

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E PROTEÔMICA

DE *Marasmiellus palmivorus* VE111: APLICAÇÃO DO

SECRETOMA EM PROCESSOS DE *GRAFTING* ENZIMÁTICO E

ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER

Caxias do Sul

2019

WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E PROTEÔMICA
DE *Marasmiellus palmivorus* VE111: APLICAÇÃO DO
SECRETOMA EM PROCESSOS DE *GRAFTING* ENZIMÁTICO E
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando a obtenção do grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Colaborador: Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
(Embrapa – Agroenergia)

Caxias do Sul

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S358p Schneider, Willian Daniel Hahn

Produção de enzimas ligninolíticas e proteômica de *Marasmiellus palmivorus* VE111 : aplicação do secretoma em processos de *grafting* enzimático e etanol de segunda geração / Willian Daniel Hahn Schneider. – 2019.

232 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

1. Enzimas de fungos. 2. Álcool. 3. Biocombustíveis. 4. Energia da biomassa. 5. Biotecnologia. I. Camassola, Marli, orient. II. Dillon, Aldo José Pinheiro, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 620.925:582.28

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E PROTEÔMICA
DE *Marasmiellus palmivorus* VE111: APLICAÇÃO DO
SECRETOMA EM PROCESSOS DE GRAFTING ENZIMÁTICO E
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Co-orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Colaborador: Dr. Félix Gonçalves de Siqueira (Embrapa – Agroenergia)

TESE APROVADA EM 12 DE JULHO DE 2019

Orientadora
Profa. Dra. Marli Camassola

Co-orientador
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Profa. Dra. Rosa Mara Borges da Silveira

Profa. Dra. Eloane Malvessi

America has a problem and the world has a problem. America's problem is that it has lost its way in recent years - partly because of 9/11 and partly because of the bad habits that we have let build up over the last three decades, bad habits that have weakened our society's ability and willingness to take on big challenges.

The world also has a problem: It is getting *hot, flat, and crowded*. That is, global warming, the stunning rise of middle classes all over the world, and rapid population growth have converged in a way that could make our planet dangerously unstable.

The best way for America to solve its big problem - the best way for America to get its "groove" back - is for us to take the lead in solving the world's big problem.

Americans intuit that we're on the wrong track and that we need a course correction. If we want things to stay as they are - that is, if we want to maintain our technological, economic, and moral leadership and a habitable planet, rich with flora and fauna, leopards and lions, and human communities that can grow in a sustainable way - things will have to change around here, and fast.

Thomas L. Friedman's (2008) – *de Hot, Flat and Crowded - Why we need a green revolution – and how it can renew America*

*“No hay razón para no probar algo nuevo
solo porque nadie lo haya intentado antes.”*

(Antoni Gaudí, 1852 – 1926)

*“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem 'Por quê?'
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo 'Por que não?'"*

(George Bernard Shaw, 1856 – 1950)

*Dedico este trabalho aos meus pais **Claudio** e **Ireni**, meu porto seguro, meu exemplo de vida e admiração, que tanto se eximiram de seus interesses pessoais por acreditar, mesmo nos momentos difíceis, no desejo e potencial de seus filhos e, hoje, orgulham-se em ter a oportunidade de ver seu primeiro filho tornando-se Doutor. Esta conquista também é de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada, que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

A Deus, o arquiteto do Universo, por guiar a minha caminhada, permitindo-me essa realização pessoal e profissional, tão desejada desde criança.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pela dedicação, sugestões e pela confiança depositada no meu trabalho. Em especial, a Profa. Dra. Marli Camassola, sempre visionária e com espírito empreendedor, pelo convite realizado e por ter-me incentivado a aceitar um novo desafio, migrando nos campos de experiências, de celulases para ligninases, de ascomicetos para basidiomicetos.

Ao pesquisador Dr. Félix Gonçalves de Siqueira, da Embrapa Agroenergia (Brasília), pela colaboração prestada a este trabalho.

Aos professores da banca de acompanhamento, Profa. Dra. Eloane Malvessi e Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi, pelas sugestões e contribuições neste trabalho; e aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Rosa Mara Borges da Silveira e Prof. Dr. Alexandre José Macedo, pela correção e também contribuições dadas ao mesmo.

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa pela amizade e companheirismo, em especial às colegas da salinha VIP, Dra. Sheila Montipó, Dra. Daiane Menegol e Me. Caroline Hartmann, pelos momentos únicos de amizade, companheirismo, produção científica e conselhos de vida.

À bolsista de iniciação científica, Paula Cavion Costa, por ter acompanhado e auxiliado na execução de experimentos desta tese de doutorado.

À técnica Dra. Roselei Claudete Fontana, por sua experiência em bioprocessos, por ter me ajudado na execução de metodologias e protocolos pertinentes ao trabalho e por não medir esforços nos ensaios realizados, inclusive nos inóculos de biorreatores nos finais de semana,

À Lucimara Serafini Rech, secretária do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por toda assistência prestada, amizade e catárses periódicos de assuntos corriqueiros.

À minha família, que sempre proporcionou o melhor para mim, estando sempre ao meu lado e acreditando em mim, por mais que as vezes não entendia aonde essa jornada toda me levaria.

Ao apoio estrutural da Universidade de Caxias do Sul, financeiro da CAPES e EMBRAPA e à bolsa de doutorado sanduíche no exterior concedida pelo CNPq.

Aos prestigiados pesquisadores Dr. Angel T. Martínez, Dra. María Jesús Martínez e Dra. Alicia Prieto, do grupo Biotecnologia para a Biomassa Lignocelulósica, Centro de Ciências Biológicas (CIB), Madri (Espanha), por terem aceitado esse projeto de doutorado sanduíche, abrindo às portas de seus laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa e contribuindo significativamente para o sucesso do trabalho. Grato também aos demais pesquisadores de renome do grupo, os quais tive o prazer de conhecer, Dra. Susana Camarero e Dr. Francisco Javier Ruiz-Duenãs, após muitos artigos lidos de suas autorias.

Aos colegas de pesquisa e, agora amigos, do Centro de Investigações Biológicas, por terem me recebido de braços abertos e tornado minha estadia no exterior mais confortável; gratidão especial aos colegas de laboratório Dr. Felipe de Salas e Dra. María Molina e à técnica Dra. Laura de Eugenio.

Aos demais colegas do CIB, pela amizade construída e pelas partidas de vôlei às terças-feiras e às sessões de cañas e tapas aos sábados.

À senhora Rosa Vara, pelo acolhimento em sua residência em Madri, fazendo sentir-me em casa durante minha estadia, compartilhando sua sabedoria e experiência de vida e, especialmente, contribuindo com sua visão política e desenvolvimento de minha consciência de classe.

Ao pesquisador Dr. Diego Moldes, ao Me. Cristian Bolano e demais colegas e também amigos do Laboratório BioSUV, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade de Vigo (Espanha), por terem me acolhido por um período bem curto, durante o estágio de doutorado sanduíche, possibilitando a realização dos testes de *grafting* enzimático.

Aos pesquisadores Dr. Jorge Rencoret e Dra. Ana Gutiérrez, do Instituto de Recursos Naturais e Agrobiologia de Sevilha (Espanha), pela colaboração nos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Às colegas professoras da Escola Municipal Catulo da Paixão Cearense, em exercício e já aposentadas, pelo apoio e incentivo em minhas decisões, em especial às colegas de trabalho que, gentilmente, me substituíram em minhas funções durante a ausência no doutorado no exterior.

A todas políticas públicas de um governo que possibilitaram o meu desenvolvimento como cidadão e profissional científico, promovendo minha chegada a este momentos tão esperado.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desta tese de doutorado, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vi
NOMENCLATURAS.....	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Demanda energética	4
2.2 Biomassa lignocelulósica	9
2.2.1 Celulose	11
2.2.2 Hemicelulose	12
2.2.3 Pectina	12
2.2.4 Lignina	13
2.3 Eucalipto	17
2.4 Fungos lignocelulolíticos.....	19
2.4.1 Macrofungos	22
2.4.1.1 Gênero <i>Marasmiellus</i>	24
2.5 Enzimas lignocelulolíticas	26
2.5.1 Celulases.....	28
2.5.2 Hemicelulases.....	28
2.5.3 Pectinases	29
2.5.4 Ligninases.....	30
2.5.4.1 Lacases.....	32
2.5.4.2 Lignina Peroxidases	36
2.5.4.3 Manganês Peroxidases	36
2.6 Aplicação das enzimas ligninolíticas	37
2.6.1 Biocombustíveis	38
2.6.2 Biorremediação.....	38
2.6.3 Biossensores	38
2.6.4 Síntese de painéis de fibras.....	39
2.6.5 Indústria alimentícia	39
2.6.6 Cosméticos.....	39
2.6.7 <i>Grafting</i> enzimático	39

2.6.8 Deslignificação enzimática.....	43
2.6.9 Detoxificação enzimática	45
2.7 Produção de enzimas ligninolíticas	47
2.7.1 Fontes de carbono.....	48
2.7.2 Fontes de nitrogênio	49
2.7.3 Indutores	49
2.7.4 pH.....	50
2.7.5 Temperatura	51
2.7.6 Oxigênio.....	51
2.7.7 Formas de cultivo	51
2.7.7.1 Cultivo submerso.....	51
2.7.7.2 Cultivo em estado sólido	54
2.8 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	54
2.8 Proteômica de basidiomicetos.....	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 Fungos	61
3.2 Meios de manutenção dos microrganismos	62
3.3 Produção de enzimas ligninolíticas	62
3.4 Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas	65
3.5 Biomassa micelial.....	66
3.6 Determinações enzimáticas	67
3.5.1 Lacases.....	67
3.5.2 Peroxidases totais	67
3.5.3 Manganês peroxidases	67
3.5.4 Lignina peroxidases.....	68
3.5.5 Oxidases do álcool veratrílico.....	68
3.5.6 Atividade sobre papel filtro (FPA)	68
3.5.7 Endoglicanases.....	69
3.5.8 β -glicosidases.....	69
3.5.9 Xilanases.....	69
3.6 Determinação de proteínas solúveis totais.....	70
3.7 Caracterização de lacases e peroxidases	70
3.7.1 pH ótimo de atividade de lacases e peroxidases	70
3.7.2 Temperatura ótima de lacases e peroxidases.....	70
3.7.3 Termoestabilidade da atividade de lacases e peroxidases	70

3.7.4 Zimograma de lacases.....	70
3.7.5 Zimograma nativo de lacases	71
3.8 Cálculos dos fatores de rendimento e produtividade	71
3.8.1 Fator de rendimento de substrato em biomassa.....	71
3.8.2 Fator de rendimento de substrato em atividade de lacases.....	71
3.8.3 Produtividade celular.....	72
3.8.4 Produtividade enzimática	72
3.8.5 Cálculo da atividade específica de lacases.....	72
3.9 SDS-PAGE de proteínas totais	73
3.10 Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massa	74
3.11 Cromatografia em fase líquida e espectrometria de massas	75
3.12 Análise de dados dos espectros de massa.....	75
3.13 Resíduos de madeira de <i>E. globulus</i>	76
3.14 Detoxificação enzimática de <i>E. globulus</i> pré-tratado por explosão a vapor.....	76
3.15 Determinação de compostos fenólicos.....	76
3.16 Cromatografia de exclusão molecular	77
3.17 Deslignificação enzimática de <i>E. globulus</i> in natura	77
3.18 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D-RMN)....	77
3.19 Sacarificação enzimática de <i>E. globulus</i>	78
3.20 Fermentação etanólica e densidade celular	79
3.21 Caracterização de <i>Eucalyptus globulus</i>	80
3.22 <i>Grafting</i> enzimático	81
3.22.1 Remoção de extraíveis da madeira	81
3.22.2 Ensaios de consumo de oxigênio	82
3.22.3 Hidrofobização da madeira de <i>E. globulus</i> por tratamento enzimático.....	82
3.22.4 Ângulo de contato da água	83
3.22.5 Absorção de água	83
3.23 Análise dos dados	83
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete <i>Marasmiellus palmivorus</i> in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources	86
Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from <i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers.....	115

Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing enzymes to enhance second-generation ethanol yield.....	139
A sustainable approach of enzymatic grafting on <i>Eucalyptus globulus</i> wood by laccase from the newly isolated white-rot basidiomycete <i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111 ...	176
5 DISCUSSÃO GERAL	193
6 CONCLUSÕES.....	198
7 PERSPECTIVAS.....	200
8 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	201

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Crescimento da população mundial de 1950 a 2050. (B) Atual consumo de diferentes combustíveis na área de transportes e projeção de mudanças nesses padrões até o ano de 2050.	4
Figura 2. Redução na emissão de gás CO ₂ por etanol celulósico em comparação com outros combustíveis.	5
Figura 3. Produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas lignocelulósicas.	6
Figura 4. Produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica e separação de quantidades do polímero aromático para o desenvolvimento de diversos produtos à base de lignina.	8
Figura 5. Mercado da lignina nos Estados Unidos, por produto, de 2014 a 2025, em milhões de dólares.	9
Figura 6. Os principais componentes e estrutura da lignocelulose.	10
Figura 7. Ocorrência da lignina na natureza. A biomassa lignocelulósica é constituída praticamente por celulose, hemicelulose e lignina. O conteúdo de lignina e sua composição diferem de uma fonte vegetal para outra.	11
Figura 8. Representação esquemática da molécula de celulose, com destaque para a celobiose.	12
Figura 9. Representação esquemática da molécula da hemicelulose, com destaque para a xilose.	12
Figura 10. Representação esquemática da molécula da pectina.	13
Figura 11. (A) Representação esquemática de uma célula vegetal: lamela média (LM); parede primária (P); parede secundária externa (S1); parede secundária média (S2); parede secundária interna (S3); lúmen (L). (B) Unidade de fenilpropano. (C) Álcoois hidróxi-cinâmicos precursores. (D) macromolécula lignina.	13
Figura 12. Ocorrência e composição das unidades fenilpropanoides da lignina (S, G e H) na natureza.	14
Figura 13. Ligações características da lignina.	15
Figura 14. Seção de lignina em madeira mole (<i>softwood</i>).	16
Figura 15. Conceito esquemático de biorrefinaria baseado na biomassa lignocelulósica.	17
Figura 16. (A) Plantação de <i>Eucalyptus globulus</i> . (B) Folha, flor e botão de <i>Eucalyptus globulus</i> .	19
Figura 17. Classificação e exemplos de fungos lignocelulolíticos.	20
Figura 18. Principais estruturas de um fungo do filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina.	22
Figura 19. Esquema do ciclo reprodutivo de um fungo do filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina.	23
Figura 20. Imagens de espécies de fungos do gênero <i>Marasmiellus</i> . (A) <i>Marasmiellus palmivorus</i> sobre tronco de palmeira; (B) basidiocarpo de <i>Marasmiellus palmivorus</i>	25

(Pong *et al.*, 2012); (C) *Marasmiellus umbilicatus*; (D) *Marasmiellus reniformis*; (E) *Marasmiellus purpureoalbus*; (F) *Marasmiellus epochnous*.

Figura 21. Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da celulose.	28
Figura 22. Ação de diferentes enzimas sobre estruturas que formam a hemicelulose.	29
Figura 23. Ação de diferentes enzimas sobre estruturas que formam a pectina.	30
Figura 24. Enzimas ligninolíticas e suas atuações seletiva nos componentes da lignina.	31
Figura 25. Ciclo catalítico das lacases.	33
Figura 26. Esquema de possíveis alterações que podem ocorrer durante a ação da lacase na lignina. Cada quadro significa eventos que devem ser atribuídos a uma reação específica que ocorre na lignina. As setas indicam como um evento pode induzir o próximo.	35
Figura 27. (A) Ciclo catalítico das lignina peroxidases. S = substrato aromático fenólico ou não fenólico. (B) Oxidação do álcool veratrílico por lignina peroxidase. AV = álcool veratrílico.	36
Figura 28. (A) Ciclo catalítico das manganês peroxidases. FOH = substrato fenólico. (B) Produção do complexo Mn^{3+} durante a oxidação de uma estrutura fenólica ou um átomo Mn^{2+} .	37
Figura 29. Esquema envolvendo os três tipos de <i>grafting</i> (enxertos): <i>grafting-to</i> , <i>grafting-from</i> e <i>grafting-through</i> .	40
Figura 30. Esquema de <i>grafting</i> enzimático usando lauril galato e lacase para modificação de madeira: a lacase reage com o substrato lauril galato, promovendo o <i>grafting</i> dos radicais fenóxi correspondentes e fica livre para continuar a reação.	43
Figura 31. Formação de inibidores oriundos do pré-tratamento da lignocelulose.	45
Figura 32: Exemplos de biorreatores. (a) biorreator agitado mecanicamente; (b) coluna de bolhas; (c) biorreator do tipo “air lift”; (d) biorreator de leito fixo; (e) biorreator de leito fluidizado.	52
Figura 33. Interações complexas entre morfologia, produtividade e condições de processo em cultivos submersos de fungos filamentosos.	53
Figura 34. Representação esquemática das alterações estruturais provocadas pelo pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.	54
Figura 35. Diferenças nos secretomas de basidiomicetos em relação ao seu estilo de vida. A abundância de diferentes grupos de proteínas é indicada para cada estilo de vida fúngica. A intensidade da cor representa a abundância de cada grupo de proteínas.	57
Figura 36. Esquema representando a metodologia empregada no decorrer do doutorado.	60
Figura 37. Fungo basidiomiceto <i>M. palmivorus</i> VE111 coletado no Parque Estadual do Itapeva, Torres/RS.	61
Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura de <i>P. echinulatum</i> S1M29 em cultivo sólido. (A) aumento de 1200×, (B) aumento de 2700×	61
Figura 39. Biorreator com agitação mecânica (New Brunswick, BioFlo®/CelliGen®115), empregado para a produção de enzimas ligninolíticas por <i>M. palmivorus</i> VE111.	64

Figura 40. (A) Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *P. echinulatm* S1M29 em cultivo em estado sólido em bandejas estáticas. (B) Produção em enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *P. echinulatm* S1M29 em cultivo submerso (biorreator construído em parceria entre Universidade de Caxias do Sul e Senai/Mecatrônica). A estrutura interna do reator, bem como o sistema de controle de parâmetros operacionais é semelhante ao apresentado na Figura 39B. **66**

Artigo 1. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources

Fig. 1. Kinetic growth and enzymatic production of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks. Laccases (A), total peroxidases (B), manganese peroxidase (C), pH variations (D), mycelial growth (E) and consumption of carbon sources (F). **94**

Fig. 2. Response surface plot (A) and contour curve plot (B) of laccase production as a function of glucose and casein concentration. Colour scale: green (< Lac activity) to dark red (> Lac activity). **99**

Fig. 3. Kinetic growth and enzymatic production of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a 5 L stirred-tank bioreactor. Laccases (A), total peroxidases (B), manganese peroxidase (C), pH variations (D), mycelial growth (E) and glucose consumption (F). Experiment 1: 5 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 2: 10 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 3: 20 g/L glucose and 1.5 g/L casein; Experiment 4: 30 g/L glucose and 1.5 g/L casein. **101**

Fig. 4. Comparative evolution of the production of ligninolytic enzymes by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in flasks and in a bioreactor. T-test ($p < 0.05$) was performed to compare the production of each enzyme (Lac, Per and MnP) in two different culture conditions (flasks and bioreactor). The column graphic represents the respective cultivation time at which each enzyme reached its maximum activity. **103**

Fig. 5. Characterization of the laccase activity peak from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in experiment 1 (88 h). Optimum reaction pH (A), optimum reaction temperature (B) and enzymatic thermostability (C). **105**

Fig. 6. Zymogram of the laccase activity peaks observed in the crude extracts of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultures in bioreactor experiments. **106**

Supplementary data 1. Experiment performed with *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks in the absence of potato broth. Mycelial growth (A) and laccase activity (B). **113**

Supplementary data 2. Pareto chart of standardized effects of glucose and casein. The vertical dashed line indicates a level of significance of 95 % ($p = 0.05$); (L) stands for linear variable and (Q) stands for quadratic variable. Pareto chart provides evidences of the values of the t-test for each independent variable. **113**

Artigo 2. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers

- Fig.1.** Optimization of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase production by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor. Parameters evaluated: pH (A - C), DO (D - F) and temperature (G - I). 121
- Fig.2.** Effect of the concentration of different inducers on the production of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks. 124
- Fig.3.** Comparison of the effects of absence and addition of CuSO₄ and MnSO₄ on the production of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor. 126
- Fig.4.** Characterization of laccase and total peroxidases peaks (112 h) from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor after optimization. Optimum reaction pH (A, D), optimum reaction temperature (B, E) and enzymatic thermostability (C, F). 127
- Fig.5.** Zymogram of laccase activity peaks from *Marasmiellus palmivorus* VE111 observed in crude extracts of each culture in a bioreactor during optimization of conditions for the production of the enzyme. Different pHs (A), DO concentrations (B), temperatures (C), best conditions without inducers (D) and best conditions with the inducers CuSO₄ and MnSO₄ (E). 129
- Fig.6.** Comparative evolution of the production on lignin-modifying enzymes (laccase, total peroxidases and manganese peroxidase) by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor during optimization. The column graphic represents the best condition found for each step of optimization for the enzymes analyzed. 130
- Supplementary data 1.** Kinetic growth of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in bioreactor during the optimization process. Experiments with different pHs (A), DO (B), temperatures (C) and with the addition of inducers (D). 137
- Supplementary data 2.** Glucose consumption by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in bioreactor during the optimization process. Experiments with different pHs (A), DO (B), temperatures (C) and with the addition of inducers (D). 137

Artigo 3. On-site manufacturing enzymes and analysis of fungal secretome for lignin wood degradation and detoxification of eucalyptus wastes to enhance second-generation ethanol

- Fig. 1.** Overview of the workflow developed to increase the production of second-generation ethanol with lignocellulolytic enzymes. Whole enzymatic broth of two fungal species, the basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 (rich in laccases), and the ascomycete *Penicillium echinulatum* S1M29 (rich in cellulases and hemicellulases) were used in different green strategies to improve the second-generation ethanol yields from *Eucalyptus globulus* biomass. 142
- Fig. 2.** Zymogram of laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111 grown in a glucose-casein-potato broth-medium revealed with 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (left) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (right) substrates. 151
- Fig. 3.** SDS-PAGE electrophoresis (A) and secretomic overview (B) of *Marasmiellus palmivorus* VE111 grown in a glucose-casein-potato broth-medium for five days. The 152

lanes of SDS-PAGE, alongside of the marcador lane (M), represent the crude enzymatic extract, in duplicate, secreted by *Marasmiellus palmivorus* VE111.

Fig. 4. HSQC 2D-NMR spectra of untreated (*left*) and laccase-treated (*right*) whole *Eucalyptus globulus* wood swollen in DMSO-*d*₆. The detected signals correspond to: **i)** ¹H-¹³C correlations in aromatic guaiacyl (**G**, in green) and syringyl (**S**, in red) lignin units; **ii)** aliphatic side-chains in lignin β-O-4' inter-unit linkages (**A**, in purple); **iii)** anomeric (**CH**₁) and other (**CH**) positions (all in cyan) in non-crystalline carbohydrates; **iv)** methoxyls (in orange); and **v)** DMSO (in dark blue). Insets show: **i)** lignin decay with respect to control; **ii)** abundance of **A** substructures (as percentages of lignin aromatic units, G+S); **iii)** syringyl-to-guaiacyl (S/G) ratio; and **iv)** "lignin-to-carbohydrate" (L/C) ratio estimated from the G+S and CH₁ intensities (see text for additional details).

Fig. 5. Free phenolic content (%) of steam-exploded *E. globulus* wood untreated and treated with laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111 (A) and size-exclusion chromatographic profile of the soluble fraction (B).

Fig. 6. Cell density of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in steam-exploded *Eucalyptus globulus* wood hydrolyzate, untreated and treated with laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111.

Artigo 4. A sustainable approach of enzymatic grafting on *Eucalyptus globulus* wood by laccase from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111

Figure 1. Chemical structure of the three substrates used (on the left) and the two tested mediator compounds (on the right). Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; GUA, guaiacol; CAT, catechol.

Figure 2. Kinetics of oxygen consumption by laccase from *M. palmivorus* VE111 with different substrates, mediators, and wood. Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; GUA, guaiacol; CAT, catechol; and EUC, eucalyptus veneer.

Figure 3. Water contact angle on eucalyptus veneers in control conditions and after different treatments with laccase and: A) octyl gallate, B) lauryl gallate, and C) octylamine (in the absence and presence of guaiacol as mediator). Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; GUA, guaiacol; and CAT, catechol.

Figure 4. Images of water contact angle on eucalyptus veneers after 30 s including: A, B) controls with only laccase or only phenolic substrate, respectively; C, D) treatments with octyl gallate and laccase without and with guaiacol, respectively; E, F) treatments with lauryl gallate and laccase without and with guaiacol, respectively; G, H) treatments with octylamine and laccase without and with guaiacol, respectively.

Figure 5. Water absorption by eucalyptus veneers treated with octyl gallate (A and B), lauryl gallate (C and D), and octylamine (E and F). The panels on the left correspond to the absorption of water after 30 min of immersion and the panels on the right show the kinetics of water absorption during 24 h of immersion. Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; and GUA, guaiacol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de biomassas lignocelulósicas e suas composições químicas.	11
Tabela 2. Composição da lignina de diferentes recursos renováveis.	15
Tabela 3. Ligações características da lignina em <i>softwood</i> e <i>hardwood</i> .	15
Tabela 4. Algumas enzimas fúngicas envolvidas na degradação da lignocelulose.	27
Tabela 5. Uso de enzimas ligninolíticas e SLM para deslignificação enzimática.	44
Tabela 6. Técnicas para detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos.	47
Tabela 7. Enzimas ligninolíticas usadas para remoção de fenóis em diferentes materiais pré-tratados.	48
Tabela 8. Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos	55
Tabela 9. Análise proteômica de sistemas enzimáticos lignocelulolíticos produzidos por fungos basidiomicetos.	59
Tabela 10. Planejamento fatorial 2 ² para identificar as concentrações mais adequadas de glicose e caseína para a produção de lacases em frascos.	63

Artigo 1. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources

Table 1. Values used in the CCRD ¹ , factorial 2 ² , performed to identify the most suitable concentrations of glucose and casein in Lac production in shaken flasks.	89
Table 2. Literature comparison of ligninolytic enzymes production by basidiomycetes species in response to different carbon and nitrogen sources.	96
Table 3. Comparison between maximum laccase activity and maximum mycelial growth in response to different carbon / nitrogen ratios in stirred-tank bioreactor cultivation.	102
Table 4. Results of yield factors, productivity, and specific activity of <i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor	104

Artigo 2. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers

Table 1. Results of yield factors, productivity, and specific activity of <i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor.	130
---	------------

Supplementary data 3. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different values of pH. **138**

Supplementary data 4. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different dissolved oxygen concentration (DO). **138**

Supplementary data 5. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different values of temperatures. **138**

Artigo 3. On-site manufacturing enzymes and analysis of fungal secretome for lignin wood degradation and detoxification of eucalyptus wastes to enhance second-generation ethanol

Table 1. Top-10 proteins in the secretome of *M. palmivorus* VE111 grown in in a glucose-casein-potato broth-medium for five days, with the highest score and PSM values (see **supplementary material** for the whole 331 proteins in secretome). **153**

Table 2. Chemical composition (% of dry solid fraction) of untreated *E. globulus* wood and pretreated by steam explosion. **154**

Table 3. Comparison of Klason lignin content (% of wood weight), glucose and xylose yield after saccharification (% of sugar released), and ethanol yield after fermentation (% of ethanol released) for the laccase-treated *E. globulus* wood and the untreated control. **155**

Table 4. Comparison of glucose and xylose yields after saccharification (% of sugar released) and ethanol yield after enzymatic saccharification (% of ethanol released) of the steam-exploded *E. globulus* wood treated with laccase before and after saccharification and the control without laccase treatment. **159**

Supplementary material. All proteins present in the secretome of *M. palmivorus* VE111 grown in in a glucose-casein-potato broth-medium for five days. The proteins are grouped according to their putative function. **168**

NOMENCLATURAS

2D – eletroforese bidimensional

2D-RMN – ressonância magnética nuclear bidimensional

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AC – acetosiringona

ACN – acetonitrila

AE_{Lac} – atividade específica de lacases

AFEX – Explosão a vapor com amônia

ARP – Percolação com amônia reciclada

AV – álcool veratrílico

BDA – batata-dextrose-ágar

CA – ácido *p*-cumárico

Ca(OH)₂ – hidróxido de cálcio

CAZy – *carbohydrate active enzyme(s)*

CBM – módulo de ligação ao carboidrato

CES – cultivo em estado sólido

C_I – composto I

CID – fragmentação induzida por colisão

CLT – *Cross Laminated Timber* (também conhecido como X-Lam)

CO₂ – dióxido de carbono

CS – cultivo submerso

Cu – cobre

CuSO₄ – sulfato de cobre

Da – daltons

DCCR – delineamento composto central rotacional

DDT – ditiotreitol

DMP – 2,6-dimetoxifenol

DMR-EH – *Deacetylation Mechanical Refining and Enzymatic Hydrolysis*

DMSO-d₆ – dimetilsulfóxido

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

DyP(s) – peroxidase(s) descolorante(s) de corante(s)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

E_f – atividade enzimática final

E_f – etanol final

E_i – atividade enzimática inicial

E_i – etanol inicial

ESI – ionização por *electrospray*

Etanol 1G – etanol de primeira geração

Etanol 2G – etanol de segunda geração

Etanol 3G – etanol de terceira geração

Etanol 4G – etanol de quarta geração

FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina

Fe – ferro

***f*_{etanol}** – fator de conversão estequiométrico de etanol por grama de glicose

FMN – mononucleotídeo de flavina

FOH – substrato fenólico

FPA – *filter paper activity*

G – álcool coniferílico

G_f – glicose final

GH – glicosil hidrolases

G_i – glicose final

GMC – glicose-metanol-colina

H – álcool cumarílico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido clorídrico

HBT – 1-hidroxibenzotriazol

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

HSQC – coerência quântica heteronuclear única

IAA – iodoacetoamida

INCT-Bioetanol – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

kDa – kilodaltons

L – lúmen

Lac(s) – lacases(s)

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

LiP(s) – lignina peroxidase(s)

LM – lamela média

LPMO – monooxigenase polissacarídica lítica

m/m – massa/volume

m/v – massa/volume

MDF – *medium density fiberboard*

MeS – metil-seringato

Mn – manganês

MnP(s) – manganês peroxidase(s)

MnSO₄ – sulfato de manganês

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NH₄HCO₃ – bicarbonato de amônio

NH₄OH – hidróxido amônio

(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio

NREL – National Renewable Energy Laboratory

P – parede primária

P_E – produtividade volumétrica de lacase

Proálcool – Programa Nacional do Alcool

[PST] – concentração de proteínas solúveis totais

PV(s) – peroxidase(s) versát(eis)

P_X – produtividade volumétrica celular

rpm – rotações por minuto

S – álcool sinapílico

S – substrato aromático fenólico ou não fenólico

S1 – parede secundária externa

S2 – parede secundária média

S3 – parede secundária interna

SA – siringaldeído

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio

S_f – substrato final

S_i – substrato inicial

SL – carga de sólidos

SLM – sistema lacase-mediador

SO₂ – dióxido de enxofre

SSP – pequenas proteínas secretadas

t – tempo de cultivo

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – tempo de voo

TP – Technical Report

U – unidades enzimáticas de lacases

UV – raios ultravioleta

v/v – volume/volume

vvm – volume de ar por volume de meio por minuto

VIO – ácido violúrico

W₀ – massa inicial das chapas secas de eucalipto

W_i – massa das chapas de eucalipto após imersão em água

WIS – sólidos insolúveis em água

X_f – concentração final de biomassa

X_i – concentração inicial de biomassa

Y_E – rendimento de etanol

Y_{E/G} – rendimento do produto em relação ao substrato

Y_{E/S} – fator de rendimento de substrato em enzima

Y_G – rendimento em glicose

[X_m] – concentração celular máxima

Y_X – rendimento em xilose

Y_{X/S} – fator de rendimento de substrato em biomassa

ρNPG – ρ-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo

RESUMO

Espécies do gênero *Marasmiellus*, fungos de degradação branca, apresentam potencial na degradação da lignocelulose, especialmente da lignina. No presente trabalho, estudou-se a produção de enzimas ligninolíticas por *Marasmiellus palmivorus* VE111, em biorreator com agitação mecânica, avaliando a influência de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e indutores na produção dessas enzimas, bem como de demais parâmetros de cultivo como pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. Posteriormente, sob condições de produção otimizadas, um estudo proteômico do caldo enzimático foi aplicado na produção de etanol de segunda geração e na tecnologia de *grafting* enzimático, isto é, na formação de ligações covalentes de um composto alvo em um substrato desejado, por meio de uma reação enzimática. Nas condições otimizadas, verificou-se a produção de 6588 U/mL de lacases, 3533 U/mL de peroxidases totais e 60 U/mL de manganês peroxidases por *M. palmivorus* VE111, utilizando 5 g/L de glicose, 1,80 g/L de caseína, 3 mmol/L de CuSO₄ e MnSO₄, concentração de oxigênio dissolvido fixa em 90%, a 28 °C, pH inicial livre até 48 h de cultivo e pH fixo em 7,0 até 120 h. Nessas condições, verificou-se crescimento micelial máximo de 6,8 g/L, produtividade volumétrica de lacases de 58,35 U/mL/h e produtividade volumétrica de biomassa de 0,073 g/L/h. Valor de pH ótimo de reação de atividade de lacases foi identificado em tampão citrato de sódio, pH 3,5, e de peroxidases totais em tampão Mc’Ilvaine, pH 3,0. A temperatura ótima de reação para lacases foi 40 °C e para peroxidases totais, 25 °C. Foram identificadas quatro isoformas de lacases em gel nativo de atividade. O secretoma de *M. palmivorus* VE111 contém 21% de glicosil hidrolases e 18% de oxidoredutases. Entre as oxidoredutases, a maior parte corresponde às lacases (45%). Peroxidases foram identificadas em menor proporção (12%). Verificou-se uma deslignificação de *Eucalyptus globulus in natura* (31% de redução na lignina) e detoxificação de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111, resultando em incrementos no rendimento em etanol para ambas as biomassas, de 8,5% e 10%, respectivamente, após sacarificação enzimática. Outrossim, as lacases de *M. palmivorus* VE111 catalisam reações de polimerização de compostos aromáticos fenólicos sobre a superfície de madeira de *E. globulus*, proporcionando maior hidrofobicidade ao material. Diante do exposto, as lacases de *M. palmivorus* VE111 agem na polimerização e despolimerização de substâncias aromáticas e fenólicas, sendo aplicáveis em tecnologias de *grafting* enzimático e etanol de segunda geração, respectivamente.

ABSTRACT

Species of the genus *Marasmiellus*, a white-rot fungi, have potential in the degradation of lignocellulose, especially lignin. In the present work, it was study the production of ligninolytic enzymes by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor with mechanical agitation, evaluating the influence of different sources of carbon, nitrogen and inductors on the production of these enzymes, as well as other cultivation parameters such as pH, temperature and concentration of dissolved oxygen. Subsequently, under optimized production conditions, a proteomic study of the enzyme broth was applied in the production of second-generation ethanol and enzymatic grafting technology, i.e. in the formation of covalent bonds of a target compound on a desired substrate, by an enzyme-based reaction. Under optimized conditions, it was verified the production of 6588 U/mL of laccases, 3533 U/mL of total peroxidases and 60 U/mL of manganese peroxidases by *M. palmivorus* VE111, using 5 g/L glucose, 1.80 g/L casein, 3 mmol/L CuSO₄ and MnSO₄, 90% concentration of dissolved oxygen, at 28 °C, initial free pH up to 48 h of cultivation and pH fixed at 7.0 to 120 h. Under these conditions, maximum mycelial growth of 6.8 g/L, laccase volumetric productivity of 58.35 U/mL/h and a biomass volumetric productivity of 0.073 g/L/h was verified. Optimum reaction pH values of laccase activity were found in sodium citrate buffer, pH 3.5, and total peroxidases in McIlvaine buffer pH 3.0. The optimum reaction temperature for laccases was 40 °C and for total peroxidases, 25 °C. Four laccase isoforms were identified on the native gel of activity. The secretome of *M. palmivorus* VE111 contains 21% glycosyl hydrolases and 18% oxidoreductases. Among the oxidoreductases, the majority corresponds to laccases (45%). Peroxidases were identified in a lower proportion (12%). It was verified a delignification of *Eucalyptus globulus* in natura (31% reduction in lignin) and detoxification of *E. globulus* pretreated by steam explosion with the *M. palmivorus* VE111 enzyme broth, resulting in increases in ethanol yield for both biomass, of 8.5% and 10%, respectively, after enzymatic saccharification. In addition, the laccases of *M. palmivorus* VE111 catalyze reactions of polymerized phenolic aromatic compounds on the wood surface of *E. globulus*, providing greater hydrophobicity to the material. Considering the above, the laccases of *M. palmivorus* VE111 act in the polymerization and depolymerization of aromatic and phenolic substances, being applicable in technologies of enzymatic grafting and second-generation ethanol, respectively.

1 INTRODUÇÃO

A degradação dos materiais lignocelulósicos tem sido objeto de muitos estudos pois, além de corresponder a uma importante etapa do ciclo do carbono na natureza, também pode ser aplicada em processos tecnológicos. Os fungos, principalmente os causadores de degradação branca, os quais degradam lignina e celulose, desestruturam a parede celular vegetal, promovendo a conversão dos polissacarídeos em açúcares de fácil assimilação, sendo que a lignina residual ou seus compostos aromáticos e fenólicos, podem ser utilizados em diferentes produtos biotecnológicos.

A aplicação de enzimas produzidas pelos fungos decompositores de materiais lignocelulósicos tem ganhado muito interesse na atualidade. O uso de xilanases e lacases em processos de branqueamento de polpas celulósicas e a aplicação de celulases na hidrólise enzimática de celulose nos processos de produção de etanol de segunda geração são exemplos de aplicações tecnológicas de grande relevância para os segmentos industriais.

Com relação às enzimas ligninolíticas, o seu potencial de aplicação é amplo, desde setores de biorrefinaria, em processos de deslignificação de biomassa lignocelulósica e detoxificação de compostos inibitórios à sacarificação e fermentação; em biorremediação, atuando na remoção e/ou degradação de poluentes ambientais; em tecnologias de *grafting* enzimático de (bio)moléculas em (bio)materiais, estendendo-se à indústria de alimentos, farmacêutica e biomédica.

Macrofungos incluem todas as espécies de fungos que produzem estruturas reprodutoras facilmente visíveis a olho nu. A maior parte pertence à classe dos basidiomicetos e o restante aos ascomicetos. Os basidiomicetos são os únicos organismos capazes de decompor eficientemente a lignina. Na literatura, são relatados estudos sobre a produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos, tanto em cultivo em estado sólido como em cultivo submerso. Espécies dos gêneros *Phanerochaete*, *Pleurotus* e *Trametes* são as mais estudadas nesta área. Nesses estudos, é possível verificar que parâmetros de processo como as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, o uso de substâncias indutoras, a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido, a agitação do meio e a morfologia de crescimento do fungo influenciam direta ou indiretamente na quantidade de enzimas produzidas.

Espécies do gênero *Marasmiellus*, pertencentes ao grupo dos basidiomicetos, são estudados no que diz respeito à produção de enzimas ligninolíticas, especialmente lacases. No entanto, são poucos os estudos encontrados na literatura referentes à aplicabilidade de espécies

deste gênero na hidrólise de lignocelulósicos. Em contrapartida, espécies mutantes de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Neurospora* e *Aspergillus* são conhecidos por serem produtores de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas, respectivamente. Entre os microrganismos disponíveis para a produção simultânea de celulasas e xilanases, incluem-se linhagens de *Penicillium echinulatum*. Mutantes celulolíticos desta espécie – como S1M29 – têm sido obtidos, sendo que o seu complexo enzimático apresenta estabilidade a 50 °C, condição relevante para aplicação destas enzimas em hidrólise enzimática e, ainda, contém β -glicosidases em maior proporção que a de *Trichoderma reesei*. Recentemente, o seu proteoma foi estudado, apresentando um complexo de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. No entanto, pectinases e enzimas ligninolíticas, essenciais na hidrólise completa de biomassas lignocelulósicas, pouco foram identificadas em seu secretoma.

A otimização do meio de cultivo é um fator crucial na produção industrial de enzimas, uma vez que a redução no seu custo é um dos seus grandes desafios, sendo que ferramentas de biologia molecular vem auxiliando nesse processo. Estudos de proteômica de fungos também têm se mostrado importantes para caracterizar e compreender o arsenal enzimático presente no secretoma de um fungo, além de ajudar a identificar vias de secreção bem como deleção e/ou coexpressão de genes.

Diversos recursos de biomassas lignocelulósicas estão disponíveis em nosso planeta para conversão em bioprodutos e energia. O Brasil, por exemplo, é o maior produtor de cana-de-açúcar de todo o mundo. No entanto, aproximadamente um terço dessa produção equivale ao bagaço, que pode ser aproveitado para a produção de açúcares fermentescíveis e, posteriormente, convertido em etanol ou ácidos orgânicos com alto valor agregado. Nos últimos anos, outra cultura energética também tem despertado interesse para a geração de energia, o capim-elefante, que apresenta elevada produtividade por hectare quando comparada à cana-de-açúcar. Mais recentemente, vem crescendo o interesse pelos resíduos de madeiras provenientes da indústria madeireira e moveleira, como por exemplo, pinus e eucaliptos. O eucalipto, em especial, destaca-se por ser uma planta que cresce rapidamente e apresentar celulose de fibras curtas, o que interessa às indústrias de polpa e papel. Consequentemente, o seu uso gera um excedente de resíduos não aproveitados, como cavacos, cascas e serragens, mas com grande potencial para as biorrefinarias. A hidrólise dessas biomassas lignocelulósicas por enzimas fúngicas, tem sido o foco de muitas pesquisas e tem despertado o interesse da indústria.

Diante dessa perspectiva, o presente trabalho visou a otimização do meio de cultivo para a produção de enzimas ligninolíticas pelo basidiomiceto *Marasmiellus palmivorus* VE111 em

biorreator com agitação mecânica, a análise proteômica do caldo enzimático otimizado e sua aplicação em tecnologia de *grafting* enzimático, deslignificação e detoxificação de *Eucalyptus globulus* visando posteriores etapas de sacarificação com *Penicillium echinulatum* S1M29 e fermentação a etanol de segunda geração.

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- testar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111 em cultivo submerso realizado em frascos mantidos sob agitação;
- verificar o efeito de diferentes concentrações das melhores fontes de carbono e nitrogênio na produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica;
- avaliar o efeito do pH, da concentração de oxigênio dissolvido e da temperatura na produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica;
- avaliar a influência de substâncias indutoras na produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111 em frascos mantidos sob agitação e em biorreator com agitação mecânica;
- determinar as condições ideais para a atividade enzimática de lacases e peroxidases totais, com relação ao pH e temperatura de reação e termoestabilidade;
- caracterizar as lacases secretadas por *M. palmivorus* VE111 por meio de zimograma nativo de atividade;
- identificar proteínas presentes no secretoma de *M. palmivorus* VE111;
- deslignificar a biomassa de *E. globulus in natura* com o caldo enzimático otimizado de *M. palmivorus* VE111;
- avaliar as modificações na estrutura da lignina de *E. globulus in natura* após tratamento com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111;
- detoxificar a biomassa de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor com o caldo enzimático otimizado de *M. palmivorus* VE111;
- hidrolisar enzimaticamente a biomassa de *E. globulus* com celulases e xilanases de *P. echinulatum* S1M29 e realizar fermentações etanólicas a partir da glicose proveniente da hidrólise enzimática;
- aplicar o secretoma de *M. palmivorus* VE111 em testes de *grafting* enzimático de compostos hidrofóbicos sobre a madeira de *E. globulus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Demanda energética

A projeção de que a atual população mundial de 7,6 bilhões deverá atingir 8,6 bilhões em 2030 e 9,8 bilhões em 2050 (Figura 1A) preocupa as autoridades dos governos mundiais (Thatcher *et al.*, 2018), uma vez que a demanda global por energia vem aumentando ainda mais rapidamente. O aumento da população mundial em consonância com o aumento nos padrões de vida e ao rápido desenvolvimento industrial nos países emergentes, acaba afetando a estabilidade dos ecossistemas, o clima global, bem como as reservas globais de petróleo, culminando em impactos ambientais e em aumento no preço do petróleo (Balat, 2011).

Cerca de dois terços das emissões globais dos gases de efeito estufa podem ser atribuídos ao fornecimento e uso de energia por combustíveis fósseis. As emissões de carbono devem ser reduzidas consideravelmente para mitigar os efeitos da mudança climática. Para cumprir as metas estabelecidas no Acordo de Paris sobre a Mudança Climática (2015) e manter a temperatura global subindo para menos de 2 °C, a intensidade de emissão de dióxido de carbono (CO₂) da economia global precisaria ser reduzida em 85% em 35 anos. Isso significa reduzir, em média, as emissões de CO₂ em 2,6% ao ano (Irena, 2017). O Brasil é signatário deste acordo e se comprometeu em reduzir as suas emissões para 37% até 2025 e para 43% até 2030, considerando os níveis de emissões de 2005 como base (Grassi & Pereira, 2019). Para que isso aconteça, a taxa de crescimento das energias renováveis deverá dobrar (Figura 1B).

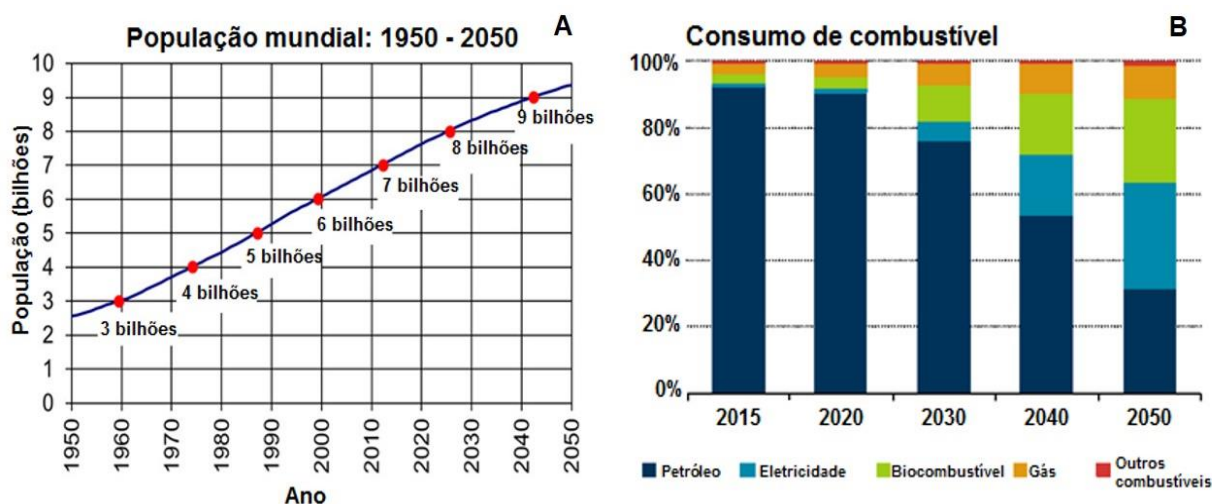


Figura 1. (A) Crescimento da população mundial de 1950 a 2050 (Thatcher *et al.*, 2018). (B) Atual consumo de diferentes combustíveis na área de transportes e projeção de mudanças nesses padrões até o ano de 2050 (Irena, 2017).

As energias renováveis representam atualmente quase um quinto do total do fornecimento global de energia. Neste sentido, os biocombustíveis têm atraído muita atenção e, dentre esses, o bioetanol se tornou uma opção eficaz, visto que ele é uma fonte originada de produtos vegetais, caracterizando-se por ser um combustível renovável e sua combustão menos agressiva ao meio ambiente, quando comparado aos combustíveis fósseis (Figura 2). Muitos países, como os Estados Unidos, Brasil, China, Canadá e vários países membros da União Europeia já afirmaram compromissos com programas de bioetanol como tentativas de reduzir a dependência de combustíveis fósseis (Zabed, 2017).

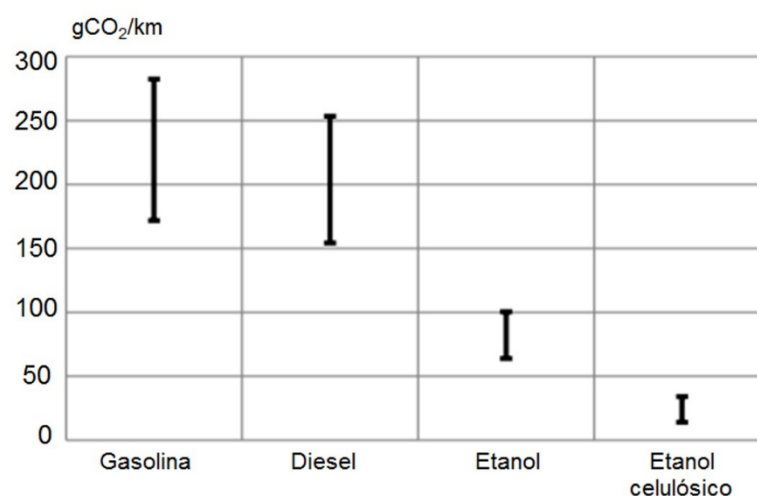


Figura 2. Redução na emissão de gás CO₂ por etanol celulósico em comparação com outros combustíveis (Unica, 2017).

Baseado na matéria-prima e no método de produção (Saladini *et al.*, 2016; Alalwan *et al.*, 2019), o bioetanol pode ser classificado como primeira, segunda, terceira e quarta geração (Figura 3).

O etanol de primeira geração, ou etanol 1G, usa biomassa comestível, como amido e açúcar, o que aumenta o custo de produção e provoca uma utilização ineficiente de recursos e gasto de energia na produção das culturas vegetais, além disso compete com a utilização de biomassa comestível, requer quantidades significativas de fertilizantes, de água e grandes áreas de terra (Rulli *et al.*, 2016).

O etanol de segunda geração, conhecido como etanol celulósico ou etanol 2G, é baseado na utilização de resíduos lignocelulósicos, tais como serragens, bagaços, madeiras de baixo preço, resíduos de colheita e resíduos municipais. Desta forma, o etanol 2G acaba não competindo com biomassas comestíveis. Apesar do etanol 2G superar as desvantagens do etanol 1G, mais etapas são necessárias para a produção desse biocombustível a baixo custo.

Nos últimos anos, avanços significativos foram alcançados, por meio da utilização de processos térmicos, químicos, biológicos ou enzimáticos para a desconstrução da parede celular celulósica presente na biomassa lignocelulósica e posterior fermentação dos açúcares liberados (Bhatia *et al.*, 2017).

O etanol de terceira geração, ou etanol 3G, diz respeito ao uso de matéria-prima aquática, como a biomassa de algas. No entanto, esse tipo de biomassa tem algumas desvantagens, como o seu alto custo de produção (Gambelli *et al.*, 2017).

Recentemente, fala-se em etanol de quarta geração, ou etanol 4G, que consiste no uso de microalgas e cianobactérias geneticamente modificadas por bioengenharia para fixarem mais CO₂ do ambiente, aumentando o rendimento de etanol (Vassilev & Vassileva, 2016).

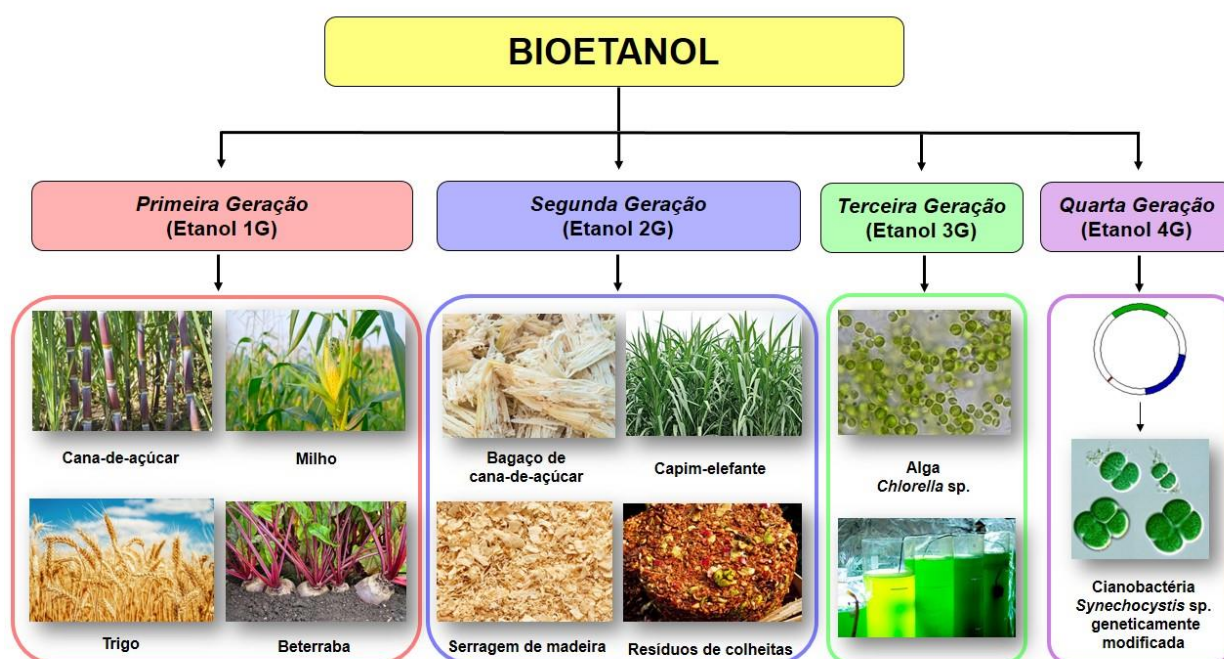


Figura 3. Produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas lignocelulósicas.

O Brasil é um país com tradição na produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar. Desde a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) na década de 70, a produção desse combustível passou por várias fases. Segundo informações do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT-Bioetanol), o etanol 2G é a principal aposta nacional para aumentar a oferta do produto sem que seja preciso elevar a área plantada de cana-de-açúcar (BiofuelsDigest, 2015). Isso porque o etanol 2G brasileiro será produzido da celulose obtida da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, ou seja, das sobras do processo atual de produção de etanol. No entanto, recentemente, as expectativas em relação ao etanol celulósico não são as

melhores, pois a estimativa de produção de 2,5 bilhões de litros para 2030 ainda está longe, uma vez que, com base no cenário atual, a previsão para a produção de etanol 2G até 2027 é de não ultrapassar 634 milhões de litros (Nova Cana, 2018).

A biomassa lignocelulósica apresenta uma maior quantidade de oxigênio e menor fração de hidrogênio e carbono em relação ao petróleo. Devido a essa diferença composicional, uma maior variedade de produtos pode ser obtido da lignocelulose do que à base de petróleo (Isikgor & Becer, 2015).

Diversos estudos vêm sendo realizados para a produção de etanol celulósico a partir de resíduos e/ou culturas energéticas diferentes da cana-de-açúcar. O capim-elefante, por exemplo, da espécie *Pennisetum purpureum* Schum., apresenta elevada produtividade quando comparado à cana-de-açúcar, produzindo cerca de 45 toneladas de matéria seca por hectare por ano (Somerville *et al.*, 2010). É uma gramínea plantada da mesma forma que a cana-de-açúcar, exigindo poucos nutrientes complementares para o crescimento. Essa espécie tem despertado grande interesse para a geração de energia e diversos estudos apontam seu potencial para a produção de etanol 2G (Menegol *et al.*, 2014, Scholl *et al.*, 2015).

Resíduos de madeiras de reflorestamento, como de eucalipto e pinus, também vêm despertando o interesse dos pesquisadores (Tura *et al.*, 2018). O cultivo de eucalipto e pinus é uma grande promessa para produção de etanol 2G, especialmente em regiões menos adequadas para o cultivo de cana-de-açúcar. Plantações de eucalipto, em especial, representam uma matéria-prima viável para a produção de combustíveis, além de compostos químicos e materiais derivados. Isso se deve ao fato de o eucalipto estar entre as plantações de árvores com o crescimento mais rápido do mundo. Diversos estudos já foram realizados com madeira, biomassa e serragem de diferentes espécies de eucaliptos para a produção de bioetanol (Gonzalez *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2014; Ramage *et al.*, 2017).

Atualmente, os esforços concentram-se não somente na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, mas também no maior aproveitamento dos demais componentes desta biomassa. Recentemente, as atividades de pesquisa e desenvolvimento voltadas para a produção comercial de etanol celulósico criou a oportunidade de aumentar consideravelmente a transformação da lignina (Figura 4) em produtos de valor agregado, o que incluem fibras de carbono, plásticos, espumas, membranas poliméricas, dispersantes, adesivos, nanomateriais para aplicações biomédicas, uma variedade de biocombustíveis (diesel, singás, hidrogênio, carvão) e produtos químicos atualmente provenientes do petróleo. Outras aplicações da lignina, que não é submetida a modificações químicas, abrangem a área de antioxidantes,

estabilizadores de raios ultravioleta (UV) e surfactantes (Ragauskas *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2018).

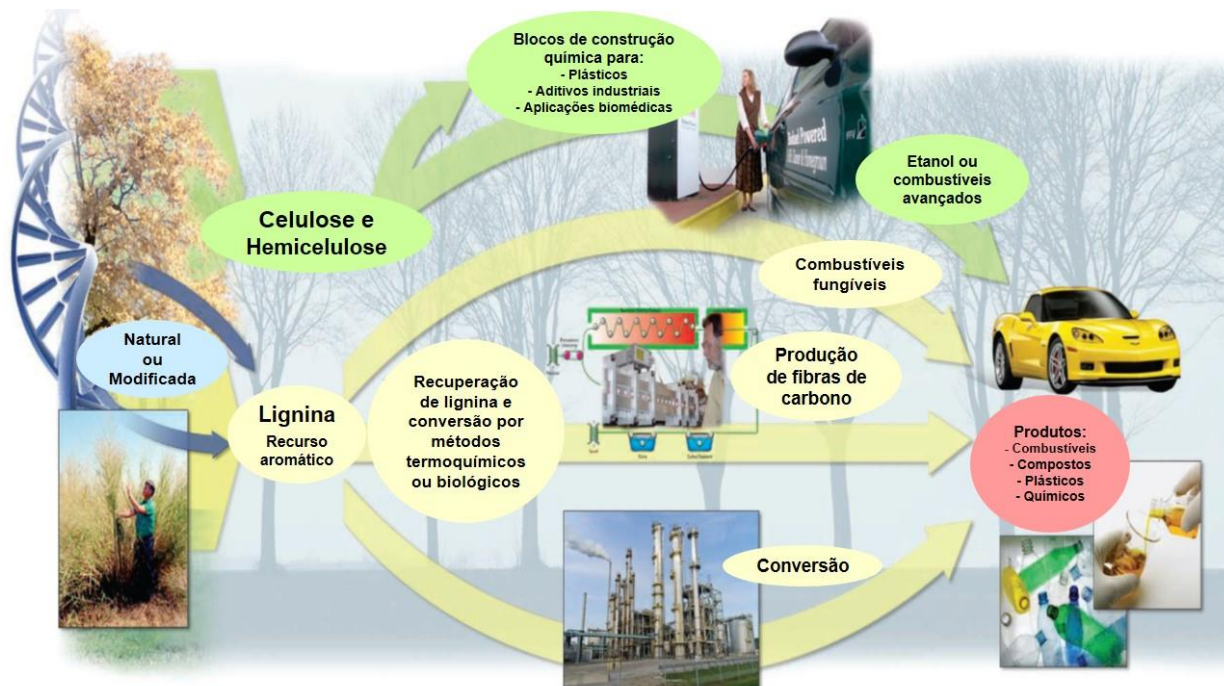


Figura 4. Produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica e separação de quantidades da lignina para o desenvolvimento de diversos produtos à base de lignina (Ragauskas *et al.*, 2014).

Com o aumento da possibilidade de usos da lignina, o mercado vem expandindo gradativamente (Figura 5). Tecnicamente, a lignina se acumula como um coproduto dos processos de polpação aplicados ao fracionamento de biomassa em diferentes setores industriais. A polpação Kraft - o processo de polpação dominante hoje – resulta em aproximadamente 130 milhões de toneladas de lignina por ano. Além disso, pode-se esperar grandes acúmulos de resíduos de lignina das usinas de biocombustíveis de segunda geração (Van den Bosch *et al.*, 2018; Becker & Wittmann, 2019).

O tamanho global do mercado de lignina foi avaliado em 793,7 milhões de dólares em 2018 e a projeção é de crescer 1,9% entre 2019 e 2025. Nos Estados Unidos, por exemplo, a crescente demanda por adesivos, aditivos de concreto e o lançamento de novos produtos deverão impulsionar a demanda por materiais leves, como as fibras de carbono, aumentando assim o consumo de lignina nos próximos anos (Grand Viewer Research, 2019). Outrossim, com a obrigatoriedade de produzir 36 bilhões de galões de biocombustíveis até 2022 nos Estados Unidos, mais da metade desse valor será fornecido por biomassa lignocelulósica, levando a produção de aproximadamente 62 milhões de toneladas de lignina residual (Chen & Van, 2017; Becker & Wittmann, 2019).

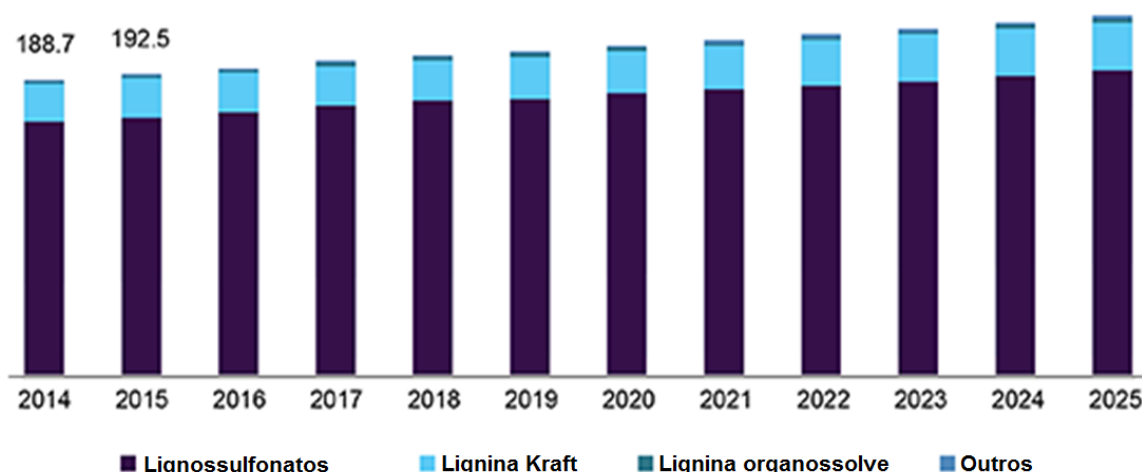


Figura 5. Mercado da lignina nos Estados Unidos, por produto, de 2014 a 2025, em milhões de dólares (Grand Viewer Research, 2019).

Além do Brasil, diversos países do mundo vêm desenvolvendo estudos na área de prospecção de fungos e engenharia de enzimas para a degradação de biomassa lignocelulósica e aproveitamento de seus componentes majoritários. Como o Brasil é um dos países de megadiversidade, a disponibilidade de genes em microrganismos, capazes de produzir enzimas que ataquem a parede celular é enorme. Uma das metas principais é identificar novas espécies e testar a ação de coquetéis enzimáticos e enzimas isoladas sobre a parede celular, em especial, sobre a degradação da lignina ou seus polissacarídeos isolados (INCT, 2014).

2.2 Biomassa lignocelulósica

A matéria vegetal lignocelulósica é o mais abundante material presente na Terra e é composta principalmente por três componentes: os polissacarídeos celulose e hemicelulose e a macromolécula fenólica lignina (Figura 6).

Juntamente com pequenas quantidades de outros componentes como pectina, grupos acetil, minerais, enzimas associadas à parede celular vegetal, proteínas estruturais e proteoglicanos, esses componentes formam uma rede intrincada que fornece resistência e durabilidade para a parede celular vegetal (Popper *et al.*, 2011; Isikgor & Becer, 2015).

A celulose, a hemicelulose e a lignina são os três maiores constituintes de parede celulares dos vegetais, unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Estes três componentes das paredes celulares vegetais constituem 97–99% da massa seca dos lignocelulósicos e as proporções podem ser distintas

dependendo do vegetal (Mosier *et al.*, 2005). Outros componentes poliméricos como amido e pectina estão presentes em menores quantidades (Martín *et al.*, 2007).

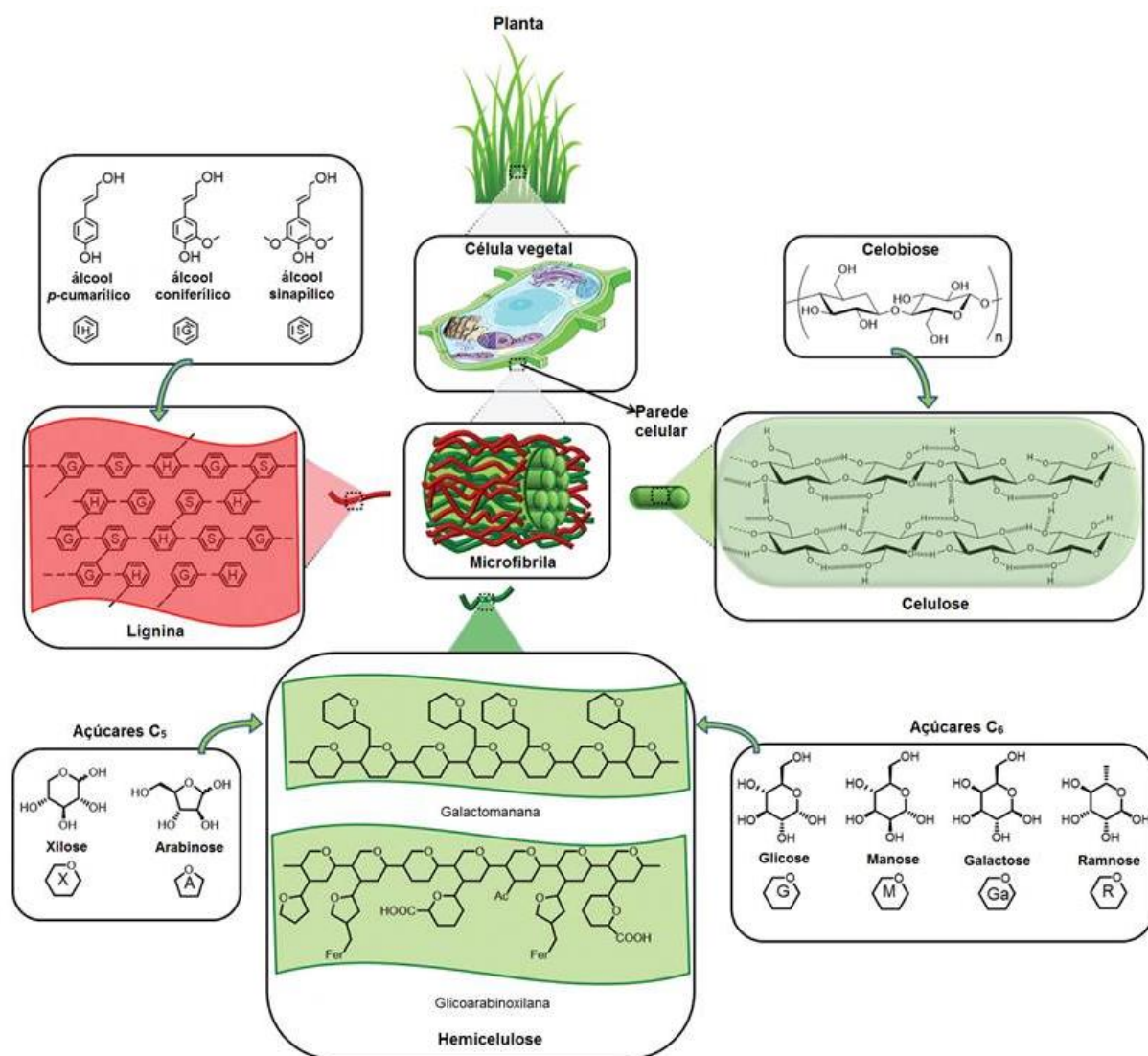


Figura 6. Os principais componentes e estrutura da lignocelulose (Isikgor & Becer, 2015).

A biomassa lignocelulósica, como referido, compreende uma ampla variedade materiais de vegetais, desde resíduos florestais de madeiras moles, conhecidas como *softwoods*, típicas de coníferas (pertencente ao grupo das gimnospermas), madeiras duras, conhecidas como *hardwoods*, típicas de plantas folhosas (pertencentes ao grupo das angiospermas), culturas energéticas, gramíneas, resíduos agrícolas até resíduos sólidos municipais (Carvalho *et al.*, 2009; Jönsson & Martín, 2016). A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-30% de

lignina e 1-2% de pectina (Fengel & Wegener, 1989; Saha, 2005) e varia conforme o tipo de biomassa (Figura 7, Tabela 1).

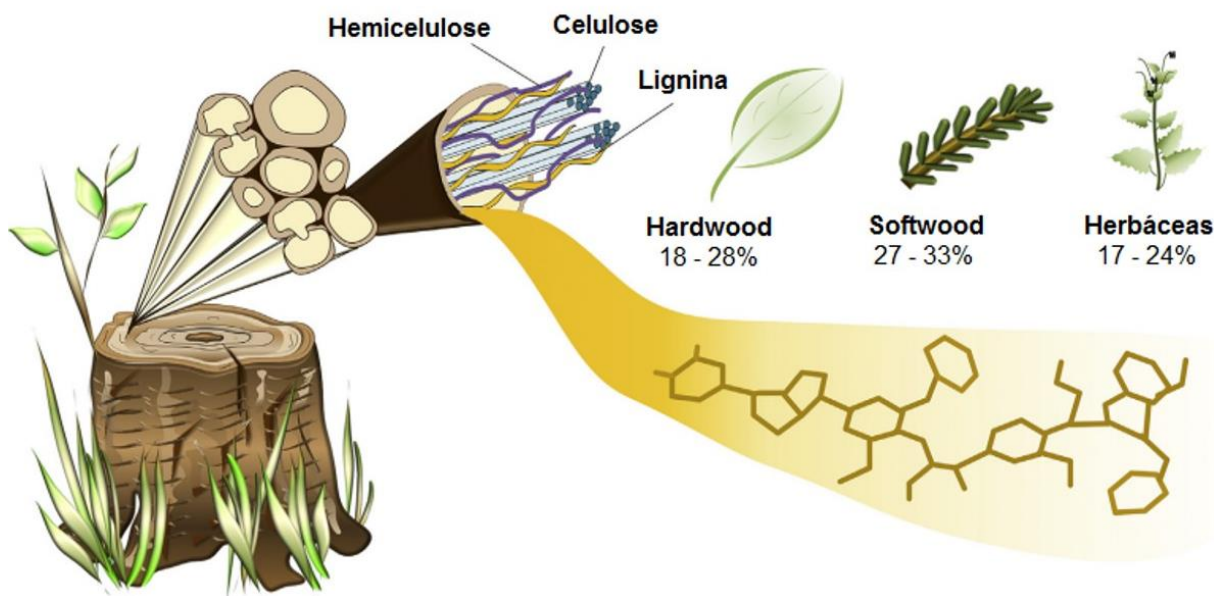


Figura 7. Ocorrência da lignina na natureza. A biomassa lignocelulósica é constituída praticamente por celulose, hemicelulose e lignina. O conteúdo de lignina e sua composição diferem de uma fonte vegetal para outra (Becker & Wittmann, 2019).

Tabela 1. Exemplos de biomassas lignocelulósicas e suas composições químicas (adaptado de Santos *et al.*, 2012; Isikgor & Becer, 2015).

Biomassa lignocelulósica		Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Softwood	Pinus	42 – 50	24 – 27	16 – 24
	Abeto	40 – 45	20 – 23	25 – 28
Hardwood	Álamo	50 – 58	26 – 28	15 – 16
	Carvalho	38 – 42	34 – 36	23 – 25
	Eucalipto	39 – 54	18 – 24	21 – 32
Resíduos Agrícolas	Palha de trigo	35 – 39	23 – 30	12 – 16
	Palha de cevada	36 – 43	24 – 33	6 – 10
	Casca de arroz	28 – 35	12 – 29	15 – 20
	Palha de aveia	31 – 35	20 – 26	10 – 15
	Talos de milho	35 – 39	16 – 35	7 – 18
	Bagço de cana	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Gramíneas	Palha de sorgo	32 – 35	24 – 27	15 – 21
	Gramíneas	25 – 40	25 – 50	10 – 30
	Switchgrass	35 – 40	25 – 30	15 – 20
Cultura energética	Capim-elefante	34 – 38	20 – 25	20 – 22

2.2.1 Celulose

O principal componente da biomassa lignocelulósica é a celulose (Figura 8), sendo o polímero natural de maior ocorrência no mundo. Trata-se de um homopolissacarídeo linear,

possuindo porções amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidroglicose (resíduos β -D-glicopiranosídicos) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). Ao contrário da anidroglicose, que é a unidade de repetição em outros polímeros de glucano, na cadeia de celulose essa é representada pelo dissacarídeo celobiose (Aguiar & Ferraz, 2011; Santos *et al.*, 2012; Isikgor & Becer, 2015).

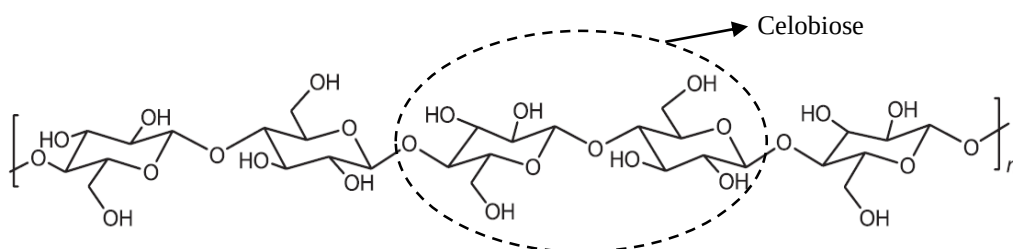


Figura 8. Representação esquemática da molécula de celulose, com destaque para a celobiose (Santos *et al.*, 2012).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose (Figura 9) é formada por polissacarídeos ramificados e de menor massa molecular que a celulose. É considerado um heteropolissacarídeo formado tanto por hexoses (glicose, manose, galactose e ramnose) como por pentoses (xilose e arabinose), além de ácidos urônicos e grupos acetila (Aguiar & Ferraz, 2011; Santos *et al.*, 2012; Isikgor & Becer, 2015).

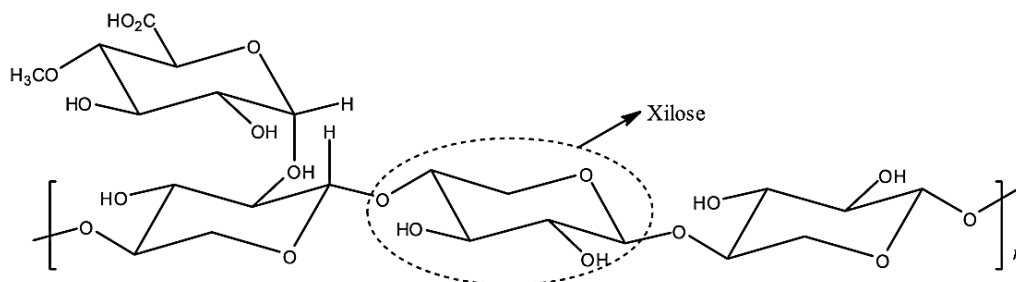


Figura 9. Representação esquemática da molécula da hemicelulose, com destaque para a xilose (Santos *et al.*, 2012).

2.2.3 Pectina

A pectina (Figura 10), conforme a biomassa lignocelulósica, pode representar uma quantidade significativa entre os constituintes da parede celular, especialmente em resíduos de frutas cítricas. É constituída quimicamente por heteropolissacarídeos ramificados numa cadeia constituída de resíduos de ácidos galacturônicos metilesterificados, unidos por ligações α -1,4 (Sousa *et al.*, 2017).

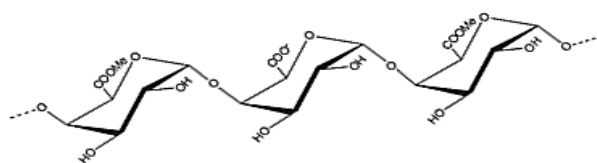


Figura 10. Representação esquemática da molécula da pectina (Sousa *et al.*, 2017).

2.2.4 Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas e difere significativamente dos polissacarídeos. É uma estrutura que provoca recalcitrância na parede celular, uma vez que funciona como uma “cola celular” que fornece resistência à compressão do tecido vegetal, rigidez à parede celular e resistência a insetos e patógenos (Aguiar & Ferraz, 2011; Santos *et al.*, 2012; Isikgor & Becer, 2015). A lignina está presente nas diferentes camadas da parede celular em diferentes proporções, correspondendo por até 84% do peso da lamela média composta (lamela média + parede secundária externa) (Figura 11A) (Rowell, 2005; Aguiar & Ferraz, 2011).

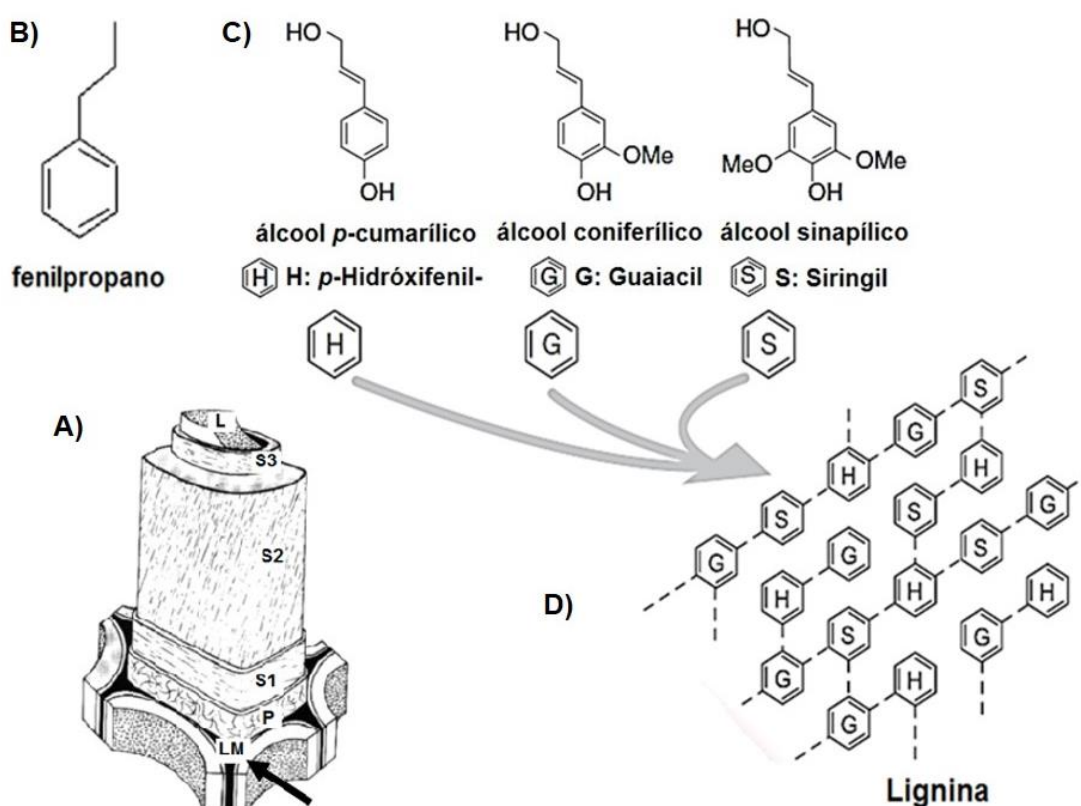


Figura 11. (A) Representação esquemática de uma célula vegetal: lamela média (LM); parede primária (P); parede secundária externa (S1); parede secundária média (S2); parede secundária interna (S3); lúmen (L). (B) Unidade de fenilpropano. (C) Álcoois hidróxi-cinâmílicos precursores. (D) Macromolécula lignina. (Fengel & Wegener, 1989; Rubin, 2008).

A lignina é considerada uma macromolécula aromática formada a partir do acoplamento radicalar de suas unidades fenilpropanoides (Figura 11B), conhecidas como álcoois hidróxi-cinâmílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 11C). Dependendo do grau de metoxilação do anel aromático, diz-se que a unidade básica é *p*-hidróxifenil (não metoxilada, derivada do álcool cumarílico, conhecida como lignina **H**), guaiacil (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico, conhecida como lignina **G**) ou siringil (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico, conhecida como lignina **S**). A interação das unidades H, G e S caracterizam a heterogeneidade da lignina (Figura 11D) (Fengel & Wegener, 1989; Carvalho *et al.*, 2009; Laurichesse & Avérous, 2014).

A porcentagem das unidades básicas de álcool cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S) variam muito dependendo do material vegetal (Tabela 2). Ligninas de madeiras de coníferas (*softwood*) são compostas majoritariamente por unidades G, enquanto as ligninas de madeiras de folhosas (*hardwood*) são mais ricas em unidades S, sendo denominadas de ligninas tipo GS (Figura 12) (Fengel & Wegener, 1989; Carvalho *et al.*, 2009; Windeisen & Wegner, 2012; Becker & Wittmann, 2019).

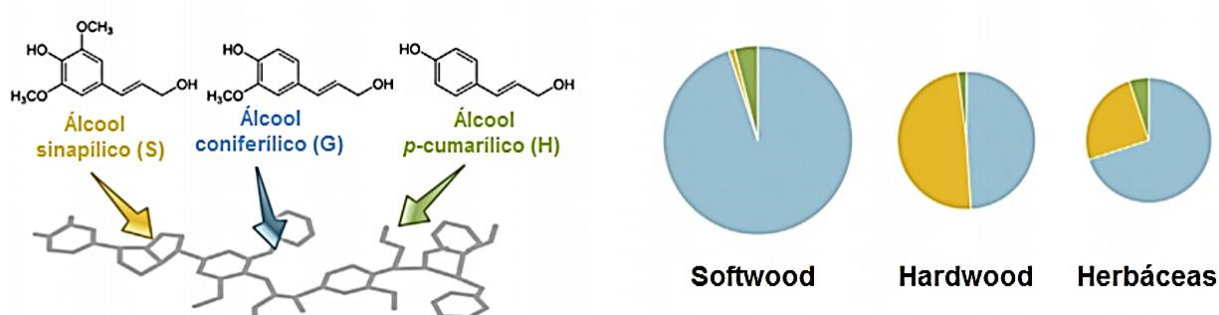


Figura 12. Ocorrência e composição das unidades fenilpropanoides da lignina (S, G e H) na natureza (Becker & Wittmann, 2019).

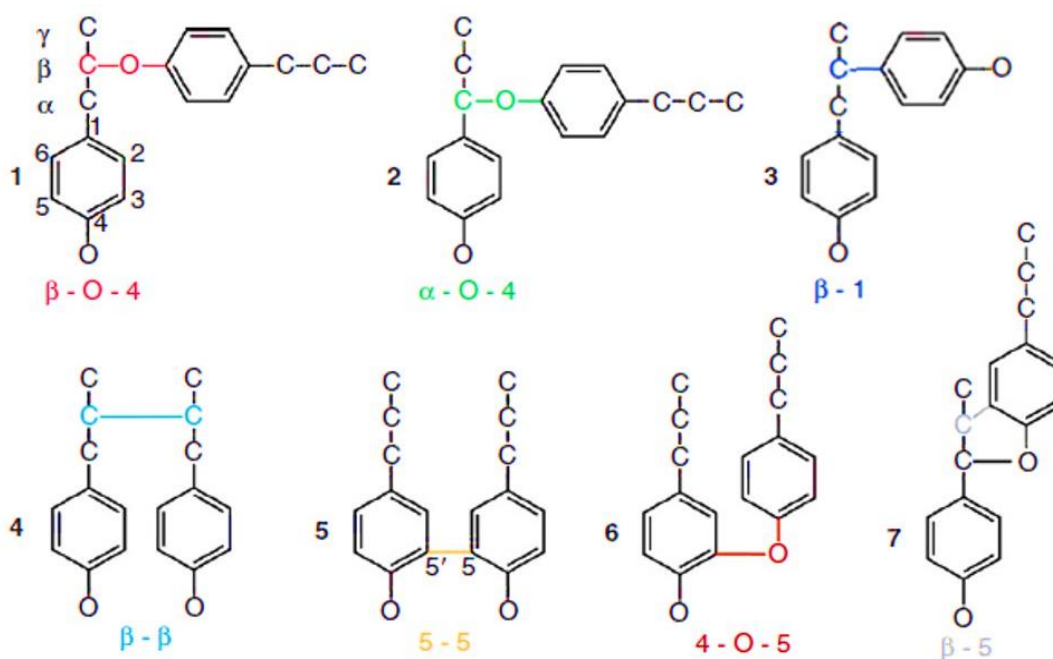
Os diferentes tipos de acoplamento entre os álcoois hidróxi-cinâmílicos dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano (Tabela 3, Figura 13), sendo a ligação aril éter β -O-4 a mais presente (cerca de 50%). Entre outras ligações presentes estão: aril éter α -O-4, β -1 (1,2 diarilpropano), β - β (pinorresinol), 5-5 (bifenil), 4-O-5 (diaril éter), β -5 (fenil cumarato) (Carvalho *et al.*, 2009; Windeisen & Wegner, 2012; Laurichesse & Avérous, 2014).

Tabela 2. Composição da lignina de diferentes recursos renováveis (Windeisen & Wegner, 2012).

Biomassa Lignocelulósica	Lignina H (%)	Lignina G (%)	Lignina S (%)
<i>Softwood</i>	< 10	> 95	2 – 3
- Abeto	5	94	1
- Madeira de compressão	29	70	1
<i>Hardwood</i>	< 8	20 – 60	40 – 75
- Faia	4	56	40
<i>Plantas anuais</i>			
- Bambu	25	35	40
- Gramíneas	5 – 33	33 – 80	20 – 54

Tabela 3. Ligações características da lignina em *softwood* e *hardwood* (Windeisen & Wegner, 2012).

Ligações	Tipo de dímeros	<i>Softwoods</i> (%)	<i>Hardwoods</i> (%)
1 β -O-4	β -aril-éter	35 – 60	50 – 70
2 α -O-4	α -aril-éter	2 – 8	7
3 β -1	1,2-diarilpropano	7	7
4 β - β	Pirorresinol	2 – 3	3 – 4
5 5-5	Bifenil	10 – 11	5
6 4-O-5	Diaril éter	4	7
n β -5	Fenil cumarato	9 – 12	4 – 9

**Figura 13.** Ligações características da lignina (Windeisen & Wegner, 2012).

Na Figura 14, está representada uma seção de lignina presente em madeira mole (*softwood*), com detalhes para as ligações características entre as unidades formadoras de lignina.

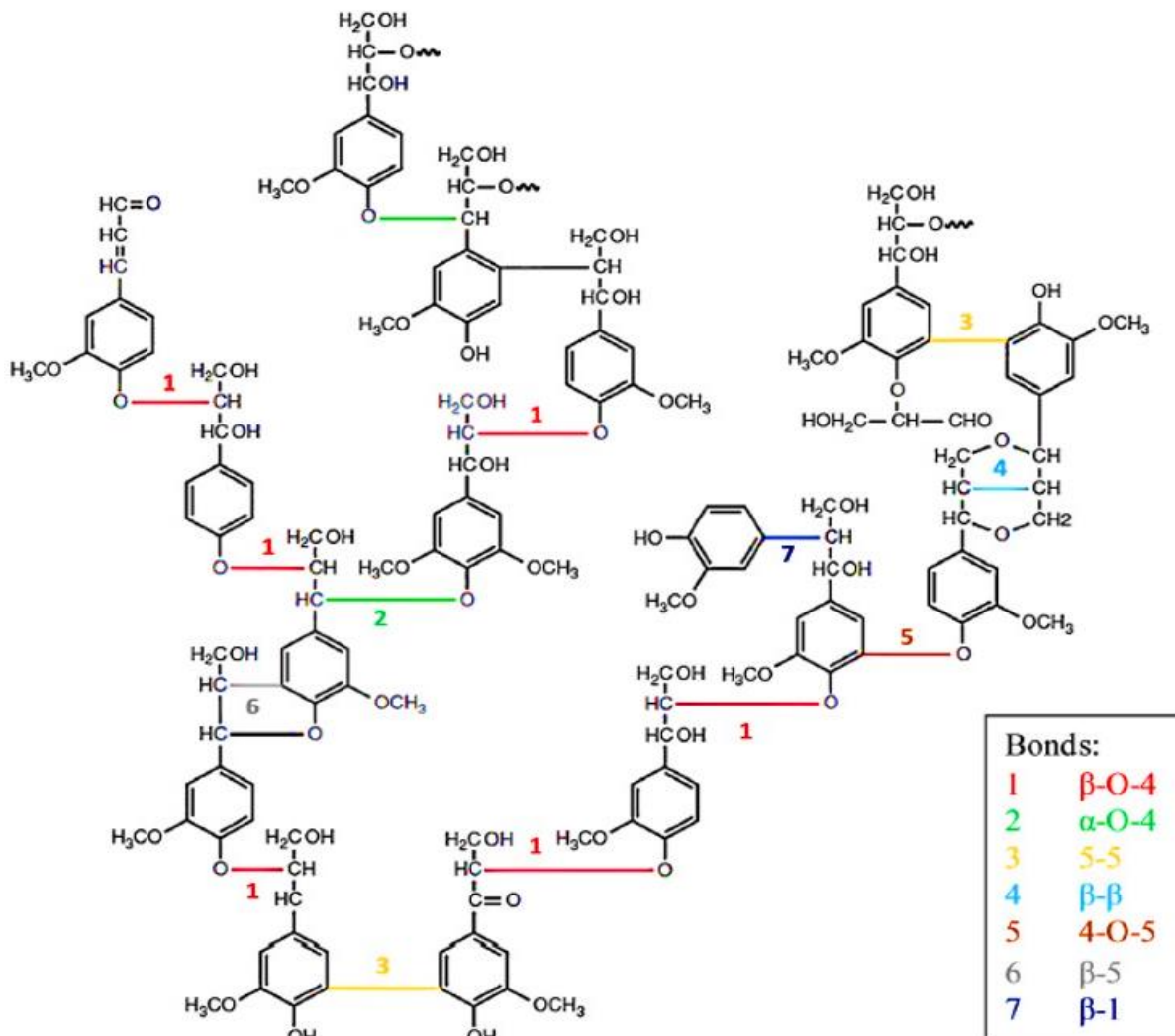


Figura 14. Seção de lignina em madeira mole (*softwood*) (Windeisen & Wegner, 2012).

Levando em consideração o conceito de biorrefinaria que pode ser definido como “uma unidade integral que pode converter biomassa em produtos de base biológica, incluindo alimentos, rações, produtos químicos e/ou materiais e bioenergia, como biocombustíveis” (Fernando *et al.*, 2006), o objetivo desse conceito emergente é usar a biomassa lignocelulósica, após métodos de pré-tratamento, separando seus principais constituintes com maior valor agregado. Este conceito de biorrefinaria cai no âmbito da química verde, evitando a produção de produtos de baixo valor residual e utilização de solventes para extrair os componentes da

matéria-prima (Laurichesse & Avérous, 2014). Atualizando ainda mais esse conceito, deve-se afirmar que a lignina não deve ser considerada como um resíduo, mas uma matéria-prima com um enorme potencial para a síntese de produtos de alto valor agregado (Figura 15), como dispersantes, aditivos, nanomateriais, entre outros.

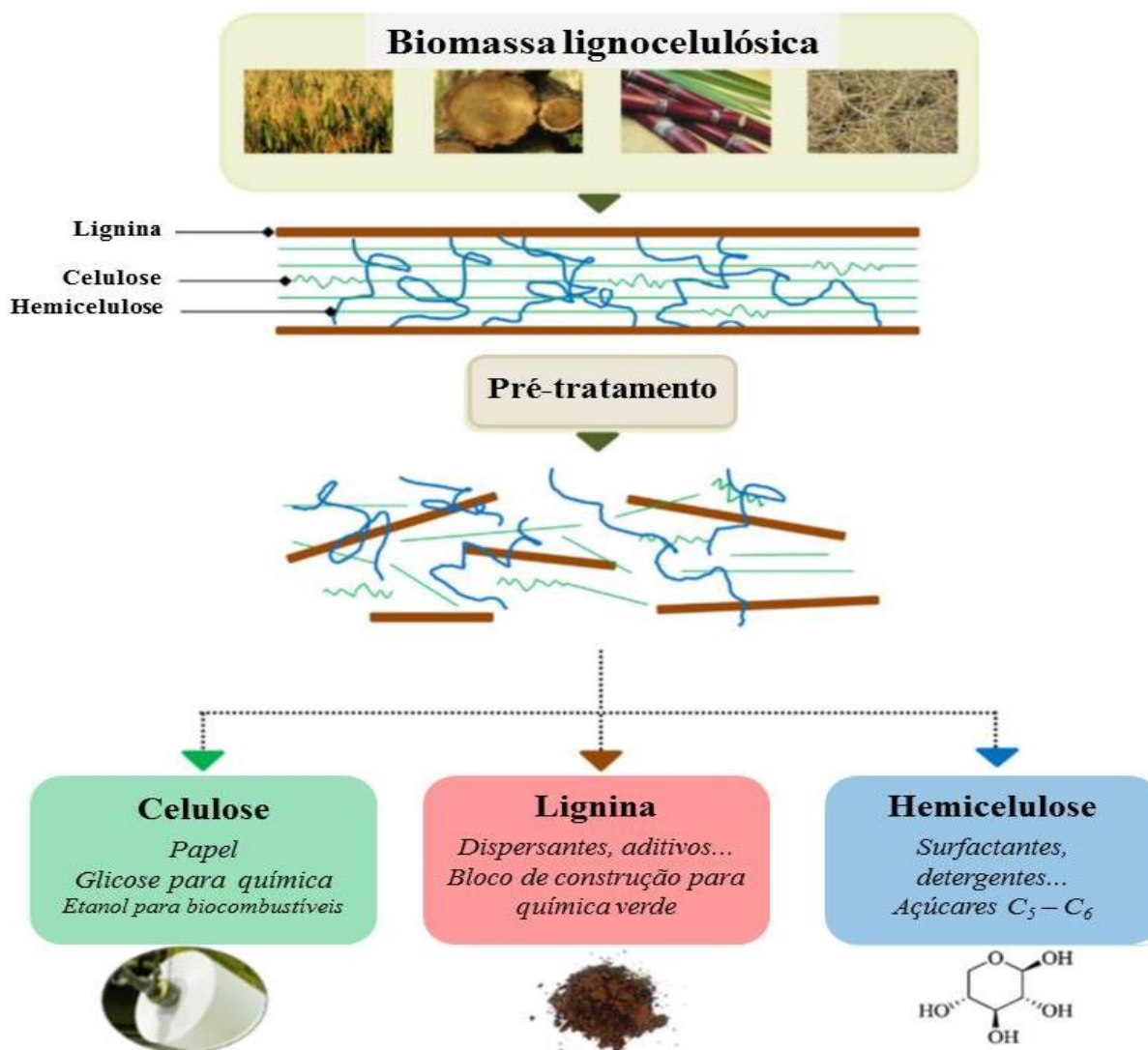


Figura 15. Conceito esquemático de biorrefinaria baseado na biomassa lignocelulósica (Laurichesse & Avérous, 2013).

2.3 Eucalipto

Entre as biomassas lignocelulósica, o eucalipto está entre as plantações que mais crescem no mundo. Além disso, eucaliptos têm sido utilizados para produção de bioenergia em numerosos países, bem como para o fornecimento de fibras de celulose, com estudos práticos na Austrália, Europa, Estados Unidos (Havaí), Irlanda, África do Sul, Brasil, Uruguai e Venezuela (Gonzalez *et al.*, 2011).

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália com algumas espécies também nativas da Indonésia e Papua Nova Guiné. Embora existam mais de 700 espécies, menos de 20 dessas espécies foram amplamente cultivadas fora do seu alcance nativo e são atualmente utilizadas com fins comerciais em todo o mundo. O movimento de sementes de eucalipto se tornou importante em meados de 1800 devido à necessidade de madeira na exploração de minas de ouro na África do Sul, bem como uma fonte de madeira para abastecer locomotivas a vapor no Brasil. Ao mesmo tempo, introduções de espécies estavam acontecendo em outras partes do mundo, incluindo os Estados Unidos (Gonzalez *et al.*, 2011; Remade, 2017; Remade, 2019b; Embrapa, 2019).

O eucalipto é uma biomassa lenhosa de rápido crescimento, cultivado no Brasil principalmente para produção de madeira e papel (Remade, 2013; Jonker *et al.*, 2015). Recentemente, tem sido indicado como potencial matéria-prima para a produção de etanol 2G. A casca do eucalipto tem 20% menos carboidratos do que a de cana-de-açúcar. No entanto, sua vantagem está em possuir mais carboidratos suscetíveis à fermentação (83% contra 65% da cana), o que torna atrativo o uso de eucalipto como biomassa energética (Nova Cana, 2013).

Entre 1970 e hoje, o rendimento médio do eucalipto brasileiro aumentou significativamente. Atualmente, o eucalipto brasileiro é plantado para papel e celulose, carvão vegetal, construção civil, indústria moveleira, produção de *pellets*, energia calorífica, produção de óleos, de mel, extração de taninos, recuperação de terras e redução de queimadas. Atualmente, não há instalações de processamento de etanol utilizando eucalipto no Brasil. Entretanto, com estudos sobre o aumento em seu rendimento, o eucalipto tem despontado como um promissor recurso para a produção de etanol 2G no Brasil (Jonker *et al.*, 2016; Embrapa, 2019).

Entre as espécies que são cultivadas em maior quantidade no Brasil, estão *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus viminalis* e híbridos de *E. grandis* × *E. urophylla*. Em seguida, temos a espécie *Eucalyptus globulus* (Figura 16), que apresenta maior representatividade no sul do Brasil, em detrimento das condições climáticas exigidas, sendo que sua produção se destaca em países europeus, como Portugal e Espanha (Ramage *et al.*, 2017; Remade, 2017; Embrapa, 2019).



Figura 16. (A) Plantação de *Eucalyptus globulus*. (B) Folha, flor e botão de *Eucalyptus globulus*.

2.4 Fungos lignocelulolíticos

Fungos são organismos eucarióticos, quimioheterotróficos, de nutrição absorptiva com digestão extracorpórea parcial, predominantemente aeróbicos ou fermentadores facultativos, que apresentam estrutura corpórea pluricelular micelial (fungos filamentosos) ou unicelular leveduriforme (leveduras), com parede celular constituída de quitina e glicanos e tendo o ergosterol como principal esteroide constituinte da membrana plasmática. Os fungos são predominantemente saprófitos e, sem eles, a matéria orgânica vegetal se acumularia, cobrindo todo o solo e impossibilitando a vida na Terra. Eles podem ainda viver associados a outros organismos como parasitas ou mutualistas, como também formarem associações que não compreendem nem relação de parasitismo estrito nem mutualismo estrito, como no caso dos líquens e micorrizas (Alexopoulos *et al.*, 1996; Esposito & Azevedo, 2010).

Na natureza, os fungos apresentam um papel central na degradação da biomassa lignocelulósica. Esses seres vivos realizam a ciclagem de nutrientes nos ecossistemas, através de enzimas celulasas, hemicelulasas, pectinas, amilases, ligninases, proteases, entre outras (Wright & Albertó, 2006), as quais podem ser classificadas basicamente em dois grupos: as oxidoreductases e as hidrolases.

Os fungos responsáveis pela degradação da madeira (lignocelulose) estão divididos em três classes (Figura 17) segundo Szklarz *et. al.* (1989):

- fungos de degradação branca (*white-rot fungi*): basidiomicetos que degradam completamente a lignina e a celulose. Dentro desta classificação, podem ser agrupados em dois

subgrupos: aqueles que promovem uma degradação simultânea dos componentes da parede celular e aqueles que realizam uma deslignificação seletiva, atacando inicialmente a lignina e a hemicelulose e, mais tarde, a celulose. No primeiro grupo estão fungos que atacam principalmente *hardwoods*. Exemplos: basidiomicetos (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrisosporium*) e alguns ascomicetos (*Xylaria hypoxylon*). No segundo grupo, estão fungos que atacam tanto *hardwoods* como *softwoods*. Exemplos: basidiomicetos (*Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus* spp. e *Phellinus pini*) (Goodell *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009).



Figura 17. Classificação e exemplos de fungos lignocelulolíticos, conforme Szklarz *et al.* (1989).

- fungos de degradação parda (*brown-rot fungi*): são basidiomicetos que causam apenas uma desmetilação da lignina, desorganizando a parede celular e permitindo a entrada de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Geralmente degradam *softwoods*. Exemplos: *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus betulinus*, *Postia placenta*, *Serpula lacrimans*) (Goodell *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009).

- fungos de degradação branda (*soft-rot fungi*): são principalmente ascomicetos e deuteromicetos. Decompõem eficientemente a celulose, porém em velocidades reduzidas, sendo a lignina levemente alterada. Geralmente degradam *hardwoods*. Exemplos: ascomicetos

(*Chaetomium globosum*, *Ustilina deusta*), deuteromicetos (*Alternaria alternata*, *Thielavia terrestres*, *Paecilomyces* spp.). Alguns basidiomicetos de degradação branca (*Inonotus hispidus*) e parda (*Rigidoporus crocatus*) causam degradação branca facultativa (Goodell *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009).

Um quarto grupo de fungos degradadores de lignocelulose diz respeito àqueles que atacam tanto *hardwoods* como *softwoods* e atuam nos extrativos da madeira e nos compostos solúveis em água (açúcar e amido). São denominados fungos de mancha (*stain fungi*) e referem-se a ascomicetos (*Ophiostoma* e *Ceratocystis* spp.) e deuteromicetos (*Phialophora* e *Trichoderma* spp.).

Fungos são relatados na literatura como excelentes produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que degradam a biomassa lignocelulósica. Por exemplo, *Trichoderma reesei* apresenta um conjunto de enzimas altamente eficientes na degradação da celulose (Martinez *et al.*, 2008), enquanto que espécies de *Aspergillus* produzem muitas enzimas para degradar pectina (Martens-Uzunova & Schapp, 2009) e *Neurospora crassa* apresenta um arsenal enzimático para a degradação da hemicelulose (Sun *et al.*, 2012).

Diferentes espécies de *Penicillium* também vêm sendo estudadas na produção de enzimas lignocelulolíticas e, entre estas, *Penicillium echinulatum* está entre os microrganismos com grande potencial para a produção de celulasas (Dillon *et al.*, 1999; Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011). A linhagem mutante S1M29 de *P. echinulatum* apresenta uma proporção equilibrada de atividades sobre papel-filtro (FPA) e β -glicosidase, fato relevante para a hidrólise da celulose (Martins *et al.*, 2008). Adicionalmente, FPA e β -glicosidasas de *P. echinulatum* são importantes para hidrólise de celulose, pois as celulasas produzidas apresentam estabilidade térmica entre 50 °C e 55 °C, respectivamente (Camassola *et al.*, 2004).

O secretoma de diferentes linhagens de *P. echinulatum*, linhagem selvagem e mutantes, foram alvo de pesquisa (Ribeiro *et al.*, 2012). Nestes estudos, verificou-se que a linhagem mutante S1M29 de *P. echinulatum* apresenta em seu secretoma uma quantidade expressiva de celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidasas, além de outras enzimas e proteínas importantes na degradação da celulose, tais como celulose monoxigenase e soleninas; na degradação da hemicelulose, como xilanases, mananases e esterases e, em quantidades menores, pectinases e ligninases, como as oxidases (Schneider *et al.*, 2016).

Com relação aos basidiomicetos produtores de enzimas ligninolíticas, destacam-se os fungos de podridão branca, como *P. chrysosporium* e espécies dos gêneros *Pleurotus* e *Trametes*, fungos especializados na degradação de lignina. A atividade destas enzimas varia de

acordo com a espécie e até mesmo com sua linhagem e, além disso, as secreções podem ser induzidas ou reprimidas conforme as condições do ambiente em que este organismo se desenvolve (Majeau *et al.*, 2010; Bettin, 2010).

2.4.1 Macrofungos

Os macrofungos, fungos com fase sexuada visível a olho nu, estão inseridos nos Filos Basidiomycota e Ascomycota. Para degradar a biomassa vegetal, estes são dotados de um sistema composto por diversas enzimas, dentre estas as celulasas, hemicelulasas, pectinases e oxidoredutases. As oxidoredutases, também conhecidas como ligninases ou enzimas ligninolíticas, podem degradar uma ampla variedade de substratos orgânicos e inorgânicos específicos e por isso podem atuar sobre substratos semelhantes aos encontrados na natureza. Por esse motivo, apresentam grande importância biotecnológica, sendo vistas como ferramentas verdes, pois podem ser utilizadas na substituição de substâncias químicas nos processos das indústrias alimentícia, farmacêutica, biomédica, têxtil, papelreira e energética, podendo tornar os processos mais econômicos e eficientes (Mezzomo, 2013; Agrawal *et al.*, 2018).

O filo Basidiomycota inclui fungos em sua maioria saprófitos, que possuem basídios, corpos reprodutivos que vão de alguns centímetros até quase um metro, todos visíveis a olho nu (Silveira, 1995). O basidioma (Figura 18) pode ser formado pelo píleo, pelo himenóforo e himênio (que contêm os esporos), e pelo estípite (que dá sustentação), podendo apresentar também anel, véu e/ou volva (Andrés *et al.*, 1990; Rosa, 2013).

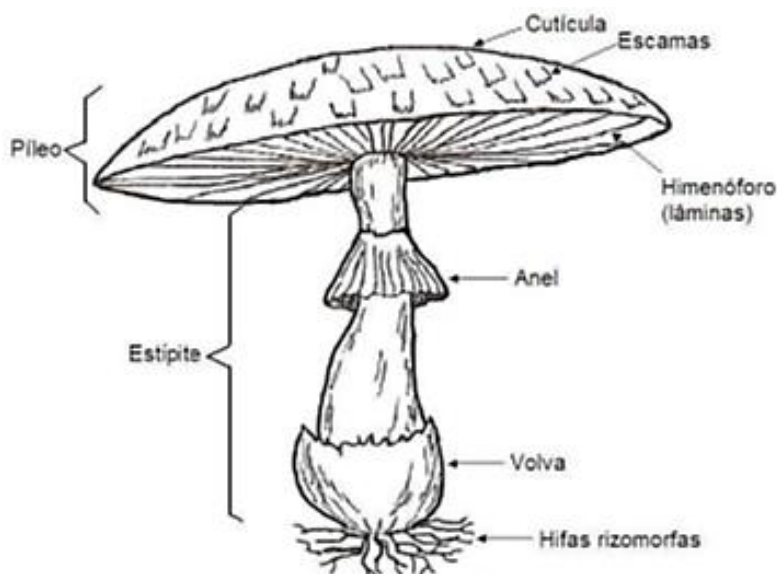
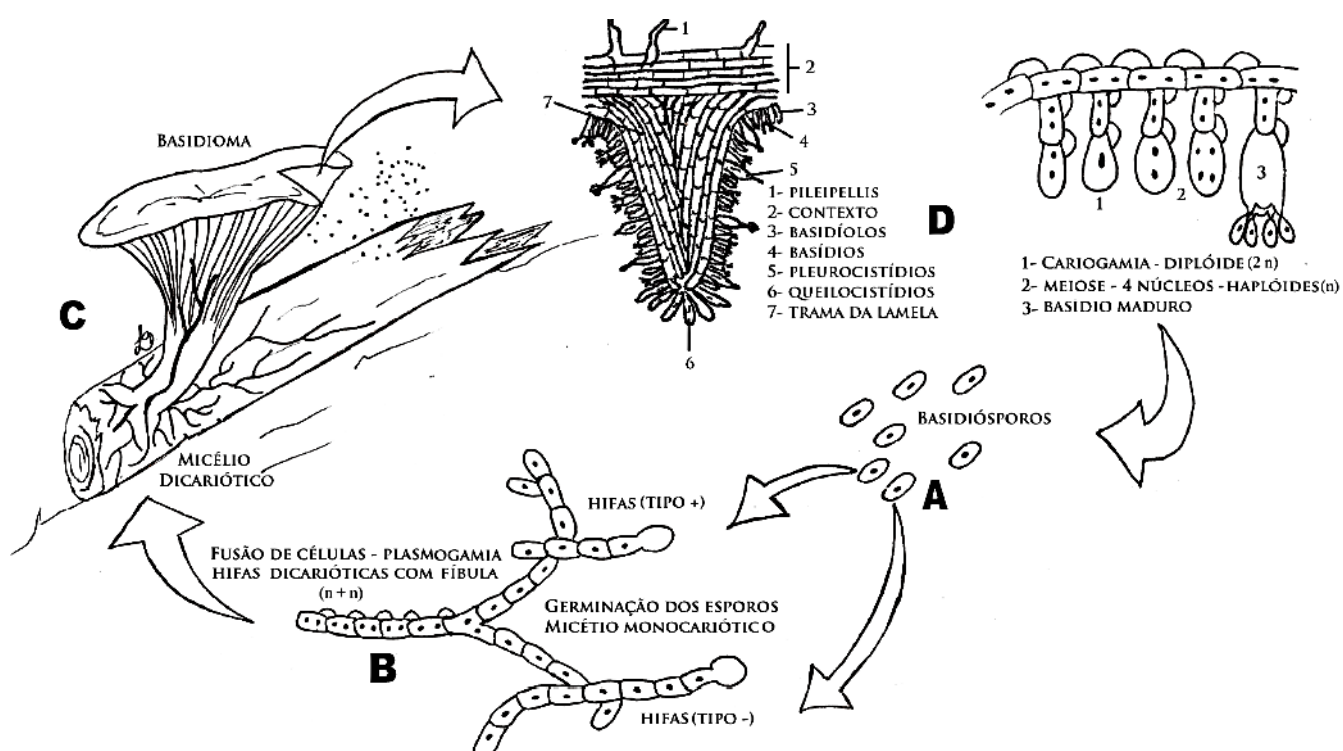


Figura 18. Principais estruturas de um fungo do filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina (Camassola & Rosa, 2008).

Na reprodução sexuada de um macromiceto (Figura 19), primeiramente os basidiósporos germinam formando hifas haplóides (n) que possuem diferentes tipos sexuais **(A)**. Na sequência, hifas + e hifas – funde-se, ocorrendo assim plasmogamia, formando hifas dicarióticas ($n + n$) com fíbulas **(B)**. Em condições favoráveis de umidade e temperatura, a partir do micélio dicariótico, forma-se o basidioma **(C)**. No basidioma (himênio), para o desenvolvimento do basídio, ocorre primeiramente cariogamia com formação de núcleo diplóide ($2n$), após ocorre meiose com formação de 4 núcleos haplóides (n), os basídios apresentam os basidiósporos **(D)**, que após maduros irão se dispersar dando continuidade ao ciclo (Alexopoulos & Mims, 1985; Kirk *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2016).



O filo Basidiomycota inclui três subfilos: Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilagionomycotina (Kirk *et al.*, 2008). A grande maioria das espécies de Basidiomycota pertence ao subfilo Agaricomycotina (98% das espécies), conhecidas como Agaricomycetes. É exatamente neste grupo que estão os agaricomícetos mais comumente conhecidos – os cogumelos (Hibbett *et al.*, 2007). Agaricomycotina é o subfilo dentro de Basidiomycota no qual se encontram os macrofungos (Rosa, 2013).

2.4.1.1 Gênero *Marasmiellus*

Os fungos do gênero *Marasmiellus* pertencem à família Marasmiaceae, ordem Agaricales, classe Agaricomycetes, filo Basidiomycota. Trata-se de um basidiomiceto de degradação branca (*white-rot fungi*).

O gênero *Marasmiellus* Murrill é amplamente distribuído em todo o território tropical e áreas subtropicais do mundo e está constituído de mais de 250 espécies (Kirk *et al.*, 2008) (Figura 20). Ocorrem mais frequentemente sobre a madeira, folhas mortas ou vivas e mais raramente entre musgos ou gramíneas no solo. Algumas espécies formam micorrizas endotróficas, outras são saprófitas ou parasitas. Alguns representantes causam doenças em várias culturas economicamente importantes, como por exemplo, banana, cana-de-açúcar, café, milho, coco e óleo de palma. Outras espécies são comestíveis e comercializadas em feiras e mercados (Almaliky *et al.*, 2012; Pong *et al.*, 2012).

Segundo Singer (1986), as principais características destes fungos são: basidioma geralmente pequeno e membranáceo, himenóforo lamelar, basídios geralmente com quatro basidiósporos, estípite central, fino, longo, preto ou colorido. Basidiosporos lisos, inamilóides, hialinos sob o microscópio.

O gênero *Marasmiellus* não é monofilético. Em um estudo filogenético de fungos gymnopoides, Wilson & Desjardin (2005) identificaram um clado de *Marasmiellus* que inclui várias espécies de *Marasmiellus* e de *Gymnopus* e um clado de *Gymnopus*, o qual incluiu as espécies típicas de *Gymnopus* e várias espécies de *Marasmiellus*.

O fungo *Marasmiellus palmivorus* foi anteriormente classificado como *Marasmius palmivorus*. Hemmes & Desjardin (2002) agruparam esse fungo no gênero *Marasmiellus* baseado em sua proximidade morfológica com outras espécies de *Marasmiellus*, como *Marasmiellus trojanus* e *Marasmiellus semiutus*. Além disso, Wilson & Desjardin (2005) também revisaram o gênero e o classificaram previamente como *Marasmiellus palmivorus* (Sharples) Desjardin *comb. prov.* até futuras análises filogenéticas que comprovaram sua identificação (Pong *et al.*, 2012).

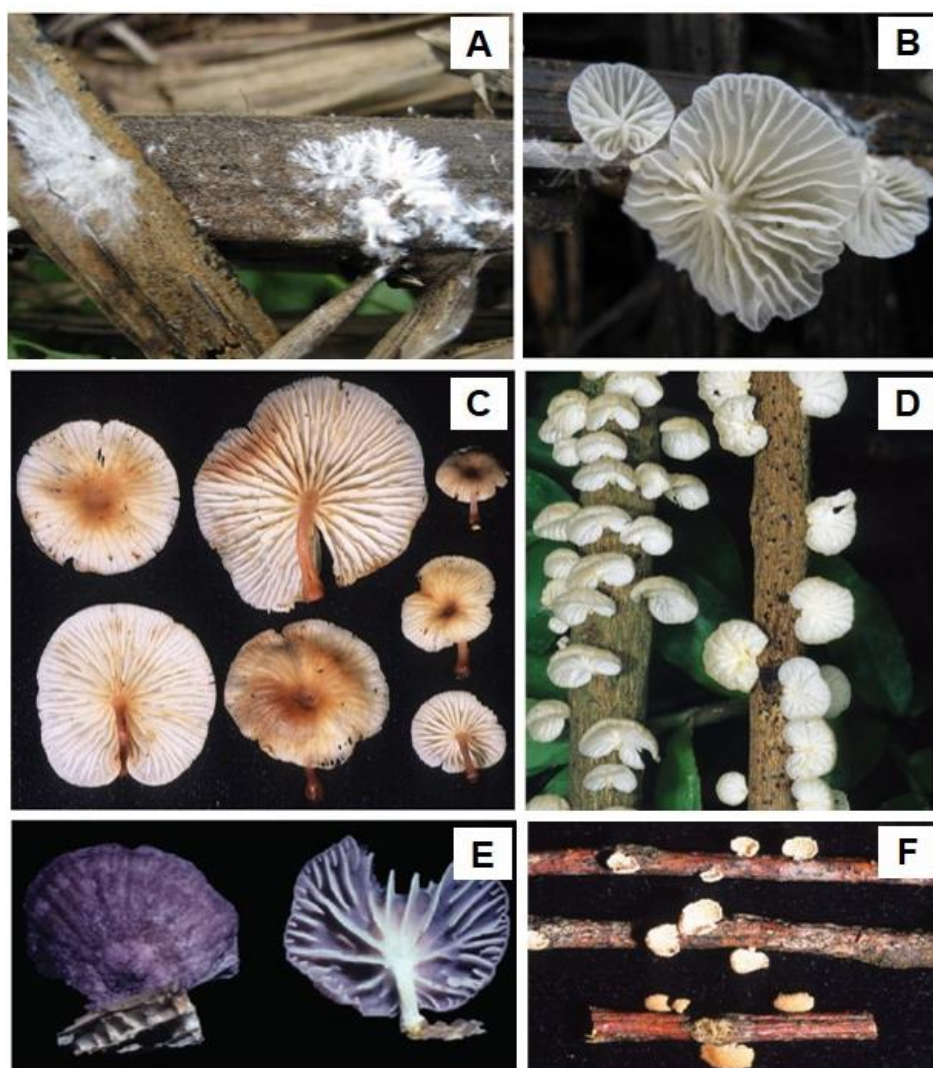


Figura 20. Imagens de espécies de fungos do gênero *Marasmiellus*. (A) *Marasmiellus palmivorus* sobre tronco de palmeira; (B) basidioma de *Marasmiellus palmivorus* (Pong *et al.*, 2012); (C) *Marasmiellus umbilicatus*; (D) *Marasmiellus reniformis*; (E) *Marasmiellus purpureoalbus*; (F) *Marasmiellus epochnous* (Fotos de Desjardin, D.E. *apud* Retnowati, 2018).

Alguns estudos referentes à produção de enzimas ligninolíticas estão disponíveis na literatura e dizem respeito ao gênero *Marasmius*, filogeneticamente muito próximo ao gênero *Marasmiellus*. Nos estudos, é relatada a capacidade de produção de diferentes lacases por *Marasmius quercophilus*, utilizadas em processos industriais como branqueamento da polpa de papel e degradação de resíduos aromáticos em efluentes (Tagger *et al.*, 1998; Klonowska *et al.*, 2001).

Dedeyan *et al.* (2000) realizaram um estudo de caracterização de uma lacase extracelular de *Marasmius quercophilus* com elevada atividade e verificaram que a mesma é capaz de reduzir o número kappa de polpa kraft em até 21% em cinco dias. Farnet *et al.* (2004) também

purificaram uma lacase de *M. quercophilus* induzido com ácido ferúlico e aplicaram na polimerização de compostos aromáticos xenobióticos. Verificou-se, na lacase purificada, termoestabilidade entre 30 e 40 °C, por até 24 horas, sendo que a enzima não é inibida por compostos como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cisteína e dodecil sulfato de sódio (SDS).

Os estudos publicados com a espécie *Marasmiuella palmivorus* ainda são escassos. Como exemplos, temos o uso de *M. palmivorus* PK-27 em pré-tratamento biológico de *Parthenium* sp. (Pandiyan *et al.*, 2014) para produção de etanol como biocombustível (Singh *et al.*, 2014), como também a produção de lacases e peroxidases por *M. palmivorus* VE111 e sua aplicação na descoloração de corantes em processos de biorremediação (Cantele *et al.*, 2017a, 2017b).

Outrossim, Chenthamaraskhan *et al.* (2017) otimizaram a produção de lacases de *M. palmivorus* LA1, isolado de restos de folhas de abacaxi. No estudo realizado, os autores verificaram que a temperatura de 28 °C, pH 5,0, galactose como fonte de carbono e sulfato de cobre como indutor, aumentaram em até 17 vezes a produção de lacases.

2.5 Enzimas lignocelulolíticas

O estudo das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal (Tabela 4) tem despertado o interesse desde os anos 1950 e o número de trabalhos publicados sobre esse assunto aumentou consideravelmente nas últimas décadas (Liu *et al.*, 2013).

Comparadas com a maioria das outras enzimas industriais, a maior importância das enzimas lignocelulolíticas é a complexidade de sua composição. Com relação à complexidade estrutural e composição química de materiais lignocelulósicos, as enzimas lignocelulolíticas produzidas por microrganismos são complexos enzimáticos contendo diversos tipos de proteínas com atividade catalítica sobre componentes da lignocelulose (Liu *et al.*, 2013).

As enzimas ativas sobre carboidratos (do inglês, CAZy, *Carbohydrate Active Enzymes*) são enzimas que degradam biomassa e podem ser organizadas em diferentes famílias baseadas na sua sequência de aminoácidos dos módulos catalíticos estruturalmente relacionados. Este banco de dados abrange as Glicosil Hidrolases (GHs), responsáveis pela hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas; Glicosil Transferases (GTs), responsáveis pela formação de ligações glicosídicas; Polissacarídeo Liases (PLs), as quais realizam clivagem não-hidrolítica de ligações glicosídicas; as Carboidratos Esterases (CEs): que hidrolisam ésteres de carboidratos; Atividades Auxiliares (AAs), enzimas redox que atuam em conjunto com outras enzimas CAZy

e Módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), proteínas que promovem a adesão da enzima ao carboidrato (CAZy, 2019).

Tabela 4. Algumas enzimas fúngicas envolvidas na degradação da lignocelulose (Liu *et al.*, 2013).

Enzima	Código da Enzima	Família CAZy ¹	Substrato	Produto
Celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	GH6,7	Celulose	Celobiose
Endo- β -1-4-glicanase	EC 3.2.1.4	GH5,7,12,45	Celulose	Celodextrina, glicose
β -glicosidase	EC 3.2.1.21	GH1,3	Celodextrinas	Glicose
Celulose monoxigenase	-	- ^c	Celulose	Celodextrina oxidada
Celobiose monoxigenase	EC 1.1.99.18	-	Celobiose	Celobiono-1,5-lactona
Expansina	-	-	Celulose	Celulose rompida
Endo- β -1,4-xilanase	EC 3.2.1.8	GH10,11,30	Xilana	Xilo-OS, xilose
β -xilosidase	EC 3.2.1.37	GH3,30,43	Xilo-OS	Xilose
Exo-1,5- α -L-arabinase	EC 3.2.1.	GH43,93	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
Endo-1,5- α -L-arabinase	EC 3.2.1.99	GH43	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
α -L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	GH3,43,51,54,62	Arabinana, arabino-OS, arabinoxilana	Arabinose
Endo-1,4-manase	EC 3.2.1.78	GH5,26	Manana	Mano-OS
β -manosidase	EC 3.2.1.25	GH2	Mano-OS	Manose
Endo- β -1,4-galactanase	EC 3.2.1.89	GH53	Galactana	Galacto-OS, galactose
β -galactosidase	EC 3.2.1.23	GH2,35	Galactana, xiloglicana	Galactose
α -galactosidase	EC 3.2.1.22	GH27,36	Galactomanana	Galactose
Xiloglicanase	EC 3.2.1.151	GH12,74	Xiloglicana	Xiloglicana-OS
Celobiohidrolase de extremidade redutora de oligoxiloglucano	EC 3.2.1.150	GH74	Xiloglicana OS	Celobiose (com ou sem substituição de xilosil)
Endo-1,3-1,4-glicanase	EC 3.2.1.6	GH12,16	β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-glicana	Glico-OS
α -L-fucosidase	EC 3.2.1.73	GH29,95	Xiloglicana	Fucose
α -glicoronidase	EC 3.2.1.63	GH29,95	Xiloglicana	Fucose
	EC 3.2.1.51	GH67	Glicuronoxilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
Acetilxilana esterase	EC 3.2.1.139	GH67	Glicuronoxilana	Ácido acético
	EC 3.2.1.131	GH67	Glicuronoxilana	Ácidos hidroxicinâmicos (ex: ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico)
Feruloil esterase	EC 3.1.1.72	CE1,2,3,5,12	Xilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
	EC 3.1.1.73	CE1	Xilana, arabinana, xiloglicana	Ácidos hidroxicinâmicos (ex: ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico)
Glicoronoil esterase	EC 3.1.1.	CE15	Xilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
Lacase	EC 3.1.10.3.2	A1	Lignina	Radicais aromáticos
Lignina peroxidase	EC 3.1.11.1.14	A2	Lignina	Radicais aromáticos
Manganês peroxidase	EC 3.1.11.1.13	A2	Lignina	Radicais aromáticos
Versátil peroxidase	EC 3.1.11.1.16	A2	Lignina	Radicais aromáticos

¹CAZy – *carbohydrate active enzyme(s)*

2.5.1 Celulases

O complexo enzimático de celulases constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas capazes de romper ligações do tipo β -1,4 de microfibrilas da celulose, liberando moléculas de celobiose e glicose (Kubicek *et al.*, 1993). O esquema clássico de degradação da celulose por fungos envolve endo-1,4- β -glicanases (GH5), que clivam ligações internas da cadeia de celulose; exo-1,4- β -glicanases ou celobiohidrolases (GH7 e GH6) que liberam moléculas de celobiose de extremidades redutoras e não redutoras da fibra de celulose; e β -glicosidasas (GH3) que hidrolisam celobiose em duas moléculas de glicose (Glass *et al.*, 2013).

Na Figura 21 pode-se visualizar o modo de ação do complexo enzimático na hidrólise da fibra de celulose.

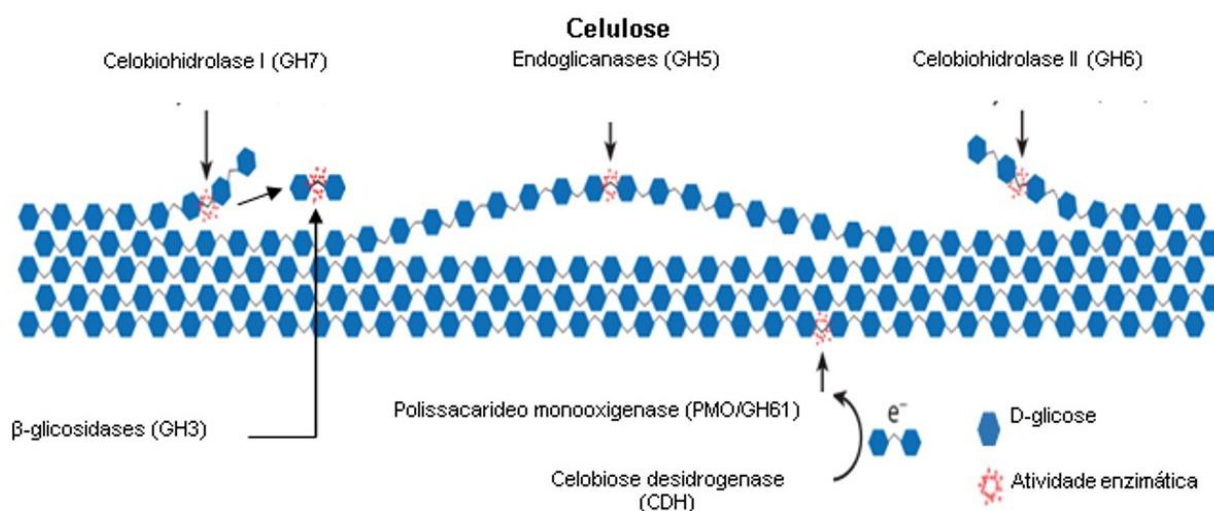


Figura 21. Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da celulose (Glass *et al.*, 2013).

2.5.2 Hemicelulases

A degradação completa da hemicelulose necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas específicas (Figura 22), como as xilanases, que são glicosidasas responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). A principal enzima na despolimerização da xilana é a endo- β -1,4-xilanases (GH10, GH11), que clivam aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana, produzindo principalmente oligossacarídeos de xilose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Para a completa degradação da hemicelulose, todas as suas ramificações necessitam ser degradadas. Isso requer pelo menos nove diferentes enzimas divididas ao longo de pelo menos doze famílias GHs, entre elas as α -L-arabinofuranosidasas (GH3, GH10, GH43, GH51, GH54 e GH62), e quatro famílias CE, como por exemplo, as acetilxilana esterases (CE1-CE7) e feruloil esterases (CE1). As

ramificações encontradas geralmente são compostas por L-arabinose, D-xilose, L-fucose, D-galactose, ácido D-glucurônico, resíduos acetil e os ácidos ρ -cumárico e ferúlico (Gouvêa, 2013).

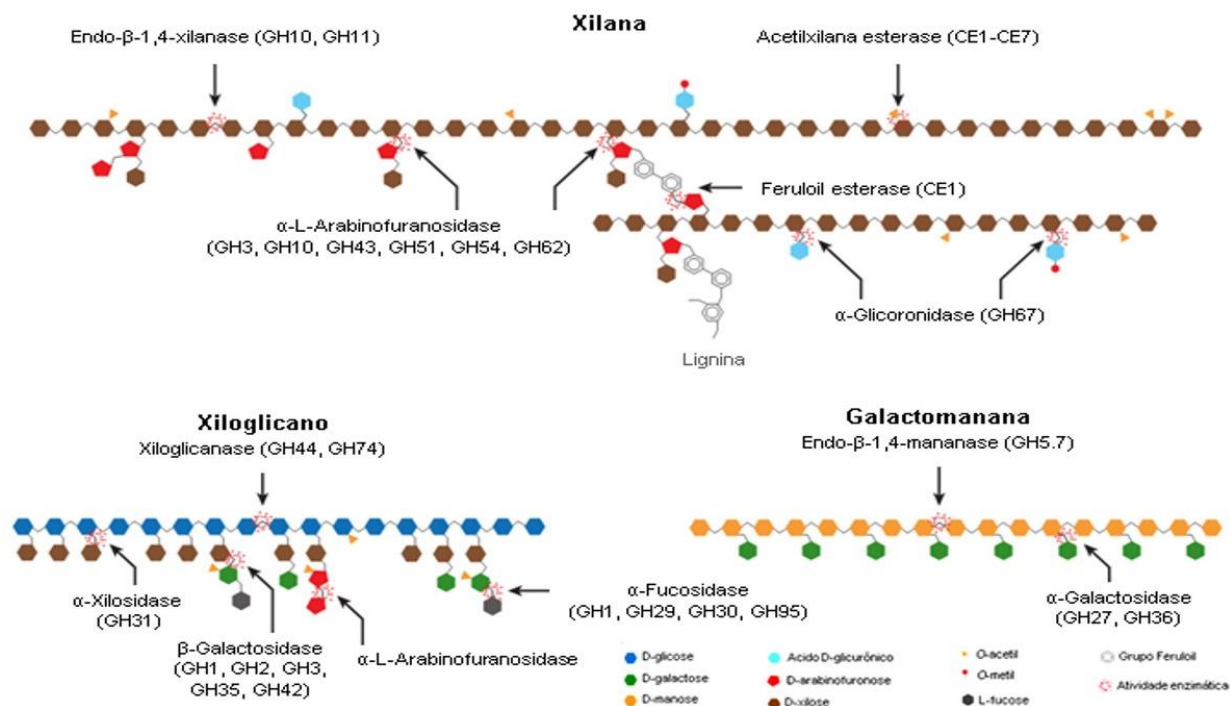


Figura 22. Ação de diferentes enzimas sobre estruturas que formam a hemicelulose (Glass *et al.*, 2013).

2.5.3 Pectinases

A degradação das ramificações da pectina requer glicosil hidrolases e polissacarídeos liases (Figura 23). As estruturas xilogacturona e ramnogalacturona também requerem enzimas acessórias para remover as cadeias laterais e promover o acesso para as enzimas pectinolíticas que hidrolisam a cadeia principal. Algumas delas como α -arabinofuranosidases (GH51 e GH54), β -galactosidase (GH2 e GH35) e β -xilosidases (GH3 e GH43) também são necessárias para degradação da hemicelulose, enquanto que endoarabinase (GH43), exoarabinases (GH93), β -endogalactanases (GH53) e esterases (CE8, CE12 e CE13) são específicas para degradação da pectina (Gouvêa 2013).

Na Figura 23 é apresentado um complexo de enzimas pectinolíticas envolvidas na degradação de estruturas pecticas.

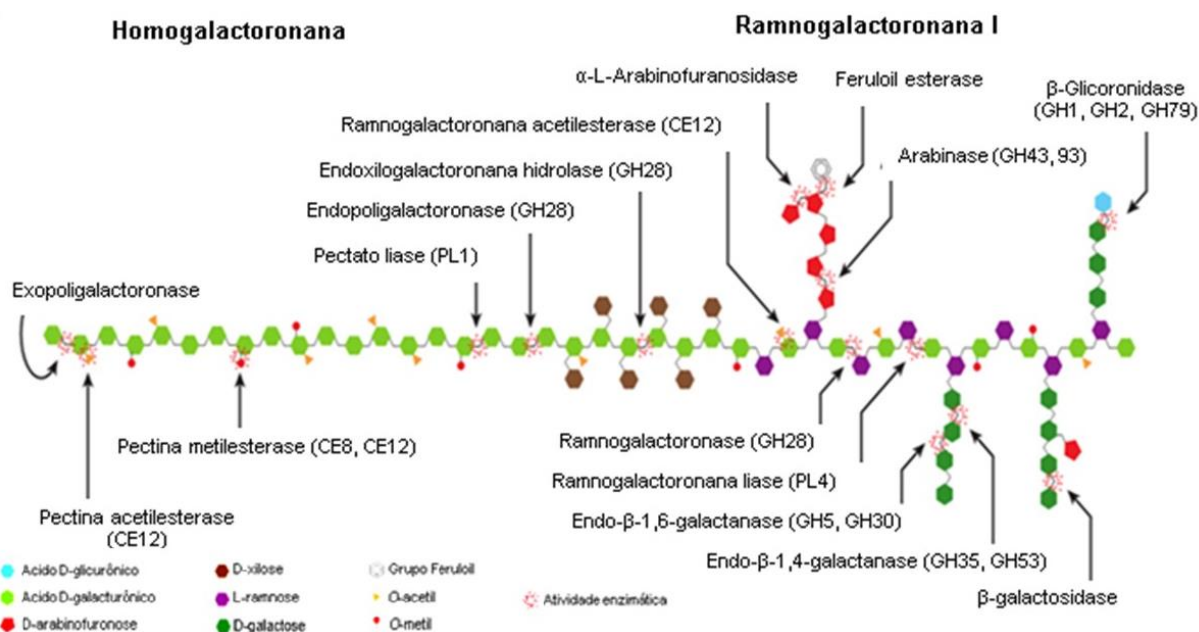


Figura 23. Ação de diferentes enzimas sobre estruturas que formam a pectina (Glass *et al.*, 2013).

2.5.4 Ligninases

As enzimas ligninolíticas, ou ligninases, são enzimas que atuam na degradação da lignina por meio de oxirreduções. Entre elas, estão as lacases (Lacs), as peroxidases (Per), com destaque para manganês peroxidases (MnPs), lignina peroxidases (LiPs) e peroxidases versáteis (PVs) (Figura 24). Há também outras enzimas acessórias às peroxidases, que produzem peróxido de hidrogênio *in situ*, como por exemplo, as enzimas intracelulares glicose oxidase e metanol oxidase, e as extracelulares glicoxal oxidase e aril-álcool oxidase. Uma enzima que até pouco tempo era associada somente ao complexo celulolítico, a celobiose desidrogenase, age como um intermediário entre os sistemas hidrolíticos e oxidativos. Ela pode oxidar oligossacarídeos e, em seguida, transferir os elétrons para aceptores como Fe^{+3} e O_2 (Carvalho *et al.*, 2009; Plácido & Capareda, 2015).

Com o grande número de sequências genômicas de basidiomicetos, novas classes de enzimas ligninolíticas foram identificadas, que é o caso das peroxidases descolorantes de corantes (DyPs), assim chamadas devido a sua capacidade de oxidar uma variedade de compostos corantes, em particular, corantes de antraquinona, que são pouco oxidados por outras peroxidases (Mäkelä *et al.*, 2015).

As enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas segundo seu potencial oxidativo: LiPs > MnPs > Lacs (Hammel & Cullen, 2008; Aguiar & Ferraz, 2011). Enquanto LiP atua diretamente oxidando tanto compostos fenólicos como não fenólicos, MnP e lacase podem atuar somente em compostos fenólicos. Contudo, essas enzimas podem oxidar

compostos não fenólicos indiretamente pela ação de um mediador. O mecanismo de PV é similar à LiP e MnP, uma vez que essa enzima não é específica para o substrato de MnP, podendo oxidar também compostos típicos de LiP, como álcool veratrílico, na ausência de manganês, além de fenóis simples, que são substratos de outras peroxidases. Uma explicação para isso é que na estrutura molecular das PVs há resíduos de aminoácidos típicos das MnPs no sítio de ligação de Mn (II), bem como resíduos típicos das LiPs que envolvem a interação com álcool veratrílico e compostos aromáticos, o que gera essa característica ambígua de MnPs e LiPs em PVs (Martínez *et al.*, 2002; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2015).

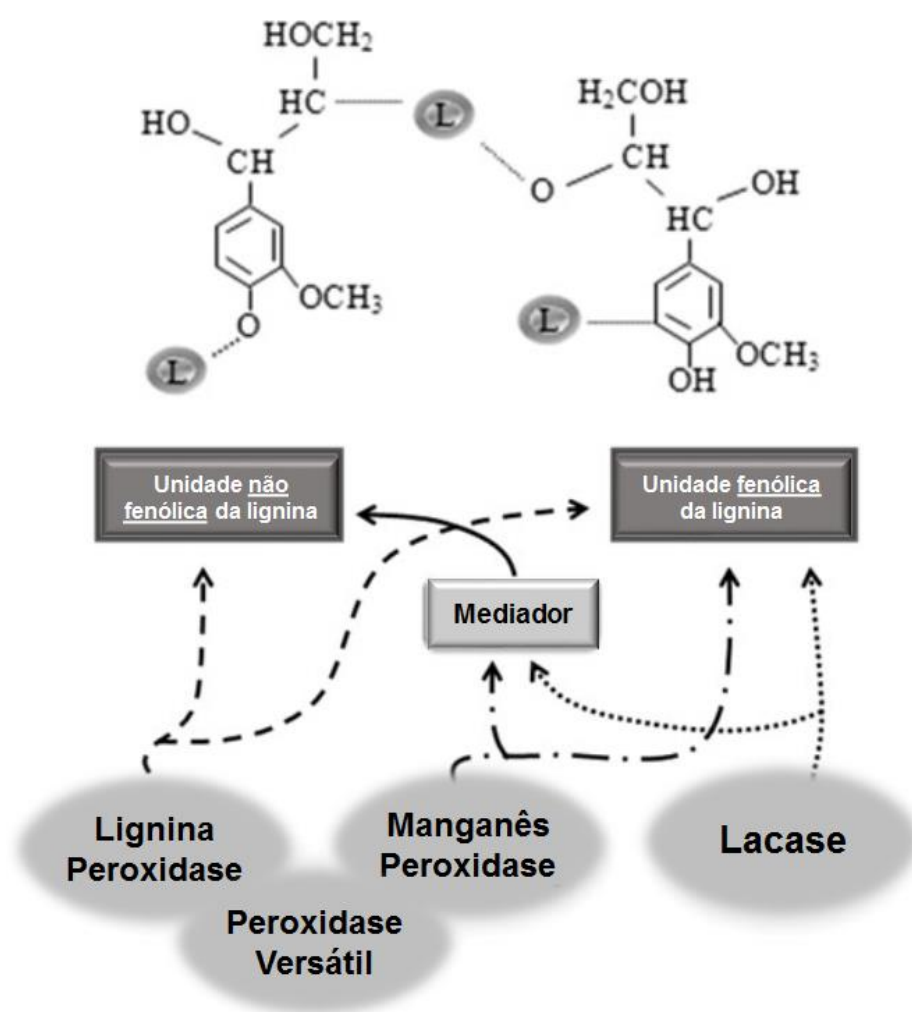


Figura 24. Enzimas ligninolíticas e suas atuações seletiva nos componentes da lignina (Moreno *et al.*, 2015).

As enzimas ligninolíticas fúngicas são as mais conhecidas e estão presentes em ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos. Dentre esses grupos, os mais estudados são *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Dicomitus squaleus*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus* e *Cerrena maxima* (Plácido & Capareda, 2015).

Essas enzimas são comumente produzidas pelos fungos de degradação branca. No entanto, nem sempre todas as enzimas ligninolíticas são produzidas por um fungo que degrada lignina. Diversas espécies produzem uma, duas ou talvez três enzimas simultaneamente (Goodell *et al.*, 1997). LiP e MnP foram descritas pela primeira vez em *Phanerochaete chrysosporium* (Martínez, 2002). PV foi descrita em *Pleurotus eryngii* como uma nova peroxidase que compartilha propriedades catalíticas com LiP e MnP (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999). Já as lacases foram descritas pela primeira vez por Yoshida, em 1883, identificada em exudatos de *Rhus vernicifera*, conhecida como árvore laca japonesa (Baldrian, 2006).

As enzimas ligninolíticas são na maioria extracelulares. No caso dos fungos de degradação branca, sem exceção, as LiP e MnP são extracelulares. Isto não se aplica às lacases. Embora a maior parte seja extracelular, muitas lacases de fungos de degradação branca são intracelulares (Baldrian, 2006).

Entre as enzimas ligninolíticas produzidas, a maioria dos fungos de degradação branca produzem lacases em diferentes quantidades. Em contraste, os fungos de degradação parda, conhecidos pela sua incapacidade de degradar lignina completamente, dificilmente produzem lacases (Baldrian, 2006). No entanto, produzem algumas peroxidases que, na presença do íon Fe^{3+} , numa reação denominada Reação de Fenton, provocam despolimerização de polissacarídeos e inserção de novas hidroxilas nos anéis aromáticos da lignina (Hammel *et al.*, 2002; Aguiar & Ferraz, 2011).

2.4.5.1 Lacases

Lacases são oxidoredutases que pertencem ao grupo das proteínas multicobre e vem sendo descritas há anos em plantas, fungos, insetos, bactérias e arqueas (Mayer & Staples, 2002; Hattori *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2015; Mäkelä *et al.*, 2015). Possuem quatro átomos de cobre em seu sítio ativo que participam na redução de oxigênio com produção de água. As lacases apresentam menor potencial redox quando comparado com as demais enzimas ligninolíticas, contudo as lacases fúngicas continuam apresentando maior potencial redox do que as lacases de bactérias (Songulashvili *et al.*, 2016; Agrawal *et al.*, 2018).

Lacases são enzimas majoritariamente extracelulares que oxidam vários compostos aromáticos e não aromáticos, o que incluem fenóis, anilinas, alguns íons inorgânicos e uma variedade de compostos não fenólicos. Atuam pela abstração de um elétron de fenóis, em função da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} que, por sua vez, reduz oxigênio a água, permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 25). Devido a essa característica de requerer somente

oxigênio molecular para oxidar uma ampla variedade de substratos, são consideradas como “ferramenta verde/catalisador verde” na biotecnologia. A oxidação de estruturas aromáticas não fenólicas por lacases ocorre por meio da oxidação de alguns mediadores (Figura 25), que podem ser sintéticos como 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), 2,6-dimetoxifenol (DMP) ou até mesmo mediadores naturais como o metil-seringato (MeS), siringaldeído, ácido *p*-cumárico e vanilina (Thurston, 1994; Baldrian, 2006; Camarero *et al.*, 2007; Aguiar & Ferraz, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2012; Agrawal *et al.*, 2018), sendo estes novamente reduzidos pelo substrato alvo.

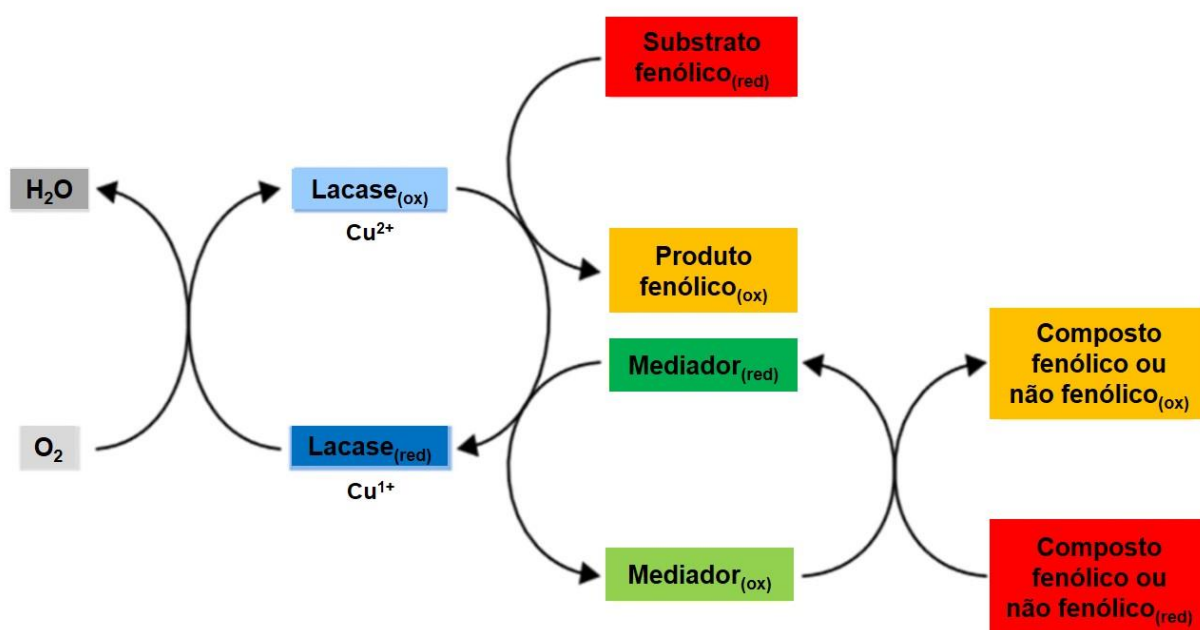


Figura 25. Ciclo catalítico das lacases (adaptado de Kirsch *et al.*, 2015).

O baixo potencial redox das lacases somente permite a oxidação direta de unidades fenólicas da lignina, o que representa uma pequena porcentagem do polímero (Mayer & Staples, 2002). Estudos de um sistema lacase-mediador (SLM) têm aumentado gradativamente nos últimos anos, principalmente devido a sua ampla aplicabilidade industrial, em processos de branqueamento de papel, modificação de polímeros, degradação e detoxificação de efluentes ambientais e deslignificação de madeira (Jurado *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2012). No caso do SLM aplicado à degradação de lignina, o substrato inicial da enzima é um composto de baixa massa molar (mediador) que, por sua vez, é oxidado, formando radicais que atuam como agente difusor, oxidando a lignina. Esse sistema é de grande valia, visto que a lacase é uma enzima grande que não é capaz de passar pela fibra da parede secundária para entrar em contato direto

com a lignina (Bourbonnais & Paice, 1990, Bettin, 2010). Apesar maioria dos mediadores estudados serem moléculas sintéticas, há um esforço na busca de mediadores naturais, como o ácido 3-hidroxi-antranílico, produzido pelo fungo *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996; Aguiar & Ferraz, 2011). A busca por esses mediadores naturais é interessante, uma vez que são mais seguros, menos poluentes e possivelmente mais econômicos que os mediadores sintéticos (Rico *et al.*, 2014).

Com relação à capacidade das lacases em degradar a lignina presente na biomassa lignocelulósica, a mudança na estrutura da lignina é iniciada quando essa estrutura recalcitrante é oxidada pela abstração de um único elétron de uma subunidade fenilpropano. Essa abstração de um elétron ativa a lignina, criando um radical ativo, tornado a lignina, em determinado local, mais reativa. Consequentemente, essa ativação da lignina pode induzir diferentes eventos reativos, tais como clivagens, modificações e/ou acoplamentos (Figura 26) (Munk *et al.*, 2015).

Sabe-se que a ação da lacase está em catalisar polimerizações enquanto o SLM catalisa despolimerizações (Bourbonnais *et al.*, 1995). Contudo, recentes estudos demonstraram seu potencial tanto em polimerizar como despolimerizar a lignina, inclusive na ausência de mediadores (Rico *et al.*, 2014). Li *et al.* (2007) sugeriram que uma competição entre polimerização e despolimerização ocorre quando a ligação β -O-4' de madeira de álamo é quebrada durante um pré-tratamento por explosão a vapor. A possibilidade da enzima em realizar uma dessas ações é influenciada pelas condições do entorno e pela presença de mediadores. É provável que ocorra uma concorrência semelhante entre as rotas de reações, como demonstrado na Figura 26, após a ativação de subunidades da lignina. Parece também que o tipo de radical criado pelo SLM pode influenciar o curso de ação para a despolimerização ou polimerização (Crestini *et al.*, 2003). A existência de competição entre as reações já foi reportado por Moldes *et al.* (2008) e Barneto *et al.* (2012) que investigaram o efeito de vários SLM na remoção de resíduos de lignina em polpa de celulose. Além disso, os resultados demonstraram que a escolha do mediador é um fator importante, mas como as condições de reações favorecem uma das duas ações específicas, ainda não foi esclarecido (Munk *et al.*, 2015).

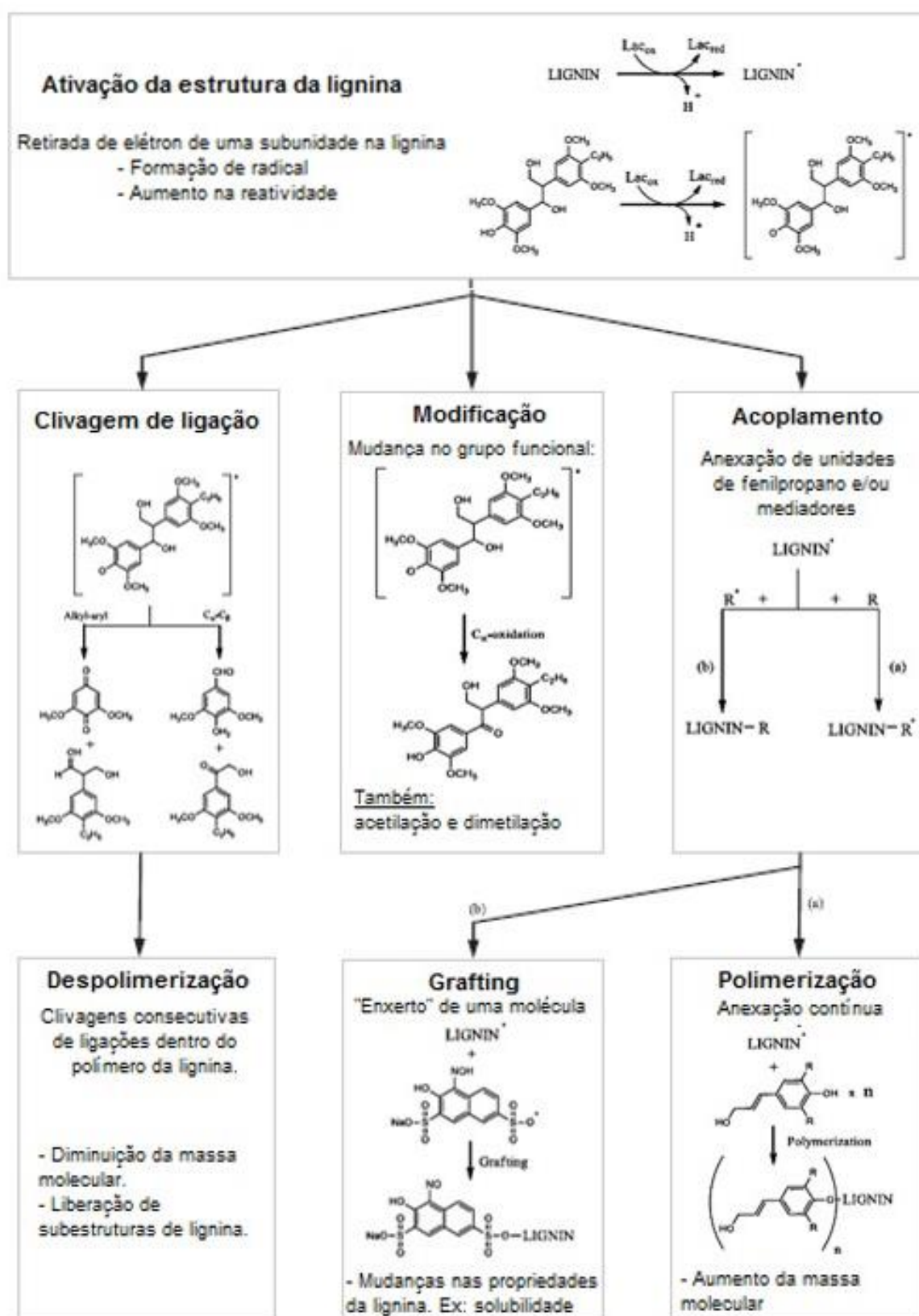


Figura 26. Esquema de alterações que podem ocorrer durante a ação da lacase na lignina. Cada quadro significa eventos que devem ser atribuídos a uma reação específica que ocorre na lignina. As setas indicam como um evento pode induzir o próximo (adaptado de Munk *et al.*, 2015).

2.5.4.2 Lignina Peroxidases

As LiPs apresentam elevado potencial redox e podem abstrair elétrons de estruturas aromáticas fenólicas e não fenólicas; no caso das ligninas, dando origem a radicais cátions. A enzima é ativada por oxidação com H_2O_2 , levando a formação de composto I (C_I) que é um complexo deficiente de dois elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de um elétron de cada vez. A redução de C_I a C_II e também de C_II a C_0 pode ocorrer por meio da oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos levando a formação de radicais cátion (Figura 27A). O álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxi-benzílico) foi um dos primeiros mediadores enzimáticos descritos, produzido por *P. chrysosporium* que, ao ser oxidado por LiP, gera um radical cátion extremamente instável que pode oxidar a lignina (Figura 27B). Em todas as LiPs, invariavelmente, há um resíduo de triptofano na cadeia proteica. Supõe-se que esse triptofano atue como elo de transferência de elétrons com substratos aromáticos que não podem ter um contato direto com o grupo heme da enzima (Goodell *et al.*, 2008; Aguiar & Ferraz, 2011).

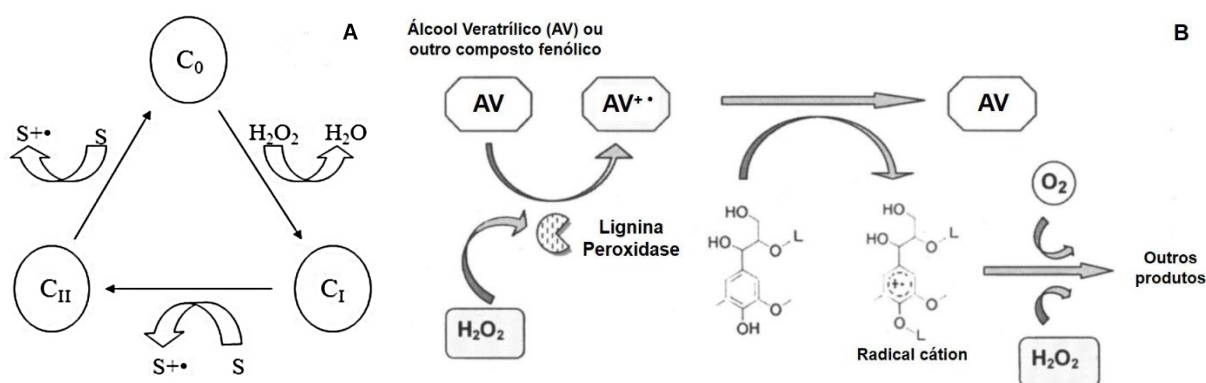


Figura 27. (A) Ciclo catalítico das lignina peroxidases. S = substrato aromático fenólico ou não fenólico. (B) Oxidação do álcool veratrílico por lignina peroxidase. AV = álcool veratrílico (Goodell *et al.*, 2008; Aguiar & Ferraz, 2011).

2.5.4.3 Manganês Peroxidases

As MnPs são enzimas dependentes de Mn^{2+} para a redução de um composto, sendo capazes de abstrair elétrons apenas de estruturas fenólicas. Nas MnPs há um sítio de ligação de manganês, o que a difere das lignina peroxidases, que apresentam um resíduo de triptofano. A enzima também é ativada pela sua oxidação por H_2O_2 , levando a formação de composto I (C_I) que é um complexo deficiente de dois elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa também

2.6.1 Biocombustíveis

Lacases são estudadas em pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol 2G ou biogás, ao passo que aumentam a fermentabilidade dos materiais lignocelulósicos através da degradação de lignina. Esse processo de oxidação ou deslignificação da lignina apresentam um valor ambiental quando comparado com outros métodos químicos e/ou físicos. A deslignificação por lacases é realizada na presença ou na ausência de mediadores enzimáticos devido seu baixo potencial redox, complexidade e tamanho da estrutura lignocelulósica. SLM gera radicais que podem clivar ligações covalentes na lignina, podendo oxidar tanto compostos fenólicos e não fenólicos. Recentemente, lacases imobilizadas foram utilizadas na detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos (Plácido & Capareda, 2015; Agrawal *et al.*, 2018).

2.6.2 Biorremediação

Lacases fúngicas são usadas na descoloração e detoxificação de efluentes eliminados pelas indústrias de alimentos, têxtil, polpa/papel e plásticos. Lacases oxidam, polimerizam ou transformam compostos fenólicos ou antropogênicos em derivados menos tóxicos. Os substratos oxidados pelas lacases são diversos e incluem fenóis, corantes, pesticidas, disruptores endócrinos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Muitos desses compostos químicos podem ser potencialmente cancerígenos e mutagênicos (Alcalde, 2007; Majeau *et al.*, 2010).

2.6.3 Biossensores

Biossensores podem ser desenvolvidos com o auxílio de sistema multienzimático. Podem ser definidos como um “dispositivo analítico que combina material biológico (por exemplo, enzimas, células, microrganismos, tecidos, etc.) com um transdutor apropriado (por exemplo, eletroquímico, calorimétrico, etc.) para fornecer informações analíticas quantitativas. Mousty *et al.* (2007) desenvolveu o conceito de biossensor para a detecção de inibidores e moduladores de lacase sem uso de reagentes. Vários biossensores de fenóis baseados em lacase foram fabricados e pesquisas recentes buscam criar biossensores para detecção de pesticidas, inibidores de lacases e poluentes (Cabaj *et al.*, 2011; Nazari *et al.*, 2015; Agrawal *et al.*, 2018).

2.6.4 Síntese de painéis de fibras

Os painéis de fibras consistem em materiais à base de madeira comum unidos por adesivo sintético que na maioria dos casos é formaldeído. A principal desvantagem do uso do formaldeído é a liberação desse mesmo composto da placa de fibra e sua exposição aos seres humanos, tornando-se um potente carcinogênico. Assim, para substituir o formaldeído, lacases têm sido usadas no tratamento de fibras para a produção dos painéis, que acabam sendo muito melhores em contraste com as placas feitas de fibras não tratadas, além de proporcionar melhor interação fibra-fibra e melhor transferência de estresse fibra-a-fibra (Felby *et al.*, 2004; Alcalde, 2007).

2.6.5 Indústria alimentícia

As lacases também são utilizada na indústria alimentícia para a produção de alimentos economicamente viáveis e saudáveis (Alcalde, 2007; Brijwani *et al.*, 2010). Por exemplo, o escurecimento dos sucos de frutas é uma desvantagem na indústria de bebidas e pode ser superado pelo uso de lacase. Sucos de frutas contêm vários compostos fenólicos que transmitem cor e gosto ao suco. Oxidação destes compostos é empregado para aumentar a estabilidade dos sucos de frutas (Ribeiro *et al.*, 2010). Na fabricação de pão, a lacase é adicionada como um aditivo à massa, que melhora o sabor, a textura (maciez), o volume e a frescura do pão (Selinheimo *et al.*, 2006). Lacases também são utilizadas para atuar nos polifenóis presentes nos vinhos em seu processo de amadeiramento e podem ser adicionadas ao mosto ou ao final da produção de cervejas, removendo qualquer excesso de oxigênio que prejudica a qualidade da cerveja (Servili *et al.*, 2000; Mathiasen, 1995).

2.6.6 Cosméticos

Branqueamento e/ou tingimento de cabelo geralmente envolve o uso de produtos químicos que podem danificar o cabelo. Os precursores de corantes podem ser oxidados no agente de coloração utilizando lacase em vez do agente químico. Pigmentos usados em aplicações cosméticas, assim como melaninas, podem ser produzidos usando reações oxidativas catalisadas por lacase (Tetsch *et al.*, 2005; Alcalde, 2007).

2.6.7 Grafting enzimático

Grafting ou “enxerto” de (bio)moléculas em polímeros e superfícies ganhou um significativo interesse nos últimos anos. O *grafting* consiste na formação de ligações covalentes

entre uma macromolécula e uma molécula pequena. Quando essa formação de ligações covalentes é realizada por meio de uma reação enzimática, o processo é denominado *grafting* enzimático. Esse conceito vem se expandindo, podendo ser definido como “compósitos ligantes que apresentam uma constituição diferente da cadeia principal a qual é ligado, sendo a cadeia principal constituída por uma matriz diversificada de materiais, desde tijolos, vidro, papel, tecidos e madeira” (Slagman *et al.*, 2018). O *grafting* pode ser alcançado através de três vias diferentes (Figura 29) (Zhao & Brittain, 2000):

- *Grafting-to*: é caracterizado pela fixação das cadeias do polímero com uma porção reativa que se liga covalentemente a um grupo reativo compatível presente na macromolécula.
- *Grafting-from*: consiste na polimerização de monômeros solúveis na macromolécula.
- *Grafting-through*: envolve a copolimerização de monômeros livres com monômeros contendo a porção enxertável, formando simultaneamente o enxerto e a macromolécula.

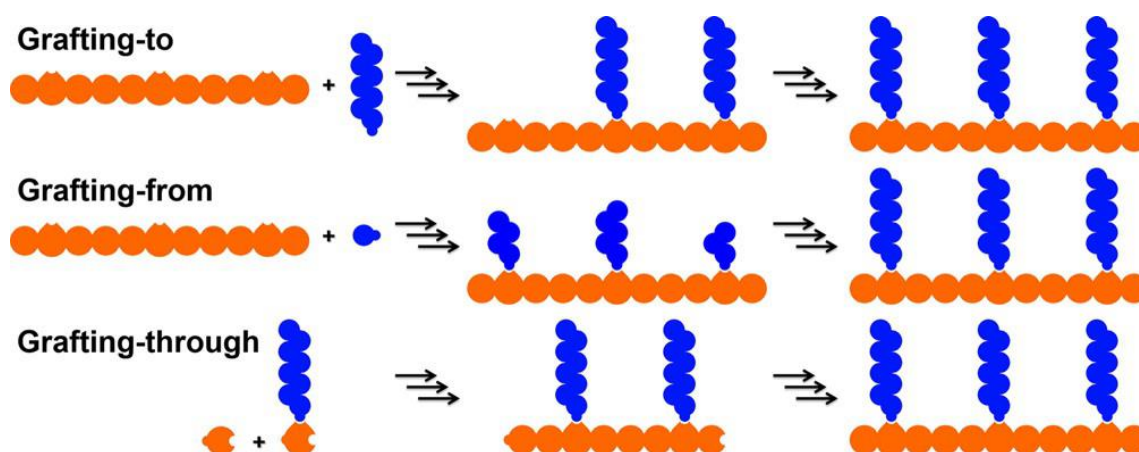


Figura 29. Esquema envolvendo os três tipos de *grafting* (enxertos): *grafting-to*, *grafting-from* e *grafting-through* (Zhao & Brittain, 2000; Slagman *et al.*, 2018).

Diante do crescimento da população mundial e da concomitante escassez de recursos, mais esforços estão sendo realizados para contornar o uso de catalisadores metálicos e processos que envolvem muita energia. Uma maneira de contornar essas desvantagens é o uso de enzimas para iniciar o *grafting*. As enzimas operam sob condições suaves e, na maioria das vezes, seletivas. Nesse contexto, o uso catalítico de oxidases, em particular, tem ganhado considerável atenção nos últimos dez anos. Dentre essa classe, lacases são de particular interesse, novamente pelo fato de poderem oxidar um substrato usando apenas oxigênio molecular como oxidante para iniciar o enxerto radical, gerando água como único subproduto;

enquanto outras oxidases, como as peroxidases requerem peróxido de hidrogênio como um oxidante, que é perigoso em concentrações elevadas (Slagman *et al.*, 2018).

A técnica de *grafting* enzimático apresenta potencial para ser aplicada e contribuir com a indústria da madeira. Nos últimos anos vem crescendo o uso de madeira, tanto na construção civil como no setor moveleiro. Isto se deve ao fato de seu melhor desempenho térmico, maior eficiência de métodos de produção e construção e o ganho ambiental na substituição de materiais convencionais pela construção em madeira. Na Europa, esse crescimento é ainda mais pronunciado, onde a madeira industrializada e a madeira cruzada (CLT ou X-Lam) tem crescido fortemente. Países como a Itália e a Inglaterra, nas duas décadas, aumentaram em mais de 15 e 25%, respectivamente, as construções com madeira. O aumento foi ainda maior em países como Alemanha, Áustria e Suíça, onde os prédios de madeira atingem níveis próximos a 35%. Mesmo países como Portugal e Espanha, com pouca tradição em construções com madeira, estão avançando em técnicas de fabricação e montagem de edificações em madeira (Remade, 2017).

Na América do Sul também tem sido investido e incentivado o uso de madeira para desenvolver as chamadas cidades de madeira, seguindo o exemplo de países da América do Norte e Escandinávia. No Brasil, por exemplo, o uso de madeiras de reflorestamento, como o *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., na construção civil tem sido fortemente encorajada. Atualmente, no Brasil, a madeira de eucalipto é a mais utilizada na construção civil e no setor moveleiro. Recentes investimentos na clonagem de eucalipto resultaram em plantações com maior produtividade e qualidade da madeira para atender a evolução do mercado de painéis de madeira reconstituída, com média densidade (MDF) destinados à produção de móveis de madeira de eucalipto, em design ecologicamente correto (Lahr *et al.*, 2018; Remade, 2019a).

Contudo, umidade e biodeterioração estão entre os fatores mais importantes que afetam a longevidade da madeira. Elas também são a razão para a maioria das pesquisas em tratamentos de madeira. Os tratamentos para evitar a absorção de água pela madeira envolvem processos químicos e térmicos. Apesar desses tratamentos melhorarem o comportamento de madeira contra microrganismos biodegradantes e fornecer hidrofobicidade à madeira, eles também podem modificar algumas de suas propriedades. Alguns tratamentos químicos envolvem o uso de compostos de silicone, ceras, óleos e resinas. Estas substâncias não são estáveis, são suscetíveis a serem lixiviados por exposição a condições climáticas, levando a contaminação ambiental. Alguns tratamentos químicos estáveis foram testados para modificação de madeira a fim de melhorar as propriedades hidrofóbicas, no entanto, acabam afetando outras propriedades da madeira, como a resistência à tração (Mai *et al.*, 2004; Kudanga *et al.*, 2010).

Portanto, pesquisas vêm sendo realizadas em tratamentos ecológicos que podem minimizar o impacto ambiental e, ao mesmo tempo, melhorar a hidrofobicidade da madeira com efeito mínimo em suas propriedades. Com base na capacidade de lacases para atuar em materiais lignocelulósicos, novos métodos biológicos e ambientalmente corretos poderiam ser desenvolvidos como uma alternativa (Fernández-Fernández *et al.*, 2015).

Embora as lacases estejam envolvidas em várias reações que ocorrem durante a ligninólise, elas também são capazes de polimerizar a lignina. A oxidação da fração fenólica da lignina por lacases pode gerar radicais reativos que podem carregar reações não enzimáticas, formando dímeros ou polímeros por ligações C-C, C-O e C-N. Essa capacidade vem sendo explorada pela indústria para enxertar compostos fenólicos na madeira, a fim de fornecer à madeira ou seus derivados novas propriedades. Essa tecnologia de funcionalização é promissora e pode ser empregada para o desenvolvimento de novas técnicas de hidrofobização de madeira. O *grafting* enzimático assistido por lacases (Figura 30), como é chamada essa tecnologia, foi realizado com sucesso usando diferentes compostos fenólicos e aminas (Fernández-Fernández *et al.*, 2015; Fernández-Costas *et al.*, 2017; Filgueira *et al.*, 2017; Galletti *et al.*, 2018). Esta união estável de compostos hidrofóbicos na superfície da madeira pode significar uma importante contribuição para o desenvolvimento de processos ambientalmente corretos, evitando o uso de compostos que podem ser lavados da madeira e gerar efluentes contaminados (Thurston, 1994; Chandra *et al.*, 2002; Kudanga *et al.*, 2010; Kudanga *et al.*, 2011).

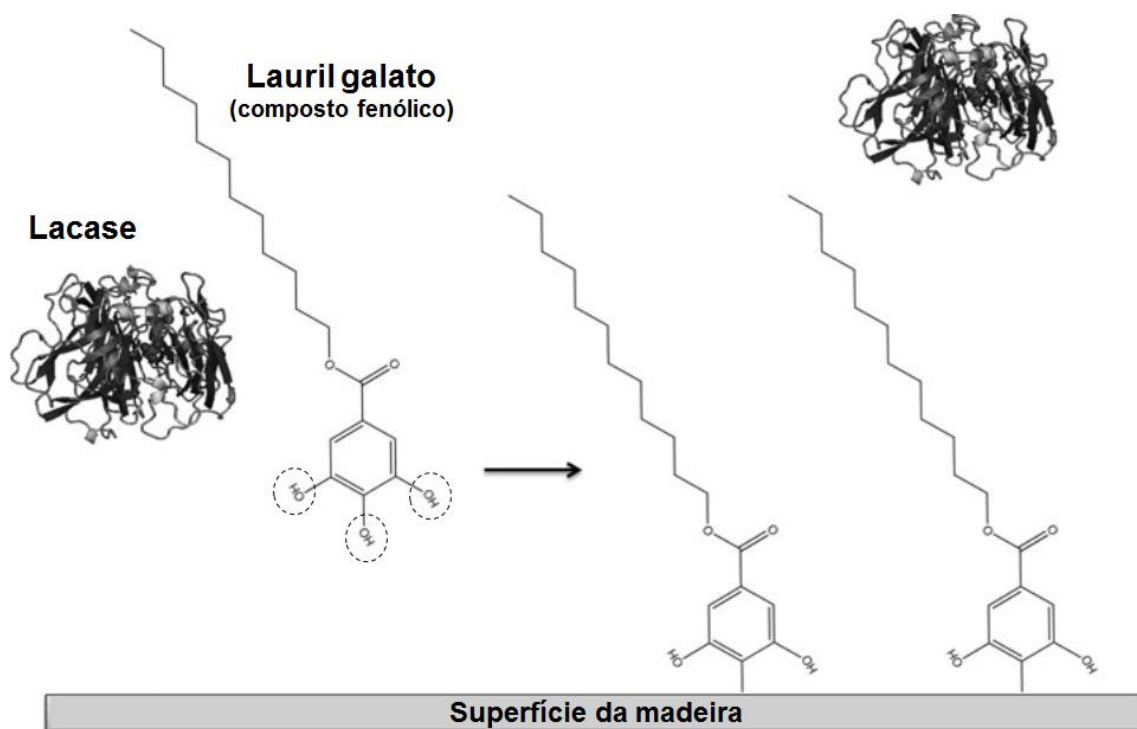


Figura 30. Esquema de *grafting* enzimático usando lauril galato e lacase para modificação de madeira: a lacase reage com o substrato lauril galato, promovendo o *grafting* dos radicais fenóxi correspondentes e fica livre para continuar a reação (Fernández-Fernández *et al.*, 2015).

2.6.8 Deslignificação enzimática

No processo de deslignificação, as enzimas ligninolíticas podem ser aplicadas em quatro métodos diferentes: 1) deslignificação fúngica, 2) deslignificação enzimática, 3) sistema lacase-mediador (SLM), e 4) fermentação fúngica integrada. O grande objetivo da deslignificação é a remoção/degradação da lignina para aumentar os rendimentos de sacarificação. Inclusive, deslignificações ligninolíticas combinadas como outros pré-tratamentos são interessantes de serem realizados (Plácido & Capareda, 2015; Moreno *et al.*, 2015).

A deslignificação enzimática (Tabela 5), emprega tanto enzimas comerciais como nativas. Neste processo, a lacase é a enzima mais utilizada seguida por manganês peroxidase e lignina peroxidase; no entanto, misturas de duas ou três enzimas ligninolíticas foram utilizadas para alguns pré-tratamentos de deslignificação. Ainda, a deslignificação enzimática pode ser realizada usando um sobrenadante de um cultivo com diferentes atividades ligninolíticas ou com uma solução preparada que contenha a enzima purificada e concentrada (Moilanen *et al.*, 2011). No processo de deslignificação enzimática, não há necessidade de suplementação de nutrientes e o pH e a temperatura ideais podem ter faixas mais amplas (3 - 8 e 25 - 80 °C,

respectivamente). Geralmente, uma menor carga de sólidos é empregada numa deslignificação enzimática (Plácido & Capareda, 2015; Moreno *et al.*, 2015).

O SLM também é muito empregado nos processos de deslignificação enzimática (Tabela 5). O potencial redox dos mediadores aumenta quando a enzima os oxida; como consequência, mediadores oxidados reagem com o substrato final para recuperar os elétrons perdidos. Esse incremento no potencial redox permite a degradação de compostos recalcitrantes, como a lignina e diferentes tipos de compostos aromáticos que a enzima por si só não é capaz de degradar. Os compostos mediadores mais utilizados em processos de deslignificação enzimática são o HBT e o ABTS e alguns mediadores naturais, como siringaldeído ou vanilina (Camarero *et al.*, 2004).

Tabela 5. Uso de enzimas ligninolíticas e SLM para deslignificação enzimática (Plácido & Capareda, 2015; Moreno *et al.*, 2015).

Tratamento	Matéria-prima	Perda de lignina	Referência
Lacase (<i>Pleurotus</i> sp.)	Bambu	84% (8 h)	Kuila <i>et al.</i> (2011)
Lacase (<i>Cerrena unicolor</i>)	Madeira de abeto explodido a vapor	Modificação da lignina	Moilanen <i>et al.</i> (2011)
Lacase (<i>Pleurotus</i> sp.)	Mamona	86% (4 h)	Mukhopadhyay <i>et al.</i> (2011)
Lacase (<i>Trametes hirsuta</i>)	Palha de milho	Modificação da lignina	Li <i>et al.</i> (2012)
Lacase, MnP, LiP (<i>P. ostreatus</i>)	Bagaço de cana- de-açúcar	33,6% (48 h)	Asgher <i>et al.</i> (2013)
SLM (<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>)	Polpa de papel	21% - AC ¹ (4 – 24 h) 25% - SA ² (4 – 24 h) 9% - CA ³ (4 – 24 h) 40% - HBT ⁴ (4 – 24 h)	Camarero <i>et al.</i> (2004)
SLM (<i>Pycnoporus sanguineus</i> – VIO ⁵)	Palha de trigo e Palha de milho	97% (24 h)	Lu <i>et al.</i> (2010)
SLM (<i>Myceliophthora thermophila</i> – MeS ⁶)	<i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i>	> 25% (12 h)	Babot <i>et al.</i> (2011)
SLM (<i>T. villosa</i> – HBT)	Eucalipto Capim-elefante	48% (eucalipto) 32% (capim-elefante)	Gutiérrez <i>et al.</i> (2012)
SLM (<i>M. thermophila</i> – HBT)	Cavacos de eucalipto	Modificação da Lignina	Martín-Sampedro <i>et al.</i> (2012)

¹AC (acetosiringona); ²SA (siringaldeído); ³CA (ácido *p*-cumárico); ⁴HBT (1-hidróxibenzotriazol); ⁵VIO (ácido violúrico); ⁶MeS (metilsiringato).

2.6.9 Detoxificação enzimática

A bioconversão da lignocelulose geralmente é precedida por um pré-tratamento termoquímico para facilitar a hidrólise enzimática da celulose. Durante esse pré-tratamento, calisadores ácidos ou alcalinos podem ser adicionados, para aumentar sua eficiência. No entanto, substâncias formadas durante esse pré-tratamento da matéria-prima lignocelulósica inibem a hidrólise enzimática, bem como os passos subsequentes de fermentação microbiana (Jönsson *et al.*, 2013) (Figura 31).

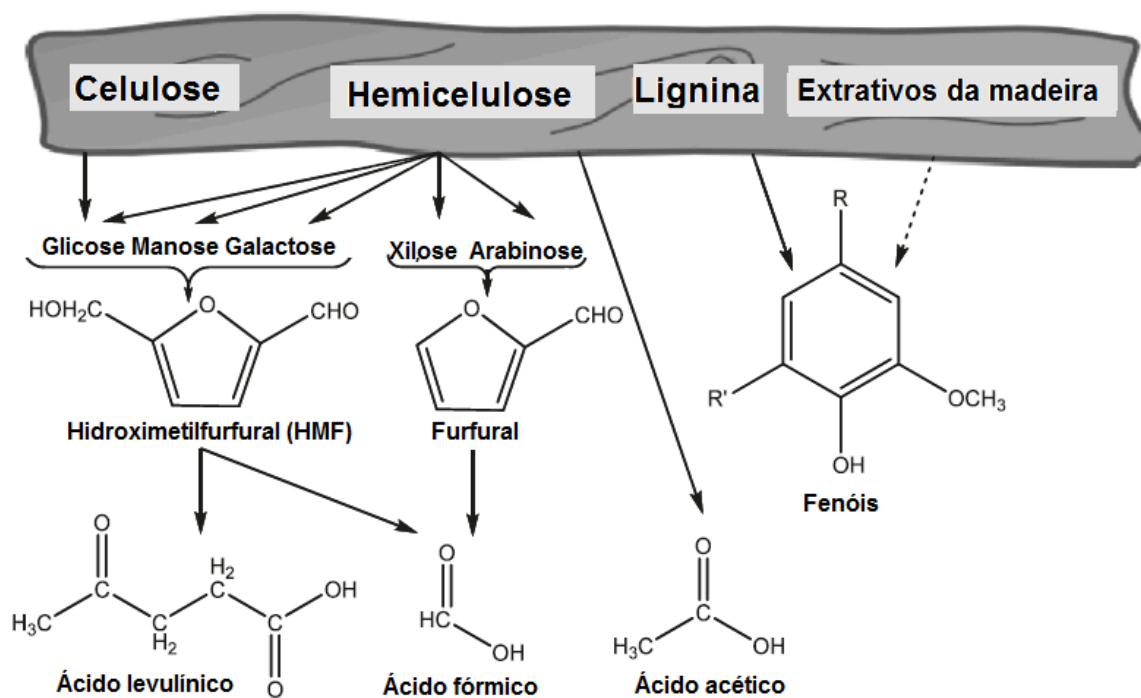


Figura 31. Formação de inibidores oriundos do pré-tratamento da lignocelulose (Jönsson *et al.*, 2013).

A geração de subprodutos do pré-tratamento é fortemente dependente da matéria-prima e do método de pré-tratamento empregado. Substâncias que podem atuar como inibidores de microrganismos incluem compostos fenólicos e outros aromáticos, ácidos alifáticos, furanoaldeídos, íons inorgânicos, bioálcoois, entre outros (Jönsson *et al.*, 2013). Exemplos de produtos inibidores da fermentação são etanol e butanol. Como a maioria dos microrganismos, *Saccharomyces cerevisiae* é inibida por concentrações de butanol na faixa de 1-2% (v/v), mas é capaz de tolerar concentrações mais altas de etanol, em torno de 17% (v/v) (Dunlop, 2011; Teixeira *et al.*, 2012). As enzimas hidrolíticas também podem ser inibidas pelos seus produtos, isto é, açúcares tais como celobiose e glicose, bem como por produtos de fermentação como o etanol e por compostos fenólicos (Ximenes *et al.*, 2010).

Entre os compostos inibidores, destacam os aromáticos. Um grande número de diferentes compostos fenólicos provenientes da degradação das unidades p-hidróxifenil, guaiacil e siringil da lignina são formados durante a hidrólise catalisada por ácido ou pré-tratamento de lignocelulose. Compostos fenólicos e outros compostos aromáticos são formados durante o pré-tratamento independentemente de um catalisador ácido ser adicionado à reação (Martín *et al.*, 2002). Além disso, alguns extrativos são compostos fenólicos, não podendo-se descartar a possibilidade de formação de compostos fenólicos de açúcares. Entre os compostos aromáticos provenientes da lignina, destacam-se os fenólicos como aldeído coniferílico, ácido ferúlico, ácido 4-hidróxibenzoico; e os compostos não fenólicos, como ácido benzoico e ácido cinâmico (Jönsson & Martín, 2016).

O efeito de compostos fenólicos e outros compostos aromáticos, que podem inibir o crescimento microbiano e o rendimento do produto, são muito variáveis e podem ser relacionados a grupos funcionais específicos. Uma explicação para esse efeito é que os compostos fenólicos interfiram na membrana celular, influenciando sua função e mudando sua relação proteína-lipídio (Larsson *et al.*, 2000). Usando enzimas para detoxificação, o consumo de açúcar por microrganismos poder ser evitado e o processo pode ser realizado em condições ideais de pH (3 - 8) e temperatura (25 - 80 °C) para enzimas (Moreno *et al.*, 2015).

O papel dos inibidores fenólicos tem sido investigado utilizando catalisadores enzimáticos que afetam especificamente compostos sem alterar as concentrações de outros inibidores. Diferentes estratégias são usadas para a remoção de compostos inibitórios de hidrolisados lignocelulósicos (Tabela 6).

Entre as estratégias utilizadas, está a detoxificação enzimática (Tabela 7). As enzimas mais comumente utilizadas para detoxificação enzimática são lacases e peroxidases produzidas por fungos de degradação branca (*T. versicolor*, *T. villosa*, *Coriolopsis rigida*, *P. cinnabarinus*, *Coltricia perennis*, *Cyathus stercoreus*) (Moreno *et al.*, 2015). Lacases e peroxidases oxidam fenóis a radicais que sofrem acoplamento a moléculas que são menos tóxicas para microrganismos fermentativos, como leveduras (Jönsson *et al.*, 1998). Contudo, a detoxificação antes ou após a sacarificação ainda é controversia (Jurado *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2012). Estudos envolvendo detoxificação enzimática reportaram índices de detoxificação entre 20% e 90%, geralmente associados a um maior rendimento em etanol (Plácido & Capareda, 2015).

Compostos fenólicos também são investigados por inibir a hidrólise enzimática da celulose. Experimentos realizados para compreender esse mecanismo, sugerem que os

compostos fenólicos atuam na precipitação de proteínas envolvidas da degradação da estrutura da celulose (Kim *et al.*, 2011; Jönsson *et al.*, 2013).

Tabela 6. Técnicas para detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos (adaptado de Jönsson *et al.*, 2013).

Técnica	Procedimento	Exemplo
Aditivos químicos	Alcalino (Ca(OH) ₂ , NaOH, NH ₄ OH)	Alriksson <i>et al.</i> (2005)
	Agentes redutores (ditionite, sulfito)	Alriksson <i>et al.</i> (2011)
Tratamento enzimático	Lacase	Jönsson <i>et al.</i> (1998) Jurado <i>et al.</i> (2009)
	Peroxidase	Jönsson <i>et al.</i> (1998)
Aquecimento e vaporização	Evaporação	Larsson <i>et al.</i> (1999)
	Tratamento de aquecimento	Ranatunga <i>et al.</i> (2000)
Extração líquido-líquido	Acetato de etila	Fenske <i>et al.</i> (1998)
	Extração com CO ₂ supercrítico	Persson <i>et al.</i> (2002)
	Triálquilamina	Zhu <i>et al.</i> (2011)
Extração líquido-sólido	Carbão ativado	Parajó <i>et al.</i> (1997)
	Troca iônica	Nilvebrant <i>et al.</i> (2001)
	Lignina	Björklund <i>et al.</i> (2002)
Tratamento microbiano	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	López <i>et al.</i> (2004)
	<i>Trichoderma reesei</i>	Larsson <i>et al.</i> (1999)
	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Okuda <i>et al.</i> (2008)

2.7 Produção de enzimas ligninolíticas

A produção de enzimas ligninolíticas é influenciada por diversos fatores, incluindo fontes de carbono e nitrogênio, condições de crescimento, adição de indutores, efeitos de compostos aromáticos, aeração, temperatura, pH, método de produção. Ressalta-se que o efeito desses compostos depende não somente da fisiologia do fungo, mas também da composição do meio de cultivo. O efeito desses fatores varia entre as espécies de fungos e pode regular diferentes isoenzimas na mesma linhagem (Zhu *et al.*, 2016). A maior parte dos estudos sobre o efeito desses fatores concentra-se na produção de lacases. A produção de lacases, por exemplo, não está necessariamente associada ao crescimento do fungo. Ainda, condições e meios de cultivo otimizados para lacases, podem não favorecer a produção de outras enzimas ligninolíticas, como as peroxidases (Majeau *et al.*, 2010).

Tabela 7. Enzimas ligninolíticas usadas para remoção de fenóis em diferentes materiais pré-tratados.

Tratamento	Matéria-prima	Observações	Referências
Lacase e lignina peroxidase (<i>T. versicolor</i>)	Salgueiro explodido a vapor + SO ₂	O tratamento enzimático auxiliou na polimerização de componentes da biomassa	Jönsson <i>et al.</i> (1998)
Lacase (<i>T. versicolor</i>)	Abeto hidrolisado em ácido diluído	Aumento no rendimento de etanol	Larsson <i>et al.</i> (1999)
Lacase (<i>T. versicolor</i>)	Bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor	Aumento em rendimentos e produtividades dos produtos desejados	Martín <i>et al.</i> (2002)
Lacase (<i>Cyathus stercoreus</i>)	Bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor	Alta produção de biomassa com elevado rendimento de etanol	Chandel <i>et al.</i> (2007)
Lacase (<i>C. rigida</i> e <i>T. villosa</i>)	Palha de trigo explodido a vapor impregnado com água ou ácido	Melhor recuperação de açúcares quando a lacase é adicionada após a sacarificação	Jurado <i>et al.</i> (2009)
Lacase (<i>T. versicolor</i>)	Palha de trigo pré-tratada com água quente líquida	Ação seletiva na polimerização de fenóis	Kolb <i>et al.</i> (2012)
Lacase (<i>T. villosa</i> e <i>P. cinnabarinus</i>)	Palha de trigo explodido a vapor	Possibilitou trabalhar com elevada carga de substrato	Moreno <i>et al.</i> (2012, 2013)
Lacase (<i>Coltricia perennis</i>)	Palha de arroz pré-tratado com H ₂ SO ₄	Ação seletiva na polimerização de fenóis	Kalyani <i>et al.</i> (2012)
Lacase (<i>T. versicolor</i>)	Palha de trigo pré-tratado com etanol-organossolve	Polimerização de fenóis e incremento no rendimento de etanol	Ludwig <i>et al.</i> (2013)
Lacase (<i>P. cinnabarinus</i>)	Palha de trigo explodido a vapor	Aumento da produtividade volumétrica em amostras com elevada consistência de biomassa seca	Alvira <i>et al.</i> (2013)

2.7.1 Fontes de carbono

A fonte de carbono está diretamente relacionada a uma maior produção de enzimas ligninolíticas. Fontes de carbono de fácil assimilação, tais como glicose, manitol e celobiose, geralmente proporcionam maior atividade às enzimas do que substratos que são assimilados mais lentamente, como celulose e lactose (Mikiashvili *et al.*, 2006). Em alguns casos, um aumento na atividade de lacase é concomitante com um aumento no crescimento celular. Por exemplo, Mansur *et al.* (1997) observou que o uso de frutose em vez de glicose resultou em um aumento de 100 vezes na atividade específica de lacase. Além disso, Rodriguez-Couto *et al.* (2007) demonstraram que a adição sequencial de diferentes fontes de carbono, como frutose

seguida de glicerol, proporcionou um aumento na produção de lacase em *Trametes hirsuta* em relação ao uso da glicose na ausência de outra fonte de carbono (Majeau *et al.*, 2010).

Não somente a fonte de carbono, como também a concentração são importantes. Concentração excessiva (≥ 10 g/L no caso de *T. versicolor*) geralmente reprimem a expressão de lacases e outras enzimas ligninolíticas (Thiruchelvam & Ramsay, 2007). Também foram publicados estudos nos quais um considerável aumento na produção de lacase é observado com baixas concentrações de glicose (10 g/L) (Galhaup *et al.*, 2002). Cultivos descontínuos alimentados também podem incrementar a produção de lacases. Para *Trametes pubescens*, o modo de produção dobrou a atividade da lacase em comparação com o cultivo descontínuo (Galhaup *et al.*, 2002) (Majeau *et al.*, 2010).

2.7.2 Fontes de nitrogênio

Em muitos estudos prévios verificou-se que ambas a natureza (orgânico ou inorgânico) e a concentração da fonte de nitrogênio são fatores que regulam o crescimento e a produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos. Para *P. chrysosporium*, cultivado em meio sintético, a produção de LiP e MnP somente foi possível em condições limitantes de nitrogênio (Reddy *et al.*, 1994). Contudo, foi relatado em estudos que, na presença de substratos lignocelulósicos, uma alta concentração de nitrogênio estimula a produção destas enzimas (Songulashvili *et al.*, 2006). Em outros trabalhos demonstrou-se que um meio de cultivo com nitrogênio limitante (2-3 mmol/L) favoreceu a produção de lacase em algumas espécies, por exemplo, *P. sanguineus* (Pointing *et al.*, 2000) e *P. ostreatus* (Hou *et al.*, 2004). A alta concentração de nitrogênio no meio foi favorável para produção de lacase com *T. gallica* (Dong & Zhang, 2004), *Lentinus edodes* (Hatvani & Mecs, 2002), *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997) e *T. pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002). Para MnP, ao contrário, uma baixa concentração de nitrogênio induziu mais a expressão da enzima em *Pleurotus sajor-caju* (Fu *et al.*, 1997). Entre fontes de nitrogênio preferíveis por basidiomicetos estão a peptona e o triptofano, os quais estiveram relacionados a maiores atividades enzimáticas quando comparados com extrato de levedura e tartarato de amônia (Galhaup *et al.* 2002; Majeau *et al.*, 2010).

2.7.3 Indutores

O uso de um indutor pode aumentar a produção de enzimas ligninolíticas, sendo um pré-requisito para uma produção eficaz numa escala industrial. Compostos aromáticos, íons metálicos, vitaminas, aminoácidos e outros indutores atuam a nível de transcrição de genes

relacionados a essas enzimas (Ikehata *et al.*, 2004; Piscitelli *et al.*, 2011). Entre os indutores mais eficazes na produção de lacases por fungos, está a xilidina e o cobre (CuSO_4). O cobre funciona como cofator no centro catalítico de lacases e quantidades mínimas desse metal são suficientes para incrementar a produção de lacases (Majeau *et al.*, 2010). Palmieri *et al.* (2000) descreveram que o cobre induz isoenzimas de lacases em *P. ostreatus*. Também verificou-se que o excesso de cobre pode ter um efeito tóxico sobre a biomassa fúngica, diminuindo assim a produção de lacase. Estratégias de adicionar cobre durante a fase exponencial de crescimento do fungo foram relatadas, resultando em maior rendimento enzimático, sem prejudicar o crescimento do fungo (Majeau *et al.*, 2010).

O efeito indutivo dos cátions metálicos, especialmente Mn^{2+} , na expressão de MnP, também está bem compreendido (Hildén *et al.*, 2005). Entre outros indutores interessantes estão o guaiacol (Ryan *et al.*, 2007), álcool veratrílico, (Dekker & Barbosa, 2001) e etanol (Lomascolo *et al.*, 2003). Monômeros de lignina, aminoácidos e vitaminas também podem atuar como indutores de ligninases. A degradação da lignocelulose de resíduos agrícolas pode liberar indutores naturais eficientes e pode superar o efeito de indutores sintéticos (Pickard *et al.*, 1999). Alguns estudos verificaram os efeitos da adição de uma combinação de dois indutores. Por exemplo, Jang *et al.* (2006) mostraram que 2,5-xilidina em conjunto com ABTS aumentou a atividade da lacase, quando comparada às atividades usando cada indutor isoladamente.

2.7.4 pH

O controle de pH do meio de cultivo é de grande relevância, pois interfere diretamente na fisiologia do organismo. O pH ideal para o crescimento fúngico é amplo, variando entre 4,0 e 9,0, embora o pico de crescimento geralmente se encontra próximo a neutralidade (Papagianni, 2004; Bettin, 2010). Por outro lado, o pH ideal para a produção de enzimas ligninolíticas varia entre 4,5 e 5,0, apesar de geralmente um meio ácido está associado a uma maior atividade de enzimas ligninolíticas (Majeau *et al.*, 2010). Quando o pH não é controlado durante o cultivo, ocorre um decréscimo no pH do cultivo na fase de crescimento micelial ou na fase de produção enzimática, e isso está associado à liberação de enzimas ligninolíticas e a secreção de ácidos. Contudo, uma queda no pH também pode levar à desnaturação das enzimas.

Em estudos de Tavares *et al.* (2006) verificou-se que o pH 5,2 foi ideal para a produção de lacases por *T. versicolor* em biorreator, em regime descontínuo alimentado com glicose. Hariharan & Nambisan (2013) também verificaram que o pH 5,0 era melhor para produção de lacase, MnP e LiP por *Ganoderma lucidum* em cultivo em estado sólido. Da mesma forma,

Chenthamarakshan *et al.* (2017) verificaram pH 5,0 como ótimo para produção de lacase por *Marasmiellus palmivorus* LA1 em cultivo sólido. Cantele *et al.* (2017a), no entanto, relataram maior atividade de lacase para *M. palmivorus* VE111 em pH livre e pH fixo em 7,0.

2.7.5 Temperatura

A produção de enzimas ligninolíticas também é influenciada pela temperatura, sendo que nem sempre a temperatura ótima da síntese é a mesma para o crescimento do microrganismo (Bettin, 2010). A produção de enzimas ligninolíticas normalmente ocorre em condições mais brandas, em temperaturas na faixa de 25 °C a 30 °C. Hariharan & Nambisan (2013) verificaram que 27 °C foi a melhor temperatura para a produção de lacase, MnP e LiP por *G. lucidum*, enquanto temperaturas abaixo (23 °C) ou acima (33 °C) levaram à redução da produção destas enzimas. Chenthamarakshan *et al.* (2017), também descreveram 28 °C como a melhor temperatura para produção de lacase por *M. palmivorus* LA1.

2.7.6 Oxigênio

A disponibilidade de oxigênio tem um grande influência na produção de enzimas ligninolíticas por fungos, sendo a transferência de oxigênio em culturas submersas de basidiomicetos um fator chave para o eficiente crescimento fúngico. No entanto, a taxa de aeração raramente é otimizada e é comumente fixado em 1 vvm na maioria dos biorreatores (Majeau *et al.*, 2010). Além do mais, os biorreatores convencionais, como os de tanque agitado, não são totalmente adequados para a cultura de basidiomicetos porque promovem altas tensões de cisalhamento às hifas miceliais e favorecem a rápida aglomeração de *pellets* miceliais, comprometendo a difusão de oxigênio para o lado interno do micélio (Domingos *et al.*, 2017). A produção de enzimas ligninolíticas pode ser melhorada se estudos sobre a taxa ótima de concentração de oxigênio dissolvido durante a fermentação fosse realizada. Em caso de *Botryosphaeria* sp., a produção de lacase foi significativamente melhorada em cultivos líquidos em frascos na presença de defletores (Dekker & Barbosa, 2001).

2.7.7 Formas de cultivo

2.7.7.1 Cultivo submerso

O cultivo submerso é frequentemente usado para a produção de enzimas ligninolíticas. No entanto, a produção de lacases, por exemplo, pode variar conforme a espécie de fungo (Majeau *et al.*, 2010). Para *T. versicolor*, a produção de lacase foi beneficiada em cultivo

submerso. Contudo, para *T. villosa* um cultivo semissólido foi mais favorável (Minussi *et al.*, 2007). Geralmente, fungos filamentosos apresentam uma morfologia caracterizada por *pellets* em cultivos submersos conduzidos em frascos. No entanto, em cultivos realizados em biorreatores, a frequência de agitação e a taxa de aeração influenciam diretamente nessa morfologia, atuando no cisalhamento do micélio e podendo resultar na formação de micélios ramificados (Ahamed & Vermette, 2009).

Os cultivos submersos podem ser realizados em frascos ou em biorreatores. Diferentes biorreatores são empregados nesses cultivos, mas a aplicabilidade de cada tipo depende do organismo empregado e do produto desejado (Figura 32).

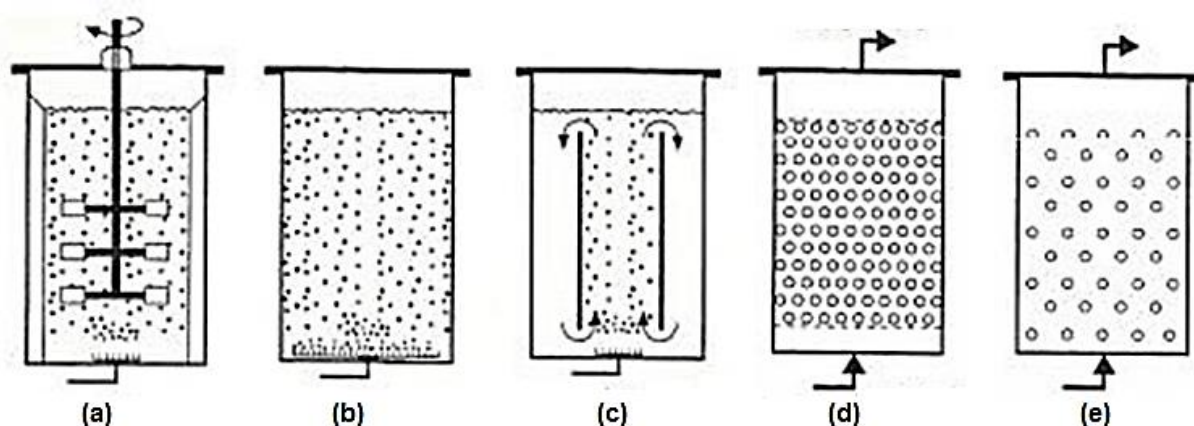


Figura 32: Exemplos de biorreatores. (a) biorreator agitado mecanicamente; (b) coluna de bolhas; (c) biorreator do tipo *air lift*; (d) biorreator de leito fixo; (e) biorreator de leito fluidizado (Schmidell & Facciotti, 2001).

Os cultivos submersos podem ser realizados em diferentes regimes de operação: regime descontínuo (ou condição em batelada), regime descontínuo alimentado (semi-contínuo ou batelada alimentada) ou regime contínuo. No regime descontínuo, o meio de cultivo é colocado de uma vez no biorreator e, em seguida, o inóculo. Geralmente, quando todo o substrato foi consumido, o cultivo se encerra e o produto final recuperado. No regime descontínuo alimentado, o inóculo é colocado no biorreator vazio com um pouco de meio de cultivo e o restante do meio é acrescentado aos poucos até atingir-se o volume útil no final do cultivo. E o regime contínuo, inicia com uma batelada inicial até atingir uma concentração celular elevada (fase exponencial de crescimento), e só então ocorrem alimentações do meio, havendo uma saída contínua do biorreator, para que se mantenha constante o volume do cultivo (Schmidell & Facciotti, 2001).

Na Figura 33 é apresentado um diagrama esquemático dos fatores que influenciam a formação de produtos em fungos filamentosos. Analisando esses fatores, verifica-se que as

condições do processo para a produção de um metabólito fúngico de interesse está diretamente relacionado à composição do meio de cultivo, ao pH, à temperatura e à concentração de oxigênio dissolvido definidos para o processo, além da forma de cultivo e regime de operação escolhidos. Essas condições influenciam no crescimento e na morfologia do fungo, o que está diretamente relacionado a formação do produto e a reologia do meio ou vice-versa.

Uma maior concentração de oxigênio dissolvido, paralela a uma maior agitação do meio de cultivo, possivelmente provocará um maior cisalhamento do micélio, modificando a morfologia fúngica. Fungos podem apresentar uma morfologia de crescimento em forma de *pellets* ou de micélio ramificado. O número de hifas e, principalmente, pontas de hifas que concentram os metabólitos a serem secretados pelo fungo, variam entre uma morfologia e outra. A morfologia fúngica, quando controlada, pode resultar em incrementos na produtividade do metabólito desejado (Peberdy, 1994). A formação de produto e a reologia do meio decorrentes da morfologia fúngica, por sua vez, afetam a transferência de massa e calor na mistura do cultivo e esses parâmetros, consequentemente, podem provocar um efeito indireto nas condições iniciais do processo. (Ahamed & Vermette, 2009).

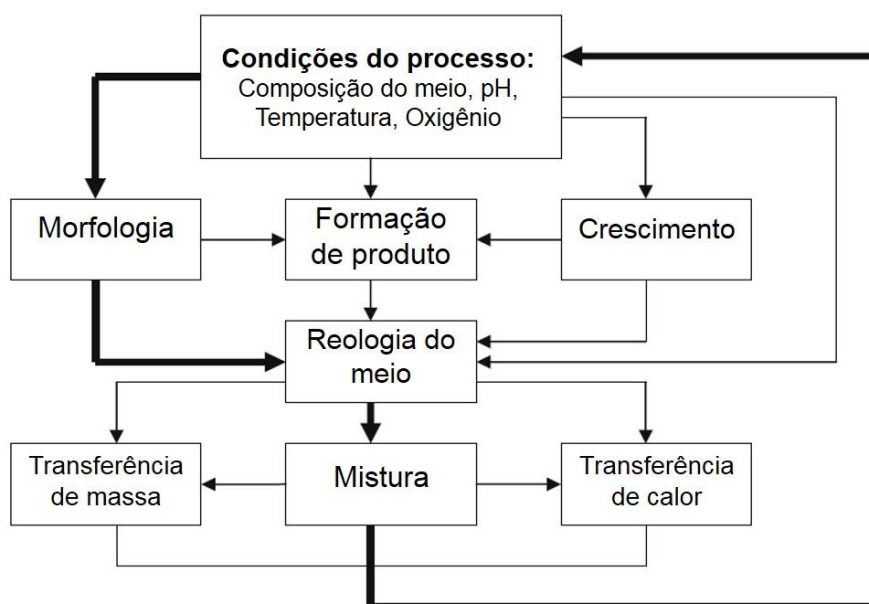


Figura 33. Interações complexas entre morfologia, produtividade e condições de processo em cultivos submersos de fungos filamentosos (adaptado de Metz, 1976; Ahamed & Vermette, 2009).

No caso de enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos, as mesmas são suscetíveis a pequenos ajustes operacionais e mudanças na composição do meio de cultivo, ainda mais em cultivos submersos, que simulam um ambiente diferente do qual o fungo habitualmente está adaptado (Majeau *et al.*, 2010).

2.7.7.2 Cultivo em estado sólido

Simulando o ambiente natural do fungo, o cultivo em estado sólido de fungos filamentosos para a produção de ligninases consiste no cultivo sobre algum material sólido na ausência de líquido livre. O cultivo em estado sólido é muito mais simples quando comparado com o cultivo submerso. Contudo, alguns parâmetros, como pH, agitação, transferência de oxigênio e temperatura são difíceis de serem controlados (Pandey et al., 2000; Majeau *et al.*, 2010).

2.8 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Diferentes características interferem na eficiência da hidrólise enzimática, entre elas, o grau de cristalinidade da celulose, o grau de polimerização e a recalcitrância provocada pela lignina. Assim sendo, um dos principais gargalos que envolvem a produção de etanol 2G é “desmontar” a parede celular liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis de forma eficiente e economicamente viável. Ao mesmo tempo, a lignina – heteropolímero aromático de alto valor agregado – pode ser aproveitada para diferentes fins (Santos *et al.*, 2012). Assim sendo, é necessária uma ruptura dos componentes presentes na estrutura lignocelulósica, através de métodos de pré-tratamentos, a fim de obter-se os produtos desejados (Figura 34).

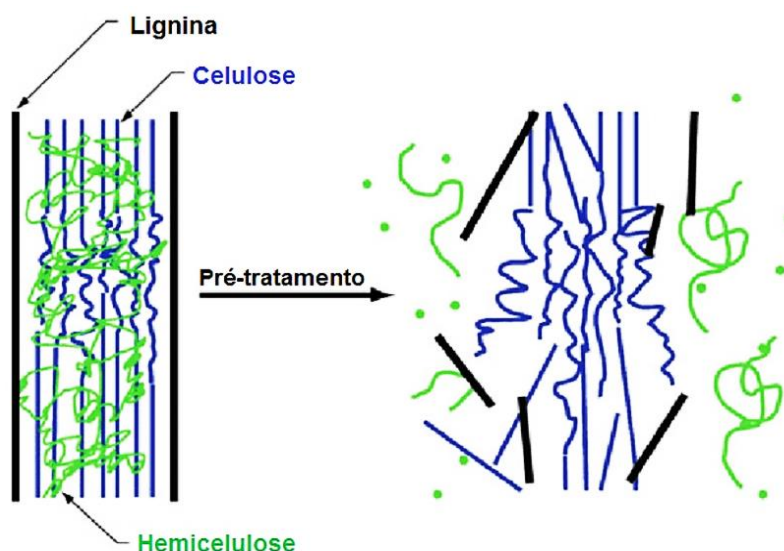


Figura 34. Representação esquemática das alterações estruturais provocadas pelo pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (adaptado de Mosier *et al.*, 2005).

Diferentes estratégias de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica foram estudadas (Chen *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2018). Os pré-tratamentos podem ser classificados genericamente em quatro diferentes grupos: físicos, químicos, biológico ou combinados

(Santos *et al.*, 2012). Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos combinados têm recebido uma maior atenção, pois removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica. Contudo, há uma degradação parcial das hemiceluloses no processo de pré-tratamento químico, devido ao fato de a lignina estar quimicamente ligadas às hemiceluloses (Sun & Cheng, 2002; Mosier *et al.*, 2005).

A explosão a vapor, por exemplo, é um dos mais comuns métodos usados para pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Neste pré-tratamento, a biomassa é submetida a uma explosão sob alta pressão seguida de uma rápida descompressão, levando à abertura da estrutura lignocelulósica e aumentando a susceptibilidade das fibras de celulose à hidrólise enzimática para produzir açúcares fermentáveis e auxiliar no fracionamento de seus componentes (Martin-Sampedro *et al.*, 2011). Na Tabela 8 estão resumidos os principais métodos de pré-tratamento, bem como suas características principais.

Tabela 8. Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos (adaptado de Santos *et al.*, 2012).

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, ocorre mudança na estrutura	Alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e oneroso
Químico	Hidróxido de sódio	Inchaço significativo	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente oneroso, recuperação alcalina
	ARP ¹	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, oneroso
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina, baixo custo	Menor efetividade, pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação	Oneroso, necessidade de mais ozônio
	Organossolve	Considerável inchaço	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Pouca energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, ocorre mudança na estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX ²	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia.

¹Percolação com amônia reciclada (ARP), ²Explosão a vapor com amônia (AFEX).

2.8 Proteômica de basidiomicetos

Os fungos filamentosos desempenham um papel importante no ciclo do carbono porque alguns desses fungos, agrupados no filo Basidiomycota, secretam grandes quantidades de enzimas degradadoras de lignocelulose. Esses fungos são organismos conhecidos por degradar todas as frações lignocelulósicas - polissacarídeos e lignina. As estratégias de degradação de cada basidiomiceto dependem do seu arsenal de enzimas extracelulares cuja produção e secreção dependem do substrato e das condições do meio em que estão inseridos (Martínez *et al.*, 2005; Alfaro *et al.*, 2014).

Mais de 1500 genomas fúngicos (cerca de 400 correspondentes a basidiomicetos) já estavam sequenciados até 2018 (Leicht *et al.*, 2018). Estas sequências podem ser bioinformaticamente rastreadas para identificar proteínas secretadas. No entanto, testes complementares, como determinação de atividades enzimáticas, são essenciais para analisar esses sistemas complexos (Alfaro *et al.*, 2014).

O secretoma pode ser definido como uma fração do proteoma total de um organismo, ou seja, um subproteoma, constituído pelo conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção destas proteínas (Tjalsma *et al.*, 2000). O estudo de secretomas de fungos facilita o uso no tratamento enzimático de diferentes lignoceluloses, visando a produção de biocombustíveis e outros processos no contexto das biorrefinarias (Alfaro *et al.*, 2014).

Estudos sobre o proteoma de basidiomicetos aumentaram nos últimos anos em paralelo com o número crescente de genomas sequenciados, o que permitiu a identificação de proteínas por espectrometria de massa em *tandem* usando bancos de dados genômicos (como JGI Mycocosm) (Fernández-Fueyo *et al.*, 2016).

Entre os secretomas de basidiomicetos, destacam-se em número e pela versatilidade de enzimas degradadoras de lignocelulose, os basidiomicetos de degradação branca. Como mencionado anteriormente, os basidiomicetos de degradação branca atacam a porção de lignina de lignocelulose utilizando enzimas oxidativas classificadas como MnPs, PVs, LiPs e lacases. Nem todos os basidiomicetos de degradação branca contêm todas estas enzimas. Por exemplo, *P. chrysosporium*, um basidiomiceto modelo de degradação branca, produz LiPs e MnPs, mas não produz lacases, enquanto *P. ostreatus* não produz LiPs. Além dessas principais enzimas ligninolíticas, há uma série de enzimas acessórias que participam do processo, como as hemeperoxidases, as cloroperoxidases, as peroxidases descolorantes de corantes, além de

glioxal oxidases e aril-álcool oxidases, piranose desidrogenases e metanol oxidases (Alfaro *et al.*, 2014).

A Figura 35 apresenta diferenças no perfil proteico de diferentes basidiomicetos.

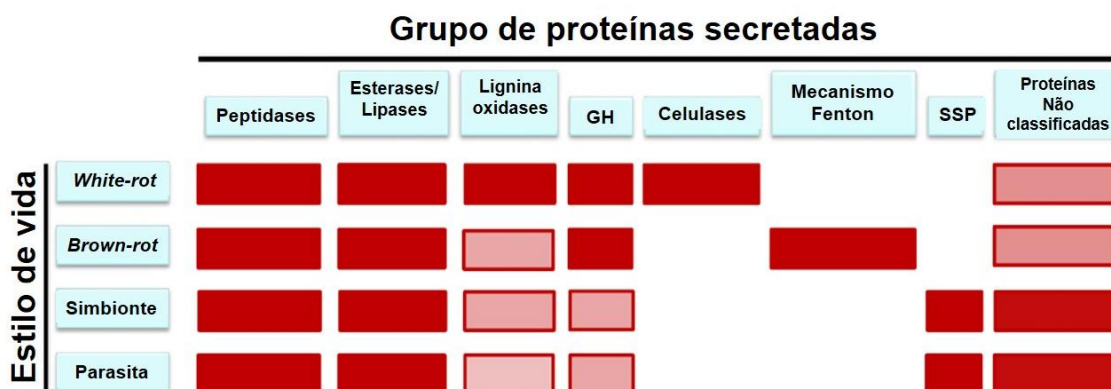


Figura 35. Diferenças nos secretomas de basidiomicetos em relação ao seu estilo de vida. A abundância de diferentes grupos de proteínas é indicada para cada estilo de vida fúngico. A intensidade da cor representa a abundância de cada grupo de proteínas (Alfaro *et al.*, 2014). GH (glicosil hidrolases); SSP (pequenas proteínas secretadas).

Entre os secretomas de basidiomicetos estudados, muitos referem-se ao secretoma de *P. chrysosporium*, uma vez que seu genoma está acessível desde 2004 (Martínez *et al.*, 2004; Salvachúa *et al.*, 2013). *P. chrysosporium* foi o primeiro basidiomiceto cujo secretoma foi estudado em condições de limitação de glicose e nitrogênio e, em estudos posteriores, utilizando fontes de carbono mais complexas, tais como: (i) celulose microcristalina; (ii) madeira de álamo moída; (iii) xilana/amido; (iv) lignina; e (v) outros substratos lignocelulósicos. O secretoma de *P. chrysosporium* também foi analisado durante cultivo em estado sólido, empregando madeira de carvalho vermelho, madeira de pinheiro preto e palha de trigo (Fernández-Fueyo *et al.*, 2016).

Outros fungos de degradação branca cujos secretomas foram analisados são: (i) *Pleurotus sapidus* cultivado em estado sólido e submerso; (ii) *Phanerochaete carnosa* cultivado com celulose microcristalina em meio líquido e em cavacos de abeto em cultivo em estado sólido (comparado com *P. chrysosporium*); (iii) *G. lucidum* durante cultivo em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar; (iv) *Trametes trogii* cultivado em blocos de madeira de álamo; (v) *I. lacteus* em palha de trigo em cultivo em estado sólido (em comparação com *P. Chrysosporium* e *P. ostreatus*); (vi) *Ceriporiopsis subvermispora* cultivado em meio líquido com celulose microcristalina; (vii) *Phlebiopsis gigantea* cultivado em madeira de aspen e pinheiro; e (viii) *Pycnoporus cinnabarinus* em cultivo líquido com lignocelulose suplementado

com maltose e em cultivo em estado sólido com cinco diferentes substratos de plantas (Fernández-Fueyo *et al.*, 2016).

A genômica comparativa combinada com estudos bioquímicos auxiliam na elucidação de estratégias de degradação lignocelulósica por basidiomicetos. Duas conclusões desses estudos são: (i) a presença de genes de peroxidases - a partir de famílias de LiP, MnP e/ou PVs - nos genomas de basidiomicetos da degradação branca (ou seja, os ligninolíticos) e sua ausência em todos os genomas de fungos de degradação parda (ou seja, os celulolíticos); e (ii) a distribuição generalizada de outros genes que contribuem para o ataque oxidativo sobre a lignocelulose, como as oxidases geradoras de H₂O₂ e lacases, nos genomas de basidiomicetos de degradação de madeira (Floudas *et al.*, 2012; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015).

Recentemente, estudos avançados de secretomas de diversos fungos, visando a despolimerização da lignina também foram realizados, contribuindo na compreensão do potencial destes fungos na obtenção de compostos de lignina de alto valor agregado (Salvachúa *et al.*, 2016).

Na Tabela 9 são apresentados alguns estudos de secretoma de basidiomicetos dos últimos anos.

Tabela 9. Análise proteômica de sistemas enzimáticos lignocelulolíticos produzidos por fungos basidiomicetos.¹LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; ²2D – eletroforese dimensional; ³GMC – glicose-metanol-colina; ⁴GH – glicosil hidrolases; ⁵CBM –

Basidiomiceto	Meio de cultivo	Abordagem	Principais proteínas do secretoma		Referência
<i>P. chrysosporium</i> RP78	Celulose cristalina	Shotgun LC-MS/MS ¹	Celobiohidrolases I e II, endoglucanase, xilanase, β -glicosidase, lignina peroxidase, proteínas putativas		Wymelenberg <i>et al.</i> (2005)
<i>P. sapidus</i> DSMZ 8266	Casca de amendoim	2D-ESI-MS/MS ²	Exo-poligalacturonase, carboxipeptidase, manganês peroxidase, lipase, versatile peroxidase, peptidases		Zorn <i>et al.</i> (2005)
<i>P. chrysosporium</i> BKM-1767	Cavacos de carvalho	2D-MALDI-TOF	Celobiohidrolase, β -glicosidase, β -galactosidase, α -glicosidase, β -exoglucanase, laminarinase, endo-1,4- β -xilanase, celobiose desidrogenase, lignina peroxidase		Abbas <i>et al.</i> (2005)
<i>P. carnosa</i> HHB-10118	Celulose cristalina e cavacos de madeira de abeto (<i>spruce wood chips</i>)	SDS-PAGE LC-MS/MS	Celobiohidrolase I e II, endoglucanase, β -glicosidase, β -manosidase, mananase, xilanase, endo-1,3(4)- β -glucanase, arabionofuranosidase, monoxigenase, GMC ³ , glioxal oxidase, peroxidase, multicobre oxidase		Mahajan & Master (2010)
<i>T. trogii</i> MT	Serragem de madeira de <i>Populus euramericana</i>	SDS-PAGE Shotgun LC-MS/MS	Celobiohidrolase, β -glicosidase, lacase, MnP, aril-álcool oxidase, celobiose desidrogenase, lignina peroxidase, lipase, proteínas hipotéticas		Ji <i>et al.</i> (2012)
<i>T. versicolor</i> AFC 2234	Meio suco de tomate suplementado com cobre e manganês	Shotgun LC-MS/MS	Hidrolases, peroxidases (MnP, VP, DyP), fenoloxidasas, oxidasas (pranose oxidase, cobre radical oxidase, aril-álcool oxidase, glioxal oxidase, álcool oxidase), esterases, proteases.		Carabajal <i>et al.</i> (2013)
<i>I. lacteus</i> 238 617/93	Palha de trigo em cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES)	Shotgun 2D-nanoLC-MS/MS	CS	Celobiohidrolase II, celulase, acetil-xilana esterase, enzima descolorante de melanina, peroxidase (DyP), endoglucanase, exo- β -1,3-galactanase, ramnogalacturonase	Salvachúa <i>et al.</i> (2013)
			CES	Peroxidase (DyP), MnP, enzima descolorante de melanina, exo- β -1,3-galactanase, ribonuclease, GH3 ⁴ , manose-6-phosphatase, protease.	
<i>P. ostreatus</i> PC9	Cavacos de madeira de álamo (CA), Palha de trigo (PT), Glicose (G)	Shotgun nLC-MS/MS	CA	Lacases, peroxidases (MnP, VP, Oxidasas (Galactose oxidase), CAZy (GH1, GH47, GH76, Carboxilesterase, CBM13 ⁵ , CBM43) Lipases, Peptidases	Fernández-Fueyo <i>et al.</i> (2016)
			PT	Lacases, Peroxidases (MnP, VP, Oxidasas (Galactose oxidase, DyP), CAZy (GH1, GH3, GH47, GH51, GH76, Carboxilesterase), Peptidases	
			G	Oxidasas (Galactose oxidase, GMC, DyP), CAZy (GH3, GH15, GH18, GH76, GH105, Carboxilesterase, CBM13) Proteases, Proteínas desconhecidas	
<i>P. eryngii</i> IJFM A582	Lignina DMR-EH ⁶	LC-ESI ⁷ -MS/MS	GMC oxidoreductases, lacases, aril-álcool oxidasas, peroxidases (DyP), FAD ⁸ /FMN ⁹ oxidoreductases, glioxal oxidase		Salvachúa <i>et al.</i> (2016)

módulo de ligação ao carboidrato; ⁶DMR-EH – *Deacetylation Mechanical Refining and Enzymatic Hydrolysis*; ⁷ESI – ionização por *electrospray*; ⁸FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina;⁹FMN – mononucleotídeo de flavina

3 MATERIAL E MÉTODOS

Um esquema com os procedimentos realizados com *M. palmivorus* VE111 é apresentado na Figura 36.

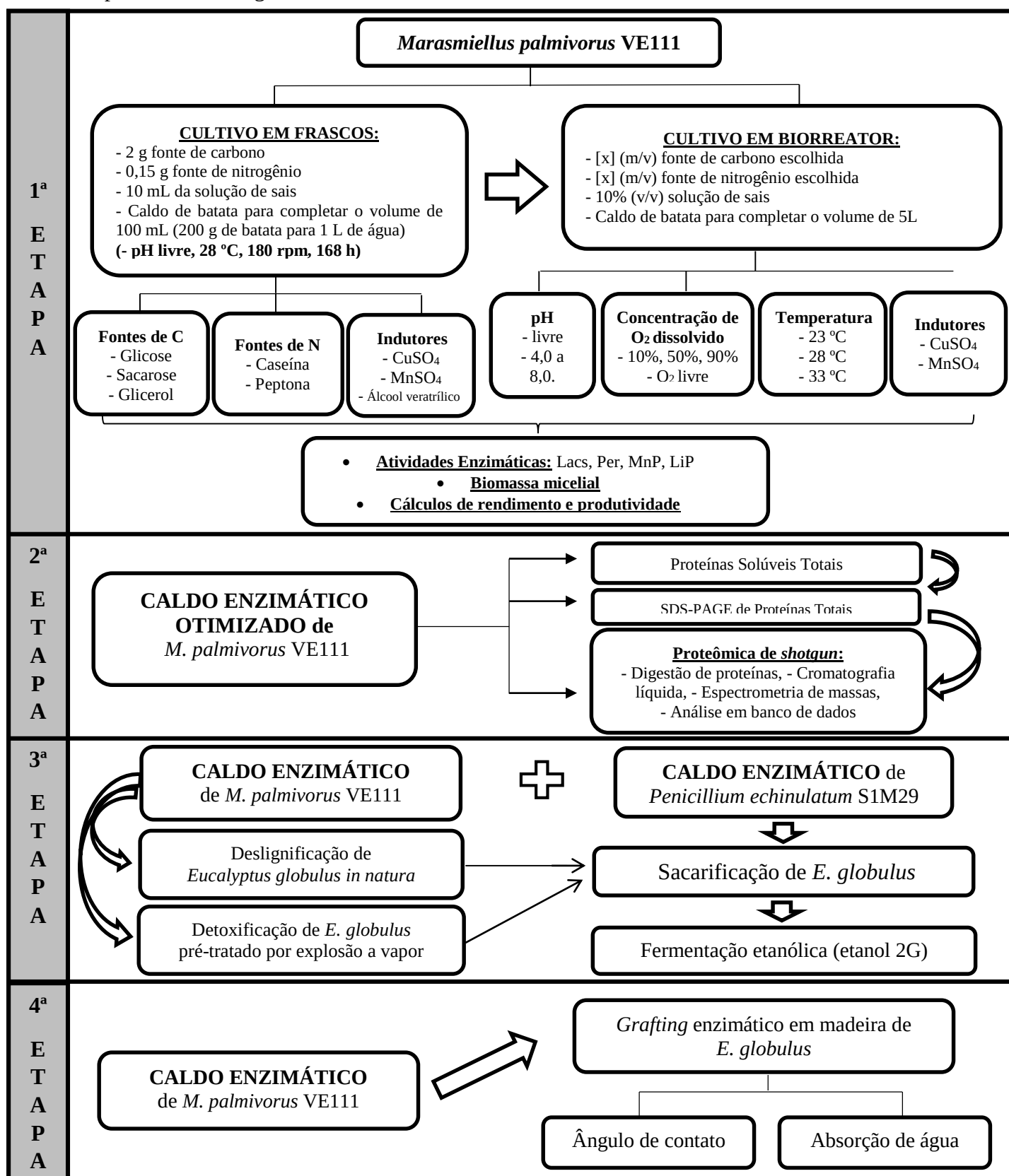


Figura 36. Esquema representando a metodologia empregada no decorrer do doutorado.

3.1 Fungos

Para a produção de enzimas ligninolíticas foi empregado o fungo basidiomiceto *M. palmivorus* VE111 (Figura 37). O fungo foi coletado no Parque Estadual do Itapeva, na cidade de Torres/RS (29° 21' S, 49° 45' O), no verão de 2013. As coletas foram realizadas com autorização para ingresso de pesquisadores nas unidades de conservação (SISGEN nº ACCE62), pela Secretaria Estadual do Meio Ambiente, RS, autorização número 91/2012 e autorização especial de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético, processo número 02001.007656/2012-11, no IBAMA (Mezzomo, 2013).

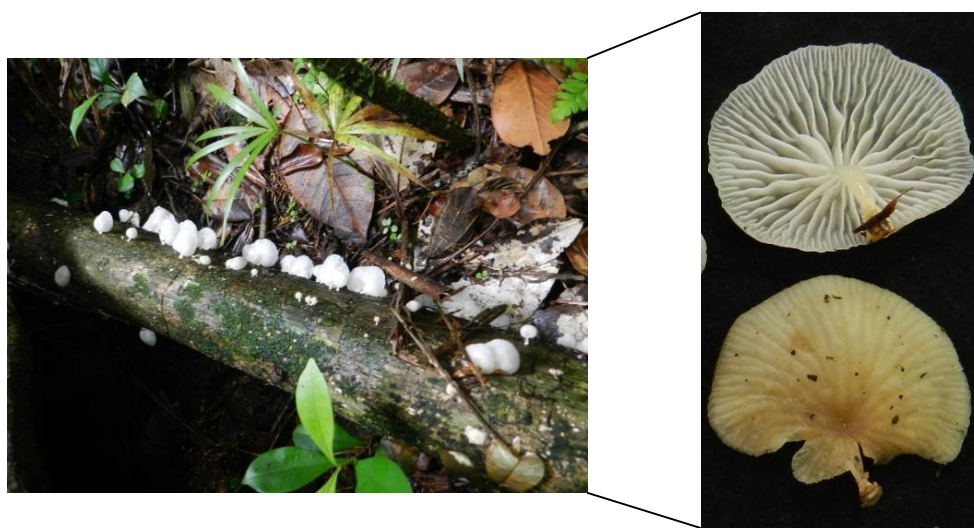


Figura 37. Fungo basidiomiceto *M. palmivorus* VE111 coletado no Parque Estadual do Itapeva, Torres/RS.

Para a produção de celulases e hemicelulases foi empregado o fungo ascomiceto *Penicillium echinulatum*, linhagem S1M29 (Figura 38).

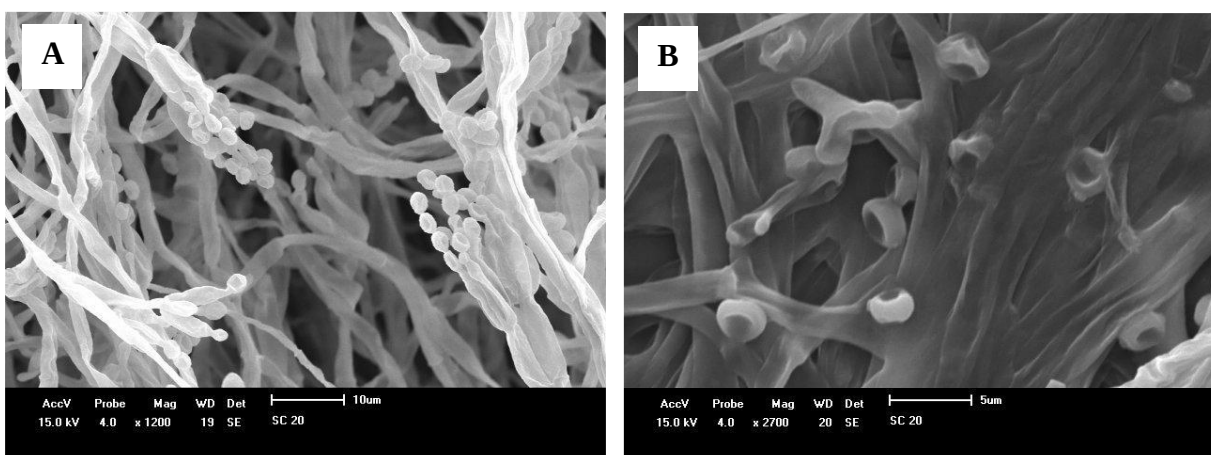


Figura 38. Microscopia eletrônica de varredura de *P. echinulatum* S1M29 em cultivo sólido. (A) aumento de 1200×, (B) aumento de 2700× (Camassola, 2008).

Ambos os fungos pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.2 Meios de manutenção dos microrganismos

3.2.1 Meio batata-dextrose-água

O meio de manutenção utilizado para *M. palmivorus* VE111 foi o batata-dextrose-água (BDA) (Kasvi®). A manutenção da linhagem foi realizada em placas de Petri e mantido em câmara de germinação (Oxylab) a 28 °C, durante sete dias.

3.2.2 Meio de celulose intumescida

O fungo *P. echinulatum* S1M29 foi crescido e mantido em meio água-celulose (C-água), consistindo de 40 mL de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral; 0,1 g proteose peptona (Oxoid L85®); 2 g de água e 50 mL de água destilada. As linhagens foram crescidas em tubos inclinados com C-água por 7 dias a 28 °C até a formação de conídios e então estocadas a 4 °C, conforme Dillon *et al.* (2006). A suspensão de celulose intumescida (2,5 g em 100 mL) foi autoclavada e, após, permaneceu sob agitação a 180 rpm por 7 dias. Essa suspensão foi armazenada a 4 °C até o momento do uso.

3.3 Produção de enzimas ligninolíticas

Para avaliar a produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111, foi realizado primeiramente um ensaio em frascos Erlenmeyer de 500 mL, variando as fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) e nitrogênio (peptona e caseína). O meio de cultivo submerso foi elaborado conforme Lipreri (2012), com modificações. O meio consistiu de 2 g fonte de carbono, 0,15 g fonte de nitrogênio, 10 mL da solução de sais de Mandels & Reese (1969) e caldo de batata para completar o volume de 100 mL (200 g de batata para 1 L de água). O cultivo foi realizado sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28 °C, pH livre, durante 10 dias. Coletas foram realizadas no 4º, 6º, 8º e 10º dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Após verificar a fonte de carbono e nitrogênio que proporcionaram a maior produção de enzimas ligninolíticas, um planejamento experimental foi realizado em frascos mantidos sob agitação. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² foi realizado para avaliar

as concentrações mais adequadas da fonte de carbono e nitrogênio na produção de lacases (Tabela 10).

Tabela 10. Planejamento fatorial 2^2 para identificar as concentrações mais adequadas de glicose e caseína para a produção de lacases em frascos.

Limites	Variáveis	
	Glicose (g/L)	Caseína (g/L)
Limite inferior (-)	10	0,5
Ponto central (0)	20	1,5
Limite superior (+)	30	2,5
Experimentos	Glicose (g/L)	Caseína (g/L)
1	12.91 (-1)	0.79 (-1)
2	27.09 (+1)	0.79 (-1)
3	12.91 (-1)	1.79 (+1)
4	27.09 (+1)	1.79 (+1)
5	10.00 (-1.41)	1.5 (0)
6	30.00 (+1.41)	1.5 (0)
7	20.00 (0)	0.5 (-1.41)
8	20.00 (0)	2.5 (+1.41)
9	20.00 (0)	1.5 (0)
10	20.00 (0)	1.5 (0)
11	20.00 (0)	1.5 (0)

Em seguida, pontos de interesse do planejamento experimental relacionadas a maior produção de lacases foram reproduzidos em biorreator com agitação mecânica de 10 L (New Brunswick, BioFlo®/CelliGen®115), em regime descontínuo (Figura 39). As condições operacionais em biorreator foram: pH livre, temperatura de 28 °C, concentração de oxigênio dissolvido $\geq 30\%$, 168 h de cultivo. A composição do meio de cultivo para os ensaios em biorreator foi a mesma dos ensaios em frascos, no entanto, em proporções para um volume operacional de 5 L.

Avaliadas e estabelecidas as melhores concentrações da fonte de carbono e nitrogênio, foi dada continuidade à otimização da produção das enzimas em biorreator. Avaliaram-se,

então, os seguintes parâmetros: pH (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 a 8,0 e pH inicial livre até 48h/pH fixo em 7,0 até o final do cultivo), concentração de oxigênio dissolvido fixo (10%, 50%, 90%), temperaturas (23, 28 e 33 °C). Para os ensaios de concentração de oxigênio dissolvido, o biorreator foi ajustado para o modo cascata e foram definidos os seguintes padrões de agitação e fluxo de ar: fixo em 10% (agitação: 50 a 350 rpm; fluxo de ar: 0,1 a 1,0 vvm); fixo em 50% (agitação: 100 a 550 rpm; fluxo de ar: 0,5 a 2,0 vvm); fixo em 90% (agitação: 200 a 850 rpm; fluxo de ar: 0,5 a 3,0 vvm). Os ensaios iniciaram com 10% (v/v) de um pré-inóculo, cultivado em frascos Erlenmeyer por quatro dias, a 28 °C, 180 rpm, empregando 5 g/L de glicose, 1,80 g/L de caseína, 10% (v/v) de solução de sais de Mandels & Reese (1957) e caldo de batata para completar o volume de 100 mL de meio de cultivo por frasco. Todos os ensaios em biorreator foram realizados durante 168 h de cultivo, sendo que 15 mL de amostra foram coletadas duas vezes ao dia e estocadas a 4 °C para posteriores análises.

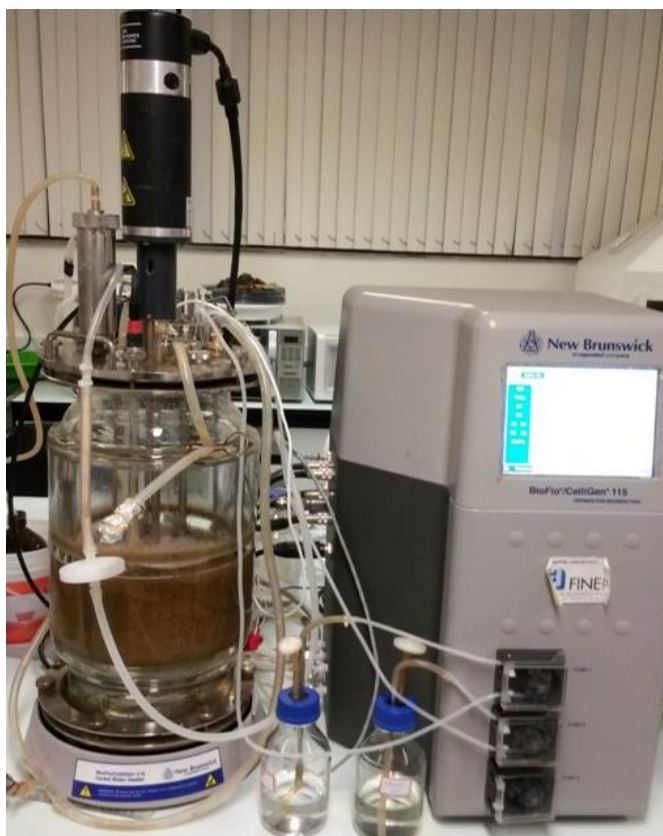


Figura 39. Biorreator com agitação mecânica (New Brunswick, BioFlo®/CelliGen®115), empregado para a produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111.

O biorreator de agitação mecânica empregado consiste em um vaso cilíndrico, com relações entre a altura e o diâmetro de 2:1, equipado com chicana e agitador montado no eixo central, formado por duas turbinas (de disco de Rushton), cada uma com seis pás planas.

Otimizados esses parâmetros em biorreator, um experimento de *screening* foi realizado em frascos mantidos sob agitação para avaliar três possíveis substâncias indutoras das enzimas estudadas: sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de manganês (MnSO₄) e álcool veratrílico nas concentrações de 1, 2 e 3 mmol/L. A composição do meio foi a mesma utilizada nos demais experimentos, exceto pela adição dos indutores individualmente nos frascos, com frascos sem indutores que foram considerados a condição controle. Coletas destrutivas (15 mL) foram realizadas no 6º e 8º dia de cultivo para avaliar a atividade enzimática. O experimento foi conduzido em triplicata, com posterior avaliação do melhor indutor em cultivo em biorreator, com as mesmas condições de cultivo e parâmetros previamente otimizados (pH, concentração de oxigênio dissolvido e temperatura).

Após cada ensaio, as amostras foram centrifugadas a $9600 \times g$ por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para determinação de pH (cultivos em frascos), atividades enzimáticas, consumo das fontes de carbono e proteínas solúveis totais. A massa micelial foi utilizada para determinação de crescimento. O consumo das fontes de carbono foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), após as amostras serem filtradas com um membrana de nylon de 20 µm.

3.4 Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas

A produção de celulasas e xilanases foi realizada em cultivos em estado sólido em bandejas estáticas, de acordo com Camassola & Dillon (2010) e cultivo submerso em um biorreator com agitação mecânica (Reis, 2017), utilizando o fungo *P. echinulatum* S1M29.

O meio de cultivo em estado sólido (Figura 40A) foi composto por 50% (m/m) de farelo de trigo, 25% (m/m) de capim-elefante, 25% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 1 mL/g de massa seca de solução mineral (Mandels & Reese, 1957). O meio sólido formava uma camada de aproximadamente 1,5 cm de espessura dentro bandeja (28 x 19 cm). Cada bandeja foi então inoculada com uma suspensão conidial com concentração final de 1×10^6 conídios por grama de massa seca do meio de produção. A umidade do meio foi ajustado para 67% pela adição de água destilada estéril. As bandejas foram incubadas numa câmara a 28 °C com 90% de umidade relativa do ar durante 96 h. Em seguida, a enzima foi extraída com 15 mL de tampão citrato de sódio a 0,05 mol/L, pH 4,8, por grama de biomassa seca (15:1). A extração foi realizada por 1 h em baixa agitação (100 rpm), a temperatura ambiente.

O meio de cultivo submerso (Figura 40B) foi composto por 1% (m/v) de celulose Celuflok E®, 0,5% (m/v) de sacarose; 0,2% (m/v) de farelo de soja; 0,5% (m/v) de farelo de

trigo; 0,05% (m/v) de Prodex®; 1 mL/L Tween 80®; 500 mL da solução mineral de Mandels & Reese (1957), 500 mL de pré-inóculo e água destilada para completar o volume de trabalho do biorreator de 5 L. O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 100 mL de meio de cultivo e uma suspensão de conídios 1×10^5 por mL. Os frascos mantidos sob agitação por 48 h, a 28 °C, 180 rpm. O meio foi o mesmo utilizado para o biorreator. O cultivo em biorreator foi realizado em batelada alimentada com celulose até 168 h (0,26 g/L/h), quando o cultivo foi finalizado e o sobrenadante centrifugado e coletado. O cultivo foi realizado a 28 °C, pH 6,0, agitação entre 150 e 300 rpm.

Após a produção, elaborou-se um coquetel de enzimas provenientes do cultivo submerso e do estado sólido (2:1 v/v), respectivamente. A combinação de enzimas de ambos os cultivos foi realizada com a finalidade de garantir um coquetel com atividades de diferentes enzimas necessárias para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, ou seja, celulasas e xilanases (produzidas em maior proporção no cultivo submerso) e β -glicosidases (com maiores atividades em estado sólido).

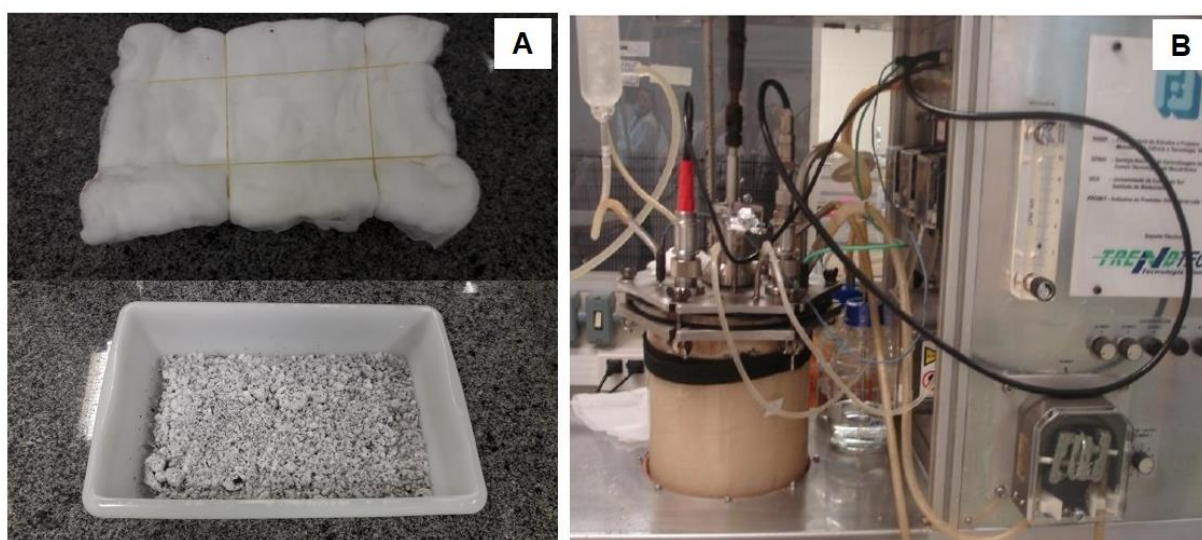


Figura 40. (A) Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *P. echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido em bandejas estáticas. (B) Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *P. echinulatum* S1M29 em cultivo submerso (biorreator construído em parceria entre Universidade de Caxias do Sul e Senai/Mecatrônica) (Reis, 2017).

3.5 Biomassa micelial

A biomassa micelial para os cultivos com *M. palmivorus* VE111 foi determinada através da massa seca fúngica, de acordo com o método de Rapp *et al.* (1981). Nos ensaios em frascos, 100 mL da cultura foi centrifugado por $9600 \times g$ por 20 minutos, após a retirada do

sobrenadante, a biomassa foi lavada três vezes com água destilada (10 mL) e após mantida em estufa a 90 °C, até massa constante. Nos ensaios em biorreator, alíquotas de 15 mL foram centrifugadas, sendo a massa micelial empregada para determinação de crescimento fúngico.

3.6 Determinações enzimáticas

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por mL (U/mL), definidas como a quantidade de enzima que libera um μmol do produto por mL, por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

3.5.1 Lacases

A atividade de lacases foi determinada segundo Wolfenden & Wilson (1982), através da quantificação do produto da oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), (ABTS) 5 mmol/L, utilizado como substrato. A mistura reacional (0,4 mL) era composta por 0,18 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 5,0; 0,18 mL de extrato enzimático e 0,04 mL do substrato ABTS 5 mmol/L. A oxidação do ABTS foi monitorada em espectrofotômetro (420 nm) durante 90 s, a 25°C.

3.5.2 Peroxidases totais

As peroxidases totais foram dosadas empregando-se a mesma metodologia de determinação de lacase, utilizando ABTS como substrato, entretanto com a presença de 0,04 mL de H_2O_2 2 mmol/L e somente 0,14 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 5,0, na mistura reacional (Heinzkill *et al.*, 1998). As atividades de peroxidases foram descontadas das atividades detectadas para lacases.

3.5.3 Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984), utilizando-se o vermelho de fenol como substrato. A mistura reacional (2 mL) era composta por 1 mL de tampão succinato de sódio 20 mmol/L, pH 4,5; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 % (m/v); 0,1 mL de lactato de sódio 250 mmol/L; 0,2 mL de albumina bovina 0,5% (m/v); 0,05 mL de MnSO_4 2 mmol/L; 0,05 mL de H_2O_2 2 mmol/L, sendo adicionados 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 0,04 mL de NaOH 2 mol/L. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância em espectrofotômetro (610 nm).

3.5.4 Lignina peroxidases

A atividade de lignina peroxidases foi determinada pela formação de veratrilaldeído, em uma mistura reacional contendo 0,1 mL de álcool veratrílico 4 mmol/L; 0,1 mL de H₂O₂ 2 mmol/L; e 0,2 mL de amostra em meio tamponado com 250 mmol/L de tartarato de sódio pH 3,0 sendo o volume final de 0,4 mL (Tien & Kirk, 1984). A variação de absorbância foi observada em espectrofotômetro (310 nm), durante 5 min, a 30 °C.

3.5.5 Oxidases do álcool veratrílico

A atividade das oxidases do álcool veratrílico foi determinada pela formação de veratrilaldeído a partir de uma reação contendo: 0,2 mL de álcool veratrílico 2 mmol/L e 0,2 mL de amostra em meio tamponado com 250 mmol/L de tartarato de sódio pH 5,0, com volume final de 0,4 mL, sendo a reação monitorada em espectrofotômetro (310 nm) durante 5 min, a 30 °C (Bourbonnais & Paice, 1988).

3.5.6 Atividade sobre papel filtro (FPA)

Para a dosagem de celulasas totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), de acordo com Camassola & Dillon (2012). Foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa, foi adicionado 10 µL de solução enzimática ou diluição apropriada e 140 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. A placa foi colocada em banho a 50 °C, durante 10 min, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima e o tampão citrato de sódio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida foram adicionados a cada poço 5 mg de papel filtro (Whatman nº 1) em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 min em banho a 50 °C. Logo após, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) e a placa foi colocada em banho a 100 °C, por 5 min. Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionado 200 µL de água destilada sendo a absorbância medida em espectrofotômetro a 545 nm. A determinação das atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose, por meio de regressão linear.

3.5.7 Endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987) com modificações, foi realizada empregando-se 1 µL da solução enzimática ou diluição apropriada e 49 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50 °C, por 10 min. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 µL de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), previamente aquecida a 50 °C, mantendo as placas por 30 min em banho a 50 °C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100 °C, por 5 min. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam tal como para FPA.

3.5.8 β-glicosidases

Para a determinação da atividade de β-glicosidases foi utilizado p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG), segundo a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional (100 µL) contendo 5 µL de água destilada, 5 µL de solução enzimática e 90 µL de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG 4 mmol/L) foi incubada a 50 °C por 30 min, sendo interrompida com a adição de 200 µL de uma solução 10% (m/v) de carbonato de sódio (Na₂CO₃). A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de pNPG a 405 nm e a determinação da atividade foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de p-nitrofenol (pNP), por meio de regressão linear.

3.5.9 Xilanases

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 µL de caldo enzimático e 90 µL de uma solução de xilana 1% (m/v) previamente aquecida a 50°C. A placa foi mantida em banho a 50 °C por 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se 300 µL de DNS e a placa foi mantida em banho a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados 100 µL de amostra em placa de 96 poços e adicionado 200 µL de água destilada e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01 mol/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

3.6 Determinação de proteínas solúveis totais

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis no secretoma de *M. palmivorus* VE111 foi empregado o método de Bradford (1976), utilizando o reagente de Bradford, sendo construída curva de calibração de soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA).

3.7 Caracterização de lacases e peroxidases

3.7.1 pH ótimo de atividade de lacases e peroxidases

A avaliação do efeito do pH sobre atividade de lacases e peroxidases foi realizada com tampões acetato de sódio, citrato de sódio e Mc'Ilvaine (fosfato de sódio/ácido cítrico). Esses tampões foram preparados em faixas de pH de 2,5 a 8,0. As cinéticas de lacases e peroxidases foram realizadas utilizando-se a metodologia tradicional de quantificação.

3.7.2 Temperatura ótima de lacases e peroxidases

Os testes de temperatura de reação foram conduzidos com o tampão que proporcionou maior atividade enzimática no teste de pH de reação. As temperaturas de reação testadas foram 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As cinéticas de lacases e peroxidases foram realizadas utilizando-se a metodologia tradicional de quantificação, variando-se as temperaturas já especificadas.

3.7.3 Termoestabilidade da atividade de lacases e peroxidases

Os testes de termoestabilidade enzimática de lacases e peroxidases foram realizados em temperaturas de 20, 30, 40, 50 e 60 °C, empregando o tampão que proporcionou maior atividade enzimática no teste de pH de reação, durante 72 h de incubação, sendo coletas realizadas em 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h de incubação. As cinéticas de lacases e peroxidases foram realizadas utilizando-se a metodologia tradicional de quantificação, variando-se as temperaturas já especificadas.

3.7.4 Zimograma de lacases

Os extratos brutos de cada pico enzimático dos ensaios realizados foram submetidos a um zimograma de lacases, submetendo 100 µL de cada amostra a um gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O SDS-PAGE foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Após a remoção do SDS por lavagem do gel em temperatura ambiente em solução A (Triton X100® 2,5%) e solução B (tampão acetato de sódio, pH 5,0) por 10 min cada uma, a revelação do gel foi realizada de acordo com Yaver *et*

al. (1996), na qual o gel foi transferido para uma placa de vidro contendo uma camada de ABTS-ágar (0,02 g de ABTS, 0,4 g de ágar, 40 mL de água aquecida até dissolver ágar).

3.7.5 Zimograma nativo de lacases

O gel nativo de lacases foi preparado seguindo também o protocolo de Laemmli (1970), no entanto, na ausência de SDS. O tampão de corrida também não possuía SDS. Uma quantidade de 15 µL de amostra concentrada foi aplicada em cada *lane*. Para revelação, o gel foi primeiro lavado com 100 mmol/L de tampão acetato de sódio (100 mmol/L), pH 4,5 durante 10 min. Subsequentemente, o gel foi incubado numa solução de 5 mmol/L ABTS em 100 mmol/L de tampão de acetato de sódio, pH 4,5, até as bandas serem visualizadas. A atividade da lacase também foi monitorizada utilizando uma solução de 5 mmol/L de 2,6-dimetoxifenol (DMP).

3.8 Cálculos dos fatores de rendimento e produtividade

3.8.1 Fator de rendimento de substrato em biomassa

O fator de rendimento em biomassa foi calculada pela Equação 1:

$$Y_{X/S} = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$Y_{X/S}$ = fator de rendimento de substrato em biomassa (g/g)

X_f = concentração final de biomassa (g/L)

X_i = concentração inicial de biomassa (g/L)

S_i = substrato inicial (concentração inicial da fonte de carbono – g/L)

S_f = substrato final (concentração final da fonte de carbono – g/L)

3.8.2 Fator de rendimento de substrato em atividade de lacases

O fator de rendimento de substrato em lacases foi calculada pela Equação 2:

$$Y_{E/S} = (E_f - E_i) / (S_i - S_f) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$Y_{E/S}$ = fator de rendimento de substrato em enzima (U/g)

E_f = atividade enzimática final (U/L)

E_i = atividade enzimática inicial (U/L)

S_i = substrato inicial (concentração inicial da fonte de carbono – g/L)

S_f = substrato final (concentração final da fonte de carbono – g/L)

3.8.3 Produtividade celular

A produtividade em biomassa celular foi calculada pela Equação 3:

$$P_X = (X_f - X_i) / t \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

P_X = produtividade volumétrica celular (g/L/h)

X_f = concentração celular final (g/L)

X_i = concentração celular inicial (g/L)

t = tempo de cultivo (h)

3.8.4 Produtividade enzimática

A produtividade enzimática de lacases foi calculada pela Equação 4:

$$P_E = (E_f - E_i) / t \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

P_E = produtividade volumétrica de lacase (U/mL/h)

E_f = atividade enzimática final (U/mL)

E_i = atividade enzimática inicial (U/mL)

t = tempo de cultivo (h)

3.8.5 Cálculo da atividade específica de lacases

A atividade específica de lacases com relação à concentração de proteínas solúveis totais foi calculada pela Equação 5:

$$AE_{Lac} = U / [PST] \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

AE_{Lac} = atividade específica de lacases (U/mg)

U = unidades enzimáticas de lacases (U/L)

[PST] = concentração de proteínas solúveis totais (mg/L)

A atividade específica de lacases com relação à concentração celular foi calculada pela Equação 6:

$$AE_{Lac} = U / [X_m]$$

Equação 6

Onde:

AE_{Lac} = atividade específica de lacases (U/g)

U = unidades enzimáticas de lacases (U/L)

$[X_m]$ = concentração celular máxima (g/L)

Neste cálculo foi considerado o valor máximo de cada variável.

3.9 SDS-PAGE de proteínas totais

O secretoma de *M. palmivorus* VE111 obtido a partir da otimização das condições do meio de cultivo foi submetido à análise do perfil proteico.

Para a determinação da massa molecular das proteínas presentes no secretoma de *M. palmivorus* VE111 foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% (m/v) de SDS. O gel empilhador foi preparado a 4% (m/v) enquanto o gel separador a 12% (m/v), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Após a padronização da amostra, 15 µL de amostra (~ 16,7 µg de proteína) e 5 µL de tampão de carga foram aplicados a cada *lane* do gel. A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *Bio Rad Mini Protean System Cell* a 110 V durante aproximadamente uma hora. A revelação da banda de gel foi realizada incubando o gel durante 30 min numa solução de 0,2% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue* G250, 50% (v/v) de água destilada, 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) ácido acético. Depois, o gel foi lavado com água destilada e imerso numa solução aquosa a 60% (v/v), 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 30 min. Todo o processo de revelação foi realizado sob agitação recíproca, até que as bandas fossem visualizadas

3.10 Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massa

Após as amostras serem quantificadas por Bradford e o gel de SDS-PAGE realizado, a amostra de *M. palmivorus* VE111 foi submetida à análise proteômica. Duplicatas foram aplicadas a cada *lane* de um novo gel SDS-PAGE (4% de gel empilhador e 10% de gel separador). A corrida eletroforética foi interrompida quando as amostras entraram cerca de 1 cm no gel de separação. Em seguida, as bandas de cada *lane* foram submetidas aos demais passos do protocolo proteômico. O processo de digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas foi realizado em duas etapas. Primeiro, as bandas de gel foram cortadas em fragmentos com cerca de 1x1 mm e transferidos a tubos eppendorf de 0,5 a 1,5 mL. Para remover o SDS, os fragmentos de bandas foram lavados com 150 µL de água ultrapura por 5 min. Os tubos foram então centrifugados e o líquido removido. Em seguida os fragmentos foram desidratados com 150 µL de acetonitrila (ACN) 100% em bicarbonato de amônio 50 mmol/L e os tubos foram incubados por 15 min em temperatura ambiente. O líquido foi removido após centrifugação, com o restante de ACN evaporado em *speed vac* à temperatura ambiente durante 10 min.

- **Redução.** Os fragmentos de bandas foram então reduzidos com 150 µL de 10 mmol/L de ditioneína (DTT) em 50 mmol/L de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e incubados por 30 min a 56 °C. As amostras foram então centrifugadas para retirada do líquido. Em seguida, os fragmentos foram incubados novamente em 100 µL de ACN por 10 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação e remoção do líquido, o restante do ACN foi evaporado em *speed vac* por 10 min.

- **Alquilação.** Na sequência, os fragmentos de bandas foram alquilados com a adição de 150 µL de iodoacetamida (IAA) 55 mmol/L em NH_4HCO_3 50 mmol/L, incubado por 20 min minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Subsequentemente, a solução IAA foi removida. Em seguida, os fragmentos foram lavados com 150 µL de NH_4HCO_3 50 mmol/L por 10 min e a solução foi removida. Posteriormente, os fragmentos foram novamente desidratados com 100 µL de ACN, incubados por 5 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas, o líquido removido e o restante do ACN foi evaporado em *speed vac* por 10 min.

- **Digestão triptica.** A digestão triptica em gel foi realizada por adição de 100 µL de solução de 15 µg de tripsina PierceTM solubilizada em 285 µL de 50 mmol/L de bicarbonato de amônio gelado (a concentração final de tripsina foi de 12,5 ng/µL). As amostras permaneceram *overnight* a 37 °C.

- **Extração.** Após digestão com tripsina, a extração de peptídeo foi realizada em duas etapas. Primeiro, o sobrenadante resultante da digestão *overnight* com tripsina foi coletado em tubo específico de *ependorf* e reservado. A primeira extração foi realizada com 100 µL de ACN 100%, adicionados a cada tubo e colocados para agitar a 700 rpm por 15 min a 37 °C. Os tubos foram sonicados por 5 min, centrifugados por alguns segundos e o sobrenadante foi coletado e reservado junto com o sobrenadante da digestão *overnight*. Na segunda extração, 100 µL de 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionados aos fragmentos de gel digeridos, repetindo o primeiro procedimento de extração, reunindo o segundo sobrenadante com o primeiro extrato. Por fim, as amostras foram concentradas em *speed vac* de modo que aproximadamente 1 mL da amostra permanecesse. As amostras foram armazenadas a -20 °C até serem transferidas para espectrometria de massas.

3.11 Cromatografia em fase líquida e espectrometria de massas

Peptídeos foram submetidos a uma pré-coluna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific), e então eluídos em uma coluna Columna Acclaim PepMap 100 C18, diâmetro interno de 75 µm, 25 cm de comprimento, 3 µm de tamanho de partícula (Thermo Scientific) e separados usando um gradiente de 180 min (160 min a partir de 0% -35% de tampão A; 10 min de 35% -100% de tampão B; 10 min de 100% de tampão B (tampão A: 0,1% (v/v) ácido fórmico, 2% (v/v) de ACN e tampão B: 0,1% (v/v) ácido fórmico em ACN) a um fluxo de 250 nL/min em HPLC nanoEasy (Proxeon) acoplada a uma nanoeletrovaporização (Thermo Scientific). Os espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Scientific) em íon positivo. Os espectros MS de varredura completa (m/z 400-15000) foram adquiridos no Orbitrap em uma resolução de 60 000 e os 15 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação induzida por colisão (CID) em armadilha de íons lineares com uma energia de colisão normalizada de 35%. Os íons carregados individualmente e os estados de carga não atribuídos foram rejeitados. A exclusão dinâmica foi ativada com duração de exclusão de 45 s (Fernández-Fueyo *et al.*, 2016).

3.12 Análise de dados dos espectros de massa

Os arquivos de espectro de massa *.raw foram pesquisados contra o banco de dados Uniprot Basidiomycota (1904909 sequências de entradas de proteínas), usando o mecanismo de busca Sequest através do Proteome Discoverer (versão 1.4.1.14) (Thermo Scientific). Os parâmetros de pesquisa incluíram um máximo de duas clivagens perdidas permitidas,

carbamidometilação de cisteínas como uma modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância da massa precursora e do fragmento foi ajustada para 10 ppm e 0,5 Da, respectivamente. Os peptídeos identificados foram validados usando o algoritmo Percolator com um limiar de valor-q de 0,01.

3.13 Resíduos de madeira de *E. globulus*

A madeira de *E. globulus* foi adquirida da Flosul Madeiras, cidade de Capivari, Rio Grande do Sul, Brasil. Para este trabalho, foram utilizados cavacos de *E. globulus in natura* (tronco e casca picados) e a biomassa pré-tratada por explosão a vapor. O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado pela America Biomass Technologies, Piracicaba, Brasil, por meio de uma reação de 17,5 kgf/cm², 205 °C, por 10 min. Após o pré-tratamento, a biomassa seca pré-tratada (parte sólida) foi separada do líquido livre produzido durante o processo. A biomassa, após secagem em temperatura de 65 °C e umidade inferior a 10%, foi utilizada para os estudos enzimáticos deste estudo, junto com a madeira *in natura*. Para os estudos de caracterização, ambos *E. globulus in natura* e pré-tratados por explosão a vapor foram moídos em um triturador de alimentos e passados por uma peneira de 40 mesh.

3.14 Detoxificação enzimática de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor

O efeito do caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 sobre os compostos fenólicos presentes na biomassa de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor foi analisado, conforme Jurado *et al.* (2009), com modificações. A reação de detoxificação foi realizada em tubos de 50 mL contendo 5% (m/v) de biomassa seca, 50 U/g de lacase por grama de biomassa seca e 0,05 mol/L de tampão citrato de sódio, pH 4,8. A reação foi conduzida em agitador a 50 °C, 180 rpm, durante 6 h. Em seguida, o conteúdo da reação foi centrifugado e o sobrenadante coletado para análise de compostos fenólicos totais e cromatografia de exclusão molecular. O experimento foi realizado em triplicata e uma condição de controle (sem enzima) foi mantida.

3.15 Determinação de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos livres foi quantificado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu com adaptações (Singleton & Rossi, 1965). Uma alíquota de 20 µL de amostras foi adicionada a 80 µL de carbonato de sódio (0,7 mol/L) e 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (0,2 mol/L), mantendo a reação no escuro, à temperatura ambiente, por 10 min. A absorbância foi medida a 655 nm em espectrômetro. Os resultados foram expressos em

gramas de equivalentes de ácido gálico por litro de fase líquida. A análise foi realizada em triplicata.

3.16 Cromatografia de exclusão molecular

Mudanças na distribuição da massa molecular de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor após tratamento com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 foram analisadas por filtração em gel (Jurado *et al.*, 2009). Condição controle incubada (sem tratamento com lacase) também foi analisada. As amostras (1 mL) foram filtradas e 200 µL foram injetados numa coluna Superdex-75 equilibrada com NaOH 0,05 mol/L, LiCl 0,025 mol/L. O fluxo foi ajustado para 0,5 mL/min e as medidas espectrofotométricas foram realizadas a 280 nm.

3.17 Deslignificação enzimática de *E. globulus* in natura

E. globulus in natura foi tratado com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 conforme proposto por Rico *et al.* (2014), com modificações. As aparas de madeira de eucalipto foram moídas em um triturador de alimentos e passaram por uma peneira de 40 mesh. O experimento foi realizado em duplicata em frascos Duran de 1 L, utilizando-se 5 g de biomassa de eucalipto, carga enzimática de 50 U/g de biomassa seca, em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8). A reação foi incubada num agitador a 40 °C, a 150 rpm, sob O₂ atmosférico (2 bars) durante 12 h. Condição controle sem adição de enzimas foi realizada também em duplicado. Após o tratamento, as amostras foram filtradas através de um funil de Büchner e lavadas com 1 L de água. Na sequência, a parte sólida foi submetida a extração alcalina (NaOH), reforçada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), com 1% (v/v) de NaOH e 3% (v/v) de H₂O₂, a 80 °C em banho por 90 min, seguida de lavagem com água. Quatro tratamentos enzimáticos sucessivos seguidos de extração NaOH–H₂O₂ foram aplicados. O teor de lignina foi estimado por lignina Klason.

3.18 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D-RMN)

Amostras de *E. globulus in natura* não tratadas (controle) e tratadas com as enzimas foram submetidas à 2D-RMN. Os experimentos de 2D-RMN de Coerência Quântica Heteronuclear Única (HSQC) foram realizados no estado de gel, que é uma análise *in situ* de toda a parede celular (Kim *et al.*, 2008; Rencoret *et al.*, 2009). Essa abordagem não requisitou isolamento prévio de lignina e evita possíveis alterações e perdas de material durante o processo

de isolamento. Uma quantidade igual a 75 mg de amostras moídas com esferas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm e embebidas em 0,7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO- d_6), formando um gel dentro do tubo (Rencoret *et al.*, 2009). Os espectros de 2D-RMN de HSQC foram registados a 300 K num espectrômetro Bruker AVANCE III 500 MHz (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) equipado com um gradiente de TCI de 5 mm CryoProbe com geometria inversa. Foi utilizada uma sequência de pulsos HSQC adiabática (padrão de Bruker “hsqcetgpsisp.2”), que possibilitou uma análise semiquantitativa dos diferentes sinais de correlação ^1H - ^{13}C (Kupče & Freeman, 2007). Os espectros de HSQC foram adquiridos de 10 a 0 ppm (5000 Hz) em F2 (^1H) usando 1000 pontos de dados para um tempo de aquisição (AQ) de 100 ms, um retardo entre varreduras (D1) de 1 s e de 200 a 0 ppm (25 168) em F1 (^{13}C) usando 256 incrementos de 32 varreduras, para um total de 2h34 min. O $^1J_{\text{CH}}$ utilizado foi de 145 Hz. Processamento usado foi uma apodização Gaussiana com correspondência típica em ^1H e um sino cosseno ao quadrado em ^{13}C . O pico central do solvente foi utilizado como referência interna ($\delta\text{C} / \delta\text{H}$ 39,5 / 2,49). Os sinais de correlação de lignina e carboidratos nos espectros do HSQC foram atribuídos por comparação com a literatura (Rencoret *et al.*, 2009). Os sinais de correlação de ^1H - ^{13}C da região aromática do espectro foram utilizados para estimar o teor de lignina (em relação ao teor de carboidratos amorfos, estimado a partir dos sinais anoméricos de xilose e glicose) e a composição de lignina em termos de unidades G e S. Os sinais de correlação $\text{C}_\alpha\text{-H}_\alpha$ na região oxigenada alifática foram usados para estimar a abundância das ligações inter-unidades de lignina ($\beta\text{-O-4}$ e $\beta\text{-}\beta$). Da mesma forma, os sinais $\text{S}_{2,6}$ e G_2 foram usados para estimar a abundâncias relativas das unidades aromáticas - como sinal $\text{S}_{2,6}$ envolve dois pares de próton-carbono, a integral de volume delas foi dividida ao meio.

3.19 Sacarificação enzimática de *E. globulus*

Tanto o *E. globulus in natura* quanto o pré-tratado por explosão vapor foram utilizados para a sacarificação enzimática. As reações foram realizadas em frascos Duran® de 50 mL contendo 5% (m/v) de biomassa seca em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8), conforme Menegol *et al.* (2014), com modificações. Para o eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, os experimentos foram realizados em triplicata a 50 °C por 72 h a 160 rpm. Com o objetivo de avaliar o efeito da adição do caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 no processo de sacarificação e, posteriormente, na fermentação etanólica, lacases foram adicionadas antes ou após a sacarificação. O tratamento com lacases foi conduzido por 6 h e a sacarificação por 72 h. Utilizou-se uma carga enzimática de 50 U de lacases e 30 U de celulasas por grama de

biomassa seca. Condições de controle sem lacases (apenas tampão e celulasas) também foram empregadas. Para o eucalipto *in natura*, em que o tratamento enzimático com lacases já foi realizado como descrito na seção 3.16, a sequência foi dada com a sacarificação enzimática com celulasas 30 U/g de biomassa seca. A mesma sacarificação foi realizada para a condição controle (sem tratamento com lacase) e tratamento (com lacase). A sacarificação foi realizada durante 72 h, centrifugada e o sobrenadante coletado para análise de açúcares e reservado para fermentação etanólica. A análise de açúcares por HPLC foi realizada com um sistema de cromatografia LC-20AD Shimadzu, desgaseificador de fase móvel DGU-14A, forno de coluna CTO-20A e detector RID-10A para o índice de refração, bem como detector de arranjo fotodiodo SPD-20A para espectrofotometria ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad®) a 60 °C, precedida por Cation-H pré-coluna e eluída com 5 mmol/L de fase móvel H₂SO₄ e vazão de 0,6 mL/min.

O rendimento de glicose e xilose foi calculado de acordo com as Equações a seguir (7 e 8), respectivamente:

$$Y_G (\%) = (g / ((gWIS / 100) \times SL)) \times 100 \quad \textbf{Equação 7}$$

$$Y_X (\%) = (x / ((xWIS / 100) \times SL)) \times 100 \quad \textbf{Equação 8}$$

onde Y_G e Y_X são, respectivamente, o rendimento de glicose e xilose expresso em % em relação a gramas de glicose e xilose liberada após hidrólise enzimática por 100 g de glicose e xilose presentes nos sólidos insolúveis em água (WIS); g e x (concentração de glicose e xilose após hidrólise enzimática, em g/L); $gWIS$ e $xWIS$ (teor de glicose e xilose no WIS, em %, após a caracterização da biomassa); SL (carga de sólidos, em g/L).

3.20 Fermentação etanólica e densidade celular

Açúcares liberados de *E. globulus* foram fermentados em etanol usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, com 10% (m/v) de células viáveis, coradas com azul de metileno, após 24 h de inóculo. A levedura usada aqui apenas fermenta glicose. A hidrólise enzimática e a fermentação foram realizadas separadamente. Os experimentos foram realizados em tubo de 5 mL com 4 mL de volume total de reação, compreendendo 3,2 mL de hidrolisado, 0,4 mL de inóculo de levedura e 0,2 mL de uma suplementação de extrato de levedura (Prodex®) e (NH₄)₂SO₄ para obter uma concentração final de 4 mg/mL 1 mg/mL. A fermentação etanólica

foi realizada a 28 °C, sob condições estáticas. Amostras foram coletadas para determinar o consumo de glicose e a produção de etanol em HPLC. O rendimento de etanol foi calculado de acordo com as duas consecutivas Equações (9 e 10):

$$Y_{E/G} \text{ (g/g)} = (E_f - E_i) / (G_i - G_f) \quad \text{Equação 9}$$

$$Y_E \text{ (\%)} = (Y_{E/G} / f_{\text{etanol}}) \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

onde $Y_{E/G}$ é a razão do rendimento do produto (etanol) em relação ao substrato (glicose) referente a gramas de etanol por g de glicose presente em WIS; E_f (etanol final); E_i (etanol inicial); G_f (glicose final); G_i (glicose final); Y_E (rendimento de etanol expresso como % do rendimento teórico máximo de etanol); f_{etanol} (fator de conversão estequiométrico de etanol - 0,511 g de etanol por g de glicose).

A densidade celular de *S. cerevisiae* CAT-1 após 24 h de fermentação foi medida em espectrofotômetro a 600 nm.

3.21 Caracterização de *Eucalyptus globulus*

A biomassa de *E. globulus* foi caracterizada antes e após a hidrólise enzimática. Antes da hidrólise enzimática, ambas biomassas *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor foram caracterizadas quanto ao teor de cinzas, proteínas, carboidratos estruturais e lignina insolúvel em ácido. A quantidade de extraíveis foi determinada somente para a biomassa pré-tratada. Após a hidrólise enzimática, o material foi caracterizado por alterações nos carboidratos e na lignina.

- **Extraíveis.** A quantificação dos extraíveis presentes na biomassa de *E. globulus* foi realizada de acordo com a metodologia do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL-TP-510-42619), com modificações. Dois gramas de *E. globulus in natura* foram submetidos a um processo de extração em aparelho Tecnal TE-044-8/50, utilizando como solvente 95% de etanol (~ 100 °C, por 8 h), seguido de extração com água quente (~ 100 °C, por 8 h). Após extração, o solvente foi recuperado e o resíduo foi seco num frasco de vidro. Por diferença de massa, a porcentagem do extrato foi obtida em relação à massa seca do material originalmente utilizado no ensaio.

- **Cinzas.** A determinação de cinzas foi realizada por gravimetria, de acordo com a metodologia NREL-TP-510-42621, com modificações. Uma quantidade igual a 300 mg de biomassa de *E. globulus* foi calcinada em estufa a 550 °C por 4 h.

- **Proteínas.** O teor de proteínas foi determinada com 200 mg de *E. globulus* seco, tanto *in natura* quanto pré-tratado, pela quantificação do nitrogênio total pelo método de Dumas (1826) e Buckee (1994). A amostra foi incinerada a uma temperatura de cerca de 1000 °C. Para a análise, foi utilizado um analisador LECO TruMac (Leco Instruments). Para determinar a quantidade de proteína nas amostras de *E. globulus*, utilizou-se um fator de conversão proteico igual a 6,25.

- **Carboidratos e lignina.** A composição química de *E. globulus in natura* e pré-tratado foi realizado de acordo com a metodologia NREL-TP-510-42618, por lignina Klason. Uma quantidade igual a 300 mg de amostra foi tratada com 3 mL de H₂SO₄ 72% (v/v) a 30 °C por 1 h. A mistura foi então diluída com água para uma concentração de H₂SO₄ final igual a 4% (v/v) e suspensão autoclavada a 121 °C por 1 h para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Subsequentemente, a mistura foi filtrada através de cadinho de Gooch, porosidade 2 (30 mL). O resíduo sólido foi lavado com água morna e colocado para secar em estufa a temperatura constante e a porcentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa da amostra seca. O filtrado foi coletado, filtrado novamente através de uma membrana de nylon de 20 µm e submetido à HPLC.

3.22 *Grafting* enzimático

3.22.1 Remoção de extraíveis da madeira

As chapas de madeira de *E. globulus* para os ensaios de *grafting* enzimático foram fornecidas pela empresa galega FINSA (Financiera Maderera AS, Galícia, Espanha). As chapas foram cortadas em pedaços de 2 cm × 5 cm com 0,5 mm de espessura e submetida a extração com solvente em extrator Soxhlet (Afora, extrato de 50 mL, refrigerador Dimroth, balão de 100 mL) por 8 h, utilizando acetona, conforme metodologia descrita no TAPPI-280. Em seguida, realizou-se uma segunda extração com água a 100 °C por 1 h. Na sequência, as chapas de madeira foram secos em estufa a 50 °C *overnight* e, posteriormente, pesadas. A massa média das chapas de madeira após a extração foi de $0,296 \pm 0,006$ g.

3.22.2 Ensaios de consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido para acompanhar a oxidação dos diferentes substratos e mediadores. Nesses ensaios, três substratos foram utilizados para verificar o potencial de oxidação das lacases de *M. palmivorus* VE111: octil galato (octil 3,4,5-tri-hidrobenzoato), lauril galato (dodecil 3,4,5-tri-hidrobenzoato) e octilamina (1-octilamina). Adicionalmente, dois compostos fenólicos foram usados como mediadores: catecol (benzeno-1,2-diol) e guaiacol (2-metoxifenol). Um ensaio controle de lacase em contato com a chapa de madeira de eucalipto foi realizado.

O consumo de oxigênio foi medido em oxímetro Accumet 600XL (Fisher Scientific), associado a uma sonda de oxigênio (Fisher Scientific, 13-620-SSP) e *software* de aquisição de dados em tempo real (AccumetComm). O teste de consumo de oxigênio foi realizado em tubos Falcon de 50 mL, a 40 °C, com uma mistura líquida composta por citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,0), 30% de etanol, 5 mmol/L de substrato e/ou 1 mmol/L de mediador e 100 U de lacase de *M. palmivorus* VE111.

3.22.3 Hidrofobização da madeira de *E. globulus* por tratamento enzimático

A hidrofobização da madeira de *E. globulus* por meio de tratamento enzimático seguiu a metodologia proposta por Fernández-Fernández *et al.* (2015), com modificações. As chapas de madeira foram imersas em cristalizadores de vidro com a mistura líquida descrita na seção 3.22.2. Os substratos e mediadores foram os mesmos descritos na seção anterior. Diferentes doses de lacase por grama de madeira foram utilizadas (20 U/g, 50 U/g e 100 U/g). Quatro diferentes condições controle foram estabelecidas: **controle 1** (somente tampão, sem substrato, mediador ou enzima), **controle 2** (tampão e enzima, sem adição de substrato ou mediador), **controle 3** (tampão e substrato, sem adição de enzima ou mediador) e **controle 4** (tampão, substrato e mediador, sem adição de enzima). O volume total da reação foi de 50 mL. A reação foi incubada a 40 °C, durante 2 h, num agitador orbital a 75 rpm. Após tratamento enzimático, os pedaços de madeira foram lavados como descrito na seção 3.22.1 e secos à temperatura ambiente *overnight*. A etapa de lavagem foi realizada para remover o octil galato, o lauril galato e a octilamina que não estavam estavelmente ligados à madeira.

3.22.4 Ângulo de contato da água

A hidrofobicidade das chapas de eucalipto após o tratamento enzimático foi avaliada conforme Filgueira *et al.* (2017), medindo-se o ângulo de contato da água na madeira com o auxílio de um goniômetro MobileDrop GH11 (KRÜSS) durante 2 min após o depósito de uma gota de água destilada. A forma da gota foi analisada usando o software DSA2 (KRÜSS).

3.22.5 Absorção de água

Após a medição do ângulo de contato com a água, as amostras foram completamente secas *overnight* a 50 °C em estufa. Para calcular a absorção de água pelas chapas de eucalipto, as amostras secas foram imersas em 50 mL de água destilada em um tubo Falcon (Filgueira *et al.*, 2017). O peso das chapas de eucalipto foi calculado antes da imersão e a cada 30 min até 3 h de imersão, a cada 1 h até 8 h e, finalmente, após 24 h de imersão. A absorção de água pelas chapas de eucalipto (em % de peso) foi calculada como a porcentagem da massa seca inicial seguindo a Equação:

$$\text{Absorção de água (\%)} = (W_i - W_0 / W_0) \times 100$$

Equação 11

onde W_0 refere-se à massa inicial das chapas secas de eucalipto e W_i à massa das chapas de eucalipto após imersão em água.

3.23 Análise dos dados

Análise dos dados foram realizados no *software* PrismGraphPad (versão 5.0) e Microsoft Excel (versão 2010). Os resultados foram analisados pela variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ou pós-teste de Dunnett para $p = 0,05$, Teste-t (*Student's test*) para $p = 0,05$ e coeficiente de correlação de Pearson. O planejamento experimental foi realizado no *software* Statistica 8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados da produção de enzimas ligninolíticas e proteômica de *Marasmiellus palmivorus* VE111 e aplicação do secretoma em tecnologias de *grafting* enzimático e etanol de segunda geração. Os seguintes resultados e discussões foram organizados em quatro capítulos, os quais representam artigos publicados e submetidos a periódicos internacionais (formatados conforme normas dos periódicos).

1. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources

Willian Daniel Hahn Schneider, Roselei Claudete Fontana, Simone Mendonça, Félix Gonçalves de Siqueira, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola – **Artigo original publicado no periódico Process Biochemistry**

2. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers

Willian Daniel Hahn Schneider, Paula Cavion Costa, Roselei Claudete Fontana, Félix Gonçalves de Siqueira, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola – **Artigo original publicado no periódico Journal of Biotechnology**

3. Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing enzymes to enhance second-generation ethanol yield

Willian Daniel Hahn Schneider, Roselei Claudete Fontana, Henrique Macedo Baudel, Félix Gonçalves de Siqueira, Jorge Rencoret, Ana Gutiérrez, Laura Isabel de Eugenio, Alicia Prieto, María Jesús Martínez, Ángel T. Martínez, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola – **Artigo original submetido ao periódico Applied Energy**

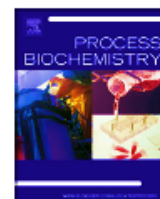
3. A sustainable approach of enzymatic grafting on *Eucalyptus globulus* wood by laccase from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111

Willian Daniel Hahn Schneider, Cristian Bolaño Losada, Diego Moldes, Roselei Claudete Fontana, Félix Gonçalves de Siqueira, Alicia Prieto, María Jesús Martínez, Ángel T. Martínez, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola – **Artigo original publicado no periódico ACS Sustainable Chemistry and Engineering**



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources



Willian Daniel Hahn Schneider^{a,*}, Roselei Claudete Fontana^a, Simone Mendonça^b,
Félix Gonçalves de Siqueira^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^a

^a Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, Petrópolis, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^b Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Ligninolytic enzymes
Bioreactor
Submerged cultivation
Experimental design
Biorefinery

ABSTRACT

The present work was carried out to determine the best sources and concentrations of carbon and nitrogen in the production of laccases, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111. Among the carbon and nitrogen sources used, the combination of glucose and casein led to higher production of laccases (5134 U/mL), total peroxidases (187 U/mL) and manganese peroxidase (57 U/mL). Central composite rotatable design (CCRD) was used to determine the optimum concentrations of glucose and casein to produce enzymes. The experiments with better results were scaled up in a 5 L bioreactor. It was verified that lower concentrations of glucose (5 and 10 g/L) stimulated higher activity of total peroxidases (1285 U/mL) and laccases (3420 U/mL), respectively, while a higher concentration of glucose (30 g/L) favoured the production of manganese peroxidase (59 U/mL). These data indicate high performance of *M. palmivorus* VE111 in the production of ligninolytic enzymes.

High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources

Willian Daniel Hahn Schneider^{a*}, Roselei Claudete Fontana^a, Simone Mendonça^b, Félix Gonçalves de Siqueira^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^a

^a*Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.*

^b*Embrapa Agroenergy, Parque Estação biológica, Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil.*

*corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2681

E-mail address: willianschneiderwhs@yahoo.com.br (W.D.H. Schneider)

Abstract

The present work was carried out to determine the best sources and concentrations of carbon and nitrogen in the production of laccases, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111. Among the carbon and nitrogen sources used, the combination of glucose and casein led to higher production of laccases (5134 U/mL), total peroxidases (187 U/mL) and manganese peroxidase (57 U/mL). Central composite rotatable design (CCRD) was used to determine the optimum concentrations of glucose and casein to produce enzymes. The experiments with better results were scaled up in a 5 L bioreactor. It was verified that lower concentrations of glucose (5 and 10 g/L) stimulated higher activity of total peroxidases (1285 U/mL) and laccases (3420 U/mL), respectively, while a higher concentration of glucose (30 g/L) favoured the production of manganese peroxidase (59 U/mL). These data indicate high performance of *M. palmivorus* VE111 in the production of ligninolytic enzymes.

Keywords

Ligninolytic enzymes; bioreactor; submerged cultivation; experimental design; biorefinery

1. Introduction

Lignocellulosic materials are composed of the polyphenol lignin and three polysaccharides: cellulose, hemicellulose and pectin [1]. White-rot fungi are microorganisms

known to be able to modify all plant components, including lignin and the polysaccharide block [2]. Ligninolytic fungus enzymes (i.e., laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase) have been applied recently in different biotechnological processes. Laccases, especially, have been employed in several areas such as bioremediation of recalcitrant aromatic compounds, treatment of effluents polluted with lignin, chemical synthesis, degradation of a wide number of textile dyes, biomass pretreatment for biofuel production [3], cellulose pulping, biosensor applications and the food and beverage industries [4].

Species of the genera *Phanerochaete*, *Pleurotus* and *Trametes* are the most studied white-rot fungi in this area [5]. One other species of the genus *Marasmiellus*, belonging to the family Marasmiaceae and order Agaricales, also has the potential to produce ligninolytic enzymes, mainly laccases, for degradation of lignocellulosic biomass, especially lignin [6–8]. *Marasmiellus palmivorus* is a species with potential production of ligninolytic enzymes. However, there are few studies in the literature regarding the production of ligninolytic enzymes by species of this genus [9–11].

The production of ligninolytic enzymes is influenced by several factors including the sources of carbon and nitrogen, growth conditions, addition of inducers, effects of aromatic compounds, aeration, temperature and pH. It is worth noting that the effect of these compounds depends not only on fungus physiology, but also on the composition of the cultivation medium [12]. Studies have investigated the effect of carbon and nitrogen sources on the production of enzymes by basidiomycetes, and have proved that both the nature and concentration of carbon and nitrogen sources play an important role in ligninolytic enzyme production [13–15]. Preliminary studies with *M. palmivorus* VE111, using glucose as a carbon source and in the absence of a nitrogen source, have shown promising results in the production of laccases. Other simple and cheap sources of carbon such as sucrose and glycerol, a by-product of the biodiesel industry, are examples of interest in the production of lignocellulolytic enzymes. In previous studies with other basidiomycete-producing laccases, it was found that laccase activities prove that the positive effect of additional nitrogen. Organic nitrogen sources such as peptone [13] and casein [16] are often cited in the literature as better laccase inducers when compared to inorganic nitrogen sources.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of different sources and concentrations of carbon and nitrogen on the secretion of ligninolytic enzymes from a newly isolated white-rot basidiomycete *M. palmivorus* VE111 in submerged cultivation both in shaken flasks and in a stirred-tank bioreactor.

2. Material and methods

2.1 Basidiomycete

The species *Marasmiellus palmivorus* VE111 was collected in Itapeva Park in the city of Torres, State of Rio Grande do Sul, Brazil, being found on a decomposing palm tree trunk. For the use of *M. palmivorus* VE111 in the study, special access authorization and shipment of samples of genetic heritage components (proceedings 02001.007656/2012-11) was obtained from the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA). The strain used in this work is linked to autochthonous macrofungi from Southern Brazil deposited in the mycological section of the Herbarium of the University of Caxias do Sul (HUCS/MIUCS) with duplicates deposited in the Alarich Schultz Herbarium (HAS) of the Zoobotanic Foundation of Rio Grande do Sul (FZB/RS). The strain of *M. palmivorus* VE111 (MIUCS 2025) belongs to the Collection of Microorganisms of the Laboratory of Enzymes and Biomass of the University of Caxias do Sul. The molecular identification of *M. palmivorus* VE111 was performed according to Cantele et al. [11]. *M. palmivorus* VE111 was grown on potato dextrose agar (PDA) (Kasvi®) maintenance medium in Petri dishes and kept in a germinating chamber with photoperiod (Oxylab) at 28 °C for seven days.

2.2 Enzyme production

2.2.1 Shaken flasks cultivation

The medium employed for enzyme production was composed of 2 g carbon source, 0.15 g nitrogen source, 5 mL mineral solution (20× concentration) described by Mandels and Reese [17] and potato broth (200 g of minced potatoes boiled in 1 L water) to complete the volume to 100 mL. The carbon sources tested were glucose (PA – Quimidrol®), sucrose (commercial) and glycerol (PA – Vetec®) and the nitrogen sources verified were peptone (Kasvi®) and pure casein (Synth®). The inoculum was performed by transferring three mycelial disks ($\varnothing = 1.5$ cm) from the Petri dishes to 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium. The experiment was carried out in a reciprocal agitation system at 180 rpm and kept at 28 °C. Shaken flasks cultivation was performed in triplicate; samples were taken at 96, 144, 192 and 240 h of cultivation.

2.2.2 Experimental design

After evaluating the optimal carbon and nitrogen sources for ligninolytic enzyme production by *M. palmivorus* VE111, an experimental design was conducted to evaluate the

optimal concentration of these sources for enzyme production (Table 1). The cultivation medium was composed of carbon and nitrogen sources chosen in concentrations indicated by a 2^2 factorial central composite rotatable design (CCRD), 5 mL mineral solution (20× concentration) described by Mandels and Reese [17] and potato broth to complete the volume to 100 mL; operation conditions were as described for shaken flasks cultivation.

Table 1

Values used in the CCRD¹, factorial 2^2 , performed to identify the most suitable concentrations of glucose and casein in Lac production in shaken flasks.

Casein in Lac production in shaken flasks.			
Limits	Variables		Results
Lower limit (-)			
Central point (0)			
Upper limit (+)			
Experiments	Glucose (g/L)	Casein (g/L)	Maximum Laccase Activity (U/mL) ²
1	12.91 (-1)	0.79 (-1)	3866
2	27.09 (+1)	0.79 (-1)	3490
3	12.91 (-1)	1.79 (+1)	6161
4	27.09 (+1)	1.79 (+1)	4548
5	10.00 (-1.41)	1.5 (0)	5525
6	30.00 (+1.41)	1.5 (0)	6818
7	20.00 (0)	0.5 (-1.41)	3285
8	20.00 (0)	2.5 (+1.41)	3739
9	20.00 (0)	1.5 (0)	3852
10	20.00 (0)	1.5 (0)	4134
11	20.00 (0)	1.5 (0)	3893

¹CCRD: Central Composite Rotatable Design

²The values of maximum laccases activities refer to 144 h (experiments 4, 5, 7 and 8) or 192 h of cultivation (1, 2, 3, 6, 9, 10 and 11).

2.2.3 Cultivation in a bioreactor

The best conditions obtained in the experimental design were chosen for batch cultivation in a stirred-tank bioreactor (New Brunswick, BioFlo[®]/CelliGen[®]115). Taking into account analysis of the experimental design, the experiments were scaled up in a bioreactor as follows: experiment 1 (5 g/L glucose and 1.8 g/L casein), experiment 2 (10 g/L glucose and 1.8

g/L casein), experiment 3 (20 g/L glucose and 1.5 g/L casein) and experiment 4 (30 g/L glucose and 1.5 g/L casein).

First, a pre-inoculum was performed as described in 2.2.1. After four days of pre-inoculum, 500 mL of pre-inoculum content was transferred to the bioreactor. Experiments were performed in a 5 L operating volume, at 28 °C, without pH control and dissolved oxygen not less than 30%. Samples were taken periodically for 168 h and were stored at 4 °C.

2.3 Mycelial growth, pH and consumption of carbon sources

The samples were centrifuged at $9600 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected for determination of pH, enzymatic activity and consumption of carbon sources. For consumption of carbon sources, samples were filtered (0.20 µm) and analysed using high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu), according to National Renewable Energy Laboratory (NREL) [18]. An Aminex HPX-87H column (Bio-Rad®) was used at 60 °C with a mobile phase of 5 mmol/L H₂SO₄ and flow rate of 0.6 mL/min. Mycelial mass was used for determination of growth, according to the method of Rapp et al. [19]. In Erlenmeyer flasks experiments, the whole contents were used for the determination of mycelial growth. After removal of the supernatant, the biomass was washed with distilled water (10 mL) and dried at 40 °C until constant weight was achieved. In bioreactor experiments, aliquots of 15 mL were collected, centrifuged and mycelial mass used for the determination of mycelial growth.

2.4 Enzymatic assays

2.4.1 Laccases (Lac)

Determination of Lac activity was performed by kinetic according to Wolfenden and Willson [20] by quantifying the product of the oxidation of 5 mmol/L 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS). In this reaction was used 0,2 mol/L of sodium acetate buffer pH 5,0. Lac activity was calculated according to Eq. (1):

$$U = (A \cdot D_f \cdot V_t \cdot 10^6 / \varepsilon \cdot V_s) / 1\,000 \quad (1)$$

where

U = enzyme activity (µmol/min/mL);

A = absorbance ($V_{\max} \rightarrow \min$);

D_f = dilution factor;

V_t = total volume of the reaction (mL);

10^6 = correction factor of ABTS (mol/L $\rightarrow$ μ mol/L);

ε = molar extinction coefficient (36 000 mol/L)

V_s = sample volume (mL).

1000 = transformation factor of U (L $\rightarrow$ mL)

2.4.2 Total peroxidases (Per)

Per activity were measured employing the same method as for Lac measurements, using 5 mmol/L ABTS as substrate, however with the addition of 2 mmol/L H_2O_2 in the reaction mixture [21]. The equation used to calculate Per activity was the same of Lac, being that the Per activity was subtracted from the activity detected for Lac.

2.4.3 Manganese peroxidase (MnP)

MnP activity was determined by the method proposed by Kuwahara et al. [22] using 3 mmol/L phenol red as substrate, 2 mmol/L $MnSO_4$, 2 mmol/L H_2O_2 , 250 mmol/L sodium lactate, 5 g/L bovine albumin, 20 mmol/L pH 4.5 sodium succinate buffer. The reaction was stopped by adding of 2 mol/L NaOH to the mixture. MnP activity was calculated according to Eq. (2):

$$U = A \cdot V_t \cdot 10^6 / \varepsilon \cdot V_s \quad (2)$$

where

U = enzyme activity (μ mol/min/mL);

A = absorbance;

V_t = total volume of the reaction (mL);

10^6 = correction factor of phenol red (mol/L $\rightarrow$ μ mol/L)

ε = molar extinction coefficient (44 600 mol/L)

V_s = sample volume (mL).

2.5. Determination of soluble protein concentration

Protein was determined by the Bradford [23] method using bovine serum albumin as the standard.

2.6 Yield factors, productivity, and specific activity

Calculations of yield factors, productivity, and specific activity were performed for experiments conducted in bioreactor. Were calculated the Lac substrate yield ($Y_{E/S}$), biomass substrate yield ($Y_{X/S}$), enzymatic productivity (P_E), cellular productivity (P_X), specific activity of Lac (SA_{Lac}) and specific activity of Lac in relation to biomass concentration.

2.7 Characterization of Lac

Since the enzymatic titles Lac were superior to Per and MnP, and standing out from the Lac values found in the literature, it was decided to characterize this enzyme. The enzyme extract that showed the highest enzymatic activity of Lac was used to characterize this enzyme in terms of optimum reaction pH, optimum reaction temperature, enzymatic thermostability and zymogram.

2.7.1 Optimum reaction pH

Evaluation of the effect of pH on Lac activity was carried out with sodium acetate buffer, sodium citrate and McIlvaine buffer (sodium phosphate/citric acid). These buffers were prepared at pH ranging from 3.0 to 8.0. The kinetics of Lac were determined using the method of quantification described in section 2.4.1.

2.7.2 Optimum reaction temperature

Reaction temperature tests were conducted with the buffer that provided greatest enzymatic activity in the reaction pH test. The reaction temperatures used were 20, 25, 30, 35 and 40 °C. The kinetics of Lac were determined using the method of quantification described in section 2.4.1, varying the temperature as already specified.

2.7.3 Thermostability of Lac

Tests of enzymatic thermostability of Lac were performed at temperatures of 20, 30, 40, 50 and 60 °C, using the buffer that provided the highest enzyme activity in the reaction pH test during 72 h of incubation, with samples taken at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h of incubation. The kinetics of Lac were determined using the method of quantification described in section 2.4.1.

2.7.4 Zymogram of Lac activity

The enzyme extract that showed the highest Lac activity in each of the experiments performed in the bioreactor was subjected to a Lac zymogram; 100 μ L of each sample was used in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed according to the methodology described by Laemmli [24]. After removal of the SDS gel by washing at room temperature in solution A (Triton X100[®] 2.5%) and solution B (sodium acetate buffer, pH 5.0) for 10 min each, the gel was visualized according to Yaver et al. [25]; the gel was transferred to a glass plate containing a layer of ABTS–agar (0.02 g ABTS, 0.4 g agar, 40 mL of water heated to dissolve the agar).

2.8 Statistical analysis

Data analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.0.1.334). The Pearson correlation coefficient was calculated using Microsoft Excel (version 2010) software. The results were analysed by ANOVA, Tukey's test and t-test at $p = 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of different carbon and nitrogen sources on Lac, Per and MnP production in shaken flasks

In order to evaluate the Lac production by *M. palmivorus* VE111 in response to different carbon and nitrogen sources, shaken flasks cultivation was performed. As shown in Fig. 1A, the medium prepared with glucose and casein afforded the highest Lac activity (5134 ± 246 U/mL) on the eighth day of cultivation. The Lac activity was significantly higher (4756 ± 519 U/mL) compared to growth on other media at 144 h of cultivation.

The production of Per (Fig. 1B) was also highest in the medium prepared with glucose and casein (187 ± 11 U/mL). The enzyme peak was obtained at 96 h; after that, the enzyme activity decreased gradually.

Peak MnP activity (Fig. 1C) was obtained at 96 h for all media tested and showed a decrease after peaking. Although the medium prepared with glucose and casein had the highest MnP activity (57 ± 0.84 U/mL), there were no statistical differences between that and the activity for the other media prepared with casein (with sucrose and glycerol as carbon source); there was, however, a statistical difference in activity for media prepared with peptone.

The pH increased gradually until 144 h of cultivation (Fig. 1D). It was observed that the pH did not show great fluctuation during cultivation, remaining in the range of 4.2 to 7.4. In the

media prepared with glucose and casein and sucrose and casein, after reaching the enzymatic peak of Lac on the eighth day of cultivation, there was a decrease in the production of the enzyme associated with a fall in pH. It is suggested that with the increase in mycelial growth, consumption of carbon and nitrogen sources and consumption of ammonia present in the mineral solution of the culture media in the form of ammonium sulfate the metabolism of the fungus eliminated H^+ to the medium [26], causing a decrease in pH and a consequent decrease in secretion of the enzyme as the production of this Lac can be sensitive to more acidic pHs.

M. palmivorus VE111 grew until the end of cultivation (Fig. 1E) because the employed carbon sources were not exhausted (Fig. 1F). The greatest mycelial growth was found in the medium prepared with sucrose and casein (12.2 g/L), followed by the media prepared with glycerol and casein and glucose and casein. It is notable that the culture media that provided higher mycelial growth are related to higher enzymatic activity. However, this does not mean that the culture medium that provided the greatest growth is also related to the highest enzymatic production of Lac, since the medium prepared with sucrose and casein reached the highest mycelial growth but not the highest Lac enzymatic titre.

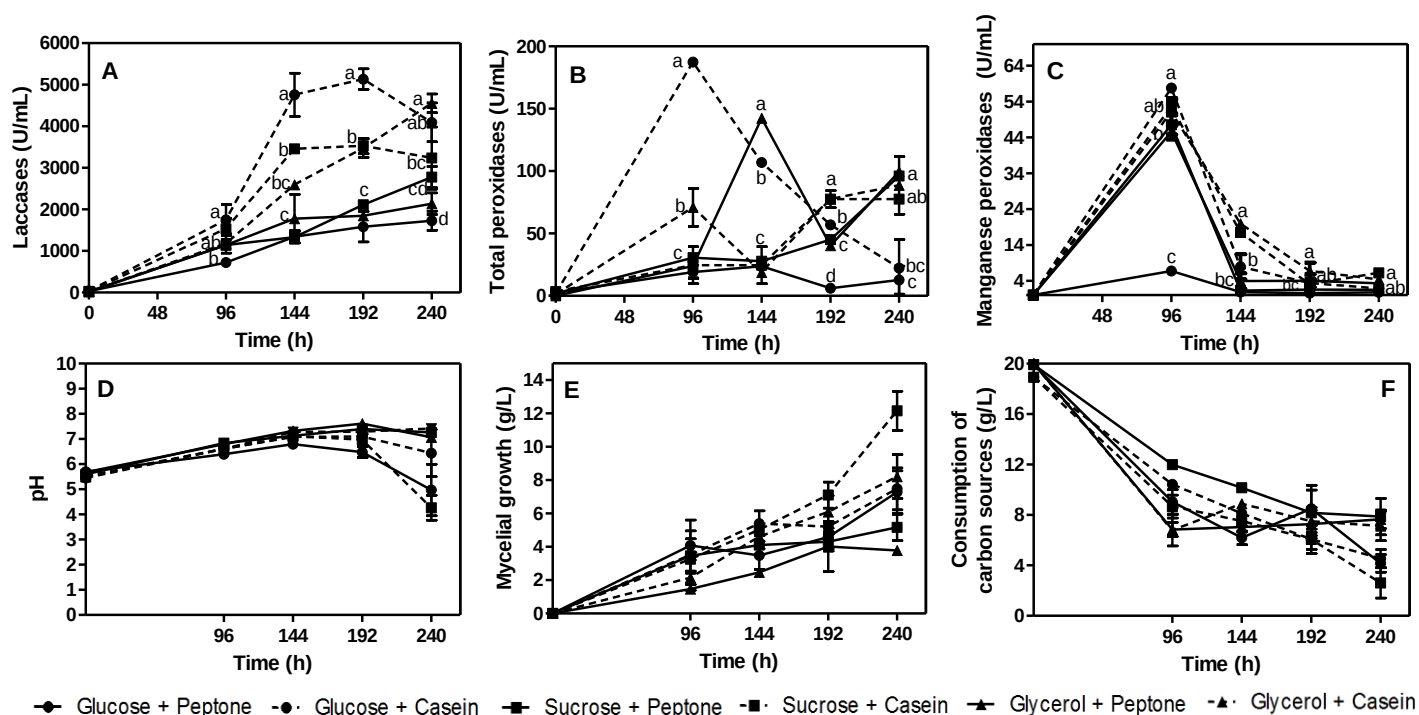


Fig. 1. Kinetic growth and enzymatic production of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks. Laccases (A), total peroxidases (B), manganese peroxidase (C), pH variations (D), mycelial growth (E) and consumption of carbon sources (F).

Several studies have investigated the effect of carbon and nitrogen sources on the production of ligninolytic enzymes by basidiomycetes (Table 2) and they have proved that both natural and concentrated carbon and nitrogen sources are powerful nutrition factors regulating ligninolytic enzyme production by wood-rotting basidiomycetes [4,13].

Concerning the effect of carbon sources, Mansur et al. [27] showed that the use of fructose instead of glucose resulted in an increase in the Lac activity of basidiomycetes. In contrast, Galhaup et al. [28] found that glucose and cellobiose were efficiently and rapidly utilized by *Trametes pubescens*, resulting in high Lac activity (Table 2). Similarly, the replacement of cellulose or xylan by cellobiose increased the Lac activity of *Cerrena unicolor* 21- and 70-fold, respectively [29]. Stajić et al. [30] also observed, among only simple carbon sources, highest Lac activity in the presence of mannitol, glucose and sodium gluconate in two strains of *Pleurotus ostreatus*.

Nitrogen source plays a key role in fungal growth and Lac production. It is commonly believed that inorganic nitrogen sources lead to low Lac yields despite sufficient biomass, whereas organic nitrogen sources render high Lac yields with good fungal growth [31].

All carbon sources tested in this study – glucose, sucrose and glycerol – as well as the nitrogen sources – peptone and pure casein – were efficient in the production of Lac, Per and MnP. However, the combination of glucose and casein as carbon and nitrogen sources, respectively, provided the highest enzymatic titres of the enzymes studied.

It is important to note that enzyme production by *M. palmivorus* VE111 was tested in the absence of potato broth; fungal growth was approximately two-thirds lower (Supplementary Data 1A) and enzymatic production was dramatically reduced to levels below 100 U/mL of Lac (Supplementary Data 1B). It is suggested that the potato broth medium functions as an inducing medium of the enzymes studied, since it is rich in carbohydrates, proteins and amino acids, vitamins and minerals, among other compounds, which help fungal growth and, consequently, the secretion of enzymes.

As shown in Table 2, the enzymatic activity of Lac obtained in this study is higher than all those found in the literature, including recent works with *M. palmivorus* LA1 [10] and with the same strain *M. palmivorus* VE111 [11]. Exceptions are the studies of Zhu et al. [15] and Kandasamy et al. [4] which used higher concentrations of carbon and nitrogen sources than the present study. In addition, they employed inducers, which have not been tested so far, and the enzymatic Lac peak occurred later (312 h) than in this study (192 h). This study is advantageous since *M. palmivorus* VE111 also produced higher Per and MnP titres than other works (Table

2), indicating that many of the studied basidiomycetes listed in the table produce Lac but are deficient in the production of these other enzymes.

Table 2

Literature comparison of ligninolytic enzymes production by basidiomycetes species in response to different carbon and nitrogen sources.

Reference	Basidiomycete	Carbon source/ Concentration	Nitrogen source/ Concentration	Inducer/ Concentration	Cultivation	Maximum Lac activity/ Substrate/ Cultivation time	Maximum Per activity/ Cultivation time	Maximum MnP activity/ Cultivation time
[29]	<i>Cerrena unicolor</i> IBB 62	Cellobiose (10 g/L)	Yeast extract (2 g/L) + NH ₄ NO ₃ (2 g/L)	-	Shaken flasks (SmF ²)	153.5 nkat/mL (SYR ⁴) 120 – 192 h	-	-
[28]	<i>Trametes pubescens</i> MB 89	Glucose (40 g/L)+ 320 g/L (fed batch)	Peptone (10 g/L)	CuSO ₄ (2 mM)	Stirred-tank reactor 15 L (SmF)	743 U/mL (ABTS ⁵) 692 h	-	-
[46]	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> BRFM 137	Maltose (20 g/L)	-	Ethanol (35 g/L)	Shaken flasks (SmF)	266 U/mL (ABTS) 336 h	-	-
[34]	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME-446	GPSCL ¹ medium: Glucose (10 g/L) + Peptone (3 g/L) + Corn steep liquor (1 g/L) supplemented with wheat straw		-	Shaken flasks (SmF)	-	-	610 U/L 72 h
[47]	<i>Trametes versicolor</i> 775	Mandarin peel (40 g/L)	-	-	Shaken flasks (SmF)	5243 U/L (SYR) 120 h	95 U/L 192 h	54 U/L 192 h
		Grape vine sawdust (40 g/L)	-	-		261 U/L (SYR) 120 h	677 U/L 192 h	148 U/L 192 h
		Glucose (10 g/L)	Peptone (20 mM)	-		521 U/L (SYR) 192 h	69 U/L 192 h	33 U/L 192 h
[13]	<i>Pleurotus ostreatus</i> 98	Mandarin peel (40 g/L)	-	-	Shaken flasks (SmF)	2375 U/L (SYR) 120 h	32.4 U/L 192 h	18.6 U/L 192 h
		Glucose (10 g/L)	Peptone (30 mM)	-		443 U/L (SYR) 192 h	71.1 U/L 192 h	10.2 U/L 192 h
[30]	<i>Pleurotus eryngii</i> 616	Dry ground mandarine peels (20 g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (20 mM)	-	Shaken flasks (SmF)	246 U/L (SYR) 168 h	-	0.7 U/L 168 h
	<i>Pleurotus ostreatus</i> 493	Gravepine sawdust (40 g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM)	-	Static flasks (SSF ³)	445 U/L (SYR) 240 h	-	6.4 U/L 240 h
	<i>Pleurotus pulmonarius</i> 572	Gravepine sawdust (40 g/L)	NH ₄ Cl (30 mM)	-	Static flasks (SSF)	441 U/L (SYR) 240 h	-	41 U/L 240 h
[12]	<i>Ganoderma lucidum</i> 447	Wheat bran (50 g/L)	KNO ₃ (10 mM)	-	Shaken flasks (SmF)	110840 U/L (ABTS) 120 h	-	119 U/L 120 h
[39]	<i>Pleurotus ostreatus</i> ITCC 3308	Potato-dextrose medium	Yeast extract (5 g/L)	-	Bioreactor 3-L (SmF)	874 U/mL (ABTS)	-	-
[48]	<i>Lentinus strigosus</i> 1566	Glucose (20 g/L)	Yeast extract (5 g/L) + Peptone (5g/L)	2 mM CuSO ₄ + 2,6-dimethylphenol	Shaken flasks (SmF)	186 U/mL (ABTS) 408 h	-	-
[16]	<i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001	Fructose (5 g/L)	Pure casein (1.5 g/L)	-	Shaken flasks (SmF)	37 U/mL (ABTS) 168 h	-	-

[49]	<i>Ganoderma lucidum</i> 447	ethanol production starch free residue (50 g/L)		Cu ⁺² (3 mM)	Shaken flasks (SmF)	149.600 U/L (ABTS) 240 h	-	-
[50]	<i>Trametes versicolor</i> CICC 14001	Glucose (40 g/L)	corn steep liquor (20 g/L)	Vanillic acid + ferulic acid	Shaken flasks (SmF)	633 U/mL (CAT ⁶) 120 h	-	-
[49]	<i>Cerrena unicolor</i> C-139	Wheat bran (40 g/L) + glucose (5.5 g/L)	Peptone (2 g/L) + yeast extract (2 g/L)	CuSO ₄ (1mM)	Bioreactor 120-L (SmF)	416.4 U/mL (ABTS) 288 h	-	-
[40]	<i>Ganoderma lucidum</i> 77002	Wheat bran (30 g/L) + peanut powder (30 g/L)		-	Shaken flasks (SmF)	141.1 U/mL (ABTS) 144 h	-	-
[15]	<i>Pleurotus Ostreatus</i> (ACC 52857)	PDA medium without agar (220 g/L)	Yeast extract (10 g/L)	Cu ⁺² (2 mM)	Shaken flasks (SmF)	8533 U/mL (ABTS) 312 h	-	-
[14]	<i>Cerrena sp.</i> HYB07	Maltodextrin (60 g/L)	Peptone (10 g/L)	-	Shaken flasks (SmF)	280 U/mL (ABTS)	-	-
[4]	<i>Hexagonia hirta</i> MSF2	Glucose yeast extract (10,5 g/L)		2,5 Xylidine (1 mM)	Static flasks (SSC)	5671 U/mL (ABTS) 312 h	-	-
[10]	<i>Marasmiellus palmivorus</i> LA1	Pine apple leaf (40 g/L)		CuSO ₄ (3mM)	Static flasks (SSF)	667 U/mL (ABTS) 120 h	-	-
[11]	<i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111	Glucose (20 g/L) + potato medium (200 g/L)		-	Shaken flasks (SmF)	185 U/mL (ABTS) 192 h	-	-
					Bioreactor 5-L (SmF)	1950 (ABTS) 96 h	555 U/mL 168 h	52 U/mL 96 h
This work	<i>Marasmiellus palmivorus</i> VE111	Glucose (20g/L) + potato medium (200 g/L)	Pure casein (1.50 g/L)	-	Shaken flasks (SmF)	5134U/mL (ABTS) 192 h	187 U/mL 96 h	57 U/mL 96 h
		Glucose (5g/L) + potato medium (200 g/L)	Pure casein (1.80 g/L)	-	Bioreactor 5-L (SmF)	3219 U/mL (ABTS) 88 h	1285 U/mL 64 h	49 U/mL 88 h

¹GPCSL: Glucose–peptone–corn steep liquor; ²SmF: Submerged cultivation; ³SSF: Solid-state cultivation; ⁴SYR: Syringaldazine; ⁵ABTS: Azino-bis-(3-ethylthiazoline-6-sulfonate); ⁶CAT: Catechol

In most of the studies carried out, complex carbon sources generally provided greater enzymatic activity than simple carbon sources. This can be demonstrated by a study conducted by Mikiashvili et al. [13] with *P. ostreatus* species which showed that, of the simple carbon sources tested, glucose was the best carbon source for Lac production and xylan for MnP. However, when complex carbon sources such as grapevine sawdust and mandarin peel were used, the latter yielded a 40-fold increase in Lac production and a 5-fold increase in MnP production.

Regarding the nitrogen sources employed in previous studies (Table 2), organic nitrogen sources were highlighted in relation to inorganic sources, which is in agreement with this study. Mikiashvili et al. [13] verified that inorganic nitrogen sources decreased Lac, Per and MnP

production. Peptone, followed by casein hydrolysate, was demonstrated as the best nitrogen source for Lac production.

In the present study, although only simple carbon sources were tested for rapid assimilation by the fungus, glucose was also the source that provided highest Lac, Per and MnP activity. Many studies reporting higher Lac production used glucose as a carbon source instead of complex carbohydrate sources (Table 2). In a similar study, Yang et al. [14] cultivated *Cerrena* sp. strain HYBO7, verified that glucose slightly increased Lac yield whereas fructose and sucrose decreased Lac production; disaccharide maltose did not affect Lac yield and sucrose lowered it. Among all carbon sources tested, the lowest Lac activity was observed with glycerol. Galhaup et al. [28] observed that when using glycerol, which is consumed slightly more slowly than glucose, similar activity levels were obtained, albeit after a longer cultivation time, in agreement with these results (Fig. 1A).

In the present study, both nitrogen sources tested stimulated growth of *M. palmivorus* VE111, increasing the Lac activity circa 25-fold when compared with the control medium without any source of nitrogen in shaken flasks [11]. However, the use of pure casein was more promising for the production of Lac and other enzymes tested in this study, probably due to the presence of aromatic amino acids in the casein constitution, which acted as inducers for these enzymes, what is in agreement with the studies of Bettin et al. [16] which verified that casein provided higher Lac titres for *Pleurotus sajor-caju* when compared to other organic nitrogen sources.

3.2 Effect of different carbon and nitrogen concentration on Lac production in shaken flasks by experimental design

From the results in flasks, glucose and casein were demonstrated to be the best sources of carbon and nitrogen, respectively, to be employed in cultivations. According to the analysis of variance (ANOVA) of 95% ($p = 0.05$), the percentage variations are satisfactorily explained by the model with 80% of variation explained (R^2). Pareto chart (Supplementary Data 2), shows that quadratic term for glucose concentrations used in the experiments was significant. Casein concentrations were not significant, possibly because there was very little difference in the concentrations used to avoid making the cultivation medium more expensive.

The model with the encoded variables representing the enzymatic activity of Lac in U/mL according to the glucose and casein studied is shown below:

$$\text{Enzymatic activity of Lac: } 3961.68 + 1028.36 \text{ glucose}^2$$

In Table 1, the enzymatic activity of Lac is shown at 144 or 192 h of cultivation, when the enzyme peaks were recorded for each experiment. Experimental design points 3 (12.91 g/L of glucose and 1.79 g/L of casein), 5 (10 g/L glucose and 1.5 g/L casein) and 6 (30 g/L glucose and 1.50 g/L casein) produced the highest enzyme titres, reaching almost 7000 U/mL of Lac. The ideal conditions for optimum Lac production can be verified in the response surface plot (Fig. 2A); the axial points of the experimental design not the central point are associated with higher Lac production. Analysing the graph, a lower concentration of glucose (10 g/L) associated with an intermediate casein concentration (1.79 g/L) is shown to provide a higher Lac production. Observing the contour curve plot (Fig. 2B), it was also found that lower concentrations of glucose (< 10 g/L) were associated with even higher Lac activity, a condition not tested experimentally in the experimental design performed.

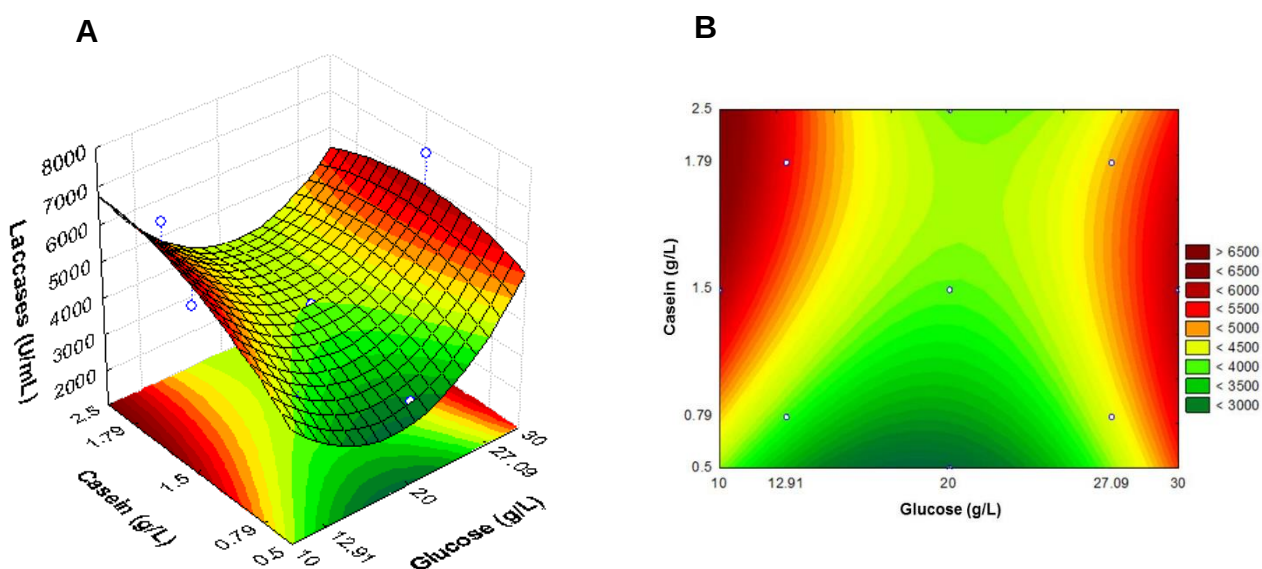


Fig. 2. Response surface plot (A) and contour curve plot (B) of laccase production as a function of glucose and casein concentration. Colour scale: green (< Lac activity) to dark red (> Lac activity).

Lac activity has also been shown to be dependent on the concentration and nature of carbon and nitrogen sources as well as on their ratio [31]. As far as carbon sources are concerned, it has been demonstrated that supplementation with substrates like glucose that are readily utilizable and efficiently metabolized by the microorganism results in high levels of Lac activity. As already verified in previous studies, when present in the culture medium above certain concentrations, glucose represses Lac synthesis in fungi [28]. High carbon levels (around 15 g/L) inhibit Lac transcription in basidiomycete I-62 and *Trametes* sp. AH28-2 [31].

According to Master and Field [32], ligninolytic enzymes are produced during secondary metabolism under conditions of limited nitrogen. However, in *P. ostreatus* a high concentration of nitrogen in the medium did not repress but rather slightly stimulated mineralization of lignin compared to an N-limited medium [30]. In the literature, there is contradictory evidence on the effects of nitrogen concentration on ligninolytic enzyme production. While high-nitrogen media gave the highest Lac activity in *Lentinula edodes*, *Rigidoporus lignosus* and *T. pubescens*, nitrogen-limited conditions enhanced enzyme production in *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus* and *Phlebia radiata* [13]. *Phanerochaete chrysosporium*, cultivated in synthetic medium, produces lignin peroxidase and MnP only under nitrogen-limited conditions [33]. However, it has been demonstrated that in the presence of lignocellulosic substrate, a high concentration of organic nitrogen stimulates production of these enzymes [12,34].

The experimental design indicates that intermediate concentrations of nitrogen (~ 1.5 g/L) would be associated with higher production of Lac. On the other hand, intermediate glucose concentrations (20 g/L) do not favour higher Lac enzymatic titres but high (30 g/L) or low concentrations of glucose (~ 10 g/L) do. The data of some authors indicate that the effect of a carbon source significantly depends on its concentration in the nutrition medium [16] as demonstrated by the experimental design.

3.3 Effect of different carbon and nitrogen concentrations on Lac, Per and MnP production in a stirred-tank bioreactor

Higher titres of Lac were found in experiments 1 and 2 (lower glucose concentrations among the conditions tested) (Fig. 3A). In experiment 2, the enzyme peak was detected at 64 h of cultivation (3420 U/mL), a sharp drop in activity being noted after the peak. In experiment 1, the activity increased until reaching an enzyme peak at 88 h of cultivation (3219 U/mL), with no considerable decrease in enzyme production by the end of cultivation.

Experiments 3 and 4, prepared with a greater amount of glucose (20 and 30 g/L, respectively), did not favour high production of Lac in comparison with other experiments, possibly due to catabolite repression [31]. In experiment 3, 1783 U/mL of Lac was obtained, while in experiment 4 the peak was equal to 2163 U/mL of Lac.

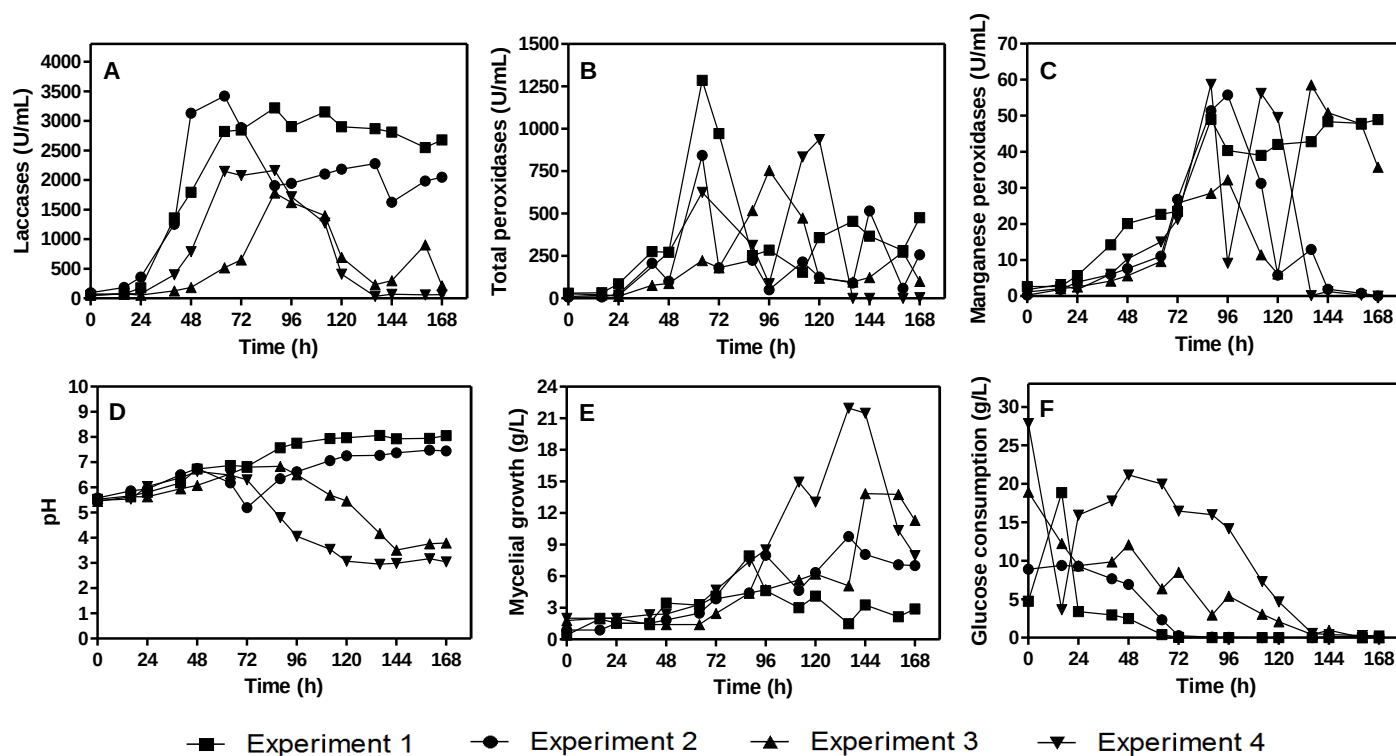


Fig. 3. Kinetic growth and enzymatic production of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a 5 L stirred-tank bioreactor. Laccases (A), total peroxidases (B), manganese peroxidase (C), pH variations (D), mycelial growth (E) and glucose consumption (F). Experiment 1: 5 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 2: 10 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 3: 20 g/L glucose and 1.5 g/L casein; Experiment 4: 30 g/L glucose and 1.5 g/L casein.

D'Agostini et al. [35] verified that a low carbon/nitrogen (C/N) ratio increases Lac production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. The same analysis was carried out in this study. Higher C/N ratios increased mycelial growth and decreased Lac production (Table 3), which justifies a strong negative correlation ($r = -0.701$), according to the Pearson correlation coefficient. The present study corroborates the results of D'Agostini et al. [35], since the lower C/N ratios provided the highest Lac activity and lower mycelial growth (experiments 2 and 1, respectively). Thus, mycelial growth was directly proportional to the C/N ratio. Supporting these results, Souza et al. [36] also reported that a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* showed the best Lac production at low C/N ratios. Thus, in this study, using *M. palmivorus* VE111 as basidiomycete, and glucose and casein as carbon and nitrogen sources, a low C/N rate was favorable for higher Lac production. In contrast, Yang et al. [14] reported that high carbon and nitrogen concentrations in the fermentation medium were beneficial for

Lac production for *Cerrena* sp. HYB07 whereas low carbon and nitrogen concentrations dramatically reduced Lac yields.

Table 3

Comparison between maximum laccase activity and maximum mycelial growth in response to different carbon / nitrogen ratios in stirred-tank bioreactor cultivation.

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
C/N ratio	2.78	5.55	13.33	20.00
Maximum laccase activity (U/mL)	3219	3420	1783	2163
Maximum mycelial growth (g/L)	7.92	9.78	13.84	21.98

Experiment 1: 5 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 2: 10 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 3: 20 g/L glucose and 1.5 g/L casein; Experiment 4: 30 g/L glucose and 1.5 g/L casein.

There was a drop in pH after 88 h of cultivation in experiment 3 and after 72 h of cultivation in experiment 4 (Fig. 3D). From these points, a decrease in production of Lac (Fig. 3A) can also be observed for both experimental conditions with higher concentrations of glucose, as well as an increase in biomass production (Fig. 3E). It is suggested that cultures with higher glucose concentrations (20 and 30 g/L) provide an increase in fungus metabolism and, as a consequence, a drop in pH; this leads to deactivation of some Lac and/or interference in the transcription of their respective genes, demonstrating that the Lac produced are sensitive to drops in pH. The same reason, that is, the pH drop causing a drastic decrease of Lac activity in experiment 2 in 72 h of cultivation, kept production of the enzyme lower until the end of the cultivation when compared to experiment 1.

For mycelial growth (Fig. 3E), experiments 3 and 4 showed the highest mycelial mass, 14 g/L and 22 g/L, respectively. Thus, the higher glucose concentrations favoured greater growth of the fungus and, in contrast, lower production of Lac.

The decrease in Lac production in experiments with higher concentrations of glucose can be explained by catabolic repression by glucose, a mechanism of energy-saving response common in some fungi in which the transcription of many genes is not performed in the presence of glucose [37]. Thus, in the presence of glucose, other enzymes such as Lac are either not produced or produced in smaller quantities because *M. palmivorus* VE111 has probably turned off some genes responsible for the production of this enzyme.

The results of this study suggest that Lac production is associated with growth, since Lac production was directly related to biomass formation and substrate consumption. For all experiments, the glucose was consumed until the end of cultivation (Fig. 3F).

With respect to the production of Per (Fig. 3B), experiment 1 exhibited the highest enzymatic titre (1285 U/mL), while for MnP (Fig. 3C) the highest production of this enzyme was found in experiment 4 (59 U/mL). Tekere et al. [38] showed that some *Trametes* species produce the highest MnP activity in a medium containing high carbon and low nitrogen concentrations, which corroborates these results.

Among the enzymes examined, it was found that Lac activity decreased approximately 30% when the process was scaled up in a bioreactor compared with the initial experiments performed in shaken flasks (Fig. 4). However, there was a considerable increase in Per activity (an almost 7-fold increase compared to flasks cultivation) compensating for the decrease in Lac production. In addition, the maximum production of these enzymes in bioreactor occurred with less time of cultivation when compared to flasks experiment, which becomes an important feature in an industrial process. MnP activity showed no differences between flasks and bioreactor experiments (t-test, $p > 0.05$). Factors such as oxygen transfer, agitation, shear and fungal morphology differ between cultures in shaken flasks and in bioreactors. These factors, acting individually or in combination, interfere in the production of Lac, reducing their secretion, while helping to increase the production of Per.

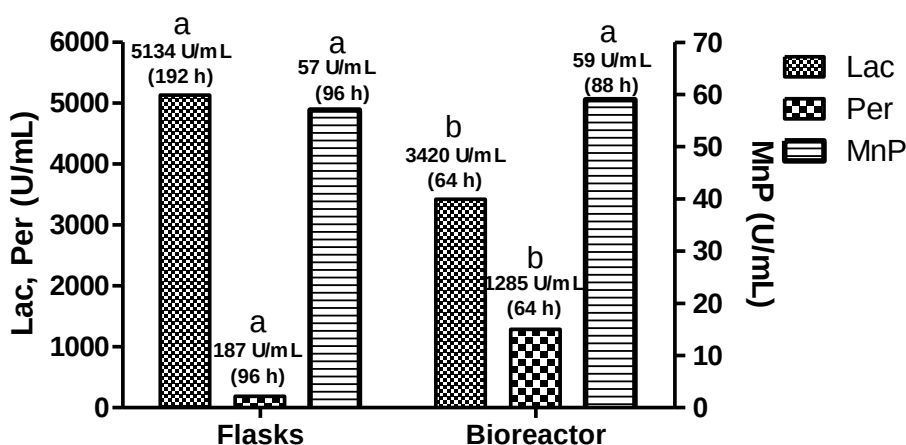


Fig. 4. Comparative evolution of the production of ligninolytic enzymes by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in flasks and in a bioreactor. T-test ($p < 0.05$) was performed to compare the production of each enzyme (Lac, Per and MnP) in two different culture conditions (flasks and bioreactor). The column graphic represents the respective cultivation time at which each enzyme reached its maximum activity.

Specifically, this reduction in Lac activity in the bioreactor can be explained by the operating volume (5 L) in which the experiments were carried out, and by no optimization of key parameters in the production of enzymes such as pH and concentration of dissolved oxygen. Mazumber et al. [39] reported that the working volume of the culture medium in a bioreactor is an important factor in Lac production by *P. ostreatus*. The results obtained in the investigation showed that decreasing the working volume by 20% doubled Lac production.

3.4 Yield factors, productivity, and specific activity

Table 4 shows that experiment 1 presented the best results for most of the analyzed parameters. The use of a lower concentration of glucose (5 g/L) provided higher substrate yield on Lac ($Y_{E/S}$) and Lac specific activities (SA_{Lac}), both in relation to Lac produced per mg of protein and in relation to maximum mycelial biomass, important factors in industrial scale process. Although the experiment 1 was the cultivation with lower mycelial growth, the relation between the mycelial growth and the lower concentration of glucose, led to higher substrate yield on biomass ($Y_{X/S}$) and biomass volumetric productivity (P_X). However, the experiment 1 does not show the highest Lac volumetric productivity (P_E), because experiment 2 presented a slightly higher production of Lac in less time compared with experiment 1.

Taking these data into account and considering that experiment 1 exhibited remaining Lac production during the cultivation time and required a lower glucose concentration and therefore lower investment cost, the enzymatic extract of experiment 1 (88 h) was chosen to be characterized.

Table 4

Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor

	Experiment			
	1	2	3	4
Maximum laccases activity – Lac_{max} (U/mL)	3219	3420	1783	2163
Time (h)	88	64	88	88
Substrate yield on laccases – $Y_{E/S}$ (U/g)	633 400	433 770	100 530	151 140
Laccases volumetric productivity – P_E (U/mL/h)	35.98	51.98	19.42	24.04
Total soluble proteins – TSP (mg/L)	597	701	880	725
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/mg of protein)	5 392	4 879	2 026	2 983
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/g of biomass)	406 439	349 693	128 829	98 407
Maximum mycelial biomass – X_{max} (g/L)	7.92	9.78	13.84	21.98
Time (h)	88	136	144	136
Substrate yield on biomass – $Y_{X/S}$ (g/g)	1.50	0.88	0.63	0.68
Biomass volumetric productivity – P_X (g/L/h)	0.085	0.065	0.084	0.147

Experiment 1: 5 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 2: 10 g/L glucose and 1.8 g/L casein; Experiment 3: 20 g/L glucose and 1.5 g/L casein; Experiment 4: 30 g/L glucose and 1.5 g/L casein.

3.5 Characterization of Lac

The ideal buffer for enzyme assays with Lac was McIlvaine buffer (Fig. 5A), and 3.5 was the optimum pH for enzyme reaction, reaching 6402 U/mL of Lac. These data were similar to those of Kandasamy et al. [4] who verified that the optimum reaction pH for Lac from *Hexagonia hirta* MSF2 was 3.4 with citrate phosphate buffer. In the studies of Fang et al. [40] with *G. lucidum* 77002, the optimum pH ranged from 2.5 to 5.0, also with citrate phosphate buffer, depending on the substrate employed.

With respect to the reaction temperature (Fig. 5B), high enzymatic Lac titres (7051 U/mL) were obtained at 40 °C. Similarly, Fang et al. [40] obtained maximal activity at 45 °C for *G. lucidum* 77002 cultivation and the results of Kandasamy et al. [4] indicated a maximum Lac activity for *H. hirta* MSF2 at 40 °C. The activation energy of the Lac production by *M. palmivorus* in this study is 13, 516 kJ/mol/L.

Regarding the thermostability of Lac (Fig. 5C), the temperature of 20 °C is the best when it refers to a greater maintenance of the enzymatic activity. Although it was observed that at 50 °C the enzyme retained approximately 50% of its initial activity during an incubation period of 3 h (7000 U/mL), 35% after 6 h (3500 U/mL) and 20% after 12 h (1300 U/mL). Furthermore, the high temperature (50 °C) at which the thermostability of Lac activity is maintained is suitable for many enzymatic hydrolysis processes [41]. In addition, the thermostability of Lac from *M. palmivorus* VE111 is better than from other other basidiomycetes , for example *G. lucidum* 77002 [40] and *P. ostreatus* HP-1 [42].

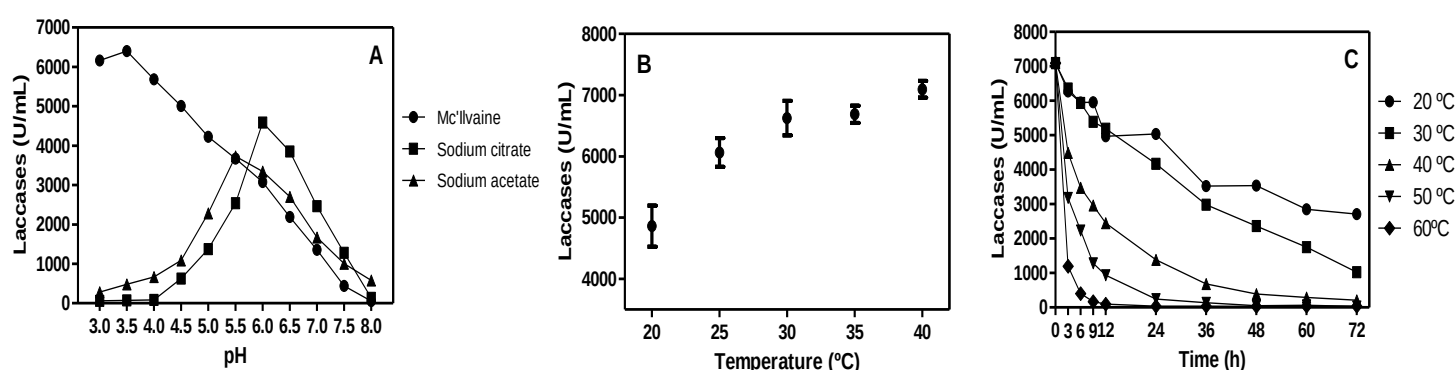


Fig. 5. Characterization of the laccase activity peak from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in experiment 1 (88 h). Optimum reaction pH (A), optimum reaction temperature (B) and enzymatic thermostability (C).

As the temperature in the thermostability tests increases, the decimal reduction time (D-value) decreases approximately by half every proportional increase in temperature until 50 °C

(20 °C – 10 466 min, 30 °C – 5 139 min, 40 °C – 2 842 min, 50 °C – 1 798 min, 60 °C – 1772 min). However, considering that enzymatic hydrolysis processes of lignocellulosic biomasses occur at higher temperatures, around 50 °C, thermostability tests demonstrate the capacity of use of *M. palmivorus* VE111 Lac at a temperature between a range at 50 °C and 60 °C. In this range the D-value presents similar values (close to 1 800 minutes), which corresponds to 30 h, a sufficient time for the action of enzymes in lignocellulosic hydrolysis.

3.6 Lac zymogram of the crude extract

Lac production, often at the level of transcription, responds to various environmental signals such as metal ions, aromatic compounds and carbon and nitrogen sources and concentrations. Fungal Lac are usually grouped into gene families, and the family members have different biochemical properties and responses to inducers and nutrients [14,43]. The effect of these factors at the level of Lac gene transcription has been demonstrated in many fungal species [31].

In the Lac zymogram (Fig. 6) a band between 37 and 50 kDa is observed for all experiments. However, only in experiments 1 and 2 was a band identified at about 30 kDa. These bands possibly represent isoenzymes that were more evident in the two best culture conditions observed (experiments 1 and 2) and related to higher Lac activity.

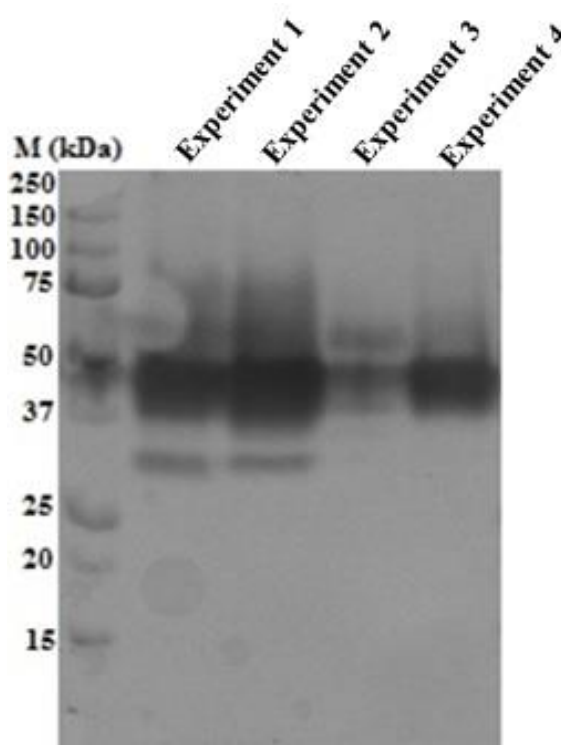


Fig. 6. Zymogram of the laccase activity peaks observed in the crude extracts of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultures in bioreactor experiments.

Fang et al. [40] verified by native PAGE that *G. lucidum* 77002 produces three Lac isoforms, although reaching an enzymatic peak of 141 U/mL, much lower than the results obtained in this study. In this study, it is probable that more isoforms are involved in the production of Lac in the range of 37–50 kDa or the isoforms of Lac found were highly expressed in the transcription of their respective genes.

According to Palmieri et al. [44], *P. ostreatus* produces several extracellular Lac isoenzymes. Karp et al. [45], for example, identified six isoforms in a study conducted with *P. ostreatus* when the highest Lac activity was achieved, in medium with yeast extract supplemented with CuSO₄ and ferulic acid in solid state fermentation.

Yang et al. [14] observed that more significant differences in the transcription profiles of the eight Lac genes from *Cerrena* sp. HYB07 were seen with various C/N ratios. Most genes were significantly up-regulated in the high-nitrogen/high-carbon medium (Lac2 and Lac5) or in the low-nitrogen/high-carbon medium (Lac3, Lac4, Lac6 and Lac8). Low-nitrogen/low-carbon medium appeared not to be preferred for transcription of the Lac genes analysed, differing from this study with *M. palmivorus* VE111 in which lower concentrations of carbon and nitrogen were preferred for Lac production.

4. Conclusions

The results obtained in this work show that both the source and concentration of carbon and nitrogen interfere in the production of ligninolytic enzymes by *M. palmivorus* VE111. It was found that lower glucose concentrations in combination with intermediate concentrations of casein provide the highest activity of Lac and Per in a bioreactor. The activity of Lac, Per and MnP achieved in this work are among the highest found in the literature. The enzymatic profile of *M. palmivorus* VE111 will certainly be of great importance in future studies of enzymatic hydrolysis aimed at the production of second generation ethanol.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial and technical support from UCS, CAPES and EMBRAPA (scholarship), CAPES (Process 3255/2013) and FAPERGS (Process 16/2551-0000246-0).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

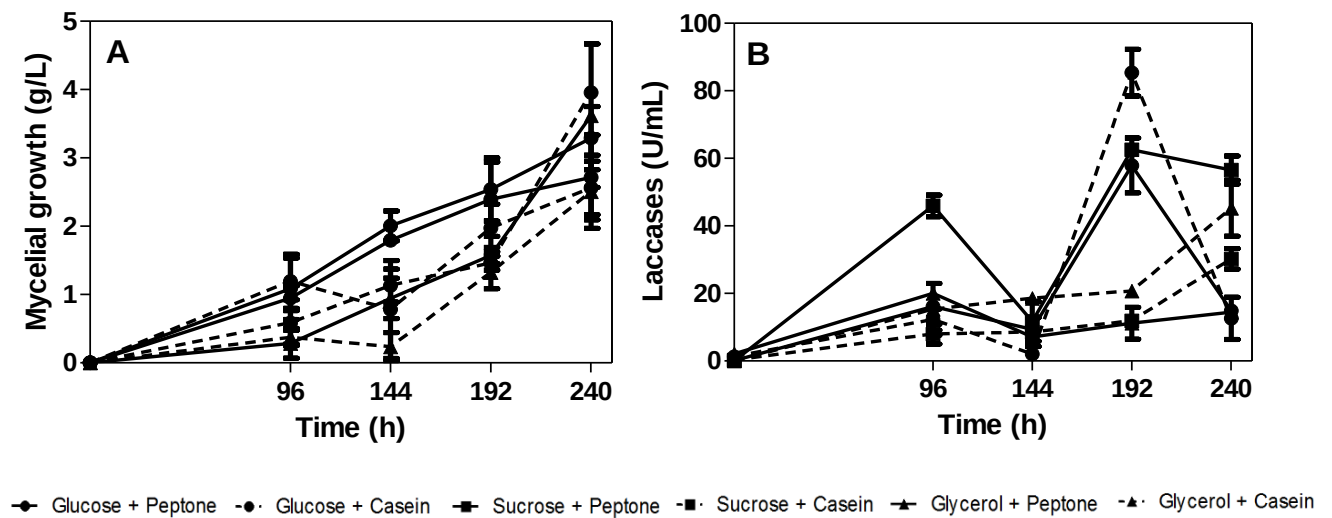
- [1] N.L. Glass, M. Schmoll, J.H.D. Cate, S. Coradetti, Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi, *Annu. Rev. Microbiol.* 67 (2013) 477–498.
- [2] A.T. Martínez, M. Speranza, F.J. Ruiz-Dueñas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillén, M.J. Martínez, A. Gutiérrez, J.C. del Río, Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin, *Int. Microbiol.* 8 (2005) 195–204.
- [3] J. Plácido, S. Capareda, Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production, *Bioresour. Bioprocess.* 2 (2015) 23. doi 10.1186/s40643-015-0049-5.
- [4] S. Kandasamy, I.K. Muniraj, N. Purushothaman, A. Sekar, D.J.S. Sharmila, R. Kumarasamy, S. Uthandi, High Level Secretion of Laccase (LccH) from a Newly Isolated White-Rot Basidiomycete, *Hexagonia hirta* MSF2, *Front. Microbiol.* 4 (2016) 707.
- [5] J.A. Majeau, S.K. Brar, R.D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2331–2350.
- [6] S. Tagger, C. Périssol, C. Gil, G. Vogt, J.L. Petit, Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.), *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1998) 372–379.
- [7] A. Klonowska, J. Le Petit, T. Tron, *FEMS Microbiol. Lett.* 200 (2001) 25.
- [8] G. Gramss, K.D. Voigt, H. Bergmann, Factors influencing water solubility and plant availability of mineral compounds in the tripartite fairy rings of *Marasmius oreades* (BOLT.: FR.) FR., *J. Basic. Microbiol.* 45 (2005) 41–54.
- [9] K. Pandiyan, R. Tiwari, S. Rana, A. Arora, S. Singh, A.K. Saxena, L. Nain, Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium* sp., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2014) 55–64.
- [10] A. Chenthamarakshan, N. Parambayil, N. Miziriya, P.S. Soumya, M.S. Kiran Lakshmi, A. Ramgopal, A. Dileep, P. Nambisan, Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of design of experiments, *BMC Biotechnol.* 17 (2017) 12. doi: 10.1186/s12896-017-0333-x.
- [11] C. Cantele, R.C. Fontana, A.G. Mezzomo, L.O. Rosa, L. Poleto, M. Camassola, A.J.P. Dillon, Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*, *Biocat. Agri. Biotech.* 12 (2017) 15–22.

- [12] G. Songulashvili, V. Elisashvili, S.P. Wasser, E. Nevo, Y. Hadar, Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes, *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007) 57–61.
- [13] N. Mikiashvili, S.P. Wasser, E. Nevo, V. Elisashvili, Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 999–1002.
- [14] J. Yang, G. Wang, T.B. Ng, J. Lin, X. Ye, Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients, *Front. Microbiol.* 6 (2016) 1558.
- [15] C. Zhu, G. Bao, S. Huang, Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACC 52857) induced through yeast extract and copper, *Biotech. Biotechnol. Equip.* 30 (2016) 270–276.
- [16] F. Bettin, Q. Montanari, R. Calloni, T.A. Gaio, M.M. Silveira, A.J.P. Dillon, Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1–9.
- [17] M. Mandels, E.T. Reese, Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals, *J. Bacteriol.* 73 (1957) 269–278.
- [18] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, National Renewable Energy Laboratory – NREL/TP-510-42623. (2008).
- [19] P. Rapp, E. Grote, F. Wagner, Formation and location of 1,4- β -glucanases and 1,4- β -glucosidases from *Penicillium janthinellum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 857–866.
- [20] R.S. Wolfenden, R.L. Wilson, Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 02* (1982) 805–812.
- [21] M. Heinzkill, L. Bech, T. Halkier, P. Schneider, T. Anke, Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae), *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1601–1606.
- [22] M. Kuwahara, J.K. Glenn, M.A. Morgan, M.H. Gold, Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.* 169 (1984) 247–250.

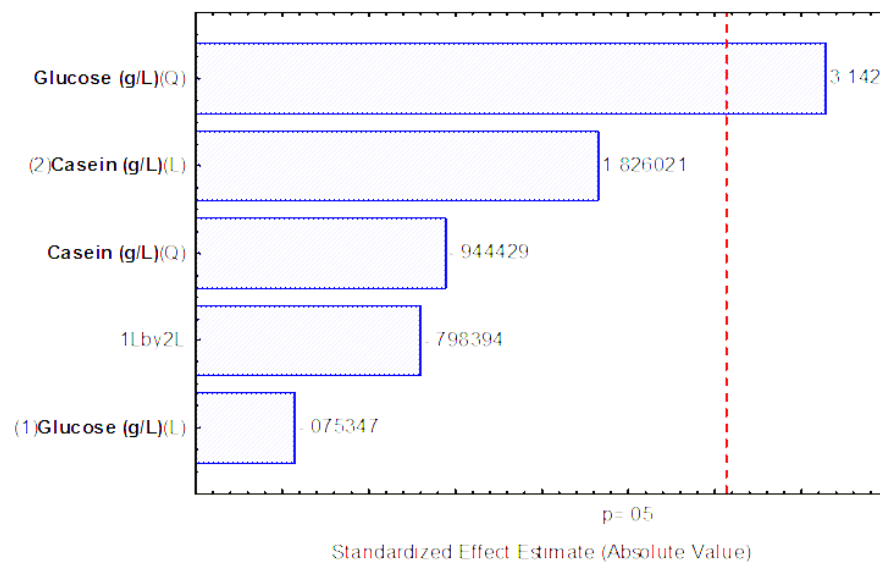
- [23] N.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄, *Nature*. 227 (1970) 680–685.
- [25] D.S. Yaver, F. Xu, E.J. Golightly, K.M. Brown, S.H. Brown, M.W. Rey, P. Schneider, T. Halkier, K. Mondorfand, H. Dalboge, Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 834–841.
- [26] D. Sternberg, S. Dorval, Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose, *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 181–191.
- [27] M. Mansur, T. Suarez, J.B. Fernandez-Larrea, M.A. Brizuela, A.D. Gonzalez, Identification of a laccase gene family in the new lignin degrading basidiomycete CECT 20197, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2637– 2646.
- [28] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2002) 529–536.
- [29] V. Elisashvili, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, T. Khardziani, M. Bakradze, Physiological regulation of edible and medicinal higher basidiomycetes lignocellulolytic enzyme activity, *Int. J. Med. Mushrooms.* 4 (2002) 159–166.
- [30] M. Stajić, L. Persky, D. Friesem, Y. Hadar, S.P. Wasser, E. Nevo, J. Vukojević, Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 65–73.
- [31] A. Piscitelli, P. Giardina, V. Lettera, C. Pezzella, G. Sannia, V. Faraco, Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi, *Curr. Genomics.* 12 (2011) 104–112.
- [32] T. Master, A.T. Field, Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese, *J Biol. Chem.* 273 (1998) 15412–15417.
- [33] C.A. Reddy, T.M. D’Souza, Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEMS Microbiol.* 13 (1994) 137–152.
- [34] A.N. Kapich, B.A. Prior, A. Botha, S. Galkin, T. Lundell, A. Hatakka, Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in

- submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446, *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004) 187–195.
- [35] É.C. D'Agostini, T.R.D'A. Mantovani, J.S. do Valle, L.D. Paccola-Meirelles, N.B. Colauto, G.A. Linde, Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation, *Sci. Agric.* 68 (2011) 295–300.
- [36] C.G.M. Souza, A. Zilly, R.M. Peralta, Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation, *J. Basic. Microbiol.* 42 (2002) 83–90.
- [37] H. Ronne, Glucose repression in fungi, *Trends Gent.* 11 (1995) 12–17.
- [38] M. Tekere, R. Zvaunya, J.S. Read, Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white rot fungi under different culture conditions, *J. Basic. Microbiol.* 41 (2001) 115–129.
- [39] S. Mazumber, S. Bosel, A. Bandopadhyay, S. Alam, M. Mukherjee, Study of laccase production by *Pleurotus ostreatus* in a 5 L bioreactor and application of the enzyme to determine the antioxidant concentration of human plasm, *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (2008) 355–360.
- [40] Z. Fang, X. Liu, L. Chen, Y. Shen, X. Zhang, W. Fang, X. Wang, X. Bao, Y. Xiao, Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production, *Biotechnol. Biofuels.* 8 (2015) 54.
- [41] M. Camassola, L.R. Bittencourt, N.T. Shenem, J. Andreaus, A.J.P. Dillon, Characterization of the Cellulase Complex of *Penicillium echinulatum*, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004) 391–396.
- [42] H. Patel, S. Gupte, M. Gahlout, A. Gupte, Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1, *Biotech.* 4 (2014) 77–84.
- [43] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, Laccases: a never-ending story, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 369–385.
- [44] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso, G. Sannia, A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31301–31307.
- [45] S.G. Karp, V. Faraco, A. Amore, L. Birolo, C. Giangrande, V.T. Soccol, A. Pandey, C.R. Soccol, Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse, *Bioresour. Technol.* 114 (2012) 735–739.
- [46] A. Lomascolo, E. Record, I. Herpoel-Gimbert, M. Delattre, J. Robert, J. Georis, T. Dauvrin, J.C. Sigoillot, M. Asther, Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of

- Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer, J. Appl. Microbiol. 94 (2003) 618–624.
- [47] N. Mikiashvili, V. Elisashvili, S. Wasser, E. Nevo, Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*, Biotechnol. Lett. 27 (2005) 955–959.
- [48] N.M. Myasoedova, A.M. Chernykh, N.V. Psurtseva, N.V. Belova, L.A. Golovleva, New Efficient Producers of Fungal Laccases, Appl. Biochem. Microbiol. 44 (2008) 73–77.
- [49] G. Songulashvili, G. Jimenéz-Tobón, C. Jaspers, M.J. Penninchx, High production of laccase by *Ganoderma lucidum* 447 in submerged cultivation on ethanol production supplemented with Cu^{2+} , Mycosphere. (2011) 507-513.
- [50] F. Wang, J-H. Hu, C. Guo, C-Z. Liu, Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer, Bioresour. Technol. 166 (2014) 602–605.
- [51] G. Songulashvili, D. Spindler, G.A. Jimenéz-Tobón, C. Jaspers, G. Kerns, M.J. Penninchx, Production of high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 on wheat bran, C. R. Biol. (2015) 121–125.



Supplementary data 1. Experiment performed with *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks in the absence of potato broth. Mycelial growth (A) and laccase activity (B).



Supplementary data 2. Pareto chart of standardized effects of glucose and casein. The vertical dashed line indicates a level of significance of 95 % ($p = 0.05$); (L) stands for linear variable and (Q) stands for quadratic variable. Pareto chart provides evidences of the values of the t-test for each independent variable.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers

Willian Daniel Hahn Schneider^{a,*}, Paula Cavion Costa^a, Roselei Claudete Fontana^a,
Félix Gonçalves de Siqueira^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^a

^a Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^b Embrapa Agroenergy, Parque Estação biológica, Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Laccases
Peroxidases
White-rot basidiomycete
Lignin
Copper sulphate
Induction

ABSTRACT

Testing different pHs, dissolved oxygen concentrations and temperatures, plus the addition of inducers, to optimize ligninolytic enzyme activity, resulted in increased production of laccases, total peroxidases and manganese peroxidases on the order of 2.1-fold, 4.6-fold and 10-fold, respectively; laccases reached 6588 U/mL, total peroxidases reached 3533 U/mL and manganese peroxidase achieved 60 U/mL. Furthermore, an increase in laccase volumetric productivity and in its specific activity was verified. The addition of inducers, such as copper sulphate and manganese sulphate, improved enzymatic activity. In addition, a new previously unidentified laccase isoform was documented by zymography. The present work successfully increased the production of ligninolytic enzymes.

Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers

Willian Daniel Hahn Schneider^{a*}, Paula Cavion Costa^a, Roselei Claudete Fontana^a, Félix Gonçalves de Siqueira^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^a

^a*Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.*

^b*Embrapa Agroenergy, Parque Estação biológica, Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil.*

*corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2681

E-mail address: willianschneiderwhs@yahoo.com.br (W.D.H. Schneider)

Abstract

Testing different pHs, dissolved oxygen concentrations and temperatures, plus the addition of inducers, to optimize ligninolytic enzyme activity, resulted in increased production of laccases, total peroxidases and manganese peroxidases on the order of 2.1-fold, 4.6-fold and 10-fold, respectively; laccases reached 6588 U/mL, total peroxidases reached 3533 U/mL and manganese peroxidase achieved 60 U/mL. Furthermore, an increase in laccase volumetric productivity and in its specific activity was verified. The addition of inducers, such as copper sulphate and manganese sulphate, improved enzymatic activity. In addition, a new previously unidentified laccase isoform was documented by zymography. The present work successfully increased the production of ligninolytic enzymes.

Keywords

Laccases; Peroxidases; White-rot basidiomycete; Lignin; Copper sulphate; Induction

1. Introduction

Among fungi, white-rot basidiomycetes (WRB) or macrofungi are the principal decomposers of wood lignocellulose, especially lignin, through the secretion of enzymes such as lignin peroxidases, manganese peroxidases, versatile peroxidases, and laccases (Wong, 2009; Mäkelä et al., 2013; Elisashvilli et al., 2018). Lignin-modifying enzymes (LME) from WRB play an important role in both depolymerization and polymerization of lignin. Since

enzymatic breakdown of lignin can produce valuable products, WRB represents an additional pathway for the production of biofuels and various other valuable products by several industrial processes (Zeng et al., 2017; Sharma et al., 2017; Elisashvili et al., 2018).

In particular, taking into account the production of biofuels, the use of LME aims to replace the pretreatment step of lignocellulosic material, since this pretreatment methodology ends up consuming a lot of energy and aggressive chemicals, as well as generating undesirable compounds. The LME produced by WRB degrades lignin, making other fractions of lignocellulose more accessible to the second step of biofuel production, i.e., the saccharification (Plácido and Capareda, 2015).

However, LME production by WRB is relatively low under natural conditions and represents a bottleneck for practical use in industry. As a result, much attention has been focused on increasing, for example, laccase production by WRB (Zhu et al., 2016). Fungal production of ligninolytic enzymes is influenced by many factors, including species, type of substrate, carbon and nitrogen sources, type of cultivation (solid-state or submerged cultivation), agitation (stationary or agitated culture mode), pH, dissolved oxygen concentration, temperature, and cultivation time (Mikiashvili et al., 2005; Stajić et al., 2006; Majeau et al., 2010; Kandasamy et al., 2016). Furthermore, the nature and concentration of inducers, such as metal ions and aromatic compounds, represent additional important factors in the production of LME (Piscitelli et al., 2011; Zhuo et al., 2017; Elisashvili et al., 2018).

Fungi in general require milder conditions for the production of laccases, with temperatures in the range of 25 °C to 30 °C, and a culture medium pH between 4.5 and 5.5 (Majeau et al., 2010). However, there have been few studies that have aimed to optimize the processes involved in ligninolytic production, with those that have been performed exploring, in most cases, the influence of different carbon and nitrogen sources and the addition of inducers. The strong influence of copper sulfate as an inducer for increased laccase production has been well documented (Baldrian & Gabriel, 2002; Yang et al., 2013; Vrsanska et al., 2016; Yang et al., 2016, Zhu et al., 2016). However, evaluations of variables such as oxygen availability, culture medium agitation and airflow, are still lacking.

Marasmiellus palmivorus is a WRB whose ligninolytic system, as far as is known from preliminary studies, consists of laccases and peroxidases (Cantele et al., 2017a; Chenthamarakshan et al., 2017; Schneider et al., 2018). Its ability to produce mainly laccases in high amounts makes it a promising fungus for bioremediation (Cantele et al., 2017b) and second-generation ethanol production (Pandiyani et al., 2014). However, to further increase

enzyme productivity, a crucial factor for industrial production, optimization studies involving several variables need to be undertaken.

Therefore, the aim of the present study was to determine the optimum pH, dissolved oxygen concentration and temperature for the production of laccases and peroxidases by *M. palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor, and to evaluate the effect of the addition of different substances as inducers. This study also aimed to better understand scaling in LME production and the influence of the aforementioned parameters, which are poorly represented in the literature.

2. Material and Methods

2.1 White-rot basidiomycete (WRB)

The species *Marasmiellus palmivorus* VE111 was collected in Itapeva Park in the city of Torres, state of Rio Grande do Sul, Brazil, where it was found on a decomposing palm tree trunk. Molecular identification of this WRB was performed as described in Cantele et al. (2017a). The fungus was subsequently grown on potato dextrose agar (PDA) (Kasvi) maintenance medium in Petri dishes and kept in a germinating chamber with a photoperiod (Oxylab) at 28 °C for seven days.

2.2 Enzyme production

Prior to enzyme production in a bioreactor, pre-inoculation was performed in shaken (reciprocal agitation system at 180 rpm at 28 °C for 96 h) flasks by transferring three mycelial disks ($\varnothing = 1.5$ cm) from Petri dishes into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium. The medium employed was composed of 0.5% (w/v) glucose, 0.18% (w/v) casein, 5% (v/v) mineral solution (20 $\times$ concentration) – as described by Mandels and Reese (1957) – and potato broth (200 g of minced potatoes boiled in 1 L water) to reach a total volume of 100 mL.

The content of the pre-inoculum was then transferred into a 10-L stirred-tank bioreactor (New Brunswick, BioFlo/CelliGen115) with an operating volume of 5 L, such that the pre-inoculum represented 10% (v/v) of the total operating volume of the bioreactor. The composition of the medium used in the bioreactor experiments was the same as that used for pre-inoculation. Bioreactor experiments first involved different pHs (free pH, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and free initial pH/fixed pH 7.0), and then, using the best results for pH, involved different dissolved oxygen concentrations (DO: 10%, 50% and 90%). For the DO experiments, the

bioreactor operating system was set in cascade mode with modifications to agitation and airflow to achieve the desired DO values as follows: 10% (agitation: 50 to 350 rpm; airflow: 0.1 to 1.0 vvm); 50% (agitation: 100 to 550 rpm; airflow: 0.5 to 2.0 vvm); 90% (agitation: 200 to 850 rpm; airflow: 0.5 to 3.0 vvm). Lastly, using the best results for both pH and DO, experiments involving temperature (23 °C, 28 °C and 33 °C) were performed. Samples were taken periodically for 168 h and were stored at 4 °C.

An experiment was then performed in the bioreactor to evaluate the addition of inducers to the culture medium. An initial screening experiment was carried out in shaken flasks to evaluate the inducers copper sulphate (CuSO₄), manganese sulphate (MnSO₄) and veratryl alcohol at concentrations of 1, 2 and 3 mmol/L. The composition of the medium was the same as that used in the other experiments except for the addition of the inducers individually into flasks, with flasks without inducers serving as a control condition. Destructive samples (15 mL) were taken from the flasks on the 6th and 8th day of cultivation in order to evaluate enzyme production. The experiment was carried out in triplicate, with subsequent evaluation of the best inducer in bioreactor cultivation with the same culture conditions and the previously optimized parameters (pH, DO and temperature).

2.3 Mycelial growth, pH and consumption of carbon sources

Aliquots of 15 mL were collected and centrifuged at $9600 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the supernatants evaluated for enzymatic activity and consumption of carbon source. Consumption of carbon source was evaluated by filtering (0.20 µm) the supernatants followed by high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu), according to National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter et al., 2008). An Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) was used at 60 °C with a mobile phase of 5 mmol/L H₂SO₄ and a flow rate of 0.6 mL/min. Mycelial mass was used for determining growth, according to the method of Rapp et al. (1981).

2.4 Enzymatic assays

2.4.1 Laccases

Activity of laccases was determined kinetically, according to Wolfenden and Willson (1982), by quantifying the product of the oxidation of 5 mmol/L 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), with 0.2 mol/L of sodium acetate buffer pH 5.0.

2.4.2 Total peroxidases

Activity of total peroxidases was measured using the same method as for laccase with 5 mmol/L ABTS as substrate, but with the addition of 2 mmol/L H_2O_2 in the reaction mixture, according to Heinzkill et al. (1998). Total peroxidases activity was calculated in the same way as for laccase, with peroxidases activity being subtracted from laccase activity.

2.4.3 Manganese peroxidase

Activity of manganese peroxidase was determined by the method proposed by Kuwahara et al. (1984) using 3 mmol/L phenol red as substrate, and 2 mmol/L MnSO_4 , 2 mmol/L H_2O_2 , 250 mmol/L sodium acetate, 5 g/L bovine albumin, and 20 mmol/L pH 4.5 sodium succinate buffer. The reaction was stopped by adding 2 mol/L NaOH to the mixture.

2.4.4 Lignin Peroxidase

Activity of lignin peroxidase was determined kinetically, according to the method proposed by Tien and Kirk (1984) using 2 mmol/L H_2O_2 and 4 mmol/L veratryl alcohol in 250 mmol/L of sodium tartrate buffer pH 3.0.

2.5. Soluble protein concentration

Protein was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

2.6 Yield factors, productivity, and specific activity

Yield factors, productivity, and specific activity were calculated for experiments conducted in the bioreactor. These included laccase substrate yield ($Y_{E/S}$), biomass substrate yield ($Y_{X/S}$), enzymatic productivity (P_E), cellular productivity (P_X), laccase specific activity (SA_{Lac}) and laccase specific activity in relation to biomass concentration. The last was calculated using the maximum values of each variable.

2.7 Characterization of laccases and peroxidases

The enzyme extracts that had the highest enzymatic activity for laccase and total peroxidases during the optimization process were used to characterize these enzymes in terms of optimum reaction pH, optimum reaction temperature and enzymatic thermostability. The effect of pH on laccase and total peroxidases activity was evaluated using sodium acetate buffer,

sodium citrate and McIlvaine buffer (sodium phosphate/citric acid), all in 0.2 mol/L. These buffers were prepared at pHs ranging from 2.5 to 8.0. Tests of reaction temperature were conducted with the buffer that provided the greatest enzymatic activity in the pH test. The reaction temperatures used were 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C. Tests of enzymatic thermostability for laccase and total peroxidases were performed at temperatures of 20, 30, 40, 50 and 60 °C, using the buffer that provided the highest enzymatic activity in the pH test, during 72 h. The kinetics of laccases and total peroxidases activity at each characterization step were determined by the method of quantification described in sections 2.4.1 and 2.4.2., respectively, varying the parameters already analysed, such the best buffer, pH and temperature.

2.8 Zymogram of laccase activity

The enzyme extract with the highest laccase activity in each of the experiments performed in the bioreactor was subjected to laccase zymography by subjecting 100 µL of each sample to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to the methodology described by Laemmli (1970). The SDS gel was removed and washed at room temperature in solution A (Triton X100 2.5%) and solution B (sodium acetate buffer, pH 5.0) for 10 min each, and then visualized according to Yaver et al. (1996), by transferring the gel page to a glass plate containing a layer of ABTS agar (0.02 g ABTS, 0.4 g agar, 40 mL of water heated to dissolve the agar).

2.8 Statistical analysis

Data analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.0.1.334). The results for the shaken flasks were analyzed by ANOVA, with Dunnett's post-test at $p = 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of pH on LME production

Different pH values strongly influenced the production of the analyzed enzymes. An initial experiment was carried out without a pH control (free pH), with the initial pH being 5.5, which was increased to near 7.0 at 48 h of cultivation (Schneider et al., 2018). The maximum production of laccase was 3102 U/mL (Fig. 1A), while that of total peroxidases was about 350 U/mL (Fig. 1B) and manganese peroxidase was 13.10 U/mL (Fig. 1C). Enzyme production was negatively influenced when the experiment was conducted at lower pH (fixed at 4.0), although it still favored the growth of the fungus (Supplementary data 1A). Maximum laccase

activity was only 227.34 U/mL, while that of total peroxidases was 19.68 U/mL and that of manganese peroxidase was 3.62 U/mL. As pH values increased, laccase activity also increased until pH 7.0, which corresponded to 1920 U/mL. When a higher pH (pH 8.0) was tested, enzyme activity decreased to 1174 U/mL, as did total peroxidases activity (77.55 U/mL) and manganese peroxidase activity (3.73 U/mL). None of the experiments for production of any of the analyzed enzymes with fixed pH reached the maximum enzyme activities reached in the experiment with free pH.

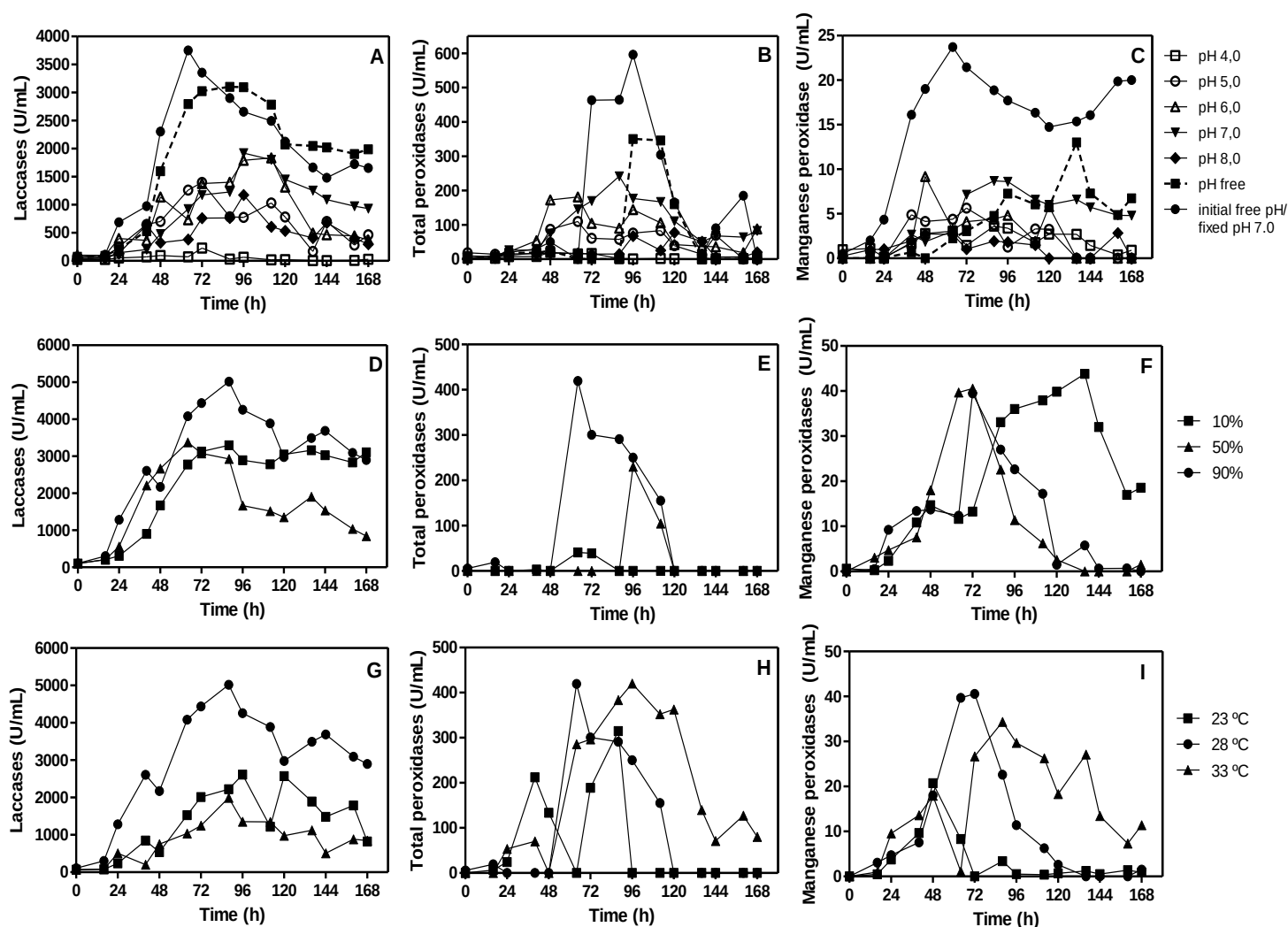


Fig.1. Optimization of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase production by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor. Parameters evaluated: pH (A - C), DO (D - F) and temperature (G - I).

Another experiment starting with free pH up to 48 h of cultivation revealed that the fungus already had considerable mycelial growth, and at which point the pH was fixed at 7.0, since this is the pH at which the fungus presented the highest activity of laccase and total

peroxidases, other than the experiment with free pH. The result was a 20% increase in laccase activity, which reached 3750 U/mL at 64 h of culture (Fig. 1A). This also represents an increase in laccase productivity from 34.61% in the free pH to 57.58% in the initial free pH/fixed pH 7.0. The activity of total peroxidases and manganese peroxidase also increased, reaching 596.14 U/mL and 23.71 U/mL, respectively (Fig. 1B and Fig. 1C). Other parameters evaluated, such as laccase specific activity, biomass substrate yield and biomass productivity (Supplementary Data 3), also affirmed that starting fungus cultivation at free pH favors its growth, while subsequent setting of the pH at 7.0 favors maximum laccase production. There is a risk in up-scaling enzyme production under an uncontrolled pH because drops in pH, due to fungal growth for example, may decrease enzymatic activity, as reported by Schneider et al. (2018). The results of the present experiments verified that the production of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase by *M. palmivorus* VE111 is associated with growth, once enzyme production occurs at the same time as the fungus grows. Furthermore, the analysis of mycelial growth in pH 4.0 (Supplementary Data 1A), which had the lowest enzymatic activity, demonstrates that the fungus grows well at any pH tested. However, the enzymatic activity at pH 4.0 is affected by the more acidic condition. Therefore, the present study shows that a more acidic pH does not interfere in mycelial growth, although it negatively influences enzymatic production.

Hariharan and Nambisan (2013) found that pH 5.0 was best for laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase production by *Ganoderma lucidum* under solid-state fermentation. Chenthamarakshan et al. (2017) also found pH 5.0 to be the optimum pH for laccase production by *Marasmiellus palmivorus* LA1 in solid-state cultivation. Cantele et al. (2017a), however, the present study reported the highest laccase activity for *M. palmivorus* VE111 at free pH and fixed pH 7.0.

3.2 Effect of dissolved oxygen concentration (DO) on LME production

After determining the best pH condition (initial free pH/fixed pH 7.0), for which all cultures had DO of 30% or above, different concentrations of DO were tested. Oxygen availability has been previously reported to have an impact on laccase production by fungi (Domingos et al., 2017), although few studies have addressed optimizing this parameter (Majeau et al., 2010). Thus, the present study aimed to evaluate the influence of oxygen on enzymatic production by varying agitation and aeration.

Little difference was found for maximum laccase activity when DO was maintained at 10% and 50%, reaching 3298 U/mL and 3377 U/mL, respectively (Fig. 1D). However, when DO was fixed at 90%, enzymatic activity reached a peak of 5017 U/mL (Fig. 1D), which corresponded to about a 34% increase in the enzymatic activity. Total peroxidases activity was also higher in the experiment with 90% DO, reaching 419.44 U/mL (Fig. 1E). Activity for manganese peroxidase was similar for all the three experiments, with 43.81 U/mL, 40.57 U/mL and 39.48 U/mL for 10%, 50% and 90%, respectively (Fig. 1F). The fungi achieved a very similar mycelial biomass in all three experiments, with values between 5.30 and 5.50 g/L (Supplementary data 1B and 4).

Thus, the difference in enzyme activity among DO concentrations, especially for laccase and total peroxidases, is likely due to the greater shear of the mycelium in 90% DO. The 90% DO treatment also had the highest agitation range (reaching 850 rpm) along with a high airflow (up to 3.0), which probably contributed to an increase in the number of hyphae tips and, consequently, the amount of enzyme secretion since many products secreted by fungi are concentrated at hyphae tips, as previously reported by Ahamed and Vermette (2009) for the production of cellulase in bioreactor. This greater fungal shear also caused a visible change to the morphology of the culture (data not shown), changing it from a pellet to mycelial clumps with more free hyphae, thus enabling a greater enzyme secretion. The optimization of yield factors, productivity and specific activity of *M. palmivorus* VE111 during the experiments with different concentrations of DO can be found in Supplementary Data 4.

3.3 Effect of temperature on LME production

Temperature mainly had an influence on laccase production. Lowering and raising the temperature by 5 °C from 28 °C (i.e., 23 °C and 33 °C), the condition of all previous experiments, decreased laccase activity by approximately 48% and 60%, respectively (Fig. 1G). Changes in temperature produced smaller differences in total peroxidases (Fig. 1H) and manganese peroxidase activity (Fig. 1H). Therefore, temperatures below or above 28 °C negatively influence laccase expression by *M. palmivorus* VE111, possibly due to reduced expression of some genes related to the transcription of the enzymes of interest. In addition, the temperature of 33 °C also negatively influenced fungus growth (Supplementary Data 1C). Hariharan and Nambisan (2013) found 27 °C to be the best temperature for laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase production by *Ganoderma lucidum*, while temperatures below (23 °C) or above (33 °C) led to reduced production of these enzymes. The present study also

corroborated Chenthamarakshan et al. (2017), who found 28 °C to be the optimum temperature for laccase production by *M. palmivorus* LA1. The optimization of yield factors, productivity and specific activity of *M. palmivorus* VE111 during the experiments with different temperatures are found in Supplementary Data 5.

3.4 Effect of CuSO₄, MnSO₄ and veratryl alcohol as inducers for LME production

The use of CuSO₄, MnSO₄ and veratryl alcohol as inducers led to increased production of the studied enzymes relative to the control, especially on the eighth day of culture in shaken flasks. All concentrations of CuSO₄ used (1 to 3 mmol/L) were found to be significantly higher than the control ($p < 0.05$) for laccase secretion (Fig. 2A), which was expected since copper atoms serve as cofactors in the catalytic core of laccase, and thus may have induced the increased laccase production (Majeau et al., 2009). The three distinct inducers significantly induced total peroxidases production at some of the concentrations tested (Fig. 2B). For manganese peroxidase (Fig. 2C), on the other hand, only 3 mmol/L MnSO₄ significantly induced production over the control, although 1 mmol/L also provided greater enzymatic activity than the control. The inductive effect of metal cations, especially Mn²⁺, on manganese peroxidase expression is well established (Hildén et al., 2005). Mäkelä et al. (2013) also verified that increased CuSO₄ in media led to higher laccase activity, and that copper ions also induced manganese peroxidase activity, which can also be concluded for the present study (Fig. 2C).

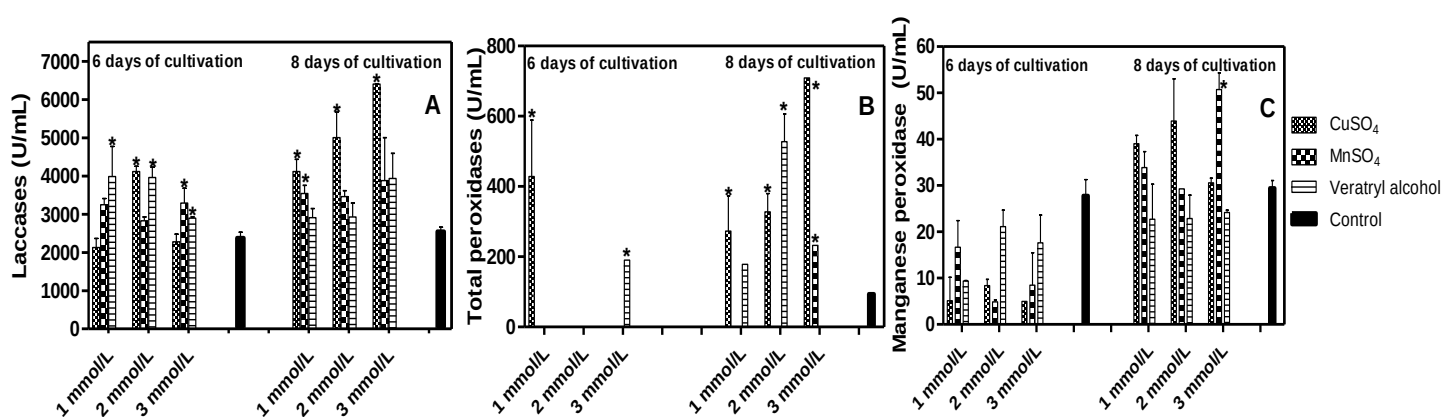


Fig.2. Effect of the concentration of different inducers on the production of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in shaken flasks.

As previously described by Vrsanska et al. (2016), cultures enriched with copper show significant laccase activity, and increased laccase activity is proportional to the concentration (amount) of CuSO₄ added (0.1 mmol/L to 1 mmol/L) for different WRBs. Some studies have

reported that excess copper may have a toxic effect on fungal biomass, thus decreasing laccase production (Majeau et al. 2009). However, in contrast, the present study found laccase production to increase proportionally with increasing CuSO₄. Although it has been suggested that the relationship between the presence of copper and laccase activity is due the fact that laccase belongs to the blue copper oxidases, which contains four copper atoms per molecule in the catalytic center (Giardina et al., 2009), the mechanism by which copper effectively stimulates laccase synthesis is not clearly understood.

Galhaup et al. (2002) also observed an increase in laccase activity in the presence of CuSO₄ (2 mmol/L) by *Trametes pubescens* MB89 in a stirred-tank bioreactor, while Baldrian and Gabriel (2002) achieved 8-fold increase in laccase production with 1 mmol/L of copper and 8.5-fold increase of activity with the addition of 2 mmol/L of cadmium. Songulashvili et al. (2015) reported a 5-fold increase in laccase production by *Cerrena unicolor* C-139 after the addition of CuSO₄ (1 mmol/L) in a bioreactor under submerged fermentation. Zhu et al. (2016) detected an 8-fold increase in laccase production by *Pleurotus ostreatus* (ACC 52857) using Cu⁺² (2 mmol/L) in shaken flasks. Other results of increased laccase activity were reported by Lamascolo et al. (2003), for *Pycnoporous cinnabarinus* employing ethanol (35 g/L); Chen et al. (2012), for *Lentinus* sp. employing CuSO₄ (0.4 mmol/L) and 2.5 xyldine (2 mmol/L); and Wang et al. (2014), for *Trametes versicolor* CICC 14001 with vanillic acid and ferulic acid. Furthermore, Kandasamy et al. (2016) found a 3-fold increase in laccase activity from *Hexagonia hirta* MSF2 by inducing with 2.5 xyldine (1 mmol/L) and CuSO₄ (0.5 mmol/L).

Regarding species of *Marasmiellus*, Tagger et al. (1998) reported increased laccase activity by *Marasmius querophiles* with 0.5 mg/L CuSO₄, while Chenthamarakshan et al. (2017), studying *Marasmiellus palmivorus* LA1, found that cupric sulphate was the factor that contributed most to laccase production and that 3 mmol/L was the best concentration, which are consistent with the results of the present work.

The results obtained in flasks led to the decision to test the best concentrations of inducers in a stirred-tank bioreactor. Thus, using CuSO₄ and MnSO₄, both at a concentration of 3 mmol/L, increased laccase activity from 5017 U/mL to 6588 U/mL (Fig. 3A), while total peroxidases activity was increased from approximately 500 U/mL to 3500 U/mL (Fig. 3B), and manganese peroxidase activity (Fig. 3C), from 39 U/mL to 60 U/mL, showing that the addition of these inducers to the culture medium was efficient.

Different from the previously performed cultures, the enzymatic peaks of both laccase and total peroxidases, and manganese peroxidase occurred later, as can be seen in Fig. 3. It

seems that, in the presence of inducers, *M. palmivorus* VE111 first consumes glucose and other nutrients present in the medium to grow, and then, only after glucose depletion (Supplementary Data 2D), consumes the inducers and increases enzyme secretion, since the inducers were present in the medium from the beginning of cultivation. However, as already reported by Galhaup and Haltrich (2001), supplementation of copper as inducer after consumption of glucose resulted in reduced laccase titers, even though significant laccase formation only began when glucose was exhausted from the medium.

In order to determine whether *M. palmivorus* VE111 produces lignin peroxidase, veratryl alcohol was used as inducer since it is a substrate for lignin peroxidase. However, no activity for this enzyme was detected according to the methodology used, suggesting that the protein is not present or the gene was not transcribed.

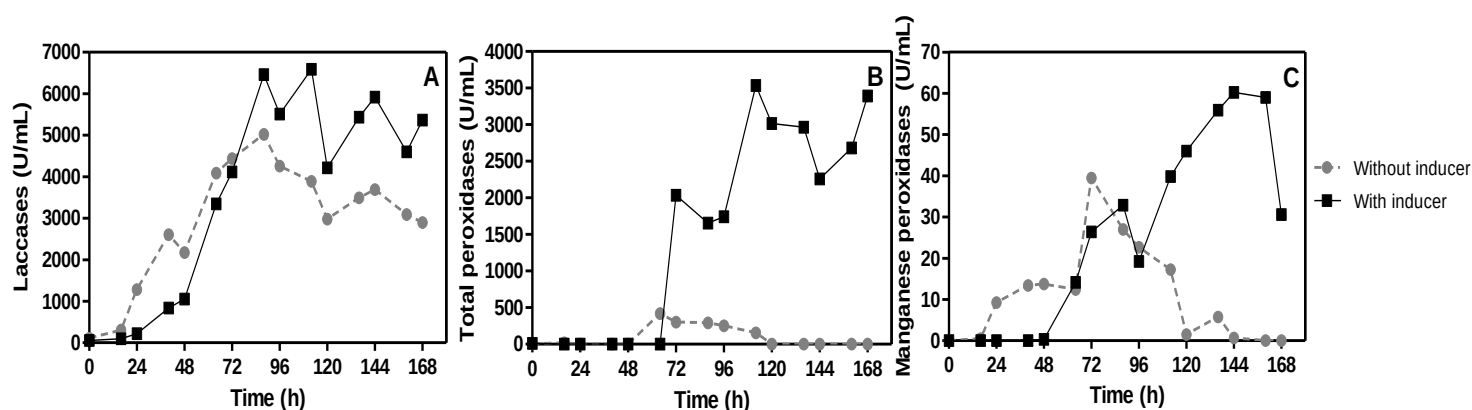


Fig.3. Comparison of the effects of absence and addition of CuSO_4 and MnSO_4 on the production of laccase, total peroxidases and manganese peroxidase by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor.

3.5 Characterization of laccase and total peroxidase

Optimized conditions for the production of laccase and total peroxidases were used to characterize these enzymes from the 112 h, which was the peak of their enzymatic activity. The optimum reaction pH for laccase (Fig. 4A) was in sodium citrate buffer (pH 3.5) while for Per (Fig. 4D) it was in McIlvaine buffer (pH 3.0). Fang et al. (2015) reported that the optimum pH for laccase from *G. lucidum* 77002 ranges from 4.5 to 5.0, depending on the substrate, while Bertrand et al. (2016) found that the optimum oxidization of all substrates by laccase from *Trametes versicolor* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* was observed at pH 3. Kandasamy et al. (2016) found that the best activity for laccase from *H. hirta* was in citrate phosphate buffer with a pH of 3.4, which are similar results to those obtained in the present study.

The optimum reaction temperature for laccase increased until 40 °C (Fig. 4B), while 25 °C (Fig. 4E) was the best temperature for total peroxidases. Similarly, Fang et al. (2015) obtained maximal activity at 45 °C for *G. lucidum* 77002, while the results of Kandasamy et al. (2016) indicated a maximum laccase activity for *H. hirta* MSF2 at 40 °C. Bertrand et al. (2016) found temperature higher for laccase activity of *Trametes versicolor* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (50 °C). Surprisingly, Zheng et al. (2017) found maximum activity of a purified laccase from *Trametes orientalis* at 80 °C.

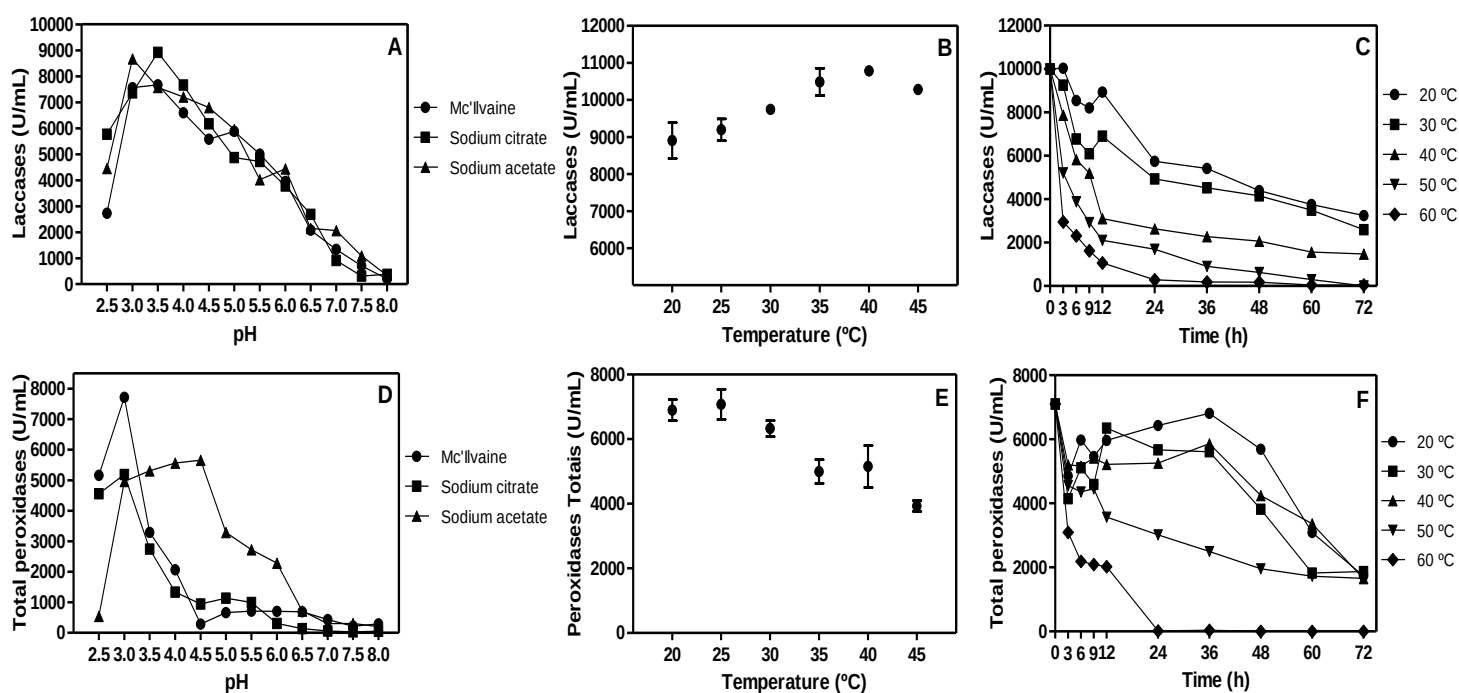


Fig.4. Characterization of laccase and total peroxidases peaks (112 h) from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor after optimization. Optimum reaction pH (A, D), optimum reaction temperature (B, E) and enzymatic thermostability (C, F).

Regarding enzymatic thermostability, laccase (Fig. 4C) was able to maintain about 50% of its activity after 24 h and around 30% after 72h of incubation at temperatures of 20 °C and 30 °C. Enzymatic activity of laccase is more affected at higher temperatures, but still maintains about 25% and 17% activity after 24h incubation at 40 °C and 50 °C, respectively. Temperatures above 50 °C result in a drastic reduction in enzyme activity shortly after the first three hours of incubation. Taking into account that cellulases used in enzymatic hydrolysis of biomasses generally exhibit stability at 50 °C, it is possible to use laccase for enzymatic treatments together with cellulases at 50 °C for a short period of time, or to use lower

temperatures for laccase with a subsequent increase in temperature for treatment by cellulases, or vice versa. The total peroxidases (Fig. 4F) were found to be more stable, maintaining its enzymatic activity at higher temperatures for a longer period of time. For example, at 40 °C total peroxidases maintained about 80% of its activity for up to 36 h, while after 24 h at 50 °C the enzyme still displayed approximately 43% of its initial activity.

Bertrand et al. (2016) found laccase activity from *Trametes versicolor* to be stable over a wide range of temperatures (25 – 70 °C) for 2 h, however, it experienced a decrease in activity of approximately 50% after 30 min at temperatures above 50 °C. Zheng et al. (2017) reported that purified laccase from *T. orientalis* was stable at temperatures below 50 °C, since more than 80% of its maximal activity was maintained after 2 h of incubation at different temperatures. Laccase purified from *G. lucidum* by Fang et al. (2015) was stable at temperatures below 55 °C, with about 90% activity retained after incubation for 2h. Thus, the results of the present study indicate that the thermostabilities of laccase and Per from *M. palmivorus* VE111 are within the range of temperatures and time of incubation reported for other white-rot fungi.

3.6 Laccase zymogram of the crude extract

Figure 5 shows the laccase zymograms performed after each step of optimizing its production. It is apparent that during the experiments with different pHs (A) DO concentrations (B) and temperatures (C), one or two possible laccase isoforms were expressed; one around 30 kDa and another around 50 kDa. In situations less favorable to enzymatic production, such as lower pH and/or lower DO, only one isoform of laccase appeared in the zymogram (~ 50 kDa), whereas in conditions more favorable to enzymatic production, such as pH closer to neutrality and/or at higher DO, a second isoform was identified (~ 30 kDa). In some steps of the experiments involving different temperatures of the culture, for example, two isoforms were identified in the zymogram, but the best condition (28 °C) produced the most intense bands. In other words, it seems that temperature induced greater protein expression, as visualized in the zymograms. Cantele et al. (2017a) and Schneider et al. (2018) previously identified one or two isoforms of laccase from *M. palmivorus* VE111.

A noteworthy result was the presence of a third isoform (Fig. 5E), between 50 and 37 kDa, in the zymogram of laccase with inducers (E), which was absent from zymograms without inducers (Fig. 5D). The presence of this third isoform is directly related to the level of transcription of the responsible gene, possibly induced by the presence of CuSO_4 , which also increased enzymatic activity compared to the absence of inducers. Thus, the addition of inducers to increase the activities of laccase and other ligninolytic enzymes was successful.

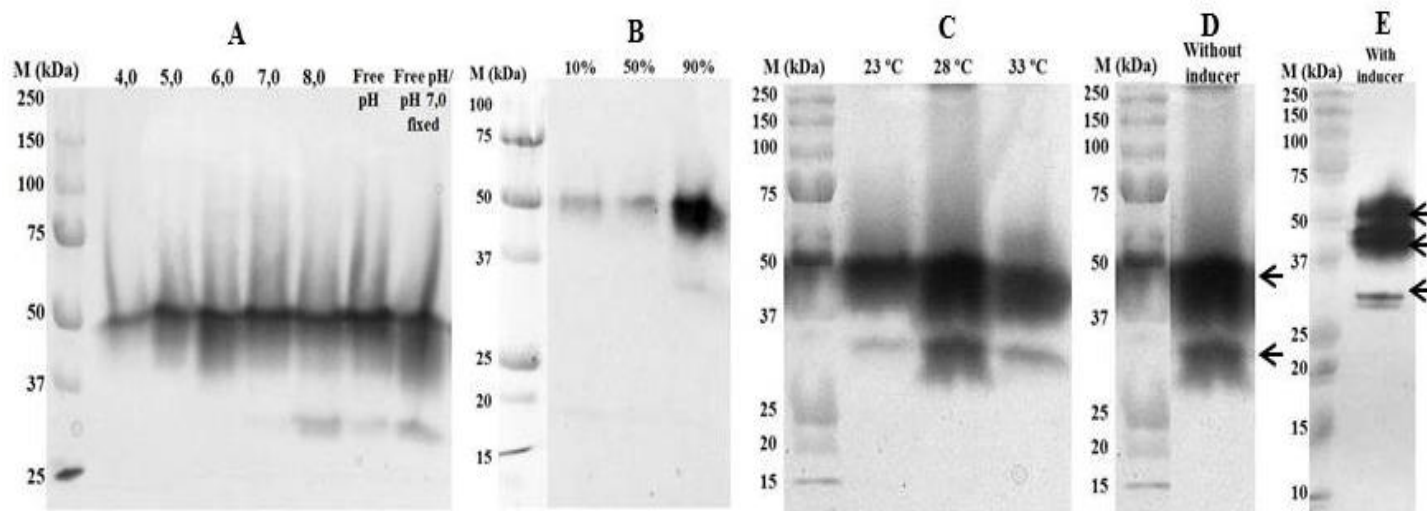


Fig.5. Zymogram of laccase activity peaks from *Marasmiellus palmivorus* VE111 observed in crude extracts of each culture in a bioreactor during optimization of conditions for the production of the enzyme. Different pHs (A), DO concentrations (B), temperatures (C), best conditions without inducers (D) and best conditions with the inducers CuSO_4 and MnSO_4 (E).

According to Gianfreda et al. (1999), although laccase activity is apparently characteristics of most basidiomycetes, the use of inducers such as aromatic substances or metal ions can increase its activity. Klonowska et al. (2001) also found that *Marasmius quercophilus* was able to secrete more than one laccase according to the growth conditions used, and succeeded in enhancing the production of three new inducible laccases when both copper and p-hydroxybenzoic acid were used in malt extract medium.

Fang et al. (2015) reported that *G. lucidum* 77002 produces three laccase isoforms, while Karp et al. (2012) identified six isoforms when the highest laccase activity was achieved for *Pleurotus ostreatus* in medium with yeast extract supplemented with CuSO_4 and ferulic acid in solid state fermentation. Yang et al. (2016) found that Cu^{2+} ions, without the use of aromatic compounds, were indispensable for efficient laccase production by *Cerrena* sp. strain HYB07, mainly through *Lac7* transcription induction.

3.7 General results of LME optimization

As can be seen in Figure 6, optimization increased laccase production by more than 2-fold, total peroxidase circa 4.5-fold and manganese peroxidase 10-fold. Likewise, Table 1 presents a summary of the main yield factors, productivity and specific activity of laccase, the enzyme of greatest interest of the present study. It is apparent that in addition to increasing laccase activity, volumetric productivity, specific activity, enzyme substrate yield and biomass substrate yield also increased, demonstrating that the steps chosen to improve enzymatic production were efficient.

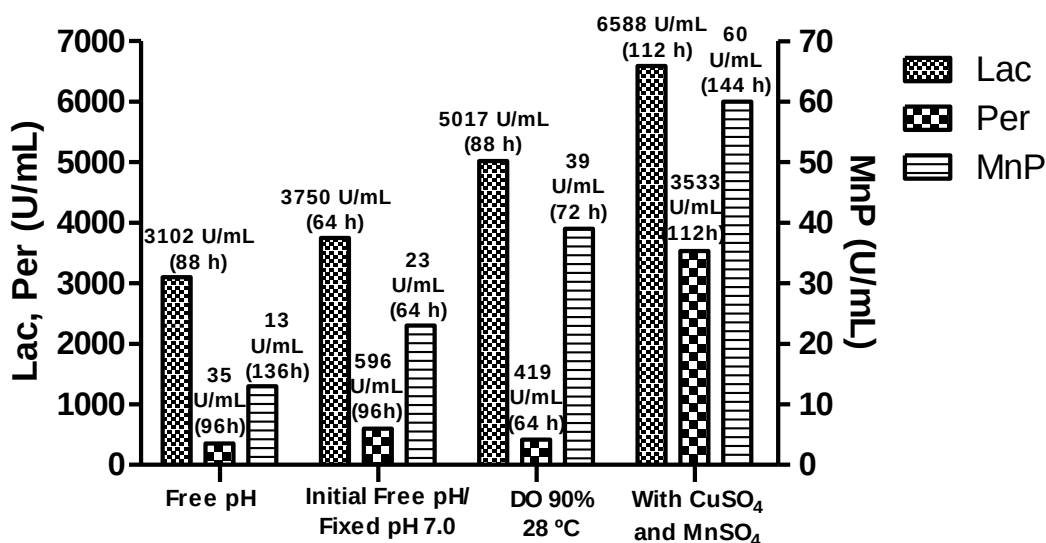


Fig.6. Comparative evolution of the production on lignin-modifying enzymes (laccase, total peroxidases and manganese peroxidase) by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor during optimization. The column graphic represents the best condition found for each step of optimization for the enzymes analyzed.

Table 1

Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor.

Parameters evaluated	Optimization results of the best conditions			
	Initial condition: pH free	Initial pH free/ fixed pH 7.0	DO (90%) Temp. (28 °C)	With inducers
Maximum laccases activity – Lac _{max} (U/mL)	3102	3750	5017	6588
Time (h)	88	64	88	112
Substrate yield on laccases – Y _{E/S} (U/g)	622 904	765 317	981 800	1 360 324
Laccases volumetric productivity – P _E (U/mL/h)	34.61	57.58	55.78	58.35
Total soluble proteins – TSP (mg/L)	308	355	329	317
Laccases specific activity – SA _{Lac} (U/mg of protein)	10 071	10 563	15 249	20 782
Laccases specific activity – SA _{Lac} (U/g of biomass)	500 322	568 181	912 181	968 823
Maximum mycelial biomass – X _{max} (g/L)	6.20	6.60	5.50	6.80
Time (h)	120	72	88	88
Substrate yield on biomass – Y _{X/S} (g/g)	1.199	1.301	1.033	1.345
Biomass volumetric productivity – P _X (g/L/h)	0.049	0.087	0.058	0.073

Regarding to the specific activity of laccase, it is observed that it is proportional to the optimization steps performed, that is, the specific activity in experiments with inducers (last step of the optimization process) is twice when compared with the initial condition (pH free). There was an increase in the specific activity of laccase, an important characteristic to industrial scale, since the enzymatic activity increased without a significant increase of biomass and/or soluble proteins. Thus, the optimization process performed in this work interfered in the microbial metabolism, in order to increase the induction and secretion of laccase, target of this study

4. Conclusion

The results presented here show that enzymatic production by *M. palmivorus* VE111 can be increased when cultures are conducted with an initial free pH for 48 h followed by a fixed pH at 7.0, a DO of 90%, a temperature of 28 °C, and the addition of CuSO₄ and MnSO₄ (3 mmol/L). The strategies employed in this study not only resulted in increased enzyme production, but also increases in yield factors and laccase productivity, as well as in the expression of a new isoform of laccase. All steps herein used are important for the increment of enzymes production in this work.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

University of Caxias do Sul (UCS), Coordination Of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Process 3255/2013) , Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (Process 16/2551-0000 246-0), Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) (34/2014).

References

- Ahamed, A., Vermette, P., 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresour. Technol.* 100, 5979–5987.
- Baldrian, P., Gabriel, J., 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 69-74.

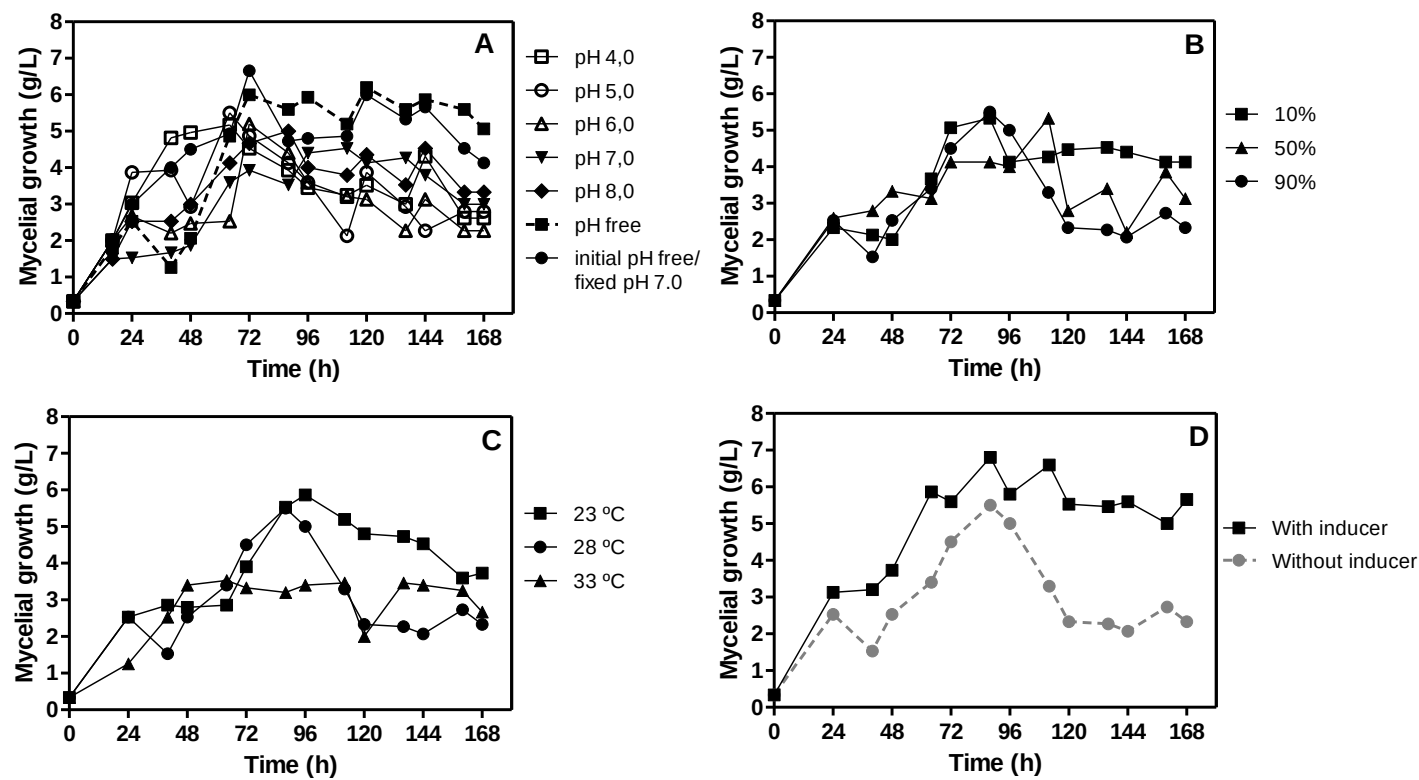
- Bertrand, B., Trejo-Hernández, M., Moráles-Guzmán, Caspeta, L., Rodrigues, R.S., Martínez-Morales, F., 2016. Functional expression, production, and biochemical characterization of a laccase using yeast surface display technology. *Fungal Biol.* 120, 1609-1622.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cantele, C., Fontana, R.C., Mezzomo, A.G., Rosa, L.O., Poletto, L., Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2017a. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. *Biocat. Agri. Biotech.* 12, 15–22.
- Cantele, C., Vilasboa, J., Reis, E.E., Fontana, R.C., Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2017b. Synthetic dye decolorization by *Marasmiellus palmivorus*: simultaneous cultivation and high laccase-crude broth treatment. *Biocat. Agri. Biotech.* 12, 314-322.
- Chen, S.C., Wu, P.H., Su, Y.C., Wen, T.N., Wei, Y.S., Wang, N.C., et al., 2012. Biochemical characterization of a novel laccase from the basidiomycete fungus *Cerrena* sp. WR1. *Protein Eng. Des. Sel.* 25, 761–769.
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P.S., Kiran Lakshmi, M.S., Ramgopal, A., Dileep, A., Nambisan, P., 2017. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of design of experiments. *BMC Biotechnol.* 17, 12.
- Domingos, M., Souza-Cruz, P.B., Ferraz, A., Prata, A.M, R., 2017. A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermisporea*. *Chem. Eng. Sci.* 170, 670-676.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Asatiani, M.D., 2018. Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 134, 39-47.
- Fang, Z., Liu, X., Chen, L., Shen, Y., Zhang, X., Fang, W., Wang, X., Bao, X., Xiao, Y., 2015. Identification of a laccase Glaccase15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels.* 8, 54.
- Galhaup, C., Haltrich, D., 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 225–232.

- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D., 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 529-536.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.-M., 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* 3, 1-25.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G., 2009. Laccases: A never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 369–385.
- Hariharan, S., Nambisan, P., 2013. Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and Laccase production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. *Bioresources.com.* 8(1), 250-271.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., Anke, T., 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1601-1606.
- Hildén, K., Martinez, A.T., Hatakka, A., Lundell, T., 2005. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genet. Biol.* 42, 403-419.
- Kandasamy, S., Muniraj, I. K., Purushothaman, N., Sekar, A., Sharmila, D.J.S., Kumarasamy, R., Uthandi, S., 2016. High Level Secretion of Laccase (LccH) from a Newly Isolated White-Rot Basidiomycete, *Hexagonia hirta* MSF2. *Front. Microbiol.* 4, 707.
- Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., Birolo, L., Giangrande, C., Soccol, V.T., Pandey, A., Soccol, C.R., 2012. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 114, 735–739.
- Klonowska, A., Le Petit, J., Tron, T., 2001. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiol. Lett.* 200, 25-30.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247-250.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature.* 227, 680-685.
- Lomascolo, A., Record, E., Herpoel-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Appl. Microbiol.* 94, 618–624.

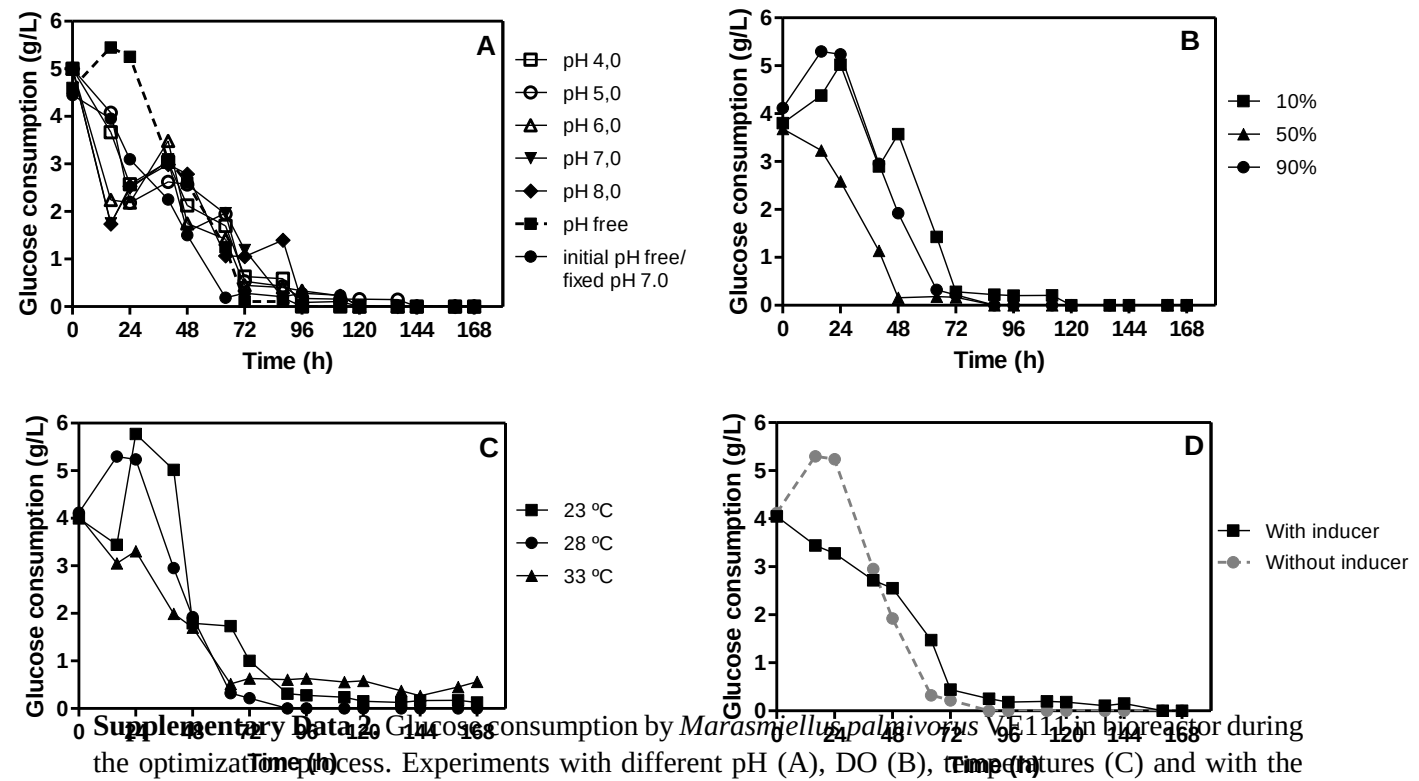
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* 101, 2331-2350.
- Mäkelä, M.R., Lundell, T., Hatakka, A., Hildén, K., 2013. Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biol.* 117, 62-70.
- Mandels, M., Reese, E. T., 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.* 73, 269-278.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E., 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* 27, 955-959.
- Pandiyani, K., Tiwari, R., Rana, S., Arora, A., Singh, S., Saxena, A.K., Nain, L., 2014. Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 55-64.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V., 2011. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Curr. Genomics.* 12, 104-112.
- Plácido, J., Capareda, S., 2015. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresour. Bioprocess.* 2:23.
- Rapp, P., Grote, E., Wagner, F., 1981. Formation and location of 1,4- β -glucanases and 1,4- β -glucosidases from *Penicillium janthinellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 857-866.
- Schneider, W.D.H., Fontana, R.C., Mendonça, S., de Siqueira, F.G., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2018. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. *Process Biochem.* 69, 1-11.
- Sharma, H.K., Xu, C., Qin, W., 2017. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste Biomass Valor.* doi: 10.1007/s12649-017-0059-y.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, National Renewable Energy Laboratory – NREL/TP-510-42623.
- Songulashvili, G., Spindler, D., Jimenez-Tobón, G.A., Jaspers, C., Kerns, G., Penninchx, M.J., 2015. Production of high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 on wheat bran. *C. R. Biol.* 121-125.

- Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J., 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 65–73.
- Tagger, S., Périsol, C., Gil, C., Vogt, G., Petit, J.L., 1998. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). *Enzyme Microb. Technol.* 2, 372-379.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2280-2284.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Vojtech, A., Kopel, P., 2016. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules.* 21, 1553.
- Wang, F., Hu, J-H., Guo, C., Liu, C-Z., 2014. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer, *Bioresour. Technol.* 166, 602–605.
- Wolfenden, R.S., Wilson, R.L., 1982. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 02, 805-812.
- Wong, D.W., 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 157,174–209.
- Yang, Y., Wei, F., Zhuo, R., Fan, F., Liu, H., Zhang, C., Ma, L., Jiang, M., Zhang, X., 2013. Enhancing the Laccase Production and Laccase Gene Expression in the White-Rot Fungus *Trametes velutina* 5930 with Great Potential for Biotechnological Applications by Different Metal Ions and Aromatic Compounds. *Plos One.* 8(11), e79307.
- Yang, J., Wang, G., Ng, T.B., Lin, J., Ye, X., 2016. Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. *Front. Microbiol.* 6, 1558.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorfand, K., Dalboge, H., 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 834-841.

- Zeng, J., Mills, M. J. L., Simmons, B. A., Kent, M. S., Sale, K. L., 2017., Understanding factors controlling depolymerization and polymerization in catalytic degradation of β -ether linked model lignin compounds by versatile peroxidase. *Green Chem.* 19, 2145-2154.
- Zheng, F., An, Q., Meng, G., Wu, X-J., Dai, Y-C., Si, J., Cui, B-K., 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 758-770.
- Zhu, C., Bao, G., Huang, S., 2016. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 30(2), 270-276.
- Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F., Zhang, X., 2017. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochem. Eng. J.* 117, 62-72.



Supplementary Data 1. Kinetic growth of *Marasmiellus palmivorus* VE111 in bioreactor during the optimization process. Experiments with different pH (A), DO (B), temperatures (C) and with the addition of inducers (D).



Supplementary Data 2. Glucose consumption by *Marasmiellus palmivorus* VE111 in bioreactor during the optimization process. Experiments with different pH (A), DO (B), temperatures (C) and with the addition of inducers (D).

Parameters evaluated	pH						
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	Free pH	initial pH free/ Fixed pH 7.0
Maximum laccases activity – $\text{Lac}_{\max}$ (U/mL)	227	1399	1834	1920	1174	3102	3750
Time (h)	72	72	112	96	96	88	64
Substrate yield on laccases – $Y_{E/S}$ (U/g)	46 681	299 328	363 522	369 400	231 177	622 904	765 317
Laccases volumetric productivity – P_E (U/mL/h)	2.83	18.58	15.48	19.23	11.85	34.61	57.58
Total soluble proteins – TSP (mg/L)	336	368	428	391	377	308	355
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/mg of protein)	675	3 801	4 285	4 910	3 114	10 071	10 563
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/g of biomass)	43 907	254 363	352 692	423 841	234 800	500 322	568 181
Maximum mycelial biomass – $X_{\max}$ (g/L)	5.17	5.50	5.20	4.53	5.0	6.20	6.60
Time (h)	64	64	72	112	88	120	72
Substrate yield on biomass – $Y_{X/S}$ (g/g)	1.106	1.155	1.019	0.838	0.949	1.199	1.301
Biomass volumetric productivity – P_X (g/L/h)	0.075	0.081	0.067	0.037	0.053	0.049	0.087

Supplementary Data 3. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different values of pH.

Parameters evaluated	OD (%)		
	10	50	90
Maximum laccases activity – $\text{Lac}_{\max}$ (U/mL)	3298	3377	5017
Time (h)	88	64	88
Substrate yield on laccases – $Y_{E/S}$ (U/g)	668 619	679 875	981 800
Laccases volumetric productivity – P_E (U/mL/h)	36.32	51.20	55.78
Total soluble proteins – TSP (mg/L)	316	357	329
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/mg of protein)	10 436	9 459	15 249
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/g of biomass)	622 264	637 170	912 181
Maximum mycelial biomass – $X_{\max}$ (g/L)	5.30	5.30	5.50
Time (h)	88	112	88
Substrate yield on biomass – $Y_{X/S}$ (g/g)	1.038	1.029	1.033
Biomass volumetric productivity – P_X (g/L/h)	0.056	0.044	0.058

Supplementary Data 4. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different dissolved oxygen concentration (DO).

Parameters evaluated	Temperature (°C)		
	23	28	33
Maximum laccases activity – $\text{Lac}_{\max}$ (U/mL)	2611	5017	1994
Time (h)	96	88	88
Substrate yield on laccases – $Y_{E/S}$ (U/g)	538 559	981 800	438 097
Laccases volumetric productivity – P_E (U/mL/h)	26.48	55.78	21.88
Total soluble proteins – TSP (mg/L)	316	357	329
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/mg of protein)	8 262	15 249	6 060
Laccases specific activity – SA_{Lac} (U/g of biomass)	445 563	912 181	564 872
Maximum mycelial biomass – $X_{\max}$ (g/L)	5.86	5.50	3.53
Time (h)	96	88	64
Substrate yield on biomass – $Y_{X/S}$ (g/g)	1.170	1.033	0.730
Biomass volumetric productivity – P_X (g/L/h)	0.057	0.058	0.049

Supplementary data 5. Results of yield factors, productivity, and specific activity of *Marasmiellus palmivorus* VE111 cultivation in stirred-tank bioreactor under different values of temperatures.

Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing enzymes to enhance second-generation ethanol yield

Willian Daniel Hahn Schneider^{a*}, Roselei Claudete Fontana^a, Henrique Macedo Baudel^b, Félix Gonçalves de Siqueira^c, Jorge Rencoret^d, Ana Gutiérrez^d, Laura Isabel de Eugenio^e, Alicia Prieto^e, María Jesús Martínez^e, Ángel T. Martínez^e, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^a

^a*Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.*

^b*America Biomass Technologies, Ipiranga Street, 1583, 13419-190 Piracicaba, SP, Brazil.*

^c*Embrapa Agroenergy, Biological Station Park, North Wing, 70770-901 Brasília, DF, Brazil.*

^d*Institute of Natural Resources and Agrobiology of Seville, CSIC, Reina Mercedes 10, E-41012 Seville, Spain.*

^e*Biological Research Center, Department of Environmental Biology, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.*

*corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2681

E-mail address: willianschneiderwhs@yahoo.com.br (W.D.H. Schneider)

Abstract

The lignocellulosic biomass on Earth represents a sustainable feedstock for the manufacture of bio-products faced to our current dependence on fossil-based resources and the increase of related environmental problems. The production of second-generation ethanol from renewable biomass, known as bioethanol, has been the focus of a large number of recent investigations. In nature, fungi play a key role in the decomposition and recycling of organic matter, mainly lignocellulosic. Among them, white-rot basidiomycetes (WRBs) secrete oxidoreductases that act in the depolymerization of lignin, which is the main hurdle in the biorefinery context due its recalcitrance. In this work, the secretome from a newly isolated WRB *Marasmiellus palmivorus* VE111 was studied and its potential to modify lignin in *Eucalyptus globulus* biomass was evaluated, aimed to enhance the saccharification by cellulolytic and xylanolytic enzymes from *Penicillium echinulatum* S1M29. In addition, two different strategies, namely laccase treatment before and after enzymatic hydrolysis, were employed to detoxify steam-

exploded *E. globulus* wood. The target is to increase the fermentative performance by removing substances formed during the feedstock pretreatment that can inhibit microbial fermentation. Proteomic analyses of the secretome of *M. palmivorus* showed that laccases are among the most predominant enzymes released by this fungus. Due the presence of these and other oxidoreductases, its application to *E. globulus* wood resulted in around 30% decrease of the lignin content, and 10% increase of the glucose yield after hydrolysis. An important finding of the present work was the successful wood delignification in the absence of laccase mediators. This laccase-rich preparation also demonstrated its potential in removing phenolic inhibitors present in steam-exploded *E. globulus* wood, increasing the ethanol yield by in an additional 10%.

Keywords

Laccase, Secretome, White-rot basidiomycete, Marasmiellus palmivorus, Enzymatic hydrolysis, Bioethanol

1. Introduction

Biofuels have been a research priority during the last decades to develop an eco-friendly and sustainable alternative to fossil fuels, and mitigate problems related to carbon dioxide emission and global warming [1-3]. Lignocellulosic materials are seen as a strong potential to be harnessed since they constitute the most abundant renewable energy resource available on Earth. Therefore, they represent a sustainable environmental alternative to produce not only fuels, but other chemicals and materials [4-8]. Among biomass sources, *Eucalyptus* spp. plantations, extensively used in southwest Europe, Brazil and South Africa, represent a viable raw material because of their very fast growth [9,10].

However, one of the bottlenecks for the use of lignocellulosic materials lies in the intrinsic recalcitrance of lignin, a bio-heteropolymer considered as the main aromatic renewable resource in Earth [11]. Unfortunately, cellulose and hemicelluloses are linked by lignin and, in the biorefinery context, this is seen as a problem because it is mostly regarded to hamper the cellulose breaking, as a fermentation inhibitor, sugar contaminant, etc [12]. Therefore, removal of lignin plays a key role in the bioethanol production from renewable biomass [13,14].

Research efforts for enzymatic lignin depolymerization are increasing every year, since this technology would enable both to remove lignin from biomass and also to produce value-added compounds from lignin [15]. In this perspective, many studies about secretome of WRBs

were performed, since they are unique in their ability to degrade all polymeric components of lignocellulosic substrates, increasing its interest in white biotechnology [16,17]. Regarding to enzymatic degradation of lignin, extensive researches focused on peroxidases and laccases, the latter being particularly abundant in many lignin-degrading WRBs. Laccases are considered as “green tools” since they are extracellular multi-copper enzymes that only require molecular oxygen as electron acceptor and generate water as the only byproduct, while oxidizing various aromatic and non-aromatic compounds [18-21].

Taking into account that biomass requires pretreatment before being converted into sugars and bioethanol, to remove and/or break down lignin for making the holocellulose more accessible to enzymatic hydrolysis, laccases present further applicability. These oxidoreductases are also able to perform detoxification of pretreated biomass. Among biological, physical and chemical pretreatments [22], the steam explosion, in combination or not with an acidic catalyst, is one of the most used methods [23]. However, this pretreatment produces some inhibitory compounds, soluble or embedded in the biomass (like weak acids, furan derivatives and phenols) originating from fractionation of sugars and lignin, which can affect both enzymatic hydrolysis as well as fermentation steps. In this sense, laccases are also able to perform detoxification of pretreated biomass [13,24,25].

Considering the potential of both polymerization and depolymerization of laccases, the present work seeks to apply, within the perspective of green chemistry, enzymes produced by two fungi isolated by the research group, *Marasmiellus palmivorus*, laccase-producing WRB, and *Penicillium echinulatum*, ascomycete secretor of cellulases and xylanases, for the production of second-generation ethanol. Therefore, in order to elucidate the enzymatic arsenal present in *M. palmivorus*, we analysed the secretome of this fungus. The laccases present in the secretome were used in experiments for lignin degradation in *E. globulus* wood, to verify its effect in the increase of saccharification performed by the holocellulolytic complex of *P. echinulatum*. Also, the effect of laccases in the detoxification of steam-exploded *E. globulus* wood and subsequent saccharification, yeast growth and ethanolic fermentation were evaluated (Fig. 1).

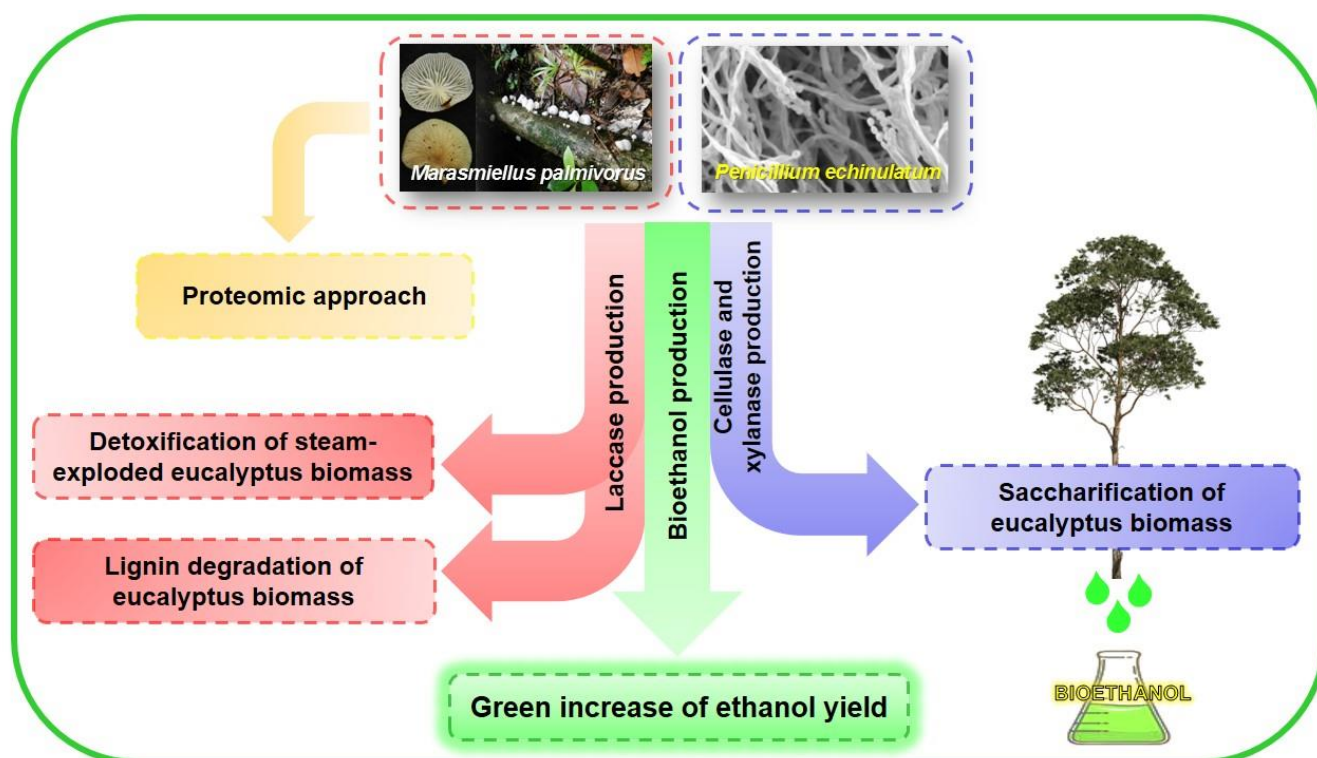


Fig. 1. Overview of the workflow developed to increase the production of second-generation ethanol with lignocellulolytic enzymes. Whole enzymatic broth of two fungal species, the basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 (rich in laccases), and the ascomycete *Penicillium echinulatum* S1M29 (rich in cellulases and hemicellulases) were used in different green strategies to improve the second-generation ethanol yields from *Eucalyptus globulus* biomass.

2. Material and methods

2.1 Fungi and maintenance

For production of lignin-degrading enzymes, the white-rot basidiomycete *M. palmivorus* VE111 was used. This isolate was collected from a decomposing palm tree trunk in Itapeva Park in the city of Torres, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The strain used in this work is linked to autochthonous macrofungi from Southern Brazil (SISGEN n° ACCE62) deposited in the mycological section of the Herbarium of the University of Caxias do Sul (HUCS/MIUCS) with duplicates deposited in the Alarich Schultz Herbarium (HAS) of the Zoobotanic Foundation of Rio Grande do Sul (FZB/RS). *M. palmivorus* VE111 was grown on potato dextrose agar (PDA) maintenance medium in Petri dishes and kept in a germinating chamber (Oxylab) at 28 °C for seven days [26].

For cellulase and xylanase production, the strain *P. echinulatum* S1M29 was used, which was obtained from mutant strain 9A02S1 (deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSM 18942) after several steps of mutagenesis [27]. The strain was grown and maintained in cellulose-agar (C-agar) slant tubes for 7 days at 28 °C until the formation of conidia, and then stored at 4 °C, as shown in Dillon et al. [28].

Both strains belong to the Collection of Microorganisms of the Laboratory of Enzymes and Biomass of the University of Caxias do Sul.

2.2 Enzyme production

Lignin-degrading enzymes were produced in optimized submerged cultivation in a stirred-tank bioreactor (New Brunswick, BioFlo/CelliGen115), as described by Schneider et al. [29]. The medium employed for both the pre-inoculum and the bioreactor was composed of 0.5% (w/v) glucose, 0.18% (w/v) casein, 5% (v/v) mineral solution [30], 3 mmol/L of copper sulphate (CuSO₄), 3 mmol/L of manganese sulphate (MnSO₄) and potato broth (200 g of minced potatoes boiled in 1 L water). The operation volume of the bioreactor was 5 L. The content of a pre-inoculum of four days of cultivation, representing 10% (v/v) of the total operating volume, was transferred into the bioreactor. The operational conditions were: free initial pH until 48 h/then fixed pH 7.0, 90% of dissolved oxygen concentration (agitation: 200–850 rpm; airflow: 0.5–3.0 vvm), and temperature set at 28 °C. The culture was harvested after 120 h, centrifuged, and the supernatant collected and used in the subsequent experiments.

Cellulases and xylanases production was carried out by solid-state cultivation (SSC) on static trays, according to Camassola and Dillon [31] and by submerged cultivation (SC) also in a stirred-tank bioreactor, according Reis et al. [32]. The medium for solid-state cultivation was contained 50% (w/w) wheat bran, 25% (w/w) elephant grass, 25% (w/w) sugarcane bagasse and 1 mL/g of dry mass of mineral solution. [30]. Each tray was then inoculated with a conidial suspension to give a final concentration of 1×10^6 conidia per gram of dry mass of production medium. Moisture was adjusted to 67% by the addition of sterile distilled water. The trays were incubated in a chamber at 28°C with air relative humidity of 90% for 96 h. After this, enzymes were extracted with 15 mL of sodium citrate buffer 0.05 mol/L, pH 4.8 per each gram of dry biomass (15:1 v/w). The extraction was carried out for 1 h under gentle agitation (100 rpm). The medium for submerged cultivation was composed of 1% (w/v) cellulose *Celuflok E*[®], 0.5% (w/v) sucrose; 0.2% (w/v) soybean meal; 0.5% (w/v) wheat bran; 0.05% (w/v) yeast extract (Prodex[®]); 1 mL/L Tween 80[®]; 500 mL of the mineral solution [30], 500 mL of inoculum and

distilled water to complete the working volume of the 5 L bioreactor. The culture was carried out in fed-batch with cellulose as carbon source for 168 h (0.26 g/L/h) at 28 °C, pH 6.0, with agitation between 150 and 300 rpm. When the experiment was terminated, the supernatant was collected and centrifuged to remove solid residues.

After enzymes production, a cocktail of mixed enzymes from both submerged and solid-state cultivation (SC/SSC = 2:1 v/v) was elaborated.

2.3 Enzymatic assays

2.3.1 Laccase and total peroxidases

The activity of laccases was determined kinetically, according to Wolfenden and Willson [33], by quantifying the product of the oxidation of 5 mmol/L 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS; cation radical $\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), with 0.2 mol/L of sodium acetate buffer, pH 5.0. Total peroxidase activity was measured using the same method as for laccase with 5 mmol/L ABTS as substrate, but with the addition of 2 mmol/L H_2O_2 in the reaction mixture, according to Heinzkill et al. [34]. This activity was calculated in the same way as for laccase, with laccase activity (i.e. ABTS oxidation in the absence of H_2O_2) being subtracted from the activity measured in the presence of H_2O_2 .

2.3.2 Cellulases and xylanases

Total activity of cellulases (*Filter Paper Activity*, FPA) was measured using Whatman N° 1 filter paper as a substrate, as described by Camassola and Dillon. [35]. Endoglucanase activity was determined according to Ghose [36], using 2% (w/v) carboxymethyl cellulose. β -glucosidase activity was measured using 0.4% (w/v) of *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG), according Daroit et al. [37]. Xylanase activity was determined as described by Bailey et al. [38] using 1% (w/v) of xylan (from oat spelts), in 0.05 mol/L sodium citrate buffer, pH 4.8. The concentration of reducing sugars was estimated using the dinitrosalicylic acid method. [39]. All reactions were carried out in 0.05 mol/L sodium citrate buffer, pH 4.8.

2.4 Determination of soluble proteins

Quantification of total soluble proteins was performed according to the Bradford method [40], employing a calibration curve of bovine serum albumin (SBA).

2.5 SDS-PAGE electrophoresis

To determine the molecular mass of the proteins present in the enzymatic broths of *M. palmivorus* VE111, polyacrylamide gel electrophoresis containing 0.1% (m/v) sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed, according to the methodology described by Laemmli [41]. After sample standardization, 15 µL of sample (~16,7 µg of protein) and 5 µL of loading buffer was applied to each gel lane after incubation at 100 °C for 10 min. The electrophoretic run was performed in Bio Rad Mini Protean System Cell. The gels were stained by incubating for 30 min in a solution of 0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, in 50% (v/v) distilled water, 40% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid, and then washed with distilled water and immersed in a 60% (v/v) water, 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid solution for 30 min. The entire process was performed under reciprocal agitation, until bands were visualized.

2.6 Zymogram of laccase in native gel

The native gel and loading buffer were prepared following the Laemmli protocol [41], in the absence of SDS. 15 µL of sample were applied to each lane. For revealing the activity bands, the gel was first washed with 100 mmol/L sodium acetate buffer (100 mmol/L), pH 4.5, for 10 min. Subsequently, it was incubated in a solution of 5 mmol/L ABTS in 100 mmol/L sodium acetate buffer, pH 4.5, until bands were visualized. Laccase activity in gels was also monitored employing a solution of 5 mmol/L 2,6-dimethoxyphenol (DMP).

2.7 Digestion of proteins for analysis by mass spectrometry

M. palmivorus VE111 samples were subjected to proteomic analysis. Protein digestion for mass-spectrometry analysis was performed in two steps. First, the gel bands from SDS-PAGE were cut into fragments of about 1x1 mm in 0.5-1.5 mL Eppendorf tubes and SDS removed with ultrapure water. The fragments were dehydrated with 150 µL acetonitrile (ACN) 100% in 50 mmol/L NH₄HCO₃ and reduced with 150 µL of 10 mmol/L dithiothreitol (DTT) in 50 mmol/L NH₄HCO₃. After this, band alkylation was performed with the addition of 150 µL of 55 mmol/L iodoacetoamide (IAA) in 50 mmol/L NH₄HCO₃, incubating for 20 min in the dark at room temperature. In-gel tryptic digestion was carried out by addition of 100 µL of a solution containing 15 µg of PierceTM trypsin solubilized in 285 µL 50 mmol/L of ice-cold NH₄HCO₃. The samples remained overnight at 37 °C. The mixture of peptides obtained from tryptic digestion was recovered after two extraction steps, the first with 100 µL of 100% ACN (700 rpm, 37 °C for 15 min, followed by sonication for 5 min) and the second with 100 µL of

0.5% trifluoroacetic acid (TFA). The extracts were combined and concentrated in a speed-vac up to a final volume around 1 μ L, and stored at -20 °C until analysed by mass spectrometry.

2.8 Liquid chromatography and mass spectrometry

Peptides were trapped onto a Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific) precolumn, and then eluted onto a Acclaim PepMap 100 C18 column and separated at a flow-rate of 250 nL/min on a nanoEasy HPLC (Proxeon) coupled to a nanoelectrospray (Thermo Scientific) using the following gradient: 160 min 0% - 35% Buffer B; 10 min 35% - 100% Buffer B; 10 min 100% Buffer B (Buffer A: 0.1% formic acid, 2% acetonitrile and Buffer B: 0.1% formic acid in acetonitrile). Mass spectra were acquired on an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo-Scientific) in the positive ion mode. Full-scan MS spectra (m/z 400-15,000) were acquired in the Orbitrap at a resolution of 60,000 and the 15 most intense ions were selected for collision induced dissociation (CID) fragmentation in the linear ion trap with a normalized collision energy of 35%. Singly charged ions and unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with exclusion duration of 45 s.

2.9 MS data analysis

Mass spectra *.raw files were searched against Uniprot Basidiomycota (including 1,904,909 protein sequence entries), using the Sequest search engine through Proteome Discoverer (version 1.4.1.14) (Thermo Scientific). Search parameters included a maximum of two missed cleavages allowed, carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification and oxidation of methionine as variable modifications. Precursor and fragment mass tolerance were set to 10 ppm and 0.5 Da, respectively. Identified peptides were validated using the Percolator algorithm with a q-value threshold of 0.01 [42].

2.10 *Eucalyptus globulus* wood

The wood of *E. globulus* was provided by Flosul Woods, city of Capivari, Rio Grande do Sul, Brazil. For this work, *E. globulus* chips and biomass pretreated by steam explosion were used. The steam explosion pretreatment of *E. globulus* were performed by America Biomass Technologies, Piracicaba, Brazil. The feedstock (*E. globulus* chips) was pretreated with saturated steam (20 bar) in a 200-L batch STEX[®] reactor (America Biomass Technologies, Brazil) at 17.5 kgf/cm² (approximately 205 °C) for 10 minutes. After the reaction, the reactor was discharged and the steam-treated material (slurry) was collected in a 6000-L blow-tank.

Subsequently, the dry pretreated biomass (solid part) was separated from the free liquid produced during the process. The biomass, after drying in estufa at 65 °C and humidity lower than 10%, was used for the enzymatic studies in this study.

2.11 Detoxification of steam-exploded *E. globulus* wood using the laccase-rich secretome

The extracellular enzyme extract of *M. palmivorus* VE111 was used as the source of laccase activity to evaluate the effect of the treatment on the phenolic content of *E. globulus* biomass pretreated by steam explosion. Detoxification reactions were performed in triplicate, in conical 50-mL polypropylene tubes containing 5% (w/v) dry biomass, 50 U laccase activity per gram of dry biomass, and 0.05 mol/L sodium citrate buffer, pH 4.8. Reactions were incubated at 50 °C in shaker-incubator at 180 rpm, for 6 h. Then, the reaction mixture was centrifuged, and the supernatant collected for analysis of total phenolic compounds and molecular mass distribution. A control sample without enzyme was treated and analyzed in the same experimental conditions.

2.12 Phenolic content and molecular-mass distribution

Free phenols content was quantified according to the Folin-Ciocalteu method [43] with adaptations, using the Folin-Ciocalteu reagent. The results were expressed as grams of gallic acid equivalents per liter. Changes in the molecular mass distribution of the soluble fraction of *E. globulus* wood pretreated by steam explosion and treated with laccase from *M. palmivorus* VE111 were analyzed by gel filtration on Superdex-75. Controls incubated under the same conditions (without laccase) were also analyzed. Samples (1 mL) were filtered and 200 µL were injected onto a Superdex-75 column equilibrated with NaOH 0.05 mol/L, LiCl 0.025 mol/L. The flow rate was adjusted to 0.5 mL/min and the fractions eluted were spectrophotometrically monitored at 280 nm.

2.13 Laccase treatment of *E. globulus* wood

Wood of *E. globulus* was treated with the whole enzymatic broth of *M. palmivorus* VE111. The wood chips of eucalyptus were milled and passed through a 40-mesh sieve. The experiments were run in duplicate in 1 L Duran flasks, using a total amount of 5 g of eucalyptus biomass, and a laccase loading of 50 U/g of dry biomass, in sodium citrate buffer (0.05 mol/L, pH 4.8), incubated in a shaker at 40 °C, at 150 rpm, under O₂ atmosphere (2 bars) for 12 h. Controls without laccase were performed also in duplicate. After the treatment, the samples

were filtered through a Büchner funnel and washed with 1 L of water. In sequence, the solid part was submitted to a peroxide-reinforced alkaline extraction using 1% (w/w) sodium hydroxide and 3% (w/w) hydrogen peroxide, at 80 °C in a bath for 90 min, followed by water washing. Four successive enzyme-extraction treatments were applied, as proposed by Rico et al. [10], with modifications. The lignin content was estimated by the Klason method, mentioned below.

2.14 Two-dimensional nuclear magnetic resonance (2D-NMR) spectroscopy

Samples of *E. globulus* untreated (control) and treated with laccases were submitted to 2D-NMR. The 2D heteronuclear single quantum coherence (HSQC) NMR experiments were performed at the gel state, which is an *in situ* analysis of the whole cell wall [44,45]. This approach does not require previous lignin isolation and avoids possible alterations and material losses during the isolation process. 75 mg of ball-milled samples were transferred into 5-mm NMR tubes and swollen in 0.7 mL of deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- d_6) forming a gel inside the tube [37]. 2D HSQC NMR spectra were recorded at 300 K on a Bruker AVANCE III 500 MHz spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a 5-mm TCI gradient CryoProbe with inverse geometry. An adiabatic HSQC pulse sequence (Bruker standard “hsqcetgpsisp.2”), which enabled a semiquantitative analysis of the different ^1H - ^{13}C correlation signals [46], was utilized. HSQC spectra were acquired from 10 to 0 ppm (5000 Hz) in F2 (^1H) using 1000 data points for an acquisition time (AQ) of 100 ms, an interscan delay (D1) of 1 s, and from 200 to 0 ppm (25 168) in F1 (^{13}C) using 256 increments of 32 scan, for a total AQ of 2 h 34 min. The $^1J_{\text{CH}}$ used was 145 Hz. Processing used typical matched Gaussian apodization in ^1H and a squared cosine bell in ^{13}C . The central solvent peak was used as an internal reference ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 39.5/2.49).

The lignin and carbohydrate correlation signals in HSQC spectra were assigned by comparison with the literature [45,47]. The ^1H - ^{13}C correlation signals from the aromatic region of the spectrum were used to estimate the content of lignin (relative to the content of amorphous carbohydrates, estimated from the anomeric xylose and glucose signals) and the lignin composition in terms of G and S units. The $\text{C}_\alpha\text{-H}_\alpha$ correlation signal in the aliphatic-oxygenated region was used to estimate the abundance of the $\beta\text{-O-4}$ lignin inter-unit linkages. Likewise, $\text{S}_{2,6}$ and G_2 signals were used to estimate the relative abundances of the aromatic units – as signal $\text{S}_{2,6}$ involves two proton-carbon pairs, their volume integral was halved.

2.15 Enzymatic saccharification of eucalyptus biomass

Both wood and steam-exploded *E. globulus* wood samples were used for enzymatic saccharification. The reactions were carried out in 50 mL Duran® flasks containing 5% of dry biomass in sodium citrate buffer (0.05 mol/L, pH 4.8). For steam-exploded eucalyptus, the experiments were performed in triplicate at 50 °C for 72 h at 160 rpm. In order to evaluate the effect of the laccase-rich enzymatic broth of *M. palmivorus* VE111 in the saccharification process and, subsequently, in the ethanolic fermentation, it was added either before or after saccharification. The laccase treatment was conducted for 6 h and the saccharification for 72 h. An enzymatic loading of 50 U of laccase and 30 U of cellulase per gram of dry biomass was employed. Control conditions without laccases (only buffer and cellulases) were also tested.

For eucalyptus wood, in which the enzymatic treatment with laccases was already performed as described in section 2.14, the enzymatic saccharification was carried out with 30 U of cellulase per gram of dry biomass. The same saccharification conditions were used for both control (without laccase) and treatment (with laccase). After saccharification for 72 h, the samples were centrifuged, and the supernatant collected for analysis of sugars and reserved for ethanolic fermentation. The analysis of sugars by high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out with a LC-20AD Shimadzu chromatography system, DGU-14A mobile phase degasser, CTO-20A column oven, and RID-10A and SPD-20A (photodiode array) detectors for refractive index and ultraviolet measurements, respectively. The analysis was performed on an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad®) at 60 °C, preceded by Cation-H pre-column and eluted with 5 mmol/L H₂SO₄ mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min.

The glucose and xylose yields were calculated according to the equations below (1 and 2, respectively):

$$Y_G (\%) = (g / ((gWIS/100) \times SL)) \times 100 \quad (1)$$

$$Y_X (\%) = (x / ((xWIS/100) \times SL)) \times 100 \quad (2)$$

where Y_G and Y_X are, respectively, the glucose and xylose yield expressed as % relative to grams of glucose and xylose released after enzymatic hydrolysis per 100 g of glucose and xylose present in the water insoluble solids (WIS); g and x (glucose and xylose concentration after enzymatic hydrolysis, in g/L); $gWIS$ and $xWIS$ (content of glucose and xylose in the WIS, in %, after the biomass characterization); SL (load of solids, in g/L).

2.16 Ethanolic fermentation and yeast cell density

Sugars released from *E. globulus* wood were fermented to ethanol using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, with 10% (w/v) of viable cells after 24 h of inoculum. This yeast ferments glucose but has no fermentative activity on pentoses. Enzymatic hydrolysis and fermentation were carried out separately. The experiments were performed in 5 mL tubes with 4 mL of total reaction volume, comprising 3.2 mL of hydrolyzate, 0.4 mL of yeast inoculum and 0.2 mL of a supplementation of Prodex and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to obtain a final concentration of 4 mg/mL and 1 mg/mL, respectively. The ethanolic fermentation was carried out at 28 °C under stationary conditions. Samples were taken to determine the consumption of glucose and ethanol production by HPLC. The ethanol yield was calculated according to the two consecutive equations below (3 and 4):

$$Y_{E/G} (\text{g/g}) = (E_f - E_i) / (G_i - G_f) \quad (3)$$

$$Y_E (\%) = (Y_{P/S} / f_{\text{ethanol}}) \times 100 \quad (4)$$

where $Y_{E/G}$ is the ratio of product yield (ethanol) relative to substrate (glucose) referred to grams of ethanol per g of glucose present in WIS; E_f (final ethanol); E_i (initial ethanol); G_f (initial glucose); G_i (final glucose); Y_E (ethanol yield expressed as % of the theoretical maximum yield of ethanol); f_{ethanol} (ethanol stoichiometric conversion factor 0.511 g of ethanol per g of glucose).

The cell density of *S. cerevisiae* CAT-1 after 24 h of fermentation was measured in a spectrophotometer at 600 nm.

2.17 Characterization of *E. globulus* wood

E. globulus wood, both untreated and pretreated by steam explosion, was characterized for protein amount, structural carbohydrates and acid-insoluble lignin. Extractives were determined only for untreated *E. globulus* wood.

- Extractives. The quantification of the extracts present in the biomass of *E. globulus* was carried out according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42619) [48].
- Ashes. The ash determination was performed via gravimetry, according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42621) [49].

- **Proteins.** Protein was determined by quantification of total nitrogen, according the Dumas [50] and Buckee method [51].
- **Carbohydrates and lignin.** Lignin estimation was carried out according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42618) [52] for Klason lignin. The liquid part after Klason lignin was collected, filtered through a 20 µm nylon membrane and submitted to HPLC for the analysis of sugars. The solid residue of Klason lignin was oven-dried and the percentage of acid-insoluble lignin was determined in relation to the mass dry sample.

3. Results and discussion

3.1 Zymogram of laccase

Both DMP and ABTS were used as substrates to be oxidized by the laccase enzyme broth from *M. palmivorus* VE111. The corresponding zymograms showed four isoforms, both with DMP (Fig. 2A) and ABTS (Fig. 2B), suggesting possible laccase isoenzymes. It is already well known that different factors, at the level of laccase gene transcription, influence laccase production and activity such as carbon and nitrogen sources and concentrations, metal ions, aromatic compounds and other inducers [53-55].

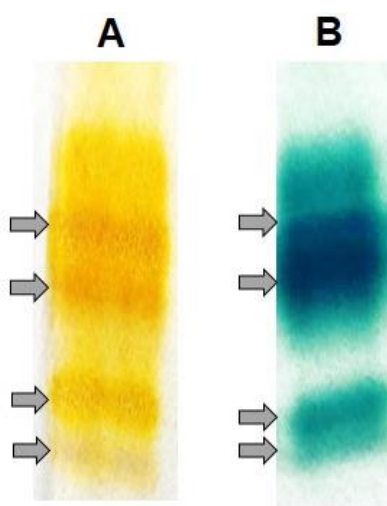


Fig. 2. Zymogram of laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111 grown in a glucose-casein-potato broth-medium revealed with 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (left) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (right) substrates.

The supplementation of the liquid medium with CuSO₄ in *M. palmivorus* VE111 cultures possibly induced the production of more isoforms of laccases than in the absence of

this inducer [29]. Karp et al. [56] working with *Pleurotus ostreatus* in medium with yeast extract supplemented with CuSO_4 and ferulic acid, identified six isoforms when the highest laccase activity was achieved. Yang et al. [55] found that Cu^{2+} ions were indispensable for efficient laccase production by *Cerrena* sp. strain HYB07. Klonowska et al. [57] also found that *Marasmius quercophilus* was able to secrete three new inducible laccases when both copper and *p*-hydroxybenzoic acid were added to malt-extract medium.

3.2 Secretomic view of *M. palmivorus* VE111

As *M. palmivorus* VE111 was a fungus recently isolated by the group, the proteins secreted in a culture medium already studied and optimized [29] were analyzed. SDS-PAGE of the extracellular proteins (Fig. 3A) showed intense bands between 20 and 75 kDa, corresponding to the molecular mass (30-85 kDa) reported for most fungal laccases [58,59].

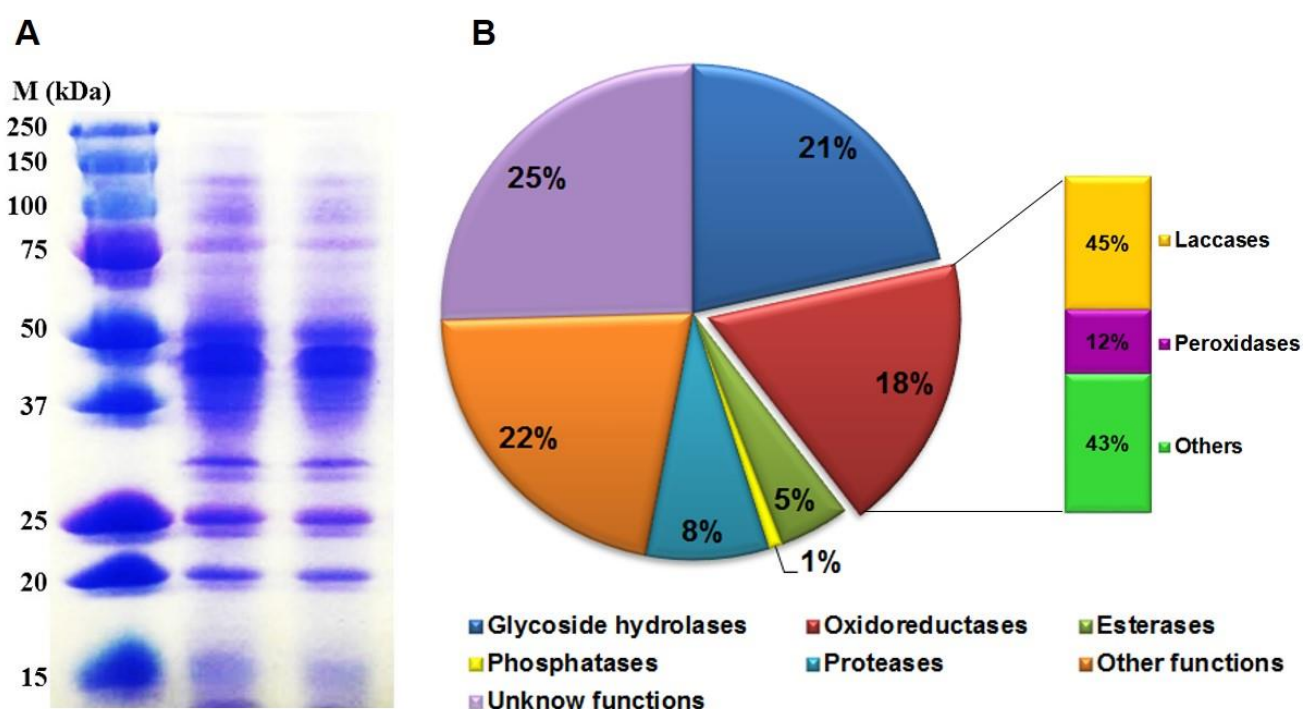


Fig. 3. SDS-PAGE electrophoresis (A) and secretomic overview (B) of *Marasmiellus palmivorus* VE111 grown in a glucose-casein-potato broth-medium for five days. The lanes of SDS-PAGE, alongside of the marcador lane (M), represent the crude enzymatic extract, in duplicate, secreted by *Marasmiellus palmivorus* VE111.

The subsequent analysis revealed the presence of 331 proteins in the secretome of *M. palmivorus* VE111, growing in glucose-casein medium supplemented with potato broth and CuSO_4 and MnSO_4 , which were grouped according to their putative function (supplementary

material). In Fig. 3B, an overview and general distribution of the different proteins identified is presented. Almost half of the secretome of *M. palmivorus* VE111 are proteins of great interest in biorefineries for biofuel production and valorization of molecules of interest present in lignocellulosic residues, with 44% corresponding to glycoside hydrolases, oxidoreductases or esterases. Among oxidoreductases (18% of proteins present in secretome), most have been identified as laccases (45%) and peroxidases represent only a small part (12%). Among the oxidoreductases that have other functions (43%), most are represented by glucose oxidase (supplementary material).

Table 1 shows the Top-10 proteins identified in the secretome of *M. palmivorus* VE111, based on the highest score and peptide spectrum match (PSM). As can be seen, half of these proteins correspond to laccases, highlighting the profile and potential of *M. palmivorus* VE111 for production of this type of oxidoreductases. The simple composition of the culture medium used for enzyme production of *M. palmivorus* VE111, only consisting of one carbon source, one nitrogen source and mineral salts, supplemented with potato broth, stands out. The representativeness that laccases have in this secretome, although already typical of most basidiomycetes, may have been increased with the addition of CuSO₄, as already reported by Carabajal et al. [17] in a proteome study conducted with *Trametes versicolor* BAFC 2234 grown on tomato juice medium supplemented with copper and manganese.

Table 1. Top-10 proteins in the secretome of *M. palmivorus* VE111 grown in in a glucose-casein-potato broth-medium for five days, with the highest score and PSM values (see **supplementary material** for the whole 331 proteins in secretome).

Accession	Description	Score	PSMs ¹	MW (kDa)	pI
A0A0W0G664	Laccase	197.50	39	54.7	5.34
A0A0W0EX47	Glucoamylase	144.92	32	62.0	6.04
A0A0W0G682	Laccase	118.62	28	56.2	5.12
A0A0W0FHK0	Hsp70 chaperone	116.74	28	73.7	5.08
E2LDQ9	Laccase	112.50	28	27.0	4.65
G5CTE7	Laccase	108.93	26	20.1	5.71
A0A1Q3E3S1	Heat shock protein 70	100.40	24	73.7	5.15
G4TLJ8	Related to glucose-regulated protein 78	73.33	18	71.2	5.19
E2LI81	Peptide hydrolase	68.78	16	30.2	4.91
A0A0W0FJ21	Laccase	60.69	12	53.5	4.73

¹Peptide Spectrum Match

Fernández-Fueyo et al. [60] analyzed the secretome of *P. ostreatus* growing on woody and nonwoody lignocellulose substrates and identified an overproduction of lignin-modifying

enzymes (mainly laccases, manganese peroxidase and versatile peroxidase) on poplar wood and wheat straw in comparison with glucose medium. Salvachúa et al. [61] compared the *Irpex lacteus* proteome, growing on wheat straw in liquid cultures and solid-state fermentation, with *Phanerochaete chrysosporium* and *P. ostreatus* proteome, growing on wheat straw in solid-state. An overview of the proteomes led to the conclusion that, in solid state, *I. lacteus* secretes mainly peroxidases (dye-decolorizing and manganese-oxidizing peroxidase), proteases, cellulases and xylanases, whereas a greater production of β -glucosidase was identified in liquid medium. In contrast, *P. chrysosporium* produces more enzymes aimed at the total hydrolysis of polysaccharides and *P. ostreatus* produces more oxidoreductases. Comparing these and other basidiomycete secretomes, it is suggested that the optimization of culture medium developed for *M. palmivorus*, promoted the secretion of enzymes implicated in the production of oxidoreductases, especially laccases, although many glycoside hydrolases of interest have been found, such as β -glucosidases, endoglucanases, β -mannosidases and exo-1,4- β -xylosidase, besides esterases. A detailed view of all the proteins found in the secretome of *M. palmivorus* VE111 is available in supplementary material.

3.3 Laccase delignification of *E. globulus* wood and its effect on saccharification and ethanolic fermentation

A characterization of *E. globulus* is presented in Table 2. The delignification performed by the laccase-rich secretome of *M. palmivorus* (from 23% to 17% Klason lignin content) allowed higher sugars yields after enzymatic hydrolysis with the cellulases and xylanases of *P. echinulatum*. The approximate 10% increase of glucose yield, and 15% increase in xylose yield resulted in an 8.5% increase of ethanol production (Table 3).

Table 2. Chemical composition (% of dry solid fraction) of untreated *E. globulus* wood and pretreated by steam explosion.

	<i>E. globulus</i> wood (%)	<i>E. globulus</i> steam-exploded (%)
Cellulose	37.40	39.80
Hemicellulose	13.14	8.71
Klason Lignin	28.33	34.65
Extractives	6.8	n.a.
Ash	1.42	1.71
Proteins	1.52	1.42
Total mass balance	88.61	86.28

n.a.: not analyzed

Table 3. Comparison of Klason lignin content (% of wood weight), glucose and xylose yield after saccharification (% of sugar released), and ethanol yield after fermentation (% of ethanol released) for the laccase-treated *E. globulus* wood and the untreated control.

<i>Eucalyptus globulus</i> wood	Lignin insoluble (%)	Glucose yield Y _G (%)	Xylose yield Y _X (%)	Ethanol yield Y _E (%)
Control	22.83±0.71	40.96±0.73	78.59±0.92	106.50±2.44
Laccase treatment	16.66±0.47	45.01±1.57	87.09±5.88	115.61±2.43

Modification of the *E. globulus* lignin was assessed by 2D-NMR (Fig. 4). The C α -H α correlation signal in the aliphatic-oxygenated region was used to estimate the abundance of the lignin β -O-4 inter-unit linkages. The HSQC spectra demonstrated that the laccase was efficient in the degradation of lignin, promoting a decay of 31% of the lignin, related to the removal of aromatic compounds, without significant modification in the S/G ratio. A decrease of 16% in β -O-4 bonds and 22% decrease of lignin/carbohydrate ratio was also observed. The reduction in lignin content observed by 2D-NMR was similar to that determined by Klason lignin (around 28%).

Among hardwoods, eucalyptus is characterized by having a lignin with a high S/G ratio, which results in a more linear structure, with less cross-linking [62], making it easier to eliminate. In addition, β -O-4 linkages, the easiest to breakdown, represent 50-70% of total lignin bonds present in this wood [63]. Therefore, *E. globulus* wood has great potential as a lignocellulosic feedstock for the production of second-generation ethanol.

Gutiérrez et al. [64] demonstrated the potential of a laccase-mediator system for the removal of lignin from eucalypt wood. In the mentioned study, high redox-potential laccase from *Trametes villosa* and 1-hydroxybenzotriazole (HBT) as mediator were used. However, the high cost and potential toxicity of synthetic mediators does not make the process viable at the industrial level. Rico et al. [10] attempting to overcome this limitation of synthetic mediators, employed a natural laccase mediator, called methyl syringate, in the pretreatment of *E. globulus* wood to degrade lignin and increase saccharification. In this work, up to 50% lignin removal from eucalypt wood and 30% increase in glucose yield were obtained.

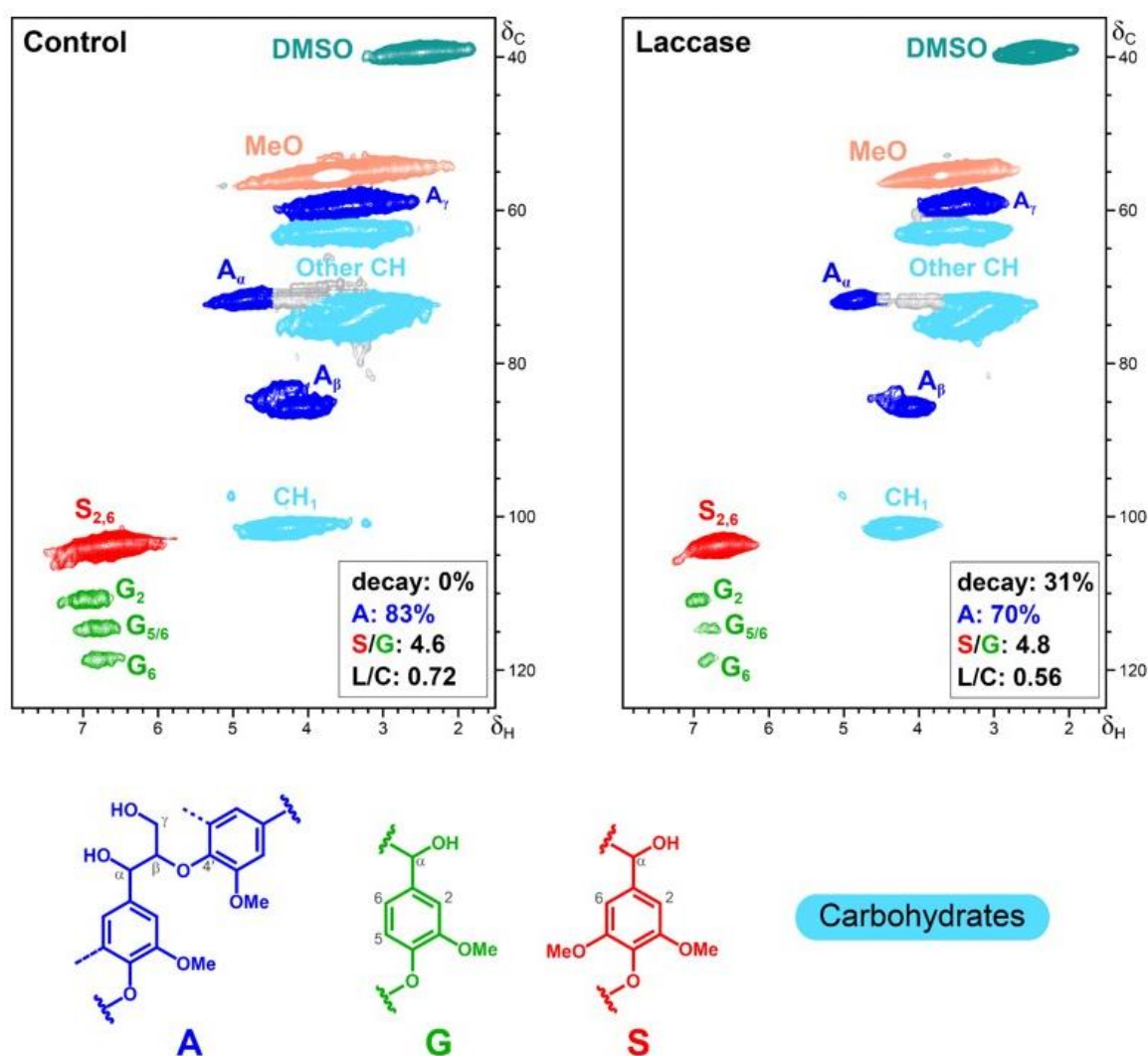


Fig. 4. HSQC 2D-NMR spectra of untreated (left) and laccase-treated (right) whole *Eucalyptus globulus* wood swollen in DMSO- d_6 . The detected signals correspond to: i) ^1H - ^{13}C correlations in aromatic guaiacyl (G, in green) and syringyl (S, in red) lignin units; ii) aliphatic side-chains in lignin β -O-4' inter-unit linkages (A, in purple); iii) anomeric (CH_1) and other (CH) positions (all in cyan) in non-crystalline carbohydrates; iv) methoxyls (in orange); and v) DMSO (in dark blue). Insets show: i) lignin decay with respect to control; ii) abundance of A substructures (as percentages of lignin aromatic units, G+S); iii) syringyl-to-guaiacyl (S/G) ratio; and iv) "lignin-to-carbohydrate" (L/C) ratio estimated from the G+S and CH_1 intensities (see text for additional details).

Some aspects deserve attention and need to be discussed here. First, the efficiency of the secretome of *M. palmivorus* VE111, rich in laccase, in degrading the aromatic structure of lignin that result in a greater saccharification and, consequently, a higher ethanol yield. The second aspect concerns the potential of the cellulolytic and xylanolytic complex of *P. echinulatum* S1M29 in the enzymatic hydrolysis of the *E. globulus* biomass and the release of

sugars. The secretome of *P. echinulatum* S1M29 against different substrates and inductive and repressive conditions has already been studied and described by Schneider et al. [65]. Its protein arsenal is constituted by enzymes involved in cellulose and hemicellulose degradation. In addition, the *P. echinulatum* enzyme broth used in the saccharification experiments contains high FPA (38 U/mL), endoglucanase (56 U/mL), β -glucosidase (20 U/mL) and xylanase activities (315 U/mL). The third aspect refers to the fact that laccase mediators were not added in this study and, nevertheless, delignification was produced leading to better results in saccharification and fermentation. It is suggested that some components of the fungus secretome or of the wood itself may have contributed to the delignification, when considering the enzyme-lignin size ratio. This represents an advantage over other studies, since it makes the process more eco-friendly and less costly.

3.4 Detoxification of steam-exploded *E. globulus* wood

Although steam explosion is the most commonly used method for pretreatment of lignocellulosic materials, one of its main drawbacks is the generation of phenols and other toxic compounds [24,66,67]. Enzymatic detoxification, generally carried out with laccases and peroxidases from white-rot fungi, is an effective biotechnological method to reduce the inhibitory compounds in the fermentation broths [68]. Bacterial laccases can also be applied for this purpose, although their use is limited by their lower redox potential [69]. Here, the laccase activity produced by *M. palmivorus* was used in an attempt to detoxify the eucalyptus biomass pretreated by steam explosion.

The detoxification was successful and, as can be seen in Fig. 5A, the content of free phenolic compounds decreased about 70% in the samples treated with the laccase-rich fungal secretome. This result suggests that the laccases contained in the enzyme extract have promoted the removal of these compounds, probably due to the polymerization of the radicals generated by oxidation of monomeric phenolic compounds. To test this hypothesis, the samples were analysed by molecular exclusion chromatography (Fig. 5B). The peaks from phenolic compounds of smaller molecular mass (center and right of the graph) decreased with the enzymatic treatment, and a new peak with higher molecular mass appeared (left), confirming the polymerization of phenolic compounds. Similar molecular-mass distribution profiles have already been reported, for example, by Jaoauni et al. [70] for *Pycnoporus coccineus* laccase treatment of wastewater from olive oil production, by Chandel et al. [71] for *Cyathus stercoreus*

laccase detoxification of sugarcane bagasse, and by Jurado et al. [24] for *Corioloopsis rigida* laccase detoxification of steam-exploded wheat straw.

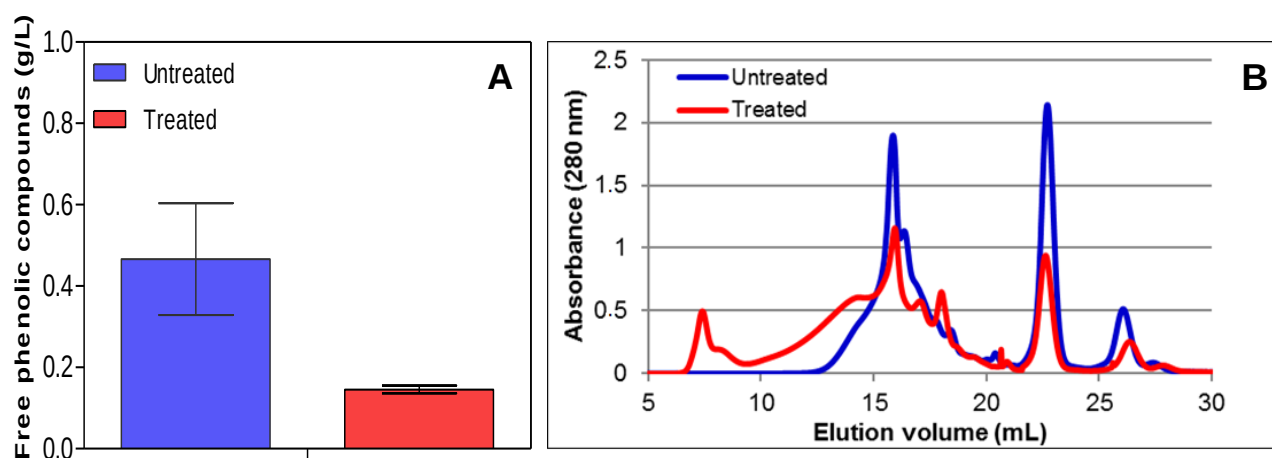


Fig. 5. Free phenolic content (%) of steam-exploded *E. globulus* wood untreated and treated with laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111 (A) and size-exclusion chromatographic profile of the soluble fraction (B).

It is important to note that the enzyme broth from *M. palmivorus* also includes some peroxidases, as demonstrated in the proteomic study (Fig. 3B). These peroxidases may also contribute, although with less intensity due to their lower abundance, to the polymerization of phenolic compounds present in the pretreated biomass. The latter will be in agreement with Jönsson et al. [66] reporting detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *T. versicolor*.

3.5 Effects of the enzymatic detoxification of steam-exploded *E. globulus* wood on saccharification, yeast growth and ethanolic fermentation

The effect of laccase treatment before and after its enzymatic saccharification was evaluated. As can be seen in Table 4, a lower glucose yield was obtained in samples detoxified before the enzymatic hydrolysis. However, when analyzing the xylose yield, the result was the opposite, and the xylose yield was higher when the laccase treatment was done before saccharification. Therefore, the total sugars yield was not altered, as already reported by Fang et al. [13].

However, the most interesting result was found in the ethanolic fermentation. An increase in ethanol yield was observed in both treatments with laccases when compared to the control condition. The increase in ethanol is higher when laccase is added after the enzymatic hydrolysis, reaching approximately 10% more ethanol in relation to the control. Glucose was

completely transformed under all conditions within 24 h. These data are in agreement with those obtained by Jurado et al. [24] and Moreno et al. [67] who also described improvements in fermentation performance after laccase treatment. However, Jurado et al. [24] and Fang et al. [13] also observed a greater increase in fermentation after detoxification with laccase, while Moreno et al. [67] found that a prior detoxification with laccases was better for fermentation. As already reported by Jönsson et al. [66] the mechanism of laccase detoxification is linked to the ability of the enzyme removing lignin-derived phenolic compounds, such as vanillin, syringaldehyde, and vanillic, syringic and *p*-hydroxycinnamic acids [72], which are important fermentation inhibitors.

Table 4. Comparison of glucose and xylose yields after saccharification (% of sugar released) and ethanol yield after enzymatic saccharification (% of ethanol released) of the steam-exploded *E. globulus* wood treated with laccase before and after saccharification and the control without laccase treatment.

<i>Eucalyptus globulus</i> steam-exploded	Glucose yield Y _G (%)	Xylose yield Y _X (%)	Ethanol yield Y _E (%)
Cellulase treatment (control)	38.79±1.31	75.97±0.98	75.31±0.43
Laccase before cellulase treatment	34.48±0.56	82.18±1.12	78.02±2.24
Laccase after cellulase treatment	38.66±0.99	76.07±1.44	82.55±4.50

The yeast cell density results (Fig. 6) also corroborated the detoxification induced by laccases. It is evident that this treatment causes the polymerization of phenolic compounds, inhibitory for the growth of *S. cerevisiae*, resulting in the maintenance of yeast cell growth, in contrast with what was observed for the control sample without laccases. The cell density was 22% higher in laccase treatment before saccharification and up to 33% higher when applied after saccharification, compared to the control. Phenolic compounds are activated by laccase oxidation, generating unstable phenoxy radicals that lead to polymerization into less toxic aromatic compounds. Inhibition by free phenols is due to a decrease in the membrane ability as a selective barrier, reducing both cell growth and sugar assimilation [73]. The higher cell density observed when the treatment with laccase was performed after enzymatic saccharification is in agreement with the results of ethanolic fermentation, in which the highest yield was also observed with the addition of laccases after the saccharification step. Likewise, Larsson et al. [74] described a higher yeast growth on acid steam-exploded spruce treated with *T. versicolor* laccase.

The potential of enzymes produced by *M. palmivorus* in bioremediation [75] and biological pretreatment have already been explored and reported [76]. Their applicability in

sustainable strategies for lignin degradation and detoxification of phenolic compounds in pretreated lignocellulosic biomass, for the production of second-generation ethanol, highlight the potential of *M. palmivorus* in the biorefinery sector.

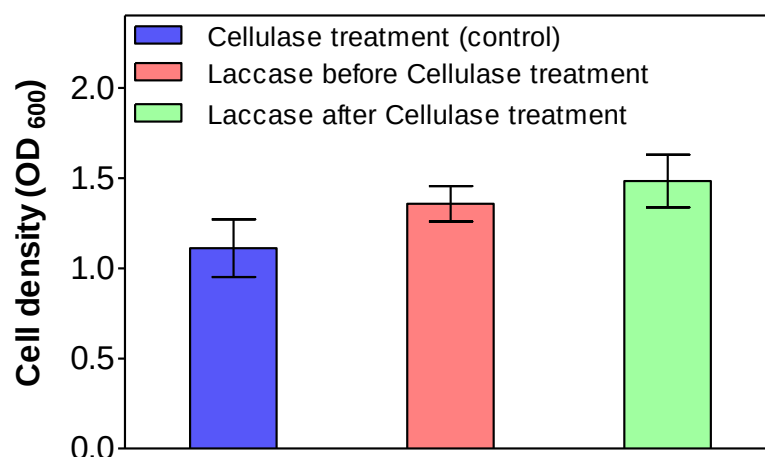


Fig. 6. Cell density of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in steam-exploded *Eucalyptus globulus* wood hydrolyzate, untreated and treated with laccase from *Marasmiellus palmivorus* VE111.

4. Conclusion

As demonstrated in this work, the secretome of from *M. palmivorus* VE111, mainly composed of laccases, was able to delignify *E. globulus* feedstock, enhancing the saccharification, removing free phenols of steam-exploded eucalypt and increasing ethanol yield. One of the outstanding findings of this work is that no mediators were necessary to perform an efficient delignification of wood. Detoxification was shown to be more efficient if performed after enzymatic hydrolysis with cellulases and xylanases from *P. echinulatum* S1M29, since the treatment removed phenolic inhibitors that would inhibit yeast growth. The results demonstrate that the polymerization and depolymerization capacity of the laccases from *M. palmivorus* VE111 is potentially relevant for industrial production of bioethanol.

Acknowledgments

Funding from University of Caxias do Sul (UCS) Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Process 3255/2013), Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (Process 16/2551-0000 246-0), Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) (34/2014), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 201925/2018-4), the Biobased Industries Joint Undertaking

(www.bbi-europe.eu) project EnzOx2 (H2020-BBI-PPP-2015-2-720297, www.enzox2.eu), the projects RETOPROSOST-2-CM [S2018/EMT-4459] financed by the Comunidad de Madrid, HIDROFUN [BIO2015-68387-R], and GLYSUS [RTI2018-093683-B-I00] from MINECO/FEDER, and the CSIC Project (201740E07) is acknowledged. We are grateful for the protein identification by nLC-MS/MS that was carried out in the Proteomics and Genomics Facility (CIB-CSIC), a member of ProteoRed-ISCI network.

References

- [1] Ho CY, Chang JJ, Lee, Chin TY, Shih MC, Li WH, et al. Development of cellulosic ethanol production process via co-culturing of artificial cellulosomal *Bacillus* and kefir yeast. *Appl Energy* 2012;100:27–32.
- [2] Chisti Y, Yan J. Energy from algae: current status and future trends: algal biofuels – a status report. *Appl Energy* 2011;88:3277–9.
- [3] Santori G, Nicola GD, Moglie M, Polonara F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. *Appl Energy* 2012;92:109–32.
- [4] Kumar M, Goyal Y, Sarkar A, Gayen K. Comparative economic assessment of ABE fermentation based on cellulosic and non-cellulosic feedstocks. *Appl Energy* 2012;93:193–204.
- [5] Dias MOS, Junqueira TL, Jesus CDF, Rossell CEV, Filho RM, Bonomi A. Improving bioethanol production – comparison between extractive and low temperature fermentation. *Appl Energy* 2012;98:548–55.
- [6] Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: a potential and promising method for enhanced methane production. *Appl Energy* 2012;94:129–40.
- [7] Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour Technol* 2011;102:7500–7506.
- [8] Seidl PR, Goulart A. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2016;2:48–53.
- [9] Gonzalez R, Treasure T, Wright J, Saloni D, Phillips R, Abt R, Jameel H. Exploring the potential of *Eucalyptus* for energy production in the Southern United States: financial analysis of delivered biomass. Part I. *Biomass Bioenerg* 2011; 35: 755–766.

- [10] Rico A, Rencoret J, del Río JC, Martínez AT, Gutiérrez A. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of *Eucalyptus* feedstock. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7:6.
- [11] Laurichesse S, Avérous L. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. *Prog Mater Sci* 2013;39(7):1266-1290.
- [12] Hämäläinen V, Grönroos T, Suonpää A, Heikkilä MW, Romein B, Ihalainen P, Malandra S, Birikh K. Enzymatic process to unlock the lignin value. *Front Bioeng Biotechnol* 2018;6:20.
- [13] Fang Z, Liu X, Chen L, Shen Y, Zhang X, Fang W, Wang X, Bao X, Xiao Y. Identification of laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnol Biofuels* 2015;8:54.
- [14] Caspeta L, Caro-Bermúdez MA, Ponce-Noyola T, Martinez A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energy* 2014;113:277–86.
- [15] Salvachúa D, Katahira R, Cleveland NS, Khanna P, Resch MG, Black BA, Purvine AO, Zink EM, Prieto A, Martínez MJ, Martínez AT, Simmons BA, Gladden JM, Beckham GT. Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. *Green Chem* 2016;doi:10.1039/C6GC01531J
- [16] Zorn H, Peters T, Nimtz M, Berger RG. The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* 2005;5:4832-4838.
- [17] Carabajal M, Kellner H, Levin L, Jehmlich N, Hofrichter M, Ulrich R. The secretome of *Trametes versicolor* grown on tomato juice medium and purification of the secreted oxidoreductases including a versatile peroxidase. *J Biotechnol* 2013;168:15-23.
- [18] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol* 1994;140: 19-26.
- [19] Bournonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft Lignin depolymerization. *Appl Environ Microb* 1995;61(5):1876-1880.
- [20] Alcalde M. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial enzymes – structure, function and applications*, Springer; 2007, p. 461-476.
- [21] Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess* 2018;5(4):1-12.

- [22] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol* 2010;101:4851-4861.
- [23] Ballesteros I, Negro MJ, Manzaneres P, Oliva JM, Sáez F, Ballesteros M. Steam explosion pretreatment for cereal conversion to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol* 2006;129–132:496–508.
- [24] Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá Á, Martínez AT, Martínez M. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour Technol* 2009;100:6378-6384.
- [25] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant, N-O. Bioconversion of lignocellulose inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 2013; 6:16.
- [26] Schneider WDH, Fontana RC, Mendonça S, de Siqueira FG, Dillon AJP, Camassola M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. *Process Biochem* 2018;69:1-11.
- [27] Dillon AJP, Bettio M, Pozzan FG, Andrighetti T, Camassola M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J Appl Microbiol* 2011;111:48–53.
- [28] Dillon AJP, Zorgi C, Camassola M, Henriques JAP. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:740–746.
- [29] Schneider WDH, Costa PC, Fontana RC, de Siqueira FG, Dillon AJP, Camassola, M. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers. *J Biotechnol* 2019;295:1-8.
- [30] Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J Bacteriol* 1957;73:269-278.
- [31] Camassola M, Dillon AJP. Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1889–1900.
- [32] Reis L, Schneider WDH, Fontana RC, Camassola M, Dillon AJP. Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. *Bioenerg Res* 2013;7:60–67.

- [33] Wolfenden RS, Wilson RL. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J Chem Soc Perkin Trans* 1982;02:805-812.
- [34] Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1601-1606.
- [35] Camassola M, Dillon AJP. Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. *Sci Rep* 2012;1(1):1–14.
- [36] Ghose T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 1987; 59:257–268.
- [37] Daroit DJ, Simonetti A, Hertz PF, Brandelli A. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:933–941.
- [38] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* 1992;23:257–270.
- [39] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426–428.
- [40] Bradford MMA. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- [41] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* 1970;227:680-685.
- [42] Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 2007;4:923–925.
- [43] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 1965;16:44-158.
- [44] Kim H, Ralph J, Akiyama T. Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-d₆. *Bioenerg Res* 2008;1:56–66.
- [45] Rencoret J, Marques G, Gutierrez A, Nieto L, Santos JJ, Jimenez-Barbero J, Martinez AT, del Rio JC. HSQC-NMR analysis of lignin in woody (*Eucalyptus globulus* and *Picea abies*) and non-woody (*Agave sisalana*) ball-milled plant materials at the gel state. *Holzforschung* 2009;63:691–698.
- [46] Kupče E, Freeman R. Compensated adiabatic inversion pulses: broadband INEPT and HSQC. *J Magn Reson* 2007;187:258–265

- [47] Rencoret J, Gutiérrez A, Nieto L, Jiménez-Barbero J, Faulds CB, Kim H, Ralph J, Martínez AT, del Río JC. Lignin composition and structure in young *versus* adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiol.* 2011;155:667-682.
- [48] Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of extractives in biomass. 2005. Technical Report NREL/TP-510-42619.
- [49] Sluiter A, Hames B, Hyman D, Payne C, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton DJW. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. 2008. Technical Report NREL/TP-510-42621.
- [50] Dumas JBA. *Annales de chimie.* 1826;33:342.
- [51] Buckee GK. Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method. Collaborative trial. *J Inst Brew* 1994;100:57-64.
- [52] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton DDC. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. 2011. Technical Report NREL/TP-510-42618.
- [53] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:369-385.
- [54] Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Curr Genom* 2011;12:104-112.
- [55] Yang J, Wang G, Ng TB, Lin J, Ye X. Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. *Front Microbiol* 2016;6:1558.
- [56] Karp SG, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Soccol VT, Pandey A, Soccol CR. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 2012;114: 735–739.
- [57] Klonowska A, Le Petit J, Tron T. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiol Lett* 2001;200: 25–30.
- [58] Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:215-242.
- [59] Maestre-Reyna M, Liu W-C, Jeng W-Y, Lee C-C, Hsu C-A, Wen T-N, Wang AH-J, Shyur L-F. Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. *Plos One* 2015;10:e0120601.

- [60] Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, López-Lucendo MF, Pérez-Boada M, Reconret J, Gutiérrez A, Pisabarro AG, Ramírez L, Martínez A. A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Biofuels* 2016;9:49.
- [61] Salvachúa D, Martínez AT, Tien M, López-Lucendo MF, García F, de los Ríos V, Martínez MJ, Prieto A. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:115.
- [62] Rencoret J, Gutiérrez A, del Río JC. Lipid and lignin composition of woods from different eucalypt species. *Holzforschung*. 2007;61:165–174.
- [63] Henriksson G. Wood Chemistry and Wood Biotechnology. In: Ek M, Gellerstedt G, Henriksson G, editors. *Fibre and Polymer Technology*, Stockholm: KTH; 2007, p.125.
- [64] Gutiérrez A, Rencoret J, Cadena EM, Rico A, Barth D, del Río JC, Martínez AT. Demonstration of laccase-mediator removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks. *Bioresour Technol* 2012;119:114–122.
- [65] Schneider WDH, Gonçalves TA, Uchima CA, Couger MB, Prade R, Squina FM, Dillon AJP, Camassola M. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels* 2016;9:66.
- [66] Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;49:691–697.
- [67] Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour Technol* 2012;106:101-109.
- [68] Moreno AD, Ibarra D, Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Crit Rev Biotechnol* 2014;10.3109/07388551.2013.878896
- [69] Singh S, Hu J, Regner MR, Round JW, Ralph J, Saddler JN, Eltis LD. Enhanced delignification of steam-pretreated poplar by a bacterial laccase. *Sci Rep* 2017;7: 42121.
- [70] Jaouani A, Guillén F, Penninckx MJ, Martínez AT, Martínez MJ. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb Technol* 2005;36:478–486.

- [71] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour Technol* 2007;98:1947–1950.
- [72] Camarero S, Cañas AI, Nousiainen P, Record E, Lomascolo A, Martínez MJ, Martínez A. *p*-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase detoxification of recalcitrant compounds. *Environ Sci Technol* 2008;42:6703–6709.
- [73] Palmqvist E, Meinander Q, Grage H, Hahn-Hagerdal B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng* 1999;63:46–55.
- [74] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol* 1999;77–79:91–103.
- [75] Cantele C, Fontana RC, Mezzomo AG, Rosa LO, Poletto L, Camassola M, Dillon AJP. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. *Biocat Agri Biotech* 2017;12:15–22.
- [76] Singh S, Khanna S, Moholkar V, Goyal A. Screening and optimization of pretreatments for *Parthernium hystrophorus* as feedstock for alcoholic biofuels. *App Energy* 2014;129:195–206.

Supplementary material. All proteins present in the secretome of *M. palmivorus* VE111 grown in a glucose-casein-potato broth-medium for five days. The proteins are grouped according to their putative function.

Accession	Description	Specie	Score	PSMs	MW (kDa)	pI
Glycoside hydrolases						
E2LFI3	β -glucosidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	45.28	11	22.2	6.38
A0A0D7B0C3	Glucoamylase	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	43.16	12	67.8	5.33
V2X8N3	α -glucosidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	39.97	9	105.9	4.75
A0A286UC51	Trehalase	<i>Pyrrhoderma noxium</i>	39.71	7	83.8	4.60
A0A0C3CAT5	Glucoamylase	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	33.34	9	61.5	8.53
A0A067THE3	Trehalase	<i>Galerina marginata</i>	32.55	10	80.6	5.50
U6NHM1	Glucoamylase	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	31.35	7	61.7	4.78
E2LFD0	GH 31	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	31.33	7	19.3	9.72
A0A0L6WIP7	Trehalase	<i>Termitomyces</i> sp.	29.91	9	74.0	6.05
V2WWU3	GH 3	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.27	6	64.4	5.49
A0A166NQN9	GH 5	<i>Fibularhizoctonia s.p</i>	27.23	7	45.3	6.01
A0A0W0ETG0	α -galactosidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	26.40	6	55.4	5.00
K5WCB3	GH 5	<i>Phanerochaete carnosa</i>	26.38	5	43.7	4.84
A0A1Q3EGI8	GH 55	<i>Lentinula edodes</i>	25.25	4	67.1	5.12
E2LZ79	GH 76	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	24.77	5	35.5	5.60
A0A0W0FWW7	GH 92	<i>Moniliophthora roreri</i>	20.49	5	90.9	5.11
W4JWN4	α -1,2-mannosidase	<i>Heterobasidion irregulare</i>	18.04	4	58.7	4.93
E2LX50	GH 18	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	17.59	4	24.8	8.60
A0A0W0F861	Putative exo- β -1,3-glucanase	<i>Moniliophthora roreri</i>	17.42	4	46.8	4.73
D8PMG6	GH 92	<i>Schizophyllum commune</i>	16.70	4	91.1	4.77
E2L8H7	β -glucosidase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	15.91	4	13.7	6.62
A0A0D7AZH6	GH 43	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	15.73	4	32.6	4.44
A0A0W0G883	Putative GH 71	<i>Moniliophthora roreri</i>	15.57	4	72.9	9.19
V2WXL9	α -glucanase	<i>Moniliophthora roreri</i>	13.84	4	52.9	5.69
V2Y4K9	GH 35	<i>Moniliophthora roreri</i>	12.82	3	113.4	6.23
A0A137QBN8	α -galactosidase	<i>Leucoagaricus</i> sp.	12.04	3	42.6	4.82
V2WW73	α -1,2-mannosidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	10.59	3	60.3	5.16
V2Y157	GH 18	<i>Moniliophthora roreri</i>	11.51	2	48.7	6.65
V2X6S9	GH 92	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.14	2	87.6	5.10
A0A0W0FUV5	GH 16	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.72	2	42.8	4.64
A0A0W0G4P4	Putative GH 2	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.38	2	108.7	4.74
E2LIS3	Trehalase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	8.25	2	31.6	5.48
A0A0W0FFX2	Trehalase	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.61	3	68.3	5.14
A0A0W0FSY2	GH 95	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.49	2	88.9	5.26
A0A0W0FW30	Putative GH 71	<i>Moniliophthora roreri</i>	5.46	1	55.0	5.38
V2WHR4	GH 61	<i>Moniliophthora roreri</i>	5.43	1	24.9	8.66
A0A0W0FZK5	GH 55	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.92	1	80.4	6.33

E2LEH9	GH 5	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	4.85	1	13.0	8.53
A0A0L6WBR6	Endo-1,6- α -mannosidase	<i>Termitomyces</i> sp.	4.61	1	43.4	4.97
A0A067NJ60	GH 28	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4.28	1	48.7	5.77
A0A165QYW5	α -galactosidase	<i>Daedalea quercina</i>	4.06	1	53.9	5.11
A0A137Q7V2	Putative exopolygalacturonase	<i>Leucoagaricus</i> sp.	4.04	1	49.9	7.08
A8NGA5	Exo- β -1,3-glucanase	<i>Coprinopsis cinerea</i>	3.96	1	88.3	5.20
V2XF82	β -galactosidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.93	1	53.8	4.83
A0A166MLN2	Six-hairpin glycosidase	<i>Exidia glandulosa</i>	3.92	1	37.8	4.92
A0A284RBM4	Related to exo- β -1,3-glucanase (I/II)	<i>Armillaria ostoyae</i>	3.81	1	44.9	5.31
A0A0W0GAF1	Putative GH 1	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.81	1	31.3	4.98
A0A0L6WJ25	Unsaturated glucuronyl hydrolase	<i>Termitomyces</i> sp.	3.80	1	41.8	6.55
W4KJ23	GH 5	<i>Heterobasidion irregulare</i>	3.74	1	72.7	5.44
V2X834	GH 43	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.68	1	17.8	7.88
A0A0W0G1P4	GH 3	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.65	1	86.1	5.00
A0A067TGT7	β -mannosidase	<i>Galerina marginata</i>	3.58	1	108.0	5.40
M2RNS1	Glucoamylase	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	3.55	1	61.6	4.45
V2XL59	GH 7	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.42	1	51.7	8.37
G4TU86	Probable xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Serendipita indica</i>	3.41	1	15.8	7.50
A0A151VHK0	Putative β -glucosidase	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	3.40	1	121.8	7.34
W4KGZ4	GH 31	<i>Heterobasidion irregulare</i>	3.30	1	98.7	5.59
V2XRV8	GH 3	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.30	1	90.7	5.14
Q01599	Glucanase (Fragment)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	3.17	1	15.5	4.55
A0A166Q847	GH 92	<i>Fibularhizoctonia</i> sp.	3.11	1	82.5	4.86
W4K394	GH 30	<i>Heterobasidion irregulare</i>	3.10	1	57.7	5.03
A0A0W0EYL7	GH5	<i>Moniliophthora roreri</i>	2.97	1	81.8	5.27
A0A2G8RY53	Exo-1,4- β -xylosidase	<i>Ganoderma sinense</i>	2.97	1	83.3	4.94
A0A146I0A8	α -galactosidase	<i>Mycena chlorophos</i>	2.82	1	56.1	5.20
A0A0W0FT48	Cell wall glycosyl hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	2.81	1	44.8	6.34
Oxidoreductases						
A0A0W0FJZ7	Aldehyde reductase	<i>Moniliophthora roreri</i>	40.09	9	36.1	6.25
A0A165B9R4	Laccase	<i>Laetiporus sulphureus</i>	38.95	9	55.9	4.61
A0A0W0FQ58	Aromatic peroxygenase	<i>Moniliophthora roreri</i>	37.36	12	30.9	6.65
A0A0W0FQU0	GMC oxidoreductase	<i>Moniliophthora roreri</i>	29.25	6	68.8	5.24
A0A165QE29	FAD-linked oxidoreductase	<i>Neolentinus lepideus</i>	28.31	5	71.3	5.00
A0A0W0F0Z7	Aldehyde oxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.12	6	63.6	8.02
A0A0W0F272	Glucose oxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	26.96	7	64.8	6.10
A0A0W0G036	Laccase	<i>Moniliophthora roreri</i>	26.41	5	58.2	5.22
A0A0W0G129	Superoxide dismutase	<i>Moniliophthora roreri</i>	22.50	4	22.5	6.96
A0A2H3JR04	Laccase	<i>Wolfiporia cocos</i>	22.22	4	57.0	4.61
A0A165MW79	Superoxide dismutase	<i>Neolentinus lepideus</i>	21.61	4	22.8	7.31
V2YC57	Glucose oxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	18.62	4	65.3	5.21
A0A0D7BHZ5	Cloroperoxidase	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	18.61	4	29.9	4.56
A0A0C2T8B5	Laccase	<i>Amanita muscaria</i>	18.61	5	38.9	5.72
E2LX62	Dye-decolorizing peroxidase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	16.83	3	47.5	6.27

E7BLR0	Laccase	<i>Cerrena</i> sp.	16.78	4	55.3	5.15
A0A0W0G588	Putative Cloroperoxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	16.55	4	27.1	5.06
D4NXN5	Laccase	<i>Marasmiellus</i> sp.	16.20	3	5.9	6.49
V2WWR3	Putative FAD dependent oxidoreductase	<i>Moniliophthora roreri</i>	13.95	3	59.1	5.20
A0A0D0ASB9	FAD-linked oxidoreductase	<i>Suillus luteus</i>	13.02	3	60.5	6.29
E2L9Y9	FAD-linked oxidoreductase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	12.83	3	15.9	5.66
A0A0W0FML8	Laccase	<i>Moniliophthora roreri</i>	12.11	3	57.6	5.80
A0A0C3AFX4	Laccase	<i>Coprinopsis cinere</i>	11.18	3	56.6	6.04
Q08AB3	Laccase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	11.07	3	56.3	6.52
A0A0W0EY53	Lytic polysaccharide monooxygenase	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.55	2	39.2	6.52
A0A0C3CAT5	Quinone-oxidoreductase	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	9.19	2	34.5	6.32
V2XS92	Putative Cloroperoxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.79	2	29.3	4.92
R4JRR8	Laccase	<i>Cerrena</i> sp.	7.62	2	56.1	6.10
E2LQR6	Laccase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	7.49	2	21.4	5.14
V2XP29	Glucose oxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.44	2	55.6	4.91
A0A1M2W1C9	Glucose oxidase	<i>Trametes pubescens</i>	7.15	2	59.5	5.73
D2CSD3	Laccase (Fragment)	<i>Trametes sanguinea</i>	6.99	2	43.0	5.62
A0A0W0FTC1	Putative cloroperoxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	6.09	2	14.6	4.87
S4VGN3	Laccase	<i>Pleurotus eryngii</i>	5.56	1	55.6	4.97
A0A1M2VNB4	Lytic polysaccharide monooxygenase	<i>Trametes pubescens</i>	5.29	1	19.9	6.51
A0A2H3BC75	Laccase	<i>Armillaria solidipes</i>	4.51	1	56.0	4.50
V2XAH1	Quinone oxidoreductase	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.49	1	42.0	9.10
A0A0F7ST12	Glucose oxidase	<i>Phaffia rhodozyma</i>	4.21	1	65.6	4.75
A0A0W0FWZ5	Laccase	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.13	1	56.5	5.26
A0A0C6E5U8	Laccase	<i>Hericium coralloides</i>	4.13	1	55.1	5.02
Q2V102	Putative Laccase	<i>Termitomyces</i>	4.12	1	30.7	4.78
A0A0W0FR04	Flavin oxidoreductase	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.11	1	18.1	6.04
A0A0W0G4Y1	Coproporphyrinogen III oxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.02	1	40.2	7.94
C0JRG5	Laccase	<i>Laccaria bicolor</i>	4.00	1	56.5	5.39
A0A0C9V2Y9	Superoxide dismutase	<i>Hydnomerulius pinastri</i>	3.75	1	22.9	7.31
B0E060	Laccase	<i>Laccaria bicolor</i>	3.72	1	54.8	5.95
V2XHA4	Dye-decolorizing peroxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.66	1	48.3	5.55
A0A097DBI4	Laccase	<i>Volvariella volvacea</i>	3.57	1	57.3	4.94
V2WHU2	Dyp-type peroxidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.54	1	42.5	6.24
A0A284QVM9	Related to aldo-keto reductase	<i>Armillaria ostoyae</i>	3.41	1	30.7	6.55
A0A0L6W7V4	Glucose oxidase	<i>Termitomyces</i> sp.	3.28	1	66.4	5.90
E2LSH6	Aldo/keto reductase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	3.25	1	32.8	7.61
A0A0W0EVM2	Laccase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3.09	2	56.5	7.42
A0A0C9VCH1	Glutathione reductase	<i>Hydnomerulius pinastri</i>	3.04	1	51.8	6.79
A0A166QAQ1	Amine oxidase	<i>Fibularhizoctonia</i> sp.	2.30	1	90.2	6.35
Esterases						
A0A137Q2K2	Carboxylic ester hydrolase	<i>Leucoagaricus</i> sp.	30.07	7	59.0	6.20
V2W6M2	Carbohydrate esterase – CE 8	<i>Moniliophthora roreri</i>	21.96	4	35.8	8.66

A0A0W0FPE0	Carboxylic ester hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	20.13	5	58.0	5.26
A0A286UEP0	Carboxylic ester hydrolase	<i>Pyrrhoderma noxium</i>	9.58	2	60.6	4.87
A0A0C9SV23	Carboxylic ester hydrolase	<i>Paxillus involutus</i>	9.36	2	59.6	4.94
E2LRQ6	Carboxylic ester hydrolase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	8.49	2	28.1	5.25
A0A165ST68	Phosphodiesterase	<i>Neolentinus lepideus</i>	8.00	2	64.6	6.34
V2WVN6	Carboxylic ester hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.00	2	57.3	4.79
A0A1Q3E6E1	Carboxylic ester hydrolase	<i>Lentinula edodes</i>	7.53	2	59.4	4.86
A0A0W0G5I6	Carbohydrate esterase	<i>Moniliophthora roreri</i>	6.67	2	27.9	7.15
A0A0D0B4A0	Carboxylic ester hydrolase	<i>Gymnopus luxurians</i>	4.03	1	58.2	4.91
A0A164VKV1	Carboxylic ester hydrolase	<i>Sistotremastrum niveocreum</i>	3.85	1	53.5	5.44
V2XSD7	Esterase lipase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.44	1	24.6	6.04
A0A0W0GDV1	Phosphodiesterase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.24	1	70.3	5.49
V2WN41	Carboxylic ester hydrolase (Fragment)	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.08	1	52.7	4.82
Proteases						
V2XFU1	Peptidase s41 family protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	42.56	12	71.6	4.93
A0A151VTT2	Peptide hydrolase	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	34.99	7	41.0	5.64
A0A0W0FPR8	Tripeptidyl-peptidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	33.28	7	66.0	5.17
A0A0W0GEW1	Peptide hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	30.53	8	61.1	5.33
A0A0W0FVW4	Extracellular serine carboxypeptidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	20.76	5	61.8	5.10
E2LTU1	Peptidase S53	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	19.31	5	45.5	5.00
A0A0W0FZL0	Leucine aminopeptidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	16.48	4	51.8	5.69
A0A0W0FIV5	Extracellular metalloproteinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	15.69	3	87.6	5.33
A0A0C2XJR5	Dipeptidyl peptidase 3	<i>Amanita muscaria</i>	14.80	4	77.1	6.07
A0A0W0FPU7	Extracellular metalloproteinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	14.56	3	65.4	4.77
A0A0C3B9A1	Dipeptidyl peptidase III	<i>Moniliophthora roreri</i>	14.15	4	64.8	5.67
A0A0W0EWE9	Peptide hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	13.47	3	40.3	5.26
A0A151VE53	Peptidyl-Lys metalloendopeptidase	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	12.12	3	36.4	6.68
V2XJE3	Extracellular metalloproteinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	11.63	3	62.0	5.06
A0A1C7M0B1	Dipeptidyl peptidase 3	<i>Grifola frondosa</i>	10.51	3	131.1	6.79
V2YX85	Protease s8 tripeptidyl peptidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.05	2	58.9	4.88
A0A067NV51	Dipeptidase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	7.50	2	48.8	6.33
A0A0W0EX95	Peptide hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.42	2	40.8	5.08
A0A0W0FFI3	Metalloprotease	<i>Moniliophthora roreri</i>	6.93	2	37.5	5.63
A0A0W0GCC4	Putative family S53 protease-like protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	5.51	1	60.8	4.79
A0A0W0G7F2	Extracellular metalloproteinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.54	1	65.8	5.02
A0A1B7N4B5	Aminopeptidase	<i>Rhizopogon vinicolor</i>	3.88	1	67.9	5.41
D8PR03	Extracellular metalloproteinase	<i>Schizophyllum commune</i>	3.62	1	26.9	4.61
J4H2K8	Peptide hydrolase	<i>Fibroporia radiculosa</i>	3.50	1	43.9	5.22
A0A0L6WH04	Vitellogenic carboxypeptidase	<i>Termitomyces sp.</i>	3.31	1	70.5	6.10
Phosphatases						
V2XLV9	Alkaline phosphatase	<i>Moniliophthora roreri</i>	34.03	8	72.6	5.05

V2XLW9	Histidine acid phosphatase	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.85	2	51.6	5.95
E2LCE5	Lysophospholipase (Fragment)	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	4.05	1	26.6	5.27
Other functions						
A0A165SBZ6	Heat shock protein 70	<i>Neolentinus lepideus</i>	65.76	16	73.6	5.31
A0A146IN94	Endoplasmic reticulum chaperone	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61.82	14	72.9	4.93
A0A0B7FKV5	78 kDa glucose-regulated protein homolog	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	58.84	14	71.7	5.25
A0A0W0EXP7	Putative phosphoglucomutase	<i>Moniliophthora roreri</i>	57.47	15	63.4	6.49
V2XWY1	Heat shock protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	56.83	15	71.7	6.16
A0A286U7U0	Heat shock 70	<i>Pyrrhoderma noxium</i>	52.33	12	74.0	5.21
A0A164QCR3	Heat shock protein	<i>Sistotremastrum niveocreum</i>	47.18	11	73.6	5.21
A0A165CYX0	Heat shock protein	<i>Exidia glandulosa</i>	43.50	10	72.9	5.34
A0A0W0GB08	DNA replication and repair protein RecF	<i>Moniliophthora roreri</i>	43.09	9	57.3	4.98
E2M5V0	Polyamine aminopropyltransferase 2	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	42.92	9	14.7	5.00
A0A2R6NK22	Stress-70 protein. mitochondrial	<i>Phlebia centrifuga</i>	42.23	10	66.8	5.40
M5E4B4	ATPase involved in protein import into the ER	<i>Malassezia sympodialis</i>	40.83	9	73.4	5.11
A0A137Q5K7	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Leucoagaricus sp.</i>	39.57	7	14.9	8.66
A0A0W0FUS4	Neutral ceramidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	34.51	9	79.8	6.65
A0A0C9YFZ5	Chaperone protein	<i>Laccaria amethystina</i>	31.67	7	74.2	5.94
A0A284RHB3	Transaldolase	<i>Armillaria ostoyae</i>	31.67	7	35.5	6.20
A0A0W0FY57	Purine nucleoside permease	<i>Moniliophthora roreri</i>	29.90	6	43.0	4.98
V2WJC2	Glutaryl-CoA dehydrogenase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.89	6	73.2	4.58
A0A0W0EWU1	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.46	6	46.2	5.82
A0A0W0FX68	Enolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.21	5	47.2	5.94
E2LY62	Adenosine kinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.18	6	34.2	5.77
A0A0W0FGF0	Heparinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	27.01	6	85.7	5.53
A0A165UUX7	β -hexosaminidase	<i>Neolentinus lepideus</i>	27.01	7	60.5	4.89
E2M098	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	26.99	5	44.7	7.53
A0A0C9ZFW4	Heat shock 70 kDa protein	<i>Pisolithus microcarpus</i>	26.93	6	66.0	6.19
V2WY24	α/β -hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	26.90	5	55.8	5.06
A0A127ZJ40	Probable Polyubiquitin protein	<i>Sporisorium scitamineum</i>	26.49	14	25.7	7.49
S7PV39	Transaldolase	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	26.25	6	36.2	6.60
A0A0W0FIE6	Putative N-acetylhexosaminidase	<i>Moniliophthora roreri</i>	24.10	6	78.0	4.86
E2LLK8	ATP synthase subunit a	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	22.35	5	23.1	5.10
E2LZ46	Cutinase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	21.56	4	29.4	9.28
A0A1Q3EB42	Heat shock protein	<i>Lentinula edodes</i>	20.39	5	72.4	5.60
A0A1M2VF72	β -hexosaminidase	<i>Trametes pubescens</i>	20.16	4	59.3	5.58
A0A1C7M0Z4	Heat shock protein	<i>Grifola frondosa</i>	19.18	5	125.9	7.30
A0A067TKK6	Transaldolase	<i>Galerina marginata</i>	17.16	4	35.5	5.82
A0A0C3NJ26	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Pisolithus tinctorius</i>	16.99	4	62.1	6.73

A0A0W0F4B8	Cutinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	16.96	4	21.1	5.85
A0A095EJN6	Hsp72-like protein	<i>Cryptococcus gattii</i>	16.25	4	69.4	5.10
A0A1J8QHF1	Heat-shock protein	<i>Rhizopogon vesiculosus</i>	15.35	4	48.5	5.74
V2WGC2	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Moniliophthora roreri</i>	14.50	4	16.7	7.44
V2XDH4	Inositol-3-phosphate synthase	<i>Moniliophthora roreri</i>	14.39	4	61.0	6.27
W4JNS5	Triosephosphate isomerase	<i>Heterobasidion irregulare</i>	14.11	3	26.9	7.28
V2XUL6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Moniliophthora roreri</i>	12.89	3	23.6	7.05
A0A0D7BG87	Heat shock protein	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	10.41	3	71.2	5.83
A0A0W0EVE5	Putative Phosphoenolpyruvate	<i>Moniliophthora roreri</i>	10.26	2	27.8	5.16
A0A0W0FQK1	Vacuolar protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.78	2	67.4	5.15
V2YGW5	Ribonuclease t2	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.60	2	16.7	5.41
E2LSX6	Cytochrome b5	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	9.51	2	14.3	4.93
A0A165HBB0	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Laetiporus sulphureus</i>	9.46	2	16.6	8.15
A0A146IEF3	3-isopropylmalate dehydrogenase	<i>Mycena chlorophos</i>	9.25	2	80.9	6.81
A0A0W0G6U0	Putative mannoprotein	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.48	2	38.9	4.97
A0A284R6Q1	α/β -hydrolase	<i>Armillaria ostoyae</i>	8.20	2	58.8	5.07
V5E7D9	Putative SSC1-mitochondrial HSP70 member	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	7.19	2	71.9	5.94
A8NPW5	Cellulose-growth-specific protein	<i>Coprinopsis cinerea</i>	5.89	1	23.4	7.44
A0A146HEJ4	Phytase	<i>Mycena chlorophos</i>	4.87	1	47.4	4.78
E2LKJ0	1.3- β -glucanosyltransferase	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	4.51	1	9.7	5.38
J0WU19	Ribonuclease T2	<i>Auricularia subglabra</i>	4.16	1	38.5	6.37
A0A060SN64	Adenosylhomocysteinase	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	4.12	1	47.1	6.20
A0A2H3CGV1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Armillaria solidipes</i>	4.07	1	23.9	6.89
A0A286U8T9	Glutathione S-transferase	<i>Pyrrhoderma noxium</i>	4.03	1	25.4	7.64
A0A165SEE6	FMN-dependent α -hydroxy acid dehydrogenase	<i>Neolentinus lepideus</i>	3.94	1	43.5	5.55
A0A286UKA6	Cofactor-independent phosphoglycerate mutase	<i>Pyrrhoderma noxium</i>	3.94	1	56.2	5.76
A0A0W0F0P6	Extracellular invertase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.78	1	69.7	5.41
E2LKC5	Malate dehydrogenase (Fragment)	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	3.76	1	18.2	9.50
V2XCC7	α/β -hydrolase	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.71	1	58.5	4.70
V2X710	Macrophage activating glycoprotein	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.67	1	38.5	4.61
A0A146HEW5	Elongation factor	<i>Mycena chlorophos</i>	3.47	1	42.9	5.62
A0A2G8SA14	Transporter	<i>Ganoderma sinense</i>	3.46	1	57.3	4.92
R7S5C0	Elongation factor 1- γ	<i>Punctularia strigosozonata</i>	3.34	1	47.1	5.97
A0A1E3IJD7	Elongation factor 1- γ	<i>Cryptococcus depauperatus</i>	3.04	1	45.8	5.31
A0A0D7BVS3	Class I glutamine amidotransferase-like protein	<i>Cylindrobasidium torrendii</i>	2.63	1	24.3	5.30
A0A0C2TGA9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Amanita muscaria</i>	2.23	1	23.8	7.58
Unknown functions						
V2X582	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	18.00	4	73.2	5.33
A0A0W0FCJ5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	16.93	4	54.6	5.48
V2WZQ0	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	16.46	4	21.1	5.01
B0CS95	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	15.77	5	71.1	5.21

A0A2G8SGQ3	Uncharacterized protein	<i>Ganoderma sinense</i>	15.53	4	79.8	5.12
A0A0W0EW13	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	15.33	3	29.1	6.54
A0A0L6WK77	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	15.31	3	43.9	5.30
A0A0W0FE24	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	14.79	4	59.5	4.67
E2M476	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	14.57	4	10.6	6.52
E2LIG7	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	13.19	4	12.6	7.46
V2YZY7	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	12.75	4	72.3	4.48
V2XIF8	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	12.71	3	22.0	7.21
A0A0W0GBF1	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	11.92	3	27.5	9.01
E2LJJ5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	11.59	3	31.7	4.86
E2LG23	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	11.46	3	15.8	7.02
E2LDY7	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	10.71	2	29.6	4.88
E2LLC8	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	10.18	3	15.2	5.29
A0A0W0FS96	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	9.74	2	85.2	7.08
A0A284RA01	Uncharacterized protein	<i>Armillaria ostoyae</i>	9.62	2	85.2	4.86
A0A1M2VP69	Uncharacterized protein	<i>Trametes pubescens</i>	9.46	2	156.0	4.61
A0A0W0G5J3	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.53	2	116.8	4.89
E2L6C5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	8.39	2	18.6	9.50
A0A0W0F7H6	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	8.38	2	55.7	4.37
E2M156	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	8.21	2	6.8	6.25
E2L577	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	7.85	2	20.0	5.86
E2L6J5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	7.82	2	22.4	7.05
A0A067SW77	Uncharacterized protein	<i>Galerina marginata</i>	7.67	2	63.1	5.88
E2M5I7	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	7.63	2	15.3	4.34
A0A0W0F8D0	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.40	2	22.6	5.07
A0A0W0FTD8	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	7.31	2	15.2	6.38
A0A151WCS7	Uncharacterized protein	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	6.35	2	32.5	6.77
A0A1X6N192	Uncharacterized protein	<i>Postia placenta</i>	5.63	1	59.1	5.07
A0A060SF71	Uncharacterized protein	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	5.04	1	49.0	5.69
A0A0D0C7X6	Uncharacterized protein	<i>Gymnopus luxurians</i>	4.95	1	53.1	5.12
A0A137QTL6	Uncharacterized protein	<i>Leucoagaricus sp</i>	4.89	1	33.1	5.16
E2LGW5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	4.85	1	30.5	5.10
V2WK32	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.69	1	96.4	4.68
E2L3T9	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	4.68	1	13.2	7.18
A0A0W0EZM4	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	4.68	1	26.9	8.59
A8P8P6	Uncharacterized protein	<i>Coprinopsis cinerea</i>	4.57	1	22.7	6.52
E2LUD6	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	4.35	1	37.4	5.60
A0A0C9TK67	Uncharacterized protein	<i>Paxillus involutus</i>	4.29	1	23.5	6.80
A0A0C9SM82	Uncharacterized protein	<i>Paxillus involutus</i>	4.27	1	15.8	5.30
A0A067SUI6	Uncharacterized protein	<i>Galerina marginata</i>	4.11	1	24.4	6.89
A0A0W0FV23	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.10	1	45.5	4.58
A0A0W0FPP5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.09	1	43.6	4.34
A0A146IB54	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	4.00	1	38.6	5.81
A0A060SB90	Uncharacterized protein	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	3.99	1	71.8	5.29

W4KAU8	Uncharacterized protein	<i>Heterobasidion irregulare</i>	3.99	1	23.9	5.20
E2LWS3	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.97	1	42.9	9.47
A0A0W0FLE0	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.94	1	32.2	6.11
E2M1E5	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.87	1	17.2	5.08
A0A066WJT1	Uncharacterized protein	<i>Rhizoctonia solani</i>	3.84	1	37.6	5.36
E2L9E6	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.72	1	18.7	4.84
A0A0W0GFD3	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.69	1	13.2	7.25
E2LX72	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.66	1	45.9	5.15
V2Z1L2	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.61	1	99.6	5.27
A0A284QKW5	Uncharacterized protein	<i>Armillaria ostoyae</i>	3.61	1	10.2	4.94
M5FN51	Uncharacterized protein	<i>Dacryopinax primogenitus</i>	3.61	1	46.2	5.16
S7R9Y8	Uncharacterized protein	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	3.59	1	35.3	5.91
A0A1Q3EEQ4	Uncharacterized protein	<i>Lentinula edodes</i>	3.57	1	30.6	4.73
E2LT99	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.56	1	23.6	6.81
A0A2A9NHH2	Uncharacterized protein	<i>Amanita thiersii</i>	3.52	1	79.5	5.99
E2L575	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.44	1	25.5	4.92
D8QH49	Uncharacterized protein	<i>Schizophyllum commune</i>	3.43	1	35.5	6.89
A0A0C3FD29	Uncharacterized protein	<i>Piloderma croceum</i>	3.38	1	67.1	6.04
E2M2X1	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.34	1	11.7	7.39
A0A0D0AEJ6	Uncharacterized protein	<i>Suillus luteus</i>	3.30	1	14.7	9.04
A0A0F7RXP4	Uncharacterized protein	<i>Sporisorium scitamineum</i>	3.28	1	12.6	6.54
R7SKT0	Uncharacterized protein	<i>Dichomitus squalens</i>	3.24	1	72.1	4.83
A0A067N0W3	Uncharacterized protein	<i>Botryobasidium botryosum</i>	3.21	1	37.1	8.02
A0A067P234	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	3.09	1	51.4	5.82
E2LTY4	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.06	1	16.5	6.35
A0A0C3RST6	Uncharacterized protein	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	3.03	1	12.2	5.21
E2LM10	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3.03	1	18.1	6.18
A0A0W0EVW2	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	2.94	1	70.5	4.98
A0A0W0F6C2	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora roreri</i>	2.91	1	40.8	7.97
E2LCB3	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	2.88	1	23.1	4.41
E2M678	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	2.78	1	10.6	5.31
D8QAG7	Uncharacterized protein	<i>Schizophyllum commune</i>	2.75	1	72.2	4.94
E2L5V2	Uncharacterized protein	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	2.73	1	22.0	4.59
A0A0D2MYX4	Uncharacterized protein	<i>Hypholoma sublateritium</i>	2.57	1	21.3	6.23

A sustainable approach of enzymatic grafting on *Eucalyptus globulus* wood by laccase from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111

Willian Daniel Hahn Schneider^{*,†}, Cristian Bolaño Losada[‡], Diego Moldes[‡], Roselei Claudete Fontana[†], Félix Gonçalves de Siqueira^{||}, Alicia Prieto[§], María Jesús Martínez[§], Ángel T. Martínez[§], Aldo José Pinheiro Dillon[†], Marli Camassola[†]

[†]*Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.* [‡]*BioSUV Group, Department of Chemical Engineering, Isaac Newton Building, Lagoas-Marcosende s/n, University of Vigo, 36310 Vigo, Spain.*

^{||}*Embrapa Agroenergy, Parque Estação biológica, Asa Norte, 70770-901 Brasília, DF, Brazil.*

[§]*Biological Research Center, Department of Environmental Biology, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.*

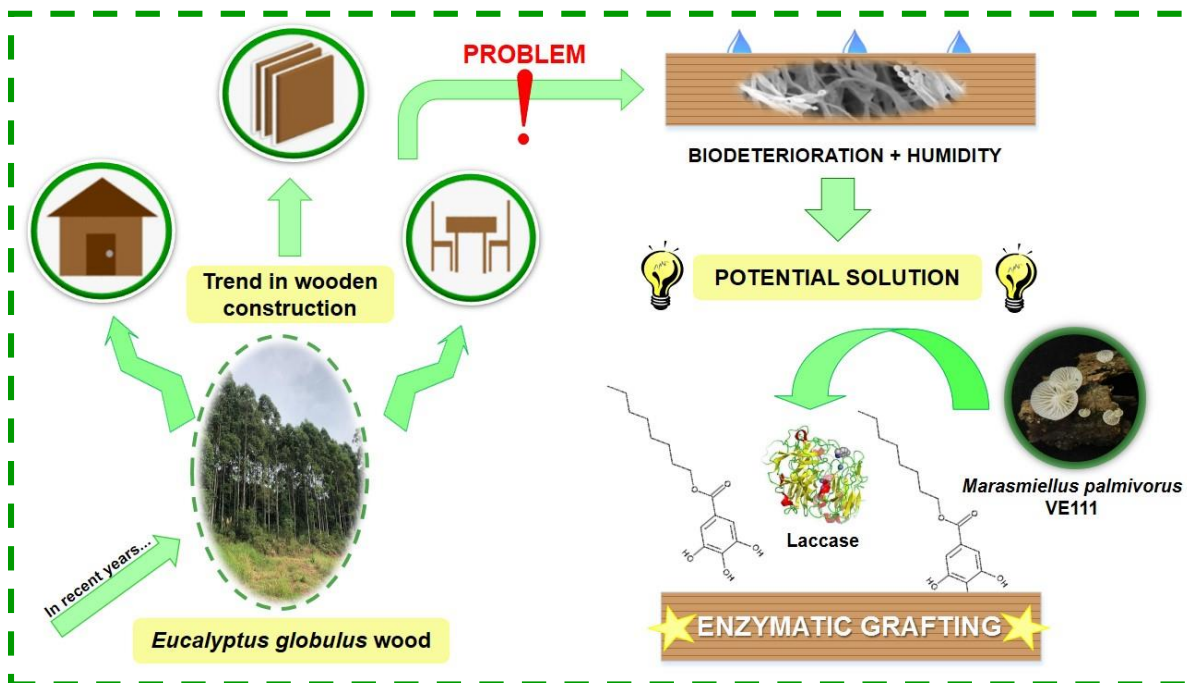
*Corresponding author: willianschneiderwhs@yahoo.com.br (W.D.H. Schneider)

Abstract

Enzymatic grafting on eucalyptus wood with laccase from the basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111, recently isolated in Southern Brazil, was investigated. Three phenol and amine hydrophobic substrates and two mediator compounds were used to verify the potential of the enzyme for oxidative grafting. Laccase-assisted grafting of octyl and lauryl gallate was effectively achieved, presenting better results with mediator addition. In the water contact angle tests, the water drop kept 60% and 37% of its initial angle, with octyl gallate and lauryl gallate, respectively. Consequently, the enzymatic grafting of these compounds allowed an increase in the hydrophobicity of eucalyptus veneers (up to 10% and 5%, respectively), which is an interesting feature for the building and furniture industry to improve the durability and dimensional stability of wood. The results obtained in this work demonstrate the possibility of an environmentally friendly pathway to help solve a major challenge in wooden construction. In addition, the promising results of this work potentiate the use of a novel laccase, on-site manufactured, to be applied in sustainable processes in wood and furniture industries and others where hydrophobization of materials is desirable.

Keywords

Phenolic substrates, Guaiacol, Mediators, Hydrophobisation veneers, Environmentally-friendly process



Graphical Abstract

Synopsis

The enzymatic strategy approach represents the proof of a biotechnological platform, in the context of a green scenario, to mitigate one of the major challenge in wooden construction.

INTRODUCTION

Wooden constructions are a growing trend in the world due to their good thermal performance, production efficiency, and environmental benefits by replacing conventional building materials. In Europe, this growth is particularly pronounced, with a high use of industrialised wooden frames and cross laminated timber (CLT or X-Lam), with wooden buildings reaching levels close to 35%¹.

In South America, the use of wood has also been promoted to develop the so called *wooden towns*, following the example of countries in North America and Scandinavia. In Brazil, for example, the use of reforestation woods (mainly *Eucalyptus* and *Pinus* species) in civil construction has been strongly encouraged, being that eucalyptus is currently the most used wood in the construction and furniture sectors. Recent investments in eucalyptus cloning

resulted in higher wood productivity and quality to meet the increasing market demands for reconstituted wood panels. These reconstituted wood panels include medium density fibreboard and particleboard for use in furniture manufacture from *Eucalyptus* wood whilst respecting the environment.^{2,3}

However, biodeterioration and humidity are important drawbacks affecting the durability of wood.⁴ Therefore, the development of new and environmentally-safe wood preservation strategies against different agents is required. Essentially, a wood preservative should be a low-toxicity compound with the ability to protect the wood against xylophages, and often decrease the timber hydrophilicity. Nevertheless, the conventional preservatives are chemicals with toxic properties that are usually leached out.¹

An outstanding eco-friendly alternative consists on the use of laccases, enzymes that have the ability to oxidize aromatic and non-aromatic compounds including phenols, amines, lignin, and other molecules. Laccases are seen as a green pathway for redox reactions, since they are biocatalysts that only require molecular oxygen as an electron acceptor and produce water as the only by-product. Due to their low substrate specificity and ability to both depolymerise and polymerise substrates, laccases have been attracting attention in different environmental, industrial, and biotechnological sectors.⁵⁻⁸

Consequently, there have been an increasing number of studies on enzymatic grafting, which consists of the formation of covalent bonds between a molecule and a target surface through an enzyme-based reaction. The oxidative capacity of laccases is promising for this purpose, and could be used in the development of new wood hydrophobisation techniques.^{9,10}

White-rot basidiomycetes stand out among the laccase-producing organisms. Most of the studies conducted on enzymatic grafting so far have been performed with commercial biocatalysts. However, bioprospecting of fungal enzymes has contributed greatly to the discovery of highly-secretory species producing enzymes of interest. Recently, a new laccase-producing white-rot basidiomycete, called *Marasmiellus palmivorus*, was collected in Rio Grande do Sul (South Brazil) growing on a decayed palm tree. Preliminary studies have sought to optimise the culture media to induce higher enzymatic secretion^{11,12} and make it a promising fungus for bioremediation¹³ and second-generation bioethanol production.¹⁴

This study aims to apply the laccases from *M. palmivorus* (strain VE111) in the enzymatic grafting of different hydrophobic compounds in wood veneers of *Eucalyptus globulus*, and to evaluate if this sustainable and environmentally-friendly procedure is suitable

to increase the hydrophobicity of the wood, by analysing the kinetics of water contact-angle changes and water absorption.

EXPERIMENTAL SECTION

White-rot basidiomycete and enzyme production

For the production of laccases, the white-rot basidiomycete *M. palmivorus* was used. The strain VE111 used in this work is linked to autochthonous macrofungi from Southern Brazil (SISGEN n° ACCE62) deposited in the mycological section of the Herbarium of the University of Caxias do Sul (HUCS/MIUCS) with duplicates in the Alarich Schultz Herbarium (HAS) of the Zoobotanic Foundation of Rio Grande do Sul (FZB/RS). The strain of *M. palmivorus* VE111 (MIUCS 2025) belongs to the Collection of Microorganisms of the Laboratory of Enzymes and Biomass of the University of Caxias do Sul. The fungus was grown on potato dextrose agar (PDA) (Kasvi®) maintenance medium in Petri dishes, kept in a germinating chamber (Oxylab®) at 28 °C for seven days.¹¹

Laccases were produced in a bioreactor with mechanical agitation and optimised culture medium.¹² Prior to bioreactor growth, pre-inoculation was performed in shaken flasks (reciprocal agitation at 180 rpm, 28 °C, for 96 h) by transferring three mycelial disks (Ø=1.5 cm) from Petri dishes into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium. The medium was composed of 0.5% (w/v) glucose, 0.18% (w/v) casein, 5% (v/v) mineral solution (20× concentration)¹⁵ and potato broth (200 g of minced potatoes boiled in 1 L water) to reach a total volume of 100 mL.

The content of the flask pre-inoculum was transferred into a 10-L stirred-tank bioreactor (New Brunswick, BioFlo/CelliGen115) with an operating volume of 5 L, so that the pre-inoculum represented 10% (v/v) of the total operating volume of the bioreactor. The composition of the medium used in the bioreactor experiments was the same as that used for pre-inoculation, with the addition of 3 mmol/L each of copper sulphate (CuSO₄) and manganese sulphate (MnSO₄). The operating conditions were: free initial pH until 48 h then fixed pH 7.0, 90% dissolved oxygen concentration (agitation: 200–850 rpm; airflow: 0.5–3.0 vvm), and a 28 °C set temperature. The cultivation was interrupted in 120 h, centrifuged, and the supernatant collected.¹²

Laccase activity

Laccase activity was determined kinetically,¹⁶ by quantifying the product of the oxidation of 5 mmol/L 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) to its cation radical ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in 0.05 mol/L sodium citrate, pH 4.0. One activity unit was defined as the amount of enzyme that oxidised 1 $\mu\text{mol/min}$ of substrate, under the above conditions.

Wood extraction

E. globulus wood provided by the Galician Company FINSA (Financiera Maderera S.A.), to be used for the enzymatic grafting assays, was cut into pieces of $2 \times 5 \text{ cm}$ with 0.5 mm thickness and subjected to solvent extraction on a Soxhlet extractor (Afora, 50 mL extractor, refrigerator Dimroth, 100 mL balloon) for 8 h using acetone, according to methodology described in TAPPI-280.¹⁷ After this, a second extraction was carried out with water at 100 °C for 1 h. Then, the veneers of *E. globulus* wood were oven-dried at 50 °C overnight and weighed. The average weight after extraction was $0.296 \pm 0.006 \text{ g}$. The extraction of compounds present on the wood surface, such as lipids, condensed tannins and flavonoids before laccase treatments is important as they interfere in the processes of binding desired substances on wood. And the extraction after treatments is necessary to remove any amount of hydrophobic substance that has not successfully bonded to the wood surface and which may interfere with subsequent analyzes of water contact angle and water absorption.

Oxygen consumption tests

Oxygen consumption was measured to follow the oxidation of the different substrates and mediators. In this test, three substrates (Figure 1) were used to verify the potential of laccase from *M. palmivorus* VE111: octyl gallate (octyl 3,4,5-trihydrobenzoate), lauryl gallate (dodecyl 3,4,5-trihydrobenzoate), and octylamine (1-octylamine). In addition, two phenolic compounds (Figure 1) were used as mediators: catechol (benzene-1,2-diol) and guaiacol (2-methoxyphenol). A control test of laccase alone in contact with the eucalyptus wood veneer was also performed. The oxygen consumption was measured with an oximeter Accumet 600XL (Fisher Scientific), associated with an oxygen probe (Fisher Scientific, 13-620-SSP) and real-time data acquisition software (AccumetComm). The oxygen consumption test was carried out in 50 mL falcon tubes, at 40 °C, with a liquid mixture composed of sodium citrate (0.05 mol/L,

pH 4.0), 30% ethanol, 5 mmol/L of substrate and/or 1 mmol/L of mediator, and 100 U of laccase from *M. palmivorus* VE111.

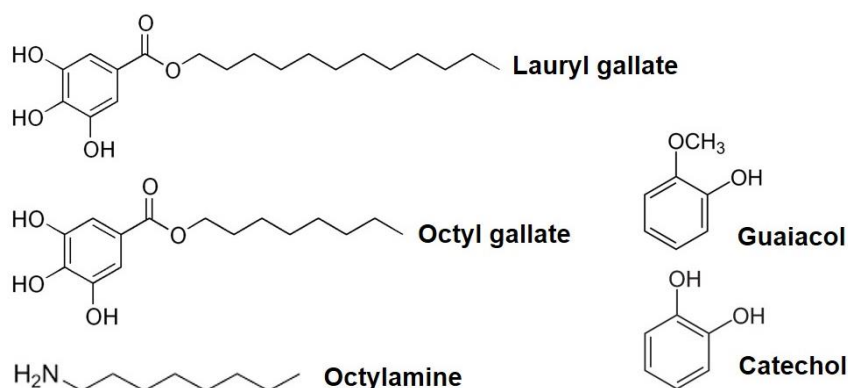


Figure 1. Chemical structure of the three substrates used (on the left) and the two tested mediator compounds (on the right).

Hydrophobisation of wood by enzymatic treatment

The wood pieces were immersed in glass crystallisers with the liquid mixture described in oxygen consumption tests. The substrates and mediators were the same as those described above. Different doses of laccase from *M. palmivorus* VE111 per gram of wood were used (20, 50 and 100 U/g). Four different control conditions were performed: **control 1** (only buffer, without substrate, mediator, or enzyme), **control 2** (buffer and enzyme, without the addition of substrate or mediator), **control 3** (buffer and substrate, without the addition of enzyme or mediator), and **control 4** (buffer, substrate, and mediator, without the addition of enzyme). The total reaction volume was 50 mL. The reaction was incubated at 40 °C for 2 h in an orbital shaker at 75 rpm. After enzymatic treatment, the wood pieces were washed as described in wood extraction and dried at room temperature. The washing step was carried out to remove the octyl gallate, lauryl gallate, and octylamine that was not stably bonded onto the wood.

Water contact angle

The hydrophobicity of the eucalyptus veneers after enzymatic treatment was evaluated by measuring the water contact angle with a MobileDrop GH11 goniometer (KRÜSS) 2 min after depositing a drop of distilled water. The drop shape was analysed using the DSA2 software (KRÜSS).

Water absorption

After measuring the water contact angle, the samples were dried overnight at 50 °C. To calculate the absorption of water by the eucalyptus veneers, the dry samples were immersed in 50 mL of distilled water in a Falcon tube. The weight of the eucalyptus veneers was calculated before immersion and every 30 min up to 3 h of immersion, then every 1 h up to 8 h, and finally after 24 h of immersion. The water absorption of the eucalyptus veneers (in weight %) was calculated as the percentage of the initial dry weight following the equation 1:

$$\text{water absorption (wt \%)} = \frac{W_i - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

where:

W_0 = initial weight of dry eucalyptus veneer

W_i = weight of eucalyptus veneer after immersion in water.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxygen consumption

Laccase from *M. palmivorus* VE111 was able to oxidize all the substrates and mediators used, alone or in combination, in different times and to different extents (Figure 2). With octyl gallate, 100% of the oxygen provided was consumed in 171 s; followed by lauryl gallate, which resulted in the consumption of 91% of the oxygen in 375 s; and octylamine, which resulted in approximately 21% of oxygen being used in 555 s. The oxygen consumption with two possible mediators for laccase from *M. palmivorus* VE111 was also tested and was 40% for guaiacol and 37% for catechol after 550 s. Given these results, guaiacol was chosen as the mediator of laccase to assess its effect in the oxidation of the three hydrophobic substrates. The addition of guaiacol accelerated the depletion of oxygen in reactions with octyl gallate, and enhanced by 15% the consumption of O₂ in those reactions with octylamine (36%) compared to the value determined in the absence of the mediator (21%). However, the oxidation of lauryl gallate by the laccase-guaiacol system was approximately 50% lower than that observed with laccase alone.

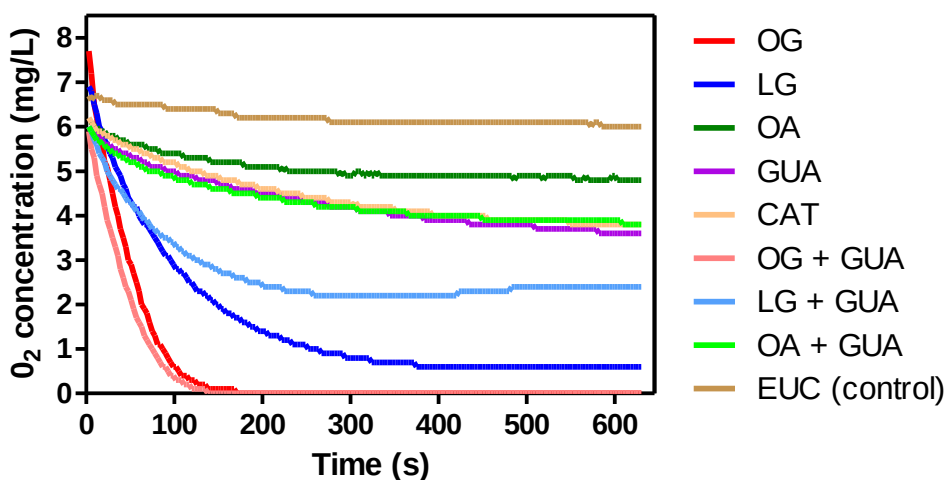


Figure 2. Kinetics of oxygen consumption by laccase from *M. palmivorus* VE111 with different substrates, mediators, and wood. Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; GUA, guaiacol; CAT, catechol; and EUC, eucalyptus veneer.

Kirsch et al.¹⁸ found that, among different laccase-mediator systems, guaiacol was one of the ones that resulted in higher oxidation by Novozyme 51003, a recombinant enzyme of *Myceliophthora thermophila* produced by *Aspergillus oryzae*.

The oxidation of amines has been less explored. However, Galletti et al.¹⁹ reported the oxidation of differently substituted benzyl amines to the corresponding benzaldehydes using the laccase from *Trametes versicolor* and TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) as mediator. De Salas et al.²⁰ prepared conductive polyaniline by laccase polymerisation of aniline. In a similar way, Su et al.²¹ performed a successful preparation of conductive cotton by in situ laccase-catalysed polymerisation of aniline in the presence of the mediator 1-hydroxybenzotriazol (HBT), replacing the need for an additive in aniline oxidation, and developed an antimicrobial coating of textiles by in situ polymerisation of catechol and *p*-phenylenediamine with laccase.²²

Nevertheless, in the current study, the laccase from *M. palmivorus* was more effective at oxidising the phenolic substrates than the amine. In addition, when laccase was added to the water in which the eucalyptus veneer was submerged, 11% of the O₂ was consumed. This suggests that, in the presence of the enzyme, a certain amount of phenoxy radicals are produced and the wood is probably preactivated.²³

Water contact angle

To evaluate the hydrophobicity of eucalyptus veneers, the water contact angle was measured. The efficiency of laccase in the wood treatment was shown by verifying a higher water contact angle when the grafting of the hydrophobic substrates was carried out (Figure 3 and Figure 4).

As seen in Figure 3, the contact angle of the water drop in some of the control conditions was very small or was unable to be measured even before the first 15 s, which was expected, since the carbohydrate content of eucalyptus is approximately 70%.²⁴ In both tests with phenolic substrates, it was observed that the controls containing a phenolic substrate and mediator had a low contact angle after 2 min. A possible self-polymerisation of the mediator in contact with oxygen could have provided this small difference in the contact angle, or perhaps the solvent extraction of the wood surface was not as efficient as expected at removing lipophilic extractives.

Among the substrates used, octyl gallate showed the best results in enzymatic grafting, since it maintained a larger contact angle (Figure 3A). It was also found that the grafting was better with the lowest amount of enzyme tested (20 U/g). The enzymatic grafting was further improved in the presence of guaiacol as a mediator, as deduced from the contact angle that increased up to 60% compared to when the mediator was absent. Possibly some relation to the redox potential of the enzyme or the fact that octyl gallate is a compound of lower molecular weight (with a shorter aliphatic chain) may have favored better grafting results when compared to the other substrates used.

When lauryl gallate was used, it was found that the contact angle was lower than when octyl gallate was used, generally with no contact angle after 2 min of analysis (Figure 3B). However, a higher efficiency of grafting was observed in the presence of the guaiacol, maintaining almost 40% of the water contact angle compared to the initial angle. Furthermore, in enzymatic grafting with lauryl gallate, a higher enzymatic load was necessary (100 U/g). Filgueira et al.²³ previously reported that the presence of a mediator (guaiacol) improved the enzymatic grafting of both octyl gallate and lauryl gallate in thermomechanical pulp.

Cusola et al.²⁵ found efficient results with lauryl gallate by testing a functionalisation solution obtained by laccase, lauryl gallate and sulfonated kraft lignin that increases the hydrophobicity of cellulose sheets considerably. Reynaud et al.²⁶ also verified two-fold increase in contact angle to a high high-lignin-content Kraft pulp by a laccase-catalysed treatment in the presence of lauryl gallate.

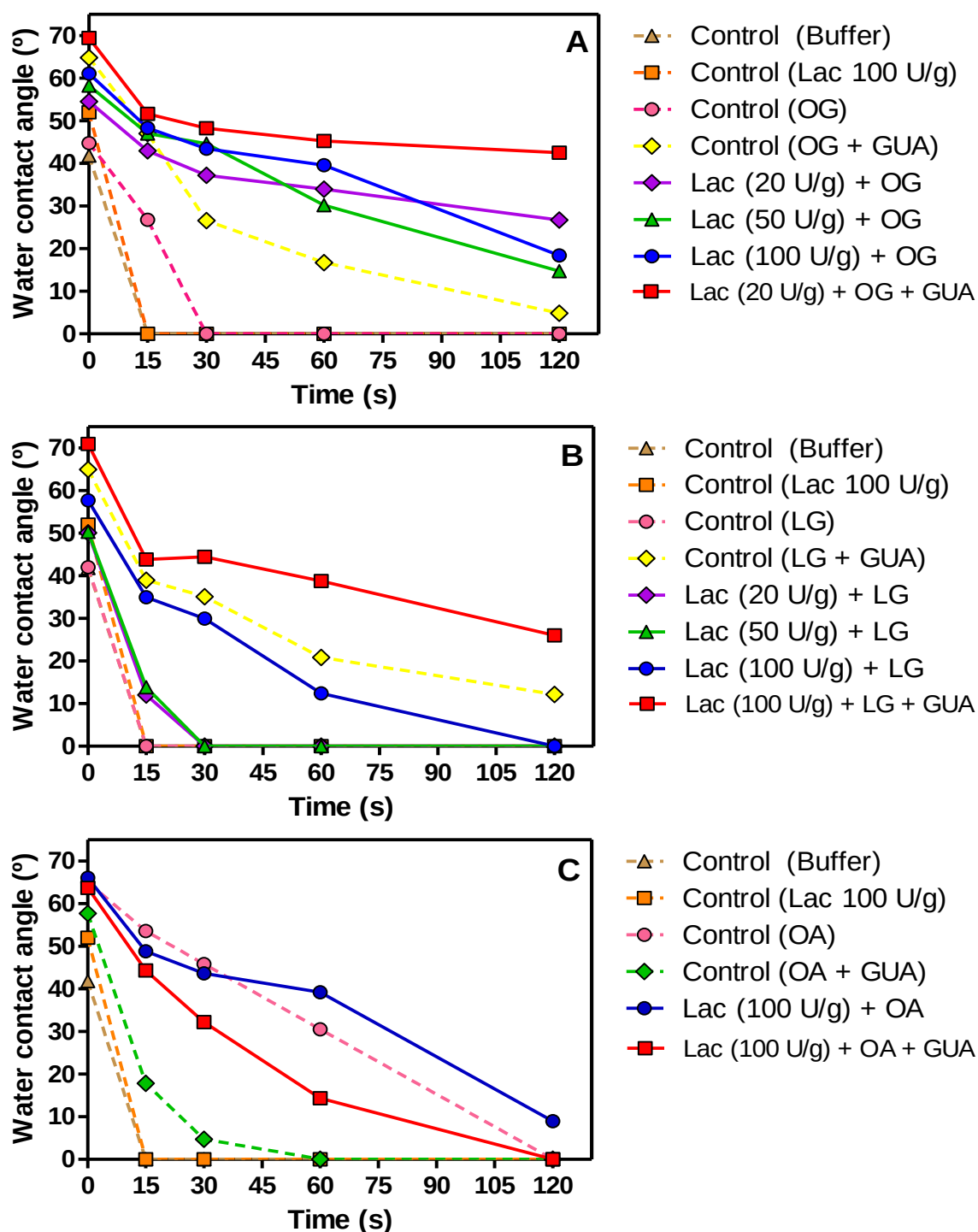


Figure 3. Water contact angle on eucalyptus veneers in control conditions and after different treatments with laccase and: A) octyl gallate, B) lauryl gallate, and C) octylamine (in the absence and presence of guaiacol as mediator). Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; GUA, guaiacol; and CAT, catechol.

Possibly, a low redox potential of the laccase employed compromised a higher efficiency of enzymatic grafting with lauryl gallate alone, and perhaps there was a steric hindrance characteristic of the eucalyptus wood. The use of a mediator might help to oxidise

the substrate, since a mediator works as an electron carrier between laccase and the phenolic substrate, enabling its oxidation and improving the enzymatic grafting.^{23,27}

The results of the enzymatic grafting with octylamine were not encouraging (Figure 3C), since no water contact angle could be measured after 2 min in any of the conditions, except a very small angle observed in samples treated with laccase without a mediator (red line). This result can be explained if, according to the data of oxygen consumption presented before, the amine is not highly oxidised and therefore is not available for grafting onto wood. Most probably, the laccase and laccase-mediator did not have a high enough redox-potential to promote the oxidation of octylamine required for grafting onto the wood surface.

The laccase-mediated grafting of alkylamines has already been reported. For example, Kudanga et al.²⁸ demonstrated that it is possible to use laccase to couple long chain alkylamines to simple phenolic monomers, lignin models, and lignocellulose materials. Dong et al.²⁹ also performed a laccase-mediated grafting of octadecylamine onto lignocellulosic jute fabrics, thus enhancing the surface hydrophobicity. Comparing the present work with the results from Dong et al.²⁹, a possible explanation for the low efficiency of enzymatic grafting with octylamine is the incubation time, since Dong et al.²⁹ showed that the longer the incubation time, the higher the contact angle and the wetting time. Possibly, for octylamine, due to the nature of the substrate itself, a longer reaction time is necessary for the grafting to be more efficient.

Figure 4 shows the contact angle shape of the water drop on eucalyptus wood in the different conditions tested.

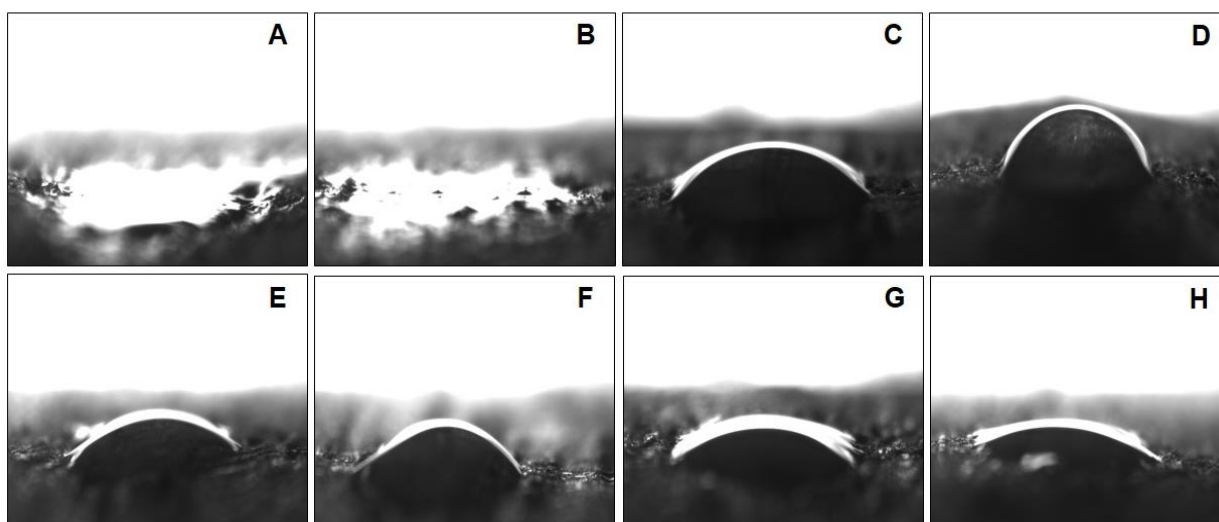


Figure 4. Images of water contact angle on eucalyptus veneers after 30 s including: A, B) controls with only laccase or only phenolic substrate, respectively; C, D) treatments with octyl gallate and laccase without and with guaiacol, respectively; E, F) treatments with lauryl gallate and laccase without and with guaiacol, respectively; G, H) treatments with octylamine and laccase without and with guaiacol, respectively.

Water absorption

Water absorption is a key parameter to determine the degree of hydrophobicity of lignocellulosic materials. The results of the water absorption experiment corroborate the water contact angle data. Under the control conditions, a higher absorption of water by the wood veneers was generally observed. Naturally, eucalyptus wood is more hydrophilic than *Fagus* and *Pinus* due to its chemical and tissue properties and, in addition, it has a lower content of extractives.^{24,30}

The eucalyptus veneers treated with laccase and octyl gallate absorbed the lowest amount of water compared to the other substrates and conditions (Figure 5). A difference in water absorption can be observed in the first 30 min of immersion of the wood veneers treated with octyl gallate (Figure 5A) and lauryl gallate (Figure 5C). The difference in water absorption after 24 h (Figure 5B and 5D) between the laccase treatments (lower water absorption) and the control conditions (higher water absorption), demonstrated that the enzymatic grafting of phenolic compounds was successful at making the eucalyptus veneers more hydrophobic. Reynaud et al.²⁶ verified that the treatment with laccase in the presence of lauryl gallate conferred water absorption resistance to lignin Kraft pulp.

However, the difference in water absorption between the treatments with octylamine and the control conditions was not significant, either after 30 min (Figure 5E) or 24 h (Figure 5F) of immersion in water. These results are in agreement with the water contact angle detected for these samples, which demonstrates the low oxidation efficiency of amine compounds by laccase from *M. palmivorus* VE111, and consequently, explains the low enzymatic grafting observed.

Filgueira et al.,³¹ working with condensed and hydroxypropylated tannins, observed that laccase treatment of the surface of beech wood (*Fagus sylvatica* L.) reduced its water uptake. Filgueira et al.²³ also verified that laccase-assisted hydrophobisation of thermomechanical pulp reduce the water absorption of pulp fibres.

Analysis of the kinetics of water absorption and contact angle confirmed that covalent bonds of octyl gallate and lauryl gallate on eucalyptus veneers were successfully formed. After the enzymatic treatment, the veneers went through an effective washing, demonstrating the achieved grafting efficiency.

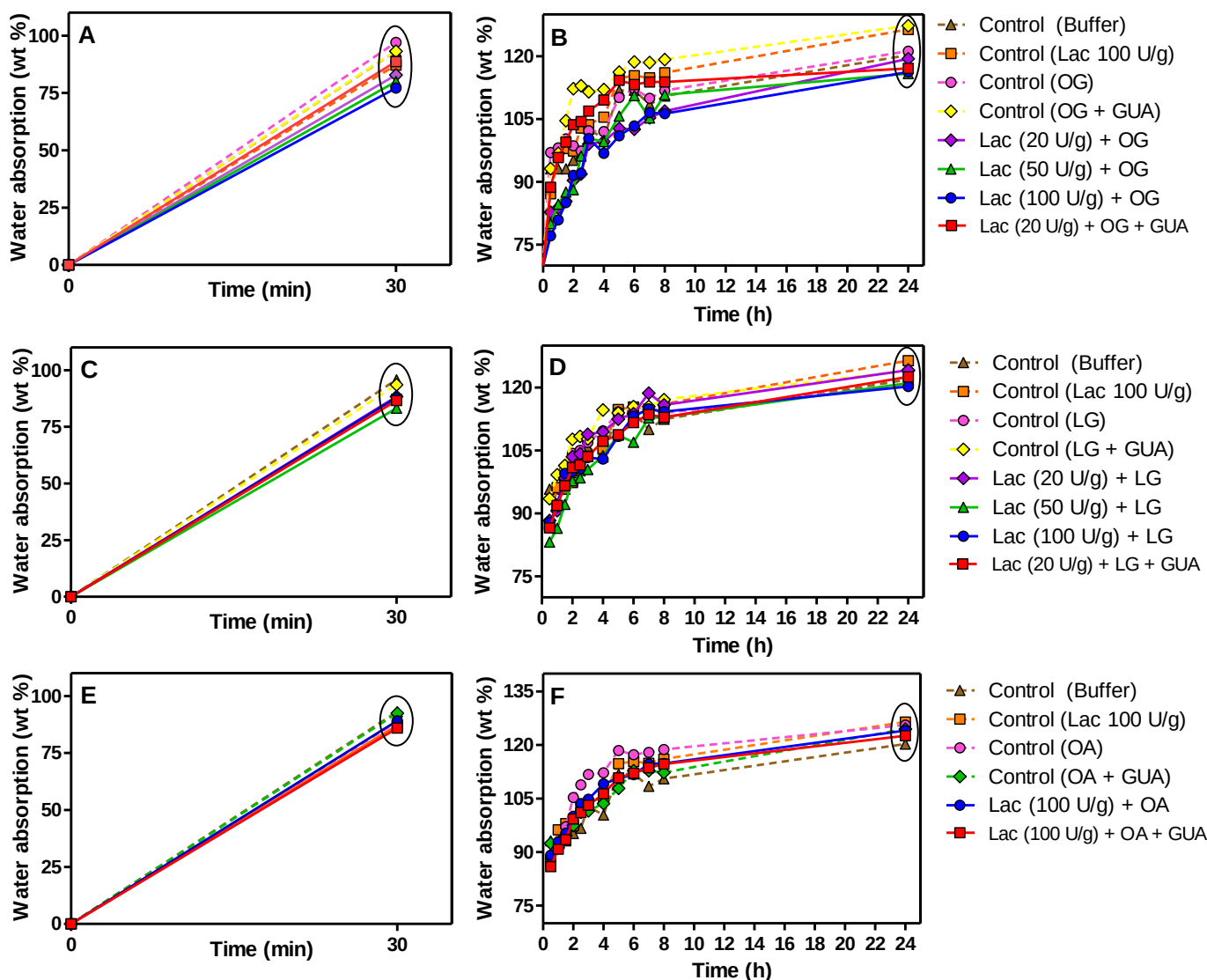


Figure 5. Water absorption by eucalyptus veneers treated with octyl gallate (A and B), lauryl gallate (C and D), and octylamine (E and F). The panels on the left correspond to the absorption of water after 30 min of immersion and the panels on the right show the kinetics of water absorption during 24 h of immersion. Abbreviations: OG, octyl gallate; LG, lauryl gallate; OA, octylamine; and GUA, guaiacol.

As a preliminary study, it is possible to conclude that laccase from *M. palmivorus* VE111 was efficient at promoting the enzymatic grafting of two phenolic substrates, octyl gallate and lauryl gallate, onto the surface of *Eucalyptus globulus* wood. The water contact angle and the water absorption results demonstrated the hydrophobicity increase of the wood veneers, demonstrating the potential of the laccase used. However, the enzyme was not efficient for the grafting of octylamine. Further studies should be carried out to test the enzyme with other substrates and mediators at different concentrations and with other wood species.

It is important to highlight the potential of this novel laccase from *M. palmivorus* and its application on enzymatic grafting. This novel laccase presents advantages when compared to the commercial laccase from *M. thermophila* commonly used, since it promotes results of water contact angle and water absorption similar to other studies,^{4,10,23} although this is one of the few works that *Eucalyptus globulus* veneers are employed. In addition, this on-site manufactured laccase is produced at low cost and also shows high enzymatic activities, demonstrating potential to be used on an industrial

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

E-mail: willianschneiderwhs@yahoo.com.br (W.D.H. Schneider)

ORCID: 0000-0002-3988-7716

Notes

The authors declare that they have no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

University of Caxias do Sul (UCS), Coordination Of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Process 3255/2013) , Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (Process 16/2551-0000 246-0), Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) (34/2014), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 201925/2018-4), MINECO/FEDER (BIO2015-68387-R), Community of Madrid (S2018/EMT-4459), Xunta de Galicia (ED431C 2017/47).

REFERENCES

- (1) Remade – Wood Magazine, **2017**. Wooden construction: a growing trend in the world. 26(150), 12-14. Source: <https://pt.calameo.com/read/0022986486330eb1150c1> (Accessed 25 March 19).
- (2) Lahr, F.A.R.; Nogueira, M.C.J.A.; de Araujo, V.A.; Vasconcelos, J.S.; Cristoforo, A.L. Wood utilization of *Eucalyptus grandis* in structural elements: densities and mechanical properties. *J. Braz. Assoc. Agric. Eng.* **2018**, *38*, 642-647.
- (3) Remade – Wood Magazine, **2019**. A comparison of construction systems in Brazil. 28(157), 16-27. Source: https://issuu.com/revistadamadeira/docs/edi__o_157_web (Accessed 25 March 19).

- (4) Fernández-Costas, C.; Palanti, S.; Charpentier, J-P; Sanromán, M.A.; Moldes, D. A sustainable treatment for wood preservation: enzymatic grafting of wood extractives. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, 5, 7557-7567.
- (5) Kalia, S.; Thakur, K.; Kumar, A.; Celli, A. Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2014**, 102, 48–58.
- (6) Songulashvili, G.; Flahaut, S.; Demarez, M.; Tricot, C.; Bauvois, C.; Debaste, F.; Penninckx, M.J. High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. *Fungal Biol.* **2016**, 120 (4), 481–488.
- (7) Surwase, S.V.; Patil, S.A.; Srinivas, S.; Jadhav, J.P. Interaction of small molecules with fungal laccase: a surface plasmon resonance based study. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, 82, 110-114.
- (8) Agrawal, K.; Chaturvedi, V.; Verma, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour. Bioprocess.* **2018**, 5 (4), 1-12.
- (9) Rencoret, J.; Aracri, E.; Gutiérrez, A.; del Río, J.C.; Torres, A.L.; Vidal, T.; Martínez, A.T. Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers. *Biochem. Eng. J.* **2014**, 86, 16-23.
- (10) Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M.A.; Moldes, D. Wood hydrophobization by laccase-assisted grafting of lauryl gallate. *J. Wood Chem. Technol.* **2015**, 35, 156-165.
- (11) Schneider, W.D.H.; Fontana, R.C.; Mendonça, S.; de Siqueira, F.G.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. *Process Biochem.* **2018**, 69, 1-11.
- (12) Schneider, W.D.H.; Costa, P.C.; Fontana, R.C.; de Siqueira, F.G.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers. *J. Biotechnol.* **2019**, 295, 1-8.
- (13) Cantele, C.; Fontana, R.C.; Mezzomo, A.G.; Rosa, L.O.; Poleto, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. *Biocat. Agri. Biotech.* **2017**, 12, 15–22.
- (14) Pandiyan, K.; Tiwari, R.; Rana, S.; Arora, A.; Singh, S.; Saxena, A.K.; Nain, L. Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 30, 55-64.

- (15) Mandels, M.; Reese, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.* **1957**, 73, 269-278.
- (16) Wolfenden, R.S.; Wilson, R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1982**, 2, 805-812.
- (17) TAPPI. Test Method Acetone Extractives of Wood and Pulp. T 280 pm-99, 1999.
- (18) Kirsch, A.; Ostendorf, K.; Euring M. Oxygen consumption of laccase-mediator-systems (LMS). *J. Materials Sci. Res.* **2015**, 4, (3), 49-58.
- (19) Galletti, P.; Funiciello, F.; Soldati, R.; Giacomini, D. Selective oxidation of amines to aldehydes or imines using laccase-mediated bio-oxidation. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 1840-1848.
- (20) De Salas, F.; Pardo, I.; Salavagione, H.J.; Aza, P.; Amougi, E.; Vind, J.; Martínez, A.T.; Camarero, S. Advanced synthesis of conductive polyaniline using laccase as biocatalyst. *PLoS ONE.* **2016**, 11, e0164958.
- (21) Su, J.; Shim, E.; Noro, J.; Fu, J.; Wang, Q.; Kim, H.R.; Silva, C.; Cavaco-Paulo, A. Conductive cotton by in situ laccase-polymerization of aniline. *Polym.* **2018**, 10, 1023.
- (22) Su, J.; Noro, J.; Silva, S.; Fu, J.; Wang, Q.; Ribeiro, A.; Silva, C.; Cavaco-Paulo, A. Antimicrobial coating of textiles by laccase in situ polymerization of catechol and *p*-phenylenediamine. *React Funct Polym.* **2019**, 136, 25-33.
- (23) Filgueira, D.; Holmen, S.; Melbø, J.K.; Moldes, D.; Echtermeyer, A.T.; Chinga-Carrasco, G. Enzymatic-assisted modification of thermomechanical pulp fibers to improve the interfacial adhesion with poly(lactic acid) for 3D printing. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, 5, 9338-9346.
- (24) Sahin, H.T. Wood-Water Interactions as Affected by Chemical Constituents of Woods. *Asian J. Chem.* **2008**, 20 (4), 3267-3276.
- (25) Cusola, O.; Valls, C.; Vidal, T.; Roncero M.B. Rapid functionalisation of cellulose-based materials using a mixture containing laccase activated lauryl gallate and sulfonated lignin. *Holzforschung.* **2014**, 68, 631-639.
- (26) Reynaud, C.; Tapin-Linguaa, S.; Elegir, G.; Petit-Conil, M.; Baumberger, S. Hydrophobic properties conferred to Kraft pulp by a laccase-catalysed treatment with lauryl gallate. *J. Biotechnol.* **2013**, 67, 302-308.

- (27) Gutiérrez, A.; Del Río, J. C.; Rencoret, J.; Ibarra, D.; Martínez, Á. T. Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72 (4), 845–851.
- (28) Kudanga, T.; Prasetyo, E.N.; Sipilä, J.; Guebitz, G.M.; Nyanhongo, G.S. Reactivity of long chain alkylamines to lignin moieties: implications on hydrophobicity of lignocellulose materials. *J. Biotechnol.* **2010**, 149, 81-87.
- (29) Dong, A.; Fan, X.; Wang, Q.; Yu, Y.; Cavaco-Paulo, A. Hydrophobic surface functionalization of lignocellulosic jute fabrics by enzymatic grafting of octadecylamine. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 79, 353-362.
- (30) Shebani, A.; van Reenen, A.; Meincken, M. Using extractive-free wood as a reinforcement in wood–LLDPE composites. *J. Reinf. Plast. Comp.* **2012**, 31 (4), 225–232.
- (31) Filgueira, D.; Moldes, D.; Fuentealba, C.; García, D.E. Condensed tannins from pine bark: A novel wood surface modifier assisted by laccase. *Ind. Crops. Prod.* **2017**, 103, 185-194.

5 DISCUSSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o basidiomiceto *M. palmivorus* VE111 tem a habilidade de secretar enzimas ligninolíticas, com destaque para as lacases. A produção das enzimas ligninolíticas foi significativamente influenciada pela presença de fontes de carbono e nitrogênio testadas, sendo que glicose e caseína, respectivamente, foram consideradas as melhores fontes. Conforme proposto por diversos autores, fontes de carbono simples, de rápida assimilação, como glicose, frutose, sacarose e outras, estão associadas a maiores atividades enzimáticas em cultivos com basidiomicetos (Mansur *et al.*, 1997; Galhaup *et al.*, 2002; Bettin *et al.*, 2009; Kandasamy *et al.*, 2016).

Verificou-se crescimento fúngico em todas as fontes de carbono e nitrogênio testadas, em diferentes proporções. A concentração dessas fontes também foi decisiva na produção de enzimas ligninolíticas, tendo como base a produção de lacases em frascos mantidos sob agitação. Os resultados obtidos no planejamento experimental e reproduzidos posteriormente em biorreator com agitação mecânica, demonstraram que uma menor concentração de glicose (5 g/L) associada a uma concentração intermediária de caseína (1,80 g/L) promoveram uma maior produção de lacases e peroxidases totais. Em contrapartida, uma possível repressão catabólica por glicose foi verificada nos experimentos com elevadas concentrações de glicose (20 e 30 g/L), nos quais o fungo preferiu consumir a glicose disponível – economizando energia – e utilizá-la para seu crescimento micelial, ao invés de ativar genes relacionados a produção de enzimas específicas (Piscitelli *et al.*, 2011). De fato, a condição que promoveu o maior crescimento, aproximadamente 22 g/L, foi verificada no cultivo com 30 g/L de glicose. Contudo, como essa condição operacional não favoreceu as maiores atividades de lacases e sim o maior crescimento micelial, os resultados evidenciam a suposta repressão catabólica por glicose.

A caracterização das lacases, enzima produzida em maiores proporções por *M. palmivorus* VE111, levou a constatar que a produção da enzima está associada ao crescimento, visto que o perfil de crescimento acompanha a queda no nível de substrato. Uma menor relação C/N proporcionou uma maior produção de lacase, sendo que uma menor concentração de biomassa está relacionada a maior produção da enzima, o que corrobora com os dados obtidos por Souza *et al.* (2002) e D'Agostini *et al.* (2011). Outrossim, no zimograma de atividade de lacases, duas bandas foram identificadas nas condições que mais favoreceram a atividade enzimática, apresentando um pH de reação ótimo mais ácido (pH 3,5), em tampão Mc'Ilvaine

e temperatura ótima de reação a 40 °C. Contudo, nos testes de termoestabilidade enzimática a uma temperatura elevada (50 °C), verificou-se apenas 50% de sua atividade inicial após 3 h.

Dando continuidade às etapas de otimização das enzimas ligninolíticas, no qual diferentes parâmetros foram testados, verificou-se um incremento na atividade enzimática das enzimas analisadas, com exceção de MnP, que se manteve igual em relação aos resultados até então obtidos. O pH teve influência direta na produção das enzimas, uma vez que um pH mais ácido (4,0) diminuiu drasticamente a produção de todas as enzimas, inclusive a níveis mínimos, sem interferir, entretanto, no crescimento micelial. Não obstante, as enzimas ligninolíticas produzidas por *M. palmivorus* VE111 são favorecidas por pH mais neutro (7,0), o que não é comum para a maior parte dos basidiomicetos, que geralmente produzem maiores títulos de lacases e peroxidases entre pH 4,5 e 5,0 (Majeau *et al.*, 2010).

Verificou-se que a combinação de um cultivo com pH livre até 48 h de cultivo, quando o fungo já apresenta uma quantidade de biomassa micelial considerável (entre 4 e 5 g/L), e depois fixando o pH a 7,0, maiores atividades de lacases, peroxidases totais e MnP foram identificadas, inclusive superiores a condição de pH livre. Isso pode ser explicado pelo menor crescimento micelial nos demais cultivos com pH fixos, inclusive o pH 7,0. Nesses experimentos, observou-se que o fungo cresce menos nas primeiras 48 h, o que implica numa menor secreção enzimática. Quando o sistema é operado em pH livre, um maior crescimento micelial é verificado nos primeiros dois dias de cultivo. Estando o pH 7,0 relacionado com as maiores atividades de lacases entre os experimentos com pH fixo, ao fixar o pH do cultivo em 7,0 após 48 h de cultivo, a produção da enzima é favorecida. E ainda assim, evita-se correr o risco de conduzir os experimentos em pH livre e, num dado momento do cultivo, ocorrer uma queda no pH, inativando as enzimas de interesse.

Com relação à concentração de oxigênio dissolvido, o fato de aumentar a frequência de agitação e a vazão de ar no meio, levaram a uma diferença na produção de lacases e MnP. A maior produção dessas enzimas, verificada em uma maior agitação e vazão de ar, deve-se possivelmente ao fato de um maior cisalhamento micelial ter sido provocado, resultando no aumento do número de extremidades de hifas para a secreção de enzimas ao meio de cultivo (Ahamed & Vermette, 2009). Ademais, com o aumento ou redução da temperatura em cinco graus em relação a 28 °C estabelecido nos demais cultivos, a produção das enzimas é fortemente alterada, resultando em menor atividade enzimática, principalmente de lacases. Sugere-se que a transcrição de genes relacionados às lacases de *M. palmivorus* VE111 seja inibida por mudanças de temperatura, principalmente as mais elevadas (33 °C) (Giardina *et al.*, 2009).

Na estratégia de continuar aumentando as atividades enzimáticas, a utilização de substâncias indutoras foi fundamental. A partir desses resultados, verificou-se que CuSO_4 e MnSO_4 combinados, a 3 mmol/L, proporcionaram uma maior atividade de lacases, peroxidases totais e MnP em biorreator quando comparados à condição otimizada sem a adição dos indutores. A utilização de CuSO_4 na indução de lacases (Palmieri *et al.*, 2000) e MnSO_4 na indução de MnP (Hildén *et al.*, 2005) estão bem descritos na literatura, e estão diretamente relacionados ao fato do cobre fazer parte do sítio ativo das lacases e o íon manganês ser necessário pelas MnPs para a redução de substâncias. Contudo, a estratégia de utilizar álcool veratrílico para induzir a secreção de LiPs e oxidases do álcool veratrílico não foi bem sucedida, uma vez que não foram detectadas atividades enzimáticas, sugerindo que o gene não foi transcrito ou até mesmo que o fungo em seu genoma não apresente o gene para esta enzima.

Ao caracterizar as lacases e peroxidases totais produzidas após otimizar o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111, verificou-se o tampão citrato, pH 3,5, como melhor tampão para lacases, temperatura ótima de reação permaneceu em 40 °C e a termoestabilidade enzimática foi melhorada, sendo que após 3h de incubação, a enzima manteve cerca de 58% de sua atividade inicial. No zimograma para lacases, uma nova isoforma foi identificada, até então, não expressa nos demais experimentos, possivelmente relacionada à presença de CuSO_4 no meio de cultivo, o qual induz a expressão de isoenzimas de lacases, como descrito por Palmieri *et al.* (2000). Quanto à caracterização das peroxidases totais, tampão Mc'Irvine foi considerado o melhor tampão, pH ótimo de reação igual a 3,0 e temperatura ótima de reação igual a 25 °C.

Após otimizar o meio de cultivo e os parâmetros operacionais para aumentar a produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111, um estudo proteômico de seu secretoma foi realizado. Conforme esperado, o caldo enzimático secretado por *M. palmivorus* é composto por uma quantidade considerável de oxidoredutases, destacando-a presença majoritária de lacases. Peroxidases foram identificadas em menores quantidades, além de outras oxidases. A presença de duas enzimas de interesse, as peroxidases descolorantes de corantes (DyPs) e a monoxigenase polissacarídica lítica (LPMO) tornam o secretoma de *M. palmivorus* VE111 ainda mais atrativo, pois são enzimas importantes em processos de biorremediação e na despolimerização da celulose na indústria de biocombustíveis, respectivamente (Salvachúa *et al.*, 2013; Martínez, 2016). Embora tenha sido verificada atividade de MnP, a enzima não foi identificada na análise secretômica, possivelmente devido ao fato de nenhum peptídeo para a proteína tenha homologia na busca em banco de dados realizada, salientando-se que o genoma

do fungo ainda não foi sequenciado. Glicosil hidrolases, enzimas importantes na desconstrução da biomassa lignocelulósica, também foram encontradas em número expressivo.

O caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111, composto principalmente por lacases (analisando-se as enzimas em sua singularidade, excluindo-se as proteases e as proteínas não identificadas), foi utilizado em diferentes aplicações dentro do contexto de biorrefinaria. Esse caldo enzimático foi empregado na deslignificação de madeira de *E. globulus*. Uma degradação de aproximadamente 30% da lignina de *E. globulus* foi verificada, com destaque para a remoção de compostos aromáticos e um decréscimo de 16% nas ligações β -O-4, típica e mais abundante ligação em madeiras como eucalipto. O efeito do caldo enzimático – supostamente com atuação majoritária de suas lacases – na estrutura da lignina, resultou em um incremento no rendimento em açúcar, de 10% para glicose e 15% para xilose e, posteriormente, em um aumento em torno de 10% no rendimento em etanol, corroborando com os dados de Rico *et al.* (2014).

Ao aplicar o mesmo caldo enzimático na detoxificação de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor, as lacases presentes removeram efetivamente os compostos fenólicos livres presentes nessa biomassa, alcançado 70% de detoxificação. Ao executar duas diferentes estratégias de detoxificação da biomassa, visando melhorar o rendimento em etanol, verificou-se que o tratamento com lacases após a sacarificação enzimática, resultou em um maior rendimento em etanol (10% em relação ao controle), o que está de acordo com os resultados de Jurado *et al.* (2009). Esse fato pode estar correlacionado com uma menor morte celular de *S. cerevisiae*, verificada no hidrolisado tratado com lacase após a sacarificação. Desta forma, o secretoma de *M. palmivorus* VE111, aplicado para esses determinados fins, contribuiu para aumentar de forma totalmente sustentável o rendimento de etanol de segunda geração.

Outrossim, não foi necessário o uso de mediadores enzimáticos para que as lacases degradassem a lignina presente em *E. globulus*. Esse fato é relevante e configura um diferencial deste trabalho, visando a questão econômica e ambiental, já que a maior parte dos mediadores sintéticos são altamente poluentes e tornam o processo industrial mais oneroso, conforme relatado por Gutiérrez *et al.* (2012). O resultado obtido na ausência de mediador enzimático sugere o envolvimento natural de estruturas fenólicas da própria biomassa de *E. globulus* mediando a oxidação enzimática (Rico *et al.*, 2014). Contudo, é de extrema valia a realização de testes com mediadores enzimáticos naturais, que poderão contribuir com um maior índice de degradação de lignina, um maior grau de detoxificação de compostos inibitórios, resultando em maiores rendimentos de etanol.

Por fim, ao aplicar o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 no *grafting* de compostos hidrofóbicos sobre a superfície de madeira de *E. globulus*, novamente verificou-se a eficiência das lacases presentes no secretoma, mediando a polimerização dos compostos octil e lauril galato na superfície da madeira. Os resultados desse experimento também demonstraram a afinidade existente entre as lacases e os dois mediadores fenólicos utilizados, guaicol e catecol, aumentando o ângulo de contato da água e resultando em uma menor absorção de água pelas chapas de madeira. Assim sendo, foi possível promover maior hidrofobicidade à madeira tratada com lacases, mediador e substrato fenólico. Contudo, o *grafting* enzimático de alquilamina não foi obtido com tanto êxito, possivelmente pelo fato das lacases de *M. palmivorus* VE111 não terem potencial redox suficiente para isso ou oxidarem melhor aminas aromáticas do que alifáticas (Kudanga *et al.*, 2011).

Vale a pena ressaltar que, apesar das lacases não terem sido purificadas nesse trabalho, os resultados obtidos devem-se principalmente a essas enzimas. Isso porque as peroxidases, além de estarem presentes em menor quantidade, diminuem significativamente a sua atividade quando citrato de sódio é empregado como tampão, com pH superior a 3,0 e temperaturas acima de 25 °C, como demonstrado nos resultados de caracterização de peroxidases totais (Schneider *et al.*, 2019). Portanto, seja pouco provável que esse grupo de enzimas contribuíssem de forma expressiva nos testes de deslignificação e detoxificação enzimática, bem como nos experimentos de *grafting* enzimático. Além do mais, foram levadas em consideração as condições ótimas para a atividade de lacases e não foi disponibilizado peróxido de hidrogênio, necessário para a reação das peroxidases.

Diante do exposto, verifica-se que o secretoma de *M. palmivorus* VE111, com predominância de lacases, apresenta uma versatilidade de aplicações. O potencial oxidativo das lacases presentes no secretoma pode ser utilizado tanto em reações de polimerização – de compostos fenólicos de biomassa pré-tratada e em tecnologia de *grafting* enzimático – como de despolimerização – no caso da degradação da lignina de eucalipto. Uma importante descoberta do presente trabalho é que ambas as estratégias podem ser realizadas na ausência de mediadores, uma vantagem da enzima em questão e uma característica não exclusiva da maior parte das lacases descritas na literatura (Munk *et al.*, 2015). Enfim, as lacases de *M. palmivorus* VE111 podem ser utilizadas para diferentes aplicações, conforme a via catalítica desejada.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- o fungo *M. palmivorus* VE111 cresce em todas as fontes de carbono e nitrogênio avaliadas, bem como em todos os valores de pH, temperaturas e concentração de oxigênio dissolvido testados, produzindo lacases, peroxidases totais e manganês peroxidases em cultivo submerso, em frascos mantidos sob agitação e em biorreator com agitação mecânica;
- a produção de lacases por *M. palmivorus* VE111 está associada ao crescimento, visto que o aumento da biomassa celular ocasiona consumo total da fonte de carbono, levando à secreção enzimática;
- o meio de cultivo contendo glicose (5 g/L) e caseína (1,80 g/L) é o mais adequado para a produção de lacases por *M. palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica, sendo que uma menor relação C/N favorece a produção das enzimas ligninolíticas;
- pH livre até 48 h de cultivo e depois fixado em 7,0, associado a uma concentração de oxigênio dissolvido fixa a 90% e temperatura de 28 °C, favoreceu a maior produção de lacases, peroxidases totais e manganês peroxidases por *M. palmivorus* VE111;
- entre as substâncias testadas, CuSO₄ 3 mmol/L foi a que mais induziu a atividade de lacases e peroxidases totais, enquanto MnSO₄ 3 mmol/L foi a melhor para a atividade de manganês peroxidases, em frascos mantidos sob agitação, sendo que não foram verificadas atividades de lignina peroxidases e oxidases do álcool veratrílico na presença de nenhuma substância indutora testada;
- a produção de 6588 U/mL de lacases, 3533 U/mL de peroxidases totais e 60 U/mL de manganês peroxidases em biorreator com agitação mecânica, após otimização dos parâmetros de cultivo e adição de CuSO₄ e MnSO₄ (3 mmol/L), resultando no aumento em todos os fatores de rendimento, produtividade e atividade específica de lacases, além da produção de três isoformas de lacases;
- as lacases produzidas por *M. palmivorus* VE111 caracterizam-se por pH ótimo de reação igual a 3,5, em tampão citrato de sódio e temperatura ótima de reação a 40 °C, enquanto as peroxidases totais por pH ótimo de reação igual a 3,0, em tampão Mc'Irvine e temperatura ótima de reação a 25 °C; além de uma manutenção de 25% e 17% da atividade inicial de lacases e de 80% e 40% da atividade inicial de peroxidases totais, após 24 h de incubação, a 40 °C e 50 °C, respectivamente;
- o secretoma de *M. palmivorus* VE111 é composto por 18% de oxidoredutases, dentre essas, 45% são lacases, 12% são peroxidases e 43% correspondem a outras oxidoredutases,

além de uma quantidade significativa de glicosil hidrolases (21%) que, junto com as oxidoredutases, representam enzimas-chave na degradação de biomassa lignocelulósica;

- atividade sobre ABTS e DMP foram identificadas pelas lacases presentes no secretoma de *M. palmivorus* VE111, sendo que quatro isoformas da enzima são identificadas no zimograma nativo;

- o uso do caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111, composto majoritariamente por lacases, promoveu uma deslignificação de até 31% da madeira de *E. globulus*, por meio da degradação de estruturas aromáticas, sem modificações das unidades S e G, um decréscimo de 16% nas ligações β -O-4, 22% na proporção lignina/carboidrato e uma redução de até 28% no percentual de lignina Klason;

- a degradação da lignina de *E. globulus* resultou em um aumento no rendimento de glicose ($Y_G = 10\%$) e xilose ($Y_X = 15\%$) e, consequentemente, no rendimento em etanol ($Y_E = 8,5\%$), quando comparado com a condição controle não tratada com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111;

- o uso do caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 promoveu a detoxificação de *E. globulus* pré-tratado por explosão a vapor, reduzindo em até 70% os compostos fenólicos livres e resultando em um melhor rendimento em etanol ($Y_E = 10\%$), quando o tratamento com lacases é realizado após a sacarificação enzimática com celulasas e xilanases de *P. echinulatum* S1M29;

- a densidade celular de *S. cerevisiae* CAT-1 foi 22% e 33% superior à condição controle, quando lacase foi adicionada antes da sacarificação e após a sacarificação, respectivamente, comprovando o efeito de remoção de compostos fenólicos pelas lacases e, em menor quantidade, peroxidases e outras oxidases presentes no secretoma de *M. palmivorus* VE111;

- as lacases de *M. palmivorus* VE111 catalisam reações de *grafting* enzimático de substâncias aromáticas fenólicas hidrofóbicas sobre a superfície de madeira de *E. globulus*, contudo, não sendo eficientes no *grafting* de octilamina;

- a polimerização da madeira de *E. globulus* com octil e lauril galato, na presença do mediador guaiacol, resultou na manutenção de até 60% e 37% do ângulo de contato de água e no aumento de 10% e 5% na hidrofobicidade da madeira, respectivamente;

- as lacases de *M. palmivorus* VE111 catalisam reações de polimerização e despolimerização de substratos, na ausência de mediadores enzimáticos, conforme via catalítica a qual a enzima é exposta.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para continuidade de pesquisas a este trabalho, sugerem-se:

- elaboração de diferentes composições de meios de cultivo, tanto em estado sólido como submerso, a base de resíduos lignocelulósicos, para a produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111;
- avaliação da produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111 em diferentes biorreatores, bem como em diferentes regimes de operação;
- avaliação de diferentes substâncias indutoras na produção de enzimas ligninolíticas por *M. palmivorus* VE111;
- purificação da(s) lacase(s) de *M. palmivorus* VE111 e de outras enzimas de interesse identificadas na análise secretômica;
- avaliação de diferentes mediadores enzimáticos para lacases, tanto sintéticos como naturais, e aplicação do sistema lacase-mediador em estratégias de deslignificação enzimática de diferentes biomassas lignocelulósicas;
- realização de testes de detoxificação enzimática com o caldo enzimático de *M. palmivorus* VE111 de hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas;
- estudos de *grafting* enzimático com lacases de *M. palmivorus* VE111 sobre superfícies de madeira de diferentes espécies, bem como de outros materiais;
- avaliação de diferentes substratos na presença ou ausência de mediadores enzimáticos, em ensaios de *grafting* enzimático sobre distintos materiais;
- sequenciamento do fungo *M. palmivorus* VE111 a fim de promover melhoramento genético da linhagem, produzindo lacases mutantes por meio de expressão heteróloga;
- elaboração de coquetéis de enzimas ligninolíticas de *M. palmivorus* VE111 e de outras espécies de basidiomicetos, caracterizando-os e aplicando-os em diferentes fins.

8 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Abbas, A.; Koc, H.; Liu, F.; Tien, M. (2005). Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. **Curr. Genet.** 45: 49-56.
- Agrawal, K.; Chaturvedi, V.; Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresour. Bioprocess.** 5: 4.
- Aguiar, A.; Ferraz, A. (2011). Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quím. Nova.** 34: 1729-1738.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2009). Effect of culture composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulose production. **Bioresour. Technol.** 100: 5970-5887.
- Alalwan, H.A.; Alminshid, A.H.; Aljaafari, H.A.S. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. **Renew. Energy Focus.** 28: 127-139.
- Alcalde, M. (2007). **Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications.** In: Polaina, J.; MacCabe, A.P. (Ed), **Industrial enzymes – structure, function and applications.** Springer, pp. 461-476.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. (1985). **Introducción a la Micología.** 1 ed. Barcelona: Ediciones Omega. 640p.
- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. E.; Blackwell, M. (1996). **Introductory Mycology.** 4 ed. New York: John Wiley & Sons.
- Alfaro, M.; Oguiza, J.A.; Ramírez, L.; Pisabarro, A.G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. **J. Proteomics.** 102: 28-43.
- Almaliky, B.S.A.; Ahmad, Z.A.M.; Kadir, J.; Yun, W.M. (2012). Pathogenicity of *Marasmiellus palmivorus* (Sharples) Desjardin comb. Prov. On Oil Palm *Elaeis guineensis*. **Wulfenia J.** 19: 1-17.

- Alriksson, B.; Sjöde, A.; Sárvári Horváth, I.; Nilvebrant, N-O.; Jönsson, L.J. (2005). Ammonium hydroxide detoxification of spruce acid hydrolysates. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 121–124: 911–922.
- Alriksson, B.; Cavka, A.; Jönsson, L.J. (2011). Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. **Bioresour. Technol.** 102: 1254–1263.
- Alvira, P.; Moreno, A.D.; Ibarra, D.; et al. (2013). Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccases during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high substrate loadings. **Biotechnol. Prog.** 29, 74–82.
- Andrés, J.R.; Llamas, B.F.; Terrón, A. A.; Sánchez, J. A. R.; García, O.P.; Arrojo, E. M.; Pérez, T.J. (1990). **Guia de hongos de la península Ibérica. Claves – Descripciones - Fotografía.** 3a ed. León - noroeste peninsular: Celarayn. 547p.
- Asgher, M.; Ahmad, Z.; Iqbal, H.M.N. (2013). Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Ind. Crops Prod.** 44: 488–495.
- Babot, E.D.; Rico, A.; Rencoret, J.; Kalum, L.; Lund, H.; Romero, J.; del Río, J.C.; Martínez, A.T.; Gutiérrez, A. (2011). Towards industrially-feasible delignification and pitch removal by treating paper pulp with *Myceliophthora thermophila* laccase and a phenolic mediator. **Bioresour. Technol.** 102: 6717–6722.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. **Energy Conv. Manag.** 52: 858-875.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiol. Rev.** 30: 215-242.

- Barneto, A.G.; Aracri, E.; Andreu, G.; Vidal, T. (2012). Investigating the structure–effect relationships of various natural phenols used as laccase mediators in the biobleaching of kenaf and sisal pulps. **Bioresour. Technol.** 112: 327–335.
- Becker, J.; Wittmann, C. (2019). A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels and health-care products. **Biotechnol. Adv.** doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.016.
- Bettin, F.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T.A.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2009). Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36: 1–9.
- Bettin, F. (2010). Cinética de crescimento e produção de lacases do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreator com agitação mecânica. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Bhatia, S.K.; Kim, S-H.; Yoon, J-J.; Yang, Y-H. (2017). Current status and strategies for second-generation biofuel production using microbial systems. **Energy Convers. Manage.** 148: 1142-1156.
- BiofuelsDigest, (2015). GranBio starts cellulosic ethanol production at 21 million gallon plant in Alagoas, Brazil. **Disponível (online)** <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/09/24/granbio-starts-cellulosic-ethanol-production-at-21-mgy-plant-in-brazil/> (10 de fevereiro de 2015).
- Björklund, L.; Larsson, S.; Jönsson, L.J.; Reimann, A.; Nilvebrant, N-O. (2002). Treatment with lignin residue - a novel method for detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 98–100: 563–575.
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.** 255: 445-450.

- Bourbonnais, R.; Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.** 267: 99-112.
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G.; Reid, I.D.; Lanthier, P.; Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1876–1880.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248–254.
- Brijwani, K.; Oberoi, H.S.; Vadlani, P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochem.** 45:120-128.
- Buckee, G.K. (1994). Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method. Collaborative trial. **J. Inst. Brew.** 100: 57-64.
- Cabaj, J.; Soloducho, J.; Chyla, A.; Jedrychowska, A. (2011). Hybrid phenol biosensor based on modified phenoloxidase electrode. **Sens. Actuators B. Chem.** 157: 225-231.
- Camarero, S.; García, O.; Vidal, T.; Colom, J.; del Río, J.C.; Gutiérrez, A.; Gras, J.M.; Monje, R.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. (2004). Efficient bleaching of nonwood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 113–120.
- Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, A.T.; Romero, J.; Gutiérrez, A.; del Río, J.C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1264-1271.

- Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andreus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2012). Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **Sci. Rep.** 1: 1-14.
- Camassola, M.; Rosa, L.O. (2008). **Álbum de Receitas Práticas, Saudáveis e Deliciosas com Cogumelos**. Caxias do Sul: Educs. 120p.
- Cantele, C.; Fontana, R.C.; Mezzomo, A.G.; Rosa, L.O.; Poletto, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2017a). Production, characterization and dye decolorization ability of a high level laccase from *Marasmiellus palmivorus*. **Biocat. Agri. Biotech.** 12: 15–22.
- Cantele, C.; Vilasboa, J.; Reis, E.E.; Fontana, R.C.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; (2017b). Synthetic dye decolorization by *Marasmiellus palmivorus*: simultaneous cultivation and high laccase-crude broth treatment. **Biocat. Agri. Biotech.** 12: 314-322.
- Carabajal, M.; Kellner, H.; Levin, L.; Jehmlich, N.; Hofrichter, M.; Ulrich, R. (2013). The secretome of *Trametes versicolor* grown on tomato juice medium and purification of the secreted oxidoreductases including a versatile peroxidase. **J. Biotechnol.** 168: 15-23.
- Carvalho, W.; Canilha, L.; Ferraz, A.; Milagres, A.M.F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova.** 8: 2191-2195.
- CAZy: Carbohydrate-Active enZYmes Database. (2019). **Disponível (online):** <http://www.cazy.org/> (17 de junho).

- Chandel, A.K.; Kapoor, R.K.; Singh, A.; Kuhad, R.C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresour. Technol.** 98: 1947–1450.
- Chandra, R.P.; Ragauskas, A.J. (2002). Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 855-861.
- Chen, Z.; Wan, C.X. (2017). Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 73: 610-621.
- Chen, H.; Liu, J.; Chang, X.; Chen, D.; Xue, Y.; Liu, P.; Lin, H.; Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Process. Technol.** 160: 196-206.
- Chenthamarakshan, A.; Parambayil, N.; Miziriya, N.; Soumya, P.S.; Kiran Lakshmi, M.S.; Ramgopal, A.; Dileep, A.; Nambisan, P. (2017). Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of design of experiments. **BMC Biotechnol.** 17: 12.
- Collins, P.J.; Dobson, A.D.W. (1997). Regulação da transcrição do gene da lacase em *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3444-3450.
- Collins, P.J.; Dobson, A.D.W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3444–3450.
- Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. (1993). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.
- Crestini, C.; Jurasek, L.; Argyropoulos, D.S. (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. **Chem. Eur. J.** 9: 5371–5378.

- D'Agostini, É.C.; Mantovani, T.R.D'A.; do Valle, J.S.; Paccola-Meirelles, L.D.; Colauto, N.B. Linde, G.A. (2011). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Sci. Agric.** 68: 295–300.
- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 933-941.
- Dedeyan, B.; Klonowska, A.; Tagger, S.; Tron, T.; Iacazio, G.; Gil, G.; Le Petit, J. (2000). Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Maramia querophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 925-929.
- Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. (2001). The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microb. Technol.** 28: 81–88.
- Dillon, A. J. P.; Malvessi, E.; Turelly, N.; Silveira, M. M. (1999). Produção de celulases por *Penicillium echinulatum*. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Resumos.** p.III-3-III5. Rio de Janeiro, 1999.
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53.
- Domingos, M.; Souza-Cruz, P.B.; Ferraz, A.; Prata, A.M.R. (2017). A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispota*. **Chem. Eng. Sci.** 170: 670-676.

- Dong, J.L.; Zhang, Y.Z. (2004). Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. **Prep. Biochem. Biotechnol.** 34: 179–194.
- Dumas, J.B.A. (1826). **Annales de chimie**. 33: 342.
- Dunlop, M.J. (2011). Engineering microbes for tolerance to next generation biofuels. **Biotechnol Biofuels**. 4: 32.
- Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J.F.D.; Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Lett.** 391: 144-148.
- Embrapa, (2019). Ecalipto. **Disponível (online)** <https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucalipto/perguntas-e-respostas> (27 de abril de 2019).
- Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2010). **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 638p.
- Farnet, A-M.; Criquet, S.; Cigna, M.; Gil, G.; Ferré, E. (2004). Purification of laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. **Enzyme Microb. Technol.** 34: 549-554.
- Felby, C.; Thygesen, L.G.; Sanadi, A.; Barsberg, S. (2004). Native lignin for bonding of fiber boards evaluation of bonding mechanisms in boards made from laccase-treated fibers of beech (*Fagus sylvatica*). **Ind. Crops Prod.** 20: 181-189.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989). **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter: Germany. 613p.
- Fenske, J.J.; Griffin, D.A.; Penner, M.H. (1998). Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. **J Ind Microbiol Biotechnol** 20: 364–368.

- Fernández-Costas, C.; Palanti, S.; Charpentier, J-P; Sanromán, M.A.; Moldes, D. (2017). A sustainable treatment for wood preservation: enzymatic grafting of wood extractives. **ACS Sustain. Chem. Eng.** 5: 7557-7567.
- Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M.A.; Moldes, D. (2015). Wood hydrophobization by laccase-assisted grafting of lauryl gallate. **J. Wood Chem. Technol.** 35: 156-165.
- Fernández-Fueyo, E.; Ruiz-Dueñas, F.J.; López-Lucendo, M.; Pérez-Boada, M.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Pisabarro, A.G.; Ramírez, L.; Martínez, A.T. (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnol. Biofuels.** 9:49.
- Fernando, S.; Adhikari, S.; Chandrapal, C.; Murali, N. (2006). Biorefineries: current status, challenges, and future direction. **Energy Fuels.** 20: 1727–1737.
- Ferreira, P.; Carro, J.; Serrano, A.; Martínez, A.T. (2015). A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. **Mycologia.** 107: 1105–19.
- Figueiredo, P.; Lintinen, K.; Hirvonen, J.T.; Kostiainen, M.A.; Santos, H.A. (2017). Properties and chemical modifications of lignina: Towards lignina-based nanomaterials for biochemical applications. **Prog. Mater. Sci.** 93: 233-269.
- Filgueira, D.; Holmen, S.; Melbø, J.K.; Moldes, D.; Echtermeyer, A.T.; Chinga-Carrasco, G. (2017). Enzymatic-assisted modification of thermomechanical pulp fibers to improve the interfacial adhesion with poly(lactic acid) for 3D printing. **ACS Sustain. Chem. Eng.** 5: 9338-9346.
- Floudas, D.; Binder, M.; Riley, R.; Barry, K.; Blanchette, R.A.; Henrissat, B.; Martínez, A.T.; Otilar, R.; Spatafora, J.W.; Yadav, J.S.; Aerts, A.; Benoit, I.; Boyd, A.; Carlson, A.; Copeland, A.; Coutinho, P.M.; de Vries, R.P.; Ferreira, P.; Findley, K.; Foster, B.; Gaskell, J.; Glotzer, D.; Górecki, P.; Heitman, J.; Hesse, C.; Hori, C.; Igarashi, K.; Jurgens, J.A.; Kallen, N.; Kersten, P.; et al. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science.** 336: 1715–9.

- Fu, S.Y.; Yu, H-S.; Buswell, J.A. (1997). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. **FEMS Microbiol. Letters**. 147: 133-137.
- Galhaup, C.; Wagner, H.; Hinterstoisser, B.; Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 529–536.
- Galletti, P.; Funiciello, F.; Soldati, R.; Giacomini, D. (2015). Selective oxidation of amines to aldehydes or imines using laccase-mediated bio-oxidation. **Adv. Synth. Catal.** 357: 1840-1848.
- Gambelli, D.; Alberti, F.; Solfanelli, F.; Vairo, D.; Zanolli, R. (2017). Third generation algae biofuels in Italy by 2030: a scenario analysis using Bayesian networks. **Energy Policy** 103: 165-178.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Giardina, P.; Faraco, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, A.; Vanhulle, S.; Sannia, G. (2009). Laccases: A never-ending story. **Cell. Mol. Life Sci.** 67: 369–385.
- Glass, N. L.; Schmoll, M.; Cate, J. H. D.; Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** 67: 477-498.
- Gonzalez, R.; Treasure, T.; Wright, J.; Saloni, D.; Phillips, R.; Abt, R.; Jameel, H. (2011). Exploring the potential of *Eucalyptus* for energy production in the Southern United States: financial analysis of delivered biomass. Part I. **Biomass Bioenergy**. 35: 755–766.
- Goodell, B.; Jellison, J.; Liu, J.; Daniel, G.; Paszczynsky, A.; Fekete, F.; Krishnamurthy, S.; Jun, L.; Xu, G. (1997). Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **J. Biotechnol.** 53: 133-152.

- Gouvêa, P. F. (2013). Estudos genéticos e moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil.
- Grand Viewer Research, (2019). Lignin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Ligno-Sulphonates, Kraft, Organosolv), By Application (Macromolecule, Aromatic), By Region (APAC, MEA, North America, Europe), And Segment Forecasts, 2019 – 2025. **Disponível (online)** <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lignin-market> (20 de abril de 2019).
- Grassi, M.C.B.; Pereira, G.A.G. (2019). Energy-cane and Renovabio: Brazilian vectors to boost the development of biofuels. **Ind. Crops Prod.** 129: 201-205.
- Gutiérrez, A.; Rencoret, J.; Cadena, E.M.; *et al.* (2012). Demonstration of laccase-based removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks. **Bioresour. Technol.** 119: 114–122.
- Hammel, K.E.; Kapich, A.N.; Jensen Jr, K.A.; Ryan, Z.C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay in fungi. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 445-453.
- Hammel, K.E.; Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr. Opin. Plant. Biol.** 11: 349-355.
- Hariharan, S.; Nambisan, P. (2013). Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and Lac production from *Ganoderma lucidum* under solid-state fermentation of pineapple leaf. **Bioresources.com.** 8: 250-271.
- Hassan, S.S.; Williams, G.A.; Jaiswal, A.K. (2018). Emerging Technologies for the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresour. Technol.** 262: 310-318.
- Hattori, M.; Konishi, H.; Tamura, Y.; Konno, K.; Sogawa, K. (2005). Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. **J. Insect Physiol.** 51: 1359-1365.

- Hatvani, N.; Mecs, I. (2002). Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 381–386.
- Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Schneider, P.; Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1601-1606.
- Hemmes, D.E.; Desjardin, D.E. (2002). **Mushrooms of Hawaii**. California: Ten Speed Press.
- Hibbett, D. S. *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research. **Mycol. Res.** 111: 509-547.
- Hildén, K.; Martinez, A.T.; Hatakka, A.; Lundell, T. (2005). The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. **Fungal Genet. Biol.** 42: 403-419.
- Hou, H.; Zhou, J.; Wang, J.; Du, C.; Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochem.** 39: 1415–1419.
- Ikehata, K.; Buchanan, I.D.; Smith, D.W. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Environ. Eng. Sci.** 3: 1-19.
- INCT, (2014). Centro de Prospecção de fungos e engenharia de enzimas. **Disponível (online)** <http://www.inctdobioetanol.com.br/pesquisa/4/Centrode%20Prospec%C3%A7%C3%A3o-de-fungos-e-engenharia-de-enzimas> (20 de abril de 2019).
- IRENA, (2017). Perspectives for the energy transition: investment needs for a low-carbon energy system **Disponível (online)** <https://www.irena.org/publications/2017/Mar/Perspectives-for-the-energy-transition-Investment-needs-for-a-low-carbon-energy-system> (13 de abril de 2019).

- Isikgor, F.H.; Becer, R.C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemical and polymers. **Polym. Chem.** 6: 4497.
- Jang, M.Y.; Ryu, W.Y.; Cho, M.H. (2006) Enhanced production of laccase from *Trametes* sp. by combination of various inducers. **Biotechnol. Bioproc. E.** 11: 96–99.
- Ji, X-L.; Zhang, W-T.; Gai, Y-P.; Lu, B-Y.; Yuan, C-Z.; Liu, Q-X.; Mu, Z-M. (2012). Patterns of lignocellulose degradation and secretome analysis of *Trametes trogii* MT. **Int. Biodeterior. Biodegradation.** 75: 55-62.
- Jonker, J.G.G.; van der Hilst, F.; Junginger, H.M.; Cavalett, O.; Chagas, M.F.; Faaij, A.P.C. (2015). Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Appl. Energy.** 147: 593-610.
- Jonker, J.G.G.; Junginger, H.M.; Verstegen, J.A.; Lin, T.; Rodríguez, L.F.; Ting, K.C.; Faaij, A.P.C.; van der Hilst, F. (2016). Supply chain optimization of sugarcane first generation and eucalyptus second generation ethanol production in Brazil. **Appl. Energy.** 173: 494-510.
- Jönsson, L.J.; Palmqvist, E.; Nilvebrant, N-O.; Hahn-Hägerdal, B. (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49: 691–697.
- Jönsson, L.F.; Alriksson, B.; Nilvebrand, N-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol. Biofuels.** 6: 16.
- Jönsson, L.J.; Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.** 199: 103-112.
- Jurado, M.; Prieto, A.; Martínez-Alcalá, Á.; Martínez, A.T.; Martínez, M.J. (2009). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresour. Technol.** 100: 6378-6384.

- Jurado, M.; Martínez, A.T.; Martínez, M.J.; Saparrat, M.C.N. (2011). Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes. **Comprehen. Biotechnol.** 6: 595–603.
- Kalyani, D.; Dhiman, S.S.; Kim, H.; Jeya, M.; Kim, I.; Lee, J. (2012). Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass. **Process Biochem.** 47: 671–678.
- Kandasamy, S.; Muniraj, I.K.; Purushothaman, N.; Sekar, A.; Sharmila, D.J.S.; Kumarasamy, R.; Uthandi, S. (2016). High Level Secretion of Laccase (LccH) from a Newly Isolated White-Rot Basidiomycete, *Hexagonia hirta* MSF2. **Front. Microbiol.** 4: 707.
- Kim, H.; Ralph, J.; Akiyama, T. (2008). Solution-state 2D-NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-d₆. **Bioenerg. Res.** 1: 56–66.
- Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N.S.; Ladisch, M.R. (2011). Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme Microb. Tech.** 48: 408–415.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A. (2008). **Dictionary of the Fungi**. 10 ed. Europe – UK: Cabi. 784p.
- Kirsch, A.; Ostendorf, K.; Euring, M. (2015). Oxygen consumption of Laccase-Mediator-Systems (LMS). **J. Material Sci. Research.** 4: 49-58.
- Klonowska, A.; Petit, J. L.; Tron, T. (2001). Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. **FEMS Microbiol. Letters**, 200: 25-30.
- Kolb, M.; Sieber, V.; Amann, M.; et al. (2012). Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. **Bioresour Technol.** 104: 298–304.
- Kubicek, C. P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R. L.; Kubicek-Pranz, E. M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb Technol.** 15: 90-99.

- Kudanga, T.; Prasetyo, E.N.; Sipilä, J.; Guebitz, G.M.; Nyanhongo, G.S. (2010). Reactivity of long chain alkylamines to lignin moieties: implications on hydrophobicity of lignocellulose materials. **J. Biotechnol.** 149: 81-87.
- Kudanga, T.; Nyanhongo, G.S.; Guebitz, G.M.; Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. **Enzyme Microb. Technol.** 48: 195-208.
- Kuila, A.; Mukhopadhyay, M.; Tuli, D.K.; Banerjee, R. (2011). Accessibility of enzymatically delignified *Bambusa bambos* for efficient hydrolysis at minimum cellulase loading: an optimization study. **Enzyme Res.** 805795.
- Kupče, E.; Freeman, R. (2007). Compensated adiabatic inversion pulses: broadband INEPT and HSQC. **J. Magn. Reson.** 187: 258–265.
- Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters.** 169: 247-250.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural preteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature.** 227: 680-685.
- Lahr, F.A.R.; Nogueira, M.C.J.A.; de Araujos, V.A.; Vasconcelos, J.S.; Cristoforo, A.L. (2018). Wood utilization of *Eucalyptus grandis* in structural elements: densities and mechanical properties. **J. Braz. Assoc. Agric. Eng.** 38: 642-647.
- Larsson, S.; Reimann, A.; Nilvebrant, N-O.; Jönsson, L.J. (1999). Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 77: 91–103.
- Larsson, S.; Quintana-Sáinz, A.; Reimann, A.; Nilvebrant, N-O.; Jönsson, L.J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygenlimited growth and

- ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 84: 617–632.
- Laurichesse, S.; Avérous, L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Prog. Mater. Sci.** 39: 1266-1290.
- Leicht, I.J.; Kooij, P.W.; Coker, T.; Grigoriev, I.V.; Nagy, L.G.; Martin, F.; Stajich, J.; Dentinger, B.T.M.; Gaya, E. (2018). **State of the World's Fungi 2018 - Fungal genomes: Exploring, understanding and utilising their diversity**. London: Royal Botanic Garden.
- Li, J.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. (2007). Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresour Technol.** 98: 3061–3068.
- Li, J., Sun, F.; Li, X. *et al.* (2012). Enhanced saccharification of corn straw pretreated by alkali combining crude ligninolytic enzymes. **J Chem Technol Biotechnol.** 87: 1687-1693.
- Liu, G.; Qin, Y.; Li, Z.; Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnol Adv.** 31: 962-975.
- Lipreri, A. (2012). Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para aumento da atividade extracelular de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Liu, G.; Qin, Y.; Li, Z.; Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnol Adv.** 31: 962-975.
- Lomascolo, A.; Record, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Delattre, M.; Robert, J.L.; Georis, J.; Dauvrin, T.; Sigoillot, J.C.; Asther, M. (2003). Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **J. Appl. Microbiol.** 94: 618–624.

- López, M.J.; Nichols, N.N.; Dien, B.S.; Moreno, J.; Bothast, R.J. (2004). Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64: 125–131.
- Lu, C.; Wang, H.; Luo, Y.; Guo, L. (2010). An efficient system for pre-delignification of gramineous biofuel feedstock in vitro: application of a laccase from *Pycnoporus sanguineus* H275. **Process Biochem.** 45: 1141–1147.
- Ludwig, D.; Amann, M.; Hirth, T.; Rupp, S.; Zibek, S. (2013). Development and optimization of single and combined detoxification processes to improve the fermentability of lignocellulose hydrolyzates. **Bioresour. Technol.** 133: 455–461.
- Mahajan, S.; Master, E.R. (2010). Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosae* grown on spruce and microcrystalline cellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 86: 1903–1914.
- Mai, C.; Militz, H.; Kües, U. (2004). Biotechnology in the wood industry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63: 477–494.
- Majeau, J.A.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresour. Technol.** 101: 2331–2350.
- Mäkelä, M.R.; Marinović, M.; Nousiainen, P.; Liwanag, A.J.M.; Benoit, I.; Sipilä, J.; Hatakka, A.; de Vries, R.P.; Hildén, K.S. (2015). Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. **Adv. Appl. Microbiol.** 91: 63–137.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269–278.
- Mansur, M.; Suarez, T.; Fernandez-Larrea, J.B.; Brizuela, M.A.; Gonzalez, A.D. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin degrading basidiomycete CECT 20197. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2637–2646.

- Martens-Uzunova, E. S.; Schaap, P. J. (2009). Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. **Fungal Genet Biol.** 46: 170-179.
- Martín, C.; Galbe, M.; Nilvebrant, N-O.; Jönsson, L.J. (2002). Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 98: 699-716.
- Martín, C.; Klinker, H.B.; Thomsen, A.B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugar cane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martínez, A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enz. Microb. Technol.** 30: 425-444.
- Martínez, A.T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M.J.; Gutiérrez, A.; del Río, J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. **Int. Microbiol.** 8: 195-204.
- Martínez, A.T. (2016). How to break down crystalline cellulose. **Science.** 352: 1050-1051.
- Martínez, D., Larrondo, L.F.; Putnam, N.; Gelpke, M.D.; Huang, K.; Chapman, J.; Helfenbein, K.G.; Ramaiya, P.; Detter, J.C.; Larimer, F.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B.; Berka, R.; Cullen, D.; Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat Biotechnol.** 22: 695-700.
- Martínez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S.E.; *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.** 26: 553-560.
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99:1417-1424.

- Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; García, J.C.; et al. (2012). Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. **Biomass Bioenerg.** 42: 97–106.
- Martin-Sampedro, R.; Capanema, E.A.; Hoeger, I.; Villar, J.C.; Rojas, O.J. (2011). Lignin changes after steam-explosion and laccase-mediator treatment of Eucalyptus wood chips. **J. Agric. Food Chem.** 59: 8761-8769.
- Mathiasen, T.E. (1995). Laccase and beer storage. **Denmark Patent.** PCT Int.Appl.WO 9521240 A2.
- Mayer, AM.; Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochem.** 60: 551-565.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2014). Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel.** 133: 232–240.
- Metz, B. (1976). From pulp to pellet. **Tese de doutorado.** Technical University of Delft, Holanda.
- Mezzomo, A.G. (2013). Levantamento e seleção de macrofungos (Basidiomycota – Agaricomycotina) lignolíticos do parque estadual de Itapeva, Torres, Rio Grande do Sul. **Monografia.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Mikiashvili, N.; Wasser, S.P.; Nevo, E.; Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleorotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 999-1002.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemis.** 31: 426-428.

- Minussi, R.C.; Pastore, G.M.; Duran, N. (2007). Laccase induction in fungi and laccase/ N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. **Bioresour. Technol.** 98: 158–164.
- Moilanen, U.; Kellock, M.; Galkin, S.; Viikari, L. (2011). The laccase catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. **Enzyme Microb. Technol.** 49: 492–498.
- Moldes, D.; Díaz, M.; Tzanov, T.; Vidal, T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. **Bioresour. Technol.** 99: 7959–7965.
- Moreno, A.D.; Ibarra, D.; Fernández, J.L.; Ballesteros, M. (2012). Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Bioresour. Technol.** 106: 101–109.
- Moreno, A.D.; Ibarra, D.; Ballesteros, I.; et al. (2013). Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam exploded biomass treated with laccase. **Bioresour. Technol.** 135, 239–245.
- Moreno, A.D.; Ibarra, D.; Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M. (2015). A review of biological delignification and detoxification methods for lignocelulosic bioethanol production. **Crit. Rev. Biotechnol.** 35: 342-354.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Mousty, C.; Vieille, L.; Cosnier, S. (2007). Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: a reagentless amperometric biosensor. **Biosens. Bioelectron.** 22: 1733-1738.

- Mukhopadhyay, M.; Kuila, A.; Tuli, D.K; Banerjee, R. (2011). Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. **Biomass Bioenergy**. 35: 3584–3591.
- Munk, L.; Sitarz, A.K.; Kalyani, D.C.; Mikkelsen, D.; Meyer, A.S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignina? **Biotechnol. Adv.** 33: 13-24.
- Nazari, M.; Kashanian, S.; Rafipour, R. (2015). Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as cathecol. **Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.** 145: 130-138.
- Nilvebrant, N-O.; Reimann, A.; Larsson, S.; Jönsson, L.J. (2001) Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 91–93: 35–49.
- Nova Cana, (2013). Viabilidade de eucalipto para produção de etanol. **Disponível (online)** <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/viabilidade-eucalipto-producao-etanol-260213> (27 de abril de 2019).
- Nova Cana, (2017). Governo prevê crescimento de Mercado, mas reduz projeção de oferta de etanol para 2027. **Disponível (online)** <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/governo-preve-crescimento-mercado-reduz-projecao-oferta-etanol-2027-061118> (13 de abril de 2019).
- Okuda, N.; Soneura, M.; Ninomiya, K.; Katakura, Y.; Shioya, S. (2008). Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. **J. Biosci. Bioeng.** 106:128–133.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B.; Sannia, G. (2000). Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 920-924.

- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I – Bioprocesses and products. **Process Biochem.** 35: 1153–1169.
- Pandiyan, K.; Tiwari, R.; Rana, S.; Arora, A.; Singh, S.; Saxena, A.; Nain, L. (2013). Comparative efficiency of different pretreatment methods on enzymatic digestibility of *Parthenium* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 1-10.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.** 22: 189-259.
- Parajó, J.C.; Dominguez, H.; Domínguez, J.M. (1997). Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme Microb. Tech.** 21: 18–24.
- Peberdy, J.F. (1994). Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnol.** 12: 50-57.
- Persson, P.; Larsson, S.; Jönsson, L.J.; Nilvebrant, N-O.; Sivik, B.; Munteanu, F.; Thörneby, L.; Gorton, L. (2002). Supercritical fluid extraction of a lignocellulosic hydrolysate of spruce for detoxification and to facilitate analysis of inhibitors. **Biotech. Bioeng.** 79: 694–700.
- Pickard, M.A.; Vandertol, H. Roman, R.; Vazquez-Duhalt, R. (1999). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. **Can. J. Microbiol.** 45: 627–631.
- Piscitelli, A.; Giardina, P.; Lettera, V.; Pezzella, C.; Sannia, G.; Faraco, V. (2011). Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Curr. Genomics.** 12: 104–112.
- Plácido, J.; Capareda, S. (2015). Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. **Bioresour. Bioprocess.** 2: 23.

- Pointing, S.B.; Jones, E.B.G.; Vrijmoed, L.L.P. (2000) Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**. 92: 139–144.
- Pong, V. M.; Zainal Abidin, M. A.; Almaliky, B.S.A.; Kadir, J.; Wong, M. Y. (2012). Isolation, Fruiting and Pathogenicity of *Marasmiellus palmivorus* (Sharples) Desjardin (comb. prov.) in Oil Palm Plantations in West Malaysia. **Trop. Agric. Sci.** 35: 37-48.
- Popper, Z.A.; Michel, G.; Herve, C.; Domozych, D.S.; Willats, W.G.; *et al.* (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** 62: 567–90.
- Putzke, J; Putzke, M.T.L. (2002). **Os Reinos Dos Fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: Edunisc. 606p.
- Ragauskas, A.J.; Beckham, G.T.; Biddy, M.J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M.F.; Davison, B.H.; Dixon, R.A.; Gilna, P.; Keller, M.; Langan, P.; Naskar, A.K.; Saddler, J.N.; Tschaplinski, T.J.; Tuskan, G.A.; Wyman, C.E. (2014). Lignin valorization: improving lignina processing in the biorefinery. **Science**. 344: 1246843.
- Ramage, M.H.; BurrIDGE, H.; Busse-Wicher, M.; Fereday, G.; Reynolds, T.; Shah, D.U.; Wu, G.; Yu, L.; Fleming, P.; Densley-Tingley, D.; Allwood, J.; Dupree, Linden, P.F.; Scherman, O. (2017). The wood from the trees: The use of timber in construction. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 68: 333-359.
- Ranatunga, T.D.; Jervis, J.; Helm, R.F.; McMillan, J.D.; Wooley, R.J. (2000). The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: The role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme Microb. Tech.** 27: 240–247.
- Rapp, P.; Grote, E.; Wagner, F. (1981). Formation and location of 1,4- β -glucanases and 1,4- β -glucosidases from *Penicillium janthinellum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 857–866.
- Reddy, C.A.; D’Souza, T.M. (1994). Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol.** 13: 137-152.

- Reis, A. (2017). Estratégias para incremento das atividades de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo sobmerso. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Remade – Wood Magazine, (2013). Etanol de casca de eucalipto na mira das pesquisas. **Disponível (online)** <http://www.remade.com.br/noticias/10905/etanol-de-casca-de-eucalipto-na-mira-das-pesquisas> (27 de abril de 2019).
- Remade – Wood Magazine, (2017). Wooden construction: a growing trend in the world. **Disponível (online)** <https://pt.calameo.com/read/0022986486330eb1150c1> (25 de março de 2019).
- Remade – Wood Magazine, (2019a). A comparison of construction systems in Brazil. **Disponível (online)** https://issuu.com/revistadamadeira/docs/edi_o_157_web (25 de março de 2019).
- Remade – Wood Magazine, (2019b). Resíduos agroflorestais que se transformam em pellets. **Disponível (online)** https://issuu.com/revistadamadeira/docs/edi_o_157_web (27 de abril de 2019).
- Rencoret, J.; Marques, G.; Gutierrez, A.; Nieto, L.; Santos, J.I.; Jimenez-Barbero, J.; Martinez, A.T.; del Rio, J.C. (2009). HSQC-NMR analysis of lignin in woody (*Eucalyptus globulus* and *Picea abies*) and non-woody (*Agave sisalana*) ball-milled plant materials at the gel state. **Holzforschung**. 63: 691-698.
- Retnowati, A. (2018). The species of *Marasmiellus* (Agaricales: Omphalotaceae) from Java and Bali. **Gardens' Bulletin Singapore**. 70: 191-258.
- Ribeiro, D. A.; Cota, J.; Alvarez, T. M.; Bruchli, F.; Bragato, J.; Pereira, B. M. P.; Pauletti, B. A.; Jackson, G.; Pimenta, M. T. B.; Murakami, M. T.; Camassola, M.; Ruller, R.; Dillon, A. J. P.; Pradella, J. G.; Paes Leme, A. F.; Squina, F. M. (2012). The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **Plos One**. 7: 50571.

- Ribeiro, D.S.; Henrique, S.M.B.; Oliveira, L.S.; Macedo, G.A.; Fleuri, L.F. (2010) Enzymes in juice processing: a review. **Int. J. Food Sci. Technol.** 45: 635-641.
- Rico, A.; Rencoret, J.; del Río, J.C.; Martínez, A.T.; Gutiérrez, A. (2014). Pretreatment with laccase and phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of *Eucalyptus* feedstock. **Biotechnol. Biofuels.** 7: 6.
- Rodriguez Couto, S. (2007). Laccase from *Trametes hirsuta* grown on paper cuttings: application to synthetic dye decolorization at different pH values. **Eng. Life Sci.** 7: 229–234
- Rosa, L.O. (2013). Levantamento de Macrofungos (filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina) do nordeste do Rio Grande do Sul e avaliação do seu potencial ligninolítico. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Rosa, L.O.; Wasum, R.A.; Dillon, A.J.P. (2016). **Macrofungos (Filo Basidiomycota) do Sul do Brasil. Levantamento e verificação da capacidade de secreção de enzimas ligninolíticas.** Saarbrücken: Novas Edições Acadêmicas.
- Rowell, R.M. (2005). **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites.** 1 ed. CRC Press: Madison.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. **Nature.** 454: 841-845.
- Ruiz-Dueñas, F.J.; Morales, M.; García, E.; Miki, Y.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. **J. Exp. Bot.** 60: 441-452.
- Ruiz-Dueñas, F.J.; Lundell, T.; Floudas, D.; Nagy, L.G.; Barrasa, J.M.; Hibbett, D.S.; Martínez, A.T. (2013). Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on ten sequenced genomes. **Mycologia.** 105: 1428–1444.

- Rulli, M.C.; Bellomi, D.; Cazzoli, A.; Carolis, G.; D'Odorico, P. (2016). The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Sci. Rep.** 6: 22521.
- Ryan, D.; Leukes, W.; Burton, S. (2007). Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. **Bioresour. Technol.** 98: 579–587.
- Saha, B.C.; Iten, L.B.; Cotta, M.A.; Wu, Y.V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Proc. Biochem.** 40: 3693–3700.
- Saladini, F.; Patrizi, N.; Pulselli, F.; Marchettini, N.; Bastianoni, S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 66: 221–227.
- Salvachúa, D.; Martínez, A.T.; Tien, M.; López-Lucendo, M.F.; García, F.; de los Ríos, V.; Martínez, M.J.; Prieto, A. (2013). Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. **Biotechnol. Biofuels.** 6: 115.
- Salvachúa, D.; Katahira, R.; Cleveland, N.S.; Khanna, P.; Resch, M.G.; Black, B.A.; Purvine, A.O.; Zink, E.M.; Prieto, A.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T.; Simmons, B.A.; Gladden, J.M.; Beckham, G.T. (2016). Lignin depolymerization by fungal secretomes and a microbial sink. **Green Chem.** doi: 10.1039/C6GC01531J
- Santos, F.A.; Queiróz, J.H.; Colodette, J.L.; Fernandes, S.A.; Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova.** 15: 1–7.
- Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R. (2001). **Biorreatores e processos fermentativos**. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Ed), **Biotecnologia Industrial – Engenharia Química**. Edgard Blücher LTDA. p. 179–192.

- Schneider, W.D.H.; Gonçalves, T.A.; Uchima, C.A.; Couger, M.B.; Prade, R.; Squina, F.M.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2016). *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Biofuels.** 9: 66.
- Schneider, W.D.H.; Costa, P.C.; Fontana, R.C.; de Siqueira, F.G.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2019). Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers. **J. Biotechnol.** 295: 1-8.
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2015). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresour. Technol.** 192: 228–237.
- Selinheimo, E.; Kruus, K.; Buchert, J.; Hopia, A.; Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. **J. Cereal Sci.** 43: 152-159.
- Servili, M.; De Stefano, G.; Piacquadio, P.; Sciancalepore, V. (2000). A novel method for removing phenols from grape must. **Amer. J. Enol. Viticult.** 51: 357-361.
- Silveira, V. D. (1995). **Micologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 336 p.
- Singer, R. (1986). **The Agaricales in modern taxonomy.** 4 ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 981 p.
- Singh, S.; Khanna, S.; Moholkar, V. S.; Goyal, A. (2014). Screening and optimization of pretreatments for *Parthenium hysterophorus* as feedstock for alcoholic biofuels. **App. Energy.** 129: 195 – 206.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticult.** 16: 44-158.

- Slagman, S.; Zuilhof, H.; Franssen, M.C.R. (2018). Laccase-Mediated Grafting on Biopolymers and Synthetic Polymers: A Critical Review. **Chem. Bio. Chem.** 19: 288-311.
- Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. **Technical. Report NREL/TP-510-42619.**
- Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J. Templeton, D.J.W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **Technical. Report NREL/TP-510-42621.**
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.D.C. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical. Report NREL/TP-510-42618.**
- Somerville, C.; Youngs, H.; Taylor, C.; Davis, S.C.; Long, S.P. (2010). Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. **Science.** 329: 790-792.
- Songulashvili, G.; Elisashvili, V.; Wasser, S.; Nevo, E.; Hadar, Y. (2006). Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. **Biotechnol. Lett.** 28: 1425–1429.
- Songulashvili, G.; Flahaut, S.; Demarez, M.; Tricot, C.; Bauvois, C.; Debaste, F.; Penninckx, M.J. (2016). High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. **Fungal Biol.** 120: 481-488.
- Sousa, A.L.N.; Ribeiro, A.C.B.; Santos, D.G.; Ricardo, N.M.P.S., Ribeiro, M.E.N.P.; Cavalcanti, E.S.B.; Cunha, A.P.; Ricardo, N.M.P.S. (2017). Modificação química da pectina do melão caipira (*Cucumis melo* var. *acidulus*). **Quím. Nova.** 40: 554-560.
- Souza, C.G.M.; Zilly, A.; Peralta, R.M. (2002). Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **J. Basic. Microbiol.** 42: 83–90.

- Sun, J.; Tian, C.; Diamond, S.; Glass, N. L. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic cell**. 11: 482-493.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 83: 1-11.
- Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L; Linkins, A.E. (1989). Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycology**. 81: 234-235.
- Tagger, S.; Périsol, C.; Gil, C.; Vogt, G.; Petit, J. L. (1998). Phenoloxidases of the White-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). **Enzyme Microb. Technol.** 23: 372-379.
- TAPPI, (1999). Test Method Acetone Extractives of Wood and Pulp. **T-280 pm-99**.
- Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z., Agapito, M.S.M., Coutinho, J.A.P., Xavier, A.M.R.B., (2006). Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 134: 233-248.
- Teixeira, M.C.; Godinho, C.P.; Cabrito, T.R.; Mira, N.P.; Sá-Correia, I. (2012). Increased expression of the yeast multidrug resistance ABC transporter Pdr18 leads to increased ethanol tolerance and ethanol production in high gravity alcoholic fermentation. **Microb. Cell Fact.** 11:98.
- Tetsch, L.; Blend, J.; Jansen, M.; Holker, U. (2005). Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. **FEMS Microbiol. Letters**. 245: 161-168.
- Thatcher, A.; Waterson, P.; Todd, A.; Moray, N. (2018). State of Science: ergonomics and global issues. **Ergonomics**. 61: 197-213.

- Thiruchelvam, A.T.; Ramsay, J.A. (2007). Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 74: 547–554.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140: 19-26.
- Tien, M.; Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂ – requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81: 2280-2284.
- Tjalsma, H.; Bolhuis; Jongbloed, J. D. H.; Brons, S.; Van Diji, J. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 515-547.
- Tura, A.; Montipó, S.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2017). Ethanol production from sugar liberated from *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. Biomass pretreated by ionic liquids. **Braz. J. Chem. Eng.** 35: 467-476.
- UNICA, (2017). Reference well-to-wheel CO₂ emissions from ethanol and fossil transport fuels. **Disponível (online)**
https://webstore.iea.org/Content/Images/uploaded/Bioenergy_2017_Annex3.pdf (25 de abril 2019)
- Van den Bosch, S.; Koelewijn, S.F.; Renders, T.; Van den Bossche, G.; Vangeel, T.; Schutyser, W.; Sels, B.F. (2018). Catalytic Strategies Towards Lignin-Derived Chemicals. **Top. Curr. Chem.** 376: 36 doi: 10.1007/s41061-018-0214-3.
- Vassilev, S.V.; Vassileva, C.G. (2016). Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel** 181: 1-33.
- Wilson, A. W.; Desjardin, D.E. (2005). Phylogenetic relationship in the gymnopoid and marasmioid fungi (Basidiomycetes eugarics clade). **Mycologia.** 97: 667-679.

- Windeisen, E.; Wegener, G. (2012). Lignin as Building Unit for Polymers. **Polym. Sci.** 10: 255-266.
- Wolfenden, R. S.; Wilson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.** 02: 805-812.
- Wright, J. E.; Albertó, E. (2006). **Hongos – Guia de la Region Pampeana – I. Hongos sin Laminillas.** Buenos Aires: L.O.L.A. 412p
- Wymelenberg, A.V.; Sabat, G.; Martinez, D.; Rajangam, A.S.; Teeri, T.T.; Gaskell, J.; Kersten, P.J.; Cullen, D. (2005). The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. **J. Biotechnol.** 118: 17-34.
- Ximenes E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Tech.** 46: 170–176.
- Yaver, D. S.; Xu, F.; *et al.* (1996). Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 834-841.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (Urushi). Part 1. **J. Chem. Soc.** 43: 472-486.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Suely, A.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 71: 475-501.
- Zhao, B.; Brittain, W.J. (2000). Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. **Prog. Polym. Sci.** 25: 677-710.

- Zhu, J.; Yong, Q.; Xu, Y.; Yu, S. (2011). Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioresour. Technol.** 102: 1663-1668
- Zhu, C.; Bao, G.; Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACC 52857) induced through yeast extract and copper. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 30: 270-276.
- Zorn, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R.G. (2005). The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics.** 5: 4832-4838.