas não organismos eucariotos, elas possuem uma gama enorme de proteínas para diversas funções, portanto as diversas lavagens em sequência da amostra, apesar de causar a perda de proteínas, não vai afetar negativamente na concentração de proteínas (Yadav, Sandhya *et al.*, 2020). Ao contrário de bactérias anaeróbias, pois sobrevivem em nichos específicos como intestinos e sedimentos, por exemplo o rúmen bovino e nestes ambientes a disponibilidade de nutrientes é maior e muitas vezes para a degradação completa da biomassa, é necessário que vários microrganismos trabalhem em sinergia para conseguir disponibilizar nutrientes (Gharechahi *et al.*, 2023).

Dessa forma, o método de TCA/Acetona utilizando uma sequência de lavagens, não foi indicado para amostras pouco concentradas, ao contrário do método de TCA 20% que conseguiu agir como agente precipitante e foram obtidas bandas bem definidas em comparação com a concentração de TCA 10%, essa se mostrou mais propensa a precipitar lignina e menos proteínas que a análise anterior.

5.5.2. Avaliação comparativa de metodologias de precipitação

Após essa análise, foi necessário realizar a concentração de proteínas e o método escolhido foi utilizando sulfato de amônio em duas saturações diferentes (70% e 80%), na intenção de verificar qual das saturações seria mais eficiente em precipitar as proteínas. Contudo, após a concentração de proteínas, a precipitação da lignina foi observada, assim como a precipitação dos produtos de degradação que estavam solúveis no líquido do sobrenadante junto com as proteínas.

Após a concentração das amostras, 1 mL de sobrenadante concentrado foi submetido a cada um dos 6 métodos de precipitação de proteínas (Figura 8B e C). Nas amostras concentradas com 70% de saturação por sulfato de amônio, foi observada bandas mais evidentes no gel, mostrando que esse método foi positivo na concentração das amostras, contudo em ambas as saturações ocorreu o acúmulo da lignina que estava presente na amostra e ela se mostrou visível em ambas variações de saturação por sulfato de amônio. Para o gel comparativo concentrado com 70% de saturação de sulfato de

amônio, foi observado que os métodos contendo acetona (1:1), acetona (4:1) e etanol 80% se mostraram eficientes em eliminar a lignina e precipitar proteínas de pesos diferentes (Figura 8B).

Entre os três métodos, o método de acetona 4:1 se mostrou mais eficiente na precipitação de mais bandas de proteínas. No gel é possível verificar o perfil proteico após o teste com todos os 6 métodos, 5 desses 6 métodos mostraram as proteínas com peso em torno de 70 e 50 kDa, possivelmente são as proteínas secretadas com maior quantidade, já as bandas em torno de 30 e 20 kDa só apareceram no tratamento com acetona 4:1. Essas proteínas podem estar em menor concentração que as outras, e os outros métodos podem não ter sido suficientemente desnaturante para a sua precipitação e solventes orgânicos como a acetona e o etanol, competem pela interação com a água, fazendo com que todas as proteínas presentes precipitem (Nickerson; Doucette, 2020). Assim como a utilização de solventes orgânicos são muito utilizados na retirada da lignina, como a lignina organosolv, que utiliza etanol para romper as ligações éter e liberar a lignina da biomassa vegetal, sendo também um método menos abrasivo para a lignina e possivelmente eliminando a lignina da amostra concentrada por causar a solubilização da lignina e ao mesmo tempo proporcionar a precipitação das proteínas por criar uma camada de solvatação (Letourneau *et al.*, 2023; Zijlstra *et al.*, 2020).

Os tratamentos ácidos com TCA 20% e TCA/Acetona 20% foram os métodos que precipitaram mais lignina junto com as proteínas e impossibilitou verificar as bandas de proteínas, formando um arraste ao longo da corrida, a amostra de TCA 20% se mostrou ainda pior que o método de TCA/Acetona 20% (Figura 8B). Esse resultado foi possível pois a lignina kraft é conhecida por ser uma lignina com características alcalinas e precipitam na presença de ácidos, por exemplo a precipitação de lignina kraft do efluente industrial é realizada utilizando a acidificação do efluente até o pH 1. Por esse motivo, a utilização de ácidos pode resultar no acúmulo da lignina com as proteínas (Lawoko; Samec, 2023; Zhu, Weizhen; Theliander, 2015).

O método que obteve o menor rendimento de proteínas foi o de metanol/clorofórmio, pois apesar de ter eliminado mais lignina do que os outros métodos, ocorreu a perda crítica de proteínas (Figura 8B). Pode ter acontecido com esse tratamento o mesmo que ocorreu com o método de TCA/Acetona 20% sem adaptações, pois o número de etapas seguidas pode gerar uma perda elevada de proteínas. Outra possível causa é que o método de metanol/clorofórmio normalmente separa os componentes em duas fases, sendo elas polares (superior) e apolares (fase inferior). As diversas

características que a lignina pode ter reagido com as proteínas impedindo que elas ficassem na fase com metanol. Dependendo da origem da lignina podem ter resíduos sulfonados que podem ter maior afinidade com as proteínas e assim formar agregados difíceis de separar.

Na segunda concentração de proteínas, utilizando 80% de saturação de sulfato de amônio, a primeira característica foi vista pela maior precipitação de lignina junto com as proteínas, pois os mesmos métodos foram utilizados para comparar e nessa amostra foi claramente visto que a lignina esteve presente na metade dos métodos. Contudo ocasionou na maior concentração de proteínas também, pois as bandas ficaram mais evidentes (Figura 8C), essa característica foi mais evidente nos métodos de acetona (1:1), TCA 20% e metanol/clorofórmio. O método mais eficiente nesse caso foi acetona (4:1) e os outros dois métodos apesar de ter eliminado mais a lignina do que os outros métodos, não conseguiu causar a precipitação das proteínas com peso entre 30 a 20 kDa, bandas levemente coradas foram vistas no método de etanol 80%, mas em comparação com o método de acetona (4:1), a precipitação foi intensamente menor.

O método de TCA 20% mostrou novamente a capacidade de precipitar a lignina kraft, devido às características da própria lignina. Pois a lignina kraft é uma lignina altamente alcalina e a alta concentração de ácidos promovem essa precipitação, atrapalhando a análise do secretoma. Já o método de acetona (1:1) ter proporcionado tanta precipitação da lignina, pode ter sido causada pela menor concentração do solvente, tendo proporcionado uma camada de solvatação inferior do que era necessário para separar totalmente a lignina das proteínas. Ao comparar com o método de acetona (4:1), fica visível que a maior quantidade de solvente foi positiva para eliminar a lignina e separar a lignina das proteínas, causando uma melhor precipitação da lignina e a formação de bandas bem definidas, apesar de ainda apresentar manchas no gel referente a uma lignina residual.

O método de TCA/Acetona 20% nesse caso se mostrou mais eficiente do que na amostra concentrada com sulfato de amônio a 70%, muito embora não foi capaz de precipitar as proteínas da faixa de 30 a 20 kDa, e as proteínas precipitadas na faixa de 75 a 50 kDa apesar de ficarem evidentes, não foram tão bem definidas como no método de acetona (4:1). Por fim o método de metanol/clorofórmio se mostrou o pior entre todos os outros, pois foi o que precipitou a maior quantidade de lignina, possivelmente ocasionada pela quantidade de lignina que foi acumulada na amostra concentrada com sulfato de

amônio 80% e a lignina pode ter interagido com as proteínas da mesma forma que foi mencionada para a amostra concentrada com sulfato de amônio 70%.

Dessa forma, foi constatado que as proteínas foram mais concentradas na saturação de 80% por sulfato de amônio e por conta da alta quantidade de lignina que precipitou junto, será necessário utilizar o método com maior quantidade de solvente orgânico que nesse caso foi o método de acetona (4:1).

5.5.3. Métodos de remoção da lignina

Por fim, foram utilizados 3 métodos principais na retirada da lignina, na intenção de diminuir a interferência causada por ela em géis de proteínas e possíveis ensaios enzimáticos que utilizam a alteração de cor de substratos para indicar atividade das enzimas envolvidas. Foi utilizado o sobrenadante do isolado IY 2-3 sem concentrar, para avaliar qual dos 3 métodos seriam mais adequados para o tratamento da amostra antes da concentração.

Foram utilizados os métodos de acidificação para o pH 3,0, saturação por sulfato de amônio e a utilização do reagente PVPP para analisar a presença e a interferência da lignina nas amostras, foi realizada a precipitação da amostra com acetona (4:1), o método que se mostrou mais eficiente na precipitação das amostras concentradas.

Nessa análise foi visualmente notável a diminuição de cor na amostra tratada com PVPP (Figura 8E(III)), principalmente em comparação com o controle negativo (Figura 8E (I)). Seguida pela amostra tratada com sulfato de amônio a 40% de saturação (Figura 8E (IV)) e por último a amostra acidificada até o pH 3,0 (Figura 8E (II)). Após o tratamento as amostras foram precipitadas com acetona e o gel revelou qual dos métodos podem ser realmente melhores para futuras análises (Figura 8D).

No gel, os tratamentos de acidificação (pH 3,0) e PVPP (5%) diminuíram drasticamente a quantidade de manchas no gel causadas pela lignina, em comparação com o controle negativo, contudo houve a diminuição da concentração de proteínas nas amostras, que podem ter sido causadas pela etapa de diálise anterior a precipitação ou a diminuição da eficiência entre a desnaturação das proteínas e a camada de solvatação criada pela acetona, para o método de PVPP (5%). Esse método é amplamente utilizado para remover compostos fenólicos em extratos de plantas, geralmente para o mesmo fim

que foi promovida essa análise, retirar interferentes para análises de ensaios enzimáticos, identificação e purificação de proteínas (Yadav, Sandhya *et al.*, 2020).

O método de acidificação pode ter tido essa perda alta de proteínas, pois é conhecido que o pH muito baixo pode ter causado a desnaturação das proteínas e precipitar em agrupamento com a lignina no momento de centrifugação, mostrando que esse método pode não ser muito eficiente para a eliminação da lignina e a preservação das proteínas do sobrenadante. Como ocorreu no caso de precipitação das proteínas do sobrenadante concentrado e as características alcalinas da lignina.

Por fim, no último método analisado foi vista uma alta concentração de proteínas nas amostras saturadas com sulfato de amônio 40%, contudo foi a amostra com maior concentração de lignina, apesar de uma parte da lignina ter sido removida da amostra pela centrifugação e diálise, mostrando que para a remoção da lignina esse método foi o menos eficiente. Isso pode ter acontecido devido a menor quantidade de saturação por sulfato de amônio do que o necessário para eliminar a lignina, como mostrado no resultado anterior, a saturação a 80% promoveu uma concentração maior de lignina na amostra do que a de 70%, indicando que seria necessário que houvesse a presença de mais sal se sulfato de amônio para remover a lignina de forma efetiva. Contudo, aumentar a saturação do sobrenadante pode ocasionar em uma perda significativa de proteínas do secretoma.

Dessa forma, os métodos de pH 3,0 e PVPP (5%) se mostraram mais eficientes em remover a lignina, mas é preciso ter cautela, pois o pH 3,0 mostrou que pode ocorrer uma perda significativa de proteínas por desnaturação e apesar do método de saturação por sulfato de amônio não ter eliminado totalmente a lignina, ela preservou as proteínas presentes no sobrenadante.

Por fim, podem ser necessários outros testes com as amostras concentradas ou outro método de precipitação de proteínas após o tratamento da amostra com PVPP, para confirmar se ele promove efetivamente uma perda significativa de proteínas no sobrenadante ou se a baixa concentração dessas amostras foi a causa da baixa qualidade de bandas no gel de proteínas, assim como testar outras saturações de sal de sulfato de amônio para remover o máximo de lignina sem que ocorra uma perda significativa de proteínas das amostras.

6. PERSPECTIVAS

O presente trabalho contemplou o estudo de isolados bacterianos na sua capacidade tanto de crescimento quanto na degradação ou modificação da lignina. Resultados obtidos aqui abrem novos questionamentos de forma a gerar hipóteses que podem ser verificadas, assim como novas estratégias para resolver adversidades que foram encontradas no desenvolvimento da pesquisa.

Primeiramente, foi constatada a necessidade da presença de glicose no meio de cultivo para promoção do crescimento dos isolados bacterianos, e a ocorrência da degradação da lignina. Assim um aprofundamento para maior compreensão da utilização da glicose pela bactéria para que ocorra a degradação da lignina, assim como a função de outras fontes de carbono na promoção desse mesmo efeito como o glicerol, a xilose, celulose, entre outros, seria de grande importância científica.

Posteriormente, dois pontos levantados como possíveis desafios, já considerados relevantes quando se trata de estudos em bactérias anaeróbias, é a identificação molecular e a obtenção de material de qualidade para análise de secretoma. A identificação molecular dos isolados é essencial para futuras análises, de forma que serão necessárias outras formas mais eficientes de amplificação do gene *rRNA* 16S ou uma etapa de isolamento para confirmação de uma única cepa presente no meio de cultura e a confirmação de que estas bactérias estejam isoladas para análise de degradação da lignina.

Assim como serão necessários esforços para estabelecer o método mais eficiente no tratamento do secretoma dessas bactérias contendo lignina e na concentração do mesmo, levando em consideração a quantidade de proteínas secretadas por bactérias anaeróbias. Assim, métodos adicionais de limpeza dos secretomas para ensaios enzimáticos e para identificação das proteínas secretadas por espectrometria de massa seriam de interesse não somente para continuidade deste estudo, mas em termos de conhecimento para outras pesquisas dessa área que encontram os mesmos desafios.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado isolados bacterianos obtidos de rúmen bovino, que foram capazes de crescer em ambiente anaeróbico, atuando na degradação ou modificação da estrutura da lignina.

A suplementação com glicose no meio de cultura foi eficiente para promover a desconstrução de lignina kraft pelos isolados do consórcio. Os isolados do grupo I apresentaram mais capacidade de descoloração do que os isolados do grupo II e alguns isolados são candidatos promissores para as futuras análises. Os gêneros encontrados pela identificação parcial podem indicar a presença de bactérias de gêneros ainda não anotados como atuantes na modificação da lignina, como o gênero *Enterococcus*, e a presença de um gênero já descrito anteriormente com essa característica como bactérias do gênero *Klebsiella*. Assim, podemos indicar que o cultivo enriquecido com lignina foi promissor tanto para isolar bactérias que são conhecidas por possuírem capacidade de descoloração, quanto outras espécies que estão atuando nessa modificação da lignina.

O método de descoloração mostrou possíveis diferenças de decomposição da lignina entre os isolados, mostrando que alguns isolados podem modificar a estrutura da lignina de formas diferentes, esse fato foi confirmado pela análise de FTIR que mostrou diferentes modificações na estrutura da lignina causadas pelos isolados IY 2-3 e IY 2-10. Estes dois isolados foram os principais analisados neste trabalho, contudo o consórcio tem vários outros isolados que podem ser analisados quanto sua capacidade de decomposição da lignina e suas possíveis vias metabólicas envolvidas no processo. Com a hipótese de que diferentes enzimas estariam atuando nessa modificação, seriam gerados dessa forma diferentes produtos que podem ter uma importante aplicação biotecnológica.

Os métodos testados para análise de secretoma, mostraram um perfil consistente de proteínas no sobrenadante nas faixas de 70 a 50 kDa e 30 a 20 kDa em menor concentração, mostrando um mecanismo constante do isolado IY 2-3 na liberação dessas enzimas para a decomposição da lignina. Como também foram encontradas soluções para a exploração do secretoma a partir do sobrenadante, como demonstrado na concentração da amostra por saturação com sulfato de amônio, representando o melhor método de preparo dessas amostras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, Omar Y.; AL-RABIAH, Abdulrahman A.; EL-HALWAGI, Mahmoud M.; HULTEBERG, Christian P. Conceptual Design of a Kraft Lignin Biorefinery for the Production of Valuable Chemicals via Oxidative Depolymerization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 23, p. 8823–8829, 15 jun. 2020. DOI 10.1021/acssuschemeng.0c02945. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.0c02945>. Acesso em: 17 mar. 2025.

AHRING, Birgitte K.; BISWAS, Rajib; AHAMED, Aftab; TELLER, Philip J.; UELLEND AHL, Hinrich. Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 175, p. 182–188, 1 jan. 2015. DOI 10.1016/j.biortech.2014.10.082. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414015041>. Acesso em: 18 mar. 2025.

AISHWARYA, Aishwarya; YADAV, Vishwanath; GOYAL, Arun. Novel and Tailor-Made Enzyme Cocktails for Saccharification of Cellulosic Biomass. *In*: BISARIA, Virendra (org.). **Handbook of Biorefinery Research and Technology: Biomass Logistics to Saccharification**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2024. p. 951–975. DOI 10.1007/978-94-007-6308-1_75. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6308-1_75. Acesso em: 17 mar. 2025.

AL-DHABI, Naif Abdullah; ESMAIL, Galal Ali; VALAN ARASU, Mariadhas. Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing *Bacillus velezensis* strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor. **Chemosphere**, [s. l.], v. 268, p. 128726, abr. 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.128726. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520329246>. Acesso em: 17 mar. 2025.

ANDLAR, Martina; REZIC, Tonči; MARĐETKO, Nenad; KRACHER, Daniel; LUDWIG, Roland; ŠANTEK, Božidar. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 768–778, 2018. DOI 10.1002/elsc.201800039. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elsc.201800039>. Acesso em: 17 mar. 2025.

ASINA, Fnu; BRZONOVA, Ivana; VOELLER, Keith; KOZLIAK, Evguenii; KUBÁTOVÁ, Alena; YAO, Bin; JI, Yun. Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 220, p. 414–424, nov. 2016. DOI 10.1016/j.biortech.2016.08.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416311373>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BAJWA, D. S.; POURHASHEM, G.; ULLAH, A. H.; BAJWA, S. G. A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 139, p. 111526, 1 nov. 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2019.111526. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019305382>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BARAPATRE, Anand; AND JHA, Harit. Degradation of alkali lignin by two ascomycetes and free radical scavenging activity of the products. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 269–286, 4 jul. 2017. DOI 10.1080/10242422.2017.1327953. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10242422.2017.1327953>. Acesso em: 18 mar. 2025.

BARREIRO, Daniela S.; OLIVEIRA, Ricardo N. S.; PAULETA, Sofia R. Bacterial peroxidases – Multivalent enzymes that enable the use of hydrogen peroxide for microaerobic and anaerobic proliferation. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 485, p. 215114, 15 jun. 2023a. DOI 10.1016/j.ccr.2023.215114. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854523001030>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BARREIRO, Daniela S.; OLIVEIRA, Ricardo N.S.; PAULETA, Sofia R. Bacterial peroxidases – Multivalent enzymes that enable the use of hydrogen peroxide for microaerobic and anaerobic proliferation. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 485, p. 215114, jun. 2023b. DOI 10.1016/j.ccr.2023.215114. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854523001030>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BARUAH, Julie; NATH, Bikash Kar; SHARMA, Ritika; KUMAR, Sachin; DEKA, Ramesh Chandra; BARUAH, Deben Chandra; KALITA, Eeshan. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontiers in Energy Research**, [s. l.], v. 6, 18 dez. 2018. DOI 10.3389/fenrg.2018.00141. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/energy-research/articles/10.3389/fenrg.2018.00141/full>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BENAVIDES, Viviana; CIUDAD, Gustavo; PINTO-IBIETA, Fernanda; ROBLEDO, Tatiana; RUBILAR, Olga; SERRANO, Antonio. Enhancing Laccase and Manganese Peroxidase Activity in White-Rot Fungi: The Role of Copper, Manganese, and Lignocellulosic Substrates. **Agronomy**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 2562, nov. 2024. DOI 10.3390/agronomy14112562. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/14/11/2562>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BILLINGS, Andrew F.; FORTNEY, Julian L.; HAZEN, Terry C.; SIMMONS, Blake; DAVENPORT, Karen W.; GOODWIN, Lynne; IVANOVA, Natalia; KYRPIDES, Nikos C.; MAVROMATIS, Konstantinos; WOYKE, Tanja; DEANGELIS, Kristen M. Genome

sequence and description of the anaerobic lignin-degrading bacterium *Tolumonas lignolytica* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 106, 19 nov. 2015. DOI 10.1186/s40793-015-0100-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0100-3>. Acesso em: 18 mar. 2025.

BOCKEN, Nancy M. P.; de Pauw ,Ingrid; Bakker ,Conny; AND VAN DER GRINTEN, Bram. Product design and business model strategies for a circular economy. **Journal of Industrial and Production Engineering**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 308–320, 3 jul. 2016. DOI 10.1080/21681015.2016.1172124. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21681015.2016.1172124>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>. Acesso em: 18 mar. 2025.

BRINK, Daniel P.; RAVI, Krithika; LIDÉN, Gunnar; GORWA-GRAUSLUND, Marie F. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 10, p. 3979–4002, 1 maio 2019. DOI 10.1007/s00253-019-09692-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09692-4>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BUGG, Timothy D. H.; AHMAD, Mark; HARDIMAN, Elizabeth M.; RAHMANPOUR, Rahman. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1883, 2011. DOI 10.1039/c1np00042j. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=c1np00042j>. Acesso em: 17 mar. 2025.

CHEN, Zhu; WAN, Caixia. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 73, p. 610–621, 1 jun. 2017. DOI 10.1016/j.rser.2017.01.166. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117301715>. Acesso em: 17 mar. 2025.

CONNOLLY, Claire; TIMLIN, Mark; HOGAN, Sean A.; O'CALLAGHAN, Tom F.; BRODKORB, André; O'DONOVAN, Michael; HENNESSY, Deirdre; FITZPATRICK, Ellen; MCCARTHY, Kieran; MURPHY, John P.; BRENNAN, Lorraine. The Impact of Varying Pasture Levels on the Metabolomic Profile of Bovine Ruminant Fluid. **Metabolites**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 476, set. 2024. DOI 10.3390/metabo14090476. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-1989/14/9/476>. Acesso em: 18 mar. 2025.

DE GONZALO, Gonzalo; COLPA, Dana I.; HABIB, Mohamed H. M.; FRAAIJE, Marco W. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 236, p. 110–119, 20 out. 2016. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.08.011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616314675>. Acesso em: 17 mar. 2025.

DEANGELIS, Kristen M.; D'HAESELEER, Patrik; CHIVIAN, Dylan; FORTNEY, Julian L.; KHUDYAKOV, Jane; SIMMONS, Blake; WOO, Hannah; ARKIN, Adam P.; DAVENPORT, Karen Walston; GOODWIN, Lynne; CHEN, Amy; IVANOVA, Natalia; KYRPIDES, Nikos C.; MAVROMATIS, Konstantinos; WOYKE, Tanja; HAZEN, Terry C. Complete genome sequence of “*Enterobacter lignolyticus*” SCF1. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 69–85, 23 set. 2011. DOI 10.4056/sigs.2104875. Disponível em: <https://environmentalmicrobiome.biomedcentral.com/articles/10.4056/sigs.2104875>. Acesso em: 17 mar. 2025.

DESSBESELL, Luana; PALEOLOGOU, Michael; LEITCH, Mathew; PULKKI, Reino; XU, Chunbao (Charles). Global lignin supply overview and kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 123, p. 109768, maio 2020. DOI 10.1016/j.rser.2020.109768. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032120300642>. Acesso em: 17 mar. 2025.

DUAN, J.; HUO, X.; DU, W.J.; LIANG, J.D.; WANG, D.Q.; YANG, S.C. Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated anaerobic bacterial strain, *Acetoanaerobium* sp. WJDL-Y2. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 55–62, 1 jan. 2016. DOI 10.1111/lam.12508. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.12508>. Acesso em: 18 mar. 2025.

GAO, Jiayue; ALI, Mohamed Yassin; KAMARAJ, Yoganathan; ZHANG, Zhenghao; WEIKE, Li; SETHUPATHY, Sivasamy; ZHU, Daochen. A comprehensive review on biological funnel mechanism in lignin valorization: Pathways and enzyme dynamics. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 287, p. 127835, 1 out. 2024. DOI 10.1016/j.micres.2024.127835. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501324002362>. Acesso em: 18 mar. 2025.

GHARECHAHI, Javad; VAHIDI, Mohammad Farhad; SHARIFI, Golandam; ARIAENEJAD, Shohreh; DING, Xue-Zhi; HAN, Jian-Lin; SALEKDEH, Ghasem Hosseini. Lignocellulose degradation by rumen bacterial communities: New insights from metagenome analyses. **Environmental Research**, [s. l.], v. 229, p. 115925, 15 jul. 2023. DOI 10.1016/j.envres.2023.115925. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393512300717X>. Acesso em: 18 mar. 2025.

GRGAS, Dijana; RUKAVINA, Matea; BEŠLO, Drago; ŠTEFANAC, Tea; CRNEK, Vlado; ŠIKIĆ, Tanja; HABUDA-STANIĆ, Mirna; LANDEKA DRAGIČEVIĆ, Tibela. The Bacterial Degradation of Lignin—A Review. **Water**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1272, jan.

2023. DOI 10.3390/w15071272. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/15/7/1272>. Acesso em: 18 mar. 2025.

GU, Jinming; QIU, Qing; YU, Yue; SUN, Xuejian; TIAN, Kejian; CHANG, Menghan; WANG, Yibing; ZHANG, Fenglin; HUO, Hongliang. Bacterial transformation of lignin: key enzymes and high-value products. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 2, 3 jan. 2024. DOI 10.1186/s13068-023-02447-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02447-4>. Acesso em: 18 mar. 2025.

HAQ, Izharul; KUMAR, Sharad; KUMARI, Vineeta; SINGH, Sudheer Kumar; RAJ, Abhay. Avaliação do potencial de biorremediação de *Serratia liquefaciens* ligninolítica para desintoxicação de efluentes de fábricas de celulose e papel. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 305, p. 190–199, 15 mar. 2016. DOI 10.1016/j.jhazmat.2015.11.046. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389415302466>. Acesso em: 18 mar. 2025.

H. BUGG, Timothy D. The chemical logic of enzymatic lignin degradation. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 804–814, 2024. DOI 10.1039/D3CC05298B. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/cc/d3cc05298b>. Acesso em: 17 mar. 2025.

HOU, Jinju; ZHANG, Qiuzhuo; TIAN, Fuxiang; LIU, Fuwen; JIANG, Jingxian; QIN, Jiaolong; WANG, Huifeng; WANG, Jing; CHANG, Shufang; HU, Xiaojun. Structure changes of lignin and their effects on enzymatic hydrolysis for bioethanol production: a focus on lignin modification. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 393, p. 61–73, 20 set. 2024. DOI 10.1016/j.jbiotec.2024.07.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165624002013>. Acesso em: 17 mar. 2025.

HUANG, Xiankun; YIN, Hongchao; ZHANG, Bin; MEI, Ning; MU, Lin. Pyrolysis of lignin (De-alkaline) via TG/DSC–FTIR and TG–MS: pyrolysis characteristics, thermo-kinetics, and gas products. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 795–812, jan. 2024. DOI 10.1007/s13399-022-02387-3. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s13399-022-02387-3>. Acesso em: 18 mar. 2025.

JIANG, Cheng; CHENG, Yi; ZANG, Hailian; CHEN, Xi; WANG, Yue; ZHANG, Yuting; WANG, Jinming; SHEN, Xiaohui; LI, Chunyan. Biodegradation of lignin and the associated degradation pathway by psychrotrophic *Arthrobacter* sp. C2 from the cold region of China. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 1423–1440, 1 fev. 2020. DOI 10.1007/s10570-019-02858-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02858-3>. Acesso em: 18 mar. 2025.

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, Pretreatment of Biomass. [s. l.], v. 199, p. 103–112, 1 jan. 2016. DOI

10.1016/j.biortech.2015.10.009. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415014042>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KATO, Hiroyuki; MIURA, Daisuke; KATO, Masashi; SHIMIZU, Motoyuki. Metabolic mechanism of lignin-derived aromatics in white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 532, 11 dez. 2024. DOI 10.1007/s00253-024-13371-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13371-4>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KATO, Souichiro; CHINO, Kanako; KAMIMURA, Naofumi; MASAI, Eiji; YUMOTO, Isao; KAMAGATA, Yoichi. Methanogenic degradation of lignin-derived monoaromatic compounds by microbial enrichments from rice paddy field soil. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 14295, 24 set. 2015. DOI 10.1038/srep14295. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep14295>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KHAN, Muhammad Usman; AHRING, Birgitte Kiaer. Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications -A review. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 128, p. 105325, set. 2019. DOI 10.1016/j.biombioe.2019.105325. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953419302740>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KHAN, Sanam Islam; ZARIN, Asaf; AHMED, Safia; HASAN, Fariha; BELDUZ, Ali Osman; ÇANAKÇI, Sabriye; KHAN, Samiullah; BADSHAH, Malik; FARMAN, Muhammad; SHAH, Aamer Ali. Degradation of lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 isolated from pulp and paper mill effluent. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 420–432, 1 jan. 2022. DOI 10.2166/wst.2021.610. Disponível em: <https://iwaponline.com/wst/article/85/1/420/85578/Degradation-of-lignin-by-Bacillus-altitudinis-SL7>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KHARAYAT, Yogita; AND THAKUR, Indu Shakher. Isolation of Bacterial Strain from Sediment Core of Pulp and Paper Mill Industries for Production and Purification of Lignin Peroxidase (LiP) Enzyme. **Bioremediation Journal**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 125–130, 1 abr. 2012. DOI 10.1080/10889868.2012.665964. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.665964>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KHATAMI, Seyyed Hossein; VAKILI, Omid; MOVAHEDPOUR, Ahmad; GHESMATI, Zeinab; GHASEMI, Hassan; TAHERI-ANGANEH, Mortaza. Laccase: Various types and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 2658–2672, dez. 2022. DOI 10.1002/bab.2313. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bab.2313>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KIENBERGER, Marlene; MAITZ, Silvia; PICHLER, Thomas; DEMMELMAYER, Paul. Systematic Review on Isolation Processes for Technical Lignin. **Processes**, [s. l.],

v. 9, n. 5, p. 804, 3 maio 2021. DOI 10.3390/pr9050804. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/5/804>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KIM, Jae-Young; PARK, Jeesu; HWANG, Hyewon; KIM, Jeong Kwon; SONG, In Kyu; CHOI, Joon Weon. Catalytic depolymerization of lignin macromolecule to alkylated phenols over various metal catalysts in supercritical tert-butanol. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 113, p. 99–106, maio 2015. DOI 10.1016/j.jaap.2014.11.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165237014002848>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KIM, Kwang Ho; KIM, Chang Soo. Recent Efforts to Prevent Undesirable Reactions From Fractionation to Depolymerization of Lignin: Toward Maximizing the Value From Lignin. **Frontiers in Energy Research**, [s. l.], v. 6, 11 set. 2018. DOI 10.3389/fenrg.2018.00092. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/energy-research/articles/10.3389/fenrg.2018.00092/full>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KUMAR, Adarsh; CHANDRA, Ram. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e03170, fev. 2020. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e03170. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020300153>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KUMAR, Adepu Kiran; SHARMA, Shaishav. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 7, 18 jan. 2017. DOI 10.1186/s40643-017-0137-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>. Acesso em: 17 mar. 2025.

KUMAR, Madan; SINGH, Jyoti; SINGH, Manoj Kumar; SINGHAL, Anjali; THAKUR, Indu Shekhar. Investigating the degradation process of kraft lignin by β -proteobacterium, *Pandora sp.* ISTKB. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 20, p. 15690–15702, out. 2015. DOI 10.1007/s11356-015-4771-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4771-5>. Acesso em: 18 mar. 2025.

KUMAR, Rajesh; SINGH, Anjali; MAURYA, Annapurna; YADAV, Pooja; YADAV, Ashutosh; CHOWDHARY, Pankaj; RAJ, Abhay. Biorremediação eficaz de águas residuais de fábricas de celulose e papel usando *Bacillus cereus* como uma possível bactéria degradadora de lignina kraft. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 352, p. 127076, 1 maio 2022a. DOI 10.1016/j.biortech.2022.127076. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852422004059>. Acesso em: 18 mar. 2025.

KUMAR, Vikas; PALLAVI, Preeti; SEN, Sudip Kumar; RAUT, Sangeeta. Harnessing the potential of white rot fungi and ligninolytic enzymes for efficient textile dye degradation: A comprehensive review. **Water Environment Research**, [s. l.], v. 96, n.

1, p. e10959, 2024. DOI 10.1002/wer.10959. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wer.10959>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LAWOKO, Martin; SAMEC, Joseph S. M. Kraft lignin valorization: Biofuels and thermoset materials in focus. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 40, p. 100738, 1 abr. 2023. DOI 10.1016/j.cogsc.2022.100738. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S245222362200150X>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LEE, Chol Gyu; BABA, Yasunori; ASANO, Ryoki; FUKUDA, Yasuhiro; TADA, Chika; NAKAI, Yutaka. Identification of bacteria involved in the decomposition of lignocellulosic biomass treated with cow rumen fluid by metagenomic analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 137–141, 1 ago. 2020. DOI 10.1016/j.jbiosc.2020.03.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172320301742>. Acesso em: 18 mar. 2025.

LEE, Siseon; KANG, Minsik; BAE, Jung-Hoon; SOHN, Jung-Hoon; SUNG, Bong Hyun. Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, 3 set. 2019. DOI 10.3389/fbioe.2019.00209. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2019.00209/full>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LETOURNEAU, Dane R.; MARZULLO, Bryan P.; ALEXANDRIDOU, Anastasia; BARROW, Mark P.; O'CONNOR, Peter B.; VOLMER, Dietrich A. Characterizing lignins from various sources and treatment processes after optimized sample preparation techniques and analysis via ESI-HRMS and custom mass defect software tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 415, n. 27, p. 6663–6675, nov. 2023. DOI 10.1007/s00216-023-04942-x. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00216-023-04942-x>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LI, Changzhi; ZHAO, Xiaochen; WANG, Aiqin; HUBER, George W.; ZHANG, Tao. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 115, n. 21, p. 11559–11624, 11 nov. 2015. DOI 10.1021/acs.chemrev.5b00155. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00155>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LI, Junfeng; YUAN, Xianjun; DESTA, Seare T.; DONG, Zhihao; MUGABE, Wazha; SHAO, Tao. Caracterização de *Enterococcus faecalis* JF85 e *Enterococcus faecium* Y83 isolados de iaque tibetano (*Bos grunniens*) para ensilagem de *Pennisetum sinense*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 257, p. 76–83, 1 jun. 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.02.070. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418302633>. Acesso em: 18 mar. 2025.

LI, Mi; PU, Yunqiao; RAGAUSKAS, Arthur J. Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 4, 18 nov. 2016. DOI 10.3389/fchem.2016.00045. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2016.00045/full>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LI, Ningjian; AN, Xuejiao; XIAO, Xiaoshuang; AN, Weijuan; ZHANG, Qinghua. Recent advances in the treatment of lignin in papermaking wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 116, jul. 2022. DOI 10.1007/s11274-022-03300-w. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11274-022-03300-w>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LI, Qi; GAO, Ruiying; LI, Yucheng; FAN, Bo; MA, Cuiluan; HE, Yu-Cai. Improved biotransformation of lignin-valorized vanillin into vanillylamine in a sustainable bioreaction medium. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 384, p. 129292, 1 set. 2023. DOI 10.1016/j.biortech.2023.129292. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852423007186>. Acesso em: 17 mar. 2025.

LIU, Yang; HU, Tianjue; WU, Zhengping; ZENG, Guangming; HUANG, Danlian; SHEN, Ying; HE, Xiaoxiao; LAI, Mingyong; HE, Yibin. Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 14004–14013, dez. 2014. DOI 10.1007/s11356-014-3342-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3342-5>. Acesso em: 18 mar. 2025.

LOMBARD, Vincent; GOLACONDA RAMULU, Hemalatha; DRULA, Elodie; COUTINHO, Pedro M.; HENRISSAT, Bernard. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. D490–D495, 1 jan. 2014. DOI 10.1093/nar/gkt1178. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>. Acesso em: 17 mar. 2025.

MESTRE, John J. Modification of Lignin*. **Journal of Macromolecular Science, Part C**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 235–289, 7 fev. 2007. DOI 10.1081/MC-120004764. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/MC-120004764>. Acesso em: 17 mar. 2025.

MIES, Annika; GOLD, Stefan. Mapping the social dimension of the circular economy. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 321, p. 128960, 25 out. 2021. DOI 10.1016/j.jclepro.2021.128960. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652621031528>. Acesso em: 17 mar. 2025.

MIZRAHI, Itzhak; WALLACE, R. John; MORAÏS, Sarah. The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. **Nature Reviews Microbiology**, [s.

l.], v. 19, n. 9, p. 553–566, set. 2021. DOI 10.1038/s41579-021-00543-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00543-6>. Acesso em: 18 mar. 2025.

MUSTAFA, Ahmed M.; POULSEN, Tjalfe G.; XIA, Yihua; SHENG, Kuichuan. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 224, p. 174–182, jan. 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2016.11.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416315334>. Acesso em: 17 mar. 2025.

NANDAL, Preeti; ARORA, Anju; VIRMANI, Shreya. An appraisal on valorization of lignin: A byproduct from biorefineries and paper industries. **Biomass and Bioenergy**, [*s. l.*], v. 155, p. 106295, dez. 2021. DOI 10.1016/j.biombioe.2021.106295. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953421003305>. Acesso em: 17 mar. 2025.

NICKERSON, Jessica L.; DOUCETTE, Alan A. Rapid and Quantitative Protein Precipitation for Proteome Analysis by Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, [*s. l.*], v. 19, n. 5, p. 2035–2042, 1 maio 2020. DOI 10.1021/acs.jproteome.9b00867. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00867>. Acesso em: 18 mar. 2025.

OJHA, A. K.; TIWARI, M. Lignin Decolorization and Degradation of Pulp and Paper Mill Effluent by Ligninolytic Bacteria. **Iranica Journal of Energy & Environment**, [*s. l.*], v. 7, n. 3, p. 282–293, 1 jul. 2016. DOI 10.5829/idosi.ijee.2016.07.03.11. Disponível em: https://www.ijee.net/article_64640.html. Acesso em: 18 mar. 2025.

PONNUSAMY, Vinoth Kumar; NGUYEN, Dinh Duc; DHARMARAJA, Jeyaprakash; SHOBANA, Sutha; BANU, J. Rajesh; SARATALE, Rijuta Ganesh; CHANG, Soon Woong; KUMAR, Gopalakrishnan. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 271, p. 462–472, jan. 2019. DOI 10.1016/j.biortech.2018.09.070. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418313233>. Acesso em: 17 mar. 2025.

PRADYAWONG, Sarocha; SHRESTHA, Ruben; LI, Ping; SUN, Xiuzhi Susan; WANG, Donghai. Effect of pH and pH-Shifting on Lignin–Protein Interaction and Properties of Lignin-Protein Polymers. **Journal of Polymers and the Environment**, [*s. l.*], v. 30, n. 5, p. 1908–1919, 1 maio 2022. DOI 10.1007/s10924-021-02319-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02319-8>. Acesso em: 18 mar. 2025.

PRIYADARSHI, Ruchir; GHOSH, Tabli; PUROHIT, Shiv Dutt; PRASANNAVENKADESAN, Varatharajan; RHIM, Jong-Whan. Lignin as a sustainable and functional material for active food packaging applications: A review. **Journal of Cleaner Production**, [*s. l.*], v. 469, p. 143151, set. 2024. DOI

10.1016/j.jclepro.2024.143151. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652624026003>. Acesso em: 17 mar. 2025.

RAJ, Abhay; REDDY, MM Krishna; CHANDRA, Ram. Decolourisation and treatment of pulp and paper mill effluent by lignin-degrading *Bacillus* sp. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 399–406, 2007. DOI 10.1002/jctb.1683. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.1683>. Acesso em: 18 mar. 2025.

RAMMALA, Bame; ZHOU, Nerve. Looking into the world's largest elephant population in search of ligninolytic microorganisms for biorefineries: a mini-review. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 64, 10 jun. 2022. DOI 10.1186/s13068-022-02159-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02159-1>. Acesso em: 17 mar. 2025.

RAVI, Krithika; ABDELAZIZ, Omar Y.; NÖBEL, Matthias; GARCÍA-HIDALGO, Javier; GORWA-GRAUSLUND, Marie F.; HULTEBERG, Christian P.; LIDÉN, Gunnar. Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 56, dez. 2019. DOI 10.1186/s13068-019-1397-8. Disponível em:
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1397-8>. Acesso em: 17 mar. 2025.

RENAULT, Hugues; WERCK-REICHHART, Danièle; WENG, Jing-Ke. Harnessing lignin evolution for biotechnological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 56, p. 105–111, abr. 2019. DOI 10.1016/j.copbio.2018.10.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166918300636>. Acesso em: 17 mar. 2025.

RESE, Morten; VAN ERVEN, Gijs; VEERSMA, Romy J.; ALFREDSEN, Gry; EIJSINK, Vincent G. H.; KABEL, Mirjam A.; TUVENG, Tina R. Detailed Characterization of the Conversion of Hardwood and Softwood Lignin by a Brown-Rot Basidiomycete. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 1063–1074, 10 fev. 2025. DOI 10.1021/acs.biomac.4c01403. Disponível em:
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.4c01403>. Acesso em: 18 mar. 2025.

SAHARAN, Baljeet Singh; KAMAL, Neel; BADONI, Prerana; KUMAR, Ramesh; SAINI, Mayuri; KUMAR, Dharmender; SHARMA, Deepansh; TYAGI, Swati; RANGA, Poonam; PARSHAD, Jagdish; GOYAL, Chhaya; KUMAR, Ravinder; NEHRA, Manju; SETH, Chandra Shekhar; DUHAN, Joginder Singh; MANDAL, Neelam Kumari. Biopolymer and polymer precursor production by microorganisms: applications and future prospects. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 17–30, 2024. DOI 10.1002/jctb.7524. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.7524>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SALVACHÚA, Davinia; KARP, Eric M.; NIMLOS, Claire T.; VARDON, Derek R.; BECKHAM, Gregg T. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 4951–4967, 2 nov. 2015. DOI 10.1039/C5GC01165E. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/gc/c5gc01165e>. Acesso em: 18 mar. 2025.

SAVINOVA, O. S.; CHULKIN, A. M.; MOISEENKO, K. V.; FEDOROVA, T. V. Obtaining a Recombinant Producer of *Trametes hirsuta* Versatile Peroxidase VP2 in *Penicillium canescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 891–899, 1 dez. 2023. DOI 10.1134/S0003683823060121. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0003683823060121>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SHOREY, Rohan; SALAGHI, Ayyoub; FATEHI, Pedram; H. MEKONNEN, Tizazu. Valorization of lignin for advanced material applications: a review. **RSC Sustainability**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 804–831, 2024. DOI 10.1039/D3SU00401E. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/su/d3su00401e>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SHU, Fan; JIANG, Bo; YUAN, Yufeng; LI, Mohan; WU, Wenjuan; JIN, Yongcan; XIAO, Huining. Biological Activities and Emerging Roles of Lignin and Lignin-Based Products—A Review. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 4905–4918, 13 dez. 2021. DOI 10.1021/acs.biomac.1c00805. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00805>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SILVA, Celia C. G.; RIBEIRO, Susana Chaves. Microorganisms and Their Importance in the Food Industry: Safety, Quality and Health Properties. **Foods**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1452, jan. 2024. DOI 10.3390/foods13101452. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/10/1452>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SILVA, Éder Bruno Rebelo da; SILVA, Jamile Andréa Rodrigues da; SILVA, Wellington Conceição da; BELO, Tatiane Silva; SOUSA, Carlos Eduardo Lima; SANTOS, Maria Roseane Pereira dos; NEVES, Kedson Alessandri Lobo; RODRIGUES, Thomaz Cyro Guimarães de Carvalho; CAMARGO-JÚNIOR, Raimundo Nonato Colares; LOURENÇO-JÚNIOR, José de Brito. A Review of the Rumen Microbiota and the Different Molecular Techniques Used to Identify Microorganisms Found in the Rumen Fluid of Ruminants. **Animals**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1448, jan. 2024. DOI 10.3390/ani14101448. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/10/1448>. Acesso em: 18 mar. 2025.

SILVA, Jéssica P.; FREDERICO, Tayná D.; TICONA, Alonso R.P.; PINTO, Otávio H.B.; WILLIAMS, Thomas C.R.; KRÜGER, Ricardo H.; NORONHA, Eliane F. Insights on kraft lignin degradation in an anaerobic environment. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 179, p. 110468, set. 2024. DOI 10.1016/j.enzmictec.2024.110468.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022924000759>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SILVA, Jéssica P.; TICONA, Alonso R. P.; HAMANN, Pedro R. V.; QUIRINO, Betania F.; NORONHA, Eliane F. Deconstruction of Lignin: From Enzymes to Microorganisms. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 2299, jan. 2021. DOI 10.3390/molecules26082299. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2299>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SINGH, Deepak; ZENG, Jijiao; LASKAR, Dhrubojyoti D.; DEOBALD, Lee; HISCOX, William C.; CHEN, Shulin. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 1030–1040, 1 mar. 2011. DOI 10.1016/j.biombioe.2010.11.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953410004125>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SONOKI, Tomonori; IIMURA, Yosuke; MASAI, Eiji; KAJITA, Shinya; KATAYAMA, Yoshihiro. Specific degradation of β -aryl ether linkage in synthetic lignin (dehydrogenative polymerizate) by bacterial enzymes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 produced in recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 429–433, 1 out. 2002. DOI 10.1007/BF00770705. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00770705>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SUMRANWANICH, Thitinun; AMOSU, Esther; CHANKHAMHAENGDECHA, Surang; PHETRUEEN, Tanaporn; LOKTUMRAKS, Wethaka; OUNJAI, Puey; HARNVORAVONGCHAI, Phurt. Evaluating lignin degradation under limited oxygen conditions by bacterial isolates from forest soil. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 13350, 10 jun. 2024. DOI 10.1038/s41598-024-64237-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-64237-8>. Acesso em: 17 mar. 2025.

TOMANI, Per. THE LIGNOBOOST PROCESS. [s. l.], [s. d.]. .

TU, Zhuowei; GENG, Alei; XIANG, Yuhua; ZAYAS-GARRIGA, Anaiza; GUO, Hao; ZHU, Daochen; XIE, Rongrong; SUN, Jianzhong. Lignin Degradation by *Klebsiella aerogenes* TL3 under Anaerobic Conditions. **Molecules**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 2177, jan. 2024. DOI 10.3390/molecules29102177. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/10/2177>. Acesso em: 18 mar. 2025.

VASINA, Daria V.; MOISEENKO, Konstantin V.; FEDOROVA, Tatiana V.; TYAZHELOVA, Tatiana V. Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e0173813, 16 mar. 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0173813. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0173813>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WALLACE, R. John; SASSON, Goor; GARNSWORTHY, Philip C.; TAPIO, Ilma; GREGSON, Emma; BANI, Paolo; HUHTANEN, Pekka; BAYAT, Ali R.; STROZZI, Francesco; BISCARINI, Filippo; SNELLING, Timothy J.; SAUNDERS, Neil; POTTERTON, Sarah L.; CRAIGON, James; MINUTI, Andrea; TREVISI, Erminio; CALLEGARI, Maria L.; CAPPELLI, Fiorenzo Piccioli; CABEZAS-GARCIA, Edward H.; VILKKI, Johanna; PINARES-PATINO, Cesar; FLIEGEROVÁ, Kateřina O.; MRÁZEK, Jakub; SECHOVCOVÁ, Hana; KOPEČNÝ, Jan; BONIN, Aurélie; BOYER, Frédéric; TABERLET, Pierre; KOKOU, Fotini; HALPERIN, Eran; WILLIAMS, John L.; SHINGFIELD, Kevin J.; MIZRAHI, Itzhak. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. **Science Advances**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. eaav8391, 3 jul. 2019. DOI 10.1126/sciadv.aav8391. Disponível em: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.aav8391>. Acesso em: 18 mar. 2025.

WANG, Yun-Yan; MENG, Xianzhi; PU, Yunqiao; J. RAGAUSKAS, Arthur. Recent Advances in the Application of Functionalized Lignin in Value-Added Polymeric Materials. **Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2277, out. 2020. DOI 10.3390/polym12102277. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/10/2277>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WENG, Caihong; PENG, Xiaowei; HAN, Yejun. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 84, dez. 2021. DOI 10.1186/s13068-021-01934-w. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-021-01934-w>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WILHELM, Roland C; SINGH, Rahul; ELTIS, Lindsay D; MOHN, William W. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 413–429, 1 fev. 2019. DOI 10.1038/s41396-018-0279-6. Disponível em: <https://academic.oup.com/ismej/article/13/2/413-429/7475149>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WOO, Hannah L.; BALLOR, Nicholas R.; HAZEN, Terry C.; FORTNEY, Julian L.; SIMMONS, Blake; DAVENPORT, Karen Walston; GOODWIN, Lynne; IVANOVA, Natalia; KYRPIDES, Nikos C.; MAVROMATIS, Konstantinos; WOYKE, Tanja; JANSSON, Janet; KIMBREL, Jeff; DEANGELIS, Kristen M. Complete genome sequence of the lignin-degrading bacterium *Klebsiella* sp. strain BRL6-2. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 19, 8 dez. 2014. DOI 10.1186/1944-3277-9-19. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-19>. Acesso em: 18 mar. 2025.

XIE, Meng; ZHANG, Jin; TSCHAPLINSKI, Timothy J.; TUSKAN, Gerald A.; CHEN, Jin-Gui; MUCHERO, Wellington. Regulation of Lignin Biosynthesis and Its Role in Growth-Defense Tradeoffs. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 9, p. 1427, 28 set. 2018. DOI 10.3389/fpls.2018.01427. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01427/full>. Acesso em: 17 mar. 2025.

XU, Rong; ZHANG, Kai; LIU, Pu; HAN, Huawen; ZHAO, Shuai; KAKADE, Apurva; KHAN, Aman; DU, Daolin; LI, Xiangkai. Lignin depolymerization and utilization by bacteria. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 269, p. 557–566, 1 dez. 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.08.118. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418312227>. Acesso em: 17 mar. 2025.

XU, Zhaoxian; LEI, Peng; ZHAI, Rui; WEN, Zhiqiang; JIN, Mingjie. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 32, dez. 2019. DOI 10.1186/s13068-019-1376-0. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1376-0>. Acesso em: 17 mar. 2025.

XU, Zhaoxian; QIN, Ling; CAI, Mufeng; HUA, Wenbo; JIN, Mingjie. Biodegradation of kraft lignin by newly isolated *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, and *Ochrobactrum tritici* strains. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 25, n. 14, p. 14171–14181, 1 maio 2018. DOI 10.1007/s11356-018-1633-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-1633-y>. Acesso em: 18 mar. 2025.

YADAV, Sandhya; SRIVASTAVA, Akanksha; BISWAS, Subhankar; CHAURASIA, Neha; SINGH, Sushil Kumar; KUMAR, Sanjiv; SRIVASTAVA, Vaibhav; MISHRA, Yogesh. Comparison and optimization of protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis protocols for liverworts. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 60, 7 fev. 2020. DOI 10.1186/s13104-020-4929-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4929-1>. Acesso em: 18 mar. 2025.

YADAV, Virendra Kumar; GUPTA, Nitin; KUMAR, Pankaj; DASHTI, Marjan Ganjali; TIRTH, Vineet; KHAN, Samreen Heena; YADAV, Krishna Kumar; ISLAM, Saiful; CHOUDHARY, Nisha; ALGAHTANI, Ali; BERA, Sweta Parimita; KIM, Do-Hyeon; JEON, Byong-Hun. Recent Advances in Synthesis and Degradation of Lignin and Lignin Nanoparticles and Their Emerging Applications in Nanotechnology. **Materials**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 953, jan. 2022. DOI 10.3390/ma15030953. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/3/953>. Acesso em: 17 mar. 2025.

ZAINITH, Surabhi; PURCHASE, Diane; SARATALE, Ganesh Dattatraya; FERREIRA, Luiz Fernando R.; BILAL, Muhammad; BHARAGAVA, Ram Naresh. Isolation and characterization of lignin-degrading bacterium *Bacillus aryabhatai* from pulp and paper mill wastewater and evaluation of its lignin-degrading potential. **3 Biotech**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 92, 19 fev. 2019a. DOI 10.1007/s13205-019-1631-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1631-x>. Acesso em: 18 mar. 2025.

ZHANG, Kun; LI, Jingfa; WANG, Zhen; XIE, Bohan; XIONG, Zixiang; LI, Hongyi; AHMED, Mehboob; FANG, Fang; LI, Jiakui; LI, Xiang. Cloning, expression and application of a novel laccase derived from water buffalo ruminal lignin-degrading bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 266, p. 131109, 1 maio 2024. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2024.131109. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813024019147>. Acesso em: 18 mar. 2025.

ZHANG, Qing; ZHANG, Jing; ZHAO, Shuai; SONG, Peizhi; CHEN, Yanli; LIU, Pu; MAO, Chunlan; LI, Xiangkai. Enhanced Biogas Production by Ligninolytic Strain *Enterobacter hormaechei* KA3 for Anaerobic Digestion of Corn Straw. **Energies**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 2990, jan. 2021. DOI 10.3390/en14112990. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1073/14/11/2990>. Acesso em: 18 mar. 2025.

ZHANG, Wen; LIU, Z. Isolation and Performance Study of a Novel Lignin-degrading Strain. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, [s. l.], n. 4, 18 jan. 2022. DOI 10.15255/CABEQ.2021.1939. Disponível em: <http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/assets/Uploads/07-4-2021.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2025.

ZHAO, Yong; SHAKEEL, Usama; SAIF UR REHMAN, Muhammad; LI, Hongqiang; XU, Xia; XU, Jian. Lignin-carbohydrate complexes (LCCs) and its role in biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 253, p. 120076, 20 abr. 2020. DOI 10.1016/j.jclepro.2020.120076. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652620301232>. Acesso em: 17 mar. 2025.

ZHOU, Man; WANG, Yaru; WANG, Yuan; TU, Tao; ZHANG, Jie; WANG, Xiaolu; ZHANG, Guijie; HUANG, Huoqing; YAO, Bin; LUO, Huiying; QIN, Xing. Sequential pretreatment with hydroxyl radical and manganese peroxidase for the efficient enzymatic saccharification of corn stover. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 136, 18 nov. 2024. DOI 10.1186/s13068-024-02583-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02583-5>. Acesso em: 17 mar. 2025.

ZHU, Daochen; ZHANG, Peipei; XIE, Changxiao; ZHANG, Weimin; SUN, Jianzhong; QIAN, Wei-Jun; YANG, Bin. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 44, dez. 2017. DOI 10.1186/s13068-017-0735-y. Disponível em: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-017-0735-y>. Acesso em: 18 mar. 2025.

ZHU, Weizhen; THELIANDER, Hans. Precipitation of Lignin from Softwood Black Liquor: An Investigation of the Equilibrium and Molecular Properties of Lignin. [s. l.], [s. d.]. .

ZIJLSTRA, Douwe S.; LAHIVE, Ciaran W.; ANALBERS, Coen A.; FIGUEIRÊDO, Monique B.; WANG, Zhiwen; LANCEFIELD, Christopher S.; DEUSS, Peter J. Mild Organosolv Lignin Extraction with Alcohols: The Importance of Benzylic Alkoxylation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 13, p. 5119–5131, 6 abr. 2020. DOI 10.1021/acssuschemeng.9b07222. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07222>. Acesso em: 18 mar. 2025.