

**PENGARUH PENAMBAHAN MnSO₄ TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
MANGAN PEROKSIDASE PADA DELIGNIFIKASI LIMBAH BAGASSE
OLEH *PHLEBIA* SP. MG-60**

*Effect of MnSO₄ on Manganese Peroxidase Activity in Delignification of Bagasse
by Phlebia sp. MG-60*

Irnia Nurika, Zuliyana Nur Muchlis Majid, Suprayogi
Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia
Penulis Korespondensi, email : Irnia@ub.ac.id

Disubmit: 17 September 2018 Direvisi: 4 Nopember 2019 Diterima: 7 Nopember 2019

ABSTRAK

Kandungan lignin pada bagasse dapat dimanfaatkan sebagai bahan kimia bernilai tinggi melalui proses degradasi lignoselulosa. *Phlebia* sp. MG-60 merupakan salah satu jenis jamur pelapuk yang menghasilkan enzim mangan peroksidase (MnP) untuk mendegradasi lignin. Akan tetapi, untuk meningkatkan aktivitas enzim MnP dibutuhkan inducer seperti MnSO₄. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan MnSO₄ terhadap aktivitas enzim MnP *Phlebia* sp. MG-60 dalam proses delignifikasi selama 28 hari inkubasi. Mangan dengan konsentrasi 0 mM; 0,1 mM; dan 0.5 mM ditambahkan pada substrat yang telah diinokulasi dengan *Phlebia* sp. MG-60 dan diinkubasi selama 28 hari. Hasil kemudian diekstrak selanjutnya diuji kadar lignin dan aktivitas enzim MnP yang dihasilkan menggunakan spektrofotometri. Hasil menunjukkan aktivitas enzim MnP bagasse yang paling besar dengan penambahan 0,1 mM MnSO₄ 0.605 IU/mL dengan lignin removal mencapai 31.60%.

Kata kunci: Lignin; Mangan Peroksidase; MnSO₄; *Phlebia* sp. MG-60

ABSTRACT

Lignin compound in bagasse can be used as a high-value chemical through lignocellulose degradation. *Phlebia* sp. MG-60 is one type of rot fungus that produces the MnP enzyme to degrade lignin. However, to increase the MnP activity, inducer such as MnSO₄ is needed. The purpose of this study was to determine the effect of MnSO₄ on *Phlebia* sp. MG-60 performance and MnP activity of *Phlebia* sp. MG-60 during 28 days degradation of lignocellulose. Manganese with a concentration of 0 mM; 0,1 mM; and 0.5 mM was added to the substrate which had been inoculated with *Phlebia* sp. MG-60 and incubated for 28 days. The results were then extracted furthermore lignin content assay and MnP enzyme activity tested by using spectrophotometry. The results showed the greatest bagasse MnP enzyme activity with the addition of 0,1 mM MnSO₄ 0.605 IU / mL with lignin removal reached of 31.60%.

Keywords : Lignin; Mangan Peroksidase; MnSO₄; *Phlebia* sp. MG-60

PENDAHULUAN

Bagasse merupakan jenis limbah pertanian yang dihasilkan dalam jumlah besar di Indonesia dengan potensi limbah mencapai 47 juta ton setiap tahun (Yuwono *et al.*, 2012). Pada umumnya, limbah bagasse dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai briket dan bahan pembangkit boiler. Disisi lain, kandungan lignin 30,62% (Zeng *et al.*, 2014) pada bagasse memiliki peran untuk dimanfaatkan sebagai bahan kimia bernilai tinggi (Kaur and Chakraborty, 2013) melalui proses delignifikasi lignin.

Lignin merupakan komponen heterogen yang terdiri dari komponen phenilpropanoid yang terhubung dengan ikatan kovalen (ikatan aryl-eter, aryl-aryl, carbon-carbon) (Järvinen *et al.*, 2012) sehingga sangat sulit untuk didegradasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan jamur pelapuk seperti *Phlebia sp.* MG-60 memiliki peran penting selama proses degradasi lignin. Penggunaan *Phlebia sp.* MG-60 pada proses degradasi lignoselulosa akan lebih memudahkan proses pemecahan selulosa dan hemiselulosa (Khuong *et al.*, 2014) menjadi glukosa dan xilosa (Kamei *et al.*, 2012) selanjutnya akan mempermudah *Phlebia sp.* MG-60 dalam memecah ikatan lignin. Selama proses pemecahan ikatan lignin, *Phlebia sp.* MG-60 (Tsuyama *et al.*, 2017) menggunakan mekanisme radikal *phenoxy* yang terdapat pada enzim peroksidase (Hofrichter, 2002) seperti mangan peroksidase (MnP) (Asgher *et al.*, 2013).

MnP merupakan enzim peroksidase (Wang *et al.*, 2016) yang mampu mengoksidasi ion mangan (II) (Mn^{2+}) menjadi Mn^{3+} yang bersifat lebih reaktif (Hofrichter, 2002). Mn^{3+} yang dihasilkan akan bereaksi dengan asam karboksilat seperti oksalat malonat, malat, tartrat, dan laktat yang menyebabkan oksidasi satu elektron dari berbagai substrat. Selain itu Mn^{3+} yang bereaksi dengan asam karboksilat akan menghasilkan alkyl radikal. Alkyl radikal ini kemudian bereaksi dengan oksigen (O_2) sehingga akan menghasilkan senyawa yang bersifat radikal (Hatakka, 2001).

Selama proses degradasi, kondisi kultur *Phlebia sp.* MG-60 dengan nutrisi yang tercukupi dibutuhkan dengan tujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim MnP sehingga akan berdampak pada meningkatnya kemampuan jamur dalam mendegradasi

limbah lignoselulosa. Terdapat banyak faktor yang berperan untuk meningkatkan aktivitas enzim pada jamur pelapuk putih, diantaranya adalah jenis substrat yang digunakan dan stimulan yang digunakan (Acevedo *et al.*, 2011).

Menurut Giardina *et al.* (2000), untuk meningkatkan aktivitas enzim MnP pada jamur pelapuk putih dapat memanfaatkan limbah lignoselulosa sebagai substrat, sedangkan $MnSO_4$ merupakan salah satu jenis induser yang berperan untuk meningkatkan produksi dan aktivitas enzim MnP. Induser merupakan senyawa atau unsur yang mendukung terjadinya reaksi pada enzim atau juga mendukung sekresi enzim (Acevedo *et al.*, 2011). Penambahan $MnSO_4$ pada jamur pelapuk dapat berperan untuk membantu reaksi enzim MnP untuk menyediakan sumber Mn^{2+} yang nantinya akan dioksidasi menjadi Mn^{3+} yang lebih reaktif (Brown *et al.*, 1991; Tuor *et al.*, 1992). Berdasarkan hasil penelitian Acevedo *et al.* (2011), penambahan 0,25 mM $MnSO_4$ mampu meningkatkan aktivitas enzim MnP pada jamur *Anthracophyllum discolor* Sp4 sebesar 1,354 IU/L pada hari ke-13. Pada penelitian yang dilakukan oleh Rajan *et al.* (2010), menunjukkan bahwa aktivitas enzim MnP tertinggi yang dapat dicapai oleh *P. chrysosporium* yaitu 54.03 IU/L dengan penambahan konsentrasi $MnSO_4$ 0,1 mM. Pada Penelitian (Khuong *et al.*, 2014) penambahan $MnSO_4$ sebanyak 168 mg/L mampu mereduksi lignin dari bagasse sebesar 23% dari berat awal lignin 23,4% menjadi 18,1%.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan $MnSO_4$ terhadap kemampuan *Phlebia sp.* MG-60 dalam mendegradasi limbah lignoselulosa dan mengetahui pengaruh $MnSO_4$ terhadap aktivitas enzim MnP yang dihasilkan oleh *Phlebia sp.* MG-60 selama 14 hari inkubasi. Diharapkan penambahan konsentrasi $MnSO_4$ dapat berpengaruh signifikan terhadap kemampuan jamur *Phlebia sp.* MG-60 dalam memecah lignin pada limbah lignoselulosa.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah limbah bagasse (diperoleh dari PT Kebon Agung di Malang), *Phlebia sp.* MG-60 (National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chiba, Japan), media

potato dextrose agar (PDA), aquades, sitrat-fosfat buffer 0,1 M (pH 3) (Sigma-Aldrich, Pro Analisis); H₂O₂ (Merck, Pro Analisis), MnSO₄ (Sigma-Aldrich, Pro Analisis) dan H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Pro Analisis).

Alat yang dibutuhkan untuk menunjang pelaksanaan penelitian adalah glassware merek pyrex (labu Erlenmeyer, corong kaca, gelas ukur, tabung reaksi, gelas beaker), autoklaf (Hirayama HVE-50), autoklaf, laminar air flow, inkubator (Eyela LTI-1001SD), bunsen, *disk mill*, sentrifuse (Eppendorf 5430 R), Spektrofotometri (Thermo Scientific Multiskan Go), waterbath (Eyela Multi Shaker MMS), Oven (Yamato DX-58), Furnace (Thermo scientific Lindberg Blue M BF51732C-1).

Persiapan Mikroorganisme dan Kultur

Phlebia MG-60 (MKFC40001) ditumbuhkan pada media Potato Dextrose Agar (PDA) kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari. Jamur siap untuk diinokulasikan pada substrat yang akan digunakan (Kamei *et al.*, 2012).

Persiapan Substrat

Bagasse yang digunakan di cacah menggunakan *disk mill* sampai pada ukuran 42-100 mesh (Khuong *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Yamasaki *et al.*, 2014). Metanol sebanyak 2,1 liter ditambahkan pada bagasse dan dimaserasi selama 96 jam untuk memisahkan dengan senyawa ekstraktif. Bagasse kemudian disimpan rapat untuk menghindari perubahan kadar kelembaban. Sebelum diinokulasikan dengan jamur *Phlebia* MG-60, kadar kelembaban bahan diatur hingga mencapai 77% (Khuong *et al.*, 2014). Sampel diamati pada hari ke 0, 14, dan 28 (Gambar 1).

Fermentasi Aerobik

Bagasse (42-100 mesh) dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL sebanyak 1 gram. Larutan MnSO₄ kemudian ditambahkan pada substrat hingga kadar kelembaban mencapai 77% kemudian disterilisasi. Satu disk kultur miselium jamur *Phlebia* MG-60 (diameter 5 mm) selanjutnya ditambahkan pada bagasse. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan *silicon plug stopper* dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 14 dan 28 hari (Kamei *et al.*, 2014; Khuong *et al.*, 2014).

Uji Enzim Mangan Peroksidase

Enzim kasar (*crude enzim*) MnP diperoleh dari jamur yang telah diinokulasikan di bagase pada kondisi aerobik. Proses ekstraksi dilakukan pada hari ke-14 dan hari ke-28 dengan menambahkan 10 mL sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) dan diekstrak dengan menggunakan *waterbath* (150 rpm, 4°C) selama 1 jam. Supernatan (*crude enzyme* MnP) kemudian dipisahkan menggunakan sentrifuse (12000 rpm pada suhu 37°C). 1,7 ml sitrat-fosfat buffer 0,1 M (pH 3); 0,05 ml MnSO₄ 0,4 M; 0,05 ml H₂O₂ 0,016 M; dan 0,2 ml *crude enzyme* dimasukkan kedalam kuvet untuk dianalisa aktivitas MnP menggunakan *spectrophotometry* dengan panjang gelombang 469 nm pada suhu 37°C. Perubahan absorbansi diamati setiap detik selama satu menit (Gassara *et al.*, 2010). Satu unit aktivitas MnP menandakan perubahan 1 µM Mn³⁺ per menit.

$$\frac{U}{ml} = \left(\frac{\text{absorbansi}}{\text{menit}} \right) \times 10^6 \times 10^{-3} \dots\dots\dots(1)$$

(Wariishi *et al.*, 1992).

Uji Kadar Lignoselulosa

Air destilat sebanyak 150 ml ditambahkan ke sampel kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (a). Larutan H₂SO₄ 1 N sebanyak 150 ml ditambahkan ke sampel dan kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam. Bagian padat kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (b).

Larutan H₂SO₄ 72% sebanyak 10 ml ditambahkan ke sampel setelah ditimbang dan dilakukan perendaman selama 4 jam. Sampel yang sudah ditambah H₂SO₄ 72% kemudian diencerkan menjadi 4% H₂SO₄ dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Bagian padat kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (c). Sampel dipanaskan pada suhu 600°C selama 4 jam dan kemudian ditimbang beratnya (d).

$$\text{Kadar lignin} = \frac{c-d}{\text{sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

(Chesson, 1981).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan MnSO₄ terhadap Aktivitas MnP

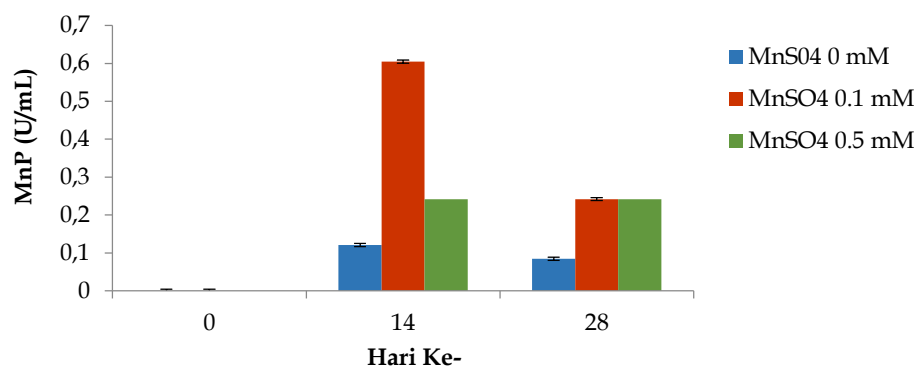
Penambahan MnSO₄ pada substrat yang diinokulasi jamur pelapuk berperan sebagai sumber mikronutrient untuk merangsang produksi enzim MnP (Avecedo *et al.*, 2011). Penambahan 0,1% MnSO₄ pada bagasse menunjukkan hasil aktivitas yang paling tinggi dibandingkan dengan kontrol dan penambahan 0,5% MnSO₄ yaitu sebesar 0,605 IU/mL pada hari ke 14 (Gambar 1). Berdasarkan Gambar 2, Kandungan lignoselulosa pada limbah lignoselulosa diketahui berperan sebagai induser dalam produksi enzim. Menurut (Kapich *et al.*, 2004), peningkatan aktivitas MnP dipengaruhi oleh kandungan senyawa aromatik atau fenolik yang terlarut sehingga dapat berdampak pada aktivitas enzim lignolitik jamur pelapuk putih. Selain itu, beberapa substrat lignoselulosa juga dapat menstimulasi produksi enzim lignolitik pada jamur pelapuk baik dengan ataupun tanpa penambahan induser (Elisashvili *et al.*, 2009).

Penambahan MnSO₄ pada perlakuan juga memiliki peran sebagai mikronutrisi dan induser pembentukan enzim MnP dan untuk menyediakan Mn²⁺ yang nantinya dirubah oleh enzim MnP menjadi Mn³⁺. Penambahan 0,1 mM MnSO₄ pada limbah bagasse menunjukkan hasil aktivitas enzim MnP lebih tinggi, dibandingkan dengan penambahan 0,5 mM MnSO₄ maupun tanpa penambahan MnSO₄. Diduga penambahan 0,1 mM MnSO₄ pada perlakuan dapat menginduksi *Phlebia* sp. MG-60 dalam memproduksi enzim MnP. Penambahan induser pada mikroorganisme berperan untuk mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim (Vrsanska *et al.*,

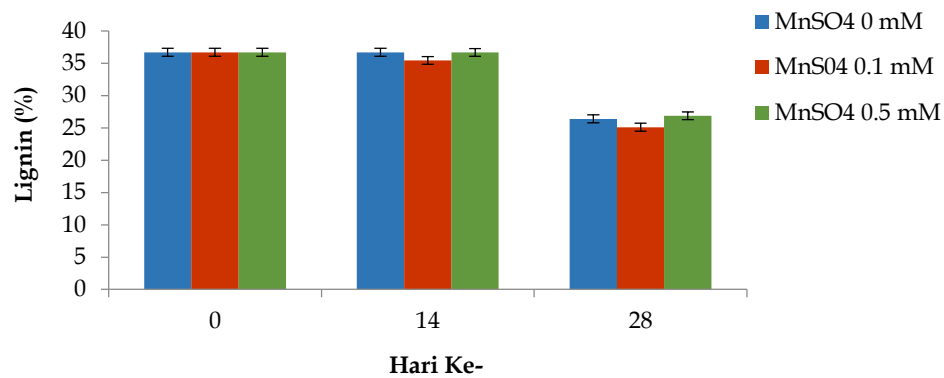
2015). Hal ini didukung oleh hasil penelitian Rajan *et al* (2010), penambahan 0,1 mM MnSO₄ pada *P. chrysosporium* mampu meningkatkan aktivitas enzim MnP hingga 54.03 IU/L. Jika dibandingkan, aktivitas enzim MnP pada penelitian ini lebih tinggi. Hal ini disebabkan pada *Phlebia* sp. MG-60 terdapat tiga puluh gen pengkode MnP (Wang *et al.*, 2016), sedangkan pada *Phanerochaete chrysosporium* hanya terdapat enam gen pengkode MnP (Gold and Alic, 1993).

Penambahan 0,5 mM MnSO₄ pada perlakuan menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan 0,1 mM MnSO₄. Dimungkinkan penambahan 0,5 mM MnSO₄ pada mikroorganisme bersifat toksik. penambahan ion logam dalam konsentrasi yang tinggi dapat memicu jamur dalam menghasilkan senyawa H₂O₂ (Acevedo *et al.*, 2011). Menurut Wariishi *et al* (1988) dan Böckle *et al* (1999) konsentrasi H₂O₂ yang tinggi tanpa diimbangi jumlah enzim akan mengganggu siklus enzim MnP dalam merubah Mn²⁺ menjadi Mn³⁺. Hal ini disebabkan karena Fe³⁺ akan dirubah menjadi Fe²⁺O₂ jika tanpa diikat oleh enzim MnP.

Gambar 1 juga menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, maka akan semakin rendah aktivitas enzim MnP yang dihasilkan. Diduga semakin lama waktu fermentasi maka nutrisi dan mikronutrient yang dibutuhkan oleh *Phlebia* sp MG-60 dalam memproduksi enzim MnP akan mengalami penurunan, sehingga berdampak pada penurunan aktivitas MnP. Hal serupa juga terjadi pada *Trametes villosa*. Pada hari ke-15 jamur menunjukkan peningkatan aktivitas MnP, dan mengalami penurunan aktifitas setelah hari ke-15 hingga mencapai angka 0 pada hari ke-30 (Silva *et al.*, 2014).



Gambar 1. Aktivitas enzim MnP yang dihasilkan oleh *Phlebia* sp. MG-60 Bagasse dengan penambahan konsentrasi MnSO₄



Gambar 2. Hasil delignifikasi lignin pada bagasse dengan penambahan konsentrasi MnSO₄ terhadap aktivitas enzim MnP *Phlebia* sp. MG-60

Tabel 1. Persentase lignin yang hilang dari proses degradasi limbah lignoselulosa bagasse dan kulit kakao oleh *Phlebia* sp. MG-60

Jenis Substrat	Konsentrasi MnSO ₄ (mM)	Berat lignin sebelum perlakuan (%)	Berat lignin setelah perlakuan (%)	% Lignin removal
Bagasse	0	36,71	26,40	28,08
	0,1	36,71	25,11	31,60
	0,5	36,71	26,87	26,80

Pengaruh Penambahan MnSO₄ terhadap Degradasi Lignin

Lignoselulosa merupakan sumber karbon yang terdiri dari tiga komponen penyusun yaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Pengolahan limbah lignoselulosa akan memiliki peran penting bagi keilmuan biorefineri seperti dihasilkannya energi terbarukan (bioetanol dan *syngas*) serta bahan kimia bernilai tinggi seperti vanillin ataupun asam ferulik. Akan tetapi, keberadaan lignin pada lignoselulosa menjadi masalah selama proses pemecahan lignin. Hal tersebut dikarenakan lignin terbentuk dari beberapa ikatan kovalen (Järvinen *et al.*, 2012) sehingga menyebabkan lignin sangat sulit untuk dipecah. Salah satu metode yang digunakan selama proses pemecahan lignin adalah menggunakan jamur pelapuk khususnya jamur pelapuk putih seperti *Phlebia* sp. MG-60. Jamur ini mampu menghasilkan peroksidase yaitu MnP (EC 1.11.1.13) yang berperan penting selama proses delignifikasi (Yamasaki *et al.*, 2014).

Rerata kadar lignin berkisar antara 25,11 % sampai dengan 36,16 %. Selama delignifikasi, penambahan MnSO₄ di berikan selama perlakuan. Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan 0,1% MnSO₄ menunjukkan presentasi kadar lignin yang hilang (lignin removal) yang paling tinggi

yaitu 31,60%. Kadar lignin pada perlakuan dengan konsentrasi MnSO₄ 0 mM tetap pada hari ke-14 dan turun pada hari ke-28 menjadi 26,4%, pada perlakuan dengan konsentrasi 0,1 mM MnSO₄ Kadar lignin turun pada hari ke-14 dan hari ke-28 menjadi 35,44% dan 25,11%, pada perlakuan dengan konsentrasi 0,1 mM MnSO₄ Kadar lignin turun pada hari ke-14 dan hari ke-28 menjadi 36,69% dan 26,87%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka akan semakin besar penurunan lignin yang didegradasi (Gambar 2). Diduga semakin lama waktu fermentasi maka akan semakin banyak lignin yang terdegradasi dan akan terakumulasi sampai hari ke-28. Hal yang sama juga terjadi pada perlakuan bagasse dengan kadar air 75% menunjukkan penurunan yang signifikan pada hari ke-28 dibandingkan dengan penurunan kadar lignin pada hari ke-14 (Khuong *et al.*, 2014).

Selain lama waktu delignifikasi, penambahan MnSO₄ juga mempengaruhi hasil delignifikasi lignin. Berdasarkan Tabel 1, penambahan 0,1% MnSO₄ menunjukkan hasil yang paling tinggi dibandingkan dengan 0,5% MnSO₄ dan tanpa penambahan MnSO₄. Penambahan konsentrasi MnSO₄ juga berperan dalam meningkatkan kemampuan jamur selama proses delignifikasi lignin.

Selama proses delignifikasi oleh *Phlebia* sp MG-60, MnP melibatkan H₂O₂ untuk mengoksidasi Mn²⁺ menjadi Mn³⁺. Mn³⁺ kemudian mengoksidasi fenolik lignin dimer, fenolik lignin dimer, monomerik fenol dan sintesis lignin melalui pembentukan fenoksi radikal (Datta *et al.*, 2017). Melalui mekanisme tersebut MnP yang dihasilkan oleh *Phlebia* sp. Mg-60 digunakan untuk mendegradasi komponen lignin pada bagasse yang menyebabkan penurunan kadar lignin.

Pada jamur *Ceriporiopsis subvermispora* aktivitas terendah MnP ditunjukkan pada sampel tanpa penambahan MnSO₄. Aktivitas MnP tertinggi ditunjukkan pada penambahan 0,02 mM MnSO₄ dan mengalami penurunan sampai pada penambahan 0,3 mM MnSO₄ (Mancilla *et al.*, 2010). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diduga penambahan MnSO₄ dalam konsentrasi yang tinggi (0,5 mM MnSO₄) dapat menghambat aktivitas enzim MnP. Hal tersebut dikarenakan penambahan ion logam dalam konsentrasi yang tinggi dapat memicu jamur dalam menghasilkan senyawa H₂O₂ yang dapat menyebabkan toksik bagi mikroorganisme (Acevedo *et al.*, 2011). Menurut Wariishi *et al* (1988) konsentrasi H₂O₂ yang tinggi tanpa diimbangi jumlah enzim akan mengganggu siklus enzim MnP dalam merubah Mn²⁺ menjadi Mn³⁺. Hal ini disebabkan karena Fe³⁺ akan dirubah menjadi Fe²⁺O₂ jika tanpa diikat oleh enzim MnP.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa dengan penambahan 0,1 mM MnSO₄ pada hari ke 14, dihasilkan aktivitas enzim MnP sebesar 0,605 IU/mL dan penurunan kadar lignin (*lignin removal*) sebesar 31,60%. Aktivitas enzim dan *lignin removal* pada penambahan MnSO₄ 0,1 mM lebih tinggi dari pada penambahan MnSO₄ 0,5 mM. Kedepannya perlu dilakukan analisa lebih lanjut pada perlakuan waktu lebih dari 28 hari untuk mengetahui pengaruh konsentrasi MnSO₄ pada aktivitas enzim MnP dan persentase *lignin removal* pada bagasse.

DAFTAR PUSTAKA

Acevedo, -F., Pizzul, -L., Castillo, -M. del -P., Rubilar, O., Lienqueo, M.E., Tortella, G., Diez, M.C., 2011. *A practical culture technique for enhanced production of*

manganese peroxidase by Anthracophyllum discolor Sp4. Brazilian Arch. Biol. Technol. 54,1175–1186. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600013>

Asgher, -M., Yasmeen, -Q., Iqbal, -H.M.N., 2013. Enhanced decolorization of Solar brilliant red 80 textile dye by an indigenous white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.03.004>

Böckle, B., Martínez, -M.J., Guillén, -F., Martínez, -Á.T., 1999. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 923–928.

Brown, -J.A., Alic, -M., Gold, -M.H., 1991. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by manganese. *J. Bacteriol.* 173, 4101–4106. <https://doi.org/10.1128/jb.173.13.4101-4106.1991>

Chesson, -A., 1981. Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* 32, 745–758. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740320802>

Datta, -R., Kelkar, -A., Baraniya, -D., Molaei, -A., Moullick, -A., Meena, -R.S., Formanek, -P., 2017. Enzymatic degradation of lignin in soil: A review. *Sustainability* 2017, 9(7), 1163. <https://doi.org/10.3390/su9071163>

Elisashvili, -V., Kachlishvili, -E., Tsiklauri, -N., Metreveli, -E., Khardziani, -T., Agathos, -S.N., 2009. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9897-x>

Gassara, -F., Brar, -S.K., Tyagi, -R.D., Verma, -M., Surampalli, -R.Y., 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.* 49, 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.015>

Giardina, -P., Palmieri, -G., Fontanella, -B., Riviaccio, -V., Sannia, -G., 2000.

- Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 171–179. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1691>
- Gold, -M.H., Alic, -M., 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57, 605–622. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372928/>
- Hofrichter, -M., 2002. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30, 454–466. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2)
- Järvinen, -J., Taskila, -S., Isomäki, -R., Ojamo, H., 2012. Screening of white-rot fungi manganese peroxidases: A comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers. *AMB Express* 2, 1–9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-62>
- Kamei, -I., Hirota, -Y., Mori, -T., Hirai, -H., Meguro, S., Kondo, R., 2012. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresour. Technol.* 112, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.109>
- Kamei, -I., Nitta, T., Nagano, -Y., Yamaguchi, -M., Yamasaki, -Y., Meguro, -S., 2014. Evaluation of spent mushroom waste from *Lentinula edodes* cultivation for consolidated bioprocessing fermentation by *Phlebia* sp. MG-60. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.001>
- Kapich, -A.N., Prior, -B.A., Botha, -A., Galkin, -S., Lundell, -T., Hatakka, -A., 2004. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.004>
- Kaur, -B., Chakraborty, -D., 2013. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 1353–1372. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0066-1>
- Khuong, -L.D., Kondo, -R., Leon, -R. De, Anh, -T.K., Meguro, -S., Shimizu, -K., Kamei, I., 2014. Effect of chemical factors on integrated fungal fermentation of sugarcane bagasse for ethanol production by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresour. Technol.* 167, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.064>
- Mancilla, -R.A., Canessa, -P., Manubens, -A., Vicuña, R., 2010. Effect of manganese on the secretion of manganese-peroxidase by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.003>
- Rajan, -A., Kurup, -J.G., Abraham, -T.E., 2010. Solid state production of manganese peroxidases using arecanut husk as substrate. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 555–562. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300008>
- Silva, -M.L.C., Souza, -V.B. de, Santos, V. da S., Kamida, H.M., Vasconcellos-Neto, J.R.T. de, Góes-Neto, A., Bello Koblitz, M.G., 2014. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 05(14), 1067–1077. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.514122>
- Tsuyama, -T., Yamaguchi, -M., Kamei, -I., 2017. Accumulation of sugar from pulp and xylitol from xylose by pyruvate decarboxylase-negative white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresour. Technol.* 238, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.015>
- Tuor, -U., Wariishi, -H., Gold, -M.H., Schoemaker, H.E., 1992. Oxidation of Phenolic Arylglycerol β -Aryl Ether Lignin Model Compounds by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Oxidative Cleavage of an α -Carbonyl Model Compound. *Biochemistry.* 31, 4986–4995. <https://doi.org/10.1021/bi00136a011>
- Vrsanska, -M., Buresova, -A., Damborsky, P., Adam, V., 2015. Influence of Different Inducers on Ligninolytic Enzyme Activities. *J. Met. Nanotechnologies.* 64–70.

- Wang, -J., Suzuki, -T., Dohra, -H., Takigami, -S., Kako, -H., Soga, -A., Kamei, -I., Mori, -T., Kawagishi, -H., Hirai, -H., 2016. Analysis of ethanol fermentation mechanism of ethanol producing white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60 by RNA-seq. *BMC Genomics* 17, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2977-7>
- Wariishi, H., Akileswaran, L., Gold, M.H., 1988. Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*: Spectral Characterization of the Oxidized States and the Catalytic Cycle. *Biochemistry*. 27, 5365-5370. <https://doi.org/10.1021/bi00414a061>
- Wariishi, -H., Valli, -K., Gold, -M.H., 1992. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.
- Yamasaki, -Y., Yamaguchi, -M., Yamagishi, -K., Hirai, -H., Kondo, -R., Kamei, -I., Meguro, S., 2014. Expression of a manganese peroxidase isozyme 2 transgene in the ethanologenic white rot fungus *Phlebia* sp. strain MG-60. *Springerplus*. 3, 1-6. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-699>
- Yuwono, -T., Rolanda, -E., 2012. Fermentasi hidrolisat enzimatik bagasse tebu menjadi hidrogen. *Laboratorium Teknik Biokimia*. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1), 1-5.
- Zeng, -J., Tong, -Z., Wang, -L., Zhu, -J.Y., Ingram, -L., 2014. Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 154, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.072>