

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/07/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes

Caracterização estrutural e funcional de uma alfa-N-  
arabinofuranosidase recombinante expressa em *Escherichia coli*.

São José do Rio Preto

2019

Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes

Caracterização estrutural e funcional de uma alfa-N-arabinofuranosidase recombinante expressa em *Escherichia coli*.

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes e Dr. Luciano Takeshi Kishi

São José do Rio Preto

2019

M543c Menezes, Cintia Lionela Ambrósio de  
Caracterização estrutural e funcional de uma alfa-N-arabinofuranosidase recombinante expressa em Escherichia coli. / Cintia Lionela Ambrósio de Menezes. -- São José do Rio Preto, 2019  
89 p. : il., tabs.  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto  
Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
  
1. Microbiologia. 2. Enzimas bacterianas. 3. Arabinofuranosidase. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Caracterização estrutural e funcional de uma alfa-N-  
arabinofuranosidase recombinante expressa em *Escherichia coli*.

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto  
ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas  
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

**Comissão Examinadora**

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

Prof(a). Dr(a). Cintia Bittar Oliva  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof(a). Dr(a). Gabriela Salvador de Amo  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)

São José do Rio Preto

01 de julho de 2019

## DEDICATÓRIA

Dedico a Deus!

Aos meus familiares, especialmente meus pais, José e Leonice ao meu irmão, Júlio e ao meu companheiro de vida Adriano, pelo apoio, paciência e por todo o amor;

A vocês, dedico meu trabalho e o meu amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela orientação durante esses 2 anos de trabalho, por toda ajuda e confiança.

Ao Prof. Dr. Luciano Takeshi Kishi pela coorientação, pelo conhecimento compartilhado, pela atenção e esclarecimentos.

A Profa. Dra. Eleni Gomes pela coorientação, pela ideia inicial do trabalho e disponibilização do laboratório no qual realizei grande parte do projeto.

As queridas amigas Maira Rodrigues e Juliana Prado, pela companhia, pela amizade, carinho, cumplicidade, sentimentos compartilhados nesses anos de convivência.

As meninas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) da UNESP/FCAV de Jaboticabal, pela amizade, pelas dúvidas esclarecidas, pela ajuda nesse trabalho e em todas as atividades no laboratório.

A todos do Laboratório Bioquímica e Microbiologia da UNESP/IBILCE, pela amizade e ajuda nesse trabalho e nas atividades no laboratório, especialmente agradeço ao Roni, Gabriela Salvador, Eduardo, Carlos, Lorena e Jéssica obrigada de coração pela ajuda, foi fundamental para mim.

Aos meus amados pais, José e Leonice, e irmão Júlio Cezar pelo amor, paciência, carinho, cuidado, amparo, ajuda, proteção, pela vida, por tudo! Por serem os melhores espelhos. Tudo o que sou e tudo o que sei devo a eles.

Ao meu amor Adriano Almeida, pelo apoio, pela paciência, pelo carinho, pelo amor, por ter trazido paz ao meu coração e leveza aos dias difíceis.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia e a UNESP.

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As abordagens metagenômicas têm sido amplamente utilizadas para isolar novos biocatalisadores de amostras ambientais, uma vez que as comunidades microbianas podem apresentar grande diversidade e, na grande maioria dos casos, não podem ser cultivadas em laboratório. Dessa maneira, estudos direcionados apenas para o isolamento e cultivo não podem fornecer informações suficientes do papel biológico de uma grande quantidade de microrganismos membros de uma comunidade, sendo estas informações melhor entendidas por abordagem metagenômica. Inicialmente investigamos as características das ORFs presentes no genoma de bactéria do gênero *Chitinophaga* com o intuito de avaliar o potencial biotecnológico da comunidade microbiana, e a partir disso a sequência CB10.2\_116 foi selecionada. A clonagem e expressão da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase codificada pela sequência CB10.2\_116 foi realizada, sendo essa selecionada de um banco de dados (CB10) (<http://200.145.102.111/cb10/>) construído a partir do sequenciamento de um consórcio microbiano. Após ser prospectada por similaridade e analisada *in silico*, a proteína codificada apresenta 780 resíduos de aminoácidos, sendo identificada como uma  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) da família de glicosil hidrolases 127, com 80,3% de similaridade com uma proteína não caracterizada da bactéria *Chitinophaga jiangningensis*. A clonagem se deu em vetor pET28-a. Para expressar a proteína de interesse, a qual apresenta uma massa molecular estimada de 87,99 kDa em célula competente de *E. coli*, uma colônia transformada foi isolada e inoculada em meio Lúria Bertani (LB) contendo canamicina a 50  $\mu$ g/mL, e deixada sob agitação constante a 37°C até atingir a fase logarítmica de crescimento, com DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 0,8. A cultura foi induzida com isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosídeo (IPTG). A confirmação da expressão da proteína foi realizada através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% - SDS-PAGE. Neste estudo não foi possível alcançar a expressão ideal da enzima de interesse, acredita-se que em virtude do sistema de expressão escolhido.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, enzima recombinante, metagenômica

## ABSTRACT

Metagenomic approaches have been widely used to isolate new biocatalysts from environmental samples, since microbial communities can exhibit great diversity and, in the vast majority of cases, can not be grown in the laboratory. Thus, studies directed only at isolation and cultivation can not provide sufficient information on the biological role of a large number of microorganisms members of a community, and this information is better understood by metagenomic approach. We initially investigated the characteristics of the ORFs present in the genome of Chitinophaga bacteria in order to evaluate the biotechnological potential of the microbial community, and from that the sequence CB10.2\_116 was selected. The cloning and expression of the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase encoded by the sequence CB10.2\_116 was performed, being selected from a database (CB10) (<http://200.145.102.111/cb10/>) constructed from the sequencing of a consortium microbial. After being prospected for similarity and analyzed in silico, the encoded protein shows 780 amino acid residues, being identified as an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) from the family of glycosyl hydrolases 127, with 80.3% similarity to a uncharacterized protein from the bacterium Chitinophaga jiangningensis. Cloning took place in vector pET28-a. To express the protein of interest, which has an estimated molecular mass of 87.99 kDa in a competent E. coli cell, a transformed colony was isolated and inoculated into Bertani lutein medium (LB) containing 50  $\mu$ g / ml kanamycin, and left under constant stirring at 37 ° C until reaching the logarithmic growth stage, with DO600nm between 0.6 and 0.8. The culture was induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Confirmation of protein expression was performed by denaturing electrophoresis on 12% polyacrylamide gel - SDS-PAGE. In this study it was not possible to achieve the ideal expression of the enzyme of interest, it is believed that by virtue of the chosen expression system.

**Keywords:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, recombinant enzyme, metagenomics

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAs	Enzimas auxiliares
ABFs	Arabinofuranosidases
$\alpha$ -L-AFase	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase
CAZymes	Enzimas ativas em carboidratos
CEs	Carboidrato esterases
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DUF	<i>Domain of unknown functions</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
GH	Glicosil Hidrolase
GTs	Glicosil Transferase
HMMs	<i>Hidden Markov Model</i>
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
MSA	Alinhamento de múltiplas sequências
NGS	Next-Generation Sequence
DO	Densidade Óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PB	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLs	Polissacarídeo liases
pI	Ponto Isoelétrico
SBS	Sequenciamento por síntese
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
XOS	Xilo-oligossacarídeos
WGS	<i>Whole genome shotgun</i>

## SUMÁRIO

Capítulo I: Análise <i>in silico</i> do genoma de <i>Chitinophaga</i> sp., e seleção da sequência que codifica uma arabinofuranosidase.....	10
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Sequenciamento de DNA .....	14
2.2 Uso de ferramentas para montagem de genomas/metagenomas .....	15
2.3 Estudo de amostras ambientais .....	17
3. OBJETIVOS .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Extração de DNA total e sequenciamento da comunidade bacteriana CB10. ....	23
4.2 Montagem, classificação taxonômica e perfil funcional da comunidade bacteriana (CB10). ....	23
4.3 Avaliação do potencial metabólico da comunidade bacteriana para desconstrução da biomassa lignocelulósica.....	24
4.4 Alinhamento de múltiplas sequências.....	25
4.5 Software de Análise Genética Evolutiva Molecular .....	25
4.6 Construção de Árvores filogenéticas .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1 Caracterização da ORF selecionada CB10_2.116 que codifica uma arabinofuranosidase. ....	33
5.2 Expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas degradadoras de lignocelulose.....	36
6. CONCLUSÕES PARCIAIS .....	39
REFERÊNCIAS .....	40
Capítulo II: Clonagem e expressão da sequência CB10_2.116. ....	44
1. INTRODUÇÃO .....	44
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	46
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	46
2.2 Hemicelulose .....	49
2.3 Famílias de glicosil hidrolases .....	50
2.4 Aplicações biotecnológicas de arabinofuranosidases .....	51
2.5 Expressão heteróloga de proteínas em <i>Escherichia coli</i> .....	54
2.6 Análises <i>In silico</i> .....	57

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	60
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
4.1 Análise <i>in silico</i> das sequências .....	61
4.2 Clonagem da sequência codificadora de arabinofuranosidase .....	61
4.3 Eletroforese preparativa .....	63
4.4 Digestão do vetor e inserto com BamHI .....	63
4.4.1 Digestão de Vetor .....	63
4.4.2 Digestão do Inserto.....	63
4.5 Digestão do vetor e inserto com EcoRI .....	64
4.5.1 Digestão de Vetor .....	64
4.5.2 Digestão de Inserto.....	64
4.6 Reação de Ligação do fragmento ao vetor de expressão.....	64
4.7 Transformação bacteriana das células de <i>Escherichia coli</i> . .....	66
4.8 Análise de sequenciamento da ORF .....	67
4.9 Construção do plasmídeo de expressão em <i>E. coli</i> (Fastbio) .....	67
4.10 Expressão da proteína recombinante .....	68
4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	69
4.12 Recuperação da proteína em fração insolúvel.....	69
4.13 Purificação por cromatografia de afinidade ao metal .....	70
4.14 Ensaio de atividade enzimática .....	70
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
5.1 Análises <i>in silico</i> .....	70
5.2 Amplificação e clonagem dos genes no vetor pET28a .....	76
5.3 Ensaio de expressão e extração das proteínas recombinantes .....	79
5.4 Purificação e atividade enzimática.....	83
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## Capítulo I: Análise *in silico* do genoma de *Chitinophaga* sp., e seleção da sequência que codifica uma arabinofuranosidase

### 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores poderosos que possuem a capacidade de aumentar significativamente as taxas de um grande número de reações biológicas e químicas. Atualmente há uma alta demanda pelas enzimas, que são consideradas alternativas mais ecológicas para a síntese química, pois ainda hoje são usados solventes orgânicos prejudiciais para o meio ambiente e elevado consumo de energia. Enzimas microbianas não possuem qualquer natureza perigosa para o ambiente, contribuindo como soluções ecologicamente adequadas na síntese de produtos químicos. O estudo com comunidades microbianas inexploradas para a identificação e isolamento de enzimas é uma área ativa de pesquisa em todo o mundo (MADHAVAN et al., 2017).

Os microrganismos procarióticos possuem uma notável diversidade fisiológica, metabólica e funcional e constituem a fonte mais rica de diversidade genética. O método clássico para prospectar essa informação diversa de genes é cultivando o microrganismo e fazendo a subsequente triagem para o fenótipo desejado. No entanto, cerca de 99,9% dos microrganismos em nichos ambientais não podem ser cultivados por técnicas laboratoriais padrão. Com isso, ferramentas e tecnologias que permitam pesquisas de microbiomas têm crescido em ritmo acelerado graças ao aumento no uso de sequenciadores rápidos e de técnicas ômicas (MADHAVAN et al., 2017 e NAVAS-MOLINA et al., 2017).

É grande a quantidade de dados coletados pelos pesquisadores, o que traz para a comunidade científica desafios no que diz respeito ao armazenamento e análise de dados. Porém, essa riqueza de informações também facilitará a compreensão de mecanismos e interações comunitárias bacterianas como nunca antes, nos conduzindo ao desenvolvimento inovador em diversas áreas, não apenas na saúde humana, mas também na agricultura e biocombustíveis, entre outras aplicações. Um dos maiores desafios enfrentados por pesquisadores que

visam atingir esses objetivos é a capacidade de integrar e correlacionar as enormes quantidades de dados produzidos por essas novas tecnologias e identificar informações biologicamente relevantes que podem ser usadas para formular hipóteses testáveis (NAVAS-MOLINA et al., 2017).

Os esforços de sequenciamento nos últimos anos levaram o número para mais perto de 1.000 filós de bactérias e de arqueas reconhecidos. Toda essa abundância de microrganismos fornece contribuições ao ecossistema que são cruciais para a sustentabilidade local e global. A microbiota dentro e sobre as culturas, árvores e outras plantas, nos solos em que crescem, fornecem nitrogênio, fósforo e outros nutrientes essenciais, além de atuarem na decomposição de poluentes e suprimirem a atividade de microrganismos patogênicos. Reconhecendo o poder inexplorado dos microbiomas do solo e das plantas no aumento da produtividade agrícola, empresas estão investindo milhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento nessa área (DUBILIER; MCFALL-NGAI; ZHAO, 2015).

As abordagens metagenômicas têm sido amplamente utilizadas para isolar novos biocatalisadores de amostras ambientais. As comunidades microbianas podem apresentar grande diversidade, e que na grande maioria dos casos não podem ser identificadas em laboratório, pois os estudos direcionados apenas no isolamento e cultivo não podem fornecer informação suficientes do papel biológico de uma grande quantidade de microrganismos membros de uma comunidade, sendo que tais informações podem ser melhor entendidas por abordagem metagenômica (GONG et al., 2012).

Neste estudo investigamos as características das ORF presentes no genoma de bactéria do gênero *Chitinophaga* com o intuito de avaliar o potencial biotecnológico da região CB10.2116 proveniente de estudos metagenômicos. Estudos posteriores puderam identificar que tal sequência pode expressar uma enzima da família de glicosil hidrolase com a importante função de atuar na desconstrução de material lignocelulósico.

da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica*. As chaperoninas exibem altas atividades de redobragem a temperaturas de 4–12 °C e conferem uma capacidade aumentada para *E. coli* crescer a temperaturas mais baixas (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

#### 5.4 Purificação e atividade enzimática

Os testes de purificação e caracterização não atingiram resultados favoráveis, sendo que por diversas vezes se tentou a purificação usando colunas HisTrap HP que por sua vez são embaladas com resina de afinidade Ni Sepharose High Performance (HP). Esta resina consiste em esferas de agarose altamente reticuladas com um grupo quelante acoplado. O grupo quelante é pré-carregado com níquel, que retém seletivamente proteínas com grupos histidina expostos.

Quanto aos testes de atividade enzimática, não foi possível, em nenhuma das tentativas detectar atividade para arabinofuranosidase.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível identificar e analisar *in silico* três ORFs que codificam arabinofuranosidases no banco de dados CB10 disponibilizado pelo LBMP – UNESP de Jaboticabal, das quais uma (a CB10\_2.116) foi selecionada para clonagem, expressão e caracterização.

A clonagem do fragmento foi realizada com sucesso em vetor de expressão pET28a. Foram realizados testes de expressão da proteína, e conforme se pode visualizar nos géis apresentados se pode dizer que a expressão foi atingida. A banda correspondente ao tamanho da proteína de interesse que apresenta 87,99 kDa aparece nos géis de poliacrilamida, porém não foi possível notar a superexpressão da enzima; testes foram realizados modificando variáveis que pudessem influenciar na expressão enzimática.

Sendo assim, não foi possível alcançar a expressão ideal dessa enzima, em virtude do sistema escolhido. Acreditamos que um novo sistema de expressão, por exemplo em *Pichia pastoris*, possa ser testado para se obter a proteína purificada, ou testes que utilizem diferentes substratos enzimáticos.

## REFERÊNCIAS

BRIAND, L, et al. Heterologous expression and characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Clostridium thermocellum* B8. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 74–83, 2018.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A.M. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-1205, 2010.

CAMARGO, B. et al. Heterologous expression and characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Clostridium thermocellum* B8. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 74–83, 2018.

CARVALHO, D. et al. A halotolerant bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: Purification and biochemical characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 114, p.741-750, 2018.

CARVALHO, N. L.; BORTOLINI, J. G.; BARCELLOS, A. L. Biocombustíveis: uma opção para o desenvolvimento sustentável. **Revista Gestão e Desenvolvimento em Contexto- Gedecon**, v. 1, n. 1, p.32-50, jan. 2015.

CINTRA, L C *et al.* Characterization of a recombinant xylose tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 105, p.262-271, dez. 2017.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

CHEN, C.; HUANG, H.; WU, C. H. Protein Bioinformatics Databases and Resources. **Protein Bioinformatics**, v. 1, n. 1, p.3-39, 2017.

COLLINS, T. GERDAY, C. FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.1, p 3–23, 2005.

CONTESINI, F. J. et al. Structural and functional characterization of a highly secreted  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 12, p. 1758–1769, 2017.

ESPINDOLA, F.S. et al. Bioinformatic resources applied on the omic sciences as genomic, transcriptomic, proteomic, interatomic and metabolomic. **Biosci. J**, v. 26, n. 3, p 463-477, 2010.

FINN, R D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p.279-285, 15 dez. 2016.

FUJITA, K. et al. Characterization of a Novel  $\beta$ -L-Arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38079–38085, 2014.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p.293-299, 2015.

GOODACRE, N. F.; GERLOFF, D. L.; UETZ, P. Protein Domains of Unknown Function Are Essential in Bacteria. **mBio**, v. 5, n. 1, p. e00744-13, 2014.

JIA, L. et al. Synergistic degradation of arabinoxylan by free and immobilized xylanases and arabinofuranosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 268–275, 2015.

KAUR, KUMAR, KAUR. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KISHI, L. T. et al. Draft Genome Sequence of a *Chitinophaga* Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. **Genome Announcements**, v. 5, n. 3, p. e01056-16, jan. 2017.

KURNIATI, A.; DARMOKOESOEMO, H.; PUSPANINGSIH, N. N. T. Scanning Electron Microscope Analysis of Rice Straw Degradation by a Treatment with  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 63–68, 2016.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p.490-495, 2013.

MALONE, G. et al. Prospecção de Genes em Bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 12, n. 1, p. 7–13, 2006.

MECHELKE, M. et al. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*: Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. **Journal Of Biotechnology**, v. 257, p.122-130, 2017.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p.1365-1391, ago. 2015.

MOHSEN DEHNAVI, S.; PAZUKI, G.; VOSSOUGH, M. PEGylated silica-enzyme nanoconjugates: A new frontier in large scale separation of  $\alpha$ -amylase. **Scientific Reports**, v. 5, n. December, p. 1–9, 2015.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 4, p.247-260, 30 dez. 2005.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p.785-786, 29 set. 2011.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers In Microbiology**, v. 5, n. 1, p.1-17, 17 abr. 2014.

ROZENDO, A. S. et al. Strategies for induction in the *Leishmania chagasi* recombinant antigens production. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, n. 3, p.174-188, dez. 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring: Cold Spring Harbor, 1989.

SAN-MIGUEL, T; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; GAVIDIA, I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. **Licensee Springer**, v. 2, n. 89. 2013.

SANTOS, F.; OSVALDO A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p.253-259, mar. 2003.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

SAXENA et al. The Basic Concepts of Molecular Modeling. **Methods in Enzymology**, v. 467, p 307-334, 2009.

SHALLOM, D. et al. The identification of the acid-base catalyst of alphaarabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2-3, p. 163-167, 2002.

SHARMA, A; MEENA, K. R; KANWAR, S. S. Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 107, p.2131-2140, 2018.

SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. **Process Biochemistry**, India, v. 55, n. 1, p.17-31, 2017.

SOUZA, L.L; RHODEN, S. A; PHAMPHILE, J.A. The importance of omics as a tool for the study of exploration of microorganisms: prospects and challenges. **Revista UNINGÁ**, v. 18, n. 2, p. 16-21. 2014.

WILKENS. et al. GH62 arabinofuranosidases: Structure, function and applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p.792-804, 2017.

YANG, W. et al. A novel bifunctional GH51 exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n.1, p. 197, 2015.

YASIR, M. et al. *Chitinophaga eiseniae* sp. nov., isolated from vermicompost. **Int J Syst Evol Microbiol** v. 61, p. 2373–2378, 2011.

YOSHIDA, S. et al. Domain Analysis of a Modular-L-Arabinofuranosidase with a Unique Carbohydrate Binding Strategy from the Fiber-Degrading Bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. **Journal Of Bacteriology**, v. 192, n. 20, p.5424-5436, 2010.