**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.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Jaboticabal**

## 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 Agropecuaria 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. *Western blot* ..... 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 *in silico* ..... 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 β(1→4), 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 esterease, α-D-glucoronidase, α-L-arabinofuranosidase), e as que atuam na cadeia principal (endo-1,4-β-xilanases EC 3.2.1.8 e β-xilosidase, EC 3.2.1.37) (Collins, Gerday e Feller, 2005).

As endo-1,4-β-xilanases são responsáveis pela clivagem randômica do esqueleto da xilana, nas ligações glicosídicas β(1→4) (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.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, composta por celulose (30% a 60%), hemiceluloses (20% a 40%) e lignina (10% a 25%), dentre outros componentes extraíveis (Kumar, Gautam e Dutt, 2016), compõe a estrutura da parede celular das plantas e pode ser categorizada em três tipos: biomassa de resíduo (palha e bagaço), biomassa virgem (árvores, arbustos e gramíneas) e culturas energéticas (Yousuf, Pirozzi e Sannino, 2020). A biomassa lignocelulósica atualmente é considerada uma das matérias-primas mais promissora por ser renovável, de baixo custo e ecológica (Balat e Ayar, 2005).

Um dos destaques da utilização da biomassa lignocelulósica está na produção de biocombustíveis em substituição aos combustíveis fosseis (Yousuf, Pirozzi e Sannino, 2020). Ela também pode ser utilizada em biorrefinarias, um conceito de indústria que explora as potencialidades desta matéria-prima, com o princípio de tratar e processar integralmente, de forma sustentável, e consequentemente agregar valor a novos produtos (Machado et al., 2016). As biorefinarias se apresentam como uma indústria que permite recuperar os diferentes componentes dos insumos e encaminhá-los para diversas aplicações, permitindo assim, a utilização ao máximo da matéria-prima (Amidon et al., 2008).

Cada biomassa lignocelulósica possui suas particularidades e concentrações distintas de celulose, hemicelulose e lignina, bem como cada matéria-prima é dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta (Kumar, Gautam e Dutt, 2016; Lee, Hamid e Zain, 2014). Assim, atualmente as biomassas lignocelulósicas são caracterizadas quanto a constituição para compreender quais métodos são adequados para a solubilização dos compostos e consequentemente aplicação dos mesmos (Machado et al., 2016). A organização estrutural dos compostos da biomassa lignocelulósica é a primeira barreira que dificulta o acesso e, consequentemente, a solubilização deles.

A celulose é um homopolissacarídeo linear, não ramificado, formado por unidades de D-glicose ligadas por ligação glicosídicas β(1→4) com alto grau de

polimerização. A orientação β-1,4 das ligações glicosídicas resulta na formação de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, desta forma, a estrutura da celulose forma redes de ligação de hidrogênio, resultando em uma estrutura cristalina compacta e insolúvel, denominada microfibrilas. Estas microfibrilas se agrupam em feixes maiores, formando as fibrilas de celulose que se inserem em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina (Menon e Rao, 2012; Saini, Saini e Tewari, 2015).

A hemicelulose, o segundo maior componente em abundância na parede celular, também é um polissacarídeo que pode apresentar em sua em sua composição química diferentes pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-manose, D-galactose e D-glicose), ácidos urônicos (4-*O*-metil-D-glicurônico, D-glicurônico e D-galacturônico) e com menor frequência L-ramnose e L-fucose. Os grupos hidroxilas podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila. As hemiceluloses estão na interface entre as microfibrilas de celulose e a lignina, proporcionando adesão e coesão a estes componentes (Polizeli et al., 2005; Saini, Saini e Tewari, 2015). A xilana é a hemicelulose mais abundante na natureza, que contém principalmente resíduos β-D-xilopiranosil ligados por ligações glicosídicas β(1→4) (Beg et al., 2001; Sun et al., 2016), podendo existir na forma de homoxilanas (sem ramificações) ou heteroxilanas (com ramificações) que possuem em suas ramificações estruturas como D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-arabinose (Kumar, Gautam e Dutt, 2016), bem como componentes esterificados com ácidos fenólicos (Biely, Singh e Puchart, 2016)

A lignina é um polímero derivado da fenilalanina e da tirosina, que se associa intimamente com a celuloses e a hemiceluloses formando uma espécie de malha lignocelulósica, e é responsável, em grande parte, pela dificuldade inerente a hidrólise da celulose (Kumar, Gautam e Dutt, 2016). A lignina é uma estrutura molecular complexa, composto por três constituintes fenólicos principais: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A presença de altas concentrações de lignina atua como uma barreira protetora para a permeabilidade, resistência as ações físicas dos microrganismos e, previne a destruição da célula vegetal (Lee, Hamid e Zain, 2014). A celulose, hemicelulose e lignina são ligados através de ligações covalentes ou não covalentes, que conferem ao tecido vegetal recalcitrância nativa à ação de enzimas (Sun et al., 2016).

A conversão da biomassa lignocelulósica, independentemente de sua aplicação, se baseia em duas etapas: o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para disponibilizar o material à hidrólise enzimática do material pré-tratado, como resultado a disponibilização de açúcares (Silva, da et al., 2020). Devido às características estruturais da biomassa lignocelulósica, as etapas se tornam complexas e com particularidades para aplicação industrial.

Os pré-tratamentos podem ser biológicos, físicos, químicos e combinações dos mesmos, de acordo com as necessidades dos procedimentos, aos impactos ambientais e aos custos para a indústria (Kumar, Gautam e Dutt, 2016; Lee, Hamid e Zain, 2014; Menon e Rao, 2012; Sun et al., 2016). Para a recuperação dos compostos da biomassa lignocelulósica, existem as particularidades de cada pré-tratamento, como por exemplo, os pré-tratamentos químicos com ácidos são eficientes principalmente a degradação das hemiceluloses e lignina, consequentemente ocorrendo maior recuperação de celulose (Mosier et al., 2005), enquanto que para a recuperação das hemiceluloses, os processos com álcalis são mais eficientes em termos de rendimento (Carvalheiro, Duarte e Gírio, 2008).

Os tratamentos enzimáticos também podem ser utilizados em pré-tratamentos, principalmente quando se objetiva a recuperação de produtos mais puros, ainda podendo ser associados a tratamentos químicos ou físicos, aumentando o rendimento, como é no caso dos bagaços ricos em xilanas (Sporck et al., 2017). Embora a biomassa lignocelulósica possua recalcitrância forte às enzimas, a combinação delas com um pré-tratamento adequado, facilita o acesso das enzimas aos componentes da planta (Lee, Hamid e Zain, 2014; Menon e Rao, 2012; Sun et al., 2016), promovendo maior rendimento e obtenção de produto mais puro, que são interesses das indústrias farmacêuticas e alimentícias.

## 2.2. Indústria biotecnológica das enzimas

Atualmente, vários setores utilizam enzimas microbianas em escala industrial, a expressão de proteínas em sistemas heterólogos possibilitou a produção e caracterização de novas proteínas de interesse biotecnológico, com alto rendimento e diferentes origens (microrganismos patogênicos, microrganismos não cultiváveis, etcs) (Ramesh et al., 2020).

A célula hospedeira mais utilizada para a expressão de proteínas recombinantes é a *E. coli*, esta bactéria gram-negativa representa um sistema altamente eficiente, com baixo custo de produção (Brondyk, 2009). Os conhecimentos aprofundados sobre o funcionamento genético da *E. coli* possibilitam traçar estratégias para realizar uma expressão eficiente de diversos tipos de genes (Hannig e Makrides, 1998). A expressão heteróloga nestes hospedeiros parte da transferência de um plasmídeo contendo a origem de replicação, marcador de resistência a antibióticos e sítios de regulação da transcrição e tradução. O sistema de expressão pET, por exemplo, amplamente utilizado pelo alto rendimento da expressão de proteínas heterólogas, requer uma célula hospedeira infectada com fragmentos do fago DE3, que codifica o sistema T7 RNA polimerase responsável pela transcrição gênica, o promotor mutado lacUV5, o qual é o sítio alvo de reconhecimento para transcrição do gene, controlado pelo indutor Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (Sørensen e Mortensen, 2005).

Na era da *big data*, a utilização dos 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 (Handelsman, 2004). As análises das bibliotecas metagenômicas tem sido realizadas por abordagens de função dirigida (*function-driven*), que busca a identificação de clones que expressam uma característica desejada; e sequência dirigida (*sequence-driven*), que faz uso de sequências referências para encontrar as biomoléculas, para então ser inserida em vetores de clonagem e, desta maneira, possibilitar a expressão proteica em vetores de expressão (Schloss e Handelsman, 2003).

As comunidades microbianas são muito diversificadas, como por exemplo, comunidades microbianas altamente eficientes na hidrólise da lignocelulose, presente no sistema digestório dos cupins (Lazuka et al., 2018) e no rúmen, que possuem microrganismos pertencentes aos três domínios: Bacteria, Archaea e Eucarya (Choudhury et al., 2015). A metagenômica destes ambientes possibilita além de uma compreensão do funcionamento deste microambiente (Deusch et al., 2017; Gruninger et al., 2016; Ogunade et al., 2019), como também a identificação de novas enzimas

para a hidrólise da biomassa, e que posteriormente podem ser aplicadas nas indústrias biotecnológicas.

### 2.3. Xilanases

A biodegradação de hemiceluloses, como as xilanas, envolve a ação sinérgica de várias enzimas hidrolíticas (acetil xilana esterease, α-D-glucoronidase, α-L-arabinofuranosidase), incluindo as principais enzimas xilanolíticas, endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8) e β-xilosidases (EC 3.2.1.37) (Collins, Gerday e Feller, 2005). As endo-1,4-β-xilanases são responsáveis pela clivagem randômica do esqueleto da xilana, nas ligações glicosídicas β(1→4), enquanto as β-xilosidades catalisam a hidrólise de xilo-oligossacarídeos (XOS) através da remoção de unidades xilosil em sua região não redutora (Alokika e Singh, 2019). A reação catalisada pelas xilanases ocorre por meio de um mecanismo ácido-base envolvendo dois resíduos (glutamato ou aspartato)(Kulkarni, 1999).

As endo-1,4-β-xilanases pertencem ao grupo das glicosil-hidrolases (GHs). O banco de dados CAZy, agrupa as enzimas ativas à carboidratos nas seguintes classes: Glicosil hidrolase (GH); Glicosiltransferase (GT); Polissacarídeo liase (PL); Carboidrato esterases (CE) e Atividades auxiliares (AA) (Lombard et al., 2014). Dentro das GHs, as enzimas com atividade xilanolítica podem ser encontradas nas famílias GH5, GH7, GH8, GH10, GH11, GH16, GH26, GH43, GH51, GH52, GH62 e GH98 (Basu, Kumar e Shukla, 2017; Linares-Pasten, Aronsson e Karlsson, 2017). Cada família detém características específicas quanto à estrutura das dobras, mecanismo de catálise, entre outras particularidades. Baseado na homologia da sequência de aminoácidos do domínio catalítico, as xilanases são normalmente classificadas nas famílias GH10 e GH11 (Basu, Kumar e Shukla, 2017).

A família GH10 é composta por endo-1,4-β-xilanases, endo-1,3-β-xilanases e celobiohidrolases, caracterizadas por possuírem tipicamente alta massa molecular e baixo ponto isoelétrico (pI). As endo-1,4-β-xilanases são as que mais se destacam, e podem apresentar atividade não somente para a xilana, como outros substratos de celulose de baixa massa molecular, como por exemplo aril-celobiosides e certos celo-oligossacarídeos (Collins, Gerday e Feller, 2005). Membros desta família possuem uma estrutura barril $(\alpha\beta)_8$, formando uma folha-β paralela cilíndrica com o núcleo

hidrofóbico e as α-hélices formando a superfície exterior da enzima (Linares-Pasten, Aronsson e Karlsson, 2017). Já a família GH11 possui xilanases com a estrutura mais conservada quando comparada a GH10, sendo caracterizada pela massa molecular baixa (<30 kDa) e alto ponto isoelétrico (Collins, Gerday e Feller, 2005; Linares-Pasten, Aronsson e Karlsson, 2017).

As endo-1,4-β-xilanases são amplamente utilizadas na indústria, como em processos como: 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 (De Freitas, Carmona e Brienzo, 2019) e obtenção do xilitol (Venkateswar Rao et al., 2016). Devido a sua importância, alguns estudos com xilanase heterólogas são relatados na literatura, buscando identificar novas enzimas altamente eficientes para as diferentes aplicações industriais (Basu, Kumar e Shukla, 2017; Hu, Arantes e Saddler, 2011; Kandiyil et al., 2018; Zhang et al., 2011). Além da eficiência, ressalta-se a necessidade de utilizar várias enzimas de forma sinérgica para a degradação da biomassa lignocelulósica, motivo este que encarece os processos industriais e, neste contexto, as enzimas bifuncionais podem ser uma estratégia para a digestão cooperativa dos polissacarídeos das plantas (Khandeparker e Numan, 2008).

As enzimas bifuncionais são enzimas que possuem duas capacidades distintas em uma mesma cadeia polipeptídica (Vrzheshch, 2007). A origem das enzimas bifuncionais pode estar relacionada com a combinação de genes que codificam enzimas associadas, como as envolvidas nas reações sequenciais do metabolismo. Existem três tipos de enzimas bifuncionais: (a) as que realização reações consecutivas; (b) as que realizam reações não consecutivas e (c) as que realizam reações opostas (Khandeparker e Numan, 2008). Algumas xilanases bifuncionais já foram relatadas na literatura: xilanase-celulase (Pohlschröder, Leschine e Canale-Parola, 1994), xilanase-desacetilase (Čepeljnik et al., 2006), xilanase-xilanase (Zhang e Flint, 1992), xilanase-xilosidase (Basit et al., 2019) e xilanase-esterase (Dodd et al., 2009; Pai et al., 2010).

As xilanases bifuncionais podem ser aplicadas em vários setores das indústrias biotecnológicas, como na produção de bioetanol, nos processos de sacarificação e produção de açúcares fermentáveis (pentoses e hexoses) com maior eficiência (Yang

et al., 2015); inclusão nas dietas dos animais de produção, auxiliando na digestibilidade de alguns polissacarídeos complexos (Yu, McKinnon e Christensen, 2005) e na produção de xilooligossacarídeos mais eficientemente (Linares-Pasten, Aronsson e Karlsson, 2017).

### 2.4. Esterases

As esterases representam um grupo de hidrolases que realizam a clivagem e formação de ligações éster. As duas maiores classes destas enzimas são as lipases (EC 3.1.1.1, triacylglycerol hydrolases) e as esterases (EC 3.1.1.3, carboxyl ester hydrolases) (Bornscheuer, 2002). A diferença entre os dois grandes grupos está principalmente no tipo de substrato ao qual elas hidrolisam: enquanto as lipases atuam em substratos altamente insolúveis em água, triglicérides de ácidos graxos de cadeia longa, as esterases atuam em substratos de triglicérides de ácidos graxos de cadeia curta (Panda e Gowrishankar, 2005).

O banco de dados CAZy distribui este grupo de enzimas dentro das famílias (1-16) das Esterases de carboidratos (CEs) (Lombard et al., 2014). A família 1 das CE é a maior e mais diversificada dentre elas, e é composto por 5157 proteínas, sendo sua maioria de origem bacterianas (4950), até o momento (http://www.cazy.org/CE1.html). As enzimas que compõem esse grupo são acetilxilano esterases (EC 3.1.1.72), feruloil esterases (EC 3.1.1.73), carboxilesterases (EC 3.1.1.1), S-formilglutationa hidrolase (EC 3.1.2.12), diacilglicerol O-aciltransferases (EC 2.3.1.20) e trealose-6-O-micoliltransferases (EC 2.3.1.122). Possuem a estrutura terciária caracterizada por uma folha-β central com α-hélices ao entorno (Nakamura, Nascimento e Polikarpov, 2017). O sítio catalítico dessas enzimas é composto por Serina (S), Histidina (H) e Aspartato (D), a Serina é encontrada em um pentapeptídeo GXSXG, em que X é qualquer resíduo de aminoácido (Sood et al., 2018).

Existe ainda outra classificação das esterases baseada nos autores Arpigny e Jaeger (1999), a qual divide esse grupo de hidrolases em oito famílias baseado nas sequências *motif* e propriedades biológicas dessas enzimas: I (grupo das lipases verdadeiras, *motif* GHSQG), II (motif GDSL), III (grupo composto por enzimas extracelulares, motif GXSMG), IV (enzimas bacterianas semelhantes a lipase hormônio sensível (HSL) dos mamíferos, *motif* GDSAGG); V (enzimas originárias de

bactérias mesofílicas, *motif* GXSMGG), VI (esterases bacterianas de 23-26kDa, *motif* GFSQG); VII (esterases bacterianas de 55kDa, *motif* GESAG) e VIII (enzimas semelhantes a β-lactamases, *motif* GGSVG) (Arpigny e Jaeger, 1999). Além disso, devido a descoberta de novas moléculas, novos grupos estão sendo propostos baseados nesta nomenclatura, uma atualização desta classificação foi proposto por Hitch e Clavel (2019), dividindo esse grande grupo em 35 famílias (Hitch e Clavel, 2019). Isso reforça a existência de diversidade de enzimas que ainda precisam ser estudadas e caracterizadas.

Estas enzimas possuem diversas aplicações na indústria, como no processamento dos produtos de indústrias alimentícia e na indústria farmacêutica (Panda e Gowrishankar, 2005); participam de processos de bioconversão de compostos orgânicos (Lagarde et al., 2002), síntese de poliésteres (Yu et al., 2012); e despolimerização de poliéster e ácido polilático (Sood et al., 2018). Além disso, este grupo de enzimas podem ser utilizadas na despolimerização de hemiceluloses com radicais éster (pectinas e xilanas), possibilitando a solubilização de ácidos ferúlicos que podem ser convertidos em vanilina (Zhu et al., 2020), ou proporcionando maior rendimento de açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração (Houfani et al., 2020).

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo prospectar uma sequência codificadora de xilanase no metagenoma do líquido ruminal, realizar clonagem, expressão da proteína heteróloga, purificação, caracterização e cinética da enzima.

## 3.2. Objetivos específicos

- Prospectar uma xilanase do metagenoma do banco de dados LBMP;
- Realizar a expressão heteróloga em células de *E. coli;*
- Realizar a extração da proteína na fração solúvel;
- Purificar a proteína;
- Caracterizar cineticamente a enzima purificada.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. Material de trabalho

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas (LEIA) e Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), no Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/SP – UNESP. O material genético do metagenoma do líquido ruminal foi proveniente do trabalhado desenvolvido na tese do Dr. Claudio Damasceno Pavani sob orientação do Prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza, que gentilmente cedeu as amostras do DNA metagenômico. Esse metagenoma foi sequenciado e anotado pelo próprio autor, cujo pertence coleção interna de dados anotados de genomas e metagenomas do LBMP.

## 4.2. Análises de bioinformática

A sequência de xilanase foi prospectada com base em inferência de função por similaridade de sequências referências de endo-β-1,4-xilanase da família GH10 extraídas da base de dados americana do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e submetida ao banco de ortólogos eggNOG (Powell et al., 2014). A prospecção inicial foi realizada pela bioinformata Dra. Érica Mendes Lopes, utilizando o banco de dados genômicos e metagenômicos do Laboratório de Bioquímica e Microrganismos de Plantas (LBMP), no conjunto de dados do sequenciamento *Illumina HiScanSQ*, do líquido ruminal da raça Nelore (acesso dos dados públicos: SRX818104) (Pavani, 2017). As ORFs (*Open Reading Frames*) encontradas com e-value -30, foram alinhadas no CLUSTAL W (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) e verificados os domínios enzimáticos no banco Pfam (El-Gebali et al., 2019).

A seleção das sequências encontradas foi realizada com base em predições *in silico*, utilizando algoritmos e ferramentas de bioinformática: quanto à sua estrutura pela ferramenta Swiss-model (Waterhouse et al., 2018), os domínios conservados identificados pela ferramenta Pfam (El-Gebali et al., 2019), características físico-químicas da proteína identificadas pela ferramenta ProtParam (Gasteiger et al., 2005)

e a presença de peptídeo sinal pelo SignalP4.0 (Petersen et al., 2011), quando verificado a presença de peptídeo sinal, as sequências foram submetidas a modelagem do algoritmo Phyre2 (Kelley et al., 2015), modo intensivo, para verificar se a sequência predita como peptídeo sinal poderia ser removida sem causar danos para a estrutura terciária (**Tabela 1**). As sequências também foram comparadas quanto à similaridade de proteínas depositadas na base de dados do NCBI com o auxílio da ferramenta BLAST (Altschul et al., 1990). Para caracterizar os domínios presentes nas ORFs, foi realizada uma anotação pela dbCAN (Zhang et al., 2018), que utiliza apenas os domínios referenciados no banco de dados CAZy.

Tabela 1. Ferramentas de bioinformática utilizadas para as predições realizadas.

| **Ferramenta** | **Recurso oferecido** | **Referência** |
|---|---|---|
| Swiss-model | Modelagem por homologia | (Waterhouse et al., 2018) |
| Phyre2 | Modelagem intensiva | (Kelley et al., 2015) |
| Pfam | Domínios conservados | (El-Gebali et al., 2019) |
| dbCAN | Anotação dos domínios CAZy | (Zhang et al., 2018) |
| Protparam | Características físico-químicas | (Gasteiger et al., 2005) |
| SignalP4.0 | Presença do peptídeo sinal | (Petersen et al., 2011) |

### 4.3. Amplificação dos genes por PCR convencional

A construção para a ORF1374 foi realizada como está esquematizada no mapa dos plasmídeos (**Figura 1**). Foram utilizados os iniciadores *forward* 5’-TATA**gaattc**TTCGGACGCAATCCAGACACCAATCC-3’, contendo o sítio de restrição *Eco*RI, e reverse 3’-TATA**aagctt**TTACTTGAACAGCAATTGAG-5’, contendo o sítio de restrição *Hind*III.

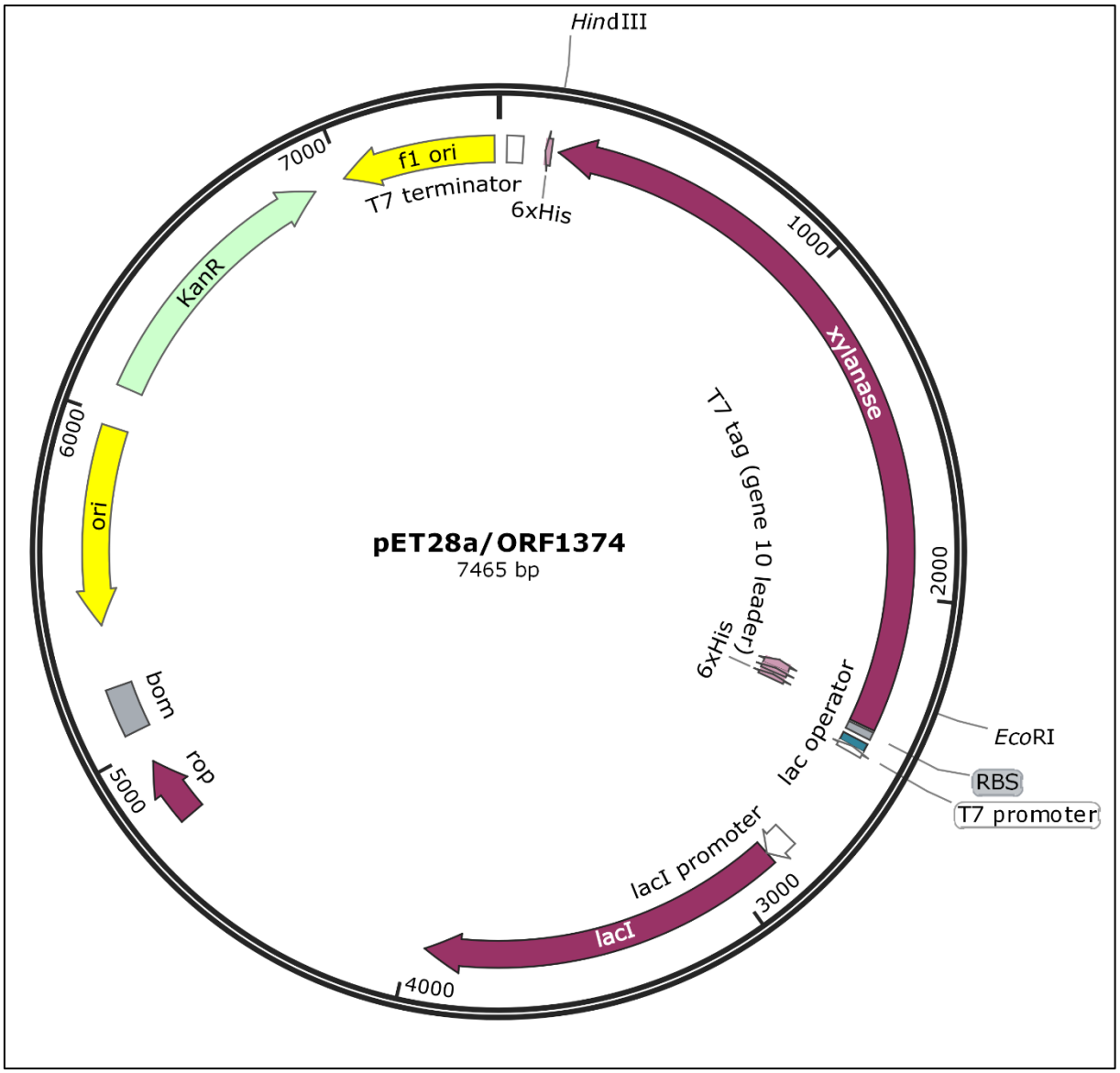



Figura 1. Mapa do plasmídeo construídos em vetor pET-28a(+) com o inserto do gene da xilanase, ORF1374. A imagem foi construída utilizando o software SnapGene versão 4.3.

A reação em cadeia da DNA-Polimerase (PCR) foi realizada em Tampão Tris.HCl 200mM, pH 8,8 contendo $(NH_4)2SO_4$ 100mM; 100mM KCl; 1% (v/v) Triton X-100, 1mg/mL de BSA; 1,4mM de $MgCl_2$; 0,2mM de dNTPs em iguais proporções, 50 ng de DNA metagenômico, 10 pmol de cada primer e 0,6U da enzima *Taq* DNA polimerase em um volume final de 20µL. As amostras foram amplificadas em termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research) seguindo o programa: 95ºC, por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 57°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C.

### 4.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisadas em eletroforese de gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo (5mg/mL) em tampão TEB (90mM Tris.HCl, 90mM Ácido Bórico e 8mM de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) dissódico. As amostras foram preparadas na proporção 1:1 (v/v) com DNA *Gel Loading Dye* e separadas através da aplicação de campo elétrico (90 V) por 1 hora em cuba de eletroforese horizontal (LCH-7×8, Loccus). O gel foi visualizado no equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad) e as imagens armazenadas e processadas pelo software ImageLab 4.1 (Bio-Rad).

### 4.5. Construção do vetor recombinante

A construção do vetor recombinante foi realizada a partir da amplificação do gene codificante da ORF1374 do DNA metagenômico, utilizando o Kit comercial 2x PCRBIO Ultra Mix (PCR Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. O fragmento obtido correspondente ao gene foi purificado pelo Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (ZymoResearch). O vetor pET28a (+) (Invitrogen) e o inserto foram restritos com as enzimas de restrição (FastDigest EcoRI Thermo Scientific e FastDigest HindIII Thermo Scientific), e defosforilado com a enzima Fast Alkaline Phosphatase (1U/ µL, Thermo Scientific). A ligação entre o inserto e o vetor foi realizada de acordo com o protocolo de Sambrook e Russel (Sambrook e Russel, 2001), utilizando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) na proporção 3:1 (inserto:vetor).

A ligação foi utilizada para a transformação em células competentes de *E. coli* BL21(DE3), utilizando 10µL da reação de ligação (vetor+inserto) e 200 µL da célula competente. A transformação foi feita por choque térmico seguindo o seguinte protocolo: 20 minutos em banho de gelo; 90 segundos a 42 °C e 2 minutos em banho de gelo. Depois de transformadas, essas células foram cultivadas em 970 µL de meio Luria-Bertani (LB, para cada litro: 10,0 g de Triptona, 5,0g de extrato de levedura e 10,0g de cloreto de sódio (NaCl) (Sezonov, Joseleau-Petit e D'Ari, 2007) e submetidas a agitação orbital de 150 rpm, a 37 °C por 90 minutos. Após o período de incubação, 100 µL da cultura foram plaqueados em meio LB sólido contendo 50mg/mL de canamicina e incubadas a 37 °C por 16 horas.

### 4.6. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento dos clones positivos foi realizado na plataforma ABI 3130xl, o protocolo da reação de sequenciamento seguiu o descrito pelo fabricante do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, utilizando-se para isso os primers T7 *forward* e T7 *reverse*. Os procedimentos foram realizados pela Dra. Camila Cesário Fernandes, na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Tecnologia, Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica – *LMSeq for sequencing* (Processo FAPESP: 2009/53984-2).

Os resultado das sequências *forward* e *reverse* de cada gene foram analisadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (Hall, 1999), através do alinhamento ClustalW (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) entre os *contigs* e o gene de referência obtido do metagenoma.

### 4.7. Ensaio de tempo e temperatura de expressão

Os ensaios de expressão foi realizado utilizando três clones positivos (confirmados por PCR e sequênciamento de Sanger). Para tanto, os clones foram cultivados em meio sólido LB contendo 50mg/mL de canamicina, que permaneceu incubado por 16 horas a 37°C. Uma colônia foi transferida para meio liquído LB contendo canamicina, e mantida em agitação de 180rpm por 16 horas a 37°C, para o preparo do pré-inoculo, e 2% deste foram adicionados em 100mL de meio liquido LB com canamicina, agitado a 180rpm, 37ºC até atingir a fase logarítmica de crescimento, com a $D.O._{600}$ de 0,4-0,6. A indução foi realizada com a adição de 0,1mM de IPTG à cultura. A expressão foi avaliada nas temperaturas de 30 e 37°C, e nos seguintes tempos: tempo 0 (T0 – antes da indução), tempo 2 (T2 – 2 horas depois da indução), tempo 4 (T4 – 4 horas depois da indução) e tempo 6 (T6 – 6 horas depois da indução), para tanto, foi aliquotado 1mL do meio de cultivo em cada tempo; as aliquotas foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000g e posteriormente visualizadas em gel de poliacrilamida a 10% pela técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

### 4.8. Extração da proteína recombinante

A enzima foi expressa em meio LB contendo 50mg/mL de canamicina e induzida com 0,1mM IPTG quando atingida a D.O.600 de 0,4-0,6, a 30°C durante 22 horas. O cultivo foi centrifugado a 10.000*g* por 30 minutos a 4°C e a extração da enzima foi realizada em Tampão Tris.HCl 20mM pH 7,5 contendo 100mM de NaCl e 10% de Glicerol e tratada com 1mg/mL de lisozima em banho de gelo por 1 hora.

As células foram rompidas por ultrassom com sonicador Branson Sonifier 250, com razão cíclica de 20% com 10 ciclos de 10 pulsos e intervalos de 10 segundos, então centrifugadas por 30 minutos a 10.000*g* a 4°C e ressuspendidas em tampão Tris.HCl 20 mM pH 7,5 contendo 100mM de Nacl e 10% de Glicerol para a obtenção do primeiro extrato. O segundo extrato foi obtido a partir do *pellet* o qual foi ressuspendido com tampão de lise (Tris.HCl 20mM pH 7,5 contendo 300mM NaCl e 10% de Glicerol) na metade do volume do primeiro extrato e submetido ao ultrassom nos mesmos parâmetros.

### 4.9. Purificação da proteína heteróloga

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, em resina Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany) e eluída na fração de 100mM de Imidazol (Sigma, Saint Louis, MO) e submetida a uma filtração em gel em coluna Hiload 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) utilizando o sistema de cromatografia ÄKTA pure (GE Healthcare, USA), o qual foi eluído num fluxo de 0,5mL/minuto em tampão Tris.HCl 20mM pH 7.5 contendo 200mM de NaCl e 5% de glicerol.

### 4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras foram previamente incubadas a 100ºC por cinco minutos em tampão Tris-HCl 62mM pH 6,8 contendo 20% glicerol, 4% SDS, 5% β-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol, e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. A separação das proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (100 V), durante 2 horas em cuba de

eletroforese vertical (Mini-Protean Tetra cell, Bio-Rad). Os géis foram corados pelo método de Azul de Comassie (0,2% comassie brillant blue, 40% metanol, 10% ácido acético) e descorados com solução descorante contendo metanol 10% e ácido acético 10%. O gel foi visualizado no equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad) e as imagens armazenadas e processadas pelo *software ImageLab* 4.1 (Bio-Rad).

### 4.11. *Western blot*

As proteínas presentes no gel de poliacrilamida 10% foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene difluoride* - PVDF, Thermo Fisher Scientific) de porosidade de 0,45µm usando Mini Trans-Blot (Bio-Rad), em tampão CAPS 10mM pH 11,0 contendo 10% de metanol, sob a voltagem de 90 V, durante 45 minutos, a 4ºC. Os locais inespecíficos foram bloqueados com fosfato salino tampão (PBS) com Tween 20 (0,02%) e 5% de leite seco sem gordura (diluição 1:1000). A membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal *Anti-polyHistidine* (H1029, Sigma, Saint Louis, MO) e o com anticorpo secundário *Anti-Mouse* IgG conjugado a Peroxidase (A9044, Sigma, Saint Louis, MO), as diluições seguiram as especificações do fabricante. A revelação foi realizada na presença de 3,3′-Diaminobenzidina tetrahidroclorito em 15 mL de PBS pH 7,6 contendo 12 µl de $H_2O_2$ 30%. A membrana foi visualizada no equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad) e as imagens armazenadas e processadas pelo software ImageLab 4.1.

### 4.12. Zimograma

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (6%) copolimerizado com 1% de *xylan from beechwood* na ausência de SDS e agentes desnaturantes, sob a voltagem constante de 100 V, durante 2 horas. A amostra foi preparada na proporção 1:1 (v/v) com o tampão Tris.HCl 62mM contendo 20% (v/v) de glicerol e 0,02%(v/v) de azul de bromofenol. Após a corrida o gel foi incubado em BOD a 37°C imerso em tampão Acetato de Sódio 0,10M pH 6,5 por 1 hora. A revelação foi realizada com a incubação com uma solução acética de vermelho congo 0,1% (w/v), e descorada com NaCl 1M para visualização do halo de degradação.

### 4.13. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada utilizando o Kit comercial (Bio-Rad Protein Assay), seguindo as recomendações do fabricante para ensaios em microplacas. Foi utilizado o soro albumina como padrão proteico.

### 4.14. Caracterização da atividade de xilanase

Para os ensaios de caracterização da atividade de xilanase foi utilizado o substrato a *Xylan from beechwood* (Megazyme, P-XYLNBE-10G).

#### 4.14.1. Determinação da atividade de xilanase

As atividades foram realizadas em microplacas para PCR 96 poços, incubadas em Termociclador PTC-100 (MJ Research), homogeneizadas em agitador tipo *vortex* e centrifugadas a 280*g* (Eppendorf centrifuge 5810 R). Para quantificar espectrofometricamente os açúcares redutores, as amostras foram transferidas para placas de microtitulação 96 poços, com diâmetro padronizado. A atividade de xilanase foi iniciada com a adição de 20 µL da enzima a 0,1mg/mL em tampão Acetato de sódio 0,10 M em pH 6,5 contendo 0,2% (w/v) de *xylan from beechwood* (Meganzyme) por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com o congelamento da placa em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer a -76°C. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de ácido-1-3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540nm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de açúcar redutor liberado por minuto por mg de proteína, sob as condições padrão de ensaio estabelecidas. Os ensaios foram realizados em triplicata, e um controle foi realizado para cada reação sem a adição de enzima para medir a hidrólise espontânea do substrato. Para quantificar a concentração dos açúcares redutores liberados, foi realizado a determinação da curva padrão de xilose pelo método de DNS (**Figura 2**).

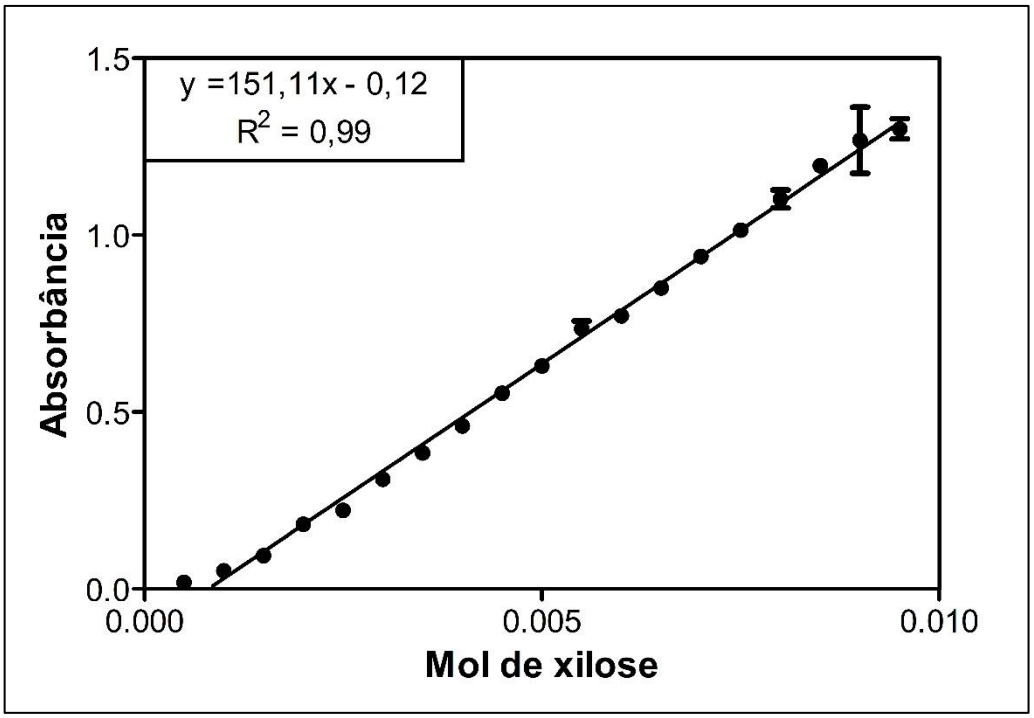



Figura 2. Curva padrão de xilose obtida com a dosagem de açúcares redutores. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

4.14.2. Efeito da temperatura

A temperatura ótima foi determinada com os ensaios submetendo a enzima ao meio reacional em diferentes temperaturas (4-95°C), utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase (tampão Acetato de sódio 0,10 M e 0,2% (w/v) de *xylan from beechwood*).

4.14.3. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada realizando uma incubação prévia na ausência do substrato nas temperaturas de 45, 50, 55 e 60ºC nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Posteriormente foi determinado os valores de atividade de xilanase, utilizando as condições estabelecidas a 37ºC.

4.14.4. Efeito do pH

O pH ótimo foi determinado variando os pH em diferentes espécies tamponantes: Acetato de sódio 0;1M (3,0-6,5), Tris.HCl 0,1M (6,5-7,5) e AMPOL 0,1M (8,5-10), utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase.

4.14.5. Efeito de íons metálicos

O efeito dos íons $Co^{+2}$, $Cu^{+2}$, $Hg^{+2}$, $Mg^{+2}$, $Mn^{+2}$, e $Zn^{+2}$ foram avaliados nas concentrações finais de 1,2,3,4 e 5 mM no meio reacional, utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase. A atividade relativa foi calculada a partir do controle adicionado em cada ensaio, sem a adição dos íons (100%).

4.14.6. Efeito de solventes orgânicos

O efeito dos solventes orgânicos metanol, etanol, propanol e Dimetilsulfóxido (DMSO) foi avaliado nas concentrações finais de 5, 10, 20 e 40% (v/v) no meio reacional, utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase.

4.14.7. Efeito de detergentes

O efeito dos detergentes Triton X-100, Triton X-114, Tween20 e Tween80 foi avaliado nas concentrações finais de 0,5, 1 e 2% (v/v) no meio reacional, utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase.

4.14.8. Efeito do NaCl

O efeito do NaCl foi avaliado nas concentrações finais de 0,1 a 2M de NaCl no meio reacional, utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase. A atividade relativa foi calculada a partir do controle adicionado em cada ensaio, sem a adição do NaCl (100%). A exposição da enzima ao NaCl foi avaliada adicionando a enzima na proporção de 1:1 (v/v) a soluções de NaCl (0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5M) nos tempos 0, 2, 4 e 8 horas, utilizando as condições estabelecidas para a determinação da atividade de xilanase. A atividade relativa foi calculada a partir do controle adicionado em cada ensaio, sem a adição da solução de NaCl (100%).

## 4.15. Determinação da atividade de esterase

A atividade de esterase foi determinada de modo descontínuo em espectrofotômetro a 405 nm. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL da enzima a 0,1mg/mL em tampão Acetato de sódio 0,1M pH 6,5 e 1mM de *p*-nitrofenil-acetato

por 15 minutos a 37°C. A afinidade pelo substrato foi determinada utilizado os substratos (1mM, Sigma): p-nitrofenil acetato, p-nitrofenil butirato, p-nitrofenil valerato, p-nitrofenil octanoato, p-nitrofenil dodecanoato, p-nitrofenil miristato, p-nitrofenil palmitato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol p-nitrofenol liberado por minuto por mg de proteína, sob as condições padrão de ensaio estabelecidas. Os ensaios foram realizados em triplicata e um controle foi realizado para cada reação sem a enzima para medir a hidrólise espontânea do substrato.

### 4.16. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros catalíticos $K_m$ (constante de Michaellis-Menten), $V_{max}$ (velocidade máxima da reação), kcat (constante catalítica) e $kcat.K_m^{-1}$ (eficiência catalítica) foram determinados para a atividade de endo-β-1,4-xilanase com substrato *xylan from beechwood* variando a concentração de 0,025 a 2,5 mg/mL. Para a atividade da esterase foi utilizado o *p*-nitrofenil acetato variando a concentração de 0,75 a 5mM. Os dados foram testados pelo teste F ($p<0,05$) quanto ao melhor modelo cinético $H_0$=Michaelis-Menten e $H_1$=sigmoidal. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk W. O teste de hipótese e a regressão não linear dos dados pela equação de Michaelis-Menten foi realizada pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.00 para Windows).

# 5. RESULTADOS

## 5.1. Análises *in silico*

A partir da abordagem *sequence-driven* foi prospectado um gene de endo-1,4-β-xilanase no metagenoma de rúmen (SRX818104), a ORF1374. A comparação com proteínas depositadas na base de dados do NCBI com o auxílio da ferramenta BLASTp (Altschul et al., 1990), demonstrou que a sequência possui 64% de similaridade com a enzima endo-1,4-β-xilanase/feruloil esterase do organismo *Prevotella ruminicola* (**Tabela 2**) e 66% de similaridade com um patente dos Estados Unidos de 2015, denominada "*Hemicellulose-degrading enzymes*" (US 9012186). As características preditas pelas ferramentas disponíveis (**Tabela 3**), indicaram a presença de peptídeo sinal de 21 resíduos de aminoácidos no N-terminal e massa molecular predita de 81,6kDa (Gasteiger et al., 2005).

Tabela 2. Análise de similaridade compartilhada da ORF1374 com as coleções disponíveis do NCBI.

| ***Coleções do NCBI*** | **ORF1374** |
|---|---|
| *non-redundant* | 74% de similaridade com a proteína hipotética da família GH10 do organismo *Bacteroidales bacterium*, query cover 99%<br>N° de acesso: PWL58549.1 |
| *Swissprot* | 64% de similaridade com a enzima endo-1,4-β-xylanase/ feruloylesterase do organismo *Prevotella ruminicola* 23, *query cover* de 99%<br>N° de acesso: D5EY13.1 |
| *Pat* | 66% de similaridade e 99% de *query cover* com uma patente do EUA.<br>N° de acesso: AKY00390.1 |

Tabela 3. Características preditas da ORF1374.

| ***Características teóricas*** | |
|---|---|
| Tamanho da sequência (pb) | 2196 |
| Presença de peptídeo sinal (SignalP 4.0) | Sim (1-21) |
| Domínios (Pfam) | GH10, esterase |
| Massa molecular predita (kDa) | 81,6 |
| pI teórico | 6,2 |

A anotação dos domínios conservados pelo dbCAN demonstrou a presença dos domínios GH10 e CE1 (**Figura 3**). A predição da estrutura secundária e alinhamento múltiplo, demonstraram alta similaridade em regiões conhecidas por serem conservadas entre proteínas pertencentes à xilanases GH10, as sequências correspondentes a $_{157}$WDVVNEA$_{163}$ e $_{280}$TELD$_{283}$, nessas regiões os dois resíduos de glutamato conservados (**Figura 4**). Quanto o domínio esterase, foi verificado a presença do *motif* $_{624}$GLSMG$_{628}$, possuindo como central a Serina (**S**) nesta região conservada (**Figura 5**).

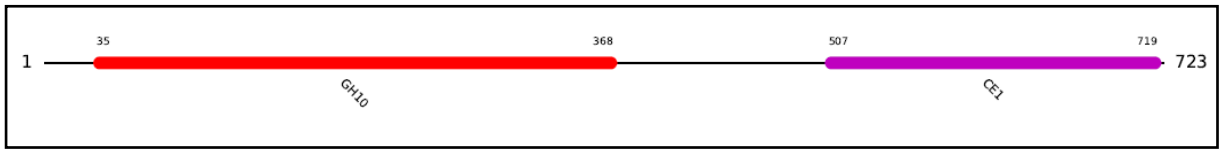



Figura 3. Domínios anotados para a ORF1374 pela ferramenta dbCAN. Fonte: Gerado pela ferramenta dbCAN (Zhang et al., 2018). Legenda: Glicosil hidrolases (GH); Carboidrato esterases da família 1 (CE1).

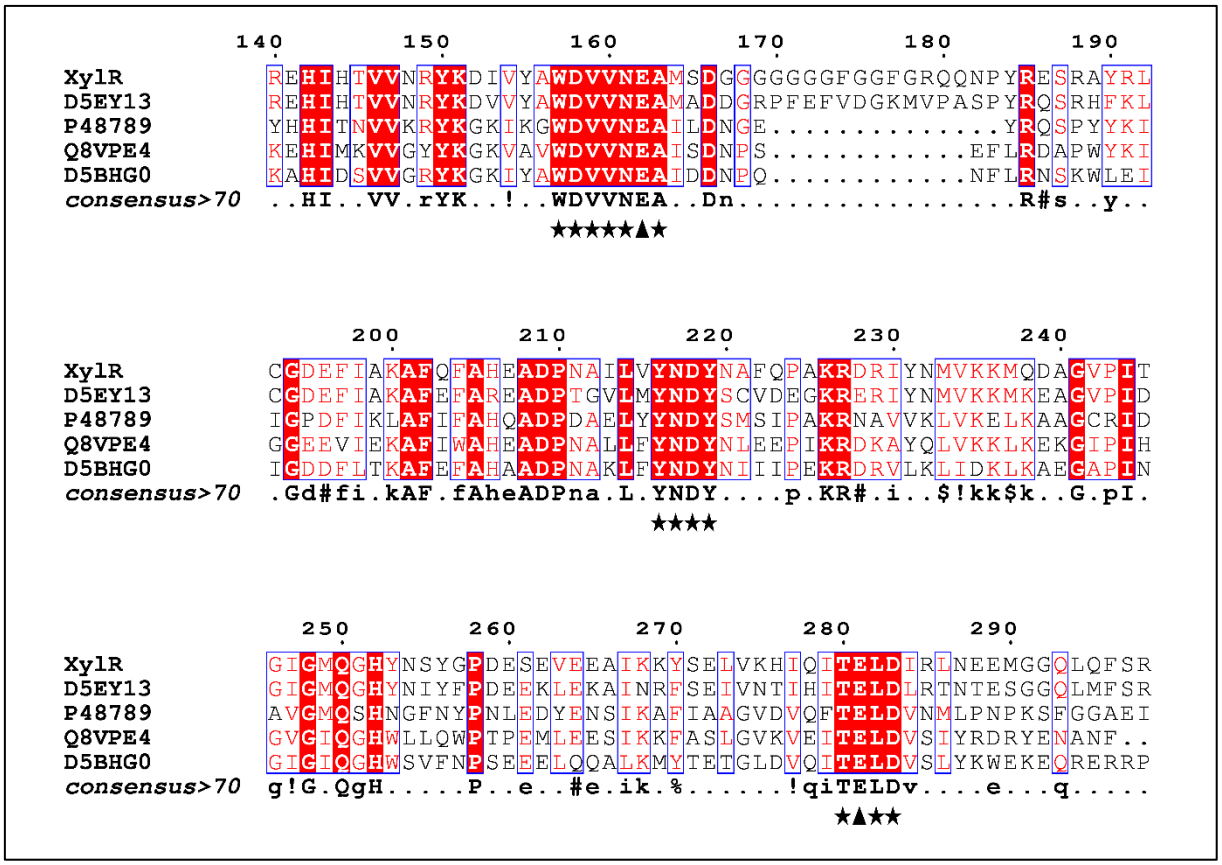



Figura 4. Fragmento do múltiplo alinhamento entre a sequência de aminoácidos da XylR e xilanases pertencentes a GH10. As regiões conservadas estão marcadas com ★, os resíduos catalíticos conservados de glutamato (E) estão destacados com ▲. O alinhamento inclui as sequências de xilanase de *Prevotella ruminicola* (D5EY13), *Prevotella ruminicola* (P48789), *Zunongwangia profunda* (ADF53358) e de uma bactéria não cultivável (AAL06078). Aminoácidos idênticos e semelhantes são destacados em vermelho ou coloridos em vermelho, respectivamente. Imagem construída pelo alinhamento múltiplo pela ferramenta Clustal Omega (Sievers et al., 2011) e montagem no EsPript 3.0 (Robert e Gouet, 2014).

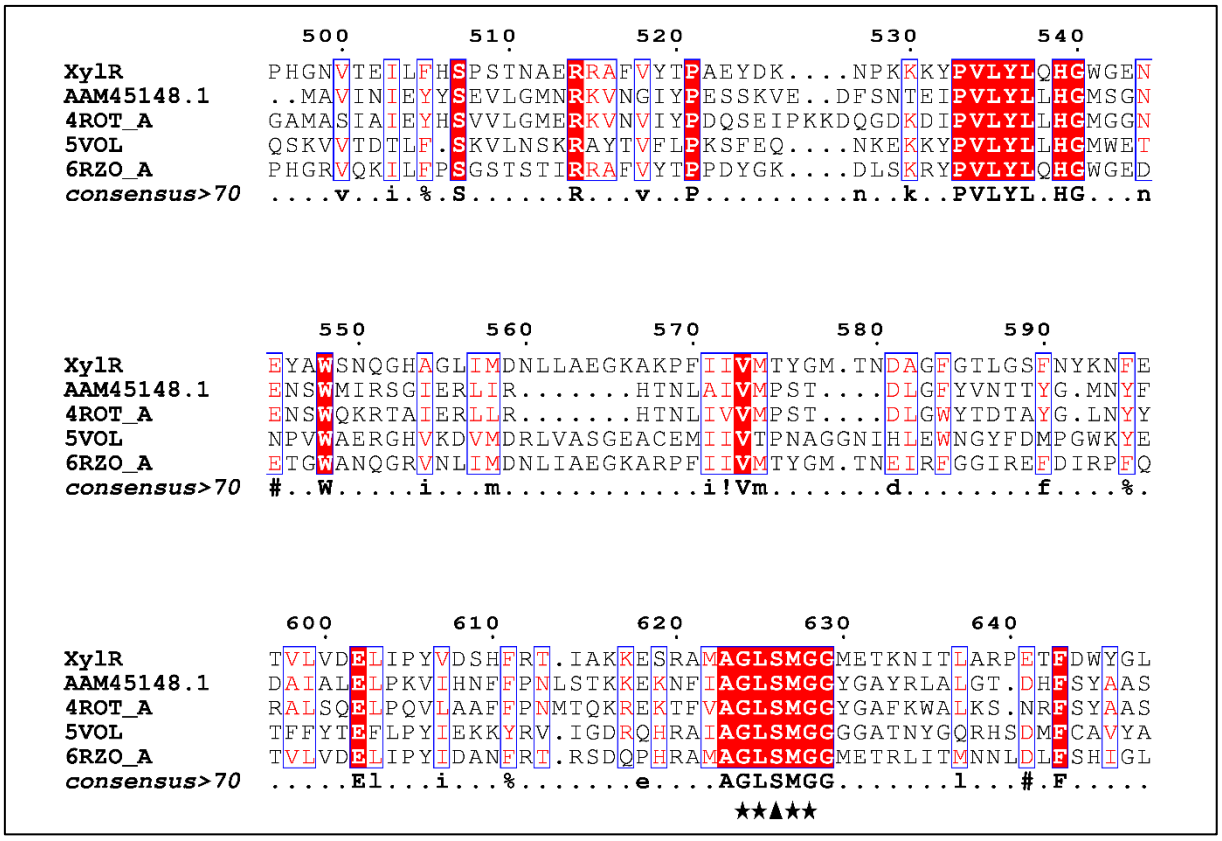



Figura 5. Fragmento do múltiplo alinhamento entre a sequência de aminoácidos da XylR e esterases da família CE1. As regiões conservadas estão marcadas com ★, o resíduo catalítico conservado de serina (S) está destacado com ▲. O alinhamento inclui as sequências de esterases de *Lactococcus lactis* (AAM45148), *Bacteroides intestinalis* DSM 17393 (5VOL), *Streptococcus pyogenes* (4ROT) e de uma bactéria não cultivável (6RZO). Aminoácidos idênticos e semelhantes são destacados em vermelho ou coloridos em vermelho, respectivamente. Imagem construída pelo alinhamento múltiplo pela ferramenta Clustal Omega (Sievers et al., 2011) e montagem no EsPript 3.0 (Robert e Gouet, 2014).

## 5.2. Clonagem e expressão

A sequência da ORF1374 foi amplificada a partir do DNA metagenômico do líquido ruminal, clonado em vetor pET28a(+) e transformado em *E. coli* BL21(DE3). A validação dos clones positivos foi realizada pela PCR à partir do DNA extraído dos plasmídeos (**Figura 6**) e Sequenciamento de Sanger.

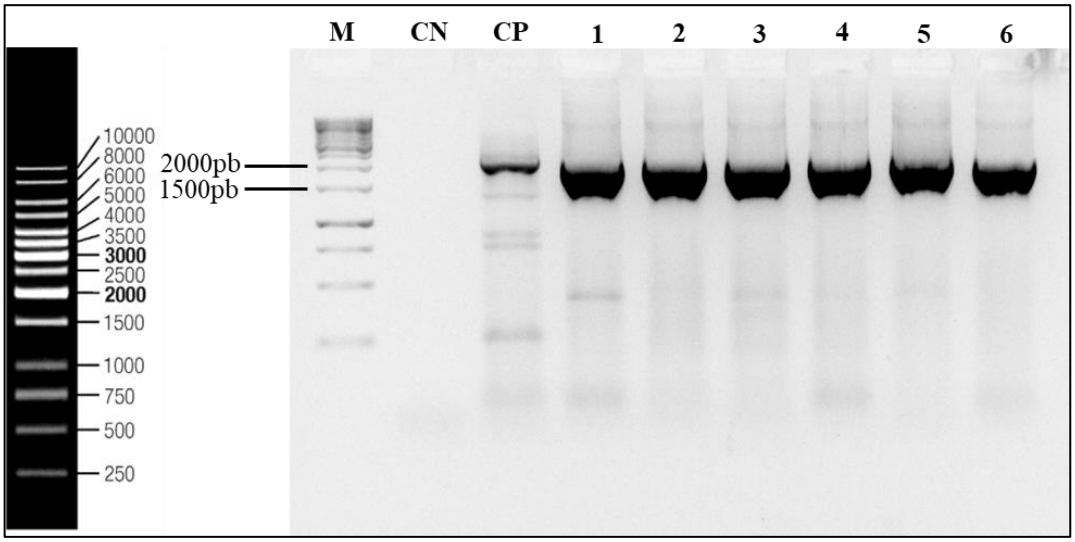



Figura 6. Perfil eletroforético dos fragmentos de interesse da ORF1374 amplificados por PCR a partir do DNA purificado obtido das colônias transformadas, visualização em gel de agarose 1,5%. As imagens foram construídas utilizando o software ImageLab 4.1. Legenda: (M) Marcador Gene Ruler 1Kb DNA ladder; (CN) Controle negativo (reação com água); (CP) Controle Positivo (reação com o DNA metagenômico); (1) Clone 1; (2) Clone 2; (3) Clone 3; (4) Clone 8; (5) Clone 10; (6) Clone 14.

Os testes de expressão realizados com três clones positivos, em diferentes temperaturas e tempos de incubação, confirmaram a expressão da proteína recombinante (**Figura 7**), devido a banda evidenciada após a indução com IPTG, ser de aproximadamente 75kDa, valor muito próximo a massa molecular predita pela ferramenta ProtParam (Gasteiger et al., 2005) 81,6kDa. As condições ótimas para a expressão da enzima solúvel em *E. coli* BL21(DE3) foi obtida com a concentração final de IPTG a 0.1mM, cultivadas a 30°C por 22 horas a 180rpm.

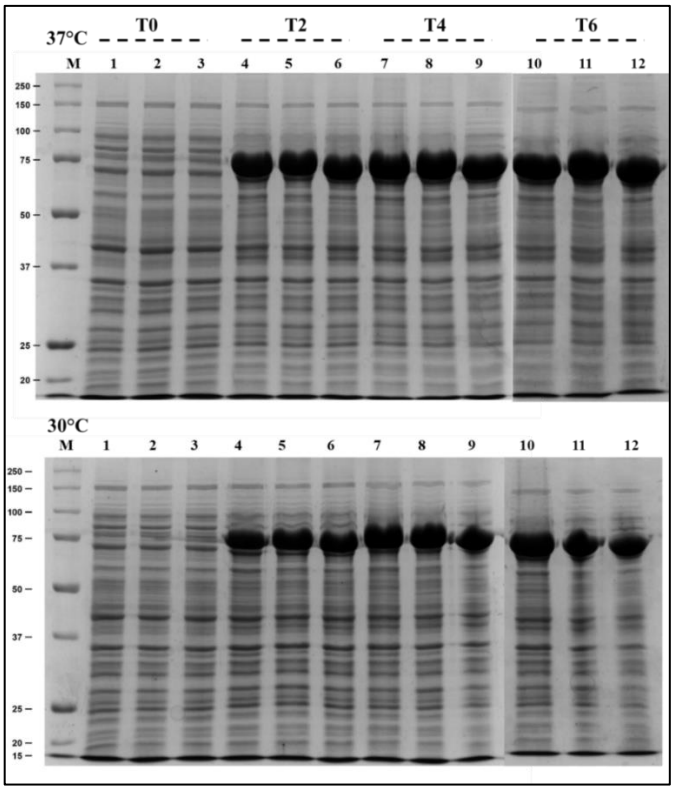



Figura 7. Perfil eletroforético do extrato celular total das bactérias *E. coli* BL21 transformadas em vetor pET28a/ORF1374 em diferentes temperaturas de expressão. As imagens foram construídas utilizando o software ImageLab 4.1. Legenda: (T0) Tempo antes da indução; (T2) Após 2 horas de indução; (T4) Após 4 horas de indução; (T6) Após 6 horas de indução. Canaletas: (M) Marcador Precision Plus (Bio-rad); (1), (4), (7) e (10) Clone 1; (2), (5), (8) e (11) Clone 2; (3), (6), (9) e (12) Clone 3.

A purificação da enzima foi realizada pela cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (**Figura 8**) e, posteriormente pela cromatografia de filtração em gel, visando remover os possíveis contaminantes da amostra. A partir do cromatograma foi possível predizer a massa molecular da enzima em 76,3kDa (**Figura 9 A**), através de uma análise de regressão linear obtida entre a constante de eluição ($K_{av}$) e o log do tamanho molecular do padrão (Protein Standard Mix 15±600 kDa, Sigma, St. Louis, MO, USA) e da própria enzima. A verificação da expressão e purificação da enzima recombinante foi confirmada pela técnica de *western blot* (**Figura 9 B**). Ao final das etapas de purificação, obteve-se a concentração de 4,3mg/mL de proteína pura (**Tabela 4**), a enzima purificada obtida da expressão heteróloga foi nomeada de XylR (xilanase obtida do rúmen).

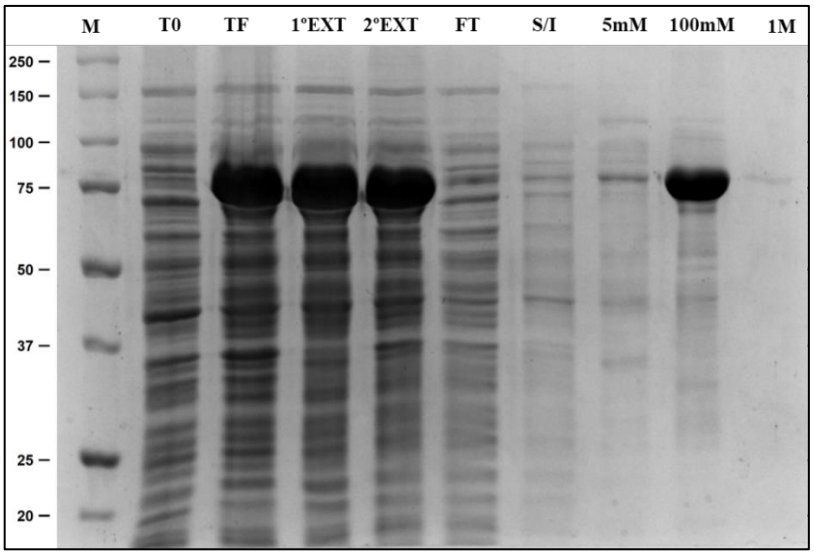



Figura 8. Perfil eletroforético da purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA da extração de proteínas solúveis das bactérias *E. coli* BL21 transformadas em vetor pET28a/ORF1374. Canaletas: (M) Marcador Precision Plus; (T0) Tempo antes da indução; (TF) Após 22 horas da indução; (1ºEXT) Primeiro extrato; (2ºEXT) Segundo Extrato; (FT) "*Flow through*"; (S/I) Fração sem imidazol; (5mM) Fração com a concentração de 5mM de imidazol; (100mM) Fração com a concentração de 100mM de imidazol; (1M) Fração com a concentração de 1M.

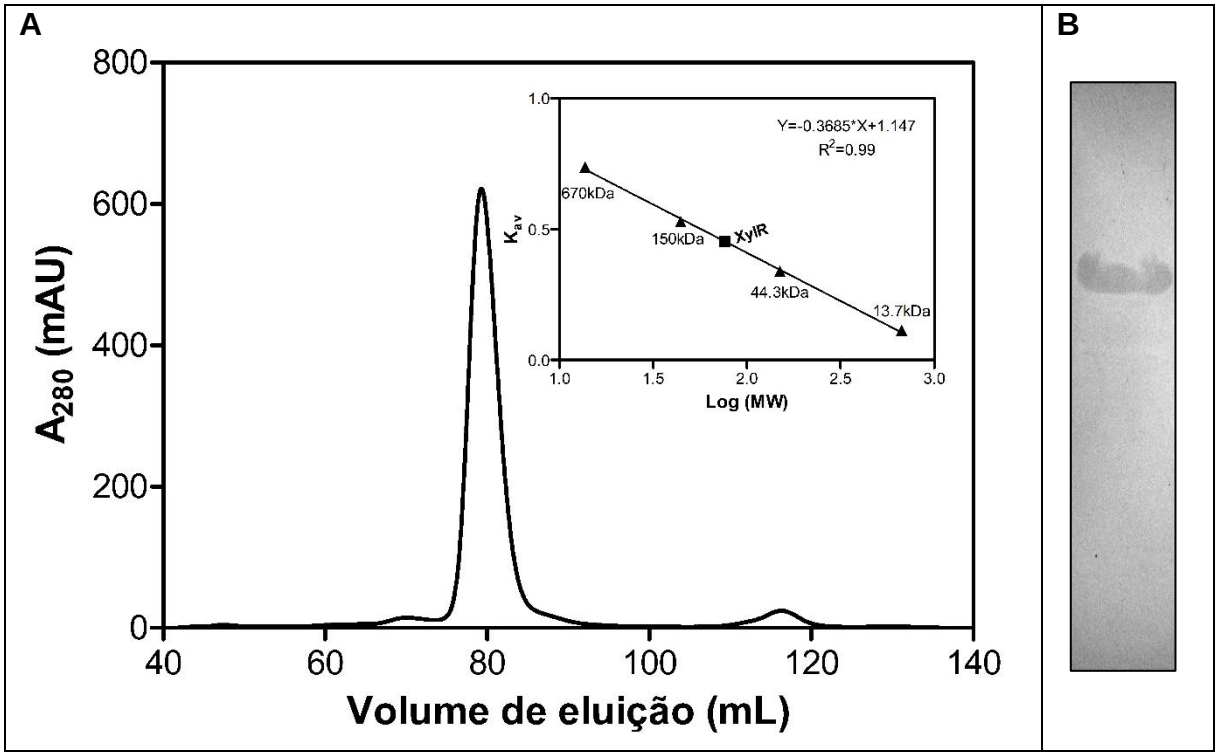



Figura 9. (A) Cromatograma da XylR purificada por filtração em gel, utilizando a coluna Hiload 16/600 Superdex 200, fluxo de 0,7mL/minuto. Imagem interna corresponde a regressão linear da cromatografia utilizando o padrão *Protein Standard Mix* 15±600 kDa. Imagem construída pelo software GraphPad Prism versão 5.00. (B) Detecção da XylR utilizando a técnica de *western blot* com anticorpos anti-$His_6$. Imagem construída pelo software ImageLab 4.1. Legenda: Imagem gerada pelo software ImageLab 4.1. Notas: O padrão Protein Standard Mix 15 ± 600 kDa, possuía as seguintes proteínas: Tireoglobulina bovina (670kDa); γ-globulina de sangue bovino (150kDa); Albumina de ovo de galinha fração VI (44,3kDa) e Ribonuclease A (13,7kDa).

Tabela 4. Concentração de proteína (mg/mL) nas diferentes etapas de purificação da XylR.

| Etapas da Purificação | Frações em cada etapa | Rendimento mg/mL |
|---|---|---|
| Extração | 1° Extrato | 6,88 |
| | 2° Extrato | 4,80 |
| | *Pellet* | 5,20 |
| Purificação pela cromatografia de afinidade Ni-NTA | FT | 2,5 |
| | S/Imidazol | 0,6 |
| | 5mM | 0,4 |
| | 100mM | 3,5 |
| | 1000M | 0,1 |
| Filtração em gel | Pico 20 | 0,3 |
| | Pico 21 | 3,6 |
| | Pico 22 | 5,3 |
| | Pico 23 | 2,3 |
| | Pico 24 | 0,3 |
| ***Amostra final*** | | ***4,3*** |

### 5.3. Caracterização da atividade de xilanase

A XylR apresentou atividade de endo-1,4-β-xilanase e de esterase principalmente para ésteres de cadeia curta (**Figura 10**). As propriedades catalíticas foram determinadas pelas constantes cinéticas ($K_m$, $V_{max}$, kcat e kcat/$K_m$) utilizando os substratos *xylan from beechwood* e *p*-nitrofenil acetato respectivamente (**Tabela 5**) e demonstraram uma eficiência catalítica maior para a atividade xilanase do que para a esterase. O teste de hipótese comparativo entre o modelo cinético de Michaelis-Menten e a cinético sigmoidal, demonstrou que a enzima se ajustou mais ao modelo *michaeliano* em relação aos substratos analisados (*xylan from beechwood* p=0,1; *p*-nitrofenil acetato p= 0,5).

Tabela 5. Valores dos parâmetros cinéticos calculados. Os valores estão representados em média±desvio padrão.

| Substratos | $V_{max}$ (µmol/min/mg) | kcat ($s^{-1}$) | $K_m$ (mM) | Kcat/$K_m$ ($mM^{-1}$ $s^{-1}$) | $K_m$ (mg/mL) | Kcat/$K_m$ (mg $mL^{-1}$ $s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Xylan from beechwood* | 30959±2334 | 2323±175,1 | 3,2±0,6 | 726,0 | 1,04±0,18 | $2,23x10^3$ |
| *p*-nitrofenil acetato | 66,0±5,2 | 5,0±0,4 | 2,3±0,4 | 2,2 | - | - |

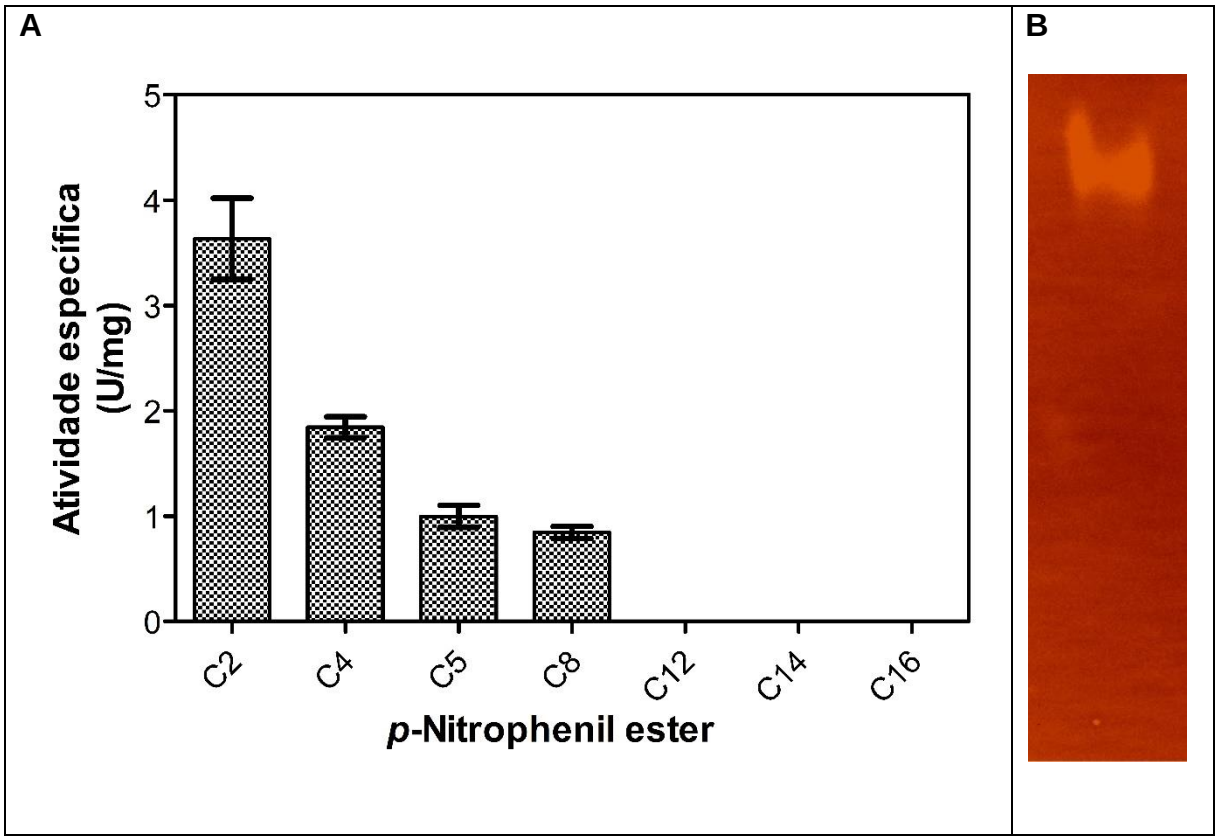



Figura 10. Atividade da XylR em diferentes substratos. **(A)** Afinidade da XylR por ésteres de diferentes carbonos. Os valores estão representados em média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00. **(B)** Zimograma para a atividade de endo-1,4-β-xilanase obtido em gel de poliacrilamida 6% copolimerizado com *xylan from beechwood*. Legenda: (C2) *p*-nitrofenil acetato, (C4) *p*-nitrofenil butirato, (C5) *p*-nitrofenil valerato, (C8) *p*-nitrofenil octanoato, (C12) *p*-nitrofenil dodecanoato, (C14) *p*-nitrofenil miristato e (C16) *p*-nitrofenil palmitato.

5.3.1. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a XlyR mostrou que a faixa ótima de pH de hidrólise ocorre no tampão Acetato de sódio 0,1 M nos pH 5,5 a 6,5, enquanto o pH ótimo observado foi em 6,5 (**Figura 11**).

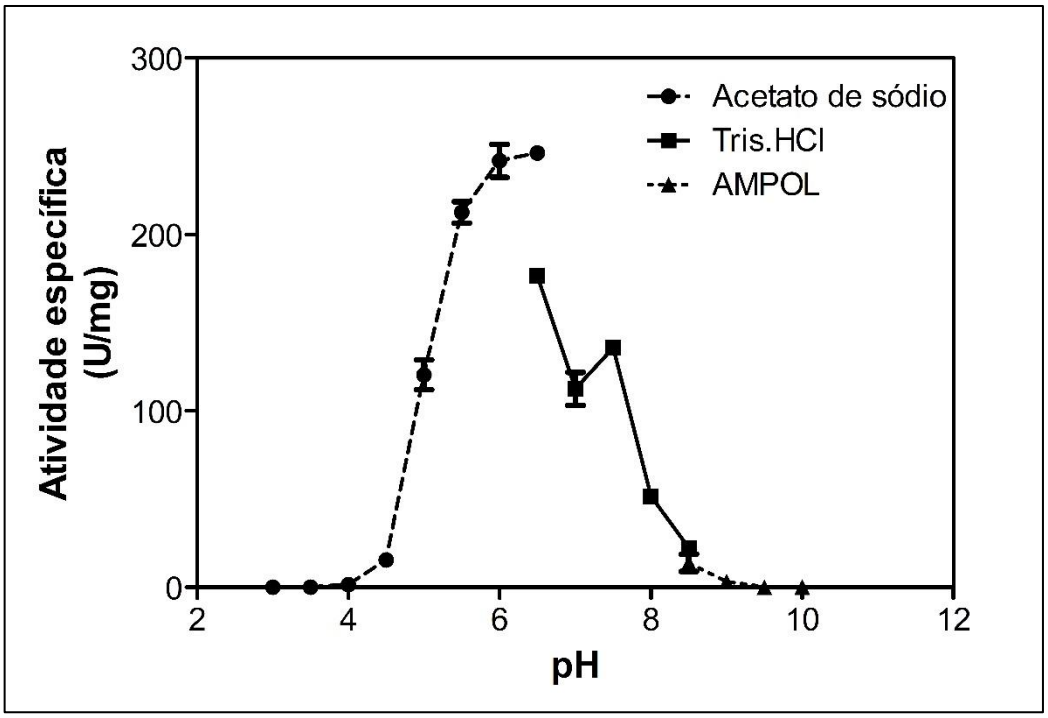



Figura 11. Atividade relativa em diferentes pH e espécies iônicas. Os valores estão representados em média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

5.3.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura mostrou maior atividade em 37°C, porém entre os valores de 30 a 45°C a enzima manteve cerca 80% de sua atividade (**Figura 12**).

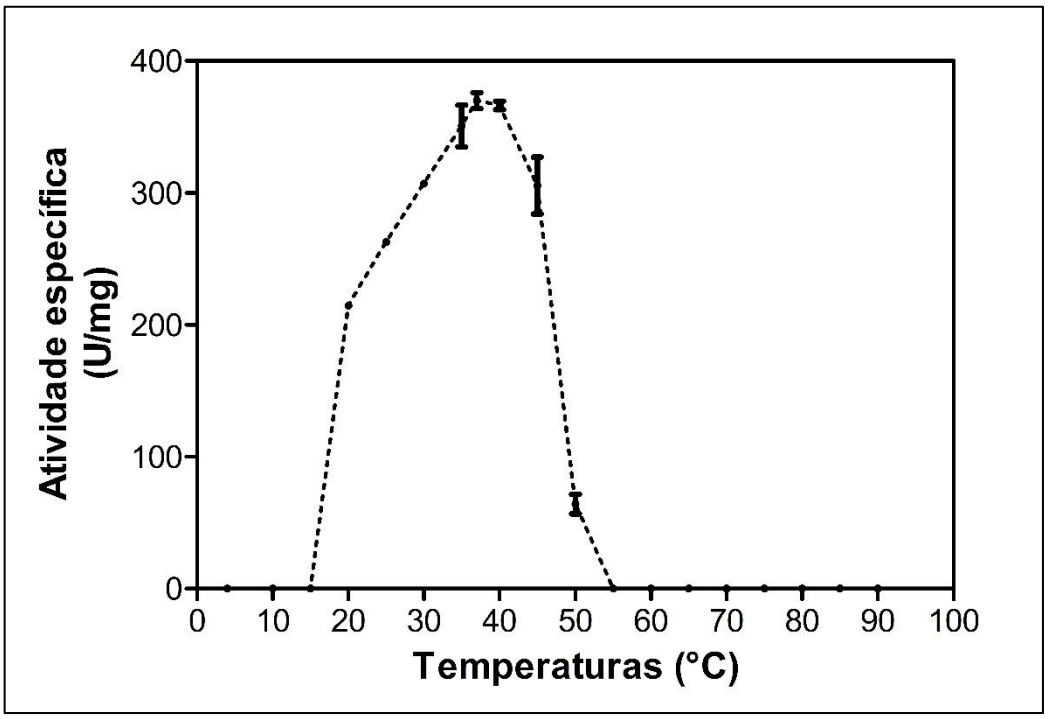



Figura 12. Atividade relativa em diferentes temperaturas. Os valores estão representados em média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

5.3.3. Estabilidade térmica

A enzima se manteve estável quando submetida a tratamentos térmicos de 45 e 50°C por até uma hora (**Figura 13**).

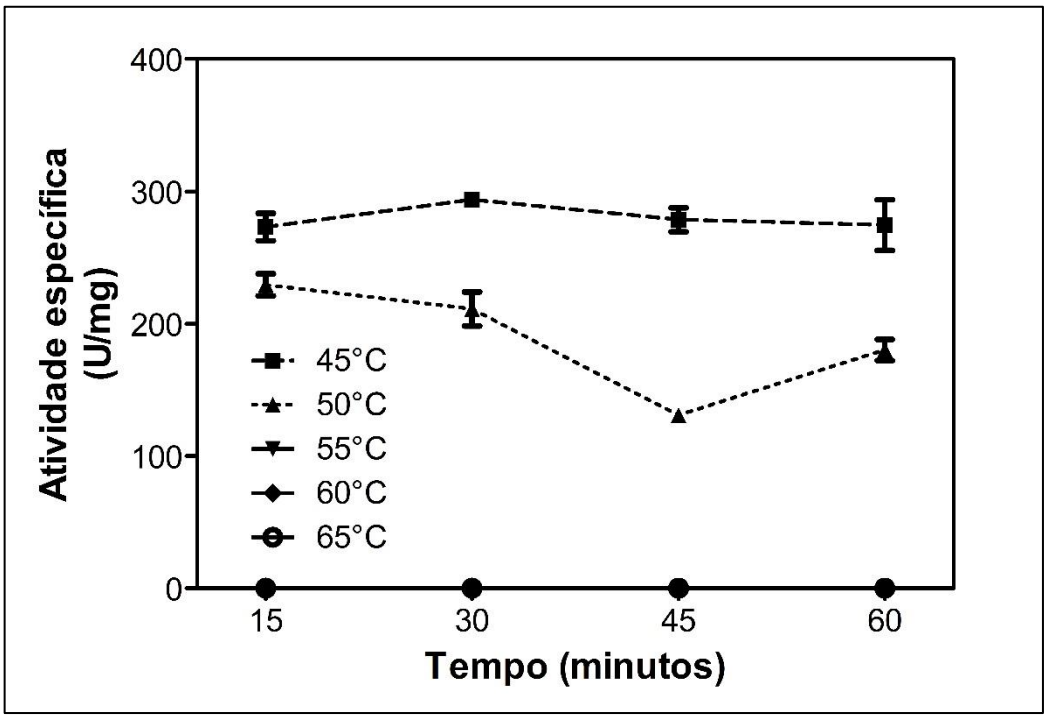



Figura 13. Estabilidade da enzima em tratamentos térmicos de 45 e 65°C por até 60 minutos. Os valores estão representados em média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

## 5.4. Efeito de íons metálicos, sal, solventes e detergentes

### 5.4.1. Efeito de íons metálicos

O efeito de diferentes íons metálicos e EDTA (1 a 5mM) na atividade da XylR é mostrado na **Tabela 6**. Na presença do íon $Mn^{+2}$ houve aumento da atividade, enquanto para os íons $Ca^{+2}$ e $Mg^{+2}$ a enzima apresentou ser estável, conservando sua atividade em 85%. Na presença do $Co^{+2}$ em concentrações superiores a 4mM, a enzima apresentou inibição de 60% da atividade. Os íons $Zn^{+2}$, e $Hg^{+2}$ e o $Cu^{+2}$ inibiram completamente a atividade enzimática. Na presença do EDTA, um agente quelante, que forma complexos estáveis com íons metálicos, não acarretou inibição na atividade enzimática.

Tabela 6. Efeito dos íons metálicos, detergentes e solventes orgânicos na atividade da XylR. Os valores estão representados em porcentagem média±desvio padrão.

| **Íons metálicos (mM)** | **Atividade relativa (%)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **$MnCl_2$** | 167,8±3,2 | 161,5±2,8 | 145,7±11,4 | 135,8±4,0 | 137,6±3,0 |
| **$MgCl_2$** | 98,0±2,3 | 100,7±2,7 | 95,0±0,4 | 97,8±1,3 | 89,2±2,9 |
| **$MgSO_4$** | 94,1±3,0 | 91,0±3,9 | 71,0±16,6 | 76,7±8,1 | 88,7±1,7 |
| **$CaCl_2$** | 97,5±0,5 | 99,9±0,8 | 97,1±2,9 | 93,9±1,2 | 95,4±2,0 |
| **$CoCl_2$** | 82,4±1,6 | 74,7±2,5 | 103,0±0,6 | 69,0±0,1 | 39,5±1,2 |
| **$ZnSO_4$** | 3,1±2,0 | 1,3±1,1 | nd | nd | nd |
| **$ZnCl_2$** | 4,7±2,1 | Nd | nd | nd | nd |
| **$HgCl_2$** | 3,5±0,1 | 4,8±0,7 | 4,3±0,5 | nd | nd |
| **$CuSO_4$** | 0,3±0,1 | Nd | nd | nd | nd |
| **EDTA** | 107,2±2 | 106,3±1,5 | 100,6±2,6 | 96,7+3,2 | 110,2±3,5 |

Legenda: nd=não detectado.

### 5.4.2. Efeito de detergentes e solventes

A presença dos solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol e DMSO) nas concentrações estudadas (5 a 40%) acarretou efeitos inibitórios na atividade enzimática apenas em concentrações superiores a 20% (v/v) (**Figura 14**). A enzima se manteve estável na presença dos detergentes (Triton X-100, Triton X-114, Tween20 e Tween80) nas concentrações estudadas (0,5 a 2%), exceto para o Tween80 a 2% que acarretou inibição de 60% da atividade enzimática.

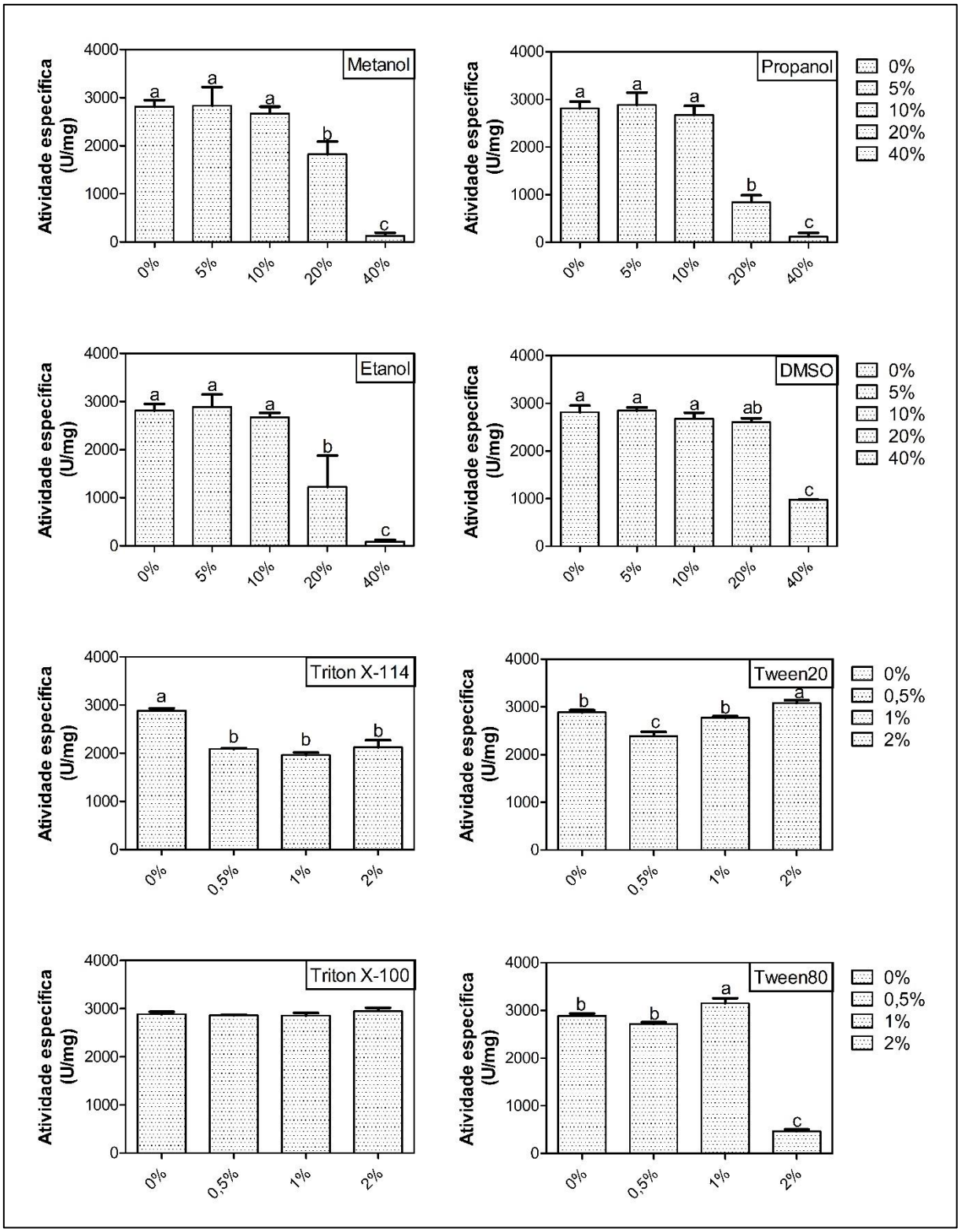



Figura 14. Efeito de solventes orgânicos e detergentes sobre a atividade da XylR. Os valores estão representados em média±erro padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00. Legenda: As letras minúsculas (a, b, c,… i) indica a diferença significativa entre cada condição testada no experimento, de acordo com a ANOVA e teste de Tukey com 5% de probabilidade.

5.4.3. Efeito do NaCl

O efeito da concentração de NaCl na atividade da XylR demonstrou que a enzima conserva 85% de sua atividade em concentrações de até 2M (**Figura 15**), além disto, quando exposta ao NaCl em concentrações de até 2.5M (concentração final da reação) em até 4 horas, a enzima demonstrou ser ativa em 80%, enquanto a 8 horas apresentou 50% de atividade enzimática comparado ao controle (**Figura 16**). Este comportamento sugere que a XylR é tolerante a presença de NaCl em concentrações de até 2,5M.

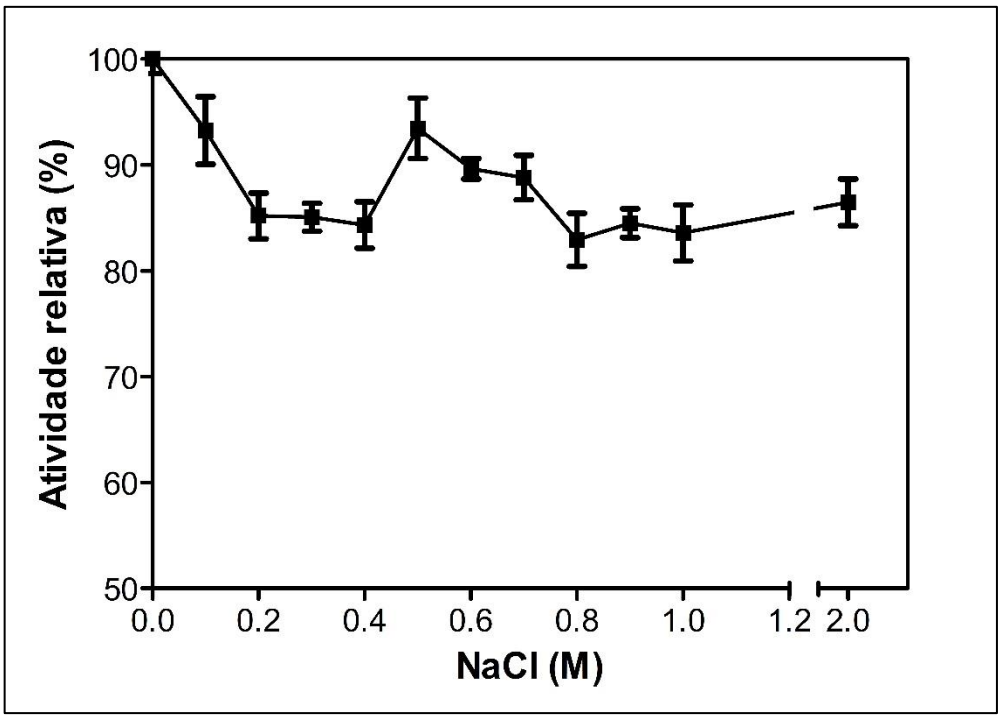



Figura 15. Atividade da xilanase na presença de NaCl no meio reacional nas concentrações de 0,1 a 2M. Os valores estão representados em porcentagem média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

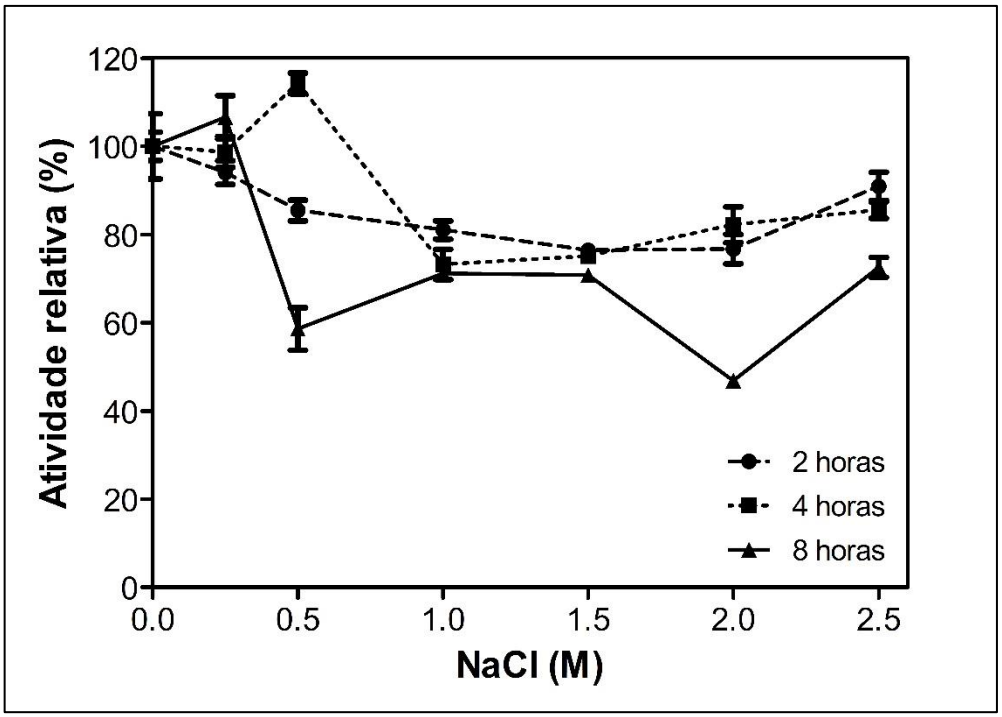



Figura 16. Atividade residual após a exposição da enzima ao NaCl nas concentrações de 0,1 a 2,5M por até 8 horas em temperatura ambiente. Os valores estão representados em porcentagem média±desvio padrão. A imagem foi construída utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi identificada e caracterizada uma xilanase bifuncional tolerante ao NaCl e a solventes orgânicos, obtida a partir do DNA metagenômico do líquido ruminal. A XylR é uma enzima com possíveis aplicações na degradação das heteroxilanas que possuem radicais éster podendo ser utilizadas em diversas aplicações do setor biotecnológico.

O gene compartilha 64% de similaridade com endo-1,4-β-xylanase/feruloylesterase de *Prevotella ruminicola* (**Tabela 2**), uma bactéria gram-negativa e pertencente ao gênero mais abundante nos rumens das espécies bovinas (Kishi et al., 2015). A presença dos dois resíduos de glutamato (**Figura 4**), nas sequências conservadas $_{157}$WDVVNEA$_{163}$ e $_{280}$TELD$_{283}$, reforçam o mecanismo de catálise característico da família GH10, o qual se baseia na retenção da configuração β do carbono anomérico (Collins, Gerday e Feller, 2005), e sinalizam a presença do sítio ativo da enzima bem como a conservação destas sequências nas diferentes espécies (Liao et al., 2015; Mirande et al., 2010). A presença de serina na região conservada GX**S**XG sinaliza o sítio ativo característico das carboxilesterases (Nakamura, Nascimento e Polikarpov, 2017). Dentro da classificação das carboxilesterases de Arpigny e Jaeger a presença do $_{624}$GLSMG$_{628}$ (**Figura 5**) indica que ela é uma esterase pertencente à família V (Arpigny e Jaeger, 1999).

A clonagem foi realizada sem o peptídeo sinal predito pelo SignalP4.0 (Petersen et al., 2011) e a confirmação da clonagem foi realizada pelo sequenciamento de Sanger. A remoção do peptídeo sinal otimizou o procedimento de obtenção da enzima na fração solúvel em células de *E. coli* BL21(DE3), a qual foi purificada e a expressão heteróloga confirmada pela técnica de *western blot*. A XylR apresentou as atividades de endo-β-1,4-xilanase e esterase (**Figura 10**), confirmando as predições teóricas dos domínios conservados da enzima, e caracterizando-a como bifuncional.

Os valores das constantes cinéticas (**Tabela 5**) pelo substrato *xylan from beechwood* indicam alta eficiência da XylR na degradação da xilana (2230 mg mL m$^{-1}$), quando comparado com aquelas isoladas e caracterizadas de espécies como

*Thermotoga thermarum* (289 mg $mL^{-1}$ $s^{-1}$) (Shi et al., 2014), *Remersonia thermophila* CBS 540.69 (417,4 mg $mL^{-1}$ $s^{-1}$) (McPhillips et al., 2014) e *Bacillus* sp. SN5 (142,6 mg $mL^{-1}$ $s^{-1}$) (Bai et al., 2012). A afinidade pelo *p*-nitrofenyl acetate indica que a XylR possui atividade esterásica, capaz de hidrolisar pequenas moléculas contendo ligação éster (Arpigny e Jaeger, 1999), embora a eficiência seja semelhante a de esterases caracterizadas, como a do fungo *Rhizomucor miehei* (0,37 $mM^{-1}$ $s^{-1}$)(Liu et al., 2013) e da bactéria *Bacillus pseudofirmus* OF4 (3,4 $\mu M^{-1}$ $s^{-1}$) (Rao et al., 2013). A menor especificidade por substratos esterásicos de cadeia curta quando comparada com o substrato específicos de xilanase, indica que ela a ação esterásica é acessória a de xilanase, auxiliando na digestibilidade das heteroxilanas.

Moléculas enzimáticas bifuncionais xilanase/esterase foram descritas por outros autores (Dodd et al., 2009; Pai et al., 2010), assim como a importância do sinergismo da ação de esterases e xilanases na degradação da hemicelulose (Wefers et al., 2017). As xilanas podem possuir radicais ésteres de ácido ferúlico e cumárico, desta forma, a adição de esterases aumenta a digestibilidade da lignocelulose durante as reações de bioconversão (Gruninger et al., 2016). A ação sinérgica de xilanases e esterases está, principalmente, relacionada com a criação de novos sítios de ligação da xilanase após a remoção dos radicais éster, de modo cooperativo entre as enzimas (Biely et al., 1986). Neste sentido, a hidrólise enzimática das ligações éster, torna-se um importante passo para a completa degradação deste tipo de hemicelulose, auxiliando o aproveitamento por completo da biomassa lignocelulósica.

O pH ótimo de hidrólise da atividade xilanolítica da XylR foi em tampão Acetato de sódio 0,1M pH 6,5 (**Figura 11**), embora manteve 50% da atividade entre pH 5,5 a 6,5. Este resultado é semelhante a endo-β-1,4-xilanases de diferentes origens e propriedades bioquímicas, como encontrado nas enzimas: termoestável de *Marasmius* sp. (tampão Acetato de sódio 0,1M pH 6,0) (Ratanachomsri et al., 2006); pertencentes a família GH10, *Bacillus subtilis* B10 (tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 6,0)(Huang, Wang e Xiao, 2006) e *Kitasatospora* sp. (tampão Acetato de sódio 0,05M pH 6,0)(Rahmani et al., 2019); a resistente ao sal de *Bacillus subtilis* cho40 (tampão Citrato 0,05M pH 6,0)(Khandeparker, Verma e Deobagkar, 2011); e obtida do metagenoma do ceco de galinha (tampão Fosfato de sódio 0,05M pH 6,5) (AL-

Darkazali et al., 2017). Esta característica reforça a propriedade das endo-β-1,4-xilanases atuarem em pHs ácidos a neutros.

A caracterização de endo-β-1,4-xilanase da XylR mostrou a capacidade de hidrólise da entre 30 a 45°C (**Figura 12**), com a temperatura ótima a 37°C, se mantendo estável até 50°C por uma hora (**Figura 13**). Temperatura de hidrólise próxima a temperatura ambiente (±25ºC) é um ótimo parâmetro para a solubilização das hemiceluloses, não sendo necessário o controle térmico na faixa de 30 a 45°C. Esse resultado, é similar ao de xilanases obtidas de outros microrganismos, como *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 (40°C) (Park et al., 2013), *Sorangium cellulosum* So9733-1(30°C) (Wang et al., 2014), e *Bacillus* sp SN5 (40°C) (Bai et al., 2012).

Os íons metálicos $Zn^{+2}$, $Cu^{+2}$ e $Hg^{+2}$ causaram inibição total na atividade da XylR em baixas concentrações (**Tabela 6**) e, desta forma, devem ser evitados nos procedimentos biotecnológicos. A inibição de xilanases pelo $Cu^{+2}$ é descrito em estudos anteriores (Gupta, Bhushan e Hoondal, 2000; Rahmani et al., 2019).

Os íons $Ca^{+2}$, $Mg^{+2}$ e $Mn^{+2}$ não causaram efeito inibitório na atividade de XylR, o que indica sua estabilidade na presença desses. Vale ressaltar que os íons $Ca^{+2}$ e $Mg^{+2}$ são macronutrientes normalmente encontrados nas biomassas lignocelulósicas (Vassilev, Vassileva e Vassilev, 2015), sendo assim, a sua estabilidade na presença desses íons reforça sua possível aplicação para hidrólise de biomassas de diferentes origens. A ausência de efeito inibitório do EDTA, um quelante de íons metálicos, indica que a XylR não é uma enzima dependente de metal. Nos processos biotecnológicos em larga escala, isto é uma vantagem, pois não se torna necessário a adição de íons metálicos para a catálise enzimática, diminuindo o custo operacional.

A tolerância da XylR a presença de solventes orgânicos (**Figura 14**) como metanol, etanol e propanol até 20% (v/v) confere a característica de resistência a processos biotecnológicos que ocorrem na presença destes solventes, como na produção contínua de etanol lignocelulósico, em que as etapas de sacarificação e fermentação ocorrem no mesmo biorreator (Aragon et al., 2013). As interações entre as extremidades hidrofóbicas da proteína com os solventes orgânicos podem afetar a estabilidade, no caso, a enzima apresenta baixo grau de hidrofobicidade e isto pode corroborar a resistência aos solventes orgânicos testados.

A tolerância da XylR de 2M no meio reacional (**Figura 15**) e de até 8 horas em concentrações de até 2,5M de NaCl (**Figura 16**), confere uma característica importante para a utilização no setor biotecnológico. Xilanases halotolerantes foram reportadas na literatura (Ghadikolaei et al., 2019; Khandeparker, Verma e Deobagkar, 2011; Li et al., 2019); como aditivos alimentares de frangos de corte (Raza, Bashir e Tabassum, 2019) e outros animais de produção, uma vez que as dietas rotineiramente são formuladas com a inclusão de NaCl; e em pré-tratamentos que contenham altas concentrações de NaCl, como para a solubilização e despolimerização de celulose (Jiang et al., 2015), aumentando a eficiência e sinergia entre os pré-tratamentos neste processo.

A identificação da XylR de uma xilanase/esterase tolerante a NaCl e a solventes orgânicos a partir do DNA metagenômico de rúmen, nos indica a diversidade de biomoléculas que podem ser exploradas nesses ambientes que podem ser utilizadas para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Atualmente, os tratamentos eficientes para o aproveitamento destes materiais envolvem a utilização de compostos químicos, os quais se não devidamente tratados, podem causar contaminação ambiental (Sun et al., 2016) e, neste sentido, a utilização de enzimas no pré-tratamento é uma maneira ecologicamente viável (Kumar, Gautam e Dutt, 2016; Saini, Saini e Tewari, 2015).

Propomos que utilização da XylR seja capaz de degradar mais eficientemente o esqueleto de xilana e seus radicais ésteres em biomassas com alto teor de hemicelulose. A tolerância ao sal, faz com que a enzima seja versátil e se adeque aos pré-tratamentos com alta concentração de sais. A utilização da XylR se estende a composição de coquetéis enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico, aditivos alimentares em rações de animais de produção e produção de xilo-oligossacarídeos mais eficientemente.

## 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 35-50ºC, 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.

Carvalheiro 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 *Pseudobutyrivibrio 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, Rodehutscord 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.

Ghadikolaei KK, Sangachini ED, Vahdatirad V, Noghabi KA, Zahiri 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 xylanasefrom *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 xylanisolvens* 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.

Vrzheshch 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.