

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 18/03/2023.

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

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS  
METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA  
PARA A AGROINDÚSTRIA**

**Natália Sarmanho Monteiro Lima**  
Engenheira Agrônoma

**2022**

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

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS  
METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A  
AGROINDÚSTRIA**

**Natália Sarmanho Monteiro Lima  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana G. de Macedo Lemos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária

**2022**

L732i

Lima, Natalia Sarmanho Monteiro

Identificação de novas enzimas de bibliotecas metagenômicas com aplicação biotecnológica para a agroindústria / Natalia Sarmanho Monteiro Lima. -- Jaboticabal, 2022

112 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Enzimas. 2. Proteínas Recombinantes. 3. Biorremediação. 4. Lacase. 5. Biomassa vegetal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A AGROINDÚSTRIA

AUTORA: NATÁLIA SARMANHO MONTEIRO LIMA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS


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



Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO (Participação Virtual)   
Embrapa Instrumentação / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - São Carlos

Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN (Participação Virtual)   
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ACACIO APARECIDO NAVARRETE (Participação Virtual)   
UFMS - Campus de Chapadão do Sul / Chapadão do Sul/MS

Prof. Dr. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ (Participação Virtual)   
Departamento de Química e Ciências Ambientais / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto

Jaboticabal, 18 de março de 2022

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Natália Sarmanho Monteiro Lima** – Nascida em 19 de dezembro de 1991, em Parnaíba, Piauí. Iniciou sua graduação em março de 2010 no curso de Agronomia pela Universidade Federal do Amazonas, na cidade de Manaus, AM, concluindo-o em Julho de 2015. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, na cidade de Jaboticabal sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana G. de Macedo Lemos e obteve o título de mestre em 2017. No mesmo ano foi aprovada no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana G. de Macedo Lemos e em março de 2022 obteve o título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

Dos nossos medos nascem as nossas coragens e nas nossas dúvidas vivem as nossas certezas. Os sonhos anunciam outra realidade possível e os delírios, outra razão. Nas perdas, nos esperamos os encontros, porque é preciso perder-se para se encontrar.

**Eduardo Galeano**

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus!** Gratidão sempre!

**Aos meus pais**, vocês são as pessoas que mais amo nesse mundo. Meus maiores exemplos, meus melhores amigos e meus amores. Agradeço imensamente o incentivo, esforço e apoio, sem vocês isso não teria o menor sentido. Essa é a realização de um sonho que sonhei com vocês.

**Mainha/Mãezinha**, à senhora todo meu amor, pois nós duas sabemos que o caminho não foi fácil.

**Pai/Papai**, o senhor é meu maior exemplo de honestidade e trabalho, tenha toda certeza de que foi de tanto te admirar que escolhi esse caminho. Te amo!

Aos meus irmãos **Mariana, Emiliano e Otávio**, apesar da distância meu amor por vocês é gigantesco. Essa conquista também é de vocês.

As famílias **de Oliveira Monteiro e Sarmanho da Costa Lima**, os meus mais sinceros agradecimentos pela compreensão nos momentos que estive ausente e pelo amor que sempre recebi de vocês. Dedico à **Marilda, Alfredo, Venilton, Lenisa, Manuel, Tereza, Laurimar, Lincoln e Verônica. Para todos os meus tios e primos.**



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Lemos** pela confiança, apoio, exemplo e por ter me recebido com tanto amor e carinho.

À **Dr<sup>a</sup>. Elisângela Gomes-Pepe**, por todo apoio e confiança. Aprendi e aprendo muito com você.

Ao **Dr. João Carlos Capanharo**, pela alegria, amizade e carinho que recebi todos os dias. Com você o trabalho se torna mais divertido.

À **Michelli Funicelli, Bárbara Bonfá, Tatiane Leonel e Pâmela Maldaner** pela companhia diária, dentro e fora do laboratório, o apoio nos momentos de desespero e as diversas risadas compartilhadas.

À toda **equipe do LBMP**, pelo convívio diário, amizade, carinho e troca de conhecimento. Vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **Vanessa Santos (minha irmã da vida), Roberta Mendes, Luan Adames, Gabriela Cabral, Milena Constâncio, Gabriella Cavazzini, Stéfane Faria e Laiana Bentes** pela companhia, os abraços sinceros, apoio e pelas diversas vezes que nos reunimos para chorar e no fim acabávamos rindo (e muito). Vocês foram minha família e guardo cada momento no meu coração.

Ao professor **Dr. João Martins Pizauro Júnior** e ao **LEIA** pelo apoio técnico.

Ao **Dr. Luis Alberto Colnago – EMBRAPA Instrumentação** e **Dr. Flávio Kock** pela realização das análises de RMN e auxílio nas interpretações dos dados.

Ao **Ebson Silva**, por ter sido minha companhia, meu amigo e muitas vezes meu auxiliar de laboratório (risos). Por todas as vezes que quis chorar e você me deu a mão para continuar. Muito obrigada. Te amo!

Ao programa de **Pós - Graduação em Microbiologia Agropecuária** da UNESP/FCAV.

À **CAPES** pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para essa jornada o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
Capítulo 1- Considerações Gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Utilização de enzimas microbianas na indústria .....	3
2.2 Controle Biológico e uso de enzimas .....	4
2.2.1 Lipases (E.C 3.1.1.3) .....	6
2.2.2 Quitinase (EC 3.2.1.14) .....	6
2.2.3 Betaglucanase (EC 3.2.1) .....	7
2.2.4 Peptidase (E.C 3.4).....	7
2.3 Contaminação por pesticidas agrícolas e biorremediação .....	7
2.3.1 Enzimas envolvidas na biorremediação de pesticidas .....	9
2.4 Biorrefinaria e produção de etanol de segunda geração.....	12
2.4.1 Enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal .....	13
2.5 Metagenômica associada a descobertas de novas enzimas funcionais para agricultura .....	15
3. REFERÊNCIAS.....	18
Capítulo 2 – Dinâmica da atuação de LacMeta na degradação completa e detoxificação do verde de malaquita.....	24
1. INTRODUÇÃO .....	26
1.1 Verde de Malaquita (VM).....	26
1.2 Biorremediação .....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1 Expressão enzimática, purificação da LacMeta e restituição da atividade (holoenzima) .....	30
2.2 Análise de UV-Visível e descoloração do verde de malaquita .....	31
2.3 Ensaio enzimático.....	31
2.3.1 Efeito do pH e da temperatura na descoloração do verde de malaquita .....	31
2.3.2 Efeitos de aditivos na descoloração do Verde de Malaquita .....	32
2.3.3 Ensaio de Fitotoxicidade .....	32
2.3.4 Ensaio de citotoxicidade.....	32
2.3.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (H-RMN).....	33

2.3.5 Análise Estatística .....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.1 LacMeta apresenta melhor atividade de descoloração em meio levemente ácido (pH 5-6,5) e temperaturas relativamente elevadas (50-60 °C) .....	33
3.2 O processo de descoloração enzimática por LacMeta apresenta resistência a solventes, detergentes, íons e NaCl.....	35
3.3 Capacidade da LacMeta em detoxificar o verde de malaquita.....	40
3.4 Potencial de descoloração/degradação enzimática de LacMeta .....	44
3.5 Espectros de H-RMN .....	46
4. CONCLUSÕES .....	47
5. REFERÊNCIAS.....	48
Capítulo 3 –Biodegradação de hidróxido de fentina e imazapic por LacMeta.....	54
1. INTRODUÇÃO .....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	58
2.1 Fluxograma de trabalho .....	58
2.2 Forma de aplicação de LacMeta para o tratamento dos pesticidas .....	58
2.2.1 Hidróxido de fentina – Mertin 400® .....	58
2.2.2 Imizapic – Plateau® .....	59
2.3 Ensaio de biodegradação.....	59
2.3.1 Detoxificação do hidróxido de fentina por LacMeta .....	59
2.3.2 Efeito do herbicida Imazapic sobre o crescimento da E.coli + lacmeta.....	61
2.3.3 Atividade enzimática da LacMeta sob efeito do Imazapic .....	61
2.3.4 Avaliação da degradação dos pesticidas por espectroscopia molecular U.V visível.....	61
3. Resultados e discussão .....	62
3.1 Hidróxido de fentina.....	62
3.3 Atividade enzimática de lacase exposta a hidróxido de fentina e Imazapic.....	66
3.4 Análise de U. V visível da degradação de hidróxido de fentina e Imazapic.....	71
4. CONCLUSÕES .....	76
5. REFERÊNCIAS.....	77
INTRODUÇÃO.....	81
1.1 Feruloil esterase.....	81
1.2 Utilização das feruloil esterases para produção de etanol de segunda geração	81
2.1 Prospecção de genes de putativas feruloil esterases.....	82
2.2 Análises da sequência ORF FaeC7.....	83
2.4 Ensaio de expressão, super expressão e extração das proteínas recombinantes .....	84

2.5 Atividade de esterase em placa .....	85
2.6 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma ...	85
2.7 Atividade de esterase e tanase .....	85
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	86
3.1 Análise da sequência e predição de características de FaeC7.....	86
3.2 Expressão, obtenção dos extratos solúveis e <i>screening</i> de atividade de Fae07	90
3.3 Atividade enzimática de tanase.....	91
4. CONCLUSÕES .....	94
5. REFERÊNCIAS.....	95
Capítulo 5 – Considerações finais .....	98

## IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ENZIMAS DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA PARA A AGROINDÚSTRIA

### RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias e novas abordagens para aumento da produtividade e melhoria das áreas cultivadas é uma busca constante. A utilização de enzimas de microrganismos é uma alternativa para alguns problemas encontrados no agronegócio, como utilização de resíduos agrícolas, controle biológico de pragas e doenças e biorremediação de defensivos agrícolas/pesticidas. As lacases e feruloil esterases são enzimas de grande importância biotecnológica. A metagenômica tem se mostrado bastante eficiente na busca de novos genes codificadores de proteínas/enzimas e a tecnologia do DNA recombinante facilita o acesso a esses genes. LacMeta é uma lacase metagenômica, que possui potencial para degradação de corantes, conforme resultados preliminares obtidos. Neste trabalho resolvemos aprofundar o estudo da aplicação biotecnológica desta enzima para biorremediação de outros compostos xenobióticos, visando determinar os parâmetros ótimos de reação bem como avaliar o potencial de detoxificação dos resíduos tratados. Para esta abordagem foram escolhidos o verde de malaquita (VM), amplamente utilizado na aquicultura apesar de proibições vigentes por diversas normas ambientais; o hidróxido de fentina (fungicida) e o imazapic (herbicida), ambos defensivos agrícolas largamente utilizados em monoculturas, visando verificar o potencial catalítico e mecanismos bioquímicos de atuação da LacMeta. Os resultados obtidos comprovaram a eficiência da LacMeta na detoxificação dos xenobióticos, sobretudo no que diz respeito a sua atuação na degradação completa do VM em 48 h, resultando em metabólitos inertes de acordo com os resultados de fitotoxicidade e citotoxicidade. Além disso, visando fomentar novos estudos de aplicação na degradação de resíduos agrícolas, prospectamos uma feruloil esterase (FAE) em bancos de dados metagenômicos. Esta enzima atua na degradação de ácidos hidroxinâmicos presentes na biomassa lignocelulósica. A nova FAE foi identificada como do tipo C. Análises preliminares da enzima em extrato celular solúvel bruto indicaram que a FeaC7 apresentou atividade enzimática positiva para esterase e tanase. Em conjunto, os resultados deste trabalho demonstram que, as enzimas metagenômicas LacMeta e FaeC7 possuem elevado potencial biotecnológico para aplicação na agroindústria, uma vez que podem atuar na degradação de resíduos agrícolas e na biorremediação de pesticidas.

**Palavras-chaves:** lacase, feruloil esterase, biorrefinaria, biorremediação

## IDENTIFICATION OF NEW ENZYMES FROM METAGENOMIC LIBRARIES WITH BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION FOR AGRIBUSINESS

### ABSTRACT

The development of new technologies and new approaches to increase productivity and improve cultivated areas is a constant search. The use of enzymes from microorganisms is an alternative for some problems encountered in agribusiness, such as the use of agricultural residues, biological control of pests and diseases and bioremediation of agricultural pesticides/pesticides. Laccases and feruloyl esterases are enzymes of great biotechnological importance. Metagenomics has proved to be quite efficient in the search for new genes encoding proteins/enzymes, and recombinant DNA technology facilitates access to these genes. LacMeta is a metagenomic laccase, which has the potential for dye degradation, according to preliminary preliminary results obtained in my master's thesis. In this work we decided to deepen the study of the biotechnological application of this enzyme for the bioremediation of other xenobiotic compounds, aiming to determine the optimal reaction parameters as well as to evaluate the detoxification potential of the treated residues. Malachite green (VM) was chosen for this approach, widely used in aquaculture despite bans in force by various environmental authorities; fentin hydroxide (fungicide) and imazapic (herbicide), both pesticides widely used in monocultures with high persistence of environmental residues, aiming to verify the catalytic potential and biochemical mechanisms of action of LacMeta. The results obtained proved the efficiency of LacMeta in the detoxification of xenobiotics, especially with regard to its action in the complete degradation of VM in 48 h, resulting in inert metabolites according to the phytotoxicity and cytotoxicity results. Furthermore, in order to promote new application studies in the degradation of agricultural residues, we prospected a feruloyl esterase (FAE) in metagenomic databases, an enzyme that acts on the degradation of hydroxynamic acids present in lignocellulosic biomass. The new FAE was identified as type C. Preliminary analysis of the enzyme in crude soluble cell extract indicated that FeaC7 showed positive enzymatic activity for esterase and tannase. Together, the results of this work demonstrate that the metagenomic enzymes LacMeta and FaeC7 have a high biotechnological potential for application in the agroindustry, since they can act in the degradation of agricultural residues and in the bioremediation of pesticides.

**Keywords:** laccase, feruloyl esterase, biorefinery, bioremediation

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)  
Bis-tris: 2,2-Bis(hidroximetil)-2',2"-nitrilotrietanol  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DO: densidade óptica  
DTT: ditioneitol  
EC: "Enzyme Commission"  
IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
IUBMB: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular  
kDa: kilodaltons  
LB: Luria Bertani  
NCBI: "National Center for Biotechnology Information"  
ORF: Open Reading Frame  
m/v: peso por volume  
pb: pares de bases  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PDB: Protein Data Bank  
PEG: polietilenoglicol  
pH: potencial hidrogeniônico - log [H+]  
pI: ponto isoelétrico  
pNP: p-nitrofenol  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
rpm: rotações por minuto  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SDS-Page: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato  
SEC: cromatografia por exclusão de tamanho  
SLAC: "small laccase"  
Tris: tris[hidroximetil]aminometano  
 $\mu$ g: micrograma  
 $\mu$ L: microlitro  
v/v: volume por volume

## Capítulo 1- Considerações Gerais

### 1. INTRODUÇÃO

Parte do setor industrial está se tornando cada vez mais dependente do uso de enzimas como catalisadores, como por exemplo, as proteases, lipases e celulasas, entre outras. A descoberta de novas enzimas pode contribuir para o aumento do rendimento dos sistemas agrícolas e, para isso, a utilização de técnicas como a metagenômica e a tecnologia do DNA recombinante, são essenciais.

Os sistemas agrícolas consistem em um conjunto diverso de ecossistemas complexos e a demanda por uma abordagem mais sustentável, vem tornando constante a busca por novos métodos aplicados a sistemas agrícolas. Entre os problemas que podem ser encontrados relacionados a agricultura, podemos citar a contaminação do solo e da água por pesticidas, a ocorrência de pragas e doenças que afetam os cultivos agrícolas e a produção de resíduos agrícolas. Dentre as soluções possíveis para amenizar estes problemas está a substituição de parte destes pesticidas por práticas de controle biológico, a utilização de resíduos agrícolas e desenvolvimento de abordagens eficientes de tratamento de resíduos químicos, como utilizando a biorremediação.

Entre os principais pesticidas, também denominados defensivos agrícolas, encontram-se os herbicidas, inseticidas e fungicidas que, a despeito de sua importância para a produtividade, muitas vezes por uso indiscriminado e até mesmo recorrência de aplicação, podem contaminar o ambiente de forma severa. A biorremediação desses compostos por microrganismos tem sido bastante estudada, porém poucos são os trabalhos que demonstram a degradação completa desses pesticidas.

A biomassa lignocelulósica é a principal fonte para a produção de bioetanol, além disso, pode ser encontrada facilmente em resíduos de agroindústrias. Diversas enzimas estão envolvidas neste processo, como as glicosil hidrolases, lacases e feruloil esterases. Uma vez que a agroindústria produz toneladas de resíduos como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de feijão, casca de amendoim, entre outros. A utilização de enzimas/coquetéis enzimáticos seria uma excelente alternativa para a geração



de produtos como bioetanol e até insumos que poderiam ser utilizados na indústria cosmética, como o ácido ferúlico.

Considerando a necessidade de abordagens mais sustentáveis, o uso de microrganismos na agricultura e no beneficiamento de produtos, vem aumentando cada vez mais, a exemplo do uso de *Bacillus thuringiensis* que é um dos maiores agentes de controle biológico encontrados atualmente, com efeito em diversas pragas e doenças como *Spodoptera frugiperda*, antracnose e broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Outro microrganismo interessante é o *Trichoderma* sp. que possui alto potencial para controle biológico, biorremediação e para degradação de resíduos agrícolas. Grande parte desse potencial deve-se ao maquinário enzimático presente nesses fungos, como quitinases (Mohiddin *et al.*, 2021), proteases (Sun *et al.*, 2021),  $\beta$ -glicosidases, xilases (Bahaman *et al.*, 2021), lacases (Ranimol *et al.*, 2018),  $\beta$ -xiloxidases (Marlene *et al.*, 2021) e lipases (Qin *et al.*, 2012), entre outras.

É notável a importância do uso direto de microrganismos para realização desses processos, porém a utilização de suas enzimas pode ser ainda mais vantajosa, uma vez que a atuação pode ocorrer de maneira mais específica e a produção de produtos/metabólitos oriundos da catálise enzimática é mais previsível. Um dos fatores que facilitaria a utilização prática e viável dessas enzimas microbianas para aplicação na agricultura, é a otimização de metodologias de produção heteróloga em larga escala, o que proporcionaria a produção e a possibilidade de manejar os parâmetros de indução para obtenção de maiores rendimentos. Para isso é necessário que sejam realizados estudos com intuito de rastrear enzimas que possam ser utilizadas em ambientes hostis e se adaptem bem a abordagens de escalonamento. Considerando a morosidade dos estudos bioquímicos *in vitro*, para que essa abordagem de rastreio seja efetiva, são fundamentais abordagens *in silico* por bioinformática, que juntamente com o acesso a banco de dados gênicos, incluindo os metagenômicos, permitiram acesso ao potencial metabólico de microrganismos incultiváveis, facilitando a descoberta de novas enzimas com mecanismos de catálise diferentes. Algumas empresas como a Basf Enzymes LLC (<https://www.basf.com>) comercializam enzimas de origem metagenômica, como fitase, xilanase, amilase e celulase (Berini *et al.*, 2017).

#### **4. CONCLUSÕES**

A prospecção de novas FAE nos metagenomas do LBMP, encontrou uma nova representante do tipo C. FaeC7 foi obtida na forma solúvel e apresentou atividade com *p*-nitrofenil acetato, além disso como representante do tipo C, também apresentou atividade para tanase. A descoberta dessa nova enzima bifuncional, demonstra mais uma vez o potencial da técnica de metagenômica para obtenção de novas moléculas funcionais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABOKITSE, K. *et al.* Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 195–203, 2 jun. 2010.
- ANTONOPOULOU, I. *et al.* Tailoring the specificity of the type C feruloyl esterase FoFaeC from *Fusarium oxysporum* towards methyl sinapate by rational redesign based on small molecule docking simulations. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–20, 2018.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K.-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J**, v. 343, p. 177–183, 1999.
- BANERJEE, A. *et al.* Characterization of tannase protein sequences of bacteria and fungi: An in silico study. **Protein Journal**, v. 31, n. 4, p. 306–327, 2012.
- BENOIT, I. *et al.* Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 387–396, 1 mar. 2008.
- BORKAR, S. Alkaliphilic bacteria: Diversity, physiology and industrial applications. *In: Bioprospects of Coastal Eubacteria: Ecosystems of Goa.* [s.l: s.n.]. p. 59–84.
- CREPIN, V. F.; FAULDS, C. B.; CONNERTON, I. F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 647–652, 2004a.
- \_\_\_\_\_. Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 567–570, 1 maio 2004b.
- DIMAROGONA, M. *et al.* The crystal structure of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase that belongs to the tannase family. **FEBS Letters**, v. 594, n. 11, p. 1738–1749, 2020.
- DYRLØV BENDTSEN, J. *et al.* Improved prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783–795, jul. 2004.
- FERNANDES, C. C. *et al.* Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 489–502, 2018.
- FINN, R. D. *et al.* The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.
- GAO, L. *et al.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Biochemical characterization of a novel feruloyl esterase from *Penicillium piceum* and its application in biomass bioconversion. v. 133, p. 388–394, 2016.
- GOMES, E. S. **Análise E Expressão De Genes De Pks Ii E De Carboidrases Provenientes De Bibliotecas Metagenômicas.** [s.l: s.n.].
- JESUS, R. B. DE *et al.* Bacterial diversity in bovine rumen by metagenomic 16S rDNA sequencing and scanning electron microscopy. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 37, n. 3, p. 251–257, 2015.

KANG, Q. *et al.* Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. **Scientific World Journal**, v. 2014, n. Ci, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LAS RIVAS, B. DE *et al.* Bacterial tannases: classification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 603–623, 2019.

LEVASSEUR, A. *et al.* Construction of Engineered Bifunctional Enzymes and Their Overproduction in *Aspergillus niger* for Improved Enzymatic Tools To Degrade Agricultural By-Products. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8132–8140, 1 dez. 2005.

LI, X. *et al.* Identification of a Novel Feruloyl Esterase by Functional Screening of a Soil Metagenomic Library. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–14, 2018.

MKABAYI, L. *et al.* Evaluating feruloyl esterase-xylanase synergism for hydroxycinnamic acid and xylo-oligosaccharide production from untreated, hydrothermally pre-treated and dilute-acid pre-treated corn cobs. **Agronomy**, v. 10, n. 5, 2020.

MONDAL, K. C. *et al.* Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 2, p. 168–171, 2001.

NASCIMBÉM, E. A. P. *et al.* Taxonomic and nitrogen-cycling microbial community functional profiles of sugarcane and adjacent forest soils in Southeast Brazil. **MOJ Ecology & Environmental Sciences**, v. 6, n. 4, p. 119–125, 2021.

NIETER, A. *et al.* A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 3, p. 348–357, 2014.

NOOR, H. *et al.* Insight on esterase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S3 that depolymerize poly(lactic acid) (PLA) at ambient temperature. **Polymer Degradation and Stability**, v. 174, n. 2020, p. 109096, 2020.

OHLHOFF, C. W. *et al.* An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 79–88, ago. 2015.

PAIXÃO, D. A. A. *et al.* Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 3, p. 773–781, 2010.

PENG, Q. *et al.* Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

POIDEVIN, L. *et al.* Comparative analyses of *Podospora anserina* secretomes reveal a large array of lignocellulose-active enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7457–7469, 3 set. 2014.

RECORD, E. *et al.* Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for

pulp bleaching application. p. 349–355, 2003.

SIVASHANMUGAM, K.; JAYARAMAN, G. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1364–1374, 2011.

SUZUKI, K. *et al.* Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 82, n. 10, p. 2857–2867, 1 out. 2014.

UDATHA, D. B. R. K. G. *et al.* The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 94–110, 2011.

WEISS, B. *et al.* Unraveling a Lignocellulose-Decomposing Bacterial Consortium from Soil Associated with Dry Sugarcane Straw by. **Microorganisms**, v. 9, n. 995, p. 1–18, 2021.

WELKER, C. M. *et al.* Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. **Energies**, v. 8, n. 8, p. 7654–7676, 2015.

WONG, D. W. S. Feruloyl Esterase: A Key Enzyme in Biomass Degradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 2, p. 87–112, 2006.

XU, Z.; WANG, T.; ZHANG, S. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production. **Bioresource Technology**, v. 288, n. 72, p. 121526, 2019.

ZARAFETA, D. *et al.* Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–16, 2016.

ZHANG, S.-B. *et al.* Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 36–40, 2013.