

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 03/06/2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

**Jéssica de Araújo Zanoni**

**Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.**

São José do Rio Preto  
2022

**Jéssica de Araújo Zanoni**

**Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez**

**Coorientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes**

**Locais de execução:** Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP); Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicadas (LBMA); Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Z33a

Zanoni, Jéssica de Araújo

Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural in silico de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*. / Jéssica de Araújo Zanoni. -- São José do Rio Preto, 2022

121 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Eleni Gomes

1. Endoxilanase. 2. Cinética enzimática. 3. Termodinâmica. 4. Maceração enzimática. 5. Xilooligossacarídeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Jéssica de Araújo Zanoni**

**Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
UNESP – Campus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
USP – Campus de São Paulo

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado  
UNESP – Campus de Ilha Solteira

Profa. Dra. Marcela Marques de Freitas Lima  
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral  
USP - Campus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto  
3 de junho de 2022

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, professor Dr Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela oportunidade, orientação e paciência.

A minha co-orientadora, professora Dra Eleni Gomes, pela disponibilidade e apoio a execução desse trabalho.

A todos os integrantes e amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP), Guilherme, Izabella, Moisés e Matheus, por todos os momentos compartilhados durante os últimos anos.

O mesmo se estende aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada (LBMA), Cíntia, Vitória, Carlos, Maitê, Erik, Eduardo.

A todos os professores e alunos do programa de pós-graduação em Biofísica Molecular, em especial para Ângela, Isabela, Ícaro, Murilo e Jorge.

Agradecimento especial aos membros da minha banca de qualificação Márcia e Roni, que foram de suma importância para o trabalho.

A toda minha família, que sempre me apoiou.

Ao meu pai, que eu sei que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu querido Daniel pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

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

## RESUMO

Este trabalho realizou estudos sobre propriedades bioquímicas, estruturais e aplicação de uma endoxilanase pertencente à família GH 11 do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Foram avaliadas características estruturais através de análises de bioinformática, identificando uma estrutura composta por 65% de folhas beta, apenas 7% de uma alfa hélice e os outros 27% da estrutura total correspondem a enovelamento aleatório (random coil). Os resíduos catalíticos da enzima foram identificados como glutamatos nas posições 89 e 181. A produção da enzima foi feita por expressão heteróloga em *Pichia pastoris* linhagem X33 (*Komagataella phaffii*) durante 144 horas a 28 °C induzida por metanol. A presença da glicosilação na região N-terminal inibiu a afinidade por íons metálicos imobilizadas da cauda de histidina, por isso o protocolo alternativo de purificação foi estabelecido onde obtivemos um rendimento final de 6,0% da purificação. A enzima purificada foi analisada quanto à influência do glicerol sobre parâmetros termodinâmicos e cinéticos, onde o glicerol aumentou significativamente  $V_{max}$  não apresentando variações significativas sobre  $K_m$ , diminuiu a energia de ativação da reação e da desnaturação térmica, aumentou os valores de meia vida, entropia e entalpia, porém não promoveu alterações nos valores de energia livre de Gibbs da desnaturação térmica. Simulações de dinâmica molecular evidenciaram que a presença do glicerol promoveu menores valores de RMSD e Rg. Os parâmetros cinéticos também foram avaliados na presença de compostos fenólicos, onde apenas os valores de  $V_{max}$  foram aumentados na presença de ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido vanílico. Análises de *docking* molecular não identificaram sítios de ligação na superfície da estrutura enzimática. Os efeitos observados podem ser atribuídos à adsorção dos fenólicos sobre as fibras de xilana, favorecida pelo pH do meio reacional. A aplicação de 10 U.g<sup>-1</sup> da enzima na maceração enzimática para extração do mosto de uva, proporcionou aumento de 8% no rendimento após 2 horas em 55°C, diminuição da acidez total e aumento nos valores de pH, sólidos solúveis, açúcares redutores e conteúdo de polifenólicos totais. A qualificação dos produtos de hidrólise da endoxilanase foi feita sobre os substratos xilana beechwood e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Em 24 horas de hidrólise foi possível identificar X1, X2 e X5 como produtos principais para a xilana beechwood, a presença de X5 foi relacionada ao mecanismo de transglicosilação descrito na literatura. No mesmo tempo para a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foram identificados X1, X2 e X4. A diferença entre os produtos encontrados deve-se à constituição estrutural dos substratos avaliados.

**Palavras-chave:** Endoxilanase. Cinética enzimática. Termodinâmica. Maceração enzimática. Xilooligossacarídeos.

## ABSTRACT

This work carried out studies on the biochemical and structural properties and application of an endoxylanase belonging to the GH11 family of the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Structural characteristics were evaluated through bioinformatics analyses, identifying a structure composed by 65% of beta sheets, only 7% of an alpha helix and the other 27% of the total structure correspond to random coiling. The enzyme catalytic residues were identified as glutamates at positions 89 and 181. Enzyme production followed by heterologous expression in *Pichia pastoris* lineage X33 (*Komagataella phaffi*) for 144 hours at 28°C induced by methanol. The presence of glycosylation in the N-terminal region inhibited the affinity for immobilized metal ions from the histidine tail, so the alternative purification protocol was established where we obtained a final yield of 6.0 %. The purified enzyme was analyzed for the influence of glycerol on thermodynamic and kinetic parameters, where glycerol significantly increased  $V_{max}$  without showing significant variations over  $K_m$ , decreased the activation energy of the reaction and thermal denaturation, increased the half-life values, entropy and enthalpy, but did not promote changes in the values of Gibbs free energy of thermal denaturation. Molecular dynamic simulations showed smaller RMSD and  $R_g$  on the presence of glycerol. The kinetic parameters were also evaluated in the presence of phenolic compounds, where only the  $V_{max}$  values were increased in the presence of syringic acid, ferulic acid and vanillic acid. Molecular docking analyzes did not identify binding sites on the surface of the enzymatic structure. The observed effects can be attributed to the adsorption of phenolics on the xylan fibers, favored by the pH of the reaction medium. The application of 10 U.g<sup>-1</sup> of the enzyme in the enzymatic maceration to extract the grape must, provided an 8% increase in yield after 2 hours at 55°C, a decrease in total acidity and an increase in pH values, soluble solids, reducing sugars and of total polyphenols. The qualification of endoxylanase hydrolysis products was performed on beechwood xylan substrates and hemicellulose extracted from sugarcane bagasse. In 24 hours it was possible to identify X1, X2 and X5 as main products for beechwood xylan, the presence of X5 was related to the transglycosylation mechanism described in the literature. At the same time, for hemicellulose extracted from sugarcane bagasse, X1, X2 and X4 were identified. The difference between the products found is due to the structural constitution of the evaluated substrates.

**Keywords:** Endoxylanase. Enzyme kinetics. Thermodynamics. Enzymatic maceration. Xylooligosaccharides.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação do arranjo da parede celular vegetal. ....   | 19 |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana, assim como a estrutura do polissacarídeo.....   | 20 |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismo de duplo deslocamento de Koshland de $\beta$ -glicosidases .....   | 22 |
| <b>Figura 4.</b> Comparação entre as estruturas terciárias de endoxilanasas pertencentes às famílias GH 10 e GH 11. ....  | 23 |
| <b>Figura 5.</b> Sítios de clivagem das enzimas das famílias GH10 e GH11 em relação ao substrato 4-O-metil-D-glucuronoxilano.....   | 24 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema representativo da etapa de clonagem do DNA durante o processo de produção da proteína recombinante.....  | 27 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura terciária de endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, modelada por homologia pelo Swiss-Model. ....   | 51 |
| <b>Figura 8.</b> Gráfico de Ramachandran para o modelo da estrutura terciária de endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, modelada por homologia pelo Swiss-Model.....             | 52 |
| <b>Figura 9.</b> Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, destacando os resíduos catalíticos no sítio ativo, Glu89 e 181.....         | 53 |
| <b>Figura 10.</b> Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, em A modelo de superfície e em B sobreposição de modelos.....              | 54 |
| <b>Figura 11.</b> Representação do modelo estrutural glicosilado da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4.....   | 55 |
| <b>Figura 12.</b> Orientação do substrato no sítio ativo da enzima. Os subsítios estão identificados como -3; -2; -1; +1 e +2.....  | 56 |
| <b>Figura 13.</b> Perfil de produção da endoxilanase recombinante (U mL <sup>-1</sup> ) expressa por <i>Pichia pastoris</i> cultivada em meio BMMY em diferentes tempos após a indução por metanol..... | 57 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 14.</b> Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 12% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) do cultivo da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> em diferentes tempos a indução com metanol.....  | 58 |
| <b>Figura 15.</b> Gráfico de Fischer do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida a 10 %.....   | 59 |
| <b>Figura 16.</b> Precipitação do extrato enzimático contendo a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando diferentes concentrações de etanol.....   | 61 |
| <b>Figura 17.</b> Perfil de eluição na filtração em gel do sobrenadante da precipitação com etanol aplicado em coluna cromatográfica GE XK-16/100 com Sephadex G-50 operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min.....   | 62 |
| <b>Figura 18.</b> Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) das frações após a precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio.....  | 63 |
| <b>Figura 19.</b> Perfil de eluição na filtração em gel do precipitado por 80% de sulfato de amônia aplicado em coluna cromatográfica de filtração em gel Superdex 75 10/300 GL operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min.....   | 64 |
| <b>Figura 20.</b> Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na ausência de glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood.....  | 67 |
| <b>Figura 21.</b> Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na presença de 20 % glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood.....   | 68 |
| <b>Figura 22.</b> Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> ....   | 71 |
| <b>Figura 23.</b> Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na presença de 20% de glicerol.....  | 72 |
| <b>Figura 24.</b> Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para a determinação da energia de ativação de desnaturação ( $E_{a(D)}$ ) da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . (●) ensaio conduzido na ausência de glicerol, (■) ensaio conduzido na presença de 20% de glicerol..... | 73 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 25.</b> Representação esquemática das mudanças de energia durante a desnaturação térmica de proteínas.....  | 76 |
| <b>Figura 26.</b> Estabilidade estrutural da endoxilanase avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....   | 78 |
| <b>Figura 27.</b> Estabilidade estrutural da endoxilanase na presença de glicerol avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....   | 79 |
| <b>Figura 28.</b> Estabilidade estrutural da endoxilanase na ausência (A) e presença de glicerol (B) avaliada por raio de giro (Rg) obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....   | 80 |
| <b>Figura 29.</b> Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL <sup>-1</sup> . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo e velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença de 20% de glicerol.....  | 82 |
| <b>Figura 30.</b> Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL <sup>-1</sup> . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e na presença de 20% de glicerol.....   | 83 |
| <b>Figura 31.</b> Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL <sup>-1</sup> . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença dos compostos fenólicos.....   | 85 |
| <b>Figura 32.</b> Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL <sup>-1</sup> . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto na presença de 10 mmol L <sup>-1</sup> dos compostos fenólicos (A) ácido siríngico; (B) ácido ferúlico; (C) ácido vanílico e (D) ácido 4-hidroxibenzoico..... | 86 |
| <b>Figura 33.</b> Sobreposição dos modelos obtidos das duas metodologias de aprendizado de máquina, alphafolda (em azul) e o RoseTTaFold (em ciano).....  | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 34.</b> Localização das cavidades (em verde) encontradas pelo programa Molegro na estrutura da endoxilanase.....  | 91  |
| <b>Figura 35.</b> Sobreposição das estruturas modeladas da endoxilanase sobrepostas. A região da cavidade 2 mostra Trp 177 descoberto na estrutura sem a presença de his-tag (azul), e rotacionado para o interior da cavidade, ocupando o espaço do sítio nas duas estruturas com a his-tag modeladas por aprendizagem de máquina, RoseTTaFold (bege) e Alphafold (verde)..... | 91  |
| <b>Figura 36.</b> Rendimento da extração de mosto de uva por maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....   | 93  |
| <b>Figura 37.</b> Análise dos produtos de hidrólise enzimática por cromatografia em camada delgada (CCD).....   | 100 |
| <b>Figura 38.</b> Representação esquemática da estrutura da xilana de beechwood. A) Unidade de 4-O-metil-glucoroxilana, onde a substituição ocorre no terceiro resíduo por uma ligação tipo alfa entre o carbono 2 do xilopiranosil e o carbono 1 da glicose metilada em seu quarto carbono.....  | 101 |
| <b>Figura 39.</b> Análise dos produtos de hidrólise enzimática prolongada por cromatografia em camada delgada (CCD).....  | 102 |
| <b>Figura 40.</b> Proposta de competição do caminho da reação entre transglicosilação e hidrólise no sítio ativo das endoxilanasas. 1, hidrólise; 2, transglicosilação.....   | 105 |
| <b>Figura 41.</b> Esquema do modo de ação da endoxilanase sobre xilana beechwood (4-O-metil-glucoroxilana). .....   | 106 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Quadro 1.</b> Parâmetros físico-químicos da endoxilanase recombinante de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4. ....   | 48  |
| <b>Tabela 1.</b> Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....  | 64  |
| <b>Tabela 2.</b> Coeficientes de temperatura ( $Q_{10}$ ) da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> estimados com base no gráfico de Arrhenius de primeira ordem. ....               | 68  |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica irreversível da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....  | 69  |
| <b>Tabela 4.</b> Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível na ausência e presença de 20% de glicerol para a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....       | 74  |
| <b>Tabela 5.</b> Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> na presença de 10 mmol L <sup>-1</sup> dos compostos fenólicos. ....                                 | 86  |
| <b>Tabela 6.</b> Resíduos constituintes das cavidades encontradas pelo programa Molegro na estrutura modelada da endoxilanase. ....  | 87  |
| <b>Tabela 7.</b> Escores médios das cinco melhores poses de cada ligante, em cada cavidade avaliada. ....  | 88  |
| <b>Tabela 8.</b> Análises físico-químicas do mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....                              | 94  |
| <b>Tabela 9.</b> Conteúdo de fenólicos totais presentes no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....                | 96  |
| <b>Tabela 10.</b> Parâmetros de cor avaliados no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . ....                          | 97  |
| <b>Tabela 11.</b> Quantificação por HPLC de xilooligossacarídeos obtidos após processo de hidrólise enzimática sobre substratos xilana beechwood e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. .... | 102 |

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | 17 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | 19 |
| <b>2.1 Endoxilanasas e as famílias Glicosídeos Hidrolases (GH 10) e (GH 11)</b>   | 19 |
| <b>2.2 Interesse industrial sobre as xilanases</b>  | 24 |
| <b>2.3 Proteínas recombinantes</b>  | 26 |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b>  | 28 |
| <b>4 OBJETIVOS</b>  | 29 |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 30 |
| <b>5.1 Caracterização estrutural por homologia</b>  | 30 |
| 5.1.1 Análise in silico da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante | 30 |
| 5.1.2 Predição da estrutura por análises computacionais   | 30 |
| 5.1.3 Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato   | 31 |
| <b>5.2 Produção por expressão heteróloga da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i></b>  | 32 |
| 5.2.1 Vetor de expressão  | 32 |
| 5.2.2 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> com o plasmídeo pPICZαA_XylMh   | 32 |
| 5.2.3 Ensaio de expressão   | 32 |
| <b>5.3 Purificação da endoxilanase recombinante</b>   | 33 |
| 5.3.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)   | 33 |
| 5.3.2 Protocolo alternativo de purificação  | 34 |
| <b>5.4 Ensaio enzimático: dosagem da atividade xilanolítica</b>   | 34 |

|  |    |
|--|----|
| <b>5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE</b> .....   | 35 |
| <b>5.6 Precipitação com TCA das amostras a serem utilizadas para as análises eletroforéticas</b> .....   | 36 |
| <b>5.7 Determinação da concentração de proteína</b> .....  | 36 |
| <b>5.8 Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> ..... | 37 |
| 5.8.1 Caracterização quanto à temperatura ótima.....   | 37 |
| 5.8.2 Cálculo da energia de ativação da reação ( $E_a$ ).....  | 37 |
| 5.8.3 Cálculo do coeficiente da temperatura.....   | 38 |
| 5.8.4 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível.....  | 38 |
| 5.8.4.1 Tempo de meia vida.....  | 38 |
| 5.8.4.2 Cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ( $E_{a(d)}$ ).....   | 39 |
| 5.8.4.3 Entalpia de ativação da desnaturação térmica $\Delta H_D$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ).....  | 39 |
| 5.8.4.4 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica $\Delta G_D$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ).....  | 39 |
| 5.8.4.5 Entropia de ativação da desnaturação térmica $\Delta S_D$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ).....  | 40 |
| 5.8.5 Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol.....   | 40 |
| <b>5.9 Avaliação do efeito do glicerol e de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> .....              | 41 |
| 5.9.1 Determinação dos parâmetros cinéticos.....   | 41 |
| 5.9.2 <i>Docking</i> molecular.....  | 41 |
| <b>5.10 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (uva-Vitória)</b> .....   | 41 |
| 5.10.1 Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....                                       | 43 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.10.2 Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....   | 43        |
| 5.10.2.1 Sólidos solúveis totais.....   | 43        |
| 5.10.2.2 pH e acidez total.....   | 43        |
| 5.10.2.3 Determinação de açúcares redutores totais .....  | 44        |
| 5.10.3 Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 44        |
| 5.10.4 Determinação de parâmetros de cor do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 44        |
| 5.10.5 Determinação da clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....   | 45        |
| <b>5.11 Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e xilana da cana-de-açúcar</b> .....   | <b>45</b> |
| 5.11.1 Processo de hidrólise enzimática do substrato xilana.....  | 45        |
| 5.11.2 Caracterização do material hidrolisado.....  | 46        |
| 5.11.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....   | 46        |
| 5.11.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....   | 46        |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>6.1 Análise <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante</b> ..... | <b>48</b> |
| 6.1.1 Parâmetros físico-químicos.....   | 48        |
| 6.1.2 Domínio conservado.....   | 49        |
| 6.1.3 Modificações pós-traducionais: N e O-glicosilação.....  | 50        |
| <b>6.2 Predição da estrutura tridimensional</b> .....   | <b>50</b> |



|  |    |
|--|----|
| <b>6.3 Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato</b> .....   | 54 |
| <b>6.4 Produção por expressão heteróloga da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i></b> .....   | 57 |
| <b>6.2 Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes</b> .....  | 58 |
| <b>6.3 Purificação da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> ...   | 59 |
| 6.3.1 Precipitação com etanol.....   | 60 |
| 6.3.2 Cromatografia de exclusão molecular em resina de Sephadex G-50.....  | 61 |
| 6.3.3 Precipitação com Sulfato de amônio.....  | 62 |
| 6.3.4 Cromatografia de exclusão molecular Superdex-75.....   | 63 |
| <b>6.4 Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b><br>.....                          | 66 |
| 6.4.1 Efeito da temperatura na hidrólise do substrato da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática..... | 66 |
| 6.4.2 Análise da termoestabilidade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática.....                    | 69 |
| 6.4.3 Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol.....   | 77 |
| <b>6.5 Efeito do glicerol sobre Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> .....   | 81 |
| <b>6.6 Efeito de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> .....   | 83 |
| <b>6.7 Docking molecular</b> .....   | 88 |
| <b>6.8 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (uva-Vitória)</b> .....  | 92 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 6.8.1      | Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....   | 93         |
| 6.8.2      | Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 94         |
| 6.8.3      | Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....                                   | 96         |
| 6.8.4      | Determinação dos parâmetros de cor e clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> .....                             | 97         |
| <b>6.9</b> | <b>Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e hemicelulose da cana-de-açúcar, pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i></b> ..... | <b>99</b>  |
| <b>7</b>   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>107</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>109</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Tem-se intensificado, especialmente nos últimos anos, a preocupação com a sustentabilidade ambiental e os efeitos negativos provocados pela exacerbada produção de resíduos industriais e agroindustriais, que necessitam de tratamento antes de retornarem ao meio ambiente ou podem ser empregados como matéria-prima para novos produtos. Dentre esses resíduos encontra-se a biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celuloses, hemiceluloses e lignina.

Desde a descoberta da fermentação acetona-butanol por Chaim Weizmann se abriu o caminho para a obtenção de produtos de elevado valor agregado utilizando microrganismos adequados e substratos de baixo custo (NUNCIRA, 2013). Essa abordagem possibilita a obtenção de produtos como exemplo xilooligossacarídeos (XOS) com propriedades prebiótica que facilitam o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. no trato gastrointestinal (ROBERFROID, 1997), o etanol de segunda geração (RAELE et al., 2014), gás metano (IBRAHIM et al., 2017), e ácido cítrico (FRANÇA, 2016), a partir da hidrólise dos polissacarídeos para liberação de seus açúcares constituintes.

O conjunto lignina-hemicelulose-celulose compreende diversos tipos de carboidratos interligados de modo a garantir a sustentabilidade da planta, constituindo um material muito resistente, que apresenta desafio ao ser degradado. Essa decomposição pode ser realizada com o auxílio de enzimas, que atuam como catalisadores biológicos altamente desejáveis devido à sua especificidade e por poderem agir com eficiência em condições suaves de reação. (ALAM et al., 1994; CHANWICHA et al., 2015; DE MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal, dentre as quais a xilana é o principal. A xilana apresenta em sua cadeia principal unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, e cadeias laterais contendo resíduos de L-arabinose, ácidos urônicos e diferentes carboidratos (SILVA et al., 1998), tais características tornam esse material atraente para aplicações biotecnológicas.

A degradação da xilana envolve uma associação de enzimas denominada “complexo xilanolítico”, cuja aplicações industriais são as mais diversas incluindo capacidade de remover a hemicelulose das polpas de celulose, sendo aplicadas na

indústria em substituição ao cloro para promover o branqueamento da polpa de celulose na fabricação de papel (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014).

Além disso, muitos outros processos podem ser incrementados com a utilização dessas enzimas em substituição aos processos químicos convencionais, como é o caso da liberação de monômeros de xilose para a fermentação de leveduras e produção do adoçante não cariogênico xilitol (TAMANINI; HAULY, 2004).

As xilanases também são utilizadas na complementação alimentar de animais como frangos, pois degradam ingredientes que não fornecem muitos nutrientes às aves, uma vez que elas não possuem essas enzimas em seu aparelho digestivo, possibilitando a utilização de novas fontes de alimentos (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Na indústria alimentícia, o uso de xilanase destaca-se na maceração enzimática de polpa de frutas (KAUSHAL et al., 2021), facilitando o processo de extração do mosto, melhorando características organolépticas como cor e aroma através da maior extração de compostos fenólicos e diminuição da turvação do material (DALAGNOL et al., 2017; NOGALES-BUENO et al., 2020). O uso de xilanases estende-se na panificação, com a finalidade de promover a degradação das pentosanas, polissacarídeos constituídos de D-xilose e L-arabinose, para facilitar o manuseio da massa, aumentando o crescimento da mesma e resultando em pães de maiores volumes (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

Estudos de caracterização bioquímica sobre parâmetros cinéticos e termodinâmicos, e caracterização estrutural sobre estrutura tridimensional, interações com substrato ou outros compostos, garantem entendimento sobre aspectos importantes para o desenvolvimento de novos métodos de utilização de enzimas, ou para o aperfeiçoamento de métodos já existentes. Nesse contexto se enquadra o presente projeto.

## 7. CONCLUSÕES

Em relação aos parâmetros termodinâmicos, o glicerol foi capaz de favorecer a reação de hidrólise do substrato por meio da diminuição na energia de ativação da reação ( $E_a$ ), e de aumentar a resistência da enzima à desnaturação térmica, através do aumento da energia de ativação da desnaturação térmica ( $E_{a(d)}$ ). O efeito termoprotetor do glicerol sobre a estrutura terciária da enzima foi evidenciado pelos valores de entalpia ( $\Delta H_D$ ) e entropia ( $\Delta S_D$ ) e energia de Gibbs ( $\Delta G_D$ ). O efeito termoprotetor do glicerol sobre a estrutura da endoxilanase foram confirmados pelos resultados das simulações de dinâmica molecular, uma vez que os valores de RMSD e Rg foram menores quando simulados na presença do composto do que nos ensaios com a enzima livre. O glicerol também foi capaz de afetar os parâmetros cinéticos da enzima, por meio de aumento da velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ), porém não houve alteração na afinidade da enzima pelo substrato avaliado ( $K_m$ ).

Os parâmetros cinéticos da endoxilanase sofreram alterações na presença de compostos fenólicos. Ácido siríngico e ácido ferúlico apresentaram os maiores valores de velocidade máxima ( $V_{max}$ ), seguido por ácido vanílico, e os valores de  $K_m$  foram menores na presença desses compostos. Já o ácido 4-hidroxibenzoico não apresentou influência sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase.

Análises de docking molecular foram realizadas em busca de sítios de interação para os compostos fenólicos na estrutura da endoxilanase. Quando a estrutura modelada sem a his-tag na região N-terminal foi submetida as análises de docking, uma cavidade oposta ao sítio ativo foi identificada, despertando a ideia de que a ligação dos fenólicos nessa cavidade poderia promover uma modulação alostérica e potencializar os parâmetros cinéticos. Uma nova análise foi realizada com a estrutura tridimensional modelada com a his-tag na região N-terminal, nesse caso observamos a rotação de Trp 177 para o interior da estrutura proteica, o que resultou na perda da cavidade anteriormente descrita, não demonstrando sítios de interação para os compostos fenólicos avaliados, além do sítio ativo da enzima.

A aplicação da endoxilanase na extração do mosto de uva mostrou-se efetiva até o tempo de 120 minutos a 50°C, promovendo maiores rendimentos de extração, maior quantidade de sólidos totais, açúcares redutores totais e compostos fenólicos. Além de melhorar os parâmetros de cor como intensidade e tonalidade, assim como a clarificação do material obtido, tornando o mosto de uva mais adequado aos

parâmetros sensoriais exigidos pelos consumidores de produtos a base de suco de uva.

Os produtos principais da hidrólise de endoxilanase sobre xilana beechwood são os oligossacarídeos X4, X3 e X2, sendo observado a presença de xilopentose ao final de 24 horas de hidrólise, atribuindo esse fato a especificidade de interação e reconhecimento do sítio de clivagem características das enzimas pertencentes à família GH 11, e a competição do caminho da reação com o mecanismo de transglicosilação. Os produtos principais da hidrólise de endoxilanase sobre a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foram X4 e X2, com a presença de xilose após 12 horas de hidrólise.

## REFERÊNCIAS

ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 571–578, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018362251>>

AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 19–35, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2079-4>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 298–302, 1994.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Oxford: Clarendon. **Computer Simulation of Liquids**, [s. l.], 1989.

AMO, G. S. De. Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de *Myceliophthora heterothallica* F. 2.1. 4. [s. l.], 2018.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 353–368, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01198746>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 326–338, 2001.

BENDER, A.; SOUZA, A. L. K. De; CALIARI, V.; MALGARIM, M. B.; COSTA, V. B.; GOULART, C. Caracterização físico-química e sensorial de sucos da uva Isabel em cortes com diferentes variedades produzidas na região do Vale do Rio do Peixe-SC. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 23, 2020.

BHATNAGAR, B. S.; BOGNER, R. H.; PIKAL, M. J. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 505–523, 2007.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X.-P.; XU, F.; SUN, R.-C.; KENNEDY, J. F. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712000124>>

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 151–166, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697000965>>

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 130–138, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138117711001470>>

CAKMAK, U.; SAGLAM ERTUNGA, N. Gene cloning, expression, immobilization and characterization of endo-xylanase from *Geobacillus* sp. TF16 and investigation of its industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 133, p. S288–S298, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138117717300164>>

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. Da; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 254–267, 2005.

CANOSSA, A. T.; REINEHR, J.; DE BEM, B. P.; ALLEBRANDT, R.; WURZ, D. A.; KRETZSCHMAR, A. A. Composição química e análise sensorial do suco de uva elaborado com três variedades cultivadas em Lages–Santa Catarina. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, [s. l.], p. 972–981, 2017.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. de O.; DA SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004905>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

CHANG, S.; GUO, Y.; WU, B.; HE, B. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 249–256, 2017. Disponível em:



<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301631594X>>

CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **mycoscience**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 171–175, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181300200079X>>

COSTA, T. dos S.; ROGEZ, H.; PENA, R. da S. Adsorption capacity of phenolic compounds onto cellulose and xylan. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 35, p. 314–320, 2015.

CREAGER, A. N. H. Recipes for recombining DNA: A history of Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **BJHS Themes**, [s. l.], v. 5, v. 2020/12/08, p. 225–243, 2020. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/recipes-for-recombining-dna-a-history-of-molecular-cloning-a-laboratory-manual/F4EE6A7FFA4991B714A33D474BC1CF76>>

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulasas, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 249–260, 1997.

DA SILVA, P. O.; DE ALENCAR GUIMARÃES, N. C.; SERPA, J. D. M.; MASUI, D. C.; MARCHETTI, C. R.; VERBISCK, N. V.; ZANOELO, F. F.; RULLER, R.; GIANNESI, G. C. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 21, p. 101312, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119303500>>

DALAGNOL, L. M. G.; DAL MAGRO, L.; SILVEIRA, V. C. C.; RODRIGUES, E.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 105, p. 197–204, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308517300949>>

DE MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em**

**Engenharia**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 68–78, 2009.

DE OLIVEIRA, R. L.; DA SILVA, O. S.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 1088–1093, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301830878X>>

DE SOUZA MOREIRA, L. R.; DE CARVALHO CAMPOS, M.; DE SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 60, p. 46–52, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184513001278>>

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000202>>

DENNISON, C. **A Guide to Protein Isolation**. [s.l.] : Springer Netherlands, 2003.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; CHRYSINA, E. D. The structure of a GH10 xylanase from *Fusarium oxysporum* reveals the presence of an extended loop on top of the catalytic cleft. **Acta Crystallographica Section D**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 735–742, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1107/S0907444912007044>>

ELIAS, H. H. de S. **Caracterização física, química e bioquímica de cultivares de videira durante a maturação**. 2008. 74f, Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Departamento de Ciência dos ..., 2008.

FOGAÇA, A. de O. **Compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade Merlot**, Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

FRANÇA, H. C. R. Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico. [s. l.], 2016.

FREITAS, C. De. Hidrólise enzimática de hemicelulose do pseudocaulo de bananeira com endoxilanase I de *Aspergillus versicolor* para produção de xilooligossacarídeos e avaliação do seu efeito prebiótico. [s. l.], 2019.

FURUKAWA, K.; KOBATA, A. Protein glycosylation. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 554–559, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095816699290085W>>

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: a review. **BioResources**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 3733–3754, 2014.

GOMES, K. de S. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. [s. l.], 2014.

GONÇALVES, L. R. B.; GOMES, S. D. L.; ALBUQUERQUE, T. L.; JUNIOR, J. E. M.; ROCHA, M. V. P. PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CAJU. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 683–688, 2014.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; SANTANA-MORALES, J. C.; RÍOS-FRÁNQUEZ, F. J.; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; CRISTIANI-URBINA, E.; PONCE-NOYOLA, T. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, [s. l.], v. 196, p. 32–35, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236117300947>>

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 419–425, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>>

HENRICI, A. T. The yeasts: genetics, cytology, variation, classification and identification. **Bacteriological Reviews**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 97–179, 1941.

HSU, C.-K.; LIAO, J.-W.; CHUNG, Y.-C.; HSIEH, C.-P.; CHAN, Y.-C. Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. 1523–1528, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1523>>

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>>

IBRAHIM, S. B. S.; LIRA, R. C.; SANTOS, E. L.; AMORIM, E. L. C.; DE LIMA BELEM, T. J.; MACEDO, W. V.; SOUZA, S. P. L.; DA SILVA, S. J. C.; DA SILVA, J. C.; LIRA, J. P. A. Biodigestão anaeróbia do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado e utilizando excretas de frango como inóculo. **PUBVET**, [s. l.], v. 11, p. 1188–1297, 2017.

JOHN, R. A. Photometric assays. In: EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. (Eds.). **Enzyme assays: A practical approach**. [s.l.] : Oxford University Press, 2002. p. 49–78.

KATAPODIS, P.; KINTZIOS, S.; KONSTAS, J.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Enzymic production of aldopentauronic acid and use as a bioregulator in plant airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 630–632, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303801755>>

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 239–243, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404000276>>

KAUSHAL, J.; KHATRI, M.; SINGH, G.; ARYA, S. K. A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1350–1361, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021023606>>

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 241–247, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002650>>

KIM, J.-S.; CHA, S.-S.; KIM, H.-J.; KIM, T.-J.; HA, N.-C.; OH, S.-T.; CHO, H.-S.; CHO, M.-J.; KIM, M.-J.; LEE, H.-S.; KIM, J.-W.; CHOI, K. Y.; PARK, K.-H.; OH, B.-H. Crystal Structure of a Maltogenic Amylase Provides Insights into a Catalytic Versatility \*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 37, p. 26279–26286, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26279>>

KOLENOVÁ, K.; VRŠANSKÁ, M.; BIELY, P. Mode of action of endo- $\beta$ -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 338–345, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165605004736>>

KUMAR, L.; NAGAR, S.; MITTAL, A.; GARG, N.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1737–1749, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1268-z>>

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1435, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0638-4>>

LI, Q.; SUN, B.; XIONG, K.; TENG, C.; XU, Y.; LI, L.; LI, X. Improving special hydrolysis characterization into *Talaromyces thermophilus* F1208 xylanase by engineering of N-terminal extension and site-directed mutagenesis in C-terminal. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 451–458, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016319377>>

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>>

MACLEOD, A. M.; LINDHORST, T.; WITHERS, S. G.; WARREN, R. A. J. The Acid/Base Catalyst in the Exoglucanase/Xylanase from *Cellulomonas fimi* Is Glutamic Acid 127: Evidence from Detailed Kinetic Studies of Mutants. **Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 20, p. 6371–6376, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00186a042>>

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. ANTHOCYANIS IN GRAPE JUICE: COMPOSITION AND STABILITY. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2006.

MANNA, B.; GHOSH, A. Understanding the conformational change and inhibition of hyperthermophilic GH10 xylanase in ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 332, p. 115875, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732221006012>>

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2003.

MARTINS, M.; ÁVILA, P. F.; PAIM DE ANDRADE, C. C.; GOLDBECK, R. Synergic recombinant enzyme association to optimize xylo-oligosaccharides production from agricultural waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 28, p. 101747, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881812030476X>>

MCCLEARY, B. V.; MCGEOUGH, P. A. Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- $\beta$ -Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 177, n. 5, p. 1152–1163, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1803-z>>

MIAO, S.; ZISER, L.; AEBERSOLD, R.; WITHERS, S. G. Identification of Glutamic Acid 78 as the Active Site Nucleophile in *Bacillus subtilis* Xylanase Using Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 23, p. 7027–7032, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00189a002>>

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. z.**, [s. l.], v. 49, n. 333–369, p. 352, 1913.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIN, C. J.; MOON-HYEONG, S.; HYUN-HO, K.; EUNKYUNG, K.; HAK-SUNG, K. Molecular basis for the role of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 25, p. 10171–10176, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1300457110>>

MONONEN, I.; KARJALAINEN, E. Structural comparison of protein sequences around potential N-glycosylation sites. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 788, n. 3, p. 364–367, 1984. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483884900505>>

MORAIS DE CARVALHO, D.; MARTÍNEZ-ABAD, A.; EVTUGUIN, D. V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 156, p. 223–234, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310761>>

MORETTI, M. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R. D.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Braz J Microbiol**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 1062–1071, 2012.

MWANGI, I. W.; NGILA, J. C.; NDUNG'U, P.; MSAGATI, T. A. M. Removal of phenolics from aqueous media using quaternised maize tassels. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 134, p. 70–79, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479713007792>>

NASCIMENTO, C. E. de O. Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação. [s. l.], 2019.

NASCIMENTO, C. E. de O.; SIMÕES, L. C. de O.; PEREIRA, J. de C.; DA SILVA, R. R.; DE LIMA, E. A.; DE ALMEIDA, G. C.; PENNA, A. L. B.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 347, p. 1–8, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165622000268>>

NC-IUB. Units of Enzyme Activity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 319–320, 1979.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. [s.l.] : Macmillan, 2008.

NOGALES-BUENO, J.; BACA-BOCANEGRA, B.; HEREDIA, F. J.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M. Phenolic compounds extraction in enzymatic macerations of grape skins identified as low-level extractable total anthocyanin content. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 324–331, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15006>>

NUNCIRA, D. L. V. **Análise termodinâmica da produção de biobutanol em uma biorefinaria brasileira**, Dissertação de mestrado. Engenharia de Energia, UNIFEI. Minas Gerais, 2013.

PETERS, G. H.; FRIMURER, T. M.; ANDERSEN, J. N.; OLSEN, O. H. Molecular Dynamics Simulations of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. I. Ligand-Induced Changes in the Protein Motions. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 505–515, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349599769079>>

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 145–161, 1956. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02538322>>

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 95, n. 16, p. 9268–9273, 1998.

RAELE, R.; BOAVENTURA, J. M. G.; FISCHMANN, A. A.; SARTURI, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, [s. l.], v. 87, p. 205–223, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004016251300317X>>

RAHMANI, N.; KAHAR, P.; LISDIYANTI, P.; LEE, J.; YOPI; PRASETYA, B.; OGINO, C.; KONDO, A. GH-10 and GH-11 Endo-1,4- $\beta$ -xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 272, p. 315–325, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418314214>>

RIZZON, L. A. Metodologia para análise de vinho. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, [s. l.], p. 120, 2010.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. [s.l.] : Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e ..., 2007.

ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Dietary fiber in health and disease**, [s. l.], p. 211–219, 1997.

ROSMINE, E.; SAINJAN, N. C.; SILVESTER, R.; ALIKKUNJU, A.; VARGHESE, S. A. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 393–401, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X1730029X>>

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021999177900985>>

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases. **Molecular biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 257–281, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a**



**laboratory manual.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Author Affiliation: University of Texas South Western Medical Center, USA.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2012, 2012.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>>

SIDDIQUI, K. S.; SAQIB, A. A. N.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. I. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 325–330, 1997.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, [s. l.], v. 8, p. 25–33, 1998.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

STEEN, P. Van den; RUDD, P. M.; DWEK, R. A.; OPDENAKKER, G. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 151–208, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10409239891204198>>

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 315–330, 2004.

TERRONE, C. C.; MONTESINO DE FREITAS NASCIMENTO, J.; FANCHINI TERRASAN, C. R.; BRIENZO, M.; CARMONA, E. C. Salt-tolerant  $\alpha$ -arabinofuranosidase from a new specie *Aspergillus hortai* CRM1919: Production in acid conditions, purification, characterization and application on xylan hydrolysis.

**Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 23, p. 101460, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119312575>>

TIAN, Y.; JIANG, Y.; OU, S. Interaction of cellulase with three phenolic acids. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 1022–1027, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612017037>>

TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 847–856, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00003a019>>

VAGENENDE, V.; YAP, M. G. S.; TROUT, B. L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 46, p. 11084–11096, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi900649t>>

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Gromos manual. **BIOMOS, Biomolecular Software, Laboratory of Physical Chemistry, University of Groningen, The Netherlands**, [s. l.], 1987.

VANDERWEELE, T. J.; DING, P. Sensitivity Analysis in Observational Research: Introducing the E-Value. **Annals of internal medicine**, United States, v. 167, n. 4, p. 268–274, 2017.

VARDAKOU, M.; DUMON, C.; MURRAY, J. W.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WEINER, D. P.; JUGE, N.; LEWIS, R. J.; GILBERT, H. J.; FLINT, J. E. Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 375, n. 5, p. 1293–1305, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283607014672>>

VIANA, Y. A.; DA SILVA GARROTE FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2005.

WANG, J.; CIEPLAK, P.; KOLLMAN, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1049–1074, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/1096-987X\(200009\)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO)>

WANG, L.; CAO, K.; PEDROSO, M. M.; WU, B.; GAO, Z.; HE, B.; SCHENK,

G. Sequence- and structure-guided improvement of the catalytic performance of a GH11 family xylanase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 297, n. 5, p. 101262, 2021. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925821010656>>

WANG, Y.; LIU, M.; LI, J.; WEI, H.; ZHANG, K. Experimental and in silico studies of competitive inhibition of family GH10 *Aspergillus fumigatus* xylanase A by *Oryza sativa* xylanase inhibitor protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1391–1399, 2021. b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021023667>>

WELLENS, A.; GAROFALO, C.; NGUYEN, H.; VAN GERVEN, N.; SLÄTTEGÅRD, R.; HERNALSTEENS, J.-P.; WYNS, L.; OSCARSON, S.; DE GREVE, H.; HULTGREN, S. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH–oligomannose-3 complex. **PloS one**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. e2040, 2008.

WICKI, J.; SCHLOEGL, J.; TARLING, C. A.; WITHERS, S. G. Recruitment of Both Uniform and Differential Binding Energy in Enzymatic Catalysis: Xylanases from Families 10 and 11. **Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 23, p. 6996–7005, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi700359e>>

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (*Saccharomycetaceae*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.59.439>>

YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 277–280, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401000244>>

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 12, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-12>>