



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Análise da degradação anaeróbica de lignina por bactérias ruminais

Jéssica Pinheiro Silva

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

Brasília, DF
Abril de 2023



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Análise da degradação anaeróbica de lignina por bactérias ruminais

Jéssica Pinheiro Silva

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

Tese apresentada à Universidade de Brasília
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular para
obtenção do título de Doutor.

Brasília, DF
Abril de 2023

Análise da degradação anaeróbica de lignina por bactérias ruminais

Jéssica Pinheiro Silva

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

Tese apresentada à Universidade de Brasília
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular para
obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora:

- ✓ **Membro interno:** Dr^a. Tatiana Amabile de Campos (UnB).
- ✓ **Membro externo:** Dr^a Dasciana de Sousa Rodrigues (Embrapa).
- ✓ **Membro externo:** Dr^a. Renata Henrique Santana (IFB).
- ✓ **Suplente:** Dr. Pedro Ricardo Vieira Hamann (USP).

Brasília, DF
Abril de 2023

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado me protegendo e confortando nos momentos difíceis.

À minha família por todo amor, suporte e incentivo.

À Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha, pela confiança e acolhimento.

Ao Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, por ter me recebido em seu laboratório e possibilitado a realização das análises de CG/MS.

À Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha, ao Dr. Pedro Ricardo Vieira Hamann e ao Dr. Alonso Roberto Poma Ticona pela parceria na publicação do artigo de revisão “*Deconstruction of Lignin: From Enzymes to Microorganisms*” na revista *Molecules*.

À Tayná e ao Otávio, por me ajudarem a analisar e interpretar os meus dados.

Às amigas que fiz no Laboratório de Enzimologia.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular

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).

Epígrafe

“A coisa mais linda que podemos experimentar é o mistério. É a fonte de toda arte e toda ciência”.

Albert Einstein

Sumário

Lista de abreviaturas e Símbolos	10
Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
CAPÍTULO 1.....	15
1. Referencial Teórico	16
1.1. Estrutura e Composição de Lignina Natural	16
1.2. Extração de lignina da parede celular vegetal	17
1.3. Degradação aeróbica de lignina por bactérias	19
1.3.1. Enzimas envolvidas na desconstrução de lignina	19
1.3.2. Catabolismo de compostos aromáticos derivados de Lignina	21
1.3.2.1. Vias de afunilamento	21
1.3.2.2. Vias de clivagem de anéis aromáticos	25
1.4. Degradação anaeróbica de lignina por bactérias	29
1.5. Consórcios microbianos e abordagens metagenômicas	31
2. Justificativa	33
3. Objetivos	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
CAPÍTULO 2.....	35
1. Introduction	37
2. Materials and Methods	38
2.1. Establishment of microbial consortia	38
2.2. Decolorization analysis	39
2.3. SEM and FTIR	40
2.4. GC/MS for Metabolite identification	40
2.5. Description of bacteria community	41
2.5.1. Data processing	41
3. Results	42
3.1. Growth curve and decolorization analysis of lignin of the culture medium by consortia KLY and KL	42
3.2. SEM and FTIR analysis	43

3.3.	Analysis of lignin degradation by GC/MS	45
3.4.	Diversity of microbial consortia	48
3.5.	Composition of Microbial Consortia	49
3.6.	Functional predictions	51
4.	Discussion.....	52
4.1.	Kraft lignin decolorization	52
4.2.	Morphology and chemical groups of Kraft lignin after treatment with consortia	53
4.3.	Lignin degradation products.....	53
4.4.	Diversity and taxonomic affiliation of KLY and KL consortia.....	55
4.5.	Functional profile of consortia	56
5.	Conclusions	56
	Supporting information	58
	References	63
	CAPÍTULO 3.....	70
1.	Introdução.....	71
2.	Material e Métodos.....	72
2.1.	Isolamento de bactérias	72
2.2.	Curva de crescimento e medição de redução de cor	72
2.3.	Identificação dos isolados bacterianos através do 16S rRNA	73
3.	Resultados	74
3.1.	Isolamento de bactérias	74
3.2.	Análise do crescimento e descoloração do meio de cultivo	75
3.3.	Identificação taxonômica	76
4.	Discussão	77
5.	Conclusão	78
	Conclusão geral	79
	Perspectivas Gerais	80
	Referências.....	81
	APÊNDICE I	94
	APÊNDICE II.....	95

Lista de abreviaturas e Símbolos

TL - Lignina Técnica

LiP - Lignina Peroxidases

MnP - Manganês Peroxidase

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

OD - Densidade ótica

GC - MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

NIST- *National Institute of Standards and Technology*

EC - *Enzyme Commission*

MetaCyc - *MetaCyc Metabolic Pathways Database*

ASV - *Amplicon Sequence Variants*

KLY – consórcios cultivados em meio líquido contendo lignina kraft e extrato de levedura como fonte de carbono

KL – consórcios cultivados em meio líquido contendo lignina kraft como fonte de carbono

CR - microbiota ruminal bovina

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NGS Illumina - *Next Generation Sequencing*

UV – Ultravioleta

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

PHA - Polihidroxialcanoatos

RT- Tempo de Retenção

TMS – *Trimethylsilyl*

MSTFA – *N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*

CPPA - *Canadian Pulp and Paper Association*

Resumo

A lignina é um dos principais componentes da biomassa de lignocelulose podendo corresponder a ~35% de sua composição. Essa macromolécula é considerada a principal fonte de compostos aromáticos na natureza. Além da lignina natural, essa estrutura é gerada como um subproduto residual de processos industriais, como o de polpação, e normalmente é destinada para a combustão para produção de energia. A utilização de lignina como matéria prima para produzir produtos de interesse industrial como a vanilina, guaiacol e o fenol poderia contribuir para a implementação de biorrefinarias. A lignina precisa ser desconstruída antes que possa ser convertida em bioprodutos com alto valor agregado. Os fungos de podridão branca e diferentes gêneros de bactérias aeróbicas são descritos como os principais degradadores de lignina na natureza. As bactérias também são capazes de desconstruir a lignina anaerobicamente, no entanto os mecanismos empregados são pouco conhecidos. Neste sentido, o presente trabalho explorou o potencial das bactérias do rúmen de bovinos em desconstruir anaerobicamente a lignina. Para isso, amostras líquidas do rúmen foram inoculadas em meios de cultura contendo lignina kraft como fonte de carbono com ou sem adição de extrato de levedura a 37 °C durante quatro dias, sob atmosfera anaeróbia durante cinco passagens. Os consórcios obtidos através dessas passagens foram capazes de descolorir os meios de cultivo, onde a descoloração máxima para o consórcio cultivado com lignina kraft e extrato de levedura como fonte de carbono (KLY) foi de 40% e 29% para o consórcio obtido usando apenas lignina kraft (KL) como fonte de carbono. As análises SEM, FTIR e GC-MS indicaram modificações na estrutura da macromolécula de lignina e a presença de compostos aromáticos relacionados a sua degradação como o fenol, ácido hidrocínâmico, álcool homovanílico e ácido vanilmandélico. As análises de diversidade e de taxonomia, baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA, indicaram diminuição da diversidade bacteriana e o enriquecimento de membros do gênero de *Dickeya* nos consórcios KLY e KL em comparação com a microbiota do rúmen. Além disso, um notável número de ASVs bacterianas classificadas como desconhecidas foram identificadas sugerindo a presença de gêneros de bactérias ainda não descritas relacionadas à degradação de lignina. A análise de predição funcional inferiu a presença de oito vias metabólicas relacionadas à metabolização da lignina nos consórcios KLY e KL. Bactérias foram isoladas a partir desses consórcios em meios sólidos contendo lignina kraft como fonte de carbono, no entanto não foram capazes de crescer e descolorir os meios de cultura líquido na ausência de glicose.

Palavras-chave: Consórcios ruminais, Lignina kraft, Degradação anaeróbica de lignina, Diversidade bacteriana.

Abstract

Lignin is one of the main components of lignocellulose biomass corresponding to ~35% of its composition. This macromolecule is considered the main source of aromatic compounds in nature. In addition to natural lignin, this structure is generated as a residual by-product of industrial processes, as pulping, and is normally destined for combustion for energy production. Lignin utilization as a raw material to produce products of industrial interest such as vanillin, guaiacol, and phenol could contribute to the implementation of biorefineries. Lignin needs to be deconstructed before being transformed into bioproducts with high-added value. White-root fungi and different genera of aerobic bacteria are known as the main degraders of lignin in nature. Bacteria are also able to deconstruct lignin anaerobically, however, the process is still poorly understood. In this sense, the present work explored the potential of bovine rumen bacteria to anaerobically deconstruct lignin. For this, rumen liquid samples were inoculated in culture media containing kraft lignin as a carbon source with or without the addition of yeast extract at 37 °C for four days, under an anaerobic atmosphere for five passages. The consortia obtained through these passages were able to decolorize the culture media, and the maximum decolorization for the consortium cultivated with kraft lignin and yeast extract as a carbon source (KLY) was 40% and 29% for the consortium using lignin kraft (KL) as a carbon source. SEM, FTIR, and GC-MS analyses indicated changes in lignin structure and the presence of aromatic compounds related to lignin degradation such as phenol, hydrocinnamic acid, homovanil alcohol, and vanilmandelic acid. Diversity and taxonomy analyses based on barcoding sequencing (16S rRNA gene) indicated a decrease in bacterial diversity and enrichment of members of the genus *Dickeya* in the consortia KLY and KL compared to the rumen microbiota. Furthermore, a remarkable number of bacterial ASVs classified as Unknown were identified suggesting the presence of yet undescribed bacterial genera related to lignin degradation. Functional prediction analysis inferred the presence of eight metabolic pathways related to lignin metabolism in the KLY and KL consortia. Bacteria were isolated from these consortiums on solid media containing kraft lignin as a carbon source. However, they were unable to grow and decolorize liquid culture media without glucose.

Keywords: Ruminal consortia, Kraft lignin, Anaerobic degradation of lignin, Bacterial diversity.

Introdução

A biomassa de lignocelulose é o recurso renovável mais abundante na natureza, e o interesse em sua conversão em biocombustíveis e produtos químicos tem crescido devido à sua potencial aplicação em biorrefinarias. A lignocelulose é composta principalmente de celulose (38-50%), hemicelulose (23-32%) e lignina (15-35%) [1,2]. A celulose e a hemicelulose podem ser degradadas em monossacarídeos por hidrólise enzimática e fermentadas em diferentes bioprodutos como álcoois, ácidos orgânicos e ácidos graxos [3,4]. Em todo o mundo, atualmente a lignina é obtida principalmente como um subproduto na indústria de polpação (papel e celulose) e geralmente é direcionada para a geração de vapor e eletricidade [5,6].

Anualmente as indústrias de polpação produzem cerca de 130 milhões de toneladas de lignina em todo o mundo [7]. No Brasil, um dos principais produtores mundiais de celulose, no ano de 2016 foram produzidas aproximadamente 11,83 toneladas de lignina kraft [8]. A lignina representa uma fonte potencial de compostos aromáticos renováveis, e a sua utilização como matéria-prima para produzir compostos com valor agregado como o guaiacol e o fenol poderia impulsionar a competitividade de custos das biorrefinarias de lignocelulose [9].

Os Fungos e bactérias são os principais degradadores de lignina na natureza e já foram identificados em diferentes habitats, como solo, madeira em decomposição, estações de tratamento de águas residuais, lodo, e trato gastrointestinal de herbívoros [7,10–13]. Fungos, basidiomicetos de podridão branca apresentam maior eficiência de degradação. No entanto, as bactérias têm atraído cada vez mais atenção devido à sua alta adaptabilidade e versatilidade bioquímica. Além disso, possuem vias metabólicas que convertem a lignina e seus derivados aromáticos em produtos de interesse biotecnológico como lipídeos, ácido láctico, piruvato e vanilina [9,14,15].

O rúmen de bovinos é um ambiente microaerófilo que hospeda uma microbiota diversa, e as bactérias em especial são altamente especializadas na degradação da lignocelulose [16,17]. Embora o papel dessas bactérias na desconstrução da lignina seja pouco explorado, Beloqui et al. (2006) [18] caracterizaram funcionalmente uma polifenol oxidase, com

atividade de lacase, de origem bacteriana derivada do rúmen de bovinos. Indicando assim, que possivelmente esse microambiente possa ser uma fonte de bactérias com atividade lignolítica.

O enriquecimento de culturas para o estabelecimento de consórcios microbianos utilizando a lignina como principal fonte de carbono auxilia na identificação de grupos de microrganismos com funções bioquímicas similares, além de diminuir a complexidade funcional de comunidades naturais como o rúmen [19]. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo explorar o potencial de consórcios bacterianos anaeróbicos na desconstrução e metabolização de lignina. Para isso, amostras do rúmen de bovinos foram inoculadas em meios de cultivo contendo lignina kraft como fonte de carbono a 37 °C por quatro dias, sob condições anaeróbicas durante cinco passagens. A identificação das bactérias enriquecidas nestas condições foi feita por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA, e a capacidade dos consórcios de degradar e metabolizar lignina kraft foi avaliada por análises SEM, FTIR e GC-MS. Além da análise dos consórcios microbianos, foi realizado também o isolamento de bactérias a partir destes consórcios, assim como a avaliação do consumo de lignina kraft.

Este trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo encontra-se o referencial teórico. No segundo capítulo é apresentado um artigo da tese que está em fase final de preparação para submissão, que descreve a diversidade e a composição bacteriana de consórcios microbianos enriquecidos após o cultivo de amostras de rúmen de bovinos em meio contendo lignina kraft, e análise dos produtos gerados. E por fim, terceiro capítulo aborda o isolamento e identificação de bactéria a partir dos consórcios microbianos obtidos.

CAPÍTULO 1.
Referencial Teórico

1. Referencial Teórico

1.1. Estrutura e Composição de Lignina Natural

A lignina desempenha um papel importante nas plantas, pois fornece suporte estrutural, assim como, resistência a ataques microbianos e decomposição da parede celular, [1,20]. A macromolécula da lignina é uma estrutura reticulada e irregular que é formada principalmente pelo acoplamento de três unidades de fenilpropano: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G), siringil (S), derivadas dos precursores álcool *p*-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil, respectivamente. As ligações entre essas unidades podem ser feitas através de ligações éter (β -O-4, 4-O-5) ou ligações carbono-carbono (5-5, β -5, β - β , β -1) geralmente chamadas de ligações condensadas (Figura 1) [21–23].

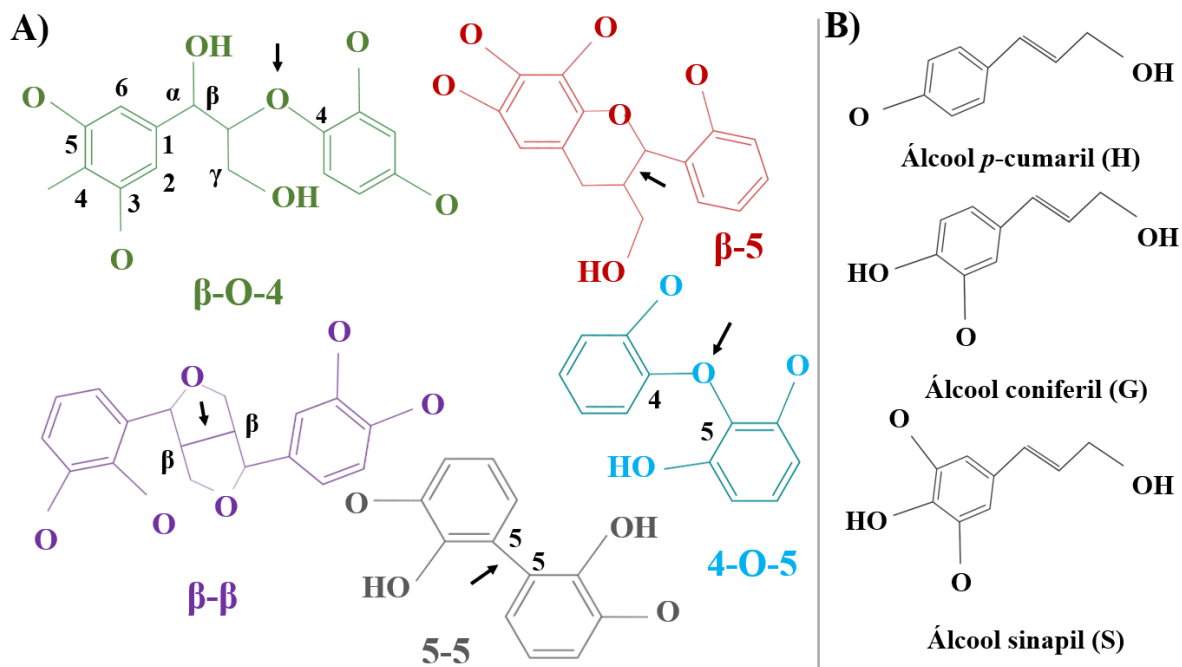


Figura 1. Ligações típicas encontradas na estrutura da lignina natural; ligações éter (β -O-4, 4-O-5) e ligações condensadas (5-5, β -5, β - β) (A). Estruturas químicas dos três precursores monoméricos da macromolécula lignina (B).

De acordo com a proporção e abundância das unidades de fenilpropano, a lignina pode ser classificada em três grupos principais: ligninas de madeira macia, madeira dura e gramíneas. As ligninas de madeira macias são compostas principalmente por unidades guaiacil e são classificadas como ligninas do tipo G. As ligninas de madeira duras contêm majoritariamente diferentes proporções de guaiacil-siringil (tipo GS) [24,25]. As ligninas de gramíneas têm uma mistura das três unidades aromáticas (HGS) [26]. As madeiras macias possuem o maior teor de lignina que são de 24 a 33%, seguidas pelas madeiras duras que possuem de 19 a 28% e pelas gramíneas com 15 a 25% [27].

1.2. Extração de lignina da parede celular vegetal

A biomassa de lignocelulose requer pré-tratamento antes do processamento em produtos de interesse industrial, pois essa etapa torna a celulose e a hemicelulose mais acessíveis a tratamentos químicos ou biológicos. Os pré-tratamentos incluem métodos físicos, químicos e físico-químicos, que resultam em um resíduo líquido conhecido como licor negro, composto principalmente por lignina, carboidratos e cinzas. As ligninas geradas à partir desses procedimentos são denominadas como ligninas técnicas [28–30].

Os métodos de processamentos mais comumente utilizados como o kraft, lignosulfonato e organosolv (Tabela 1), produzem ligninas com diferentes propriedades em termos de estrutura, perfil de impurezas e peso molecular [31,32].

Tabela 1. Principais tipos de pré-tratamentos utilizados para extrair a lignina da biomassa de lignocelulose.

Pré-tratamento	Metodologia	Características da Lignina	Referências
Kraft	NaOH e Na ₂ S (150–180 °C)	> Grupos hidroxila fenólicos > C-C > Fração insolúvel	[30–33]
Lignosulfonatos	SO ₃ ²⁻ e HSO ₃ ⁻	+ Grupos hidroxila carboxílicos, sulfurosos e	[34]

		fenólicos	
		> Solubilidade em água	
Organosolv	Solventes orgânicos e água (190 °C)	> Peso molecular < Alterações estruturais > Pureza química < Solubilidade em água < Peso molecular	[35,36]

O método de polpação Kraft foi introduzido pela primeira vez em 1879 e se tornou a tecnologia mais usada na indústria de polpação. Nesse método é usado uma mistura de solução de hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S) em altas temperaturas (150–180 °C), que causa a quebra de ligações éter presentes na estrutura da lignina através de um intermediário de epissulfeto. Durante o cozimento, a lignina é degradada em fragmentos de diferentes pesos moleculares e é dissolvida no licor de polpação. Após a separação da celulose por filtração, a lignina e a hemicelulose remanescentes no licor negro podem ser utilizadas em processos industriais [31–33].

Devido a clivagem de ligações β-aril durante o processo de cozimento, ocorre um aumento significativo de grupos hidroxila fenólicos na estrutura da lignina. Além disso, novas ligações condensadas C-C são formadas entre os fragmentos da lignina como resultado das severas condições do procedimento. As ligações C–C, como as ligações β–β e β–5, são mais difíceis de romper do que as ligações C–O (ligações β-aril éter). O grau de condensação da lignina é importante, pois afeta a recuperação da lignina após o pré-tratamento da biomassa [30–33].

Em um processo semelhante, conhecido como Lignoboost, a lignina é isolada do licor negro por meio de adição de dióxido de carbono (CO₂) ao licor, e em seguida ocorre a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e, finalmente, a lignina é isolada por filtração. Em comparação ao processamento Kraft, nesta metodologia é utilizada uma quantidade menor de sulfeto e sódio, o que acaba diminuindo os custos operacionais [36,37]. Os Lignosulfonatos derivam de processos de polpação de sulfito, no qual ocorre a adição de sulfito (SO₃²⁻) e bissulfito (HSO₃⁻) à biomassa de lignocelulose. Através desse processo a lignina é sulfonada e

solubilizada. Os lignossulfonatos contêm muitos grupos funcionais, como grupos hidroxila carboxílicos, sulfurosos e fenólicos. Além disso, apresenta características físicas e químicas distintas, como solubilidade em água e peso molecular relativamente alto [34].

No pré-tratamento Organosolv podem ser utilizados vários solventes orgânicos como etanol, ácido fórmico, ácido acético e ácidos peroxiorgânicos como agentes deslignificantes. Uma mistura de solvente orgânico, água e biomassa é cozida em altas temperaturas (190 °C) e em seguida a lignina é separada via solubilização. Por ser obtida por meio de um processo menos agressivo, a estrutura da lignina Organosolv é menos modificada em relação as outras ligninas industriais. Além disso, possuem baixo peso molecular, alta pureza química, e apresentam baixa solubilidade em água [35,36].

1.3. Degradação aeróbica de lignina por bactérias

O processo de desconstrução de lignina em procariotos não é amplamente estudado quando comparado com os fungos, no entanto várias cepas bacterianas dentro dos filos Actinomicetos e das Proteobactérias são conhecidas como conversoras de lignina. Dentre estas encontram-se bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Bacillus* [38–40]. De modo geral, para o processo de desconstrução de lignina as bactérias secretam enzimas ligninolíticas oxidativas como lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase. A ação dessas enzimas gera um conjunto de compostos aromáticos de baixo peso molecular, que posteriormente podem ser transportados através da membrana celular e convertidos em produtos alvo através de vias metabólicas [41].

1.3.1. Enzimas envolvidas na desconstrução de lignina

As lacases (E.C 1.10.3.2) pertencem à superfamília de proteínas oxidases de multi-cobre e possuem quatro íons de cobre distribuídos pelos seus sítios ativos T1 e T2/T3. O substrato é oxidado no sítio T1 e os elétrons são transferidos para os sítio T2/T3 (que contém um íon de cobre no T2 e dois íons de cobre no T3), onde ocorre a redução do oxigênio molecular à água (Figura 2A) [42,43]. As lacases oxidam uma ampla variedade de substratos fenólicos e não fenólicos. Ao oxidar os substratos fenólicos o radical livre fenoxil é formado como um

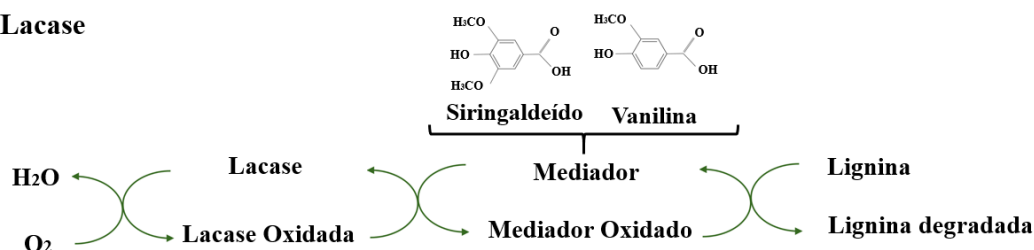
intermediário instável, que então promove a oxidação de C α , clivagem de alquil-aril e clivagem C α -C β . As lacases precisam da presença de mediadores, que são moléculas pequenas que agem como transportadores intermediários de elétrons, para atuar na degradação de unidades não fenólicas presentes na lignina, que normalmente têm maior potencial redox do que as lacases. Os compostos não fenólicos acoplados a mediadores podem promover a clivagem de anéis aromáticos, C α -C β e éter β , além da oxidação de C α . Os mediadores aumentam a capacidade de oxidação das lacases e ajudam a superar o impedimento estérico existente entre a lacase e o substrato. O seringaldeído e a vanilina são exemplos de mediadores naturais podem estar presentes em ligninas técnicas [44–46].

As ligninas peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14) são heme-proteínas pertencentes à superfamília peroxidase-catalase e o seu mecanismo de ação depende da presença de H₂O₂. O ciclo catalítico inicia-se com a oxidação do ferro (III), presente na enzima, a ferro (IV) pelo H₂O₂ resultando na formação do intermediário composto I oxo-ferril, radical catiônico da LiP. Em seguida o intermediário oxo-ferril (deficiente de 2e⁻) é reduzido por uma molécula de substrato, como substratos aromáticos não fenólicos, formando assim o segundo intermediário, composto II (deficiente de 1e⁻), a última etapa envolve a doação subsequente de um segundo elétron ao composto II pelo substrato reduzido, e a enzima retorna a seu estado natural, concluindo o ciclo de oxidação (Figura 2B). Compostos fenólicos como o guaiacol, acetosiringona, catecol, álcool vanílico e ácido siringico são suscetíveis aos potenciais oxidativos da LiP [47–49].

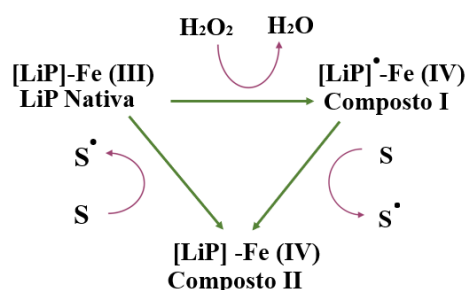
Semelhante a LiP, a manganês peroxidases (MnP; E.C 1.11.1.13) é uma heme-proteína e o processo de desconstrução de lignina por essa enzima inclui etapas de oxidação e redução (Figura 2C). Para que o processo de catálise ocorra as MnPs requerem o uso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como doador de elétrons e o Mn²⁺ como mediador para manter a sua atividade. O ciclo de catálise inicia-se com a ligação do H₂O₂ com o ferro presente no grupo heme da MnP. Em seguida, a MnP oxida o Mn²⁺ a Mn³⁺ na presença de quelantes. O Mn³⁺ gerado pode oxidar fenóis monoméricos e diméricos, catalisar a clivagem das ligações C α -C β , oxidar o C α de estruturas lignolíticas. Os quelantes de ácidos orgânicos podem estabilizar a enzima e estimular a sua atividade enzimática [41,50,51]. Além das oxidases clássicas outras enzimas como álcool oxidase, Glioxal oxidase, superóxido dismutase de manganês e

β -eterase podem estar envolvidas no processo de desconstrução de lignina. A álcool oxidase e a Glioxal oxidase são enzimas auxiliares que fornecem peróxido de hidrogênio para a ação das peroxidases [52]. A superóxido dismutase cliva ligações aril-C α e C α -C β presentes na estrutura da lignina [41]. As β -eterases clivam as ligações β -aril éter e bifenil [19].

A) Lacase



B) Lignina Peroxidase



C) Manganês Peroxidase

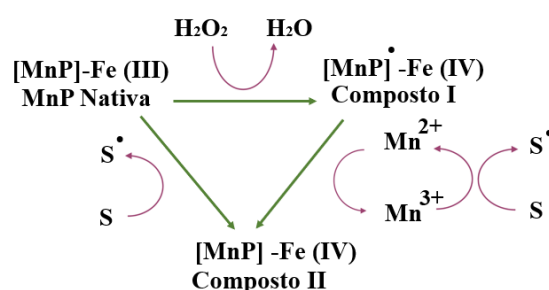


Figura 2. Mecanismo catalítico da degradação de lignina mediado por (A) lacase, (B) lignina peroxidase (LiP), (C) manganês peroxidase (MnP).

1.3.2. Catabolismo de compostos aromáticos derivados de Lignina

Após a degradação enzimática da molécula de lignina são geradas principalmente as três categorias de monolignóis (lignina-H, lignina-G e lignina-S). O catabolismo desses compostos primeiro passa pelas “vias superiores”, que são vias de afunilamento para produzir intermediários aromáticos centrais, como protocatecuato, catecol e ácido 3-O-metilgálico (3MGA) ou ácido gálico [53].

1.3.2.1. Vias de afunilamento

Os derivados de lignina-H, são comumente representados pelo ácido *p*-cumárico e outros ácidos hidroxicinâmicos. Geralmente, o ácido *p*-cumárico pode ser degradado pela via de β -

oxidação dependente de CoA, pela via não β -oxidação dependente de CoA e a via de descarboxilação. Essas três convergem para a formação do ácido protocatecuico (Figura 3).

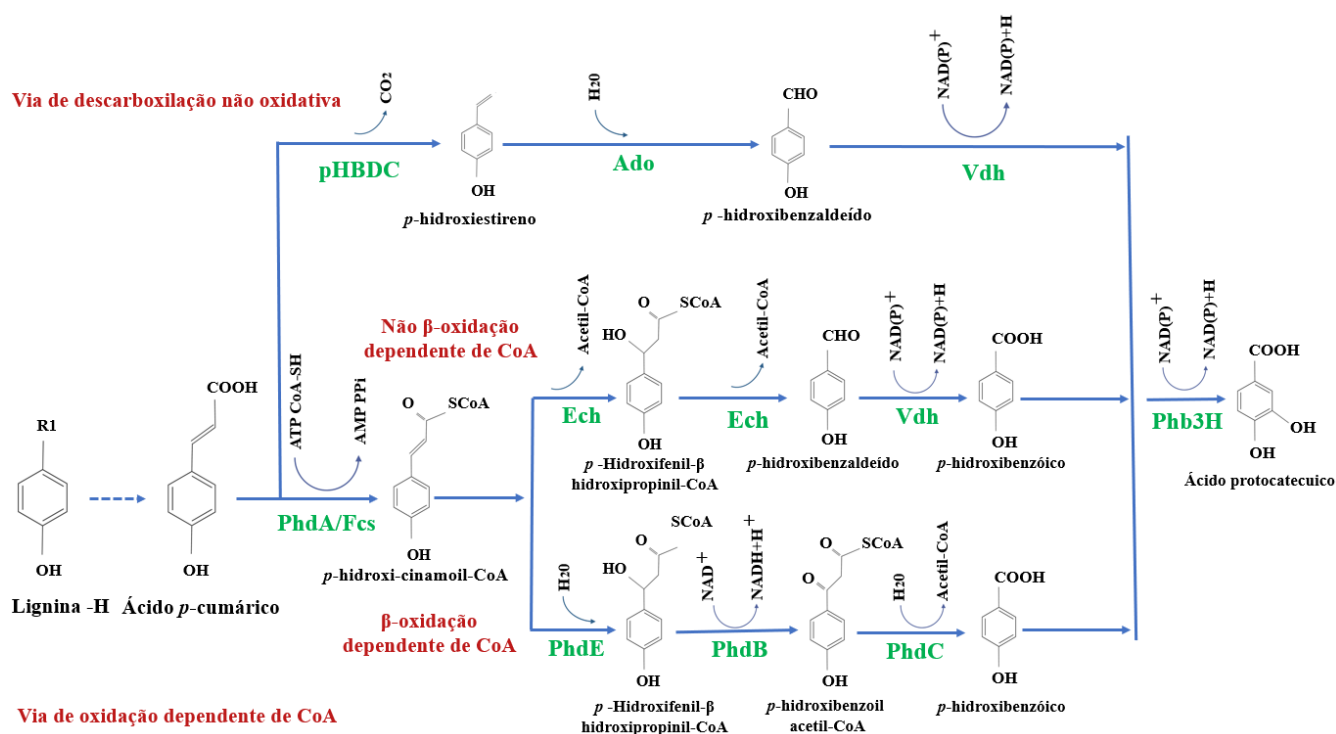


Figura 3. Catabolismo de derivados de lignina-H, representados pelo ácido *p*-cumárico, através das vias de β -oxidação dependentes de CoA e não β -oxidação dependente de CoA. PhdA (*p*-hidroxicinamoil-CoA sintetase); PhdE (enoil-CoA hidratase); PhdB (3-hidroxiacil-CoA desidrogenase); PhdC (3-oxoacil-CoA cetohidrolase); Fcs (acil-CoA sintetase); Ech (enoil-CoA hidratase); vdh (por vanilina desidrogenase); pobA (4-hidroxibenzoato 3-monooxigenase); pHBDC (*p*-hidroxicinâmico descarboxilase); Ado (dioxigenase aromática); phb3H (*p*-hidroxibenzoato-3-hidroxilase)

A via de β -oxidação dependente de CoA de ácido *p*-cumárico começa com uma ligação de CoA, que é catalisada pela *p*-hidroxicinamoil-CoA sintetase (PhdA) formando tioésteres de hidroxicinamoil-CoA. Subsequentemente, esse composto é hidratado por uma enoil-CoA hidratase (PhdE) e oxidado por 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (PhdB) produzindo *p*-hidroxibenzoil acetil-CoA, que é então hidrolisado por uma 3-oxoacil-CoA cetohidrolase (PhdC)

produzindo *p*-hidroxibenzóico e acetil-CoA [54,55]. Na via de não β -oxidação dependente de CoA as duas primeiras etapas são similares a da via de β -oxidação dependente de CoA, as enzimas acil-CoA sintetase (Fcs) e enoil-CoA hidratase (Ech) atuam no ácido *p*-cumárico e formam um grupo hidroxila. O grupo hidroxila pode ser diretamente clivado por Ech para formar *p*-hidroxibenzaldeído e acetil-CoA. Em seguida o *p*-hidroxibenzaldeído é catalisado por vanilina desidrogenase (vdh) e 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenase (pobA) gerando o protocatecuato [56]. E por fim, na via de descarboxilação o ácido *p*-cumárico é descarboxilado por uma ácido *p*-hidroxicinâmico descarboxilase (pHBDC) e produz *p* hidroxiestireno e CO₂, que em seguida é catalisado por uma dioxigenase aromática (Ado) gerando *p*-hidroxibenzaldeído. Esse composto e então convertido em protocatecuato pela *p*-hidroxibenzoato-3-hidroxilase (phb3H) [57,58].

O ácido ferúlico é normalmente considerado o modelo típico de monômeros de lignina do tipo G e as vias envolvidas em sua degradação incluem a incluindo β -oxidação dependente de CoA, descarboxilação não oxidativa e redução da cadeia lateral. Através dessas três vias o ácido ferúlico pode ser convertido no intermediário ácido vanílico posteriormente transformado em ácido protocatecuico (Figura 4).

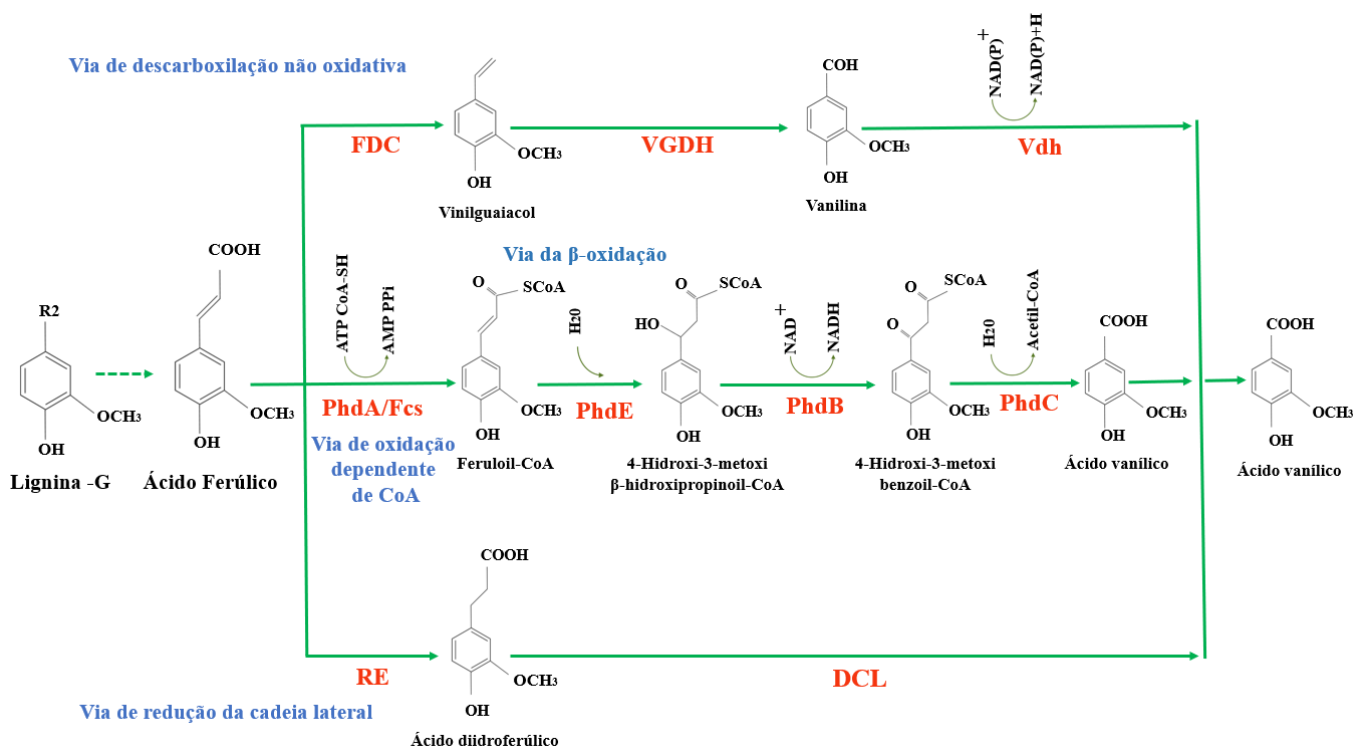


Figura 4. Catabolismo de derivados de lignina-G, representados pelo ácido ferúlico, através das vias de β -oxidação dependente de CoA, descarboxilação não oxidativa e redução da cadeia

lateral. PhdA (*p*-hidroxicinamoil-CoA sintetase); PhdE (enoil-CoA hidratase); PhdB (3-hidroxiacil-CoA desidrogenase); PhdC (3-oxoacil-CoA cetohidrolase); FDC (ácido ferúlico descarboxilase); VGDH (4-vinilguaiacol desidrogenase); RE redutase (aromática); DCL (descarboxilase).

Na via de β -oxidação dependente de CoA o ácido ferúlico é convertido em feruloil-CoA por PhdA, que é posteriormente catalisado pelas enzimas PhdE, PhdB e PhdC gerando ácido vanílico e acetil-CoA [59]. Na via de descarboxilação não oxidativa, o ácido ferúlico é cataliticamente descarboxilado pela ácido ferúlico descarboxilase (FDC) para produzir 4-vinilguaiacol, que é posteriormente convertido por uma 4-vinilguaiacol desidrogenase (VGDH) em vanilina [60]. Já na via de redução da cadeia lateral o ácido ferúlico é reduzido pela redutase aromática (RE) para formar o ácido diidroferúlico e posteriormente catalisado por uma descarboxilase (DCL) para formar o ácido acético e o ácido vanílico [61].

Para os aromáticos derivados de lignina do tipo S, ácido siríngico, a degradação inicia-se com uma O-desmetilação catalisada por uma O-demetilase dependente de tetrahydrofolato (DesA) para produzir 3-O-metilgalato (3MGA). Em seguida por uma outra, o 3MGA pode ser catabolizado por duas vias: assimilação e degradação. Na via de assimilação, 3MGA é O-desmetilado por vanilato/ácido 3-O-metilgálico O-desmetilase (LigM) para produzir ácido gálico. Na via de degradação do ácido siríngico, 3MGA e ácido gálico são dois intermediários centrais (Figura 5) [62].

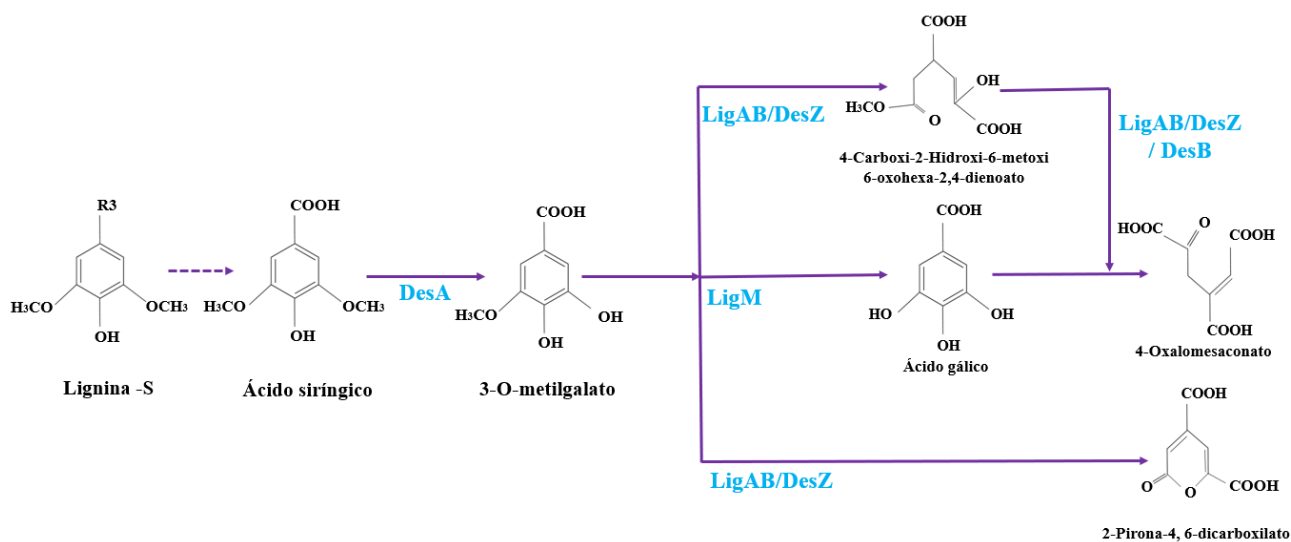


Figura 5. Catabolismo de aromáticos derivados de lignina-S, representados pelo ácido siríngico. DesA (O-demetilase dependente de tetrahydrofolato); DesB (ácido gálico dioxigenase);

DesZ (3-O-metilgálico 3,4-dioxygenase); LigAB (ácido protocatecúico 4,5-dioxygenase); LigM (3-O-metilgálico O-desmetilase).

1.3.2.2. Vias de clivagem de anéis aromáticos

O ácido protocatecuico pode ser convertido em catecol e o anel aromático de ambos intermediários pode ser clivado através de dioxygenases presentes em vias de *orto* e *meta*-clivagem, entre ou adjacente aos grupos hidroxila, respectivamente (Figura 6A) [63].

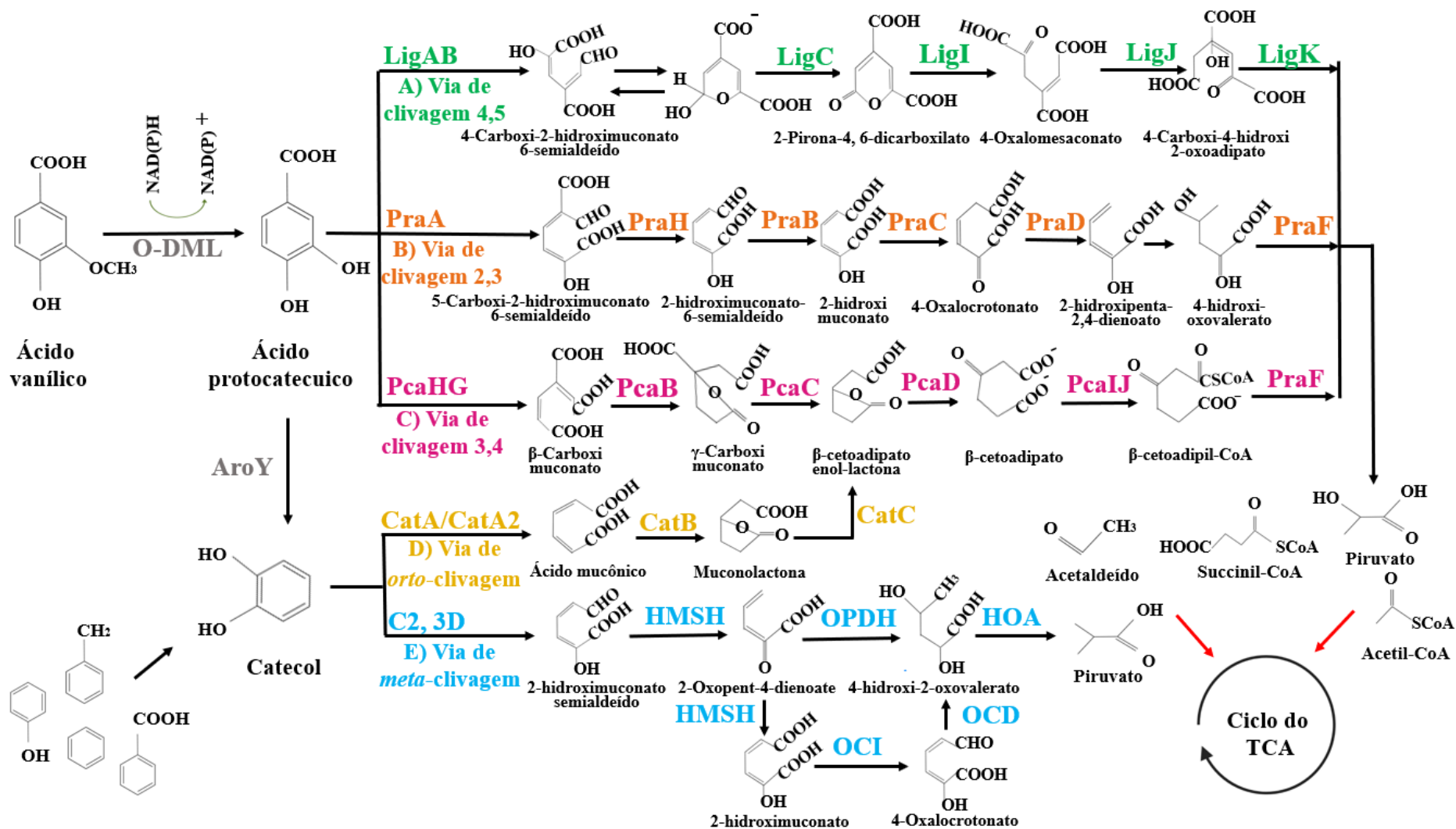


Figura 6. Vias de clivagem de anéis aromáticos. Catabolismo do ácido protocatecuico através das vias de clivagem 4,5 (A), clivagem 2,3 (B) e 3,4 (via β -ceto-adipato) (C). Catabolismos do catecol por meio das vias de *orto*-clivagem (D) e *meta*-clivagem. LigAB (ácido

protocatecúico 4,5-dioxigenase); LigC (4-carboxi-2-hidroximuconato-6-semialdeído deshidrogenase); LigI (2-pirona-4, 6-dicarboxilato hidrolase); LigJ (4-oxalomesaconato hidratase); LigK (4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato aldolase); PcaB (3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase); PcaC (4-carboximuconolactona descarboxilase); PcaD (3-oxoadipato enol-lactonase); PcaI/J (3-oxoadipato CoA-transferase); PcaF (4-hidroxi-2-oxoalerato aldolase); PraA (protocatecuato 2, 3-dioxigenase); PraB (2-hidroximuconato-6-semialdeído deshidrogenase); PraC (4-oxalomesaconato tautomerase); PraD (4-oxalomesaconato descarboxilase); PraE (2-hidroxipenta-2, 4-dienoato hidratase); CatA/A2 (catecol 1, 2-dioxigenase); CatB (cicloisomerase muconate); CatC (muconolactona isomerase); C2, 3D (catecol 2, 3-dioxigenase), HMSH (2-hidroximuconato semi-aldeído hidrolase); OPDH (2-oxopent-4-dienoato hidratase); HOA (4-hidroxi-2-oxoalerato aldolase); DesZ (2-Pirona-4,6-dicarboxilato hidrolase).

O ácido protocatecuico pode ser degradado pela via de clivagem 3,4 (via β -ceto adipato), via de clivagem 4,5 e via de clivagem 2,3 (Figura 6A-C). Inicialmente o ácido protocatecuico é catalisado por uma ácido protocatecuico 3,4-dioxigenase e posteriormente catalisado por 3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerase (PcaB), 4-carboximuconolactona descarboxilase (PcaC), 3-oxoadipato enol-lactonase (PcaD) e 3-oxoadipato CoA-transferase (PcaI/J) produzindo assim o β -ceto adipato. O β -ceto adipato pode ser convertido em succinil CoA e acetil-CoA através da ação de 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase (PcaF) [9,64].

Outros aromáticos como, fenol, benzeno, benzoato e tolueno podem ser convertidos em catecol e ser posteriormente ser degradados [62]. Na via de *orto*-clivagem (Figura 6D) o catecol é convertido pelas enzimas catecol 1, 2-dioxigenase (CatA/A2), cicloisomerase muconate (CatB) e muconolactona isomerase (CatC) para produzir β -ceto adipato enol-lactona e, em seguida é transformado em succinil-CoA e acetil-CoA. Na via da *meta*-clivagem (Figura 6D) as enzimas, catecol 2, 3-dioxigenase (C2, 3D), 2-hidroxi muconato semi-aldeído hidrolase (HMSH) e 2-oxopent-4-dienoato hidratase (OPDH) transformam o catecol em 4-hidroxi-2 oxovalerato que posteriormente é catalisado por 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase (HOA) produzindo piruvato e acetaldeído [65,66].

Para os intermediários derivados do ácido sirínico como, o 3MGA, o processo de abertura do anel é catalisado por 2-Pirona-4,6-dicarboxilato hidrolase (DesZ) ou ácido protocatecuico 4, 5-dioxigenase (LigAB) para produzir 2-pirona-4, 6-dicarboxilato que pode ser incorporado na via de clivagem 4,5 do ácido protocatecuico (Figura 6A) [67,68].

O metabolismo de lignina por bactérias fornece uma plataforma de compostos que podem ser utilizados para a síntese de bioprodutos de valor agregado como a vanilina, polihidroxicanoatos (PHAs) e lipídeos. A vanilina é um agente aromatizante que é utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos [69]. Atualmente, vanilina obtida a partir de lignossulfonatos já é comercializada e o seu preço no mercado pode chegar a \$100-200 dólares por quilo [70]. Os PHAs são matérias primas promissoras que podem ser utilizados para a produção de bioplásticos, pois possuem propriedades físico-químicas semelhantes aos plásticos à base de combustíveis fósseis. Uma outra perspectiva é o uso de lipídeos, obtidos a partir de aromáticos derivados de lignina, como precursores de biodiesel [60].

1.4. Degradação anaeróbica de lignina por bactérias

O mecanismo de desconstrução de lignina em condições anaeróbicas é menos compreendido quando comparado com sistemas bacterianos aeróbicos. No entanto, alguns estudos demonstraram o potencial das bactérias em degradar a lignina a seus derivados aromáticos, sob atmosfera anaeróbica (Tabela 2).

Tabela 2. Bactérias que degradam lignina e seus derivados aromáticos em condições anaeróbicas.

Bactéria	Características	Substrato	Referências
<i>Enterobacter lignolyticus SCF1</i>	Anaeróbica facultativa	Lignina álcali	[71]
<i>Tolomonas lignolytica BRL6-1</i>	Anaeróbica facultativa	Lignina álcali	[12]
<i>Klebsiella sp. BRL6-2</i>	Anaeróbica facultativa	Lignina álcali	[72]
<i>Acetoanaerobium sp. WJDL-Y2</i>	Anaeróbico obrigatório	Lignina kraft	[73]
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Anaeróbico obrigatório	Madeira dura de <i>Populus trichocarpa</i>	[74]
<i>Acetobacterium woodii</i>	Anaeróbico obrigatório	Vanilato, siringato e trimetoxicinamato	[75].
<i>Desulfobacterium catecholicum</i>	Anaeróbico obrigatório	4-hidroxibenzoico	[76]
<i>Desulfobacterium phenolicum</i>	Anaeróbico obrigatório	4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético	[77]
<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> <i>sk43H</i>	Anaeróbica facultativa	4-hidroxibenzoico, 4-hidroxifenilacético	[78]
<i>Thauera aromática sp.nov</i>	Anaeróbica facultativa	4-hidroxifenilacético	[79]

Nos genomas de bactérias anaeróbicas facultativas isoladas do solo e cultivadas com lignina álcali como fonte de carbono sob atmosfera anaeróbica, foram identificados genes de enzimas de degradação de lignina. Como por exemplo, em *Enterobacter lignolyticus SCF1* foi detectada a presença de lacases e peroxidases, além da via de degradação completa do 4-hidroxifenilacetato, intermediário produzido durante a desconstrução da lignina [71]. Além disso, a análise do proteoma e transcrito deste mesmo isolado, cultivado com xilose e lignina álcali como fontes de carbono, mostrou a regulação positiva de enzimas pertencentes a via de degradação do 4-hidroxifenilacetato, catalases, peroxidase e glutathione S-transferase [80]. Em *Tolomonas lignolytica BRL6-1* e *Klebsiella sp. BRL6-2* foram detectados genes de peroxidases e vias metabólicas de degradação de ácido ferúlico e protocatecuato [12,72]. Esses estudos ainda sugeriram a hipótese de a lignina atuar como um aceptor final de elétrons na ausência do oxigênio.

A bactéria *Acetoanaerobium sp. WJDL-Y2*, isolada do lodo de uma fábrica de celulose e papel, foi capaz de oxidar a lignina kraft a compostos ácidos e aromáticos de baixo peso molecular, como ácido benzenopropanóico, ácido siríngico e ácido ferúlico [73]. Akinosho et al. (2017) [74] analisaram mudanças estruturais na parede celular de madeira dura de *Populus trichocarpa* após o tratamento com a bactéria termófila anaeróbica *Clostridium thermocellum ATCC 27405* e os resultados indicaram que o teor de ligações β -O-4, encontrada na estrutura de lignina, foi reduzido sugerindo uma possível hidrólise dessas ligações. Além disso, foi observado aumento no índice das unidades siríngil/guaiacil (S/G) na lignina após o cultivo com essa bactéria [74].

A bactéria *Acetobacterium woodii* utiliza o grupo O-metil de aromáticos metoxilados, como o vanilato, siríngato e trimetoxicinamato, como fonte de carbono e energia, embora não seja capaz de degradar a estrutura do anel aromático desses compostos [75]. O catabolismo dos ácidos aromáticos 4-hidroxibenzoico por *Desulfobacterium catecholicum*, *Desulfobacterium phenolicum* e 4-hidroxifenilacético por *Sulfuritalea hydrogenivorans sk43H* e *Thauera aromática* gera benzoil-CoA como um intermediário central, que posteriormente pode ser submetido a clivagem do anel aromático através de redutases

dependentes ou independentes de ATP e reações similares a β -oxidação para gerar intermediários centrais [76,78,79,81].

1.5. Consórcios microbianos e abordagens metagenômicas

A estrutura e a funcionalidade de consórcios microbianos podem ser acessadas a partir de ferramentas baseadas em sequenciamento como a metataxonomia e a metagenômica *shotgun*. A metataxonomia consiste no sequenciamento de genes marcadores, geralmente regiões do gene do RNA ribossômico (rRNA) que são altamente conservadas entre os táxons. Essa metodologia fornece informações sobre a composição dos microrganismos presentes (podendo chegar até o nível de espécies), interações ecológicas e aspectos evolutivos. A metagenômica *shotgun* é o sequenciamento aleatório de todo o DNA microbiano presente em uma amostra e permite estimar a estrutura da comunidade assim como genes e vias metabólicas predominantes, que consiste na funcionalidade da comunidade [19,82,83].

Empregando a abordagem de metataxonomia Mendes et al. (2014) [84] avaliaram a composição e a dinâmica de consórcios microbianos aeróbicos enriquecido através do cultivo de amostras de solo em meios contendo lignina álcali e kraft como fontes de carbono. O sequenciamento do 16S rDNA identificou que o filo dos Firmicutes foi o mais abundante nos consórcios cultivados com lignina álcali e Proteobacteria nos consórcios com lignina Kraft. Além disso a diversidade bacteriana dos consórcios foi menor do que a do solo original.

Moraes et al. (2018) [85], usaram o sequenciamento do gene 16S rDNA e metagenômica *shotgun* para caracterizar um consórcio ligninolítico obtido pelo cultivo de uma amostra de solo de cana-de-açúcar em um meio contendo lignina solúvel de baixo peso molecular como fonte de carbono sob condições aeróbicas. A análise taxonômica mostrou que as famílias *Alcaligenaceae*, *Micrococcaceae*, *Bacteriaceae* e *Paenibacillaceae* foram as mais enriquecidas. A análise funcional desse consórcio revelou a presença de genes de peroxidases, lacases, esterases de carboidratos e vias relacionadas à degradação de compostos aromáticos como o benzoato.

Ao avaliar a estrutura e funcionalidade de consórcios originados do solo e fezes de galinha enriquecidos com lascas de madeira ou papel filtro e subcultivados em aerobiose em meio contendo lignina álcali como fonte de carbono, Carlos *et al.* (2018) [86] demonstraram que o gênero das *Pseudomonas* foi mais predominante e possuía a maior parte dos genes envolvidos na degradação de lignina, como vias de degradação de benzoato e catecol.

Neste trabalho propomos avaliar o potencial de bactérias do rúmen de bovinos em desconstruir anaerobicamente a macromolécula de lignina. A principal meta é identificar bactérias e compostos aromáticos produzidos durante o processo de degradação, e dessa forma contribuir para a compreensão do processo de degradação anaeróbica de lignina por bactérias ruminais.

2. Justificativa

A lignina é a principal fonte de compostos aromáticos na natureza e pode ser convertida em produtos de interesse industrial, como a vanilina, guaiacol e o fenol. As bactérias são capazes de desconstruir e metabolizar a lignina e seus derivados aromáticos. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo, principalmente por bactérias anaeróbicas, são pouco compreendidos. Identificar bactérias que estão envolvidos nessa atividade é fundamental para entender como ela ocorre e contribuir para a valorização da lignina como matéria prima para geração de químicos com alto valor agregado. Dessa forma, neste estudo exploramos o potencial de bactérias anaeróbicas ruminais na desconstrução e metabolização de lignina.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Obter e identificar consórcios microbianos enriquecidos através do cultivo em meios seletivos contendo lignina kraft como fonte de carbono sob atmosfera anaeróbica e avaliar o seu potencial para a desconstrução de lignina.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a diversidade taxonômica de bactérias nos consórcios microbianos obtidos através do sequenciamento *Barcoding* do gene 16S rDNA;
- Isolar e identificar bactérias isolados a partir dos consórcios microbianos;
- Avaliar a degradação de lignina pelos consórcios microbianos utilizando SEM, FTIR e GC-MS

CAPÍTULO 2.
**Insights on lignin kraft degradation in an anaerobic
environment**

Insights on lignin kraft degradation in an anaerobic environment

Jéssica P. Silva¹, Tayná D. Frederico¹, Alonso R. P. Ticona², Otávio H. B. Pinto¹, Thomas C. R. Williams³, Ricardo H. Krüger¹ and Eliane F. Noronha^{1,*}

¹ Enzymology Laboratory, Cell Biology Department, University of Brasilia, 70910-900 Brasília, Brazil; wpinheiro.jessica@gmail.com (J.P.S.); taydnzfrederico@gmail.com (T.D.F.); otaviohenriquebp9@gmail.com (O.H.B.P.); rhkruger@uwalumni.com (R.H.K.)

² Enzyme Biotechnology Research Laboratory, Science Faculty, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, 23003 Tacna, Perú; arpomat@unjbg.edu.pe

³ Plant Biochemistry Laboratory, Department of Botany, University of Brasilia, 70910-900 Brasília, Brazil; tcwilliams@unb.br (T.C.R.W.)

* Correspondence: enoronha@unb.br; Tel.: +55-61-3307-2152

Abstract: Lignin is an aromatic macromolecule and one of the main constituents of lignocellulosic materials. Kraft lignin is generated as a residual by-product of the lignocellulosic biomass industrial process, and it might be used as a feedstock to generate low molecular weight aromatic compounds. In this work, we established two lignin degrader anaerobic microbial consortia, KLY and KL, as shown by decolorizing assays, scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Taxonomic analysis showed enrichment of the microbial community with *Dickeya* genus members. A remarkable number of ASVs were classified as unknown bacteria, suggesting the role of non-previously described bacteria in lignin degradation in an anaerobic microbiome. Eight metabolic pathways related to lignin metabolism were predicted for KLY and KL consortia. Both microbiomes were also able to consume aromatics compounds such as 4-hydroxybenzoic acid, syringaldehyde, acetovanillone, and syringic acid producing molecules of commercial interest as 4-hydroxyphenylatic, 3-phenylatic acids, and Phenylacetic acid. Therefore, microbial consortia shown in the present work are models to understand the process of lignin degradation and consumption in bacterial anaerobic communities and to develop biological processes to add value to industrial processes based on lignocellulosic biomass as feedstock.

Keywords: Ruminal consortia, lignin, anaerobic degradation, bacterial diversity, decolorization

1. Introduction

Lignin is one of the main structural components of lignocellulosic biomass, accounting for 15-35% of its dry weight [1]. This material is an aromatic macromolecule composed mainly of the units: guaiacyl (G), syringyl (S), and p-hydroxyphenyl (H), which are linked by ether and carbon-carbon linkage [2], which provides mechanical strength and hydrophobicity to plant cell walls and protects the polysaccharide fraction from enzymatic degradation [3,4]. It highly contributes to the recalcitrance of lignocellulose biomass. In addition to natural lignin, this macromolecule is generated as a residual by-product, technical lignin, of industrial processes which applied lignocellulosic biomass as feedstock [5,6]. Cellulose and pulping industry is one of the main producers of technical lignin producing about 130 million tons annually worldwide [1,7,8]. Kraft pulping process is the most used removing lignin from wood chips as “black liquor”, traditionally used for energy production [9–11].

Lignin also might be used as a renewable source of aromatic compounds of industrial interest such as vanillin, syringaldehyde, guaiacol, and phenol. This kind of reusing adds value to bioprocesses based on lignocellulose and could increase lignocellulose biorefineries’ competitiveness. A central step for biological valorization of lignin is its deconstruction into low molecular weight aromatic compounds that can later be converted by microorganisms [12,13].

Degradation of lignin by white-rot fungi has been extensively studied. In comparison to fungi bacteria are less studied, however; their use to this purpose has attracted attention due to their ability to adapt to different environments and biochemical versatility. Genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, and *Arthrobacter* have already been described as capable of degrading lignin and converting it into compounds of commercial interest [14,15]. For example, Linger et al. (2014) [16] demonstrated the potential of *Pseudomonas putida* KT2440 to convert lignin from alkaline pretreated corn stover into polyhydroxyalkanoates (PHAs), applied as bioplastics or adhesives.

Bacterial deconstruction of lignin is mainly described for aerobic environments, and little is known about the role of anaerobic bacteria in this process. Bovine rumen is a

microaerophilic environment that hosts a diverse microbiome highly specialized in degradation of lignocellulose. Bacteria are predominant in this microenvironment, representing approximately 95% of the total microorganisms [17–19]. Previous works showed partial degradation of lignin in rumen and the potential role of bacteria in its degradation and metabolization [20–23]. Nowadays, several reports showed that microbial degradation and consumption of complex substrates in natural environments are carried out in a cooperative process among different microorganisms able to degrade and metabolize the substrate [24–27]. In the present work aiming to understand and explore the potential of rumen bacteria in the anaerobic deconstruction of kraft lignin, a culture enrichment technique was used to obtain a consortium of anaerobic bacteria. This consortium was further characterized to verify its ability to degrade and consume kraft lignin using SEM, FTIR, and GC-MS analyses and to identify the main bacteria related to this phenotype.

2. Materials and Methods

2.1. Establishment of microbial consortia

Liquid rumen was sampled from Holstein dairy cows at Veterinary and Zoo-technical School- Federal University of Goiás, Brazil, as described in Ticona et al. (2020) [19]. Animals sampled were approximately 60 months old, and its diet consisted of a mixture of grass silage (50% of dry matter) and concentrate (50% of dry matter of soybean, corn, and urea). At first, 500 μL aliquots of rumen liquid samples were inoculated into sealed flasks containing 50 mL of reducing liquid medium: NH_2PO_4 (5 g l^{-1}), Na_2HPO_4 (2.5 g l^{-1}), NH_4Cl (0.5 g l^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g l^{-1}), NaHCO_3 (0.5 g l^{-1}), MgCl_2 (0.09 g l^{-1}), mineral solution (5.0 mL), vitamin solution (0.5 mL), NaOH (0.04 g l^{-1}), $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$ (0.125 g l^{-1}), cysteine (0.05 g l^{-1}) supplemented with 0.35% (w/v) Kraft lignin as carbon source with or without the addition of yeast extract (3 g l^{-1}), under anaerobic atmosphere.

Inoculated flasks were incubated at 37°C and aliquots were taken every 24 hours of cultivation to measure growth (optical density at 600 nm) [28]. After four days of growth, aliquots of 500 μL were collected and transferred to 50 mL of fresh liquid reducing medium under the same conditions described above. This procedure was repeated five times [29].

Resulting culture obtained after the last passing was grown for four days and sampled after every 24 hours of growth to measure the decolorization of liquid media, as an indicator of lignin consumption (described in item 2.2). Consortia cultivated in liquid media containing kraft lignin and yeast extract as carbon source and only in the presence of lignin, were designated as KLY and KL, respectively. Non-inoculated reducing liquid medium (with or without the addition of yeast extract) was used as negative control. All experiments were performed in triplicate.

Kraft lignin, used as a carbon source, was recovered from the industrial black liquor of the hybrid eucalyptus species; *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*, through the LignoBoost process [30]. The anaerobiosis cultivation protocol using the reducing liquid medium was performed as described previously in Hamann et al. (2015) [31].

2.2. Decolorization analysis

Culture liquid medium decolorization was measured according to the standard Canadian Pulp and Paper Association (CPPA) method (1974) [32]. Color was determined spectrophotometrically at 465 nm in comparison to a standard platinum-cobalt (PtCo). Above mentioned culture samples were centrifuged at 8000g for 15 min to remove suspended solids, the pH of the collected supernatant was adjusted to 7.6 and absorbance measured at 465 nm against distilled water. Absorbance values were transformed into color units (CU) according to the equation:

$$CU = 500 * A1 / A2,$$

where A1 is the A465 absorbance of the platinum-cobalt 500 CU standard solution (0.126) and A2 is the sample absorbance [33]. The decolorization proportion was defined as the ratio between CU of the consortium supernatant and CU of negative control. All measurements were performed in triplicate.

2.3. SEM and FTIR

The samples from the consortia (KLY and KL) and the negative controls were centrifuged at 8000 g for 15 min. Supernatants were lyophilized and then, the samples were placed in glass Petri dishes and dried at 60°C for 24 hours. Dry powder samples were used for SEM and FTIR analysis.

Sample preparation and analysis using a scanning electron microscope (JEOL JSM 7001F) were performed as previously described in Ullah et al. (2019) [34]. The FTIR spectra were measured by an ALPHA FT-IR Spectrometer Bruker operating in attenuated total reflectance (ATR) mode. The ATR-FTIR equipment was configured for 24 scans in the range from 4000 to 400 cm^{-1} .

2.4. GC/MS for Metabolite identification

Samples for GC-MS analysis was taken at 5 mL aliquots from the consortia (KLY and KL) and negative controls and subsequently centrifuged at 8000 g for 15 min. Initially, 5 ml of samples from the consortia (KLY and KL) and the negative controls were centrifuged at 8000 g for 15 min. The supernatants were acidified (pH 1-2) with 1M HCl and then three volumes of ethyl acetate were added to extract the compounds. The organic layer of the extraction mixture was collected and dried in SpeedVac (miVac (GeneVac)). Then, 40 μL of pyridine was added to the samples and they were incubated for 30 minutes at 37°C. Finally, 70 μL of N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) were added to each of the samples, which were incubated for 30 minutes at 37°C. An aliquot of 1 μL of each sample was injected in GC-MS (Agilent 7820A-5975 MDS). The column used in the analysis was the Optima 5MS Capillary Column (30m x 250 μm , internal diameter x 0.25 μm film thickness). The helium was used as a carrier gas with flow of 1mL/min. The column temperature program was from 80 °C for 5 minutes/10 °C for 1 minutes to 300 °C for 5 minutes. The transfer line temperature and ionization source were maintained at 250 °C. Electron ionization (EI) mass spectra in the range 30–550 (m/z) were recorded at an electron energy of 70 eV [35]. The chromatographic peaks were automatically identified by the Agilent ChemStation software that uses the NIST (National Institute of Standards and

Technology) library to identify the compounds. Low molecular weight lignin compounds were detected as derivatives of TMS (trimethylsilyl). Analyzes were performed in triplicate and compounds that appeared in at least two replicates and presented quality equal to or greater than 80% were considered.

2.5. Description of bacteria community

Cultures of each consortium grown for 2 and 4 days as above described, in triplicate, and original sample (sampling liquid rumen) were centrifuged, and pelleted cells used extract genomic DNA with DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. DNA quality was verified on agarose gels 1% (w/v). Extracted DNA and negative control (ultrapure water) were barcoding sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea). Library construction was carried out using V3-V4 region the 16S rRNA gene (Bakt_341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' Bakt_805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), sequenced using Illumina MiSeq platform (paired, 300 bp, 100 k reads/ sample) and the results delivered in fastq format. Sequencing quality was analyzed using FASTQC (0.11.8) program (Babraham Institute, Cambridge, UK) [36].

2.5.1. Data processing

Raw sequences were previously filtered using the BBDuk program version 38.93 (BBMap–Bushnell B.– sourceforge.net/projects/bbmap/) to remove Illumina adapters and the PhiX Control Library v3. The treated sequences were imported into the QIIME2 program version 2021.8 (<https://qiime2.org/>) [37], and primers were trimmed from reads with the cutadapt plugin [38]. The qiime2-dada2 plugin pipeline was used for filtering, dereplication, turning paired-end fastq files into merged, and removal of chimeras [39]. Taxonomic assignments were determined for amplicon sequence variants (ASVs) using the qiime2-feature-classifier [40] classify-sklearn against the SILVA database version 138 [41] with Naïve Bayes classifier and threshold of 97% identity.

The taxa and ASV table outputs from QIIME 2 were used with metadata as input files into R environment version 4.1.2 for community analyses using the phyloseq package [42]. The sequence libraries were filtered to exclude amplicon sequence variants taxonomically classified as archaea. For alpha and beta diversity analyses, data were rarefied to 51,736 sequences per sample. Significance testing was carried out on alpha diversity estimates using the Kruskal-Wallis test followed by the pairwise Wilcoxon test. The *p*-value was adjusted using the Benjamini & Hochberg method. Statistical significance tests were performed on the dplyr package (Wickham et al., 2021) [43]. Beta diversity was investigated through Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Weighted UniFrac distances. Significant differences in variance between groups were determined with PERMANOVA using the vegan package [44]. Relative abundances of bacterial phyla, families, and genera were plotted using the ggplot2 package [45] after transforming abundance data into relative abundances. For the relative abundance graphs, only the main bacterial ASVs with abundance above 1% for phyla and above 5% for family and genus were represented.

Additionally, normalized ASV function contributions were calculated using picrust2 v2.5.1 pathway_pipeline.py "--per_sequence_contrib" [46], and output (pathway abundance) was used as an input file on STAMP (version 2.1.3) [47]. Welch's nonparametric t-test evaluated statistical differences with Bonferroni correction. The functional profiling was built based on the MetaCyc Metabolic Pathway Database [48]. Only metabolic pathways attributed to Lignin degradation were evaluated.

Due to the small sample size, for the statistical analysis of alpha and beta diversity, and functional inferences triplicates of the KLY consortium of days two (KLY2) and four (KLY4) were pooled. As well as the triplicates of days two (KL2) and four (KL4) of the KL consortia.

3. Results

3.1. Growth curve and decolorization analysis of lignin of the culture medium by consortia KLY and KL

After two days of cultivation, KLY and KL consortia reached a maximum growth OD_{600nm} (Fig. 1A). Highest growth was observed for KLY consortium. Despite the difference in the growth rate of these two culture conditions, no significant difference ($p > 0,05$) was observed in lignin decolorization rates. After two days of cultivation, KLY consortium showed 40% of medium decolorization, while the KL consortium 29%. This rate remained constant until the last day of growth, 4 days (Fig.1B).

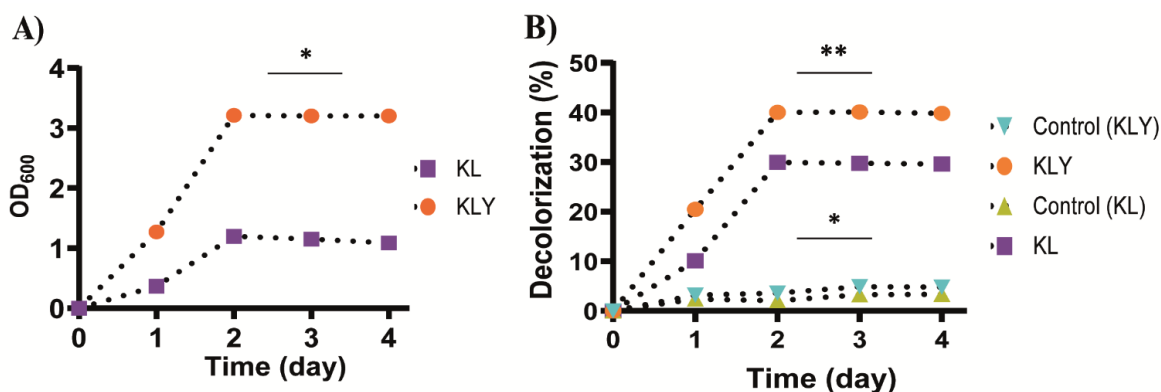


Figure 1. Growth curve (A), analysis of the decolorization of the culture medium (B) of the KLY and KL consortia during four days of growth. (*) $p < 0,05$ and (**) $p > 0,05$.

3.2. SEM and FTIR analysis

Residual lignin recovered from liquid media inoculated with KLY and KL presented morphological changes didn't observed in comparison to lignin recovered from non-inoculated media (Figure 2). Surface of untreated lignin (negative controls) is compacted and smooth (Figures 2A and 2D), residual lignin recovered from culture media of KLY and KL consortia, instead, seems to be disintegrated presenting wrinkled surfaces (figure 2 (B,C,E, and F)).

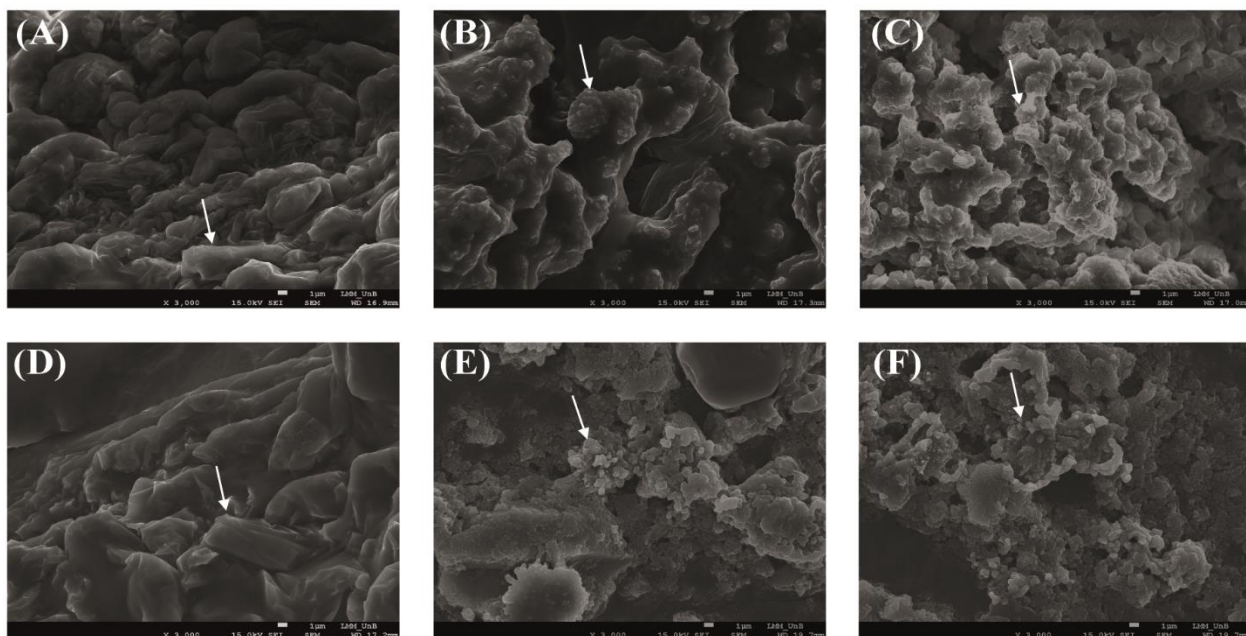


Figure 2. SEM of lignin recovered from liquid media non-inoculated and inoculated with KLY and KL. Negative control (KLY) (A), treatment with the KLY consortium on days two (B) and four (C) of cultivation. Negative control (KL) (D) and treatment with the KL consortium on days two (E) and four (F) of cultivation.

FTIR spectra of residual lignin recovered from cultures inoculated with KLY and KL consortia and non-inoculated, negative controls are shown in Figures 3 and S1. Figure 3 shows that lignin recovered from cultures of KLY consortium present two additional bands in comparison to negative control, one in the region of $\sim 803/\text{cm}$ after 2 days of growth and another at $\sim 1153/\text{cm}$, four days of growth, which corresponds to C-H vibrations of guaiacyl units. Furthermore, band located at $\sim 1076/\text{cm}$ region attributed to C-O vibration in secondary alcohol and/or aliphatic ether was not detected in the KLY consortium during the second day of cultivation. Absorption bands at $\sim 853/\text{cm}$ and $\sim 1108/\text{cm}$ attributed to C-H vibrations of guaiacyl and syringyl units, respectively, increased in lignin recovered from cultures inoculated with KLY consortium. Lignin recovered from liquid cultures inoculated with KL consortium doesn't present significant differences compared to lignin recovered from negative controls using FITR.

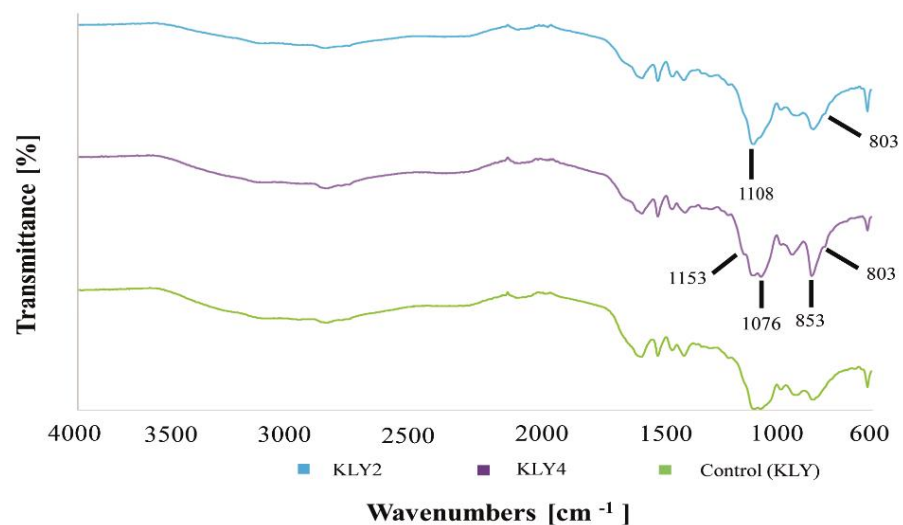


Figure 3. FTIR spectra of the negative control (KLY) and the KLY consortium during days 2 and 4 of cultivation.

3.3. Analysis of lignin degradation by GC/MS

Main compounds identified by GC-MS in the supernatant of cultures of KLY and KL consortia and respective negative controls are listed in Tables 1 and 2. The complete list with all compounds described is found in Supplementary Table 1.

Table 1. Compounds identified by GC-MS in the supernatant of cultures from the KLY consortium and negative control (KLY) collected on days two and four of cultivation.

RT (min)	Identified compounds	Molecular formula	Control	KLY_2	KLY_4
7.015	Phenol	C ₆ H ₆ O	-	+	+
7.599	Acetic acid	CH ₃ COOH	-	-	+
8.728	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	+	+	+
9.495	Butanoic acid, 2-methyl	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	+	+
10.624	4-Chlorophenol	C ₆ H ₅ ClO	-	-	+
10.683	4-Hydroxybutanoic acid	C ₄ H ₈ O ₃	-	-	+
10.818	2-Hydroxy-3-methylvaleric acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	-	+	-
10.872	2-Hydroxyhexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	-	+	-
11.612	Phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	-	-	+
12.196	2,3-Dihydroxy-2-methylpropanoic acid	C ₄ H ₈ O ₄	+	-	-
12.428	2-Butenedioic acid	C ₄ H ₄ O ₄	+	-	-
13.152	Syringol	C ₈ H ₁₀ O ₃	+	+	+
13.374	Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	-	+	-
14.486	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	+	-	-
15.091	DL-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	+	-	-
15.653	3-Phenylactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂ / C ₉ H ₁₀ O ₃	-	-	+
16.102	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	+	+	-
16.215	4-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	+	-	-
16.917	Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	+	-	-
17.214	1-(Trimethylsiloxy)-2-methoxy-4-(1-trimethylsiloxyethyl)-benzene	C ₁₅ H ₂₆ O ₃ Si ₂	-	+	+
17.598	4-Hydroxyhydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	+	+	+
17.641	Vanillic Acid	C ₈ H ₈ O ₄	+	+	+
18.241	Dihydroconiferyl Alcohol	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	+	+	-
19.035	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	+	+
19.148	4-Hydroxyphenylacetic acid	C ₉ H ₁₀ O	-	+	+
19.478	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	+	-	+
20.326	Vanillic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	+	+	+
21.336	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	+	+	-
21.746	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	-	-

Table 2. Compounds identified by GC-MS in the supernatant of cultures from the KL consortium and negative control (KL) collected on days two and four of cultivation.

RT (min)	Identified compounds	Molecular formula	Control	KL_2	KL_4
7.555	Acetic acid	CH ₃ COOH	-	+	+
8.684	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	-	+	+
9.451	Butanoic acid, 2-methyl	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	+	+
10.424	Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	+	+	+
11.439	Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	-	-	+
11.893	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	-	+	+
15.502	Pentanedioic acid	C ₅ H ₈ O ₄	-	+	+
15.605	Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	-	-	+
15.977	Acetovanillone	C ₉ H ₁₀ O ₃	+	-	-
16.669	2,6-dimethoxybenzene-1,4-bis(trimethylsilyloxy)	C ₁₄ H ₂₆ O ₄ Si ₂	-	+	+
16.885	Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	+	+	+
17.020	Homovanillyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O ₃	-	+	+
17.592	Isovanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	+	+	+
18.203	Dihydroconiferyl Alcohol	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	+	+	+
18.343	4'-(Salicylideneamino)acetanilide	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	-	-	+
18.884	Vanillylmandelic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	-	-	+
19.018	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	-	-
19.780	3-Vanil-1,2-bis(trimethylsilyloxy)propane	C ₁₉ H ₃₈ O ₄ Si ₃	-	+	+
20.277	Vanillactic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	+	+	+
20.407	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	+	+	+
21.293	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	+	-
22.162	Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	+	+
29.223	2,5-Dimethoxymandelic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	+	-	+

Some aromatic compounds such as syringol, 4-hydroxyhydrocinnamic acid, vanillic acid, 4-hydroxybenzoic and syringic acid were identified in the supernatants of the negative control (KLY) and, KLY consortium (Table 1). The compounds for KL consortium and its negative control (KL) were: guaiacol, syringaldehyde, isovanillic acid, dihydroconiferyl alcohol, 2,5-dimethoxymandelic acid and vanillactic acid (Table 2).

The compounds 4-hydroxyphenylacetic acid, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid and dihydroconiferyl alcohol identified in the negative control (KLY) were not detected in the KLY consortium (Table 1). For the KL consortium, acetovanillone and syringic acid were not identified. Furthermore, 2,5-dimethoxymandelic acid was not detected on the second day of cultivation but reappeared on the fourth day (Table 2).

Several aromatic compounds were identified only in the supernatant of cultures of KLY and KL consortia (Tables 1 and 2). The compounds phenol, 4-chlorophenol, phenylacetic acid, hydrocinnamic acid, 3-phenylacetic acid, 1-(trimethylsiloxy)-2-methoxy-4-(1-trimethylsiloxyethenyl)-benzene, and 4-hydroxyphenylacetic acid were detected in supernatant of KLY consortium culture. For KL consortium hydrocinnamic acid, 2,6-dimethoxybenzene-1,4-bis(trimethylsilyloxy), homovanillyl alcohol, vanillylmandelic acid, and 3-vanillyl-1,2-bis(trimethylsilyloxy)propane were detected.

3.4. Diversity of microbial consortia

Bacterial α diversity (Fig. 4A) differed between the original rumen sample CR and consortia KLY and KL. Richness of CR sample based on Chao 1 index analysis is greater than that for KLY and KL consortia ($p < 0,05$). Likewise, the same difference was observed using Simpson and Shannon diversity indexes ($p < 0,05$). Simpson index also showed that diversity of KLY consortium was greater than that of KL consortium ($p < 0,05$). Furthermore, beta diversity analysis (Fig. 4B) using the weighted UniFrac distance showed that there was difference (PERMANOVA, $p < 0,05$) between CR sample and the KLY and KL consortia and indicates that KLY and KL consortia are more like each other than to CR sample. The replicates of each sample CR ($n=3$), KLY ($n=6$), and KL ($n=6$) samples were close to each other.

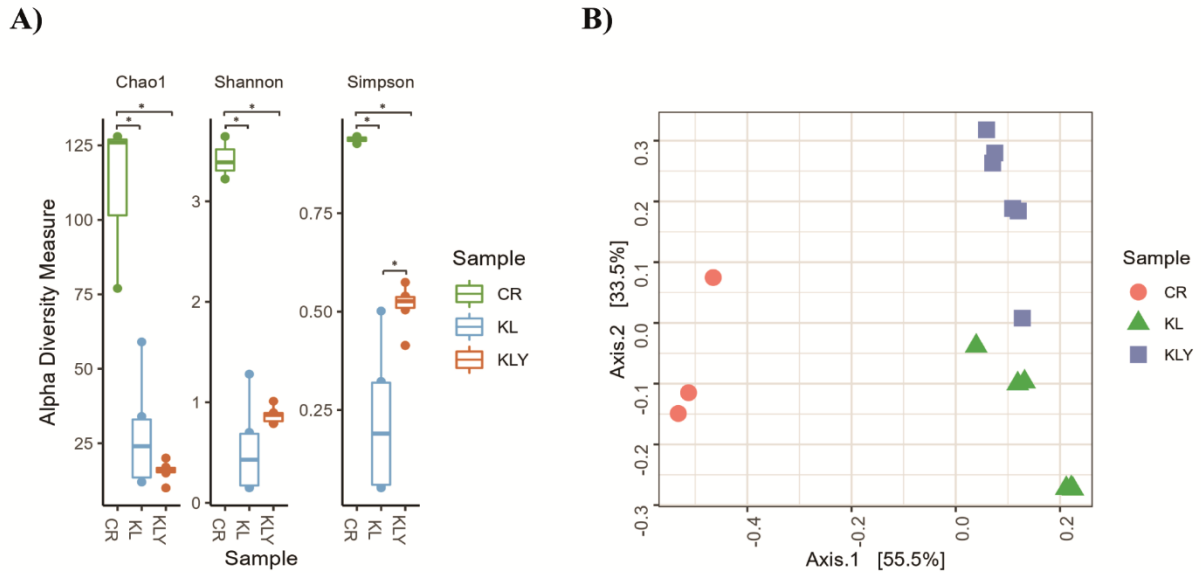


Figure 4. Alpha and beta diversity plots of rumen microbiota (CR), KLY, and KL consortia. A) Boxplot corresponding to Chao1, Shannon, and Simpson indices (alpha diversity). B) Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing beta diversity with weighted UniFrac distance. (*) $p < 0,05$.

3.5. Composition of Microbial Consortia

Comparative analysis of the taxonomic profiles in CR sample with those in KLY and KL consortia (on days two and four of culture) showed differences in the total relative abundance of the phylogenetic groups (Fig. 5 (A-C)). Main phyla represented in CR sample were: Firmicutes (~48%), Bacteroidota (~37%) and Proteobacteria (~10%). Most abundant families were: Prevotellaceae (~20%), Lachnospiraceae (~15%), Rikenellaceae (~14%), Ruminococcaceae (~7%), and Succinivibrionaceae (~6%). For genera the most represented were: Prevotella (~14%), Rikenellaceae_RC9_gut_group (~14%), an unknown genus identified by the family Bacteroidales_RF16_group (~6%), and Lachnospiraceae (~4%).

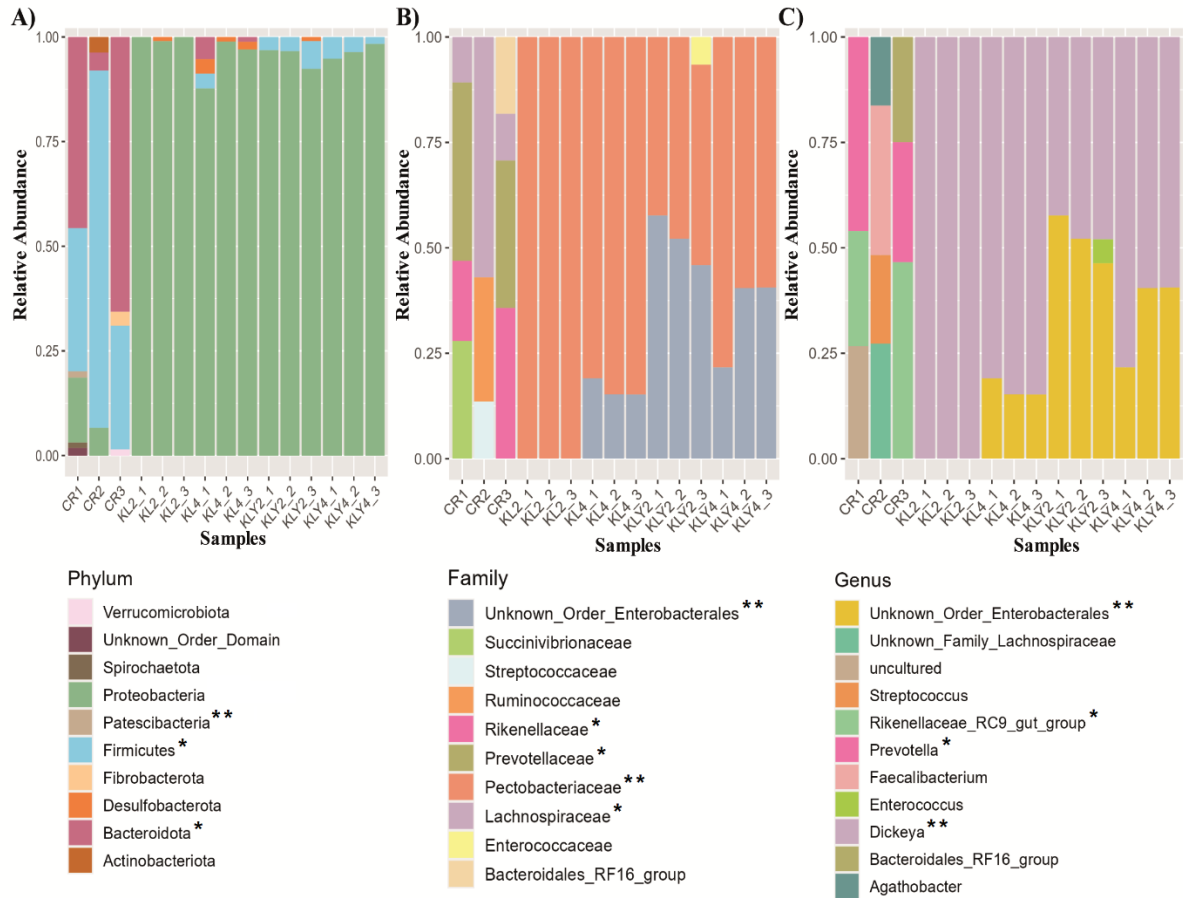


Figure 5. Taxonomic profile of different Phyla, Families, and Genera of bacteria found in bovine rumen microbiota (CR) and KLY and KL consortia. Numbers (1, 2, and 3) represent the replicates of CR samples and consortia on days two (KLY2 and KL2) and four (KLY4 and KL4) of cultivation. The closest previous hierarchical level was provided for families and genera classified as Unknown. (*) and (**) represent the most abundant microorganisms in CR samples and KLY and KL consortia, respectively.

Enriched sample, named KLY consortium, presented Proteobacteria as a dominant phylum (~94%) and Firmicutes (~4.37%) for 2 days old cultures. . The most prominent families were Pectobacteriaceae (~43%), an unknown family identified by the order Enterobacterales (~49%), and Enterococcaceae (~4%). Regarding genera, the most represented were: Dickeya (~43%), an unknown genus identified as the order

Enterobacterales (~49%) and Enterococcus (~3%). This distribution didn't differ for those described for KLY consortium 4 days old cultures.

KL consortium, on the second day of cultivation, presented Proteobacteria (~98%) as the most abundant phylum. Pectobacteriaceae family (~96%) was the most abundant. And Dickeya's genus (~96%) was predominant. On the fourth day of cultivation, there was a difference only in the distribution of families in which the most abundant were: Pectobacteriaceae (~76%) and the unknown family identified by the order Enterobacterales (~14%) and in the genus with Dickeya (~76%) and an unknown genus identified by the order Enterobacterales (~14%).

Identification of bacteria in the consortia (KLY and KL) and CR sample showed a remarkable number of ASVs classified as Unknown, which may be related to the lack of bacterial sequences in public databases compared to the data obtained in this study [2].

3.6. Functional predictions

Comparative functional prediction analysis (Fig.4A) indicated the presence of two statistically significant ($p < 0,05$) MetaCyc pathways related to lignin degradation between the rumen microbiota (CR) and KLY consortium; 3-phenylpropanoate degradation and Cinnamate and 3-hydroxycinnamate degradation to 2-hydroxypentadienoate and KL consortium; Toluene III degradation (aerobic) (via p-cresol) and Methylgallate degradation.

Comparing the KLY and KL consortia (Fig.4B), eight metabolic pathways were predicted, as follows; 3-hydroxyphenylacetate degradation, Catechol degradation III (ortho-cleavage pathway), Toluene III degradation (aerobic) (via p-cresol), Methylgallate degradation, Protocatechuate degradation II (ortho-cleavage pathway), Phenylacetate I degradation (aerobic), 3-phenylpropanoate degradation, and Cinnamate and 3-hydroxycinnamate degradation to 2-hydroxypentadienoate.

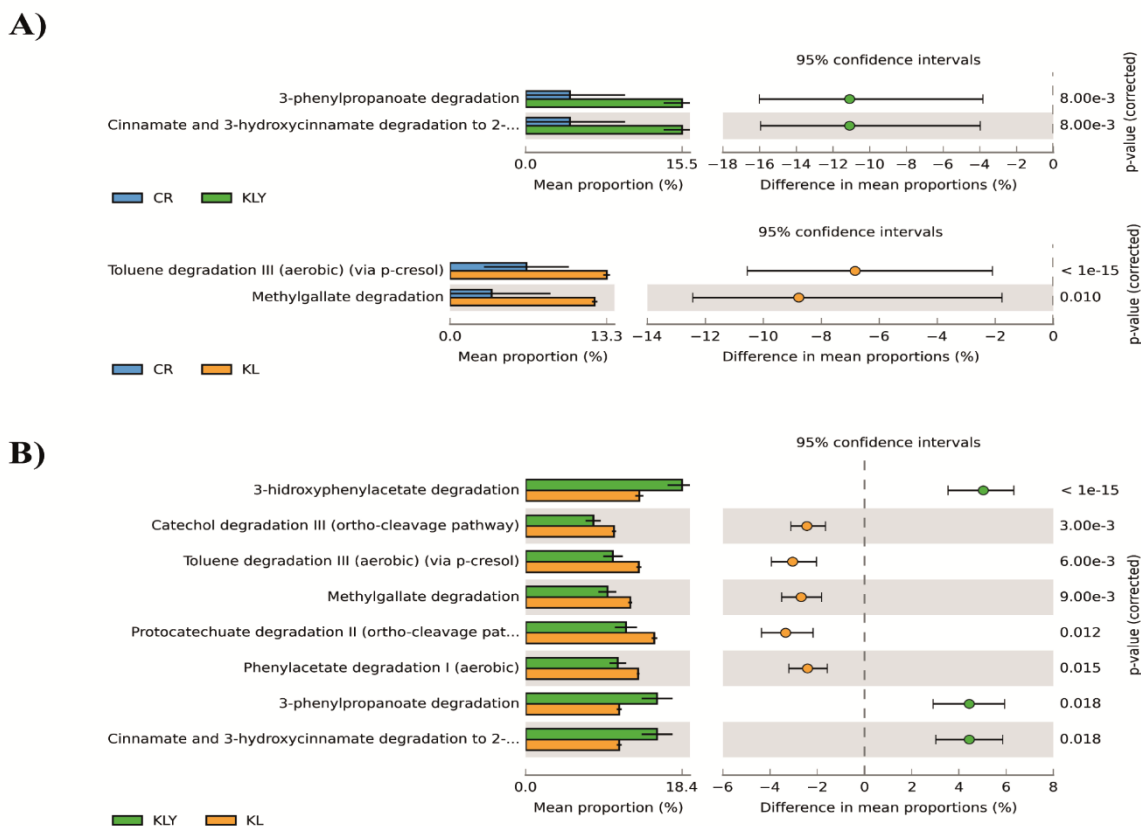


Figure 4. Comparison of abundances of predicted metabolic pathways related to lignin degradation between ruminal microbiota (CR) and KLY and KL consortia (A) and between KLY and KL consortia (B). Bar plots on the left display the mean proportion of each pathway. Dot plots on the right show differences in the mean proportions between the two indicated groups using the *p*-value.

4. Discussion

4.1. Kraft lignin decolorization

Lignin color reduction by bacteria is already used as a tool to measure lignin degradation, being directly correlated with it [33,49,50]. In the present study we showed the role of anaerobic and/or microaerophilic bacteria in lignin degradation. Decoloration rate of lignin by KLY (40%) and KL (29%) consortia was lower from those described for bacterial aerobic

consortia composed of *Serratia marcescens* (GU193982), *Klebsiella pneumoniae* (GU193983), and *Citrobacter* sp. (HQ873619) (74%) [51] or *Bacillus subtilis*, *Bacillus endophyticus*, and *Bacillus* sp (68.29%) [52]. However, KLY and KL consortia were able to grow and decolorize the culture medium even without addition of glucose as carbon source or peptone as nitrogen source.

4.2. Morphology and chemical groups of Kraft lignin after treatment with consortia

SEM images suggest significant degradation/transformation of Kraft lignin by KLY and KL consortia. Similar results were found in other studies reporting degradation of kraft lignin by bacteria [49,53,54]. Furthermore, FTIR spectra of Kraft lignin after treatment with the KLY consortium indicate changes in chemical bonds such as the appearance of new bands (~803/cm and ~1153/cm) related to the C-H of the guaiacyl ring. The disappearance of the band located in the ~1076/cm region, corresponding to the vibrations in secondary alcohol and/or aliphatic ether, demonstrated that these more easily degradable compounds present at the beginning of the cultivation were possibly consumed by the KLY consortium during the second day of cultivation and reappeared in the fourth after degradation of lignin by the consortium. Despite changes in the morphology of Kraft lignin after treatment with the KL consortium, no changes in the composition of chemical bonds were observed.

4.3. Lignin degradation products

Due to the severity of the lignin extraction process from lignocellulosic biomass, its structure is partially degraded, and some aromatic compounds are released [33,55], as shown in tables 1 and 2 in the negative controls (KLY and KL). Some of these compounds such as 4-hydroxyphenylacetic acid, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, and dihydroconiferyl

alcohol seem to be consumed by KLY consortium and acetovanilone and syringic acid by KL consortium.

Interestingly, some aromatic compounds identified in the supernatants after treatment with KLY consortium, as phenol, phenylacetic acid, hydrocinnamic acid, 3-phenylactic acid, and 4-hydroxyphenylactic acid, and KL consortium, as hydrocinnamic acid, homovanil alcohol, and vanilmandelic acid, represent important intermediates in lignin metabolism [35,56,57] and indicate that the microorganisms present in the consortia were able to deconstruct and transform this macromolecule into these compounds.

Additionally, cinnamic acid, present in KLY and KL consortia as hydrocinnamic acid, links lignin with the hemicellulose fraction through ester and ether linkages [58]. Most ester linkages are broken during the lignin extraction process, however, some ether linkages remain in the structure [59]. Thus, indicating that consortia members may be involved in the cleavage of these linkages. This acid seems to have been consumed by the KLY consortium on the fourth day of cultivation (Table 1).

Compounds identified in this study have industrial applications as 4-hydroxyphenylactic and 3-phenylactic acids which have antifungal properties and are used as food conservatives [60]. Phenylacetic acid has the odor of honey and is used to produce perfume fragrances and in the production of penicillin G and diclofenac [61]. Currently, the industrial production of these compounds is done mainly by chemical synthesis. Bacterial potential to produce these compounds has already been reported in the literature [61,62].

In the present work, we show the potential of microbial consortiums derived from the bovine rumen for the first time to depolymerize and metabolize lignin degradation products anaerobically. Furthermore, we show a different bacterial route to produce these compounds using lignin kraft as a carbon source by anaerobic or microaerophilic bacteria. Thus, more studies are needed to investigate these routes and therefore make their application viable and contribute to the valorization of lignin.

4.4. Diversity and taxonomic affiliation of KLY and KL consortia

Lower bacterial richness and diversity found in samples KLY and KL compared to CR (Fig. 3) agree with the expected result of sample enrichment related to the desired phenotype. Due to the selective pressure of the cultivation atmosphere and lignin, most adapted microorganisms become dominant in the biological samples. Other studies that used culture enrichment to establish ligninolytic consortia demonstrated the same pattern [2,63].

ASVs classified as Unknown in each consortium may likely represent a set of undescribed bacteria related to lignin degradation [2]. However, further analyzes are needed to confirm this hypothesis. The order *Enterobacterales*, the last taxonomic affiliation of the Unknown genus present in KLY and KL consortia, has already been reported as one of the most abundant in an anaerobic microbial consortium derived from sediments collected from paddy fields and cultivated with kraft lignin as sole carbon source [29]. Member of this order has been already studied and described as able to grow in alkaline lignin as sole carbon source, as the facultative anaerobe bacteria *Enterobacter lignolyticus SCF1*. Genomics analysis of this bacterium showed the presence of two genes encoding putative laccases and one a putative peroxidase [64].

In KL consortium, changes in the relative abundance of the Unknown genus belonging to the *Enterobacterales* order in a time course manner, especially on the fourth day of growth, may be related to lignin degradation by the most abundant genus after two days of growth. These results suggest that consortium members might collaborate to each other to degrade and metabolize lignin, acting as a community.

The genus *Dickeya*, found in this study, contains several species of facultative anaerobic bacteria that are phytopathogenic and produce a wide range of plant cell wall degrading enzymes [65]. Genomic analysis of a member of this genus, isolate *Dickeya sp.* WS52, revealed the presence of many genes encoding potentially relevant ligninolytic enzymes such as multicopper oxidase and glutathione S-transferase [66].

Genera members of Proteobacteria phylum seem to play a central role in lignin degradation, as they were the most enriched in KLY and KL consortia. A similar result was

described by Mendes et al. (2021) [2] in an aerobic microbial consortium using a different source of microorganisms, soil, grown in media containing Kraft lignin as a carbon source.

4.5. Functional profile of consortia

Some of the metabolic pathways inferred to be present in the KLY and KL consortia may be involved in the consumption of aromatics identified by GC-MS in the supernatants of the consortia. For example, 4-hydroxybenzoic acid in the KLY consortium could be converted into protocatechuate through the enzyme 4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase and then enter the protocatechuate II degradation pathway [67]. Syringaldehyde in the KLY consortium and syringic acid in the KL consortium may have been consumed via the methylgallate degradation pathway. However, syringaldehyde would first need to be converted into syringic acid, by the action of aldehyde dehydrogenase enzymes [68].

The degradation of aromatic compounds through the pathways predicted in this study occurs in the presence of oxygen. Although some studies suggest the anaerobic degradation of lignin in various natural environments, the metabolic pathways involved in the process are still poorly understood [69–72].

16S-based functional predictions can provide an initial picture of the potential of consortia in lignin degradation, but further studies using metagenomic shotgun analysis are needed to improve resolution and clarify our findings on predicted metabolic pathways. However, our results provide a basis for future investigations.

5. Conclusions

Established culture conditions, in the present work, allowed the selection of microbial consortia capable of degrade and consume Kraft lignin. Genus *Dickeya* seems to play a central role in lignin degradation, as they were the most enriched in the KLY and KL consortia. Furthermore, a significant number of ASVs classified as unknown suggested the presence of yet undescribed bacteria related to lignin degradation. GC-MS analysis of the culture supernatant demonstrated the potential of the consortia to metabolize lignin degradation products probably through the predicted metabolic pathways, such as

protocatechuate II degradation and methylgallate degradation pathway. However, further studies are needed to understand the occurrence of these pathways under anaerobic conditions. Many aromatic compounds produced by the consortia, such as 3-phenylactic and 4-hydroxyphenylactic acids, have biotechnological potential. Therefore, consortia can contribute to the lignin valorization process.

Supporting information

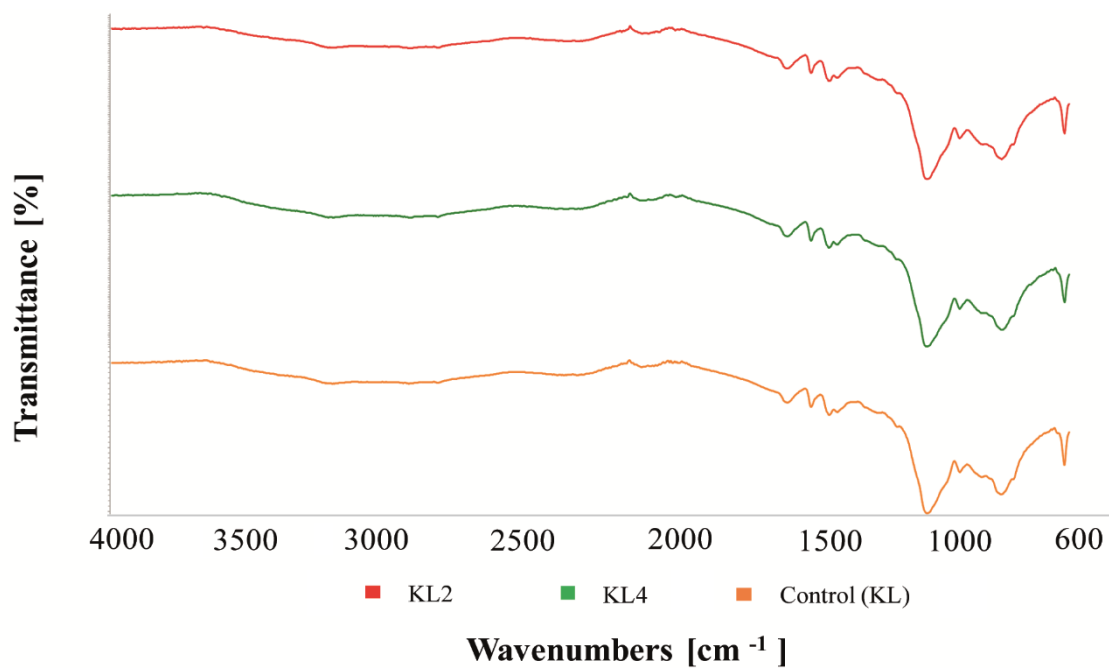


Figure S1. FTIR spectra of the negative control (KL) and the KL consortium during days 2 and 4 of cultivation.

Table S1. Compounds identified by GC-MS in the supernatant of cultures from the KLY consortium and negative control (KLY) collected on days two and four of cultivation.

No.	RT (min)	Identified compounds	Molecular formula	Control	KLY_2	KLY_4
1	5.476	Ethylene glycol	C ₂ H ₆ O ₂	+	-	-
2	6.745	2,3-Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	-	-	+
3	7.015	Phenol	C ₆ H ₆ O	-	+	+
4	7.210	1,3-Propanediol	C ₃ H ₈ O ₂	-	+	+
5	7.313	Lactic Acid	C ₃ H ₆ O ₃	+	+	+
6	7.599	Acetic acid	CH ₃ COOH	-	-	+
7	7.766	L-Valine	C ₃ H ₁₁ NO ₂	+	-	-
8	8.231	L-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	+	-	-
9	8.679	2-Furoic acid	C ₅ H ₄ O ₃	-	-	+
10	8.728	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	+	+	+
11	9.495	Butanoic acid, 2-methyl	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	+	+
12	10.624	4-Chlorophenol	C ₆ H ₅ ClO	-	-	+
13	10.683	4-Hydroxybutanoic acid	C ₄ H ₈ O ₃	-	-	+
14	10.818	2-Hydroxy-3-methylvaleric acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	-	+	-
15	10.872	2-Hydroxyhexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	-	+	-
16	11.067	L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	+	-	-
17	11.488	Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	-	+	+
18	11.612	Phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	-	-	+
19	11.737	L-Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	+	-	+
20	11.915	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	+	+	+
21	12.196	2,3-Dihydroxy-2-methylpropanoic acid	C ₄ H ₈ O ₄	+	-	-
22	12.428	2-Butenedioic acid	C ₄ H ₄ O ₄	+	-	-
23	13.109	Lactic acid dimer	C ₆ H ₁₀ O ₅	-	+	+
24	13.152	Syringol	C ₈ H ₁₀ O ₃	+	+	+
26	13.374	Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	-	+	-
27	13.665	β-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	+	-	+

28	14.486	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	+	-	-
29	14.827	L-5-Oxoproline	C ₅ H ₇ NO ₃	-	-	+
30	15.091	DL-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	+	-	-
31	15.540	Pentanedioic acid	C ₅ H ₈ O ₄	-	+	+
32	15.653	3-Phenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂ / C ₉ H ₁₀ O ₃	-	-	+
33	16.102	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	+	+	-
34	16.215	4-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	+	-	-
35	16.631	Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	+	-	-
36	16.917	Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	+	-	-
34	17.214	1-(Trimethylsiloxy)-2-methoxy-4-(1-trimethylsiloxyethenyl)-benzene	C ₁₅ H ₂₆ O ₃ Si ₂	-	+	+
35	17.598	4-Hydroxyhydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	+	+	+
36	17.641	Vanillic Acid	C ₈ H ₈ O ₄	+	+	+
37	18.241	Dihydroconiferyl Alcohol	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	+	+	-
38	18.484	Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	+	+	+
40	18.981	Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	+	-	-
41	19.035	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	+	+
42	19.148	4-Hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O	-	+	+
43	19.478	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	+	-	+
44	20.326	Vanillactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	+	+	+
45	20.428	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	+	+	+
46	21.271	Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	+	-	-
47	21.336	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	+	+	-
48	21.746	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	-	-
49	22.206	Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	+	+
50	23.843	Arachidic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	+	-	-

Table S2. Compounds identified by GC-MS in the supernatant of cultures from the KL consortium and negative control (KL) collected on days two and four of cultivation.

No.	RT (min)	Identified compounds	Molecular formula	Control	KL_2	KL_4
1	6.697	2,3-Butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	-	-	+
2	7.166	1,3-Propanediol	C ₃ H ₈ O ₂	-	+	+
3	7.258	Lactic Acid	C ₃ H ₆ O ₃	+	-	-
4	7.555	Acetic acid	CH ₃ COOH	-	+	+
5	8.684	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	-	+	+
6	9.451	Butanoic acid, 2-methyl	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	+	+
7	10.424	Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	+	+	+
8	11.439	Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	-	-	+
9	11.893	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	-	+	+
10	15.502	Pentanedioic acid	C ₅ H ₈ O ₄	-	+	+
11	15.605	Hydrocinnamic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	-	-	+
12	15.977	Acetovanillone	C ₉ H ₁₀ O ₃	+	-	-
13	16.669	2,6-dimethoxybenzene-1,4-bis(trimethylsilyloxy)	C ₁₄ H ₂₆ O ₄ Si ₂	-	+	+
14	16.885	Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	+	+	+
15	17.020	Homovanillyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O ₃	-	+	+
18	17.592	Isovanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	+	+	+
19	18.203	Dihydroconiferyl Alcohol	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	+	+	+
20	18.343	4'-(Salicylideneamino)acetanilide	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	-	-	+
21	18.884	Vanillylmandelic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	-	-	+
22	19.018	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	+	-	-
23	19.780	3-Vanil-1,2-bis(trimethylsilyloxy)propane	C ₁₉ H ₃₈ O ₄ Si ₃	-	+	+
24	20.277	Vanillactic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	+	+	+
25	20.407	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	+	+	+
26	21.293	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	+	-
27	22.162	Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	+	+	+

28	29.223	2,5-Dimethoxymandelic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	+	-	+
----	--------	----------------------------	--	---	---	---

References

1. Abdelaziz, O.Y.; Al-Rabiah, A.A.; El-Halwagi, M.M.; Hulteberg, C.P. Conceptual Design of a Kraft Lignin Biorefinery for the Production of Valuable Chemicals via Oxidative Depolymerization. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 8823–8829, doi:10.1021/acssuschemeng.0c02945.
2. Mendes, I.V.; Garcia, M.B.; Bitencourt, A.C.A.; Santana, R.H.; de Castro Lins, P.; Silveira, R.; Simmons, B.A.; Gladden, J.M.; Kruger, R.H.; Quirino, B.F. Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0255083.
3. Alekhina, M.; Ershova, O.; Ebert, A.; Heikkinen, S.; Sixta, H. Softwood kraft lignin for value-added applications: Fractionation and structural characterization. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *66*, 220–228, doi:10.1016/j.indcrop.2014.12.021.
4. Xie, M.; Zhang, J.; Tschaplinski, T.J.; Tuskan, G.A.; Chen, J.G.; Muchero, W. Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1–9, doi:10.3389/fpls.2018.01427.
5. Li, T.; Takkellapati, S. The current and emerging sources of technical lignins and their applications. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **2018**, *12*, 756–787, doi:10.1002/bbb.1913.
6. Kienberger, M.; Maitz, S.; Pichler, T.; Demmelmayer, P. Systematic review on isolation processes for technical lignin. *Processes* **2021**, *9*, doi:10.3390/pr9050804.
7. Becker, J.; Wittmann, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107360, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.016.
8. Rammala, B.; Zhou, N. Biotechnology for Biofuels Looking into the world ' s largest elephant population in search of ligninolytic microorganisms for biorefineries : a mini - review. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **2022**, 1–14, doi:10.1186/s13068-022-02159-1.
9. Silva, E.A.B. da; Zabkova, M.; Araújo, J.D.; Cateto, C.A.; Barreiro, M.F.; Belgacem, M.N.; Rodrigues, A.E. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chem. Eng. Res. Des.* **2009**, *87*, 1276–1292, doi:10.1016/j.cherd.2009.05.008.
10. Rinaldi, R.; Jastrzebski, R.; Clough, M.T.; Ralph, J.; Kennema, M.; Bruijninx, P.C.A.; Weckhuysen, B.M. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 8164–8215, doi:10.1002/anie.201510351.
11. Dessbesell, L.; Paleologou, M.; Leitch, M.; Pulkki, R.; Xu, C. (Charles) Global

- lignin supply overview and kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2020, *123*, 109768.
12. Liu, Z.H.; Xie, S.; Lin, F.; Jin, M.; Yuan, J.S. Combinatorial pretreatment and fermentation optimization enabled a record yield on lignin bioconversion. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 1–20, doi:10.1186/s13068-018-1021-3.
 13. Lee, S.; Kang, M.; Bae, J.H.; Sohn, J.H.; Sung, B.H. Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 1–18, doi:10.3389/fbioe.2019.00209.
 14. Beckham, G.T.; Johnson, C.W.; Karp, E.M.; Salvachúa, D.; Vardon, D.R. Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 40–53, doi:10.1016/j.copbio.2016.02.030.
 15. Xu, Z.; Lei, P.; Zhai, R.; Wen, Z.; Jin, M. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: Microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 1–19, doi:10.1186/s13068-019-1376-0.
 16. Linger, J.G.; Vardon, D.R.; Guarnieri, M.T.; Karp, E.M.; Hunsinger, G.B.; Franden, M.A.; Johnson, C.W.; Chupka, G.; Strathmann, T.J.; Pienkos, P.T.; et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, doi:10.1073/pnas.1410657111.
 17. Wang, L.; Hatem, A.; Catalyurek, U. V.; Morrison, M.; Yu, Z. Metagenomic insights into the carbohydrate-active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0078507.
 18. Jose, V.L.; Appoorthy, T.; More, R.P.; Arun, A.S. Metagenomic insights into the rumen microbial fibrolytic enzymes in Indian crossbred cattle fed finger millet straw. *AMB Express* **2017**, doi:10.1186/s13568-016-0310-0.
 19. Ticona, A.R.P.; Ullah, S.F.; Hamann, P.R.V.; Lopes, F.A.C.; Noronha, E.F. *Paenibacillus barengoltzii* A1_50L2 as a Source of Plant Cell Wall Degrading Enzymes and Its Use on Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization* **2020**, doi:10.1007/s12649-020-00975-w.
 20. Bernard-Vailhe, M.A.; Besle, J.M.; Dore, J. Transformation of ¹⁴C-lignin-labeled cell walls of wheat by *Syntrophococcus sucromutans*, *Eubacterium oxidoreducens*, and *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 379–381, doi:10.1128/aem.61.1.379-381.1995.
 21. Beloqui, A.; Pita, M.; Polaina, J.; Martínez-Arias, A.; Golyshina, O. V.; Zumárraga, M.; Yakimov, M.M.; García-Arellano, H.; Alcalde, M.; Fernández, V.M.; et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22933–22942, doi:10.1074/jbc.M600577200.
 22. Baba, Y.; Matsuki, Y.; Mori, Y.; Suyama, Y.; Tada, C.; Fukuda, Y.; Saito, M.; Nakai, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass by cattle rumen fluid for methane

- production: Bacterial flora and enzyme activity analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**, *123*, 489–496, doi:10.1016/j.jbiosc.2016.11.008.
23. Ufarté, L.; Potocki-Veronese, G.; Cecchini, D.; Tauzin, A.S.; Rizzo, A.; Morgavi, D.P.; Cathala, B.; Moreau, C.; Cleret, M.; Robe, P.; et al. Highly promiscuous oxidases discovered in the bovine rumen microbiome. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2018.00861.
 24. Scully, E.D.; Geib, S.M.; Hoover, K.; Tien, M.; Tringe, S.G.; Barry, K.W.; Glavina del Rio, T.; Chovatia, M.; Herr, J.R.; Carlson, J.E. Metagenomic Profiling Reveals Lignocellulose Degrading System in a Microbial Community Associated with a Wood-Feeding Beetle. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–22, doi:10.1371/journal.pone.0073827.
 25. Lacerda Júnior, G. V.; Noronha, M.F.; de Sousa, S.T.P.; Cabral, L.; Domingos, D.F.; Sáber, M.L.; de Melo, I.S.; Oliveira, V.M. Potential of semiarid soil from Caatinga biome as a novel source for mining lignocellulose-degrading enzymes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, doi:10.1093/femsec/fiw248.
 26. Žifčáková, L.; Větrovský, T.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Howe, A.; Baldrian, P. Feed in summer, rest in winter: microbial carbon utilization in forest topsoil. *Microbiome* **2017**, doi:10.1186/s40168-017-0340-0.
 27. Wilhelm, R.C.; Singh, R.; Eltis, L.D.; Mohn, W.W. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *ISME J.* **2019**, *13*, 413–429, doi:10.1038/s41396-018-0279-6.
 28. Ravi, K.; Abdelaziz, O. Y.; Nöbel, M.; García-Hidalgo, J.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Hultberg, C.P.; Lidén, G. Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, doi:10.1186/s13068-019-1397-8.
 29. Wu, Y.R.; He, J. Characterization of anaerobic consortia coupled lignin depolymerization with biomethane generation. *Bioresour. Technol.* **2013**, doi:10.1016/j.biortech.2013.03.103.
 30. Tomani, P. The lignoboost process. *Cellul. Chem. Technol.* **2010**, *44*, 53–58.
 31. Hamann, P.R. V.; Serpa, D.L.; Barreto da Cunha, A.S.; de Camargo, B.R.; Osiro, K.O.; Valle de Sousa, M.; Felix, C.R.; Miller, R.N.G.; Noronha, E.F. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2015**, *105*, 97–105, doi:10.1016/j.ibiod.2015.08.013.
 32. 1974, C. No Title. In *Technical section standard method H5P*; Canadian Pulp and Paper Association: Montreal, Canada, 1974.
 33. Raj, A.; Chandra, R.; Reddy, M.M.K.; Purohit, H.J.; Kapley, A. Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 793–799, doi:10.1007/s11274-006-9299-x.
 34. Ullah, S.F.; Souza, A.A.; Hamann, P.R. V.; Ticona, A.R.P.; Oliveira, G.M.; Barbosa,

- J.A.R.G.; Freitas, S.M.; Noronha, E.F. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *127*, 385–395, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.057.
35. Raj, A.; Krishna Reddy, M.M.; Chandra, R. Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, doi:10.1016/j.ibiod.2006.09.006.
 36. Simon Andrews No Title Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on Aug 1, 2022).
 37. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
 38. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from highthroughput sequencing reads. *ENBnet J.* 2011, 17:10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
 39. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
 40. Bokulich, N.A.; Kaehler, B.D.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.A.; Gregory Caporaso, J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **2018**, *6*, 1–17, doi:10.1186/s40168-018-0470-z.
 41. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 590–596, doi:10.1093/nar/gks1219.
 42. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
 43. Wickham, H.; François, R.; Henry, L.; Müller, K. Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. 2021. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr> .
 44. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P.R.; OOHara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Henry, M.; et al. *Vegan Community Ecology Package*. Package *Vegan* Vers. 2.2-1; World Agroforestry Centre: Nairobi, Kenya, 2015.
 45. Wickham, H. *Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York. 2009. <http://ggplot2.org> .
 46. Langille, M.G.I.; Zaneveld, J.; Caporaso, J.G.; McDonald, D.; Knights, D.; Reyes,

- J.A.; Clemente, J.C.; Burkepille, D.E.; Vega Thurber, R.L.; Knight, R.; et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 814–821, doi:10.1038/nbt.2676.
47. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3123–3124, doi:10.1093/bioinformatics/btu494.
 48. Caspi, R.; Billington, R.; Keseler, I.M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Midford, P.E.; Ong, W.K.; Paley, S.; Subhraveti, P.; Karp, P.D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D455–D453, doi:10.1093/nar/gkz862.
 49. Shi, Y.; Yan, X.; Li, Q.; Wang, X.; Liu, M.; Xie, S.; Chai, L.; Yuan, J. Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. *Process Biochem.* **2017**, *52*, 238–242, doi:10.1016/j.procbio.2016.10.004.
 50. Kumar, R.; Singh, A.; Maurya, A.; Yadav, P.; Yadav, A.; Chowdhary, P.; Raj, A. Effective bioremediation of pulp and paper mill wastewater using *Bacillus cereus* as a possible kraft lignin-degrading bacterium. *Bioresour. Technol.* **2022**, *352*, doi:10.1016/j.biortech.2022.127076.
 51. Chandra, R.; Abhishek, A.; Sankhwar, M. Bacterial decolorization and detoxification of black liquor from rayon grade pulp manufacturing paper industry and detection of their metabolic products. *Bioresour. Technol.* **2011**, doi:10.1016/j.biortech.2011.03.048.
 52. Ojha, A.K.; Tiwari, M. Lignin Decolorization and Degradation of Pulp and Paper Mill Effluent by Ligninolytic Bacteria. *Iran. J. Energy Environ.* **2016**, *7*, 282–293, doi:10.5829/idosi.ijee.2016.07.03.11.
 53. Duan, J.; Liang, J.; Wang, Y.; Du, W.; Wang, D. Kraft lignin biodegradation by *Dysgonomonas* sp. WJDL-Y1, a new anaerobic bacterial strain isolated from sludge of a pulp and paper mill. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, doi:10.4014/jmb.1602.02014.
 54. Baghel, S.; Anandkumar, J. Biodepolymerization of Kraft lignin for production and optimization of vanillin using mixed bacterial culture. *Bioresour. Technol. Reports* **2019**, *8*.
 55. Shi, Y.; Chai, L.; Tang, C.; Yang, Z.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Jing, Q. Biochemical investigation of kraft lignin degradation by *Pandora* sp. B-6 isolated from bamboo slips. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, doi:10.1007/s00449-013-0972-9.
 56. 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. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 55–62, doi:10.1111/lam.12508.
 57. Zhu, D.; Zhang, P.; Xie, C.; Zhang, W.; Sun, J.; Qian, W.J.; Yang, B. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. *Biotechnol. Biofuels*

- 2017, doi:10.1186/s13068-017-0735-y.
58. Lam, T.B.T.; Kadoya, K.; Iiyama, K. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: Ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 987–992, doi:10.1016/S0031-9422(01)00052-8.
 59. Hernández, M.; Rodríguez, J.; Pérez, M.I.; Ball, A.S.; Arias, M.E. ¹³C NMR cross polarization and magic angle spinning (CPMAS) and gas chromatography/mass spectrometry analysis of the products from a soda pulp mill effluent decolourised by two *Streptomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 272–278, doi:10.1007/s002530050926.
 60. Mu, W.; Yang, Y.; Jia, J.; Zhang, T.; Jiang, B. Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007 fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, doi:10.1016/j.jbiosc.2009.10.005.
 61. Mihal', M.; Červeňanský, I.; Markoš, J.; Rebros, M. Bioproduction of phenylacetic acid in airlift reactor by immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Chem. Pap.* **2017**, *71*, 103–118, doi:10.1007/s11696-016-0062-y.
 62. Zhu, Y.; Wang, Y.; Xu, J.; Chen, J.; Wang, L.; Qi, B. Enantioselective biosynthesis of L-phenyllactic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli*. *Molecules* **2017**, *22*, 1–11, doi:10.3390/molecules22111966.
 63. Moraes, E.C.; Alvarez, T.M.; Persinoti, G.F.; Tomazetto, G.; Brenelli, L.B.; Paixão, D.A.A.; Ematsu, G.C.; Aricetti, J.A.; Caldana, C.; Dixon, N.; et al. Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 1–16, doi:10.1186/s13068-018-1073-4.
 64. Deangelis, K.M.; D'Haeseleer, P.; Chivian, D.; Fortney, J.L.; Khudyakov, J.; Simmons, B.; Woo, H.; Arkin, A.P.; Davenport, K.W.; Goodwin, L.; et al. Complete genome sequence of “enterobacter lignolyticus” SCF1. *Stand. Genomic Sci.* **2011**, doi:10.4056/sigs.2104875.
 65. Garlant, L.; Koskinen, P.; Rouhiainen, L.; Laine, P.; Paulin, L.; Auvinen, P.; Holm, L.; Pirhonen, M. Genome sequence of *dickeya solani*, a new soft rot pathogen of potato, suggests its emergence may be related to a novel combination of non-ribosomal peptide/polyketide synthetase clusters. *Diversity* **2013**, *5*, 824–842, doi:10.3390/d5040824.
 66. Yang, Y.J.; Lin, W.; Singh, R.P.; Xu, Q.; Chen, Z.; Yuan, Y.; Zou, P.; Li, Y.; Zhang, C. Genomic, transcriptomic and enzymatic insight into lignocellulolytic system of a plant pathogen *dickeya* sp. WS52 to digest sweet pepper and tomato stalk. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9120753.
 67. Brink, D.P.; Ravi, K.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M.F. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019.

68. Ravi, K.; García-Hidalgo, J.; Brink, D.P.; Skyvell, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Lidén, G. Physiological characterization and sequence analysis of a syringate-consuming Actinobacterium. *Bioresour. Technol.* **2019**, doi:10.1016/j.biortech.2019.121327.
69. Hackett, W.F.; Connors, W.J.; Kirk, T.K.; Zeikus, J.G. Microbial decomposition of synthetic ¹⁴C labeled lignins in nature: lignin biodegradation in a variety of natural materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 43–51, doi:10.1128/aem.33.1.43-51.1977.
70. Benner, R.; Maccubbin, A.E.; Hodson, R.E. Anaerobic Biodegradation of the Lignin and Polysaccharide Components of Lignocellulose and Synthetic Lignin by Sediment Microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47*, 998–1004, doi:10.1128/aem.47.5.998-1004.1984.
71. Young, L.Y.; Frazer, A.C. *The fate of lignin and lignin-derived compounds in anaerobic environments*; 1987; Vol. 5; ISBN 7777777777.
72. Dittmar, T.; Lara, R.J. Molecular evidence for lignin degradation in sulfate-reducing mangrove sediments (Amazônia, Brazil). *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65*, 1417–1428, doi:10.1016/S0016-7037(00)00619-0.

CAPÍTULO 3.

Isolamento de Bactérias a partir de consórcios lignolíticos e identificação taxonômica

1. Introdução

A lignina kraft, produzida pelas indústrias de polpação, é o subproduto mais abundante mundialmente (~130 milhões de toneladas) e a sua utilização para a produção de químicos com alto valor agregado poderia favorecer a sua valorização como matéria-prima [87].

A hidrólise é a primeira etapa e a mais desafiadora no processo de conversão de lignina em produtos valiosos [9]. Os fungos de podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, tem sido estudado por décadas e são conhecidos como os principais degradadores de lignina [88,89]. No entanto, a baixa adaptabilidade a temperatura, pH e condições anóxicas, limitam a sua utilização na indústria. As bactérias por outro lado, são muito mais tolerantes a condições adversas além de possuírem vias metabólicas que transformam a lignina e seus derivados aromáticos em produtos de interesse comercial [90,91].

A capacidade de desconstrução de lignina e seus derivados aromáticos por diferentes espécies de bactérias anaeróbicas obrigatórias/facultativas, como *Enterobacter lignolyticus SCF1*, *Tolomonas lignolytica BRL6-1*, *Klebsiella sp. BRL6-2*, *Acetoanaerobium sp. WJDL-Y2* e *Desulfobacterium catecholicum*, já foi reportada literatura. No entanto, esses estudos são limitados e os genes de enzimas e vias metabólicas utilizados durante o processo de degradação são pouco conhecidos [12,71–73,76].

Identificar bactérias e explorar os mecanismos empregados na degradação de lignina poderia auxiliar na compreensão do processo de desconstrução anaeróbica de lignina e assim aumentar o repertório de microrganismos e genes que poderiam ser utilizados em processos industriais para transformação de lignina em produtos com alto valor agregado. Dessa forma, este estudo tem como objetivo isolar bactérias a partir de consórcios microbianos lignolíticos derivados do rúmen de bovinos e caracterizar o seu potencial na desconstrução de lignina kraft. Esses dados servirão como base para futuras análises de sequenciamento e montagem de genomas para identificação de genes de enzimas relacionadas com a degradação e consumo de lignina.

2. Material e Métodos

2.1. Isolamento de bactérias

Para o isolamento de bactérias foram utilizadas amostras do segundo dia de cultivo dos consórcios KLY_2 e KL_2 (obtidas conforme descrito no capítulo 2) e o protocolo utilizado foi o de Ticona et al. (2020) [92]. Alíquotas de 100 µL dessas culturas foram inoculadas em frascos contendo meio redutor sólido: NH_2PO_4 (5 g l⁻¹), Na_2HPO_4 (2.5 g l⁻¹), NH_4Cl (0.5 g l⁻¹), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g l⁻¹), NaHCO_3 (0.5 g l⁻¹), MgCl_2 (0.09 g l⁻¹), solução mineral (5.0 mL), solução de vitamina (0.5 mL), NaOH (0.04 g l⁻¹), $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$ (0.125 g l⁻¹), cisteína (0.05 g l⁻¹), fitagel 15 (g l⁻¹), lignina kraft 0,35% (p/v) como fonte de carbono suplementado adicionado ou não com 3g/L de extrato de levedura sob atmosfera anaeróbica. Após 2 dias de incubação a 37°C, as colônias bacterianas que cresceram passaram por avaliação visual e as que apresentaram diferenças morfológicas foram coletadas individualmente e re-inoculadas em meio sólido redutor, por semeadura, sob atmosfera anaeróbica. Esse procedimento foi repetido três vezes. Os isolados obtidos foram armazenados a -80°C em glicerol a 20% (v/v) para futuras análises.

2.2. Curva de crescimento e medição de redução de cor

Os isolados bacterianos obtidos como acima descrito foram cultivados individualmente em frascos contendo meio líquido redutor: NH_2PO_4 (5 g l⁻¹), Na_2HPO_4 (2.5 g l⁻¹), NH_4Cl (0.5 g l⁻¹), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g l⁻¹), NaHCO_3 (0.5 g l⁻¹), MgCl_2 (0.09 g l⁻¹), solução mineral (5.0 mL), solução de vitamina (0.5 mL), NaOH (0.04 g l⁻¹), $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$ (0.125 g l⁻¹), cisteína (0.05 g l⁻¹), extrato de levedura (3g l⁻¹) e lignina kraft 0,35% (p/v) com e sem glicose 0,5% (p/v) como fontes de carbono sob atmosfera anaeróbica [92]. Como controle negativo do crescimento foi utilizado o meio de cultura sem a adição do inóculo, mas submetido às mesmas condições de crescimento dos meios inoculados. O crescimento foi realizado a 37°C em estufa durante quatro dias. O cultivo foi feito em triplicata e a cada 24 horas foram

retiradas alíquotas para a medição da densidade óptica (OD a 600 nm) e avaliação de descoloração do meio de cultivo (465 nm) conforme descrito no capítulo 2 no item 2.2.

2.3. Identificação dos isolados bacterianos através do 16S rRNA

O DNA genômico dos isolados foi extraído como descrito no capítulo 2 no item 2.5. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'). Para a reação de amplificação foram utilizados: 20 ng de DNA genômico, 2,0 µL de Tampão 10X (Cellco, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (TaqPol Hot Start /Cellco, Brasil), 0,2 mM dNTPs (Sinapse inc, Brasil), 0,5 µM de cada primer (forward e reverse) no volume final de 20 µL. As condições de temperatura e ciclagem da reação de PCR foram: desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido de 27 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e as bandas correspondentes à região amplificada (1400 pb) foram cortadas do gel. A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando o Kit *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram enviadas para sequenciamento, do tipo Sanger, na empresa Omikka em Paulínea, São Paulo. Apenas três das quatro amostras dos isolados foram sequenciadas, pois apresentaram concentração de DNA exigida pela empresa (entre 10 e 50 ng/µL) para sequenciamento.

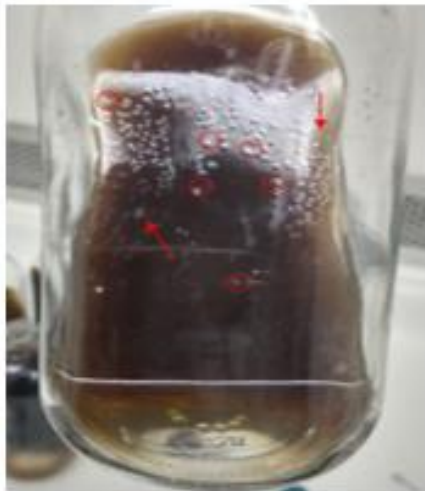
As sequências recebidas foram analisadas no programa *Electropherogram quality analysis* (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e somente as sequências com 'Phred score' maior que 30 foram mantidas. Em seguida, as sequências foram comparadas com sequências de nucleotídeos do banco de dados do "16S ribosomal RNA Database" do GenBank (*National Center for Biotechnology Information*), usando a ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Resultados

3.1. Isolamento de bactérias

O total de 150 colônias com coloração branca, brilhosa, superfície lisa e formato circular cresceram a partir do inóculo do consórcio KLY_2 em meio redutor sólido contendo lignina kraft e extrato de levedura (Figura 1 A). Entre estas, dez foram coletadas para isolamento e destas, três apresentaram crescimento em meio de cultivo líquido contendo lignina kraft como fonte de carbono, sendo denominadas de: IY1_1, IY2_9 e IY2_3. Para o consórcio KL_2 cultivado no meio sólido contendo lignina kraft, foi obtido um menor número de colônias, 32, com as características morfológicas: transparente, brilhosa e superfície lisa, circulares e com bordas levemente irregulares (Figura 1 B). Destas, sete foram selecionadas para isolamento e apenas uma, designada como IL2_3, foi capaz de crescer em meio líquido.

A)



B)

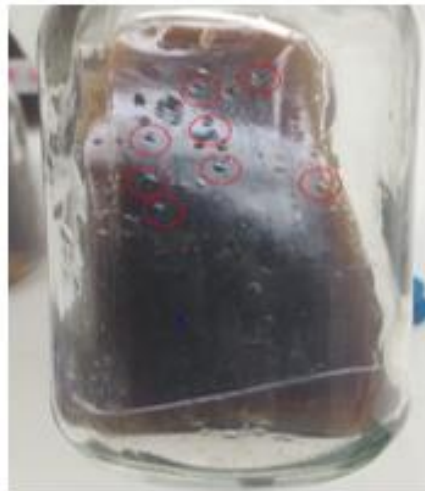


Figura 1. Colônias isoladas em meio contendo lignina Kraft e extrato de levedura como fonte de carbono (A); Colônias isoladas em meio contendo lignina Kraft (B). As culturas foram

crescidas por dois dias. Os círculos e as e as setas em vermelho indicam as colônias bacterianas.

3.2. Análise do crescimento e descoloração do meio de cultivo

Os isolados IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3, obtidos do meio sólido redutor contendo lignina kraft como única fonte de carbono, não foram capazes de crescer e descolorir o meio de cultura na ausência de glicose (dados não mostrados). A adição de glicose aos meios possibilitou o crescimento dos isolados IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3 que atingiram OD₆₀₀ nm máxima no terceiro dia de cultivo (Figura 2A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimentos dos isolados (Figura 2A).

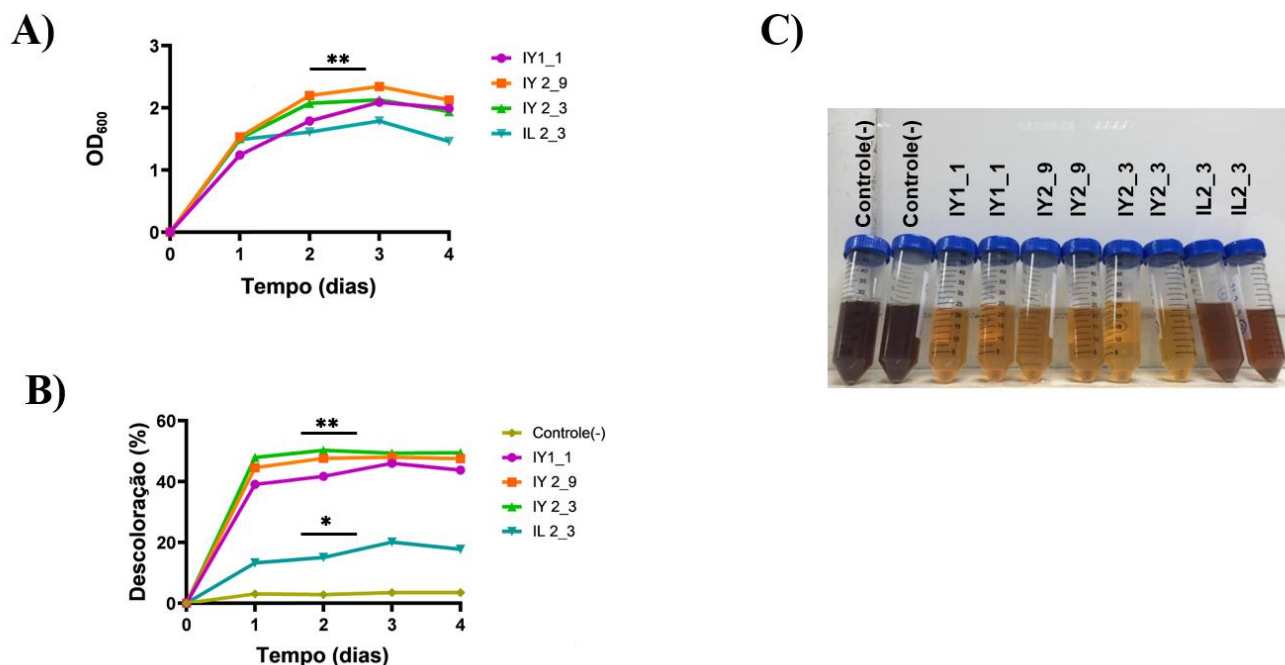


Figura 2. Curva de crescimento (A) e análise da descoloração do meio de cultivo (B) dos isolados IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3 cultivados em meio cultura líquido contendo lignina kraft e glicose como fonte de carbono durante quatro dias de crescimento. C) Análise visual da descoloração do meio de cultivo dos IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3 coletados no quarto

dia de cultivo. Barras verticais representam o desvio padrão de triplicatas. (*) $p < 0,05$ e (**) $p > 0,05$.

Houve diferença na taxa de descoloração do meio de cultivo líquido contendo lignina kraft e glicose como fontes de carbono dos isolados obtidos do consórcio KLY_2 com relação ao isolado obtido do consórcio KL_2 (Figura 2B). No primeiro dia de crescimento os isolados IY1_1, IY2_9 e IY2_3 reduziram a coloração do meio em 45%, 48% e 49% , respectivamente, enquanto o isolado IL2_3 descoloriu 20% da lignina, no terceiro dia de cultivo (Figura 2C).

3.3. Identificação taxonômica

Somente as sequências *forward* (~650 pb) do gene 16S rRNA dos isolados IY2_9 e IL2_3 apresentaram ‘*Phred score*’ menor do que 30. A comparação das sequências desses isolados com sequências do NCBI do BLAST mostraram identidades (>98%) com o gênero de *Enterococcus* para o isolado IY2_9 e a família *Enterobacteriaceae* para o isolado IL2_9, alguns representantes são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Comparação das sequências parciais de do gene 16S rRNA dos isolados IY2_9 e IL2_3 com sequências do banco de dados *16S ribosomal RNA Database* do GenBank. usando a ferramenta BLASTn.

Isolado	Organismos	Identidade (%)	Score	Cobertura (%)	Número de acesso
IY2_9	<i>Enterococcus durans</i>	99,84	1179	100	NR_036922.1
	<i>Enterococcus faecium</i>	99,53	1168	100	NR_114742.1
	<i>Enterococcus lactis</i>	99,53	1168	100	NR_117562.1
IL2_3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,72	1301	100	NR_037084.1
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	99,44	1293	100	NR_134062.1
	<i>Klebsiella africana</i>	99,44	1290	100	NR_180233.1
	<i>Klebsiella variicola</i>	99,44	1290	100	NR_025635.1

<i>Klebsiella aerogenes</i>	99,01	1273	100	NR_102493.2
<i>Enterobacter bugandensis</i>	99,01	1273	100	NR_148649.1
<i>Kosakonia quasisacchari</i>	98,45	1251	100	NR_169476.1
<i>Lelliottia aquatilis</i>	98,45	1251	100	NR_179968.1
<i>Raoultella terrigena</i>	98,45	1251	100	NR_114503.1
<i>Pseudescherichia vulneris</i>	98,31	1245	100	NR_114080.1
<i>Yokenella regensburgei</i>	98,17	1242	100	NR_114159.1
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98,03	1234	100	NR_104933.1

4. Discussão

A relação entre adição de outra fonte de carbono e a desconstrução de lignina já foi previamente descrita [93–96]. Como por exemplo, para a bactéria anaeróbia facultativa *E. lignolyticus* SCF1, para a qual a suplementação do meio com xilose foi fundamental para aumentar a formação de biomassa celular e proporcionar o consumo de lignina [80].

A adição de glicose fez com que as taxas de descoloração do meio de cultura redutor, mesmo se tratando de bactérias isoladas (IY1_1 (45%), IY2_9 (48%) e IY2_3 (49%)), fossem maiores do que a do consórcio enriquecido KLY (40%), utilizado como inóculo para o isolamento. Como discutido anteriormente no capítulo 2, a descoloração do meio de cultivo pode ser diretamente correlacionada com a biodegradação de lignina [97]. Estudos anteriores demonstraram que as enzimas manganês peroxidase e lacase tem um papel importante nesse processo [98–100]. Desta forma, este parece ser um dos mecanismos pelo qual estes isolados bacterianos degradam a lignina em atmosfera anaeróbica. A menor taxa de descoloração do meio de cultura pelo IL 2_3 pode estar relacionada com o seu baixo potencial de degradação de lignina isoladamente. No entanto, será necessário investigar essa hipótese.

O par de *primers* 27F e 1492R amplifica sequências quase completas de 16S rDNA (1400 pb) que fornecem uma melhor resolução taxonômica [101]. No entanto, a utilização de apenas parte dessa sequência (~650 pb) limitou essa resolução para os isolados IY2_9 e IL2_3, permitindo fazer apenas uma identificação preliminar do gênero *Enterococcus* para o isolado IY2_9 e família *Enterobacteriaceae* para o isolado IL2_3. Alguns representantes da família *Enterobacteriaceae* [80,102] são descritos como capazes de degradar a lignina e seus

derivados aromáticos na presença do oxigênio como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* isolada do rúmen de búfalos foi capaz de degradar 11,1% da estrutura da lignina (lignossulfonato de sódio) e apresentou atividades de lacase e lignina peroxidase [103]. Esta mesma espécie é capaz de transformar vanilina em álcool vanílico além de degradar compostos como o álcool vanílico e o siringaldeído em condições aeróbias [104]. Para o gênero dos *Enterococcus* não foram encontrados representantes relacionados a desconstrução de lignina.

5. Conclusão

Os isolados IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3 possuem potencial para a degradação de lignina, uma vez que foram capazes de crescer e descolorir o meio de cultura redutor contendo lignina kraft e glicose como fontes de carbono. A caracterização taxonômica dos isolados IY2_9 e IL2_3 permitiu identificá-los como membros do gênero *Enterococcus* e família *Enterobacteriaceae*, respectivamente. No entanto, esses dados são resultados preliminares e será necessário o uso de técnicas analíticas, como o GC/MS e o FTIR, para identificar os produtos de degradação de lignina presentes no sobrenadante das culturas e identificação taxonômica das espécies dos isolados.

Conclusão geral

As condições de cultivo utilizadas neste trabalho permitiram estabelecer consórcios microbianos capazes de desconstruir e consumir a lignina kraft. O gênero *Dickeya* parece desempenhar um papel central na degradação de lignina, pois foi um dos mais enriquecidos nos consórcios KLY e KL. Além disso, a presença de ASVs classificados como desconhecidos nos consórcios sugere a presença de bactérias ainda não descritas relacionadas à degradação de lignina. A análise de GC-MS dos sobrenadantes das culturas demonstrou o potencial dos consórcios para metabolizar os produtos de degradação de lignina, possivelmente através das vias metabólicas previstas, como a via de degradação do protocatecuato II e a via de degradação do metilgalato. Muitos compostos aromáticos produzidos pelos consórcios, como os ácidos 3-fenilático e 4-hidroxifenilático, possuem potencial biotecnológico. Além disso, foram isoladas quatro bactérias IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3 a partir desses consórcios que foram capazes de descolorir o meio de cultura redutor contendo glicose e lignina kraft como fontes de carbono. A taxa de descoloração do meio de cultura dos isolados IY1_1 (45%), IY2_9 (48%) e IY2_3 (49%) foram maiores do que a do consórcio o consórcio enriquecido KLY (40%), utilizado como inóculo para o isolamento. Os isolados IY2_9 e IL2_3 foram identificados como membros do gênero *Enterococcus* e família *Enterobacteriaceae*, respectivamente.

Perspectivas Gerais

- Fazer a análise do metagenôma dos consórcios KLY e KL para identificar genes e vias metabólicas relacionadas com a degradação de lignina;
- Montar os genomas das ASVs classificadas como desconhecidas;
- Avaliar o potencial dos consórcios KLY e KL na desconstrução de outras ligninas técnicas, como a organosolv;
- Utilizar técnicas analíticas, como o GC/MS e o FTIR, para avaliar o potencial de degradação de lignina dos isolados IY1_1, IY2_9, IY2_3 e IL2_3;
- Testar diferentes condições de cultivo para o isolado IL2_3 e analisar o co-cultivo com os outros isolados;
- Identificar as espécies dos isolados;
- Sequenciar os genomas dos isolados.

Referências

1. Alekhina, M.; Ershova, O.; Ebert, A.; Heikkinen, S.; Sixta, H. Softwood kraft lignin for value-added applications: Fractionation and structural characterization. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *66*, 220–228, doi:10.1016/j.indcrop.2014.12.021.
2. Bhowmick, G. De; Sarmah, A.K.; Sen, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresour. Technol.* **2018**, *247*, 1144–1154.
3. Takkellapati, S.; Li, T.; Gonzalez, M.A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Technol. Environ. Policy* **2018**, *20*, 1615–1630, doi:10.1007/s10098-018-1568-5.
4. Saini, J.K.; Gupta, R.; Hemansi; Verma, A.; Gaur, P.; Saini, R.; Shukla, R.; Kuhad, R.C. *Integrated Lignocellulosic Biorefinery for Sustainable Bio-Based Economy*; Springer International Publishing, 2019; ISBN 9783319947976.
5. Dessbesell, L.; Paleologou, M.; Leitch, M.; Pulkki, R.; Xu, C. (Charles) Global lignin supply overview and kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *123*, 109768.
6. Abdelaziz, O.Y.; Al-Rabiah, A.A.; El-Halwagi, M.M.; Hulteberg, C.P. Conceptual Design of a Kraft Lignin Biorefinery for the Production of Valuable Chemicals via Oxidative Depolymerization. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 8823–8829, doi:10.1021/acssuschemeng.0c02945.
7. Rammala, B.; Zhou, N. Biotechnology for Biofuels Looking into the world ' s largest elephant population in search of ligninolytic microorganisms for biorefineries : a mini - review. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **2022**, 1–14, doi:10.1186/s13068-022-02159-1.

8. Vaz Jr, S.; Moraes, M.C.B.; Costa, E.S.; Borges, M.; Laumann, R.A.; Colodette, J.L. Estudo da Aplicação de Lignina Kraft em Formulação de Liberação Controlada para Manejo Integrado de Pragas. *Embrapa Agroenergia* **2018**, *17*, 46.
9. Linger, J.G.; Vardon, D.R.; Guarnieri, M.T.; Karp, E.M.; Hunsinger, G.B.; Franden, M.A.; Johnson, C.W.; Chupka, G.; Strathmann, T.J.; Pienkos, P.T.; et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, doi:10.1073/pnas.1410657111.
10. Davis, J.R.; Sello, J.K. Regulation of genes in Streptomyces bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 921–929, doi:10.1007/s00253-009-2358-0.
11. DeAngelis, K.M.; Allgaier, M.; Chavarria, Y.; Fortney, J.L.; Hugenholtz, P.; Simmons, B.; Sublette, K.; Silver, W.L.; Hazen, T.C. Characterization of trapped lignin-degrading microbes in tropical forest soil. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0019306.
12. Billings, A.F.; Fortney, J.L.; Hazen, T.C.; Simmons, B.; Davenport, K.W.; Goodwin, L.; Ivanova, N.; Kyrpides, N.C.; Mavromatis, K.; Woyke, T.; et al. Genome sequence and description of the anaerobic lignin-degrading bacterium Tolumonas lignolytica sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* **2015**, *10*, 1–11, doi:10.1186/s40793-015-0100-3.
13. Barapatre, A.; Jha, H. Degradation of alkali lignin by two ascomycetes and free radical scavenging activity of the products. *Biocatal. Biotransformation* **2017**, doi:10.1080/10242422.2017.1327953.
14. Bugg, T.D.H.; Ahmad, M.; Hardiman, E.M.; Singh, R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 394–400, doi:10.1016/j.copbio.2010.10.009.
15. Janusz, G.; Pawlik, A.; Sulej, J.; Świdorska-Burek, U.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Paszczyński, A. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 941–962, doi:10.1093/femsre/fux049.

16. Hess, M. Metagenomic Discovery of. *Science* (80-.). **2011**, *463*, 463–467, doi:10.1126/science.1200387.
17. Wang, L.; Hatem, A.; Catalyurek, U. V.; Morrison, M.; Yu, Z. Metagenomic insights into the carbohydrate-active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0078507.
18. Beloqui, A.; Pita, M.; Polaina, J.; Martínez-Arias, A.; Golyshina, O. V.; Zumárraga, M.; Yakimov, M.M.; García-Arellano, H.; Alcalde, M.; Fernández, V.M.; et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22933–22942, doi:10.1074/jbc.M600577200.
19. Silva, J.P.; Ticona, A.R.P.; Hamann, P.R.V.; Quirino, B.F.; Noronha, E.F. Deconstruction of lignin: From enzymes to microorganisms. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26082299.
20. Xie, M.; Zhang, J.; Tschaplinski, T.J.; Tuskan, G.A.; Chen, J.G.; Muchero, W. Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1–9, doi:10.3389/fpls.2018.01427.
21. Ralph, J. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 65–83, doi:10.1007/s11101-009-9141-9.
22. Ferreira, S.S.; Simões, M.S.; Carvalho, G.G.; de Lima, L.G.A.; Svartman, R.M. de A.; Cesarino, I. The lignin toolbox of the model grass *Setaria viridis*. *Plant Mol. Biol.* **2019**, *101*, 235–255, doi:10.1007/s11103-019-00897-9.
23. Li, C.; Zhao, X.; Wang, A.; Huber, G.W.; Zhang, T. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11559–11624, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00155.
24. Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 895–905, doi:10.1104/pp.110.155119.
25. Lourenço, A.; Pereira, H. Compositional Variability of Lignin in Biomass. In *Lignin*

- *Trends and Applications*; 2018.

26. Ponnusamy, V.K.; Nguyen, D.D.; Dharmaraja, J.; Shobana, S.; Banu, J.R.; Saratale, R.G.; Chang, S.W.; Kumar, G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour. Technol.* 2019.
27. Lu, Y.; Lu, Y.C.; Hu, H.Q.; Xie, F.J.; Wei, X.Y.; Fan, X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *J. Spectrosc.* 2017.
28. Abdelaziz, O.Y.; Brink, D.P.; Prothmann, J.; Ravi, K.; Sun, M.; García-Hidalgo, J.; Sandahl, M.; Hultberg, C.P.; Turner, C.; Lidén, G.; et al. Biological valorization of low molecular weight lignin. *Biotechnol. Adv.* 2016.
29. Chen, Z.; Wan, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *73*, 610–621, doi:10.1016/j.rser.2017.01.166.
30. Eraghi Kazzaz, A.; Fatehi, P. Technical lignin and its potential modification routes: A mini-review. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112732.
31. Jönsson, L.J.; Martín, C. Pretreatment of lignocellulose : Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* **2015**, doi:10.1016/j.biortech.2015.10.009.
32. Amin, F.R.; Khalid, H.; Zhang, H.; Rahman, S.; Zhang, R.; Liu, G.; Chen, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* **2017**, *7*, doi:10.1186/s13568-017-0375-4.
33. Yoo, C.G.; Meng, X.; Pu, Y.; Ragauskas, A.J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. *Bioresour. Technol.* **2020**, *301*, 122784, doi:10.1016/j.biortech.2020.122784.
34. Li, M.; Pu, Y.; Ragauskas, A.J. Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance. *Front. Chem.* 2016.

35. de la Torre, M.J.; Moral, A.; Hernández, M.D.; Cabeza, E.; Tijero, A. Organosolv lignin for biofuel. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *45*, 58–63, doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.002.
36. Baruah, J.; Nath, B.K.; Sharma, R.; Kumar, S. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–19, doi:10.3389/fenrg.2018.00141.
37. Tomani, P. The lignoboost process. *Cellul. Chem. Technol.* **2010**, *44*, 53–58.
38. Majumdar, S.; Lukk, T.; Solbiati, J.O.; Bauer, S.; Nair, S.K.; Cronan, J.E.; Gerlt, J.A. Roles of small laccases from streptomyces in lignin degradation. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4047–4058, doi:10.1021/bi500285t.
39. Mycroft, Z.; Gomis, M.; Mines, P.; Law, P.; Bugg, T.D.H. Biocatalytic conversion of lignin to aromatic dicarboxylic acids in *Rhodococcus jostii* RHA1 by re-routing aromatic degradation pathways. *Green Chem.* **2015**, *17*, 4974–4979, doi:10.1039/c5gc01347j.
40. Xu, Z.; Qin, L.; Cai, M.; Hua, W.; Jin, M. Biodegradation of kraft lignin by newly isolated *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, and *Ochrobactrum tritici* strains. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 14171–14181, doi:10.1007/s11356-018-1633-y.
41. Chauhan, P.S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101498, doi:10.1016/j.bcab.2020.101498.
42. Arregui, L.; Ayala, M.; Gómez-Gil, X.; Gutiérrez-Soto, G.; Hernández-Luna, C.E.; Herrera De Los Santos, M.; Levin, L.; Rojo-Domínguez, A.; Romero-Martínez, D.; Saparrat, M.C.N.; et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 1–33, doi:10.1186/s12934-019-1248-0.
43. Brugnari, T.; Braga, D.M.; dos Santos, C.S.A.; Torres, B.H.C.; Modkovski, T.A.; Haminiuk, C.W.I.; Maciel, G.M. Laccases as green and versatile biocatalysts: from

- lab to enzyme market—an overview. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8*, 1–29, doi:10.1186/s40643-021-00484-1.
44. Christopher, L.P.; Yao, B.; Ji, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. Energy Res.* **2014**, *2*, 1–13, doi:10.3389/fenrg.2014.00012.
 45. Kumar, A.; Chandra, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* **2020**, *6*, e03170, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03170.
 46. Zhang, W.; Wang, W.; Wang, J.; Shen, G.; Yuan, Y.; Yan, L.; Tang, H.; Wang, W. Isolation and characterization of a novel laccase for lignin degradation, LacZ1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, 1–14, doi:10.1128/AEM.01355-21.
 47. Higuchi, T. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2004**, *80*, 204–214, doi:10.2183/pjab.80.204.
 48. Falade, A.O.; Nwodo, U.U.; Iweriebor, B.C.; Green, E.; Mabinya, L. V.; Okoh, A.I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* **2017**, *6*, 1–14, doi:10.1002/mbo3.394.
 49. Singh, A.K.; Katari, S.K.; Umamaheswari, A.; Raj, A. In silico exploration of lignin peroxidase for unraveling the degradation mechanism employing lignin model compounds. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 14632–14653, doi:10.1039/d0ra10840e.
 50. Hofrichter, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 454–466, doi:10.1016/S0141-0229(01)00528-2.
 51. Xu, H.; Guo, M.Y.; Gao, Y.H.; Bai, X.H.; Zhou, X.W. Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the degradation of four dyes and phenol. *BMC Biotechnol.* **2017**, *17*, 1–12, doi:10.1186/s12896-017-0338-5.
 52. Alcalde, M. Engineering the ligninolytic enzyme consortium. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 155–162, doi:10.1016/j.tibtech.2014.12.007.

53. Wang, W.; Zhang, C.; Sun, X.; Su, S.; Li, Q.; Linhardt, R.J. Efficient, environmentally-friendly and specific valorization of lignin: promising role of non-radical lignolytic enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, doi:10.1007/s11274-017-2286-6.
54. Jung, D.H.; Kim, E.J.; Jung, E.; Kazlauskas, R.J.; Choi, K.Y.; Kim, B.G. Production of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by *Burkholderia glumae* BGR1. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 1493–1503, doi:10.1002/bit.25908.
55. Kallscheuer, N.; Vogt, M.; Kappelmann, J.; Krumbach, K.; Noack, S.; Bott, M.; Marienhagen, J. Identification of the phd gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1871–1881, doi:10.1007/s00253-015-7165-1.
56. Vardon, D.R.; Franden, M.A.; Johnson, C.W.; Karp, E.M.; Guarnieri, M.T.; Linger, J.G.; Salm, M.J.; Strathmann, T.J.; Beckham, G.T. Adipic acid production from lignin. *Energy Environ. Sci.* **2015**, *8*, 617–628, doi:10.1039/c4ee03230f.
57. Jung, D.H.; Choi, W.; Choi, K.Y.; Jung, E.; Yun, H.; Kazlauskas, R.J.; Kim, B.G. Bioconversion of p-coumaric acid to p-hydroxystyrene using phenolic acid decarboxylase from *B. amyloliquefaciens* in biphasic reaction system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1501–1511, doi:10.1007/s00253-012-4358-8.
58. Ni, J.; Wu, Y.T.; Tao, F.; Peng, Y.; Xu, P. A Coenzyme-Free Biocatalyst for the Value-Added Utilization of Lignin-Derived Aromatics. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16001–16005, doi:10.1021/jacs.8b08177.
59. Liu, H.; Liu, Z.H.; Zhang, R.K.; Yuan, J.S.; Li, B.Z.; Yuan, Y.J. Bacterial conversion routes for lignin valorization. *Biotechnol. Adv.* **2022**, *60*, doi:10.1016/j.biotechadv.2022.108000.
60. Weng, C.; Peng, X.; Han, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14*, 1–22, doi:10.1186/s13068-021-01934-w.
61. Priefert, H.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin.

- Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 296–314, doi:10.1007/s002530100687.
62. Becker, J.; Wittmann, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107360, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.016.
 63. Cui, L.; Wang, Z.; Zeng, Y.; Yang, N.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zheng, Y. Lignin Biodegradation and Its Valorization. *Fermentation* **2022**, *8*, 1–19, doi:10.3390/fermentation8080366.
 64. Kumar, M.; You, S.; Beiyuan, J.; Luo, G.; Gupta, J.; Kumar, S.; Singh, L.; Zhang, S.; Tsang, D.C.W. Lignin valorization by bacterial genus *Pseudomonas*: State-of-the-art review and prospects. *Bioresour. Technol.* **2021**, *320*, 124412, doi:10.1016/j.biortech.2020.124412.
 65. Johnson, C.W.; Beckham, G.T. Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metab. Eng.* **2015**, *28*, 240–247, doi:10.1016/j.ymben.2015.01.005.
 66. Nešvera, J.; Rucká, L.; Pátek, M. Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Adv. Appl. Microbiol.* **2015**, *93*, 107–160, doi:10.1016/bs.aambs.2015.06.002.
 67. Kasai, D.; Masai, E.; Miyauchi, K.; Katayama, Y.; Fukuda, M. Characterization of the 3-O-methylgallate dioxygenase gene and evidence of multiple 3-O-methylgallate catabolic pathways in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 4951–4959, doi:10.1128/JB.186.15.4951-4959.2004.
 68. Kasai, D.; Masai, E.; Miyauchi, K.; Katayama, Y.; Fukuda, M. Characterization of the gallate dioxygenase gene: Three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 5067–5074, doi:10.1128/JB.187.15.5067-5074.2005.
 69. Lee, S.; Kang, M.; Bae, J.H.; Sohn, J.H.; Sung, B.H. Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives.

Front. Bioeng. Biotechnol. **2019**, 7, 1–18, doi:10.3389/fbioe.2019.00209.

70. Agrawal, A.; Kaushik, N.; Biswas, S. Derivatives and Applications of Lignin—An Insight. *SciTech J.* **2014**.
71. Deangelis, K.M.; D’Haeseleer, P.; Chivian, D.; Fortney, J.L.; Khudyakov, J.; Simmons, B.; Woo, H.; Arkin, A.P.; Davenport, K.W.; Goodwin, L.; et al. Complete genome sequence of “enterobacter lignolyticus” SCF1. *Stand. Genomic Sci.* **2011**, doi:10.4056/sigs.2104875.
72. Woo, H.L.; Ballor, N.R.; Hazen, T.C.; Fortney, J.L.; Simmons, B.; Davenport, K.W.; Goodwin, L.; Ivanova, N.; Kyrpides, N.C.; Mavromatis, K.; et al. Complete genome sequence of the lignin-degrading bacterium *Klebsiella* sp. strain BRL6-2. *Stand. Genomic Sci.* **2014**, 9, 1–9, doi:10.1186/1944-3277-9-19.
73. 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. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, 62, 55–62, doi:10.1111/lam.12508.
74. Akinosho, H.O.; Yoo, C.G.; Dumitrache, A.; Natzke, J.; Muchero, W.; Brown, S.D.; Ragauskas, A.J. Elucidating the Structural Changes to Populus Lignin during Consolidated Bioprocessing with *Clostridium thermocellum*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, 5, 7486–7491, doi:10.1021/acssuschemeng.7b01203.
75. Bache, R.; Pfennig, N. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **1981**, doi:10.1007/BF00459530.
76. Szewzyk, R.; Pfennig, N. Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic. **1987**, 163–168.
77. Bak, F.; Widdel, F. *Hicrebiology.* **1986**, 177–180.
78. Sperfeld, M.; Diekert, G.; Studenik, S. Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H. **2019**, 1–9, doi:10.1093/femsec/fiy199.
79. Fuchs, G. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic

compounds under denitrifying conditions , and description of *Thauera phenylacetica* sp . nov ., *Thauera aminoaromatica* sp . nov ., and *Azoarcus buckelii* sp . nov . **2002**, 26–35, doi:10.1007/s00203-002-0422-6.

80. DeAngelis, K.M.; Sharma, D.; Varney, R.; Simmons, B.; Isern, N.G.; Markillie, L.M.; Nicora, C.; Norbeck, A.D.; Taylor, R.C.; Aldrich, J.T.; et al. Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1. *Front. Microbiol.* **2013**, doi:10.3389/fmicb.2013.00280.
81. Durante-Rodríguez, G.; Gómez-Álvarez, H.; Blázquez, B.; Fernández-Llamosas, H.; Martín-Moldes, Z.; Sanz, D.; Nogales, J.; Carmona, M.; Díaz, E. Chapter 13: Anaerobic Pathways for the Catabolism of Aromatic Compounds. In *RSC Energy and Environment Series*; Royal Society of Chemistry, 2018; Vol. 2018-Janua, pp. 333–390.
82. Marchesi, J.R.; Ravel, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **2015**, *3*, 1–3, doi:10.1186/s40168-015-0094-5.
83. Breitwieser, F.P.; Lu, J.; Salzberg, S.L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief. Bioinform.* **2018**, *20*, 1125–1139, doi:10.1093/bib/bbx120.
84. Mendes, I.V.; Garcia, M.B.; Bitencourt, A.C.A.; Santana, R.H.; de Castro Lins, P.; Silveira, R.; Simmons, B.A.; Gladden, J.M.; Kruger, R.H.; Quirino, B.F. Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0255083.
85. Moraes, E.C.; Alvarez, T.M.; Persinoti, G.F.; Tomazetto, G.; Brenelli, L.B.; Paixão, D.A.A.; Ematsu, G.C.; Aricetti, J.A.; Caldana, C.; Dixon, N.; et al. Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 1–16, doi:10.1186/s13068-018-1073-4.
86. Carlos, C.; Fan, H.; Currie, C.R. Substrate shift reveals roles for members of bacterial consortia in degradation of plant cell wall polymers. *Front. Microbiol.* **2018**, doi:10.3389/fmicb.2018.00364.

87. Rammala, B.; Zhou, N. Looking into the world's largest elephant population in search of ligninolytic microorganisms for biorefineries: a mini-review. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* **2022**, *15*, 1–13, doi:10.1186/s13068-022-02159-1.
88. Rollag, M.; Niswender, G.D.; Reppert, S.M.; Perlow, M.J.; Tamarkin, L.; Klein, C.; Tamarkin, L.; Chen, H.; Mcnemar, A.; Sidbury, J.; et al. Tien1983. **1982**, *2*, 11–13.
89. Zhang, W.; Ren, X.; Lei, Q.; Wang, L. Screening and comparison of lignin degradation microbial consortia from wooden antiques. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26102862.
90. Zhao, L.; Zhang, J.; Zhao, D.; Jia, L.; Qin, B.; Cao, X.; Zang, L.; Lu, F.; Liu, F. Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *188*, 115715, doi:10.1016/j.indcrop.2022.115715.
91. Grgas, D.; Rukavina, M.; Bešlo, D.; Štefanac, T.; Crnek, V.; Šiki, T.; Habuda-stani, M. The Bacterial Degradation of Lignin — A Review. **2023**, 1–17.
92. Ticona, A.R.P.; Ullah, S.F.; Hamann, P.R.V.; Lopes, F.A.C.; Noronha, E.F. Paenibacillus barengoltzii A1_50L2 as a Source of Plant Cell Wall Degrading Enzymes and Its Use on Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization* **2020**, doi:10.1007/s12649-020-00975-w.
93. Rafael, V. Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 646–655.
94. Chandra, R.; Raj, A.; Purohit, H.J.; Kapley, A. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. *Chemosphere* **2007**, *67*, 839–846, doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.011.
95. Abhishek, A.; Dwivedi, A.; Tandan, N.; Kumar, U. Comparative bacterial degradation and detoxification of model and kraft lignin from pulp paper wastewater and its metabolites. *Appl. Water Sci.* **2017**, doi:10.1007/s13201-015-0288-9.
96. Kumar, R.; Singh, A.; Maurya, A.; Yadav, P.; Yadav, A.; Chowdhary, P.; Raj, A. Effective bioremediation of pulp and paper mill wastewater using Bacillus cereus as a possible kraft lignin-degrading bacterium. *Bioresour. Technol.* **2022**, *352*,

doi:10.1016/j.biortech.2022.127076.

97. Raj, A.; Chandra, R.; Reddy, M.M.K.; Purohit, H.J.; Kapley, A. Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 793–799, doi:10.1007/s11274-006-9299-x.
98. Shintani, N.; Sugano, Y.; Shoda, M. Decolorization of kraft pulp bleaching effluent by a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1. *J. Wood Sci.* **2002**, *48*, 402–408, doi:10.1007/BF00770700.
99. Rahman, N.H.A.; Rahman, N.A.; Aziz, S.A.; Hassan, M.A. Production of ligninolytic enzymes by newly isolated bacteria from palm oil plantation soils. *BioResources* **2013**, *8*, 6136–6150, doi:10.15376/biores.8.4.6136-6150.
100. Chai, L.Y.; Chen, Y.H.; Tang, C.J.; Yang, Z.H.; Zheng, Y.; Shi, Y. Depolymerization and decolorization of kraft lignin by bacterium *Comamonas* sp. B-9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1907–1912, doi:10.1007/s00253-013-5166-5.
101. Hou, Q.; Bai, X.; Li, W.; Gao, X.; Zhang, F.; Sun, Z.; Zhang, H. Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.3389/fmicb.2018.02045.
102. dos Santos Melo-Nascimento, A.O.; Anna, B.M.M.S.; Gonçalves, C.C.; Santos, G.; Noronha, E.; Parachin, N.; de Abreu Roque, M.R.; Bruce, T. Complete genome reveals genetic repertoire and potential metabolic strategies involved in lignin degradation by environmental ligninolytic *Klebsiella variicola* P1CD1. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0243739.
103. Wang, Z.; Wu, W.; Cui, L.; Li, X.; Kulyar, M.F. e. A.; Xiong, H.; Zhou, N.; Yin, H.; Li, J.; Li, X. Isolation, characterization, and interaction of lignin-degrading bacteria from rumen of buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Basic Microbiol.* **2021**, *61*, 757–768, doi:10.1002/jobm.202100068.
104. Nishikawa, N.K.; Sutcliffe, R.; Saddler, J.N. The influence of lignin degradation

products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 27, 549–552, doi:10.1007/BF00451630.



APÊNDICE I

PUBLICAÇÃO



Review

Deconstruction of Lignin: From Enzymes to Microorganisms

Jéssica P. Silva ¹, Alonso R. P. Ticona ² , Pedro R. V. Hamann ¹, Betania E. Quirino ³  and Eliane F. Nomnha ^{1,4}

¹ Enzymology Laboratory, Cell Biology Department, University of Brasília, 70810-900 Brasília, Brazil; wpsilva@unb.br (J.P.S.); alonso.ponsa@gmail.com (A.R.P.T.); pedro_hamann@hotmail.com (P.R.V.H.)

² Genetics and Biotechnology Laboratory, Embrapa-Agronegócio, 70770-901 Brasília, Brazil; betania.quirino@embrapa.br

⁴ Correspondence: enomnha@unb.br; Tel.: +55-61-3307-2132

Abstract: Lignocellulosic residues are low-cost abundant feedstocks that can be used for industrial applications. However, their recalcitrance currently makes lignocellulose use limited. In natural environments, microbial communities can completely deconstruct lignocellulose by synergistic action of a set of enzymes and proteins. Microbial degradation of lignin by fungi, important lignin degraders in nature, has been intensively studied. More recently, bacteria have also been described as able to break down lignin, and to have a central role in recycling this plant polymer. Nevertheless, bacterial deconstruction of lignin has not been fully elucidated yet. Direct analysis of environmental samples using metagenomics, metatranscriptomics, and metaproteomics approaches is a powerful strategy to describe/discover enzymes, metabolic pathways, and microorganisms involved in lignin breakdown. Indeed, the use of these complementary techniques leads to a better understanding of the composition, function, and dynamics of microbial communities involved in lignin deconstruction. We focus on omics approaches and their contribution to the discovery of new enzymes and reactions that impact the development of lignin-based bioprocesses.

Keywords: lignin; bacteria; biodegradation; auxiliary activities; metagenomics; metaproteomics; metatranscriptomics



Citation: Silva, J.P.; Ticona, A.R.P.; Hamann, P.R.V.; Quirino, B.E.; Nomnha, E.F. Deconstruction of Lignin: From Enzymes to Microorganisms. *Molecules* **2021**, *26*, 2299. <https://doi.org/10.3390/molecules26082299>

Academic Editor: Claudio Costa

Received: 26 February 2021
Accepted: 26 March 2021
Published: 15 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The conversion of lignocellulosic biomass into biofuels and chemicals has gained interest because of its potential application in biorefineries as a green platform. Lignocellulosic biomass is mainly composed of lignin and polysaccharides (i.e., cellulose, hemicellulose, and pectin), arranged in plant cell walls. Cellulose is a homopolymer, composed of D-glucose monomers joined by linear β (1–4) linkages. Hemicellulose is also a sugar polymer, but it is composed of different monosaccharide molecules mainly joined by β -1,4 glycosidic linkages. Among the sugars that compose hemicellulose, D-xylose, D-mannose, and arabinose are present. Hemicellulose polymers are strongly interlinked through covalent and non-covalent bonds, and also linked to lignin, which together with cellulose will form the recalcitrant lignocellulosic matrix [1,2]. In the plant cell wall, lignin is linked to the carbohydrate moiety via the ester linkage. This association gives the plant cell wall greater strength and impermeability [3]. Lignin is formed by radical coupling reactions involving the three main phenylpropane units: p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), and syringyl (S), linked by C–C and C–O linkages [4,5].

Lignin is the main plant cell wall component responsible for recalcitrance [6]. Thus, pretreatment is an essential step for removing lignin in the process of lignocellulosic biomass conversion into biofuels [7,8]. The high carbon/oxygen ratio and the natural abundance of lignin make it a promising feedstock material for biological conversion into value-added products [9]. In addition to the biofuel industry, lignin may also be found as a by-product from wood-biomass in industrial processes for paper and pulp production.

APÊNDICE II

Sequencias parciais do gene 16S RNA dos isolados IY2_9 e IL2_3

> IY2_9 16S ribosomal RNA gene

TCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGG
AAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAA
GGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACT
GTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAACAGGAGAGTGGAATTCCA
TGT

>IL2_3 16S ribosomal RNA gene

GTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGC
CATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTA
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTT
ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG
TCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTG
GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA