

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/07/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ENZIMA BIFUNCIONAL XILANASE-ESTERASE OBTIDA DO
METAGENOMA DO LÍQUIDO RUMINAL**

**Gabriella Cavazzini Pavarina
Bióloga**

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ENZIMA BIFUNCIONAL XILANASE-ESTERASE OBTIDA DO
METAGENOMA DO LÍQUIDO RUMINAL**

Gabriella Cavazzini Pavarina

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2020

P337e

Pavarina, Gabriella Cavazzini

Enzima bifuncional xilanase-esterase obtida do metagenoma do líquido ruminal / Gabriella Cavazzini Pavarina. -- Jaboticabal, 2020
64 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Coorientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Enzimas. 2. Biotecnologia. 3. Genética microbiana. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ENZIMA BIFUNCIONAL XILANASE-ESTERASE OBTIDA DO METAGENOMA DO LÍQUIDO RUMINAL

AUTORA: GABRIELLA CAVAZZINI PAVARINA

ORIENTADOR: JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR

COORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Dra. THAÍS CARVALHO MAESTER CASANOVA
Ecobiotech Biotecnologia e Automação / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 28 de julho de 2020

DADOS CURRICULADORES DO AUTOR

Gabriella Cavazzini Pavarina – nascida em Taquaritinga, estado de São Paulo, em 21 de dezembro de 1994. Ingressou no curso de Ciências Biológicas em 2012 na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de Licenciada em 2015 e bacharela em 2017. Durante a graduação realizou por quatro anos (2012-2016) pesquisa de iniciação científica no Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal, com o projeto intitulado “Atividade de LPS-desfosforilase da fosfatase alcalina intestinal de frangos de corte” onde foi bolsista FAPESP. Ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária em março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, pela orientação, apoio e incentivo durante todo meu percurso acadêmico, por ser meu mentor e exemplo profissional.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela coorientação, apoio e incentivo.

Ao Dr. João Carlos Campanharo, Dra. Elisângela Soares Gomes-Pepe, Dra. Milena Tavares Lima Constancio, Dra. Camila Cesário, Dra. Érica Mendes Lopes e todos os pesquisadores que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas.

As minhas companheiras de bancada Natália, Barbara, Tatiane e Pâmela, pela ajuda, companhia, apoio e ensinamentos que vocês puderam me dar nessa jornada.

À minha mãe por me incentivar, apoiar e confiar no meu trabalho, por estar ao meu lado durante todas as situações.

Aos meus companheiros que sempre estiveram ao meu lado e em especial à Mariana Nakano, Gabriele Gricio e Andrei Itajahy.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão de bolsa e de todo o auxílio financeiro necessário para a realização deste Mestrado, processo 2018/12885-0.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Biomassa lignocelulósica	3
2.2. Indústria biotecnológica das enzimas.....	5
2.3. Xilanases.....	7
2.4. Esterases	9
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Material de trabalho.....	12
4.2. Análises de bioinformática.....	12
4.3. Amplificação dos genes por PCR convencional	13
4.4. Eletroforese em gel de agarose.....	15
4.5. Construção do vetor recombinante.....	15
4.6. Sequenciamento de Sanger	16
4.7. Ensaio de tempo e temperatura de expressão	16
4.8. Extração da proteína recombinante.....	17
4.9. Purificação da proteína heteróloga.....	17
4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)...	17
4.11. <i>Western blot</i>	18
4.12. Zimograma	18
4.13. Determinação da concentração de proteína	19
4.14. Caracterização da atividade de xilanase.....	19
4.14.1. Determinação da atividade de xilanase	19
4.14.2. Efeito da temperatura	20
4.14.3. Termoestabilidade	20
4.14.4. Efeito do pH	20
4.14.5. Efeito de íons metálicos	21

4.14.6. Efeito de solventes orgânicos	21
4.14.7. Efeito de detergentes	21
4.14.8. Efeito do NaCl	21
4.15. Determinação da atividade de esterase	21
4.16. Determinação dos parâmetros cinéticos	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Análises <i>in silico</i>	23
5.2. Clonagem e expressão	27
5.3. Caracterização da atividade de xilanase	31
5.3.1. Efeito do pH	33
5.3.2. Efeito da temperatura	34
5.3.3. Estabilidade térmica	35
5.4. Efeito de íons metálicos, sal, solventes e detergentes	36
5.4.1. Efeito de íons metálicos	36
5.4.2. Efeito de detergentes e solventes	36
5.4.3. Efeito do NaCl	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	44
8. REFERÊNCIAS	45

ENZIMA BIFUNCIONAL XILANASE-ESTERASE OBTIDA DO METAGENOMA DO LÍQUIDO RUMINAL

RESUMO – A biomassa lignocelulósica, importante e estratégica fonte de energia renovável, é complexa e heterogênea. Para que ocorra a hidrólise enzimática desta matéria-prima é necessária a ação sinérgica de enzimas degradadoras de celulose, hemicelulose e lignina. As endo- β -xilanases, enzimas capazes de degradar a cadeia principal das xilanas, hemicelulose mais abundante, apresentam sua eficiência reduzida devido à presença de ramificações em sua estrutura, como por exemplo ligações éster com ácido ferúlico e cumárico, as quais podem ser degradadas por esterases. Uma alternativa para aumentar a eficiência seria a hidrólise simultânea destas ramificações e da cadeia principal, o que é possibilitado pelo uso de enzimas bifuncionais. O objetivo do trabalho foi prospectar e expressar uma xilanase-esterase obtida do metagenoma do líquido ruminal. A sequência da xilanase-esterase foi obtida com base na inferência de função por similaridade no metagenoma de rúmen. Foi realizada a amplificação da sequência do DNA metagenômico por PCR, a inserção em vetor pET28a e transformação em *Escherichia coli* BL21 (DE3). A purificação da enzima recombinante foi realizada utilizando a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados e filtração em gel no sistema AKTA. A atividade de endo- β -xilanase foi verificada por zimograma contendo *xylan from beechwood* e a de esterase pela hidrólise do substrato de *p*-nitrofenil-éster. Os resultados demonstram a obtenção de uma enzima bifuncional (xilanase-esterase), ativa para ambos os substratos, resistente ao NaCl e solventes orgânicos (etanol, metanol, propanol e DMSO), com potencial para aplicação na degradação de biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: enzimas, biotecnologia, genética microbiana

BIFUNCTIONAL XYLANASE-ESTERASE ENZYME OBTAINED FROM THE RUMINAL LIQUID METAGENOME

ABSTRACT – Lignocellulosic biomass, an important and strategic source of renewable energy, is complex and heterogeneous. For the enzymatic hydrolysis of this raw material to occur, it needs the synergistic action of cellulose, hemicellulose and lignin degrading enzymes. The endo- β -xylanases, enzymes capable of degrading the main chain of xylans, the most abundant hemicellulose, have their efficiency reduced due to the presence of branches in their structure, such as ester bonds with ferulic and cumaric acid, which can be degraded by esterases. An alternative to increase efficiency would be the simultaneous hydrolysis of these branches and the main chain, which is possible using bifunctional enzymes. The aim of this work was to prospect and express a xylanase-esterase achieved by metagenome from the rumen fluid. The xylanase-esterase sequence was obtained based on the inference of function by similarity in the rumen metagenome. The amplification of the metagenomic DNA sequence by PCR was realized, insertion into vector pET28a and transformation into *Escherichia coli* BL21 (DE3) were made. The purification of the recombinant enzyme was performed using affinity chromatography for immobilized metal ions and gel filtration in the AKTA system. The endo- β -xylanase activity was verified by zymogram containing xylan from beechwood and esterase activity by the hydrolysis of the substrate of *p*-nitrophenyl ester. The results demonstrate the obtaining of a bifunctional enzyme (xylanase-esterase), active for both substrates, resistant to NaCl and organic solvents (ethanol, methanol, propanol and DMSO), with potential for application in the degradation of lignocellulosic biomass.

Keywords: enzymes, biotechnology, microbial genetics

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica, importante e estratégica fonte de energia renovável, possui grande interesse econômico, pois é a matéria-prima mais abundante em todo mundo, e pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis e diversos bioprodutos (Sharma, Xu e Qin, 2019). A biomassa é composta de altos teores de celulose, hemicelulose e lignina, a complexa ligação entre eles confere recalcitrância nativa à ação das enzimas, inviabilizando a solubilização e o aproveitamento destes compostos (Sun et al., 2016).

A conversão da biomassa lignocelulósica é complexa e requer tratamentos, os quais podem ser físicos, químicos, enzimáticos ou uma combinação dos mesmos (Kumar, Gautam e Dutt, 2016; Sun et al., 2016). A utilização das enzimas nos pré-tratamentos é uma estratégia ecologicamente viável e que possibilita altos rendimentos e produtos mais puros (Lee, Hamid e Zain, 2014; Menon e Rao, 2012; Sun et al., 2016), desta forma, ressalta-se a necessidade de caracterizar novas enzimas bem como identificar a diversidade funcional destas biomoléculas.

A xilana, a hemicelulose mais abundante na natureza, contém principalmente resíduos β -D-xilopiranosil ligados por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, algumas possuem ramificações em suas estruturas como L-arabinofuranosil, 4-O-metilglucurônicos ligados por ligações α -1,2 e α -1,3, além de ligações éster com o ácido cumárico e ferúlico (Beg et al., 2001). A biodegradação das xilanas envolve a ação sinérgica de várias enzimas hidrolíticas, as que atuam nas ramificações (acetil xilana esterase, α -D-glucoronidase, α -L-arabinofuranosidase), e as que atuam na cadeia principal (endo-1,4- β -xilanasas EC 3.2.1.8 e β -xilosidase, EC 3.2.1.37) (Collins, Gerday e Feller, 2005).

As endo-1,4- β -xilanasas são responsáveis pela clivagem randômica do esqueleto da xilana, nas ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Beg et al., 2001), são principalmente classificadas no grupo das glicosil-hidrolases (GHs) do banco de dados “*The Carbohydrate-Active Enzymes database*” (CAZy, <http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014), nas famílias GH10 e GH11 devido à alta homologia das sequências de aminoácidos e domínios catalíticos (Basu, Kumar e Shukla, 2017). Além da

degradação de hemicelulose, as xilanases são amplamente utilizadas em processos como a sacarificação, processamento de sucos de frutas, produção de papel (Alokika e Singh, 2019), produção de etanol de segunda geração (Beg et al., 2001), produção de xilo-oligossacarídeos (Freitas, de, Carmona e Brienzo, 2019) e obtenção do xilitol (Venkateswar Rao et al., 2016).

As esterases são um grupo de hidrolases que realizam a clivagem de ligações éster, e podem ser aplicadas em diferentes setores industriais como na síntese de poliéster (Yu et al., 2012) e na despolimerização de poliéster e ácido poliático (Sood et al., 2018). Sua utilização também pode estar relacionada com a despolimerização de hemiceluloses, pensando sem seus radicais éster (ácido ferúlico e cumárico), proporcionando maior rendimento de açúcares fermentáveis.

A ação destas enzimas individualmente podem compor coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassas ricas em hemicelulose, embora também possam ser encontradas enzimas bifuncionais, caracterizadas por apresentar capacidades distintas em uma mesma cadeia polipeptídica (Vrzheshch, 2007). Na era da *big data*, os recursos metagenômicos disponíveis em bancos de dados são valiosos para a mineração e descoberta de novas enzimas (Madhavan et al., 2017), possibilitando explorar a diversidade de ambientes que outrora não poderia ir além dos métodos convencionais de cultivo. Neste sentido, explorar os eficientes na conversão da lignocelulose, como o rúmen (Deusch et al., 2017; Gruninger et al., 2016; Ogunade et al., 2019), possibilita a identificação de novas enzimas, incluindo xilanases, esterases e até mesmo enzimas bifuncionais.

O objetivo deste estudo foi a obtenção e expressão de uma xilanase com características desejáveis para a aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica, a partir da mineração de dados metagenômicos do rúmen.

7. CONCLUSÃO

Um novo gene que codifica a enzima bifuncional xilanase/esterase foi prospectado no metagenoma de rúmen, clonado, expresso e purificado. A caracterização *in vitro* desta demonstrou ser ativa em faixa de pH de 5 a 6,5 ser estável nas temperaturas entre 35-50°C, independe de íons metálicos, com tolerância ao NaCl e a solventes orgânicos nas concentrações testadas.

8. REFERÊNCIAS

Al-Darkazali H, Meevootisom V, Isarangkul D, Wiyakrutta S. (2017) Gene Expression and Molecular Characterization of a Xylanase from Chicken Cecum Metagenome. **International Journal of Microbiology** 2017:1-12.

Alokika BS (2019) Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology** 103:8763-8784.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology** 215:403-410.

Amidon TE, Wood CD, Shupe AM, Wang Y, Graves M, Shijie L (2008) Biorefinery: Conversion of Woody Biomass to Chemicals, Energy and Materials. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy** 2:100-120.

Arpigny JL, Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal** 343:177-183.

Bai W, Xue Y, Zhou C, Ma Y (2012) Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5. **Biotechnology Letters** 34:2093-2099.

Balat M, Ayar G (2005) Biomass Energy in the World, Use of Biomass and Potential Trends. **Energy Sources** 27:931-940.

Basit A, Miao T, Liu J, Wen J, Song L, Zheng F, Lou H, Jiang W (2019) Highly Efficient Degradation of Xylan into Xylose by a Single Enzyme. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 7:11360-11368.

Basu M, Kumar V, Shukla P (2018) Recombinant Approaches for Microbial Xylanases: Recent Advances and Perspectives. **Current Protein & Peptide Science** 19:87-99.

Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56:326-338.

Biely P, Mackenzie CR, Puls J, Schneider H (1986) Cooperativity of Esterases and Xylanases in the Enzymatic Degradation of Acetyl Xylan. **Nature Biotechnology** 4:731–733.

Biely P, Singh S, Puchart V (2016) Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances** 34:1260-1274.

Bornscheuer UT (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews** 26:73-81.

Brondyk WH (2009) Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. *Methods in Enzymology* 463:131-147.

Carvalho F, Duarte LC, Gírio FM (2008) Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research** 67:849-864.

Čepeljnik T, Rincón MT, Flint HJ, Logar RM (2006) Xyn11A, a multidomain multicatalytic enzyme from *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T. **Folia Microbiologica**, 51:263-267.

Choudhury PK, Salem AZM, Jena R (2015) Rumen Microbiology: An Overview. **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**. New Delhi: Springer India, 3-16.

Collins T, Gerday C; Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** 29:3-23.

Deusch S, Camarinha-Silva A, Conrad J, Beifuss U, Rodehutschord M, Seifert J (2017) A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. **Frontiers in Microbiology** 8:1-21.

Dodd D, Kocherginskaya AS, Spies MA, Beery KE, Abbas CA, Mackie RI, Cann Ik (2009) Biochemical Analysis of a β -d-Xylosidase and a Bifunctional Xylanase-Ferulic Acid Esterase from a Xylanolytic Gene Cluster in *Prevotella ruminicola* 23. **Journal of Bacteriology** 191:3328-3338.

El-Gebali S, Mistry J, et al (2019) The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research** 47:427-432.

De Freitas C, Carmona E, Brienzo M (2019) Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre** 18:100-184.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In.:**The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa: Humana Press p. 571-607.

Ghadikolaie KK, Sangachini ED, Vahdatirad V, Noghabi KA, Zehri HS (2019) An extreme halophilic xylanase from camel rumen metagenome with elevated catalytic activity in high salt concentrations. **AMB Express** 9:86.

Gruninger RJ, Cote C, McAllister TA, Abbott DW (2016) Contributions of a unique β -clamp to substrate recognition illuminates the molecular basis of exolysis in ferulic acid esterases. **Biochemical Journal** 473:839-849.

Gupta S, Bhushan B, Hoondal GS (2000) Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology** 88:325-334.

Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41:95-98.

Handelsman J (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 68:669-685.

Hannig G, Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology** 16:54-60.

Hitch TCA, Clavel T (2019) A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes. **PeerJ** 7:e7249.

Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S (2020) Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars— a review. **Biomass and Bioenergy** 134:e105481.

Hu J, Arantes V, Saddler JN (2011) The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels** 4:36.

Huang J, Wang G, Xiao L (2006) Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology** 97:802-808.

Jiang Z, Yi J, Li J, He T, Hu C (2015) Promoting Effect of Sodium Chloride on the Solubilization and Depolymerization of Cellulose from Raw Biomass Materials in Water. **ChemSusChem** 8:1901-1907.

Kandiyil S, Malek RA, Aziz R, Enshasy HAE (2018) Development of an Industrially Feasible Medium for Enhanced Production of Extremely Thermophilic Recombinant Endo-1,4- β -xylanase by *Escherichia coli*. **Journal of Scientific and Industrial Research** 77:41-49.

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols** 10:845-858.

Khandeparker R, Numan MT (2008) Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 35:635-644.

Khandeparker R, Verma P, Deobagkar D (2011) A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. **New Biotechnology** 28:814-821.

Kishi LT, De Jesus RB, Pavani CD, Lemos EG, De Souza JA (2015) Metagenomic Assembly and Draft Genome Sequence of an Uncharacterized *Prevotella* sp. from Nelore Rumen. **Genome Announcements** 3:4.

Kulkarni N (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** 23:411-456.

Kumar A, Gautam A, Dutt D (2016) Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology** 7:149-168.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.

Lagarde D, Nguyen HK, Ravot G, Wahler D, Reymond JL, Hills G, Veit T, Lefevre F (2002) High-Throughput Screening of Thermostable Esterases for Industrial Bioconversions. **Organic Process Research & Development** 6:441-445.

Lazuka A, Auer L, O'Donohue M, Hernandez-Raquet G (2018) Anaerobic lignocellulolytic microbial consortium derived from termite gut: Enrichment, lignocellulose degradation and community dynamics. **Biotechnology for Biofuels** 11:1–14.

Lee HV, Hamid SBA, Zain SK (2014) Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal** 2014:1–20.

Li Z, Li X et al (2019) The critical roles of exposed surface residues for the thermostability and halotolerance of a novel GH11 xylanase from the metagenomic library of a saline-alkaline soil. **International Journal of Biological Macromolecules** 133:316-323.

Liao H, Zheng H, Li S, Wei Z, Mei X, Ma H, Shen Q, Xu Y (2015) Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports** 5:12631.

Linares-pasten JA, Aronsson A, Karlsson EM (2017) Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. **Current Protein & Peptide Science** 19:48-67.

Liu Y, Yan Q, Yang S, Jiang Z (2013) Biochemical Characterization of a First Fungal Esterase from *Rhizomucor miehei* Showing High Efficiency of Ester Synthesis. **PLoS ONE** 8:e77856.

Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research** 42:490-495.

Machado G, Leon S, Santos FA, Lourega R (2016) Literature Review on Furfural Production from Lignocellulosic Biomass. **Natural Resources** 7:115-129.

Madhavan A, Shindhu R, Parameswaran B, Sukumaran RK, Pandey S (2017) Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 636-651.

McPhillips K, Waters DM, Parlet C, Walsh DJ, Arendt EK, Murray PG (2014) Purification and Characterisation of a β -1,4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 172:1747-1762.

Menon V, Rao M (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science** 38:522-550.

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** 31:426-428.

Mirande C, Mosoni P, Bera-Maillet C, Bernalier-Donadille A, Forano E (2010) Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xyloxylicus* XB1A. **Applied Microbiology and Biotechnology** 87:2097-2105.

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology** 96:673-686.

Nakamura AM, Nascimento AS, Polikarpov I (2017) Structural diversity of carbohydrate esterases. **Biotechnology Research and Innovation** 1:35–51.

Ogunade IM, Lay J, Andries K, McManus CJ, Bebe F (2019). Effects of live yeast on differential genetic and functional attributes of rumen microbiota in beef cattle. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 10:1-7.

Pai CK, Wu ZY, Chen MJ, Zeng YF, Chen W, Duan CH, Li ML, Liu JR (2010) Molecular cloning and characterization of a bifunctional xylanolytic enzyme from *Neocallimastix patriciarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 85:1451-1462.

Panda T, Gowrishankar BS (2005) Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology** 67:160-169.

Park DJ, Lee YS, Chang J, Fang SJ, Choi YL (2013) An β -1,4-Xylanase with Exo-Enzyme Activity Produced by *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and Its Cloning and Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 23:397-404.

Pavani CD (2017) **Potencial biotecnológico do metageoma de rúmen bovino da raça Nelore (*Bos tauros indicus*), visando à desconstrução da biomassa vegetal**. 181 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Petersen TN, Brunak S, Heijne GV, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** 8:785-786.

Pohlschröder M, Leschine SB, Canale-Parola E (1994) Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvens* C7. **Journal of Bacteriology** 176:70-76.

Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 67:577-591.

Powell S, Forslund K et al (2014) eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. **Nucleic Acids Research** 42:231-239.

Rahmani N, Kahar P, Lisdiyanti P, Lee J, Yopi Y, Bambang P, Ogino C, Akihiko K (2018) GH-10 and GH-11 Endo-1,4- β -xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. **Bioresource Technology** 272:315-325.

Ramesh A, Devi PH, Chattopadhyay S, Kavitha M (2020) Commercial Applications of Microbial Enzymes. In.: Arora N, Mishra J, Mishra V. (Eds.) **Microbial Enzymes: Roles and applications in Industries** Singapore: Springer, p. 137-184.

Ratanachomsri U, Sriprang R, Sornlake W, Buaban B (2006) Thermostable Xylanase from *Marasmius* sp.: Purification and Characterization. **BMB Reports** 39:105-110.

Raza, A, Bashir S, Tabassum R (2019) An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. **Heliyon** 5:e01437.

Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research** 42:320-324.

Saini JK, Saini R, Tewari L (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech** 5:337-353.

Sambrook J, Russel DW (2001) Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*. In: **Molecular Cloning, A Laboratory Manual** Nova York: Cold Spring Harbor 1508-1526.

Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology** 14: 303–310.

Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'ari R (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology** 189:8746–8749.

Sharma HK, Xu C, Qin W (2019) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization** 10:235-251.

Shi H, Zhang Y, Zhong H, Huang Y, Li X, Wang F (2014) Cloning, over-expression and characterization of a thermo-tolerant xylanase from *Thermotoga thermarum*. **Biotechnology Letters** 36:587-593.

Sievers F, Wilm A et al (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology** 7:e539.

Silva AS, Espinheira RP, Teixeira RSS, De Souza MF, Ferreira-Leitão V, Bom EPS (2020) Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. **Biotechnology for Biofuels** 13: 58.

Sood S, Sharma A, Sharma N, Kanwar SS (2018) Carboxylesterases: Sources, Characterization and Broader Applications. **Insights in Enzyme Research** 1:2.

Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology** 115:113-128.

Sporck D, Reinoso FAM, Recoret J, Gutiérrez A, Del Rio JC, Ferraz A, Milagres AMF (2017) Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology for Biofuels** 10:296.

Sun S, Sun S, Cao X, Sun R (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology** 199:49-58.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22:4673-4680.

Vassilev SV, Vassileva CG, Vassilev VS (2015) Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. **Fuel** 158:330-350.

Venkateswar Rao L, Goli JK, Gentela K, Koti S (2016) Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology** 213:299-310.

Vrzheschch PV (2007) Steady-state kinetics of bifunctional enzymes. Taking into account kinetic hierarchy of fast and slow catalytic cycles in a generalized model. **Biochemistry (Moscow)** 72:936-943.

Wang G, Huang X, Ng T, Lin J (2014) High Phylogenetic Diversity of Glycosyl Hydrolase Family 10 and 11 Xylanases in the Sediment of Lake Dabusu in China. **PLoS ONE** 9:e112798.

Waterhouse A, Bertoni M et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research** 46:296-303.

Wefers D, Cavalcante JJV, Schendel RR, Deveryshetty J, Wang K, Wawrzak Z, Mackie RI, Koropatkin NM, Caan I (2017) Biochemical and Structural Analyses of Two Cryptic Esterases in *Bacteroides intestinalis* and their Synergistic Activities with Cognate Xylanases. **Journal of Molecular Biology** 429:2509-2527.

Yang W, Bai Y, Yang P, Luo H, Huang H, Meng K, Shi P, Wang Y, Yao B (2015) A novel bifunctional GH51 exo- α -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for Biofuels** 8:197.

Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F (2020) **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**. Massachusetts: Academic Press p. 358.

Yu P, McKinnon JJ, Christensen DA (2005) Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multienzyme cocktail: In vitro studies. **Journal of Animal Science** 83:1133–1141.

Yu Y, Liu C, Zhao Z, Yang Y, Li Q (2012) Lipase/esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via polycondensation: A review. **Process Biochemistry** 47:1027–1036.

Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, Busk PK, Xu Y, Yin Y (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research** 46:95-101.

Zhang JX; Flint HJ (1992) A bifunctional xylanase encoded by the xynA gene of the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 comprises two dissimilar domains linked by an asparagine/glutamine-rich sequence. **Molecular Microbiology** 6:1013-1023.

Zhang J, Siika-aho M, Tenkanen M, Viikari L (2011) The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. **Biotechnology for Biofuels** 4:60.

Zhu Y, Liao Y, Lv W, Liu J, Song X, Chen L, Wang C, Sels BF, Ma L (2020) Complementing Vanillin and Cellulose Production by Oxidation of Lignocellulose with Stirring Control. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 8:2361–2374.