

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

VANDIERLY SAMPAIO DE MELO

**Caracterização de glicosil hidrolases envolvidas na degradação de biomassa vegetal**

São Paulo

2022

VANDIERLY SAMPAIO DE MELO

**Caracterização de glicosil hidrolases envolvidas na degradação de biomassa vegetal**

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo alterações solicitadas pela comissão julgadora em 23 de março de 2022. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
com os dados inseridos pelo(a) autor(a)  
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Sampaio de Melo, Vandierly  
Caracterização de glicosil hidrolases envolvidas  
na degradação de biomassa vegetal / Vandierly  
Sampaio de Melo; orientador, Felipe Santiago  
Chambergo Alcalde. -- São Paulo, 2022.  
96 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular,  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
Universidade de São Paulo, 2022.  
Versão corrigida

1. GH43. 2. Endo-?-1,5-L-arabinanase. 3. ?-  
xilosidase. 4. Etanol de segunda geração. 5. Enzimas  
termoestáveis. I. Chambergo Alcalde, Felipe  
Santiago, orient. II. Título.

Nome: MELO, Vandierly Sampaio de

Título: Caracterização de glicosil hidrolases envolvidas na degradação de biomassa vegetal

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: 23/03/2022

### **Banca Examinadora**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elen Aquino Perpetuo

Universidade Federal de São Paulo - Instituto do Mar

Dr<sup>ª</sup>. Leticia Maria Zanphorlin

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - LNBR

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas

Universidade de São Paulo – Instituto de Química

*Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, Vera Sampaio, pelo amor, dedicação e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que me concedeu.

Agradeço aos meus pais em especial a minha mãe pela sua doação, conselhos, amor, apoio, dentre tantas outras coisas que não caberiam em uma simples folha de papel.

Ao meu noivo e amigo Robson pelo companheirismo, amor e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador prof. Felipe Chambergo por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, confiança e paciência. Minha eterna gratidão!

A prof<sup>a</sup>. Viviane Nunes não somente pelo suporte material e ajuda durante a realização deste trabalho, mas também pelo carinho e confiança.

Ao prof. José Ribamar por sempre estar disposto em compartilhar seus conhecimentos. Tenho uma enorme admiração pelo seu trabalho como educador e pesquisador!

As minhas amigas e amigos de laboratório Brisa, Bruna, Bianca, Jeniffer e Rafael pelo carinho, ajuda e compartilhamento de conhecimento. Apesar do pouco tempo que passamos juntos, tivemos momentos maravilhosos que jamais esquecerei. Amo vocês!

A todos os colegas de laboratório que tive a oportunidade de conhecer e aprender um pouco com as experiências e vivências de cada um, Amanda, Daniela, Flávio, Gabriel, Giovanna, Gustavo, Izabela, Myrian, Patrícia e Thiago, meu muito obrigada!

Ao meu amigo Renan por todo o conhecimento e ajuda prestada. Apesar de distante sempre respondia minhas mensagens prontamente, sendo gentil e atencioso.

Ao meu amigo Gabriel e a Elvira que tiveram uma importante contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários da instituição pelos serviços prestados, em especial ao técnico Clarino e Fernanda, pela gentileza, disposição e auxílio.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito o convite e disponibilizar seu tempo para a leitura e a apresentação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.*

Paulo Freire



## RESUMO

MELO, Vandierly Sampaio de. **Caracterização de glicosil hidrolases envolvidas na degradação de biomassa vegetal**. 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2022. Versão corrigida.

Em virtude da crescente demanda por energia e de problemas ambientais causados pelo consumo de combustíveis fósseis, tem-se aumentado a necessidade de produção de combustíveis renováveis. O etanol de segunda geração (2G) surgiu como uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis devido ao uso de biomassa vegetal como matéria-prima. Para que haja o processo de hidrólise enzimática da biomassa vegetal e obtenção de açúcares fermentáveis é fundamental o uso de diversas enzimas, tais como endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases e  $\beta$ -xilosidases. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo caracterizar as enzimas glicosil hidrolases endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase e  $\beta$ -xilosidase de *Geobacillus* sp. JS12 e *Geobacillus thermodenitrificans*, respectivamente. Os genes das enzimas putativas, endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA) e  $\beta$ -xilosidase (GeoXIL) foram obtidos a partir de análises da base de dados CAZy e posteriormente sintetizados e clonados para a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21. Análises de bioinformática foram realizadas da sequência de aminoácidos da GeoARA e GeoXIL. As enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose e realizou-se a caracterização bioquímica e análises de termoestabilidade por dicroísmo circular. As enzimas GeoARA e GeoXIL foram agrupadas dentro da família de glicosil hidrolases 43 (GH43). A partir dos testes de atividade, notou-se que a GeoARA possui maior atividade em pH 7,0 e temperatura de 70 °C, enquanto a GeoXIL possui maior atividade em pH 5,0 e temperatura de 60 °C. Nos testes com íons metálicos e EDTA, ambas as enzimas foram estáveis. Verificou-se que a GeoARA possui uma boa estabilidade térmica em 70 °C, principalmente na presença do íon  $\text{Co}^{2+}$  após 48 horas, enquanto que a GeoXIL apresentou maior estabilidade a 50 °C por 4 horas. A GeoARA possui uma significativa atividade sobre a arabinana desramificada (226,67 U/mg) e eficiência catalítica de 53 mL/mg/s. Por sua vez, a GeoXIL apresentou atividade bifuncional de  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, com maior atividade sobre o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo. A atividade específica sobre o p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo foi de 18,33 U/mg e eficiência catalítica de 20,21 /mM/s; comparável com outras  $\beta$ -xilosidases. A atividade em elevadas temperaturas, termoestabilidade e estabilidade a íons metálicos são características desejáveis a enzimas industriais. Nesse sentido, as enzimas GeoARA e GeoXIL apresentam características bioquímicas interessantes para aplicação na hidrólise enzimática de biomassa vegetal.

Palavras-chave: GH43. Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase.  $\beta$ -xilosidase. Etanol de segunda geração. Enzimas termoestáveis.

## ABSTRACT

MELO, Vandierly Sampaio de. **Characterization of glycosyl hydrolases involved in plant biomass degradation**. 2022. 96 p. Dissertation (Master of Science) – Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2022. Corrected version.

Due to the growing demand for energy and environmental problems caused by the consumption of fossil fuels, the need to produce renewable fuels has increased. Second generation ethanol (2G) has emerged as a promising alternative to fossil fuels due to the use of plant biomass as a feedstock. In order to enzymatic hydrolysis the plant biomass and obtain fermentable sugars, it is essential to use several enzymes, such as endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases and  $\beta$ -xylosidases. Thus, this work aimed to characterize the glycosyl hydrolases enzymes endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase and  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus* sp. JS12 and *Geobacillus thermodenitrificans*, respectively. The genes sequences corresponding to the putative endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA) and  $\beta$ -xylosidase (GeoXIL) enzymes were recovered from analyzes of the CAZy database and later synthesized and cloned for the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21. Bioinformatics analysis was performed on the amino acid sequence of GeoARA and GeoXIL. The enzymes were purified by affinity chromatography on a nickel-sepharose column and biochemical characterization and thermostability analysis by circular dichroism were performed. The enzymes GeoARA and GeoXIL were grouped within the family of glycosyl hydrolases 43 (GH43). Through activity tests, it was found that GeoARA has greater activity at pH 7.0 and temperature of 70 °C while GeoXIL has greater activity at pH 5.0 and temperature of 60 °C. In tests with metal ions and EDTA, the enzymes were stable. It was found that GeoARA has a good thermal stability at 70 °C, mainly in the presence of the  $\text{Co}^{2+}$  ion after 48 hours, while GeoXIL showed greater stability at 50 °C for 4 hours. GeoARA has significant activity on debranched arabinan (226.67 U/mg) and catalytic efficiency of 53 mL/mg/s. In fact, GeoXIL showed bifunctional activity of  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, with greater activity on the substrate p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside. The specific activity on p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside was 18.33 U/mg and catalytic efficiency of 20.21 /mM/s, comparable to other  $\beta$ -xylosidases. The activity at high temperatures, thermostability and stability to metal ions are desired characteristics for industrial enzymes. In this sense the GeoARA and GeoXIL enzymes present interesting biochemical characteristics for application in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.

Keywords: GH43. Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase.  $\beta$ -xylosidase. Second generation ethanol. Thermostable enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos principais constituintes da parede celular da cana-de-açúcar e local de atuação das enzimas $\beta$ -xilosidase (GeoXIL) e endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA)..	26
Figura 2: Representação esquemática do mapa físico dos plasmídeos..	32
Figura 3: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da GeoARA.....	41
Figura 4: Árvore filogenética gerada a partir da sequência de aminoácidos da GeoARA e outras sequências de endo-arabinanases obtidas pelo UniProt..	43
Figura 5: Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases..	44
Figura 6: Mecanismo de catálise da GeoARA. ....	45
Figura 7: Estrutura terciária predita da GeoARA.....	46
Figura 8: Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície da GeoARA. ....	47
Figura 9: Purificação da GeoARA por cromatografia de afinidade. ....	48
Figura 10: Efeito do pH na atividade da GeoARA.....	50
Figura 11: Efeito da temperatura na atividade da GeoARA.....	52
Figura 12: Termoestabilidade da GeoARA a 4 °C.....	53
Figura 13: Influência de íons metálicos, EDTA e BSA na atividade da GeoARA. ....	54
Figura 14:: Influência de detergentes na atividade da GeoARA. ....	55
Figura 15: Curva de progresso da reação catalisada pela GeoARA. ....	56
Figura 16: Perfil estrutural de dicroísmo circular da enzima GeoARA na ausência e presença do íon $\text{Co}^{2+}$ .....	59
Figura 17: Perfil de desnaturação térmica por dicroísmo circular da GeoARA na ausência e presença do íon $\text{Co}^{2+}$ .....	59
Figura 18: Sequência de aminoácidos da GeoXIL. ....	60
Figura 19: Árvore filogenética gerada a partir da sequência de aminoácidos da GeoXIL e outras sequências de $\beta$ -xilosidases obtidas pelo UniProt. ....	62
Figura 20: Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de $\beta$ -xilosidases..	63
Figura 21: Mecanismo de catálise de XynB3.....	64
Figura 22: Estrutura tridimensional predita da GeoXIL.....	67
Figura 23: Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície da GeoXIL. 1.....	68
Figura 24: Purificação da enzima GeoXIL por cromatografia de afinidade. ....	69
Figura 25: Efeito do pH na atividade da GeoXIL. ....	72
Figura 26: Efeito da temperatura na atividade da GeoXIL. ....	74

Figura 27: Influência de íons metálicos, EDTA e BSA na atividade da GeoXIL.....	75
Figura 28: Influência de detergentes na atividade da GeoXIL. ....	77
Figura 29: Curva de progresso da reação catalisada pela GeoXIL.....	77
Figura 30: Perfil estrutural por dicroísmo circular da GeoXIL. ....	80
Figura 31: Perfil de desnaturação térmica por dicroísmo circular da GeoXIL. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biorrefinarias produtoras de Etanol 2G em escala comercial. ....	28
Tabela 2: Lista de enzimas comerciais voltadas para a degradação de biomassa vegetal e suas propriedades.....	29
Tabela 3: Dados das enzimas utilizadas neste trabalho. ....	31
Tabela 4: Substratos naturais e sintéticos .....	36
Tabela 5: Atividade específica da GeoARA para diferentes substratos testados. ....	49
Tabela 6: Dados comparativos do pH e Temperatura de endo-arabinanases de alguns microrganismos. ....	51
Tabela 7: Dados comparativos dos parâmetros cinéticos de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases de alguns microrganismos. ....	57
Tabela 8: Dados comparativos do estado oligomérico de $\beta$ -xilosidases GH43 cristalizadas...	70
Tabela 9: Atividade específica da GeoXIL para diferentes substratos testados.....	71
Tabela 10: Dados comparativos do pH e Temperatura de $\beta$ -xilosidases de alguns microrganismos. ....	73
Tabela 11: Dados comparativos dos parâmetros cinéticos de $\beta$ -xilosidases de alguns microrganismos. ....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
Å	Angstrom
BSA	Albumina de soro bovino
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
CD	Dicroísmo circular
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Densidade óptica
EC	Número de comissão de enzima
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GEE	Gases de efeito estufa
GH	Glicosil hidrolases
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	Pares de base
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1	ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO .....	18
1.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	19
<b>1.2.1</b>	<b>Celulose.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Hemicelulose.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Pectina.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Lignina.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.5</b>	<b>Hidrólise da biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>23</b>
1.3	ENZIMAS GLICOSIL HIDROLASES .....	23
<b>1.3.1</b>	<b><math>\beta</math>-xilosidase .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Endo-<math>\alpha</math>-1,5-L-arabinanase .....</b>	<b>25</b>
1.4	BACTÉRIAS PRODUTORAS DE GLICOSIL HIDROLASES .....	26
1.5	BIORREFINARIAS DE LIGNOCELULOSE.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1	SELEÇÃO E SÍNTESE DOS GENES ALVOS.....	31
3.2	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	32
<b>3.2.1</b>	<b>Análise da sequência gênica e proteica.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Alinhamento múltiplo de sequências e construção da árvore filogenética</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Predição da estrutura tridimensional .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície.....</b>	<b>33</b>
3.3	BACTÉRIAS, CONDIÇÕES DE CULTURA E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	34
3.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE .....	34
3.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	35

3.5.1	<b>Especificidade ao substrato</b> .....	35
3.5.2	<b>Influência do pH e temperatura</b> .....	37
3.5.3	<b>Influência de íons metálicos e reagentes químicos</b> .....	38
3.5.4	<b>Cinética enzimática</b> .....	38
3.6	<b>ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E ESTABILIDADE TÉRMICA POR DICROÍSMO CIRCULAR</b> .....	39
3.6.1	<b>Endo-<math>\alpha</math>-1,5-L-arabinanase (GeoARA)</b> .....	39
3.6.2	<b><math>\beta</math>-xilosidase (GeoXIL)</b> .....	39
3.7	<b>ANÁLISE DE DADOS</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1	<b>ENDO-<math>\alpha</math>-1,5-L-ARABINANASE (GeoARA)</b> .....	41
4.1.1	<b>Análises de bioinformática</b> .....	41
4.1.2	<b>Expressão e purificação da GeoARA</b> .....	48
4.1.3	<b>Especificidade ao substrato</b> .....	49
4.1.4	<b>Influência do pH e temperatura</b> .....	50
4.1.5	<b>Influência de íons metálicos e reagentes químicos</b> .....	53
4.1.6	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos</b> .....	55
4.1.7	<b>Análise de termoestabilidade por Dicroísmo Circular</b> .....	58
4.2	<b><math>\beta</math>-XILOSIDASE (GeoXIL)</b> .....	60
4.2.1	<b>Análises de bioinformática</b> .....	60
4.2.2	<b>Expressão e purificação da GeoXIL</b> .....	69
4.2.3	<b>Especificidade ao substrato</b> .....	71
4.2.4	<b>Influência do pH e temperatura</b> .....	72
4.2.5	<b>Influência de íons metálicos e reagentes químicos</b> .....	75
4.2.6	<b>Determinação dos parâmetros cinéticos</b> .....	77
4.2.7	<b>Análise de termoestabilidade por Dicroísmo Circular</b> .....	78
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82



<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE A – PREPARO DE SUBSTRATOS NATURAIS E SINTÉTICOS.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Fatores como o crescimento populacional e o aumento do desenvolvimento industrial contribuem para uma maior demanda por energia. Entretanto, o uso de combustíveis fósseis tem acarretado no aumento da emissão de gases de efeito estufa (GEE) e na diminuição da disponibilidade desta fonte de energia, visto sua natureza não renovável. Neste contexto, fontes de energia sustentáveis e ecologicamente corretas são necessárias para atender às necessidades energéticas dos países (AGUIAR et al., 2021; CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2017; ZHOU et al., 2012).

Diante destes problemas, biocombustíveis como o etanol, butanol e biodiesel têm despertado interesse de pesquisadores, indústrias e governos (DEMAIN; NEWCOMB; WU, 2005; HILL et al., 2006). Em particular, o etanol é considerado um combustível promissor que pode fornecer uma alternativa ao uso da gasolina no setor de transportes (ROBAK; BALCEREK, 2018). Globalmente, o setor de transportes é um dos principais consumidores de energia, correspondendo a 29% do total em 2018 em relação a outros setores (IEA, 2020). É importante ressaltar que, mundialmente, mais de 90% da energia usada nesse setor é oriunda de combustíveis derivados do petróleo, principalmente gasolina e diesel (IEA, 2020; EPA, 2022). No Brasil, o setor de transporte é o principal responsável pela emissão de CO<sub>2</sub>, seguido da indústria e produção de eletricidade e calor (IEA, 2022).

Nos EUA, o uso de etanol na gasolina em 2020 reduziu as emissões de GEE do setor de transportes em 47,3 milhões de toneladas. Isso equivale a remover 10,1 milhões de carros da estrada por um ano. Além de reduzir as emissões de GEE, o uso de etanol também permite a redução das emissões de outros poluentes nocivos ao homem e ao meio ambiente, como o monóxido de carbono, hidrocarbonetos de escape, benzeno e material particulado fino (RFA, 2022a).

Com o objetivo de promover a produção de etanol e biodiesel a partir de diversas fontes disponíveis no Brasil, o governo brasileiro declarou uma nova política nacional de biocombustíveis (RenovaBio) em dezembro de 2017. O principal instrumento do RenovaBio é o estabelecimento de metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, de forma a incentivar o aumento da produção e da participação de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (ANP, 2022a). Em suma, o etanol de segunda geração, juntamente com combustíveis de primeira geração fornecem o impulso necessário para enfrentar os problemas citados (CHANDEL et al., 2019).

## 1.1 ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO

O CO<sub>2</sub> é o principal gás do efeito estufa. Apesar da liberação deste gás proveniente da combustão do etanol, o fluxo de CO<sub>2</sub> liberado deste biocombustível se constitui como um ciclo fechado, o que significa que a mesma proporção de CO<sub>2</sub> liberado é novamente reciclado e incorporado na biomassa vegetal devido à fotossíntese e a síntese de celulose. Assim, o etanol representa uma fonte de energia renovável, no qual não é adicionado CO<sub>2</sub> líquido na atmosfera, fazendo deste combustível uma fonte de energia ambientalmente benéfica (EPA, 2021).

Em 2019, a produção global de etanol atingiu 29 bilhões de galões. O Brasil e os Estados Unidos são os líderes mundiais, juntos representando 84% de toda a produção (RFA, 2022b). No Brasil, o etanol é produzido quase exclusivamente a partir do caldo da cana-de-açúcar e melaço, enquanto que nos EUA, é obtido a partir do amido de milho (GOLDEMBERG, 2007; SOCCOL et al., 2019). Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP (2022b), em 2019, a produção de etanol no Brasil alcançou 222 milhões de barris (35.306.704 m<sup>3</sup>). Apesar desta produção, é importante salientar que apenas um terço da biomassa da cana-de-açúcar é usada para a produção de bioenergia, enquanto outro terço (correspondente ao bagaço), é queimado para a produção de eletricidade, e o terço restante é deixado no campo (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008). Assim, o desenvolvimento de tecnologias para produção de etanol a partir do bagaço de cana possibilitaria um aumento considerável no rendimento da produção de etanol, com uma produção potencial de 600 milhões de galões a partir de 10 milhões de toneladas de biomassa seca (SOCCOL et al., 2010). Entretanto, alguns obstáculos ainda precisam ser superados para viabilizar tecnicamente e economicamente este processo (MACHADO, 2013; PATEL; SHAH, 2021).

O etanol de primeira geração (etanol 1G) é um biocombustível projetado para veículos rodoviários, gerado a partir de culturas alimentares com altos níveis de amido e açúcares simples (HO; NGO; GUO, 2014). Entretanto, essas matérias-primas competem com a produção de alimentos, são insuficientes para atender à crescente demanda por combustíveis, têm um impacto negativo na biodiversidade e podem levar ao desmatamento tendo em vista a ampliação de terras agrícolas (HÄGERDAL et al., 2006). Diferentemente da primeira geração, a segunda e subsequentes gerações de biocombustíveis, não competem contra o suprimento de alimentos, uma vez que são baseadas em matérias-primas não alimentares (THOMPSON; MEYER, 2013).

O etanol de segunda geração (etanol 2G) é normalmente produzido a partir de biomassa lignocelulósica presente em resíduos industriais e rejeitos de atividades agrícolas, podendo ser obtido até mesmo de lixo urbano; gerados em abundância (GONÇALVES; SANTOS;

MACEDO, 2015; RODRIGUES, 2011). Assim, a matéria-prima para esse biocombustível é relativamente barata, além de amplamente disponível (ACHINAS; EUVERINK, 2016). A lignocelulose é considerada uma fonte de carbono renovável e sustentável e ocorre em muitas matérias-primas vegetais (KIM; BLOCK; MILLS, 2010). Entretanto, a conversão de lignocelulose em açúcares redutores é mais difícil do que a conversão de amido (ROBAK; BALCEREK, 2018). Ou seja, o principal desafio na produção de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica é a transformação dos polímeros complexos em açúcares simples que podem ser assimilados por microrganismos durante a fermentação (SOCCOL et al., 2019).

## 1.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Um melhor entendimento da estrutura da biomassa lignocelulósica e de seus constituintes é de fundamental importância para a determinação dos parâmetros dos processos para a máxima obtenção de energia a partir da biomassa. A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, além de pectina e proteínas (MACHADO, 2013).

Em geral, a celulose é o polímero mais abundante, correspondendo de 34 a 50% da massa seca, seguida pela hemicelulose (19 a 34%) e lignina (11 a 30%) (CAGNON et al., 2009). A proporção de cada um dos polímeros na biomassa lignocelulósica varia consideravelmente entre as espécies vegetais, bem como dentro de uma mesma espécie, sendo dependente do tipo de tecido, fatores ambientais e estágio de desenvolvimento (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

### 1.2.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal e o composto orgânico mais abundante na natureza. Está é definida como um polímero não ramificado composto unicamente por subunidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011). A celulose ocorre na natureza em duas formas: cristalina e amorfa. A forma cristalina corresponde a 40 a 70% da celulose presente na parede celular vegetal (DEEPIKA et al., 2021) e consiste de cadeias de celulose orientadas paralelamente e fortemente ligadas por ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals* (WADA; IKE; TOKUYASU, 2010). Essas interações resultam em uma estrutura altamente organizada que é resistente à hidrólise enzimática; assim como à maioria dos produtos químicos e solventes (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Alternando com os domínios cristalinos predominantes, a celulose também contém regiões menos compactas e organizadas, sendo esta conformação denominada de celulose amorfa. Este menor grau de organização resulta em um maior distanciamento entre as cadeias, tornando essas regiões alvos importantes para diferentes

reagentes, incluindo hidrolisantes químicos e enzimas (CIOLACU et al., 2011; PÉREZ et al., 2002).

### 1.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, cuja natureza química varia entre tecidos, estágio de desenvolvimento, bem como entre as espécies vegetais (BRINK; VRIES, 2011; GANDLA; MARTÍN; JÖNSSON, 2018; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). O papel deste polissacarídeo é fornecer uma ligação entre a lignina e celulose (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). A hemicelulose pode ser composta por diferentes resíduos de carboidratos, incluindo pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose e L-ramnose) e ácidos urônicos (ácido D-galacturônico e ácido D-glicurônico e 4-O-metil-glicurônico), sendo a D-xilose e L-arabinose as pentoses mais abundantes na biomassa vegetal. Geralmente a hemicelulose é formada por 2 a 6 diferentes monômeros ligados, na maioria das vezes, por ligações do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídicas, podendo também ocorrer ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas. Em virtude da complexidade, polímeros de hemicelulose são classificados de acordo com o açúcar majoritário em sua cadeia principal e na ramificação lateral (PÉREZ et al., 2002; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011; SOCCOL et al., 2019).

A xilana é o mais frequente tipo de hemicelulose presente em plantas de madeira dura e gramíneas. A xilana de gramíneas, tendo como exemplo a cana de açúcar, apresenta uma cadeia principal constituída de D-xilopiranosil (D-xilose) com ligações do tipo  $\beta$ -D-1,4 podendo conter cadeias laterais nos carbonos 2 e 3 de resíduos de  $\alpha$ -arabinofuranosil (L-arabinose),  $\alpha$ -D-glucuronopiranosil, unidades derivadas de 4-O-metil ou grupamento acetil. Além disso, os resíduos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, nas cadeias laterais, podem ser esterificados com ácido ferúlico e ácido p-cumárico (BURLACU; CORNEA; ROMING, 2016; ZHOU et al., 2017). A xilana é ligada quimicamente à lignina pela ligação do tipo éster entre o carbono 5 do resíduo de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil e o ácido ferúlico (KROON et al., 1999).

As xilanas podem ser, ainda, classificadas em homoxilanas, que representam estruturas sem cadeias laterais (ramificações), e em heteroxilanas, aquelas que apresentam cadeias laterais. De acordo com o tipo de ramificação presente na cadeia lateral de heteroxilanas, estas podem ser denominadas: glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas ou glucuronoarabinoxilanas (BURLACU; CORNEA; ROMING, 2016; ZHOU et al., 2017).

A arabinoxilana é um dos principais componentes de matérias-primas vegetais que são atualmente estudadas como fontes para os biocombustíveis e também são as principais hemiceluloses das gramíneas (LAGAERT et al., 2014; PENG et al., 2012). A arabinoxilana é constituída de uma cadeia principal de unidades D-xilopiranosil unidas por ligações do tipo  $\beta$ -

1,4 que apresentam substituições de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil nas posições 2 e 3 nas unidades de D-xilopiranosil. Grupos acetila também podem estar presentes nessa hemicelulose na posição 2 e/ou na posição 3. Ademais, a presença de ácidos hidroxicinâmicos, ácido p-cumárico e ácido ferúlico ligados à posição 5 das porções de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil é uma característica comum da estrutura da arabinoxilana (GÍRIO et al., 2010).

### 1.2.3 Pectina

A pectina é um polissacarídeo complexo composto principalmente de ácido D-galacturônico (GalA), constituindo cerca de 35% das paredes primárias em dicotiledôneas e monocotiledônias não gramináceas e 2 a 10% em gramíneas. Além das paredes primárias, a pectina também é encontrada na lamela média. De todos os componentes, o GalA está em maior quantidade, compreendendo aproximadamente 70% da pectina. Ademais, todos os polissacarídeos pécticos contêm GalA ligados covalentemente por ligações  $\alpha$ -1,4, formando a cadeia principal. Assim como a hemicelulose, a pectina pode apresentar diferentes constituintes e ramificações e, dessa forma, pode ser distribuída em três domínios principais: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RGI) e ramnogalacturonana II (RGII) (ALBERSHEIM et al., 1996; MOHNEN, 2008; POSÉ et al., 2019).

O polissacarídeo péctico mais abundante é a homogalacturonana (HG), um homopolímero linear de GalA apresentando ligações  $\alpha$ -1,4 que compreende aproximadamente 65% da pectina presente na parede celular vegetal (MOHNEN, 2008). Os resíduos de GalA podem estar parcialmente metil-esterificados em C-6 e acetil-esterificados nas posições O-2 e/ou O-3, dependendo da fonte vegetal (WILLATS et al., 2001; YAPO, 2011).

Ao contrário da HG, a ramnogalacturonana I (RGI) é ramificada e heterogênea, e é considerada o segundo polissacarídeo mais importante das pectinas. A cadeia principal da RGI consiste na repetição de unidades de dissacarídeos (1,2)- $\alpha$ -L-ramnose-(1,4)- $\alpha$ -D-galacturônico, com 20 a 80% dos resíduos de ramnose substituídos em O-4 e/ou O-3 com cadeias laterais de arabinana, galactana ou arabinogalactana. O número de resíduos laterais varia de um único resíduo glicosil a 50 ou mais, produzindo uma família altamente variável de polissacarídeos (WILLATS et al., 2001; YAPO, 2011).

Dentre os tipos de polissacarídeos que constituem as cadeias laterais das RGI, destaca-se a arabinana. Este polissacarídeo é composto por unidades de L-arabinofuranosil unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,5, as quais podem conter ramificações de L-arabinofuranosil nas posições  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 (BELDMAN et al., 1997; SHI et al., 2014). A importância deste polímero é discutida mais adiante.

Por fim, a ramnogalacturonana II (RGII) é o polissacarídeo péctico mais complexo, que constitui cerca de 10% da pectina presente na parede celular vegetal. Sua cadeia principal é composta de, pelos menos, 8 resíduos de D-GalA unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, contendo 4 cadeias laterais heteropoliméricas, consistindo em 12 tipos diferentes de açúcares; o que inclui açúcares raros, como: D-apiose, L-ácido acérico, 2-O-metil-L-Fuc, 2-O-metil-D-Xil, L-Gal, Dha e Kdo. Esses e outros resíduos estão interligados por mais de 20 ligações glicosídicas diferentes, cuja sequência glicosil é altamente conservada em todas as plantas vasculares (MATSUNAGA et al., 2004; O'NEILL et al., 2004).

Há evidências na literatura que sugerem que polissacarídeos pécticos podem estar associados à celulose, hemicelulose, compostos fenólicos (lignina) e proteínas de parede (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Além disso, estudos recentes revelaram que interações pectina-celulose são muito mais abundantes do que as previstas de acordo com os modelos clássicos de arquitetura de parede primária, e também foram sugeridas interações covalentes únicas e estáveis entre esses polissacarídeos (LORENZO et al., 2019).

Por fim, é importante destacar que alguns polissacarídeos pécticos, como galactanas, arabinanas e arabinogalactanas podem ser descritos como um tipo de hemicelulose, pois são frequentemente isolados com esse material, conseqüentemente as enzimas que os degradam também podem ser descritas como hemicelulases (BROEKER et al., 2018; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

#### **1.2.4 Lignina**

A lignina é um complexo aromático heterogêneo, amorfo e reticulado, formado a partir de unidades de fenilpropano unidas por ligações não hidrolisáveis. Este complexo fenólico é sintetizado pela geração de radicais livres, que são liberados na desidrogenação mediada pela peroxidase de três álcoois fenilpropiônicos: álcool coniferílico (guaiacil propanol), álcool cumarílico (p-hidroxifenil propanol) e álcool sinapílico (siringil propanol). A lignina é covalentemente ligada a grupos laterais em diferentes hemiceluloses, formando uma matriz complexa que envolve as microfibrilas de celulose. Na parede celular da planta, este complexo fenólico representa de 2 a 40% da composição total. A existência de fortes ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C) na lignina fornece força à parede celular da planta e proteção contra ataques de microrganismos celulolíticos (SÁNCHEZ, 2009).

A associação entre os polímeros que compõem a matéria vegetal (celulose, hemicelulose, pectina e lignina), somando às características individuais de cada um deles, como elevado grau de cristalinidade da celulose e a complexa estrutura da lignina, resulta em um

material de estrutura rígida e recalcitrante, sendo muito resistente a ação enzimática (MACHADO, 2013).

### 1.2.5 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Para produção de etanol 1G, apenas uma parte da cana-de-açúcar é utilizada, o caldo, gerando então, resíduos de origem lignocelulósica provenientes do bagaço e da palha. Como mencionado anteriormente, estes resíduos podem ser utilizados para produção de etanol 2G, sendo necessária etapas adicionais para sua obtenção (SANTOS et al., 2012).

O processo de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol 2G e obtenção deste biocombustível envolve quatro etapas: (I) pré-tratamento: para romper a estrutura cristalina da celulose; (II) hidrólise enzimática: para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentáveis; (III) fermentação: para converter os açúcares em etanol e a (IV) destilação: que visa a separação de componentes de uma mistura, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

A degradação da lignocelulose em açúcares fermentáveis, processo denominado de sacarificação, requer muitos tipos de enzimas, em virtude da complexidade da biomassa vegetal (GOUVÊA et al., 2018). As enzimas comerciais utilizadas na desconstrução da biomassa lignocelulósica são oriundas principalmente dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (Tabela 2) (CAMPOS et al., 2014; PATEL; SHAH, 2021). No entanto, está em constante estudo o desenvolvimento de novos extratos enzimáticos ou suplementação de coquetéis enzimáticos com hemicelulases e enzimas acessórias, como oxidases e pectinases oriundas de diferentes organismos, com o intuito de melhorar o processo de sacarificação ao liberar monossacarídeos e aumentar a atividade das celulasas, que são as enzimas majoritárias (BENEDETTI et al., 2019; CAMPOS et al., 2014; CINTRA et al., 2020; GAO et al., 2011; OBENG et al., 2017).

### 1.3 ENZIMAS GLICOSIL HIDROLASES

As enzimas capazes de degradar, modificar ou criar ligações glicosídicas, são reunidas no banco de dados CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database) e agrupadas em famílias, com base na sua similaridade de sequência e estrutura tridimensional. Atualmente, estas enzimas podem ser divididas em cinco famílias: Glicosil Hidrolases (GHs), Glicosil Transferases (GTs), Liasas de Polissacarídeos (PLs), Esterases de Carboidratos (CEs) e Atividades Auxiliares (AAs) (LOMBARD et al., 2014; <http://www.cazy.org/>).

As glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-) compreendem um grupo amplo de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma



molécula de outra natureza. Dentro do grupo das GHs existem famílias especializadas na degradação da hemicelulose e polissacarídeos pécnicos. Uma destas famílias é a GH43 que abrange uma ampla variedade de enzimas:  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), xilanase (EC 3.2.1.8),  $\alpha$ -1,2-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.-), exo- $\alpha$ -1,2-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.-), exo- $\alpha$ -1,5-L-arabinase (EC 3.2.1.-),  $\beta$ -1,3-xilosidase (EC 3.2.1.-), exo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.-), endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.99), exo- $\beta$ -1,3-galactanase (EC 3.2.1.145) e  $\beta$ -D-galactofuranosidase (EC 3.2.1.146) (LOMBARD et al., 2014; <http://www.cazy.org>).

As enzimas GH43 são caracterizadas por atuarem na hidrólise da ligação glicosídica com inversão da configuração anomérica dos seus respectivos substratos e por possuírem uma estrutura tridimensional denominada de hélice  $\beta$  de cinco pás (LOMBARD et al., 2014; <http://www.cazy.org>). Essas enzimas são produzidas por diversos organismos, tais como: fungos, bactérias e plantas (PENG et al., 2012).

O presente trabalho destaca as GHs  $\beta$ -xilosidase e endo-1,5-L-arabinanase, descritas nas seções subsequentes.

### 1.3.1 $\beta$ -xilosidase

Para que ocorra a degradação completa da xilana é necessária a ação sinérgica de várias enzimas, entre as quais as endo- $\beta$ -1,4-xilanases e exo- $\beta$ -1,4-xilosidases, também denominadas de  $\beta$ -xilosidases, desempenham o papel principal. As endo- $\beta$ -1,4-xilanases atuam sobre as ligações  $\beta$ -1,4-xilosídicas internas da xilana gerando xilo-oligossacarídeos curtos. Estes, por sua vez, podem sofrer ação das  $\beta$ -xilosidases, ocorrendo a liberação de D-xilose a partir da extremidade não redutora (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2014; MARCOLONGO et al., 2019).

A importância das  $\beta$ -xilosidases não está limitada apenas à liberação de açúcares redutores, essas enzimas também contribuem para a diminuição da inibição das endo- $\beta$ -1,4-xilanases pelo seu produto (xilo-oligossacarídeos). Este fenômeno ocorre devido à sua ação catalítica levar ao consumo de xilo-oligossacarídeos (também relatados como inibidores de celulases) e, dessa forma, gerar um desbalanço de equilíbrio químico que permite as endo- $\beta$ -1,4-xilanases gerar mais xilo-oligossacarídeos. Visto isso, observa-se que as  $\beta$ -xilosidases são de fundamental importância para a degradação final das paredes das células vegetais (BHALLA; BISCHOFF; SANI, 2014; CAMPOS et al., 2014; YANG et al., 2014). Consequentemente, destaca-se a aplicação dessas enzimas não apenas para a produção de etanol 2G, mas também nas indústrias de alimentos, rações, farmacêutica e celulose e papel (TOMAZINI et al., 2019; YIN et al., 2019).

Além da família GH43, as  $\beta$ -xilosidases também são encontradas nas famílias GH1, GH2, GH3, GH10, GH30, GH39, GH52, GH54 e GH120 (LOMBARD et al., 2014; <http://www.cazy.org>). Diferentemente das GH43, as  $\beta$ -xilosidases dessas famílias catalisam a hidrólise de xilo-oligossacarídeos por meio de um mecanismo de retenção da configuração anomérica do substrato. Ambos os mecanismos, retenção e inversão, requerem dois ácidos carboxílicos e prosseguem através de um estado de transição semelhante ao íon oxocarbânio. As glicosidases de retenção utilizam um mecanismo de duplo deslocamento, em que um resíduo catalítico funciona como nucleófilo e o outro como ácido-base geral. Já as glicosidases inversoras usam um mecanismo de deslocamento único, no qual um ácido carboxílico atua como um ácido geral, protonando o oxigênio glicosídico, tornando a aglicona um melhor grupo de saída. O segundo carboxilato atua como uma base geral que ativa uma molécula de água, o que promove um ataque nucleofílico ao carbono anomérico do lado oposto da ligação glicosídica, resultando na inversão da configuração (SINNOTT, 1990).

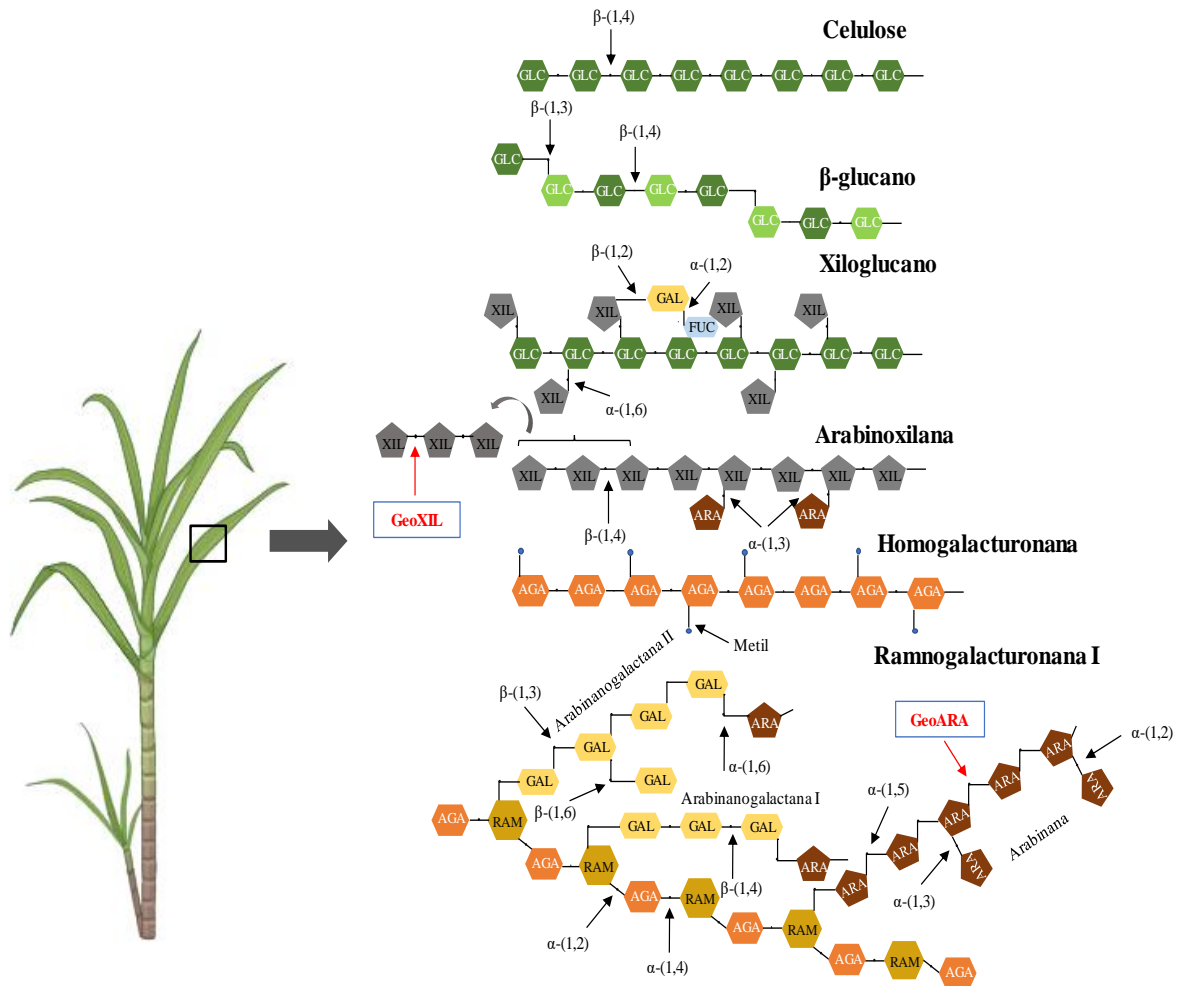
### **1.3.2 Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase**

As endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases hidrolisam as ligações internas  $\alpha$ -1,5 presentes na cadeia principal de L-arabinofuranosil da arabinana para produzir arabino-oligossacarídeos ou L-arabinoses. Para a completa degradação da arabinana também é necessária a presença de outras enzimas que atuam de modo sinérgico, sendo estas as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e as exo-1,5-arabinanases que liberam as arabinoses terminais das cadeias laterais e principal, respectivamente, a partir de arabinanas ou arabino-oligossacarídeos (CARAPITO et al., 2009; WONG; CHAN; BATT, 2008). Assim como as exo-1,5-arabinanases, as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases também possuem atividade exo, porém atuam sobre resíduos terminais  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,5-L-arabinofuranosil presentes nas cadeias laterais de diferente oligossacarídeos e polissacarídeos (NUMAN; BHOSLE, 2006; SAHA, 2000). Diferentemente das  $\beta$ -xilosidases, as enzimas endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases, até o momento, são encontradas apenas na família GH43 (LOMBARD et al., 2014; <http://www.cazy.org>).

Estudos mostraram que a suplementação de misturas de enzimas fúngicas com endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases melhorou a taxa de hidrólise da biomassa vegetal, o que aponta a importância dessas enzimas na conversão da biomassa para produção do etanol 2G (BERLIN et al., 2007; DELABONA et al., 2013; GAO et al., 2011; SANTOS et al., 2014). O produto L-arabinose resultante da ação dessas enzimas também apresenta outras aplicações, para além da obtenção de biocombustível. Este produto pode ser usado na indústria de alimentos como adoçante natural e matéria-prima para a produção de diferentes sabores; como agente redutor de açúcar no sangue e aditivo alimentar funcional (efeito inibitório sobre

a sacarase); como agente antioxidante com atividades protetoras contra a hiperglicemia; como precursor para o desenvolvimento de drogas antivirais; dentre outras possíveis aplicações (FEHÉR, 2018).

Na Figura 1, é possível observar o local de atuação das enzimas GH43  $\beta$ -xilosidase e endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (setas vermelhas), além dos principais constituintes da parede celular da cana-de-açúcar.



**Figura 1:** Estrutura química dos principais constituintes da parede celular da cana-de-açúcar e local de atuação das enzimas  $\beta$ -xilosidase (GeoXIL) e endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA). Glicose (GLC), xilose (XIL), galactose (GAL), fucose (FUC), arabinose (ARA), ácido galacturônico (AGA) e ramnose (RAM). Fonte: adaptada (LEITE, 2013).

#### 1.4 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE GLICOSIL HIDROLASES

As bactérias são importantes fontes de enzimas industriais e têm sido exploradas devido à sua capacidade natural de produzir uma ampla variedade de celulasas e hemicelulasas (MAKI; LEUNG; QIN, 2009). O presente trabalho descreve o estudo de enzimas oriundas de bactérias do gênero *Geobacillus*. Bactérias desse gênero são conhecidas por produzirem diferentes tipos de glicosil hidrolases (BARTOSIAK-JENTYS et al., 2013; BHATTACHARYA; BHATTACHARYA; PLETSCHKE, 2015). Em especial, as espécies *Geobacillus*

*stearothermophilus* e *Geobacillus thermodenitrificans* têm sido relatadas como produtoras de  $\beta$ -xilosidades de diferentes famílias (QUINTERO et al., 2007; SHALLOM et al., 2005) e de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases (ALHASSID et al., 2009; ZHANG et al., 2020).

As bactérias do gênero *Geobacillus* são bastonetes formadores de endósporos, gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Geralmente estas bactérias crescem em uma faixa de temperatura entre 35 °C a 80 °C, com temperatura ótima de 55 °C a 65 °C, e valores ótimos de pH para crescimento de 6,0 a 8,0. Membros do gênero *Geobacillus* são termófilos de grande importância biotecnológica, pois são fontes de muitas enzimas termoestáveis (KANANAVIČIUTE; ČITAVIČIUS, 2015; NAJAR; THAKUR, 2020). Para obtenção destas proteínas, convencionalmente utiliza-se um hospedeiro mesófilo, que possui um sistema de expressão bem estabelecido, geralmente a *Escherichia coli* (KANANAVIČIUTE; ČITAVIČIUS, 2015).

Apesar do elevado custo das enzimas lignocelulolíticas para a indústria de biocombustíveis, o processo de sacarificação em temperaturas mais altas apresenta várias vantagens. Enzimas termófilas e termoestáveis têm mais flexibilidade em relação às configurações do processo e elevada atividade específica que diminuem a quantidade total de enzima necessária para a hidrólise. A diminuição da viscosidade do meio reacional a alta temperatura aumenta os coeficientes de difusão dos substratos para hidrólise enzimática eficiente. Além disso, temperaturas mais elevadas diminuem o risco de contaminação microbiana. Todos esses fatores melhoram a eficiência do bioprocessamento e tornam as enzimas termófilas e termoestáveis candidatas preferidas para a produção de etanol 2G (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015).

### 1.5 BIORREFINARIAS DE LIGNOCELULOSE

O termo “biorrefinaria” tem sua origem no conceito clássico de refinaria de petróleo e faz referência à conversão de biomassa em combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado por meio da integração de processos limpos (RUIZ et al., 2013).

Biorrefinarias que empregam enzimas na degradação da biomassa vegetal já são uma realidade e apresentam grande potencial para geração de etanol 2G de forma eficiente e competitivo comercialmente. Há vários exemplos globais de biorrefinarias com base na conversão enzimática da lignocelulose em escala comercial, utilizando principalmente como matéria-prima o bagaço da cana-de-açúcar, palha da cana-de-açúcar ou palha de milho (SILVA; VAZ; FILHO, 2018). Dentre esses exemplos, seis se destacam na produção do etanol 2G: GranBio, Raízen, Poet-DSM, Beta Renewables, Abengoa e Dupont; no qual as duas primeiras são brasileiras. Ambas as iniciativas brasileiras utilizam o bagaço ou palha da cana-de-açúcar

como matéria-prima, o que está de acordo com o predomínio do bioetanol de cana-de-açúcar produzido no Brasil, devido à abundante disponibilidade de terras próprias para o cultivo dessa planta (NETO; GUIMARÃES; FREIRE, 2018). A Tabela 1 apresenta algumas características dessas empresas.

**Tabela 1:** Biorrefinarias produtoras de Etanol 2G em escala comercial.

<b>Empresa</b>	<b>Localização</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Capacidade de produção de etanol (milhões de litros/ano)</b>
DuPont Industrial BioSciences	Iowa, Estados Unidos	Palha de milho	113,5
Abengoa Bioenergy	Kansas, Estados Unidos	Palha de milho	94,6
Poet-DSM Advanced Biofuels	Iowa, Estados Unidos	Palha de milho	94,6
GranBio	Alagoas, Brasil	Palha de cana-de-açúcar	60,0
Beta Renewables	Crescentino, Itália	Palha de trigo	75,7
Raízen Energia	São Paulo, Brasil	Bagaço de cana-de-açúcar	40,0

Fonte: adaptada (NOVACANA, 2022b).

A GranBio, fundada em julho de 2011, foi a primeira empresa de etanol celulósico do Brasil. Esta companhia entrou em operação em setembro de 2014 com a Bioflex® 1, a primeira biorrefinaria produtora de etanol 2G em escala comercial do Hemisfério Sul e é a grande responsável pela produção do etanol 2G gerado a partir de resíduos de cana-de-açúcar no mundo. Instalada no município de São Miguel dos Campos – AL, a empresa tem capacidade para produzir 60 milhões de litros de etanol 2G por ano (GRANBIO, 2022a). Ademais, a GranBio possui alianças com usinas de etanol 1G para o fornecimento da matéria-prima, o que é considerado um fator crítico de competitividade para produção de renováveis. A empresa desenvolveu um sistema de recolhimento, armazenamento e processamento de palha da cana-de-açúcar equivalente a 300 mil toneladas por ano para a Bioflex® 1 que, segundo a empresa, é um dos maiores e mais competitivos sistemas do mundo (GRANBIO, 2022b).

A segunda empresa a iniciar a produção em escala comercial no Brasil, em novembro/dezembro de 2014, foi a Raízen. Esta é a maior produtora de eletricidade a partir da biomassa de cana-de-açúcar do país. A empresa utiliza tecnologia de geração de bioeletricidade a partir do bagaço, palha e folhas da cana-de-açúcar gerados por meio da produção de etanol e açúcar (processo de cogeração). Sua biorrefinaria para produção de etanol 2G foi construída em Piracicaba – SP ao lado da Usina Costa Pinto, também pertencente a Raízen. Esta biorrefinaria tem capacidade de produção de 40 milhões de litros por ano (NETO; GUIMARÃES; FREIRE, 2018; SILVA; VAZ; FILHO, 2018).

A capacidade de produção de etanol 2G no Brasil, levando em consideração apenas as plantas da GranBio e Raízen, é de 100 milhões de litros por ano. No entanto, de acordo com dados publicados pela Novacana (2022a), as duas usinas produziram apenas 6,11 milhões de litros de etanol 2G em 2019.

Embora a biomassa lignocelulósica tenha imenso potencial para obtenção de biocombustíveis, a realidade da operação das biorrefinarias lignocelulósicas envolve muitos desafios, entre os quais destaca-se o custo das enzimas aplicadas no processo de conversão da biomassa. Recentemente, várias tecnologias foram desenvolvidas para melhorar os processos de conversão, contudo, o objetivo atual é tornar esse sistema competitivo em termos de custos (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017; NETO; GUIMARÃES; FREIRE, 2018; VAN RIJN et al., 2018).

Como destacado anteriormente, as enzimas são um elemento central na produção de etanol 2G. Contudo, atualmente a GranBio e Raízen têm à disposição apenas enzimas produzidas no exterior. Ambas as companhias utilizam enzimas produzidas pela empresa dinamarquesa Novozymes (GRANBIO, 2022c). Globalmente, existem duas empresas que se destacam na produção de enzimas usadas na conversão de biomassa, Novozymes e Genencor (Tabela 2) (PATEL; SHAH, 2021).

**Tabela 2:** Lista de enzimas comerciais voltadas para a degradação de biomassa vegetal e suas propriedades.

Nome do Produto	Empresa	Organismo Produtor	pH	Temperatura (°C)
Celluclast 1.5 L	Novozymes (Dinamarca)	<i>Trichoderma reesei</i>	5,0	50
Cellic CTec 2	Novozymes (Dinamarca)	–	5,0 – 5,5	45 – 50
Cellic CTec 3	Novozymes (Dinamarca)	–	4,75 – 5,25	50 – 55
Spezyme	Genencor (EUA)	<i>Trichoderma reesei</i>	4,0	50
Accellerase®1500	Genencor (EUA)	<i>Trichoderma reesei</i> <sup>a</sup>	4,0 – 5,0	50 – 65
Accellerase®1000	Genencor (EUA)	<i>Trichoderma reesei</i> <sup>a</sup>	4,0 – 5,0	50
Cellulase TAP10	Amano Enzyme (EUA)	<i>Trichoderma viride</i>	5,0	50
Cellulase AP30 K	Amano Enzyme (EUA)	<i>Aspergillus niger</i>	4,5	60

a: geneticamente modificado.

Fonte: adaptado (PATEL; SHAH, 2021).

A principal vantagem de uma enzima produzida nacionalmente é a redução de custos de produção do etanol 2G, que são ainda considerados uma barreira para a competitividade do biocombustível. As enzimas representam entre 30% a 40% do custo da produção (GRANBIO, 2022c; PATEL; SHAH, 2021). Dessa forma, torna-se necessária a produção e comercialização de enzimas nacionais que possam ser utilizadas até mesmo em outras indústrias, como de nutrição animal, alimentos e bebidas (LI; CHANG; LIU, 2018; MAMO, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as enzimas glicosil hidrolases recombinantes  $\beta$ -xilosidase (GeoXIL) e endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA) de *Geobacillus thermodenitrificans* e *Geobacillus* sp. JS12, respectivamente, produzidas em *E. coli*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises de bioinformática da sequência gênica e proteica da GeoXIL e GeoARA;
- Clonar os genes *GeoARA* e *GeoXIL* e expressar as enzimas recombinantes em *E. coli* BL21;
- Purificar as enzimas recombinantes por cromatografia de afinidade;
- Determinar as características bioquímicas das enzimas recombinantes;
- Verificar o perfil da estrutura secundária e termoestabilidade das enzimas por meio de dicroísmo circular (CD).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais para condução do presente trabalho foram realizados no laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidade da Universidade de São Paulo (EACH - USP).

#### 3.1 SELEÇÃO E SÍNTESE DOS GENES ALVOS

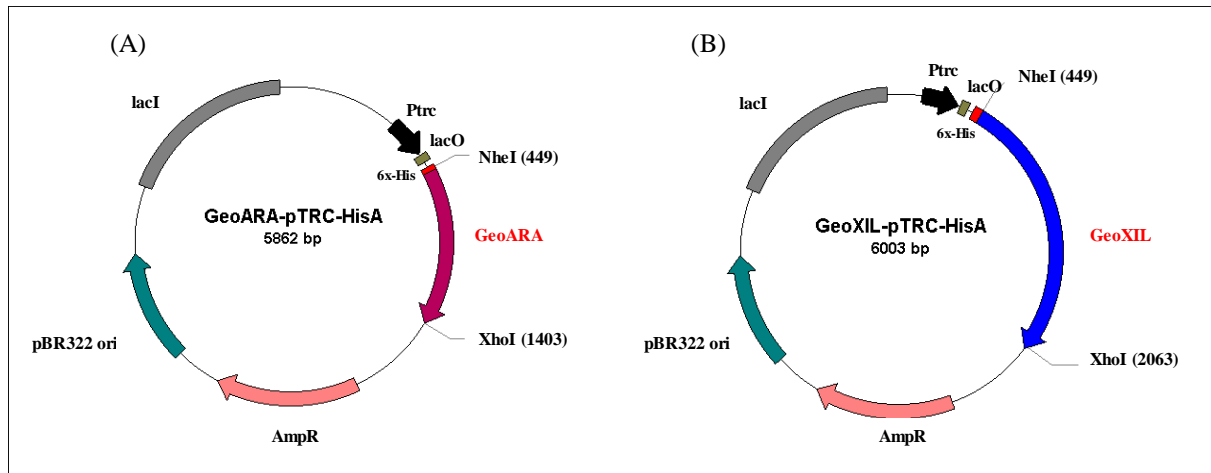
A seleção das enzimas alvo foi realizada por meio de pesquisa no banco de dados de domínio público CAZy (<http://www.cazy.org/>), utilizando como critério de seleção: a putativa atividade de hemicelulase, o ano de depósito (mais recentes) e ausência de trabalhos relacionados com a caracterização de tais enzimas (Tabela 3). As sequências gênicas obtidas, disponíveis no GenBank (NCBI, EUA), foram sintetizadas pela empresa ThermoFisher (EUA) e clonadas no vetor pTrc-HisA (Invitrogen™) para a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*. As enzimas recombinantes foram sintetizadas em fase de leitura com uma cauda de fusão de histidinas (6xHis) na extremidade N-terminal, para possibilitar a purificação por cromatografia de afinidade posteriormente.

**Tabela 3:** Dados das enzimas utilizadas neste trabalho.

Enzima	Organismo	Família CAZy	GenBank	Referência
$\beta$ -xilosidase (GeoXIL)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	GH43	ARP42883.1	DAAS et al., 2018
Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA)	<i>Geobacillus</i> sp. JS12	GH43	AMQ20692.1	JEON et al., 2016

O vetor pTrc-HisA de 4,4 kb, apresenta uma origem de replicação pBR322, a região promotora trc (Ptrc), uma cópia do gene *lacI*, operador *lac* (*lacO*), o gene que confere resistência a ampicilina ( $\text{Amp}^R$ ) e uma sequência que codifica seis resíduos de histidinas (6xHis). Os genes das enzimas selecionadas foram clonados em fase de leitura entre os sítios de restrição *NheI* e *XhoI* (Figura 2).





**Figura 2: Representação esquemática do mapa físico dos plasmídeos.** Em A: vetor de expressão pTRC-HisA contendo o gene da GeoARA (948 pb). Em B: vetor de expressão pTRC-HisA contendo o gene da GeoXIL (1608 pb).

## 3.2 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

### 3.2.1 Análise da sequência gênica e proteica

A sequência gênica da GeoARA (GenBank: CP014749.1) e GeoXIL (GenBank: CP020030.1) foram utilizadas para obtenção de informações sobre seu respectivo produto gênico. A tradução *in silico* das sequências foi realizada com a ferramenta Translate (<https://web.expasy.org/translate/>). As sequências de aminoácidos obtidas foram utilizadas para a predição do tamanho das proteínas com a ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Realizou-se também a identificação de domínios usando o banco de dados Pfam (<http://pfam.xfam.org/>).

### 3.2.2 Alinhamento múltiplo de sequências e construção da árvore filogenética

De forma a analisar a relação evolutiva da GeoARA e GeoXIL com outras enzimas de mesma função, foi realizada a busca por enzimas com atividade de arabinanase e  $\beta$ -xilosidade, respectivamente, no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Selecionou-se 33 sequências proteicas revisadas de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (Swiss-Prot) e 18 sequências proteicas revisadas (Swiss-Prot) e 6 sequências proteicas não revisadas de  $\beta$ -xilosidade (TrEMBL). As sequências obtidas juntamente com a sequência alvo (GeoARA ou GeoXIL), foram alinhadas usando o programa ClustalX2 (<http://www.clustal.org/clustal2/>). As confecções das árvores filogenéticas também foram realizadas pelo ClustalX2, utilizando o algoritmo *neighbor-joining*, com o cálculo de *bootstrap* baseado em 1000 reamostragens, para garantir a consistência dos nós das árvores. Para visualização das árvores utilizou-se o programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>). Análises de BLASTp foram feitas pelo servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a fim de obter a porcentagem de

identidade da GeoARA e GeoXIL em relação a outras endo-arabinanases e  $\beta$ -xilosidades, respectivamente. As figuras dos alinhamentos foram obtidas pelo programa ESPript 3.0 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>). Os putativos resíduos catalíticos da GeoARA e GeoXIL foram preditos a partir dos resultados obtidos dos alinhamentos, os quais incluem sequências de enzimas com estrutura elucidada.

### 3.2.3 Predição da estrutura tridimensional

A estrutura tridimensional da GeoARA e GeoXIL foram preditas com base na abordagem de modelagem por homologia utilizando o servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Adotou-se como molde para a GeoARA a estrutura da endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase de *Geobacillus thermodenitrificans* TS-3 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q93HT9 e GenBank: BAB64339.1) com PDB ID: 1WL7 determinada por cristalografia com difração de raios-X (resolução de 1.90 Å). Já para a GeoXIL, utilizou-se como molde a estrutura da exo- $\beta$ -1,4-xilosidade de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (UniProtKB/TrEMBL: Q09LX0 e GenBank: ARP42883.1) com PDB ID: 2EXH, também determinada por cristalografia com difração de raios-X (resolução de 1.88 Å). Após a obtenção dos modelos 3D, estes foram submetidos ao servidor SAVES v6.0 para análise da qualidade da estrutura usando o gráfico de Ramachandran (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Posteriormente, realizou-se um refinamento dos parâmetros estereoquímicos das estruturas utilizando o programa GalaxyRefine do servidor GalaxyWEB (<http://galaxy.seoklab.org/>). A avaliação das estruturas finais foi feita por meio do programa QMEAN disponível no servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>). O programa PyMol v.2.4. (<https://pymol.org/2/>) foi utilizado para visualização e obtenção de figuras dos modelos 3D. Para a predição das estruturas secundárias e ligações dissulfeto utilizou-se o servidor PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>).

### 3.2.4 Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície

Para predição do perfil de hidrofobicidade da GeoARA e GeoXIL foi utilizado um gradiente de cores com base na classificação experimental de propriedades de aminoácidos de Eisenberg (EISENBERG et al., 1984). De acordo com o gradiente de cores, as regiões nas enzimas indicadas em vermelho possuem alta hidrofobicidade e as regiões indicadas em branco possuem baixa hidrofobicidade.

Para predição da distribuição do potencial eletrostático da superfície das enzimas, foi utilizado o *script* Adaptive Poisson - Boltzmann Solver (APBS) (BAKER et al., 2001; FOGOLARI; BRIGO; MOLINARI, 2002), que apresenta um gradiente de potencial negativo

para positivo, representado por cores. As regiões nas enzimas indicadas em vermelho são carregadas negativamente e as regiões indicadas em azul são carregadas positivamente.

A intensidade das cores está diretamente relacionada com o grau de hidrofobicidade e potencial eletrostático, respectivamente. Para a geração e visualização das imagens utilizou-se o programa PyMol v.2.4 (<https://pymol.org/2/>).

### 3.3 BACTÉRIAS, CONDIÇÕES DE CULTURA E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Uma alíquota de 1 µg do vetor pTrcHisA contendo o gene de interesse (*GeoARA* ou *GeoXIL*) foi utilizado para transformação por eletroporação de células de *E. coli* BL21 (GE Life Science, EUA) eletrocompetentes (50 µL). A eletroporação foi conduzida no aparelho Electroporador 2510 (Eppendorf, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. Após o pulso de corrente elétrica, a bactéria foi recuperada em 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) e incubada a 37 °C por 1 hora, sob agitação constante de 150 rpm. Após este período as células foram semeadas em meio LB ágar + ampicilina (100 µg/mL) e incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas. Em seguida, uma colônia isolada de cada transformante foi armazenada a - 80 °C em meio LB acrescido de glicerol 15% para uso posterior.

### 3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE

As enzimas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21 nas seguintes condições: o inóculo foi realizado em 200 mL de meio LB acrescido com ampicilina (100 µg/mL), em Erlenmeyer aletado de 2 L, a 37 °C e acompanhado o crescimento celular até atingir densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de aproximadamente 0,8 – 1,2. A indução da produção das proteínas recombinantes foi realizada com a adição de 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG - Sigma-Aldrich, EUA) durante a noite (*overnight*).

A massa bacteriana foi coletada por centrifugação a 4000 rpm, 4 °C, por 20 minutos (Hitachi - Himac CR21F, Japão), suspensa em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e realizada a lise celular por sonicação, utilizando o desruptor de células Eco-sonics (Ultronique, Brasil) nas seguintes condições: seis ciclos de operação em banho de gelo (1 minuto de pulso e 2 minutos de pausa) e 99% de potência. O conteúdo lisado foi centrifugado a 8000 rpm, 4 °C, por 20 minutos (Hitachi - Himac CR21F, Japão) e o sobrenadante (fração solúvel) resultante foi coletado, filtrado em membrana 0,45 µm e usado na etapa de purificação.

O processo de purificação foi realizado no aparelho AKTA purifier FPLC (GE Life Science, EUA). A técnica utilizada foi a cromatografia por afinidade com resina ligada ao níquel. A escolha do método de purificação foi baseada na estratégia de expressão das enzimas

recombinantes que foram fusionadas a uma cauda de histidinas (6xHis), que possui afinidade pelo íon níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ).

No início do processo de purificação, a coluna HisTrap Chelating (GE life science, EUA) de 10 mL de volume de coluna (VC) com a resina de sefarose carregada com sulfato de níquel (0,1 M), foi equilibrada com 3 VC de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Um volume de aproximadamente 20 mL do sobrenadante filtrado do lisado bacteriano, foi aplicado e a coluna lavada com 4 VC de tampão de ligação. A etapa de eluição foi iniciada com o aumento do gradiente de 0 a 100% do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M de imidazol) em 4 VC e a eluição final ocorreu com 2 VC de tampão de eluição. A fim de verificar a eficiência do processo de purificação e determinação da massa molecular da enzima, foi realizado a eletroforese em gel de poliacrilamida (12% ou 8%) desnaturante contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Quando necessário, as enzimas foram preparadas em tampão de amostra não denaturante para aplicação no SDS-PAGE (Glicerol 87%, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,1%). Utilizou-se o programa GeoAnalyzer 19.1 para auxiliar no processo de determinação da massa molecular das enzimas (<http://www.gelanalyzer.com/>).

As frações coletadas após a purificação foram concentradas e dialisadas por filtração (Vivaspin Turbo VS15T01, membrana de 10 kDa (GeoARA) ou 30 kDa (GeoXIL), Sartorius) a 3000 rpm, 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha). A diálise foi realizada em tampão *MacIlvine* (fosfato dissódico/ácido cítrico) 50 mM, pH 6,0. Feito isso, estimou-se a concentração das proteínas purificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão.

### 3.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### 3.5.1 Especificidade ao substrato

A atividade da GeoARA e GeoXIL foi avaliada utilizando substratos naturais obtidos da empresa Megazyme (Irlanda) e substratos sintéticos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA) (Tabela 4), preparados conforme descrito no Apêndice A.

A atividade enzimática foi analisada em triplicata utilizando, primeiramente, os substratos sintéticos. O meio reacional (100  $\mu\text{L}$ ) preparado em tubos de 1,5 mL contendo 1 mM de substrato, tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 6,0 e 2  $\mu\text{g/mL}$  da enzima, foi incubado por 10 minutos a 40 °C, 1000 rpm em Thermomixer comfort (Eppendorf, EUA). A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M e o p-nitrofenol liberado foi medido por espectrofotometria a 410 nm no equipamento de leitura de microplacas (Infinite M200pro, TECAN, Suíça). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como

a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto, sob as condições da reação.

**Tabela 4:** Substratos naturais e sintéticos.

Substrato	N ° catálogo	Empresa
<b>Naturais</b>		
Arabinana ramificada de beterraba-sacarina	P-ARAB	
Arabinana desramificada de beterraba-sacarina	P-DBAR	
Arabinoxilana de centeio de alta viscosidade	P-RAXY	
Arabinoxilana de farinha de trigo	P-WAXYRS	Megazyme
Xilana de madeira de faia	P-XYLNBE	
Xiloglucana de tamarindo	P-XYLGLN	
$\beta$ -glucana de cevada de baixa viscosidade	P-BGBL	
Galactomanana de alfarroba de baixa viscosidade	P-GALML	
Ramnogalacturonana I de batata	P-RHAMI	
<b>Sintéticos</b>		
p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNP-Ara)	N3641	
p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (pNP-Gal)	N1127	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (pNP-Glu)	N7006	
p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNP-Xil)	N2132	

Em seguida, foi testada a capacidade da enzima em hidrolisar diferentes substratos naturais. Para isso, o meio reacional (100  $\mu\text{L}$ ) preparado em tubos de 1,5 mL contendo 0,4% (p/v) do substrato, tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 6,0 e 2  $\mu\text{g/mL}$  da enzima, foi incubado por 30 minutos a 40 °C, 1000 rpm em Thermomixer comfort (Eppendorf, EUA). A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959). A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DNS e aquecimento a 95 °C por 5 minutos, e, em seguida, os tubos foram mantidos no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, fez-se análise de absorvância a 540 nm com espectrofotômetro (Infinite M200pro, TECAN, Suíça). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto, sob as condições da reação.

Todos os ensaios foram medidos em microplacas com 96 poços de fundo plano (Costar, EUA). Os controles das reações foram realizados sem a adição da enzima no meio reacional, a fim de avaliar a hidrólise espontânea dos substratos. A atividade enzimática foi expressa como unidade por miligrama de proteína (U/mg). Para determinar a quantidade liberada de açúcar redutor, construiu-se uma curva padrão de L-arabinose (Cat. N° 178680, Calbiochem, EUA) e p-nitrofenol (Cat. N° 241326, Sigma-Aldrich, EUA).

Para as demais análises, utilizou-se o substrato em que as enzimas apresentaram maior atividade, na concentração citada anteriormente, exceto para avaliação da cinética enzimática.

### **3.5.2 Influência do pH e temperatura**

Para a determinação do pH de maior atividade das enzimas, foi utilizado o tampão *MacIlvine* 50 mM com uma variação de pH de 3,0 a 8,0 e tampão Glicina-NaOH 50 mM com variação de pH de 9,0 a 11,0. As reações foram realizadas a 40 °C, 1000 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf, EUA). Para determinação da temperatura de maior atividade, foi utilizado tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 (GeoARA) ou pH 5,0 (GeoXIL), variando a temperatura de 20 °C a 100 °C. As demais condições das reações e cálculo da atividade foram realizadas conforme descrito no item 3.5.1.

#### **3.5.2.1 Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA)**

A termoestabilidade ao longo do tempo foi estimada incubando a enzima em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0, a 70 °C e 80 °C, com ou sem a presença de 1 mM de CoCl<sub>2</sub>. O meio reacional (300  $\mu$ L) sem a presença do substrato foi incubado em tubo de 2 mL com tampa de rosca, para evitar perdas por evaporação. Amostras foram removidas após diferentes intervalos de tempo (12, 24, 36 e 48 horas) e mantidas em gelo por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 0,4% (p/v) de arabinana desramificada e o meio reacional foi incubado por 30 minutos para dosagem da atividade enzimática residual, realizada conforme descrito no item 3.5.1. Também foi verificada a estabilidade da GeoARA a 4 °C durante 90 dias. A enzima foi armazenada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0, contendo glicerol a 20% (LANG et al., 2016).

#### **3.5.2.2 $\beta$ -xilosidase (GeoXIL)**

A termoestabilidade ao longo do tempo foi estimada incubando a enzima em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0, a 50 °C, 60 °C e 70 °C. O meio reacional (100  $\mu$ L) sem a presença do substrato foi incubado em tubos de 1,5 mL. Em seguida, os tubos foram removidos após diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3 e 4 horas) e mantidos em gelo por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mM de p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNP-Xil) e o meio reacional incubado por 10 minutos para dosagem da atividade enzimática residual, realizada conforme descrito no item 3.5.1.

Os controles das reações foram realizados sem a adição das enzimas no meio reacional (pH e temperatura) ou sem a incubação das enzimas (termoestabilidade). Os testes foram realizados em triplicatas; e os valores das absorbâncias foram transformados em atividade relativa (%).

### 3.5.3 Influência de íons metálicos e reagentes químicos

Sabe-se que os íons metálicos podem atuar como cofatores enzimáticos. Assim, após a determinação das condições ótimas de pH e temperatura, foi verificada a influência dos íons metálicos  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{KCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NiCl}_2$  e  $\text{ZnSO}_4$  sobre a atividade das enzimas, na concentração final de 1 mM. Além disso, foram avaliados outros aditivos, tais como: EDTA 1 mM (agente quelante), albumina de soro bovino 1 mg/mL (BSA), detergentes (Triton X-100, Tween 20 e SDS, nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1,0% v/v). A reação de hidrólise em substrato específico com os aditivos foi realizada no pH e temperatura determinados de maior atividade, conforme descrito nos itens 3.5.1 e 3.5.2.

Os controles das reações foram realizados sem a adição dos aditivos no meio reacional. Os testes foram realizados em triplicatas; e os valores das absorbâncias foram transformados em atividade relativa (%).

### 3.5.4 Cinética enzimática

Primeiramente, foi realizada a construção da curva de progresso da reação enzimática, a fim de verificar o melhor tempo para análise da cinética enzimática. Dessa forma, diferentes tempos de reação foram empregados, sendo estes: 2, 6, 10, 14, 20, 30 e 40 minutos, nas condições de maior atividade da GeoARA (pH 7,0 a 70 °C) e 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, nas condições de maior atividade da GeoXIL (pH 5,0 a 60 °C).

#### 3.5.4.1 Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA)

A determinação da atividade enzimática foi realizada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 a 70 °C por 10 minutos, usando o substrato arabinana desramificada em diferentes concentrações, variando de 1 a 20 mg/mL (triplicatas), bem como na ausência ou presença de  $\text{CoCl}_2$  1 mM.

#### 3.5.4.2 $\beta$ -xilosidase (GeoXIL)

A determinação da atividade enzimática foi realizada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0 a 60 °C por 10 minutos, usando o substrato pNP-Xil em diferentes concentrações, variando de 1 a 16 mM (triplicatas).

Os parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$ ) da GeoARA e GeoXIL foram determinados por meio do ajuste da equação de Michaelis-Menten disponível no programa OriginPro 8.5.

### 3.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E ESTABILIDADE TÉRMICA POR DICROÍSMO CIRCULAR

#### 3.6.1 Endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA)

Foram realizados experimentos de dicróismo circular (CD) para a investigação da estabilidade térmica da GeoARA na presença e ausência de  $\text{CoCl}_2$  1 mM e análise da estrutura secundária predominante da enzima. A concentração utilizada da GeoARA para os testes foi de 0,05 mg/mL em tampão *MacIlvine* 25 mM, pH 7,0.

Os espectros de CD da GeoARA foram obtidos utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japão), em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico, utilizando comprimentos de onda de 195 nm a 240 nm (5 acumulações). A temperatura da solução com a proteína foi mantida a 20 °C durante a coleta dos espectros pelo controlador de temperatura Peltier (Jasco CDF-426S).

Para verificar a desnaturação da GeoARA, mediu-se a elipticidade molar em comprimento de onda de 230 nm. A temperatura variou de 20 °C a 100 °C, a uma taxa de 1 °C/minuto. Em seguida, verificou-se a estabilidade da proteína a 80 °C por 30 minutos.

#### 3.6.2 $\beta$ -xilosidase (GeoXIL)

Também foi analisada a estabilidade térmica e estrutura secundária predominante da GeoXIL por meio de dicróismo circular. A concentração utilizada da enzima para os testes foi de 0,2 mg/mL em tampão *MacIlvine* 6 mM, pH 5,0.

Os espectros de CD da GeoXIL foram medidos utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japão), em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico, utilizando comprimentos de onda de 202 nm a 240 nm (5 acumulações). A temperatura da solução com a proteína foi mantida a 20 °C durante a coleta dos espectros pelo controlador de temperatura Peltier (Jasco CDF-426S).

A desnaturação da GeoXIL foi verificada medindo a elipticidade molar em comprimento de onda de 215 nm. A temperatura variou de 20 °C a 100 °C, a uma taxa de 1 °C/minuto. Também foi verificada a estabilidade da proteína a 60 °C por 6 horas.

Os valores de elipticidades obtidos foram convertidos em elipticidade molar residual  $[\theta]$  utilizando a equação abaixo:

$$\text{Equação: } [\theta] \text{ (graus.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} = (\theta * 100 * M) / (C * l * n)$$

Onde,  $\theta$  é a elipticidade em graus, M é a massa molecular da proteína, C é a concentração da amostra (mg/mL), l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína (CORRÊA; RAMOS, 2009).



### 3.7 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados das atividades enzimáticas foram inicialmente plotados em uma planilha do Microsoft Excel para determinação dos valores médios e desvio padrão. Para confecção das tabelas, utilizou-se o programa Microsoft Excel e dos gráficos o programa OriginPro 8.5, este também foi empregado para o tratamento dos dados obtidos nas análises de CD.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENDO- $\alpha$ -1,5-L-ARABINANASE (GeoARA)

#### 4.1.1 Análises de bioinformática

##### 4.1.1.1 Análise da sequência gênica e proteica

A sequência gênica da GeoARA, disponível no GenBank (CP014749.1) e inserida no vetor pTRC-HisA, contém 948 pb e codifica uma proteína de 315 aminoácidos, com massa molecular estimada em 35,8 kDa. A análise no Pfam identificou um domínio de glicosil hidrolases da família 43 (GH43) nas posições 22 a 311 da sequência enzimática (Figura 3).

1	atggttcattttcatccggttggcaacgtgaacttctatgaaatggattggagcctgaaa	
	M V H F H P F G N V N F Y E M D W S L K	
61	ggtgatctgtgggcacatgatccggttattgcaaaagaacgtagccggttggtatgtttt	20
	G D L W A H D P V I A K E R S R W Y V F	
121	cataccggtcgtggattcagatcaaaaccagcgaagatgggtggtcattgggaaaatag	40
	H T G R G I Q I K T S E D G V H W E N M	
181	gatcgtgtttttccgagcctgccggattgggtgtaaacagtatggtccggaaaaagatgaa	60
	D R V F P S L P D W C K Q Y V P E K D E	
241	gatcattttatgggcacctgacatctgcttttataacggcatctattatctgtactatagc	80
	D H L W A P D I C F Y N G I Y Y L Y Y S	
301	gtgagcacctttggcaaaaataaccagcgttattggtctggcaaccaatcgtaccctggat	100
	V S T F G K N T S V I G L A T N R T L D	
361	ccgctaaccggattatgaatggaaagatgggtcctgttattcatagcaccgcaagc	120
	P R N P D Y E W K D M G P V I H S T A S	
421	gataactataatgccattgatccgaatggtggtttgatcaagaaggtcagccttggctg	140
	D N Y N A I D P N V V F D Q E G Q P W L	
481	agctttggtagcttttggagcggattcagctgattcaactggataccgaaaccatgaaa	160
	S F G S F W S G I Q L I Q L D T E T M K	
541	ccggcagcacaggcagaactgctgaccattgcaagccgtggatgaagaaccgaatgcaatt	180
	P A A Q A E L L T I A S R G E E P N A I	
601	gaagcaccgtttattgtttgtcgcaacggctattattacctgtttgtgagctttgatttt	200
	E A P F I V C R N G Y Y Y L F V S F D F	
661	tgctgccgtggtattgaaagcacctataaaatcgagttggctgcagcaagatattacc	220
	C C R G I E S T Y K I A V G R S K D I T	
721	ggtccgtatggtgataaaaatgggtgagcatgatgcaaggtgggtggcaccattctggat	240
	G P Y V D K N G V S M M Q G G G T I L D	
781	gcagtaatgatcgttggattggtccgggtcattgtgcagtgatttttcaggtgcaagc	260
	A G N D R W I G P G H C A V Y F S G A S	
841	gcaattctggtaatcatgcatatgatgctgaaaaatggcgaaccgacactgcagatt	280
	A I L V N H A Y D A L K N G E P T L Q I	
948	cgctccgctgtattgggatgatgaaggtggccgtatctgagcgttttaa	300
	R P L Y W D D E G W P Y L S V -	315

Figura 3: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da GeoARA. Destaca-se em azul o domínio GH43.

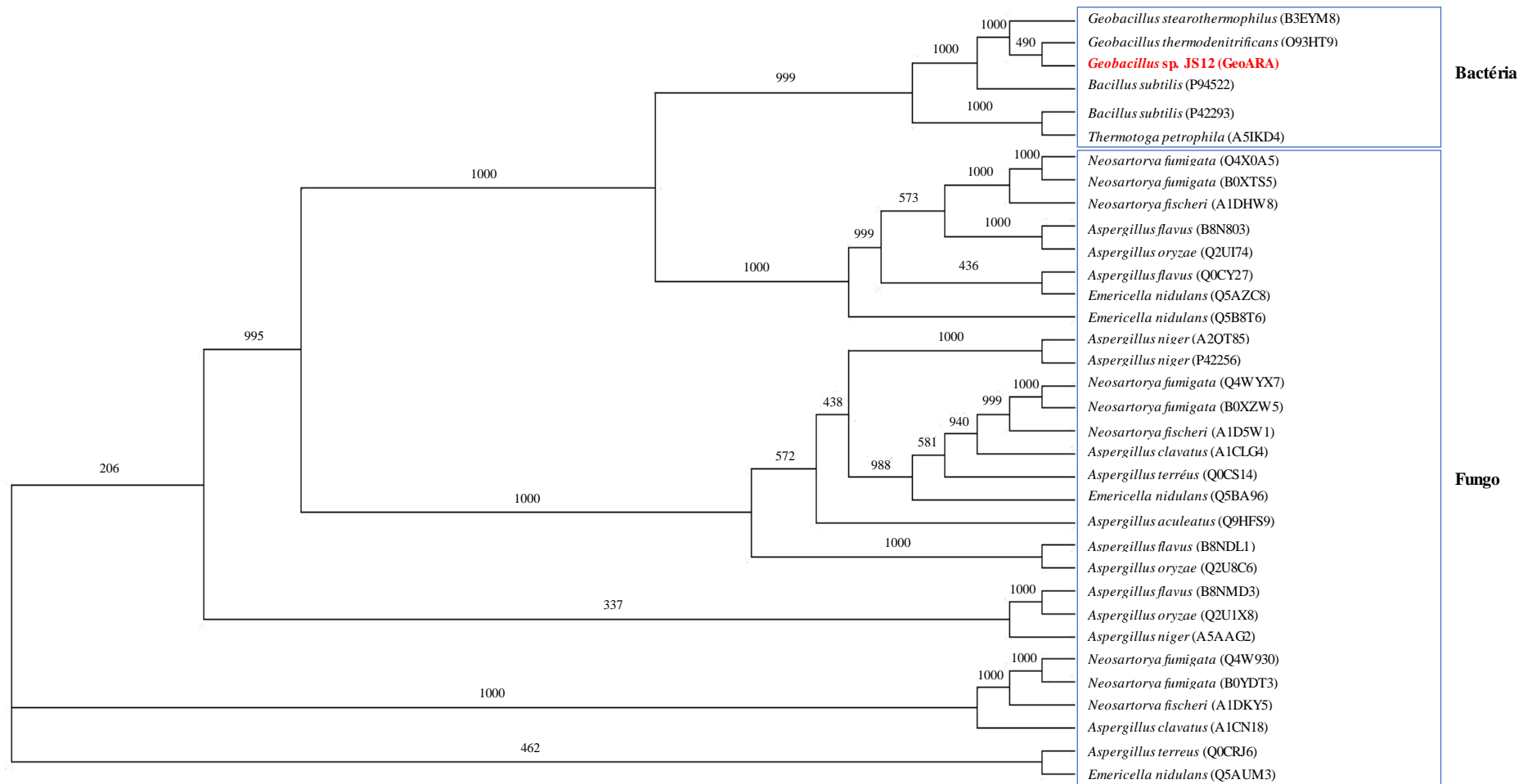
##### 4.1.1.2 Alinhamento múltiplo de sequências e construção da árvore filogenética

A busca por enzimas com atividade de arabinanase pelo UniProt resultou em 1.634 sequências não revisadas (TrEMBL) e 33 sequências revisadas (Swiss-Prot). Para construção da árvore filogenética utilizou-se apenas as 33 sequências revisadas, pois apresentam informações anotadas manualmente extraídas da literatura e análise computacional avaliada por um curador, o que garante um maior grau de confiabilidade (BATEMAN et al., 2015).

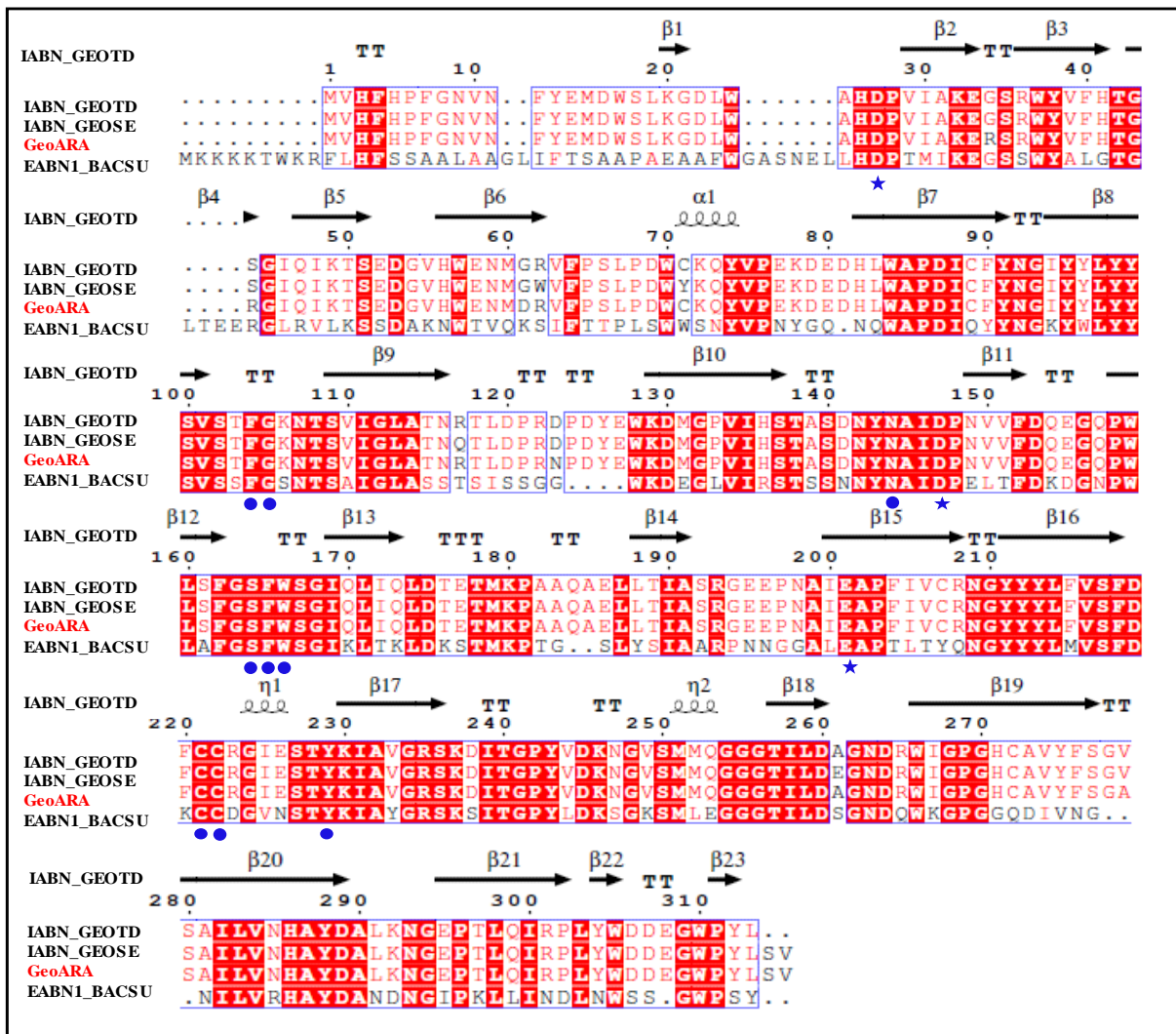
A análise filogenética demonstra que a GeoARA se localiza no mesmo grupo correspondente às endo-arabinanases bacterianas, enquanto que as endo-arabinanases fúngicas formam grupos separados (Figura 4). Como esperado, a GeoARA (*Geobacillus* sp. JS12) possui maior relação evolutiva com endo-arabinanases produzidas por bactérias do gênero *Geobacillus*, sendo estas a *Geobacillus thermodenitrificans* TS-3 (UniProt: Q93HT9),

denominada anteriormente de *Bacillus thermodenitrificans* e *Geobacillus stearothermophilus* (UniProt: B3EYM8), apresentando um nó altamente consistente (1000). A arabinanase de *Bacillus subtilis* (UniProt: P94522) está agrupada às arabinanases de *Geobacillus* por um nó também altamente consistente (1000). Em virtude desses resultados, selecionou-se as endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases de tais organismos e a GeoARA para uma análise BLASTp e de alinhamento múltiplo de sequências pelo ClustalX2, a fim de analisar a identidade e similaridade dos resíduos de aminoácidos.

De acordo com o BLASTp, a GeoARA compartilha 98,4%, 97,1% e 52,2% de identidade com as endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases da família GH43 de *G. thermodenitrificans* TS-3 (ABN-TS), *G. stearothermophilus* (AbnB) e de *B. subtilis* (AbnA), respectivamente. O núcleo catalítico das enzimas da família GH43 é altamente conservado e apresenta três resíduos de aminoácidos principais: Asp (D), Asp (D) e Glu (E). Estes resíduos também estão presentes nas enzimas das famílias GH32, GH62 e GH68 (PONS et al., 2003). Nesse sentido, a diversidade das características enzimáticas destas famílias consiste no alinhamento dos resíduos em torno do sítio ativo que é diferente entre as enzimas (LANG et al., 2016). A partir do alinhamento múltiplo de sequências, pode-se observar a conservação dos resíduos da tríade catalítica (Figura 5). Na sequência da GeoARA eles correspondem: D27, D147 e E201. A importância dos resíduos citados na atividade catalítica das endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases foi evidenciada no trabalho de Yamaguchi et al. (2018) por mutagênese sítio-dirigida. As proteínas mutantes ABN-TS D27A, D147A, D147N e E201A, ao contrário da selvagem, não apresentaram atividade enzimática no meio reacional contendo arabinana desramificada (YAMAGUCHI et al., 2018).



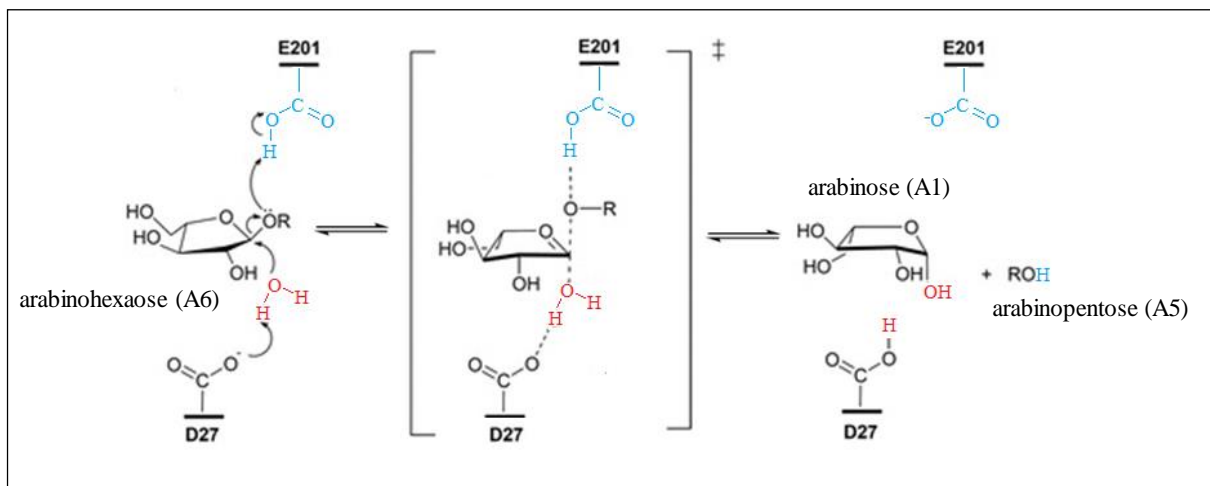
**Figura 4:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência de aminoácidos da GeoARA e outras sequências de endo-arabinanases obtidas pelo UniProt. Os números nos nós indicam os valores percentuais de inicialização para 1000 reamostragens. A descrição entre parênteses, após o nome dos organismos, indica o número de entrada das sequências proteicas no UniProt. A árvore filogenética foi gerada pelo ClustalX2 e a figura obtida pelo FigTree v1.4.4.



**Figura 5:** Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases. As seqüências são identificadas pelo seu nome de entrada no UniProt: *G. thermodenitrificans* (IABN\_GEOTD), *G. stearothermophilus* (IABN\_GEOSE) e *B. subtilis* (EABN1\_BACSU). Resíduos de aminoácidos idênticos são escritos em letras brancas e destacados de vermelho e aqueles que possuem alta similaridade são escritos em letras vermelhas. Os resíduos que compõem a tríade catalítica estão indicados por estrelas e os que são essenciais para o reconhecimento do substrato são indicados por esferas. Os elementos de numeração de seqüência e de estrutura secundária correspondem à seqüência da endo-arabinanase de *G. thermodenitrificans*. O alinhamento foi gerado pelo ClustalX2 e a figura produzida pelo ESPrict 3.0.

Com base na estrutura cristalina da ABN-TS de *G. thermodenitrificans* TS-3 (PDB: 1WL7) e AbnB de *G. stearothermophilus* (PDB: 3CU9), Asp27 e Glu201 representam a base geral e o ácido geral, respectivamente e Asp147 atua como modulador de pKa, ou seja, acredita-se que este resíduo eleva o pKa do Glu201 e mantém a ligação correta entre o ácido geral e o substrato (ALHASSID et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2005). Estes resíduos atuam na hidrólise da ligação glicosídica, com inversão da configuração anomérica do substrato (SQUINA et al., 2010). Por meio de ligações de hidrogênio, os resíduos conservados em GH43, His26 e Thr42, mantém a orientação exata da base geral em relação ao substrato. A posição do Asp27 permite que ele ative uma molécula de água para um único ataque de deslocamento no carbono anomérico, resultando na inversão da configuração do substrato. A posição dessa

molécula é mantida através de ligações de hidrogênio com uma tirosina conservada (Tyr229). Por sua vez, a orientação do ácido geral em relação ao substrato é mantida por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos de Ser164 e Tyr229. Estes resíduos conservados também podem desempenhar um papel na modulação do pKa do ácido geral (ALHASSID et al., 2009). Portanto, infere-se que os resíduos Asp27, Asp147 e Glu201, relatados nas endo-arabinanases de *G. thermodenitrificans* e *G. stearothermophilus*, desempenham as mesmas funções na GeoARA. O mecanismo de reação proposto para GeoARA é mostrado na Figura 6.



**Figura 6: Mecanismo de catálise da GeoARA.** Hidrólise de arabinohexaose, produzindo arabinose e arabinopentose. Asp27 representa a base geral e Glu201 o ácido geral. O modulador de pKa, Asp147, foi omitido. Fonte: adaptado (MEELUA et al., 2021).

Uma característica notável do sítio ativo é a presença de uma ligação dissulfeto formada pelas cisteínas adjacentes Cys221 e Cys222. Dentro da família GH43, esses resíduos são conservados apenas em endo-arabinanases. Os resíduos de cisteínas contribuem para o reconhecimento do substrato por meio da interação hidrofóbica com C4 e C5 da molécula de arabinose geral (ALHASSID et al., 2009). Além dos resíduos citados, existem outros resíduos conservados que são essenciais para o reconhecimento do substrato em endo-arabinanases GH43, sendo estes: Phe104, Gly105, Asn144, Ser164, Phe165, Trp166, Cys221, Cys222 e Tyr229 (HUY et al., 2013).

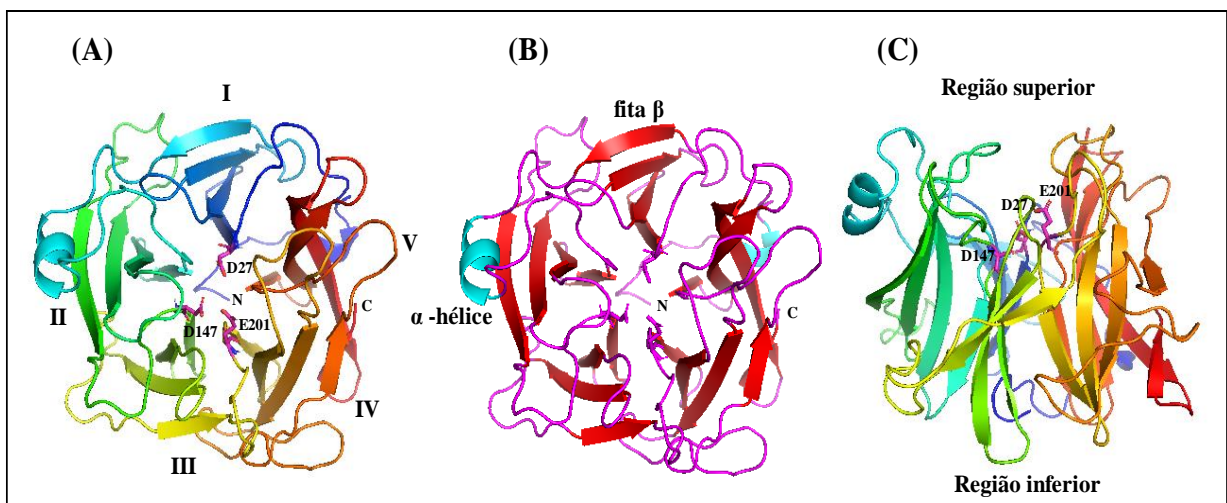
#### **4.1.1.3 Predição da estrutura tridimensional**

A fim de elucidar a estrutura tridimensional da GeoARA, utilizou-se como molde a endo-arabinanase ABN-TS, devido à maior identidade apresentada (98,4%) e sua estrutura tridimensional estar disponível no Banco de Dados de Proteínas (PDB: 1WL7). A análise da qualidade estereoquímica do modelo tridimensional, gerado inicialmente pelo SWISS-MODEL, apresentou os seguintes resultados no diagrama de Ramachandran: 82,6% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 15,2% em regiões permitidas, 1,9% em regiões que

são admitidas e 0,4% em regiões não permitidas. Após o refinamento da estrutura, o modelo apresentou 88,6% de resíduos em regiões mais favoráveis e 9,8% em regiões permitidas, melhorando a qualidade da estrutura tridimensional predita para a GeoARA.

A análise de qualidade global do modelo realizada por meio da ferramenta QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) atribui uma *score* global de qualidade da estrutura com base em diferentes aspectos geométricos das proteínas. O *score* global é apresentado no intervalo entre 0 e 1, sendo 1 o melhor valor. Em relação ao modelo obtido para a GeoARA o valor de *score* global é de 0,84. Nesse sentido, o modelo é considerado satisfatório, com o valor de *score* global próximo do valor máximo 1, indicando que a estrutura da GeoARA apresenta qualidade compatível com estruturas de alta resolução resolvidas experimentalmente.

Como pode-se observar, o modelo da GeoARA apresenta estrutura terciária formada por 20 fitas  $\beta$  e 2  $\alpha$ -hélices (Figura 7). Já a ABN-TS apresenta 23 fitas  $\beta$  e 3  $\alpha$ -hélices e AbnB apresenta 22 fitas  $\beta$  e 4  $\alpha$ -hélices (ALHASSID et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2005). As fitas  $\beta$  estão organizadas em 5 folhas  $\beta$ , compostas por 4 fitas  $\beta$  antiparalelas cada, chamadas de pás ou lâminas, dispostas radialmente em torno de um eixo central, formando um estrutural geral denominada de hélice  $\beta$  de cinco pás, característica das GH43 (YAMAGUCHI et al., 2018). Os resíduos catalíticos, D27, D147 e E201 conservados, como identificados no alinhamento (Figura 5), estão distribuídos na primeira, terceira e quarta pá, respectivamente (YAMAGUCHI et al., 2005). O sítio ativo da GeoARA possui uma abertura em forma de “V” e está localizado na região central da estrutura (Figura 7C).

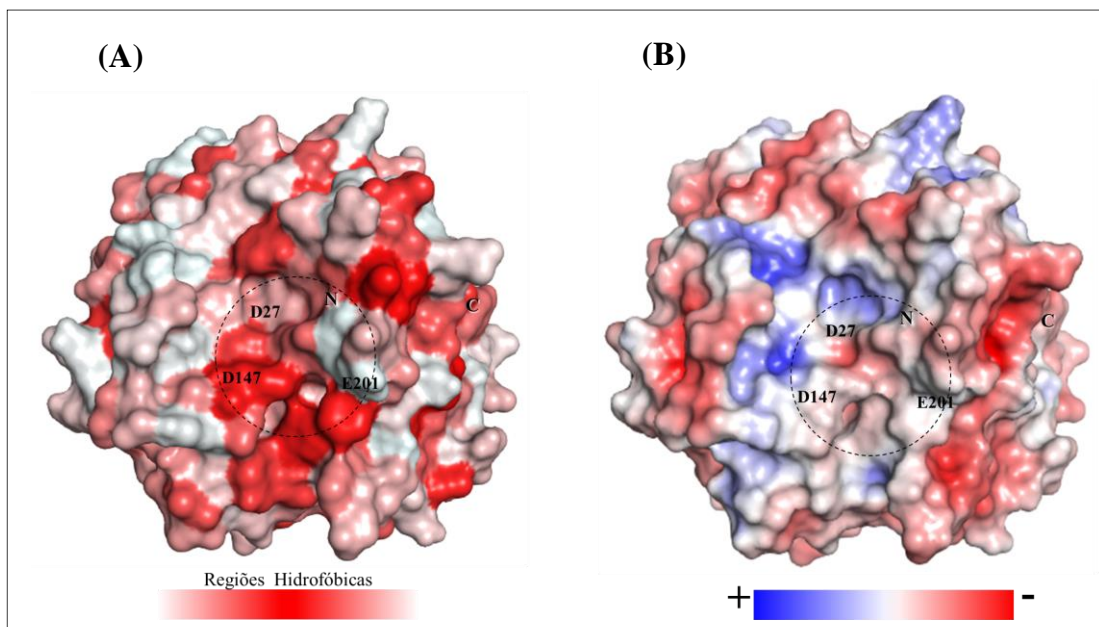


**Figura 7: Estrutura terciária predita da GeoARA.** Em A: estão destacadas as cinco pás da hélice  $\beta$  e triade catalítica. Em B: estão destacadas as estruturas secundárias (fitas  $\beta$  em vermelho,  $\alpha$ -hélices em azul e elementos de conexão em rosa). Em C: destaca-se a região superior em forma de “V” e inferior da enzima. O modelo da estrutura tridimensional foi construído pela ferramenta Swiss Model, usando a estrutura da endo-arabinanase de *G. thermodenitrificans* TS-3 (PDB: 1WL7). A imagem foi obtida pelo programa PyMol.

#### 4.1.1.4 Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície

É sabido que a composição da superfície das proteínas determina a afinidade e a especificidade das interações moleculares, como por exemplo a interação enzima-substrato (HAGEMANS et al., 2015). Nesse sentido, a fim de conhecer as características da superfície da GeoARA, em especial da região do sítio ativo, realizou-se a análise do seu perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático.

O perfil de hidrofobicidade da região do sítio ativo da GeoARA, contendo os resíduos catalíticos D27, D147 e E201, mostrou que a região apresenta predominantemente característica hidrofóbica (Figura 8A) com potencial eletrostático predominantemente negativo (Figura 8B).



**Figura 8: Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície da GeoARA.** Em A: perfil de hidrofobicidade destacando-se (círculo preto) a região do sítio catalítico da enzima, predominantemente hidrofóbica, contendo os resíduos D27, D147 e E201. As regiões hidrofóbicas são apresentadas em vermelho e as regiões hidrofílicas são apresentadas em branco. Em B: potencial eletrostático destacando-se (círculo preto) a região do sítio catalítico da enzima, predominantemente negativa, contendo os resíduos D27, D147 e E201. As regiões eletrostáticas negativas são apresentadas em vermelho, regiões neutras são apresentadas em branco e regiões positivas são apresentadas em azul.

Poucos trabalhos descrevem as interações do sítio ativo de endo-arabinanases com seu substrato. As informações disponíveis consistem basicamente dos dados obtidos de cristalografia por raios-X pela co-cristalização do complexo enzima-substrato, no qual é descrito que este complexo é estabelecido, principalmente, por meio de interações de hidrogênio e hidrofóbicas (ALHASSID et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2018). No trabalho de Yamaguchi et al. (2018), a endo-arabinanase ABN-TS (98,4%, de identidade com a GeoARA) foi co-cristalizada com uma molécula de arabinohexaose, sendo observada a participação do resíduo His26 estabelecendo interações de hidrogênio e hidrofóbicas com o substrato; os resíduos Asp27, Gly105, Asn144, Asn147 (substituindo o modulador de

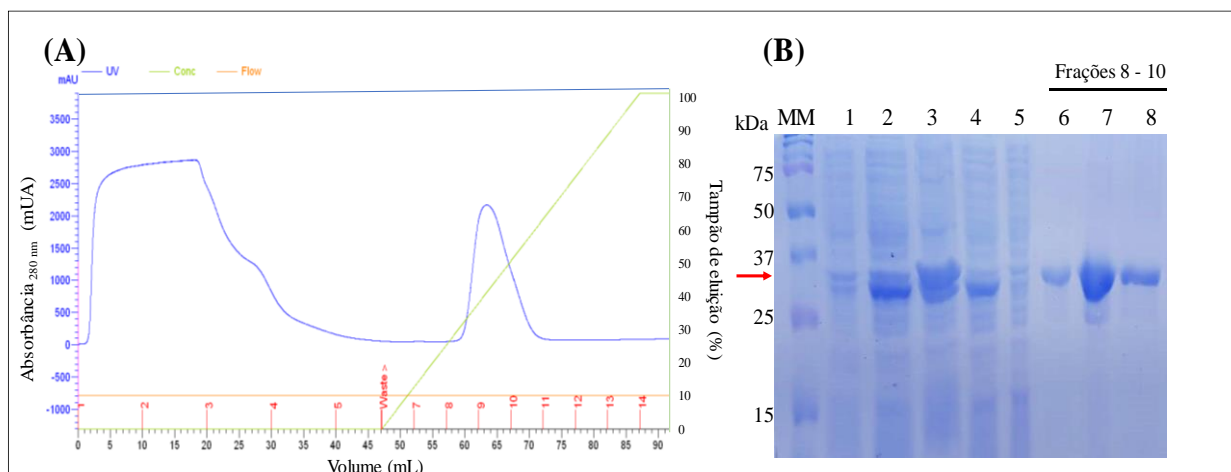


pKa Asp147), Ser164, Trp166, Glu196 e Glu201 estabelecendo ligações de hidrogênio com grupos OH do substrato; enquanto que os resíduos Thr42, His82, Phe104, Phe165, Cys221 e Cys222 estabeleciam interações hidrofóbicas com os átomos de carbono do substrato. Apesar da predominância de regiões hidrofóbicas observadas na estrutura superficial da GeoARA, também é possível observar regiões de menor hidrofobicidade e até mesmo ausência de hidrofobicidade, contribuindo para as distintas possibilidades de interação entre enzima-substrato. Para a análise e comparação do potencial eletrostático da GeoARA em relação à outras endo-arabinanases, infelizmente não foi localizado na literatura dados que contribuíssem para a discussão do resultado obtido. Em síntese, pode-se inferir, previamente, que o caráter hidrofóbico e negativo do sítio ativo da GeoARA, contribui para a interação com seu substrato.

Dessa forma, a elevada identidade de GeoARA com a endo-arabinanase ABN-TS, a presença de resíduos catalíticos importantes e conservados, bem como a constituição estrutural predita da proteína, indicam que a GeoARA é uma enzima com atividade endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase GH43, tornando-se necessária a caracterização bioquímica para elucidar sua função.

#### 4.1.2 Expressão e purificação da GeoARA

A enzima recombinante GeoARA foi expressa em células de *E. coli* BL21 e visualizada, em SDS-PAGE, na fração solúvel após o processo de sonicação. Por meio da purificação por cromatografia de afinidade, foi possível observar a presença de um único pico no cromatograma, indicando a presença da GeoARA (Figura 9A).



**Figura 9: Purificação da GeoARA por cromatografia de afinidade.** (A) Perfil cromatográfico da enzima durante processo de purificação; (B) SDS-PAGE 12%: (1) cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5 mM de IPTG; (3) precipitado bacteriano; (4) sobrenadante bacteriano; (5) *flow-through*; (6 a 8) frações coletadas após a purificação; a seta em vermelho indica a posição da enzima recombinante; MM - Marcador molecular Precision Plus Protein Dual Color – Bio Rad.

A enzima purificada mostrou uma única banda com uma massa molecular estimada em 30 kDa, conforme determinada pelo programa GelAnalyzer 19.1, a partir do resultado obtido da eletroforese em SDS-PAGE (Figura 9B, poços 6, 7 e 8). Este valor difere do valor estimado por análise de bioinformática, sendo este de 37,3 kDa, com base nos 315 resíduos de aminoácidos da sequência proteica, mais 6 resíduos de histidinas e 5 resíduos de aminoácidos espaçadores presentes na região N-terminal. Verificou-se que a massa molecular da GeoARA é semelhante à de endo-arabinanases de outros microrganismos (HUY et al., 2013; SAKAMOTO et al., 2012; SEO et al., 2010). Uma endo-arabinanase de *Thermotoga thermarum* DSM também apresentou uma massa molecular de 30 kDa (SHI et al., 2014).

#### 4.1.3 Especificidade ao substrato

A GeoARA apresentou atividade sobre a arabinana desramificada e arabinana ramificada e nenhuma atividade detectável foi encontrada nos demais substratos (Tabela 5). A maior atividade específica, nas condições iniciais de caracterização enzimática (pH 6,0 a 40 °C), foi sobre a arabinana desramificada (87,5 U/mg), em conformidade com outras endo-arabinanases (FARRO et al., 2018; HONG; PARK; OH, 2009; HUY et al., 2013; SEO et al., 2010; SHI et al., 2014; WANG et al., 2014a).

**Tabela 5:** Atividade específica da GeoARA para diferentes substratos testados.

Substrato	Atividade Enzimática (U/mg) ± DP	
	pH 6,0; 40 °C	pH 7,0; 70 °C
Arabinana desramificada de beterraba-sacarina	87,49 ± 0,83	226,67 ± 1,41
Arabinana ramificada de beterraba-sacarina	10,87 ± 0,09	30,39 ± 2,82
Arabinoxilana de centeio de alta viscosidade	ND	ND
Arabinoxilana de farinha de trigo	ND	ND
Xilana de madeira de faia	ND	ND
Ramnogalacturonana I de batata	ND	ND
Xiloglucana de tamarindo	ND	ND
β-glucona de cevada de baixa viscosidade	ND	ND
Galactomanana de alfarroba de baixa viscosidade	ND	ND
p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo	ND	ND
p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo	ND	ND
p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo	ND	ND
p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	ND	ND

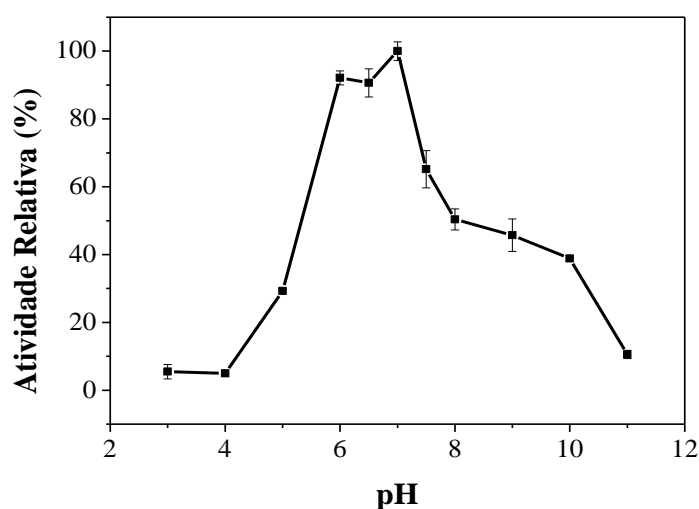
A atividade sobre substratos naturais (0,4% p/v) foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 6,0 a 40 °C por 30 minutos e pH 7,0 a 70°C por 10 minutos. A atividade sobre substratos sintéticos (1 mM) foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 6,0 a 40 °C e pH 7,0 a 70°C por 10 minutos.  
ND – não detectada.

A menor atividade específica para a arabinana ramificada (10,9 U/mg) pode ser explicada devido à inibição pelas cadeias laterais (ramificações) α-1,2-L-arabinofuranosil e α-

1,3-L-arabinofuranosil ligadas à cadeia principal de  $\alpha$ -1,5-L-arabinofuranosil (GODDARD-BORGER et al., 2011). O sítio ativo das endo-arabinanases é estreito e se encaixa de forma adequada no substrato não ramificado, sem espaço extra para acomodar ramificações presentes (FARRO et al., 2018). A incapacidade de enzimas do tipo endo-arabinanase de hidrolisar substratos sintéticos é explicada pela ausência de interações ótimas, principalmente ligações de hidrogênio, entre o grupo aromático do substrato sintético (p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo) e o sítio ativo da enzima (ALHASSID et al., 2009; FARRO et al., 2018). Esses resultados indicam que a enzima putativa GeoARA é de fato uma endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase.

#### 4.1.4 Influência do pH e temperatura

A atividade enzimática máxima da GeoARA foi obtida em pH 7,0 e diminuiu mais de 50% quando o pH estava abaixo de 6,0 e acima de 8,0, o que mostra uma maior estabilidade da enzima nessa faixa de pH (Figura 10). A maioria das endo-arabinanases relatadas apresentam atividade ótima na faixa de pH 6,0 a 7,0, ou seja, levemente ácidas e neutras (Tabela 6). Em trabalhos que reportam a caracterização da endo-arabinanase ABN-TS de *G. thermodenitrificans* (98,4% de afinidade com a GeoARA), foi descrita uma maior atividade da enzima em pH 6,0 – 7,0 (TAKAO et al., 2002; TAKAO; AKIYAMA; SAKAI, 2002; ZHANG et al., 2020). Dessa forma, o pH ideal da GeoARA está de acordo com a literatura.

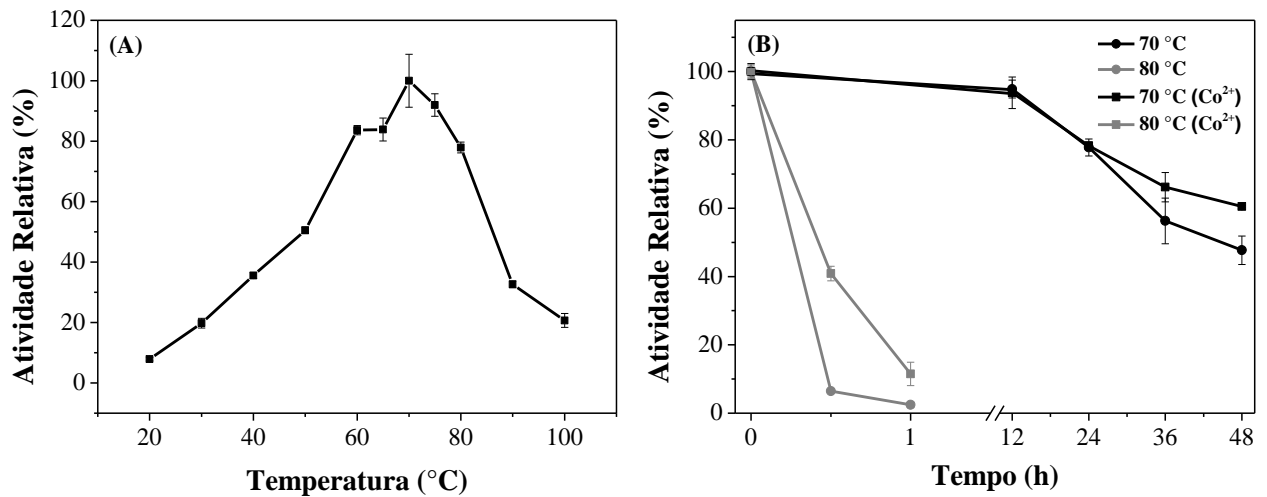


**Figura 10: Efeito do pH na atividade da GeoARA.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM (pH de 3,0 a 8,0) e tampão Glicina-NaOH 50 mM (pH 9,0 a 11,0) a 40 °C.

**Tabela 6:** Dados comparativos do pH e temperatura de endo-arabinanases de alguns microrganismos.

Organismo de origem	Enzima	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	BLABNase	6,0	55	PARK et al., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i> KS12	Endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase	6,0	35	SEO et al., 2010
Biblioteca metagenômica (rúmem)	ARN2	6,0	45-50	WONG; CHAN; MCCORMACK, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	AbnA	6,0	60	LEAL; SÁ-NOGUEIRA, 2004
<i>Bacillus subtilis</i>	Abn2	7,0	50	INÁCIO; DE SÁ-NOGUEIRA, 2008
<i>Lactobacillus crispatus</i> DSM29598	AbnA AbnB	6,0 7,5	40 40	LI; GÄNZLE, 2020
<i>Penicillium chrysogenum</i> 31B	AbnS1	6,0-7,0	60	SAKAMOTO et al., 2012
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Z6	AbnZ1	6,0	40	WANG et al., 2014a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Z6	AbnZ2 AbnZ3	6,0 6,0	35 30	WANG et al., 2014b
<i>Rhizomucor miehei</i> CAU432	RmArase	5,5	55	CHEN et al., 2015
<i>Streptomyces coelicolor</i>	ScAra43A	6,0	45	YANG; KANEKO, 2006
<b><i>Geobacillus</i> sp. JS12</b>	<b>GeoARA</b>	<b>7,0</b>	<b>70</b>	<b>Este trabalho</b>

A temperatura de maior atividade da GeoARA é de 70 °C, com atividade relativa superior a 50% entre 50 °C a 80 °C, apresentando uma maior estabilidade nessa faixa de temperatura (Figura 11A). A temperatura ótima da GeoARA é comparável à outras endo-arabinanases bacterianas de *G. thermodenitrificans* (98,4% de afinidade com a GeoARA) e *T. petrophila*, que apresentam temperatura de maior atividade em 70 °C e 73 °C, respectivamente (SQUINA et al., 2010; TAKAO; AKIYAMA; SAKAI, 2002). A maior atividade relatada para endo-arabinanases termotolerantes foi a 75 °C e 76 °C (HONG; PARK; OH, 2009; LIM et al., 2011; SHI et al., 2014; ZHANG et al., 2020), sendo que a GeoARA manteve 92% e 78% de sua atividade em 75 °C e 80 °C, respectivamente. A maioria das endo-arabinanases relatadas apresentaram uma temperatura ótima na faixa de 30 °C a 60 °C (Tabela 6).



**Figura 11: Efeito da temperatura na atividade da GeoARA.** Em A: a atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 em temperaturas variando de 20 °C a 100 °C. Em B: a atividade foi avaliada na presença ou ausência de  $\text{CoCl}_2$  1 mM, pH 7,0, por 24 horas a 70 °C e 1 hora a 80 °C.

Enzimas que conseguem manter elevada atividade em temperaturas altas (70° a 100 °C) e estabilidade térmica a longo prazo, são de grande interesse para o processamento da biomassa vegetal, como por exemplo, na produção de biocombustíveis (ZHANG et al., 2020). Nesse sentido, verificou-se a termoestabilidade da GeoARA em temperatura de maior atividade (70 °C) e em 80 °C durante 48 horas. Também foi analisada a influência do íon  $\text{Co}^{2+}$  na termoestabilidade da enzima, visto que há trabalhos que relatam o aumento da estabilidade térmica de endo-arabinanases por metais divalentes (FARRO et al., 2018). A escolha do  $\text{Co}^{2+}$  deve-se aos resultados apresentados na Figura 12.

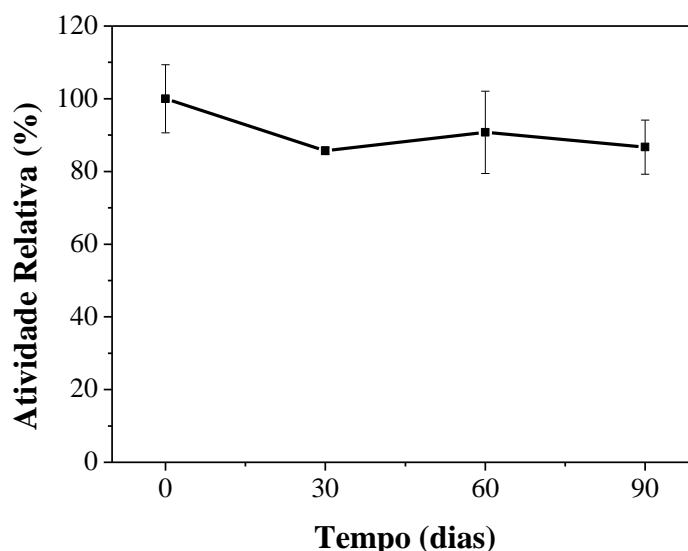
Conforme mostrado na Figura 11B, a GeoARA conseguiu manter mais de 90% de sua atividade após 12 horas de incubação a 70 °C e reteve 60,5% e 44,7% da atividade após 48h, na presença e ausência de íons  $\text{Co}^{2+}$ , respectivamente. Em contrapartida, a 80 °C, a enzima manteve somente 11,5% e 2,4% da atividade após 1 hora, na presença e ausência de íons  $\text{Co}^{2+}$ , respectivamente. Apesar de uma menor atividade residual a 80 °C, é interessante observar que o íon cobalto contribuiu significativamente para a estabilidade térmica da enzima ao longo do tempo (termotolerância), também observado a 70 °C. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Farro et al. (2018), que demonstra que o íon  $\text{Co}^{2+}$  aumentou a estabilidade térmica da endo-arabinanase B1Abn1 de *B. licheniformis*.

A ABN-TS de *G. thermodenitrificans*, também possui uma atividade ótima a 70 °C, como mencionado acima, porém sua meia-vida é de 11 horas, menor que a da GeoARA, que apresenta uma meia vida entre 36 horas e 48 horas na ausência de cobalto e maior que 48 horas na presença deste íon (TAKAO; AKIYAMA; SAKAI, 2002). Além da GeoARA, foram identificadas somente três endo-arabinanases que possuem atividade elevada em maior ou igual

a 70 °C, sendo estas a AbnA de *Thermotoga petrophila* (SQUINA et al., 2010), Tth Abn de *Thermotoga thermarum* (SHI et al., 2014) e a endo-arabinanase de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Esta última enzima apresenta a maior termotolerância relatada até o momento, com temperatura ótima de 75 °C e meia vida de 254 horas a 70 °C (HONG; PARK; OH, 2009). Dessa forma, a GeoARA representa uma das poucas endo-arabinanases que possuem temperatura ótima elevada e com significativa termotolerância a 70 °C.

As tecnologias de hidrólise enzimática existentes são realizadas em temperaturas entre 40 °C a 50 °C (AGUILAR et al., 2018; BHALLA et al., 2013), porém exibem taxas de hidrólise lentas, requerem altas quantidades de enzimas e são propensas a problemas de contaminação. Nesse sentido, tais limitações podem ser superadas com o uso de enzimas termófilas e termoestáveis (BHALLA et al., 2013).

Quando analisada a estabilidade térmica da GeoARA a 4 °C, em tampão de armazenamento (MacIlvine 50 mM, pH de 7,0, acrescido de glicerol 20%), por 90 dias, verificou-se que a enzima reteve 87% de sua atividade (Figura 12). Tais resultados indicam que a GeoARA pode ser estocada por vários dias a 4 °C, sem perda significativa da atividade.



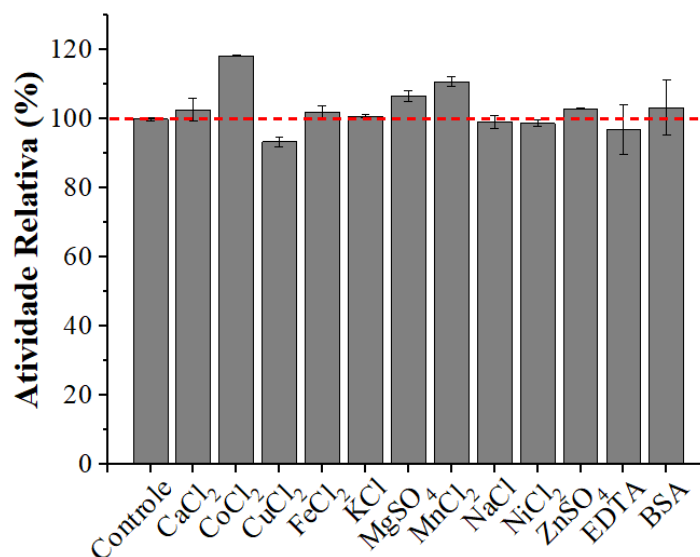
**Figura 12: Termoestabilidade da GeoARA a 4 °C.** A atividade enzimática foi avaliada a cada 30 dias, a 70 °C, em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0, contendo glicerol 20%.

#### 4.1.5 Influência de íons metálicos e reagentes químicos

O efeito de íons metálicos e reagentes químicos na atividade enzimática da GeoARA foi estudado (Figura 13 e 14). A atividade da enzima foi levemente estimulada pela presença dos íons  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Alguns trabalhos relataram a influência positiva desses íons na atividade de endo-arabinanases de *Lactobacillus crispatus* e *Bacillus licheniformis* (FARRO et al., 2018; LI; GÄNZLE, 2020). Neste trabalho, observou-se que atividade da GeoARA foi levemente afetada por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  e íon  $\text{K}^+$  praticamente não

teve nenhum efeito. Observou-se que o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , além da GeoARA, exerce uma atividade negativa em diversas endo-arabinanases descritas (CHEN et al., 2015; FARRO et al., 2018; HONG; PARK; OH, 2009; HUY et al., 2013; LANG et al., 2016; SEO et al., 2010; SHI et al., 2014). Já o íon  $\text{Ni}^{2+}$  pode afetar de forma positiva ou negativa a atividade enzimática de maneira proteína-específica. A endo-arabinanase de *C. saccharolyticus* teve sua atividade melhorada, na presença deste íon, enquanto que a endo-arabinanase de *B. licheniformis* (BlAbn1) teve sua atividade reduzida, semelhante a GeoARA (FARRO et al., 2018; HONG; PARK; OH, 2009). Por sua vez, os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  afetaram de forma positiva a endo-arabinanase RmArase de *Rhizomucor miehei* (CHEN et al., 2015).

Em virtude do maior aumento da atividade enzimática da GeoARA ter sido proporcionado na presença de  $\text{Co}^{2+}$  ( $118,37 \pm 0,24\%$ ), este íon foi utilizado nos testes de termoestabilidade, como mostrado no item 4.1.4. O papel de alguns metais no aumento da atividade de endo-arabinanases tem sido atribuído à estabilidade, em vez de um papel direto na catálise (FARRO et al., 2018). Essa hipótese é corroborada com os resultados obtidos neste trabalho (Figura 11B).



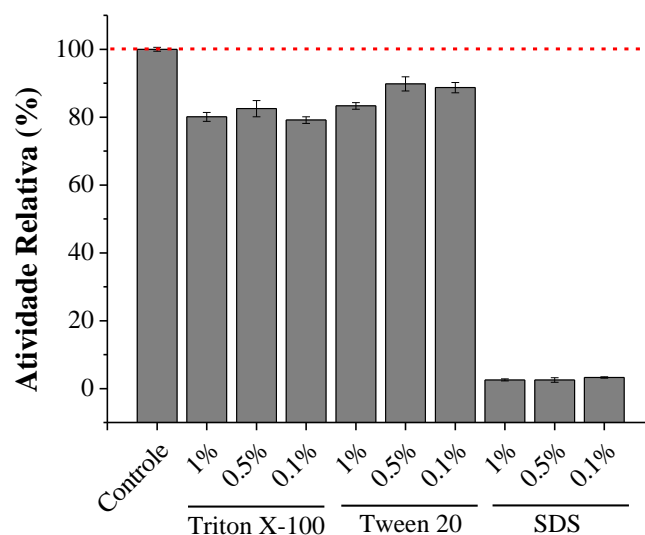
**Figura 13: Influência de íons metálicos, EDTA e BSA na atividade da GeoARA.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 a 70 °C.

A GeoARA exibiu quase a mesma atividade enzimática na presença do agente quelante EDTA ( $97,04 \pm 7,1\%$ ), indicando que é uma enzima independente de metal, em conformidade com a maioria das endo-arabinanases até então relatadas (HONG; PARK; OH, 2009; INÁCIO; DE SÁ-NOGUEIRA, 2008; LANG et al., 2016; LEAL; SÁ-NOGUEIRA, 2004; SEO et al., 2010; TAKAO; AKIYAMA; SAKAI, 2002). De acordo com Sanctis et al. (2010), uma endo-

arabinase de *B. subtilis* (BsArb43B) requer o íon  $\text{Ca}^{2+}$  para a sua atividade. No trabalho de Li e Gänzle (2020) foi relatada a caracterização de duas endo-arabinanases de *L. crispatus* (AbnA e AbnB). A atividade da enzima AbnA é parcialmente dependente de íons metálicos, visto que sua atividade foi reduzida a 60% após a adição de EDTA. Em contrapartida, a enzima AbnA é independente de metal, semelhante a GeoARA. Esses dados sugerem que as endo-arabinanases são enzimas que exibem diferentes respostas na presença de íons metálicos, independentemente de serem oriundas do mesmo organismo.

Também foi analisada a influência da proteína albumina na atividade enzimática da GeoARA, visto que já foi relatado que a BSA pode aumentar a hidrólise enzimática da celulose (YANG; WYMAN, 2006), além disso é sugerido seu uso (1 mg/mL) no meio reacional contendo a endo-arabinanase de *Aspergillus niger* (E-EARAB), comercializada pela empresa Megazyme (MEGAZYME, 2022a). No entanto, a presença de BSA aumentou levemente a atividade da GeoARA ( $103,4 \pm 8,1\%$ ).

A atividade da GeoARA foi fortemente inibida pelo detergente SDS e levemente inibida por Triton X-100 e Tween 20 (Figura 14), diferentemente dos resultados descritos por Shi et al. (2014), no qual a endo-arabinanase Tth Abn de *T. thermarum* teve sua atividade melhorada na presença de 0,05% de Tween 60 e 0,1% SDS.



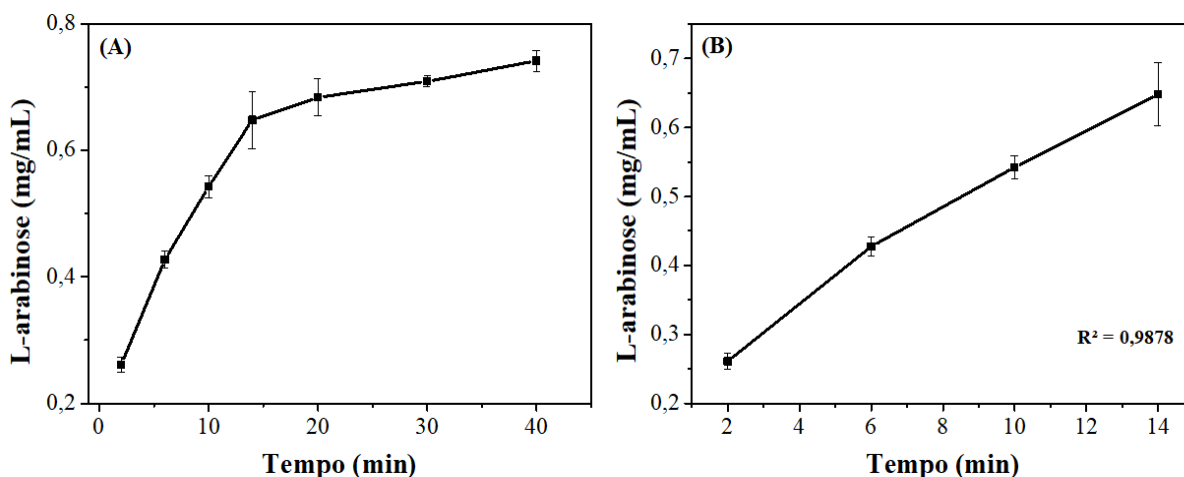
**Figura 14: Influência de detergentes na atividade da GeoARA.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 a 70 °C.

#### 4.1.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

Uma vez que uma reação catalisada deve inicialmente seguir uma relação linear, da qual sua velocidade é derivada (BISSWANGER, 2014), foi necessária a construção de uma curva de progresso da reação catalisada pela GeoARA em diferentes tempos, a fim de determinar o



melhor tempo para realização dos ensaios de cinética enzimática. Nesse sentido, verificou-se que o tempo de 10 minutos seria o ideal para determinação dos parâmetros cinéticos (Figura 15).



**Figura 15: Curva de progresso da reação catalisada pela GeoARA.** Em A: curva das reações realizadas nos tempos de 2 minutos a 40 minutos. Em B: curva das reações realizadas nos tempos de 2 minutos a 14 minutos. As atividades foram avaliadas com arabinana desramificada 0,4% em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 7,0 a 70 °C.

A atividade específica da GeoARA contra a arabinana desramificada como substrato, nas condições de maior atividade da enzima, foi de  $226,67 \pm 1,41$  U/mg, com valores de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten),  $V_{max}$  (velocidade inicial máxima),  $k_{cat}$  (número de renovação) e  $k_{cat}/K_m$  (eficiência catalítica) de  $12,12 \pm 4,98$  mg/mL,  $1284,70 \pm 359,58$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $642,34 \pm 254,26$  /s,  $53$  mL/mg/s, respectivamente (Tabela 7).

A enzima possui um valor de  $K_m$  dentro da faixa dos valores relatados para endo-arabinanases. Em contrapartida, a eficiência catalítica da GeoARA consiste no segundo melhor valor apresentado. Até o momento, a endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase ABN-TS de *G. thermodenitrificans* TS-3 possui a maior eficiência catalítica sobre o substrato arabinana desramificada (Tabela 7).

Analisou-se também os parâmetros cinéticos da GeoARA na presença de 1mM de  $\text{CoCl}_2$ . A atividade específica da GeoARA contra a arabinana desramificada foi de  $262 \pm 12,91$  U/mg, com valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ , e  $k_{cat}/K_m$  de  $9,53 \pm 2,32$  mg/mL,  $1175,73 \pm 173,32$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $587,87 \pm 122,54$  /s,  $61,69$  mL/mg/s, respectivamente. Como pode ser observado, o íon  $\text{Co}^{2+}$  contribui com a melhora de 1,16% da eficiência catalítica. Apesar desse valor ser considerado baixo, a maior estabilidade térmica da GeoARA ao longo do tempo proporcionada pelo íon  $\text{Co}^{2+}$  (Figura 11B) indica uma notável contribuição deste íon em bioprocessos utilizando a enzima GeoARA.

**Tabela 7:** Dados comparativos dos parâmetros cinéticos de endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases de alguns microrganismos.

Organismo de origem	Enzima	Substrato	Atividade Relativa (%)	$K_m$ (mg/mL)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min/mg)	$k_{cat}$ (/s)	$k_{cat}/K_m$ (mL/mg/s)	Referência
<i>B. licheniformis</i> KS12		Arabinana desramificada	100	19	NI	161	8,47	SEO et al., 2010
		Arabinana ramificada	2,6					
<i>B. thermodenitrificans</i>	ABFN-TS	Arabinana desramificada	100	8,5	1600	933,3 <sup>c</sup>	109,8 <sup>c</sup>	TAKAO; AKIYAMA; SAKAI, 2002
		Arabinana ramificada	NI					
<i>C. saccharolyticus</i>		Arabinana desramificada	100	18,13	NI	49,78	2,75	HONG; PARK; OH, 2009
		Arabinana ramificada	21,7					
<i>P. chrysosporium</i>	rPcARA	Arabinana desramificada	100	4,3	400	220 <sup>c</sup>	51,16 <sup>c</sup>	HUY et al., 2013
		Arabinana ramificada	6,7					
<i>P. polymyxa</i>	AbnZ1	Arabinana linear	100	11,6	117,7	68,7	5,92 <sup>c</sup>	WANG et al., 2014a
		Arabinana desramificada	54,9					
		Arabinana ramificada	12,7					
<i>T. petrophila</i>	AbnA	Arabinana desramificada	100	19,9	478,2 <sup>a</sup>	NI	NI	SQUINA et al., 2010
		Arabinana linear	100	12,3	1052,1 <sup>b</sup>	349,3	28,4	
<i>T. thermarum</i>	Tth Abn	Arabinana desramificada	84	3,3	510,9 <sup>b</sup>	169,6	51,4	SHI et al., 2014
		Arabinana ramificada	17,9					
<b><i>Geobacillus</i> sp. JS12</b>	<b>GeoARA</b>	<b>Arabinana desramificada</b>	<b>100</b>	<b>12,12</b>	<b>1284,7</b>	<b>642,34</b>	<b>53</b>	<b>Este trabalho</b>
		<b>Arabinana ramificada</b>	<b>13,6</b>					

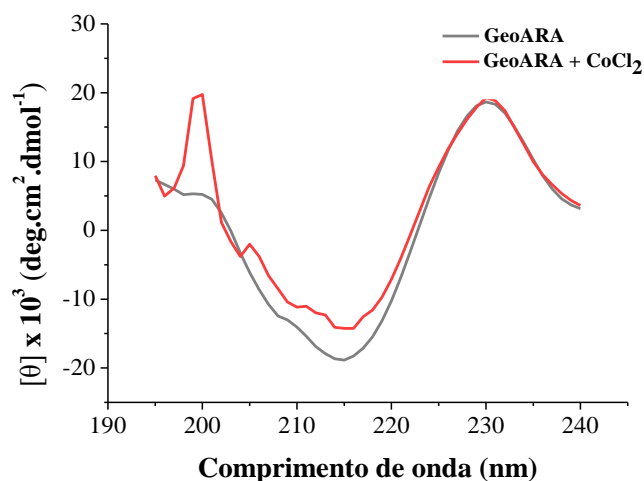
NI = não informado; a: mg/ml/min; b:  $\mu$ mol/mL/min; c: valores não informados na literatura, porém deduzidos pelo autor.

#### 4.1.7 Análise de termoestabilidade por Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica utilizada para investigar, principalmente, a estrutura secundária e alterações conformacionais de proteínas. Este método é baseado no fenômeno óptico da absorção da luz circularmente polarizada. O sinal de CD ocorre quando os cromóforos em um ambiente assimétrico interagem com a luz polarizada. No caso das proteínas, os principais cromóforos são as ligações peptídicas, pois absorvem a luz polarizada na região do comprimento de onda UV distante (isto é, abaixo de 240 nm). As alfa-hélices e conformações betas têm espectros de CD característicos. Com o espectro de CD, pode-se determinar se as proteínas estão dobradas corretamente, estimar a fração da proteína que assume qualquer uma das duas estruturas secundárias comuns e monitorar as transições entre os estados enovelados e não enovelados (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

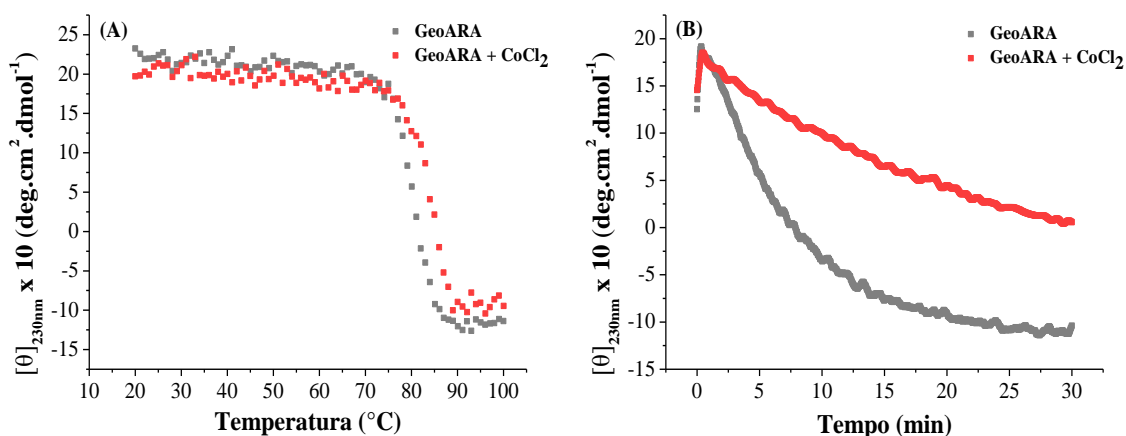
Nesse sentido, a fim de identificar o melhor comprimento de onda (maior sinal de CD) para análise de termoestabilidade da GeoARA, primeiramente foi feita a análise do perfil estrutural da enzima na presença e ausência do íon  $\text{Co}^{2+}$ , em virtude da influência deste íon na termoestabilidade da GeoARA. Como pode ser observado na Figura 16, a GeoARA apresenta uma estrutura secundária estável na presença de  $\text{Co}^{2+}$ , e os espectros mostraram um pico negativo entre 210-220 nm, com um mínimo local em 215 nm, e um pico positivo entre 195-200 nm (mais evidente na presença de  $\text{Co}^{2+}$ ), característicos do espectro para uma proteína de folha- $\beta$  (CORRÊA; RAMOS, 2009), resultado este esperado, em conformidade com o modelo tridimensional obtido da GeoARA.

Também é possível observar um pico positivo em 230 nm. De acordo com a literatura, picos positivos na região de 225-230 nm de espectros de CD de proteínas, são atribuídos a presença de resíduos aromáticos, principalmente tirosina e triptofano, e ligações dissulfeto (HIDER et al., 1988; PERCZEL; PARK; FASMAN, 1992). A sequência proteica da GeoARA possui 6 resíduos de cisteína (1,9% da composição proteica), destes foi verificado por meio do servidor PDBsum que apenas os resíduos Cys221 e Cys222 formam ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto são identificadas para dois resíduos de cisteínas cujos átomos de enxofre estão separados por menos de 3Å (RICHARDSON, 1981). Nesse sentido, acredita-se que esta ligação dissulfeto, juntamente com a presença de resíduos aromáticos (6,0% de tirosina e 3,8% de triptofano) contribuiu com o sinal de CD observado a 230 nm. Diante do resultado apresentado, selecionou-se o comprimento de onda de 230 nm para análise de termoestabilidade da GeoARA.



**Figura 16:** Perfil estrutural por dicroísmo circular da enzima GeoARA na ausência e presença do íon  $\text{Co}^{2+}$ . A enzima recombinante foi diluída (0,05 mg/mL) em tampão *MacIlvine* 25 mM, pH 7,0 na ausência (gráfico cinza) e presença (gráfico vermelho) de 1 mM de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ).

A desnaturação térmica da GeoARA na ausência e presença do íon  $\text{Co}^{2+}$  foi monitorada utilizando CD, variando a temperatura de 20 °C a 100 °C. O processo de desnaturação mostrou uma transição brusca do estado enovelado para o desenovelado a partir de 70 °C como mostrado na Figura 17A, havendo uma sutil diferença entre a termoestabilidade da enzima na ausência ( $T_m = 80,2$ ) e presença de cobalto ( $T_m = 83,6$ ). No entanto, quando analisada a desnaturação da GeoARA ao longo do tempo a 80 °C (Figura 17B), verifica-se que a enzima na presença do íon  $\text{Co}^{2+}$  apresenta uma maior termotolerância, retardando sua desnaturação, o que corrobora com os resultados obtidos nos testes de atividade enzimática (Figura 11B). Em suma, tais resultados indicam que o íon cobalto contribui para uma maior termotolerância da GeoARA, em virtude da melhora da estabilidade estrutural da enzima proporcionada por este íon.



**Figura 17:** Perfil de desnaturação térmica por dicroísmo circular da GeoARA na ausência e presença do íon  $\text{Co}^{2+}$ . Em A: variação da temperatura de 20 °C a 100 °C. Em B: variação do tempo de 0 a 30 minutos a 80 °C. A enzima recombinante foi diluída (0,05 mg/mL) em tampão *MacIlvine* 25 mM, pH 7,0 na ausência (gráficos em cinza) e presença (gráficos em vermelho) de 1 mM de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ). Utilizou-se o comprimento de onda de 230 nm para as análises.

## 4.2 $\beta$ -XILOSIDASE (GeoXIL)

### 4.2.1 Análises de bioinformática

#### 4.2.1.1 Análise da sequência gênica e proteica

A sequência gênica da GeoXIL, disponível no GenBank (CP020030.1) e inserida no vetor pTRC-HisA, contém 1608 pb e codifica uma proteína de 535 aminoácidos, com massa molecular estimada em 61,9 kDa. A análise no Pfam identificou um domínio de glicosil hidrolases da família 43 (GH43) nas posições 4 a 302 e um domínio C-terminal  $\beta$ -xilosidase semelhante a concanavalina A (GH43\_C2) nas posições 331 a 533 da sequência enzimática (Figura 18). De acordo com os dados disponíveis no Pfam, o domínio GH43\_C2 está presente apenas em proteínas da família GH43, sendo a maioria enzimas com atividade de  $\beta$ -xilosidase.

10	20	30	40	50	60
MVKIKNPILT	GFHPDPSICR	AGDDYYIAVS	TFEWFPGVRI	YHSKDLKNWR	LVARPLNRLS
70	80	90	100	110	120
QLNMIGNPDS	GGIWNAPHSY	SDGKFWLIYT	DKVQVEGQWK	DGHNYLVTC	TIDGEWSDPI
130	140	150	160	170	180
YLNSSGFDP	LFHDEDGRKY	LVMYWDHRV	GHHPFYGI	QEYSVEQK	IGEPKIIFKG
190	200	210	220	230	240
TDLRITGPH	LYKIDGYI	LTAEGGTRY	HAATIARSAS	LYGPYEVHPE	NPLITSWPYP
250	260	270	280	290	300
RNPLQKAGHA	SIVHTHTDEW	FLVHLTGRPL	PREGQPLLDH	RGYCPLGRET	AIQRLEWKDG
310	320	330	340	350	360
WPYVVGNGP	SLEIDGPNVE	EVPWERDYDE	KDDFDGDTLN	HHFQTLRIPL	GEDIATLKAR
370	380	390	400	410	420
PGHLRLYGRE	SLTSRFTQAF	VARRWQHFFH	IAETKVAFRP	TTIQQSAGLV	NYNYTQNWTT
430	440	450	460	470	480
LQLTWHEEK	RILELMACDH	LVVEQPLRGR	EIVVPDDVEY	VYLRVNVQMT	TYKYSYFDG
490	500	510	520	530	
VDWKEIPVTF	ESYKLSDDYI	KSNAAFTGAF	VGMHCRDGS	QNNYADFDF	LYKEL

**Figura 18: Sequência de aminoácidos da GeoXIL.** Destaca-se em azul o domínio GH43 (PF04616.16) e em vermelho o domínio GH43\_C2 (PF17851.3).

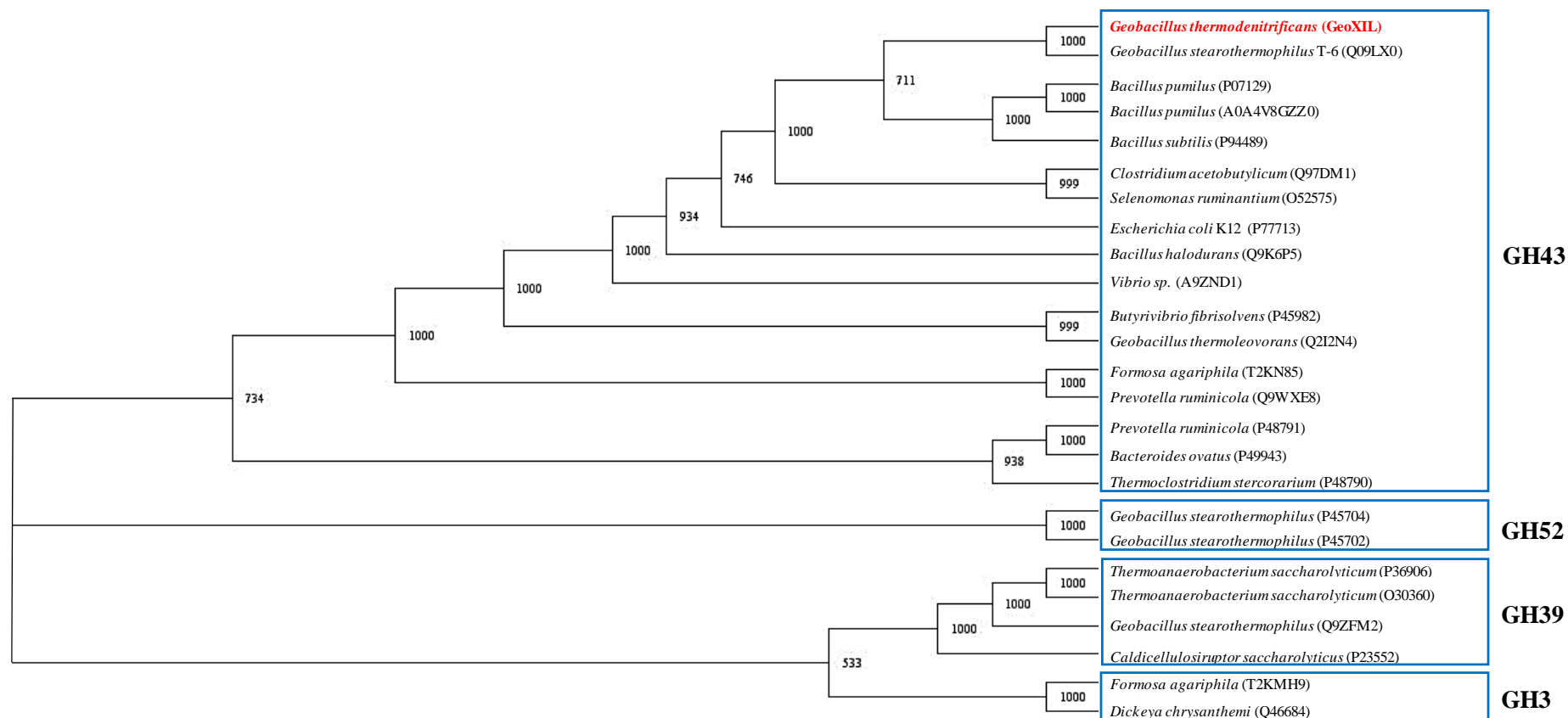
#### 4.2.1.2 Alinhamento múltiplo de sequências e construção da árvore filogenética

A busca por enzimas com atividade de  $\beta$ -xilosidase pelo UniProt, resultou em 17.675 sequências não revisadas (TrEMBL) e 68 sequências revisadas (Swiss-Prot), no entanto, é importante destacar que deste total, nem todas as enzimas eram de fato  $\beta$ -xilosidases. Nesse sentido, para construção da árvore filogenética, utilizou-se 18 sequências revisadas que apresentaram maior similaridade com a GeoXIL, além de 6 sequências não revisadas de  $\beta$ -xilosidases, porém que possuem a estrutura elucidada disponíveis no PDB.

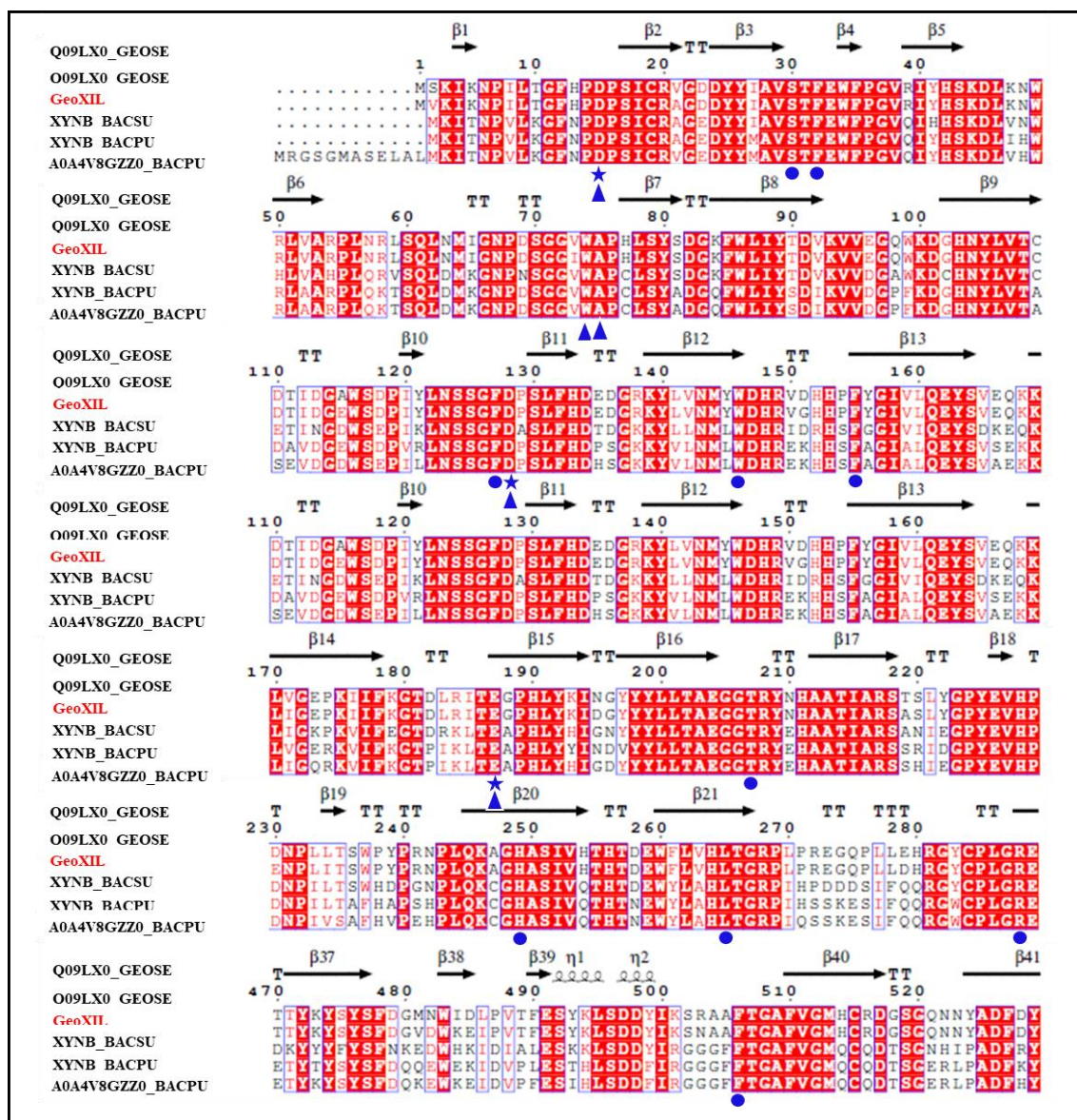
Como é possível observar na Figura 19, as sequências mais relacionadas evolutivamente com a sequência da GeoXIL (*Geobacillus thermodenitrificans*) são oriundas de diferentes gêneros de bactérias. A enzima apresenta uma estreita relação com uma  $\beta$ -xilosidase de *Geobacillus stearothermophilus* (Uniprot: Q09LX0; PDB: 2EXH), indicada pela presença de um nó altamente consistente (1000). De fato, a análise BLASTp entre as duas sequências apresentou uma identidade de 94,58%. A GeoXIL também apresentou uma relação próxima com  $\beta$ -xilosidases de *Bacillus subtilis* (Uniprot: P94489; PDB: 1YIF), *Bacillus pumilus* (Uniprot: A0A4V8GZZ0; PDB: 6IFE) e *Bacillus pumilus* (Uniprot: P07129; PDB: 5ZQJ). De acordo com a análise BLASTp das sequências proteicas citadas, GeoXIL apresenta uma identidade de 66,98%, 65,17% e 64,17%, respectivamente. Todas essas enzimas apresentam um domínio característico das GH43.

Diferentemente ao observado da análise filogenética das endo-arabinanases, enzimas com atividade de  $\beta$ -xilosidase oriundas do gênero *Geobacillus*, foram distribuídas em diferentes ramos (exceto a sequência PDB: 2EXH), indicando uma maior distância evolutiva entre as sequências, o que justifica a distribuição em diferentes famílias de GH (39, 43 e 52). De acordo com o BLASTp, apenas a  $\beta$ -xilosidase de *Geobacillus thermoleovorans* (Uniprot: Q2I2N4; PDB: 5Z5D) apresentou uma identidade significativa (34,63%) para quantificação em relação as demais. Dessa forma, selecionou-se apenas as enzimas que apresentaram maior relação evolutiva com a GeoXIL para análise comparativa das sequências e dedução dos resíduos de aminoácidos relacionados a catálise enzimática.

Como mencionado anteriormente, o núcleo catalítico das enzimas da família GH43 é altamente conservado e apresenta três resíduos de aminoácidos principais: Asp, Asp e Glu. A partir do alinhamento múltiplo de sequências, pode-se observar a conservação dos resíduos da tríade catalítica (Figura 20). Na sequência da GeoXIL eles correspondem: Asp15, Asp128 e Glu187.



**Figura 19:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência de aminoácidos da GeoXIL e outras sequências de  $\beta$ -xilidases obtidas pelo UniProt. Os números nos nós indicam os valores percentuais de inicialização para 1000 reamostragens. A descrição entre parênteses, após o nome dos organismos, indica o número de entrada das sequências proteicas no UniProt. A árvore filogenética foi gerada pelo ClustalX2 e a figura obtida pelo FigTree v1.4.4.

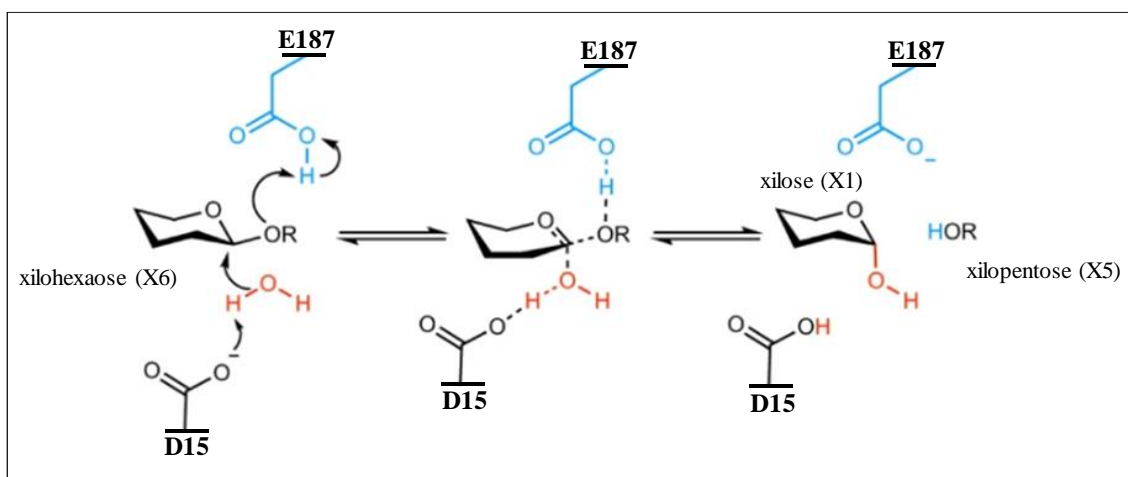


**Figura 20:** Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos de  $\beta$ -xilosidases. As seqüências são identificadas pelo seu nome de entrada no UniProt: *G. stearothermophilus* T-6 (Q09LX0\_GEOSE), *B. subtilis* (XYNB\_BACSU), *B. pumilus* (XYNB\_BACPU) e *B. pumilus* (A0A4V8GZZ0\_BACPU). Resíduos de aminoácidos idênticos são escritos em letras brancas e destacados de vermelho e aqueles que possuem alta similaridade são escritos em letras vermelhas. Os resíduos que compõem a tríade catalítica estão indicados por estrelas; os resíduos essenciais para o reconhecimento do substrato apenas em  $\beta$ -xilosidases GH43 são indicados por esferas; e os resíduos essenciais para o reconhecimento do substrato em enzimas GH43 são indicados por triângulos. Os elementos de numeração de seqüência e de estrutura secundária correspondem à seqüência da  $\beta$ -xilosidase XynB3 de *G. stearothermophilus* T-6. O alinhamento foi gerado pelo ClustalX2 e a figura produzida pelo ESPript 3.0.

Com base na estrutura cristalina da XynB3 de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (PDB: 2EXH) e caracterização bioquímica da enzima nativa e mutada (D15G, D128G e E187G), Asp15 e Glu187 representam a base geral e o ácido geral, respectivamente e Asp128 atua como modulador de pKa do resíduo Glu187, além de orientar este resíduo em direção ao substrato e também auxiliar na ligação do substrato no sítio ativo da



enzima. O mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica também resulta na inversão da configuração anomérica do substrato (Figura 21). A base geral, Asp15, está situada entre dois resíduos de prolina (Pro14 e Pro16) conservados que fornecem a orientação necessária para a atividade catalítica deste resíduo ácido. Além disso, há uma forte interação de hidrogênio entre Asp15 e Ser30, um resíduo bem conservado entre as  $\beta$ -xilosidases GH43. A posição de Asp15 permite ativar uma molécula de água para um ataque de deslocamento único no carbono anomérico do lado oposto da ligação glicosídica, resultando na inversão da configuração anomérica. O resíduo ácido geral, Glu187, protona o açúcar de saída. Para que este resíduo atue como um ácido geral, seu pKa deve ser consideravelmente maior que o normal (4,07). Nesse sentido, Asp128 modula o pKa desse resíduo e o eleva para 7,1 resultando na manutenção do seu estado protonado e permitindo que funcione como ácido para a reação (BRÜX et al., 2006; SHALLOM et al., 2005). Portanto, infere-se que os resíduos Asp15, Asp128 e Glu187, relatados em XynB3, também desempenham as mesmas funções na GeoXIL.



**Figura 21: Mecanismo de catálise de XynB3.** Hidrólise de xilooligossacarídeo curto, representado por xilohexaose, produzindo xilose e xilopentose (grupo de saída). Asp15 representa a base geral e Glu187 o ácido geral. O modulador de pKa, Asp128, foi omitido.

Fonte: adaptado de (MORAIS et al., 2021).

Além dos resíduos citados, existem outros resíduos conservados que são essenciais para o reconhecimento do substrato apenas em  $\beta$ -xilosidases GH43, sendo estes: Ser30, Phe32, Phe127, Trp146, Phe155, Thr207, His249, Leu265, Arg288 e Phe506; e resíduos conservados (além dos resíduos catalíticos Asp15, Asp128 e Glu187) que são essenciais em todos os membros de GH43, sendo estes: Trp74 e Ala75 (Figura 20) (BRÜX et al., 2006).

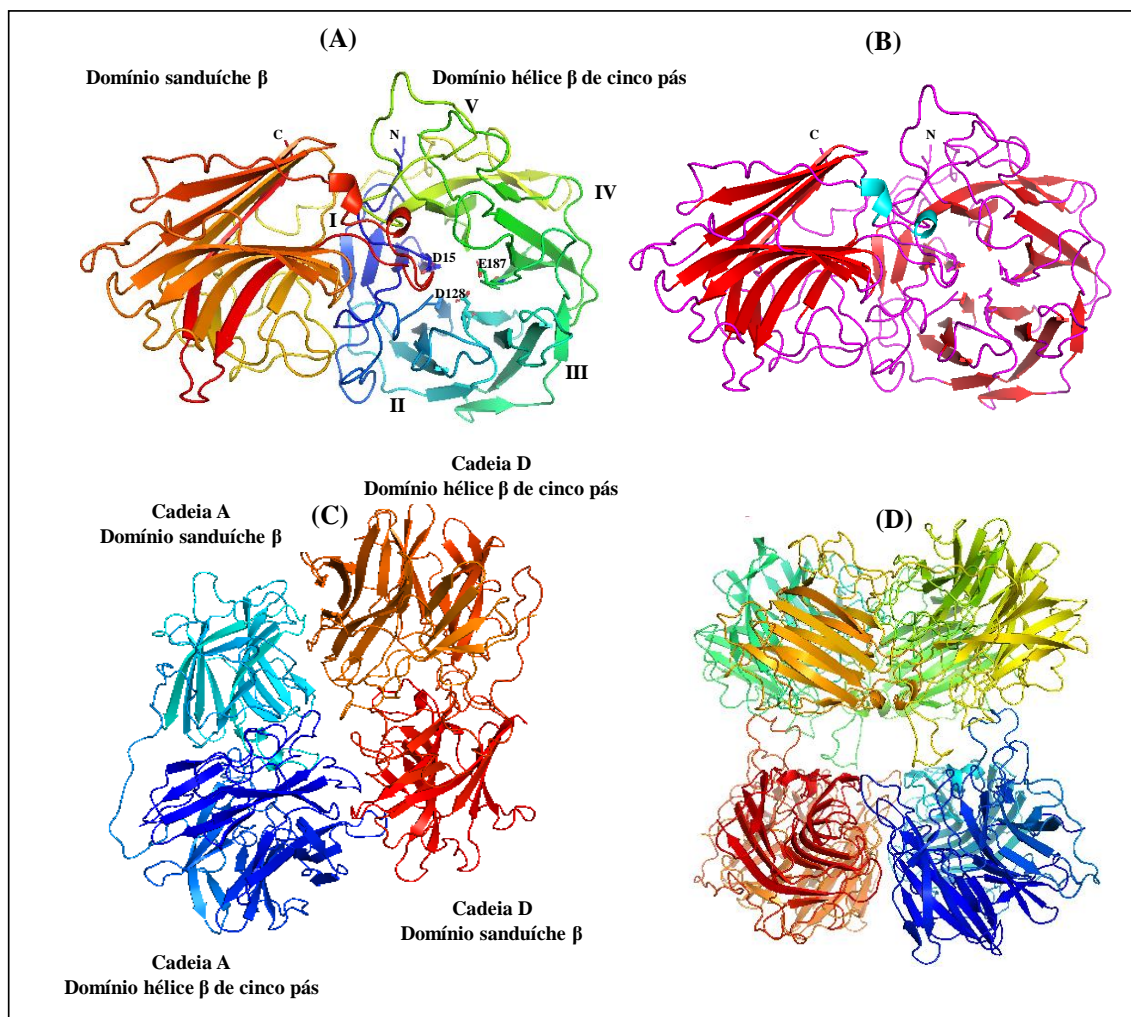
### **4.2.1.3 Predição da estrutura tridimensional**

A fim de elucidar a estrutura tridimensional da GeoXIL, utilizou-se como molde a  $\beta$ -xilosidase XynB3, devido à maior identidade apresentada (94,58%) e sua estrutura tridimensional estar disponível no Banco de Dados de Proteínas (PDB: 2EXH). A estrutura da  $\beta$ -xilosidase XynB3 foi obtida na forma de homotetrâmero, estando disponível este arranjo para modelagem e da sua unidade monomérica. Dessa forma, o modelo da GeoXIL foi construído a partir desses dois arranjos. A análise da qualidade estereoquímica do modelo tridimensional na forma de monômero, gerado pelo SWISS-MODEL, apresentou os seguintes resultados no diagrama de Ramachandran: 86,8% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 11,2% em regiões permitidas, 0,9% em regiões que são admitidas e 1,1% em regiões não permitidas. Por sua vez, o modelo tridimensional na forma de tetrâmero, apresentou os seguintes resultados no diagrama de Ramachandran: 86,3% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 11,8% em regiões permitidas, 1,0% em regiões que são admitidas e 0,8% em regiões não permitidas. Em virtude da limitação do número de aminoácidos aceitos no programa utilizado para refinamento de estruturas tridimensionais ( $\leq 1000$  aa), bem como a elevada qualidade dos modelos obtidos pelo SWISS-MODEL, não foi realizado o refinamento destes.

A análise de qualidade global dos modelos, realizada por meio da ferramenta QMEAN, apresentou um *score* global de 0,73 (monômero e tetrâmero). Nesse sentido, os modelos das estruturas monomérica e tetramérica de GeoXIL, também foram considerados satisfatórios, com o valor de *score* global próximo do valor máximo 1, indicando que tais estruturas apresentam qualidade compatível com estruturas de alta resolução resolvidas experimentalmente.

Como pode ser observado na Figura 22 (A e B), o modelo monomérico da GeoXIL apresenta dois domínios denominados de domínio hélice  $\beta$  de cinco pás ou lâminas (domínio 1; resíduos 4 – 302) localizado na região N-terminal e domínio sanduíche  $\beta$  (domínio 2; resíduos 331 - 533) localizado na região C-terminal. O domínio 1 é constituído por 21 fitas  $\beta$  antiparalelas organizadas em 5 folhas  $\beta$ , enquanto que o domínio 2 é constituído por 2  $\alpha$ -hélices e 11 fitas  $\beta$  antiparalelas organizadas em 2 folhas  $\beta$ . Por sua vez, a  $\beta$ -xilosidase XynB3, também constituída por dois domínios (1 e 2), apresenta no primeiro domínio 23 fitas  $\beta$  antiparalelas organizadas em 5 folhas  $\beta$ , enquanto que o domínio 2 é constituído por 2  $\alpha$ -hélices e 17 fitas  $\beta$  antiparalelas organizadas em 2 folhas  $\beta$  (BRÜX et al., 2006). Dessa forma, é possível observar algumas diferenças entre a estrutura secundária da GeoXIL e XynB3.

O sítio ativo da GeoXIL está situado em uma extremidade da cavidade em forma de funil do domínio 1 que é formado pelo empacotamento das folhas  $\beta$ . Os resíduos catalíticos D15, D128 e E187 estão orientados no centro da cavidade da hélice  $\beta$  e localizados nas pás I, III e IV, respectivamente, das fitas  $\beta$  mais internas (Figura 22A). O sítio ativo das  $\beta$ -1,4-xilosidases possui uma topologia de bolso que é construída principalmente a partir de resíduos do domínio 1. Estes resíduos formam uma fenda que é bloqueada de um lado por uma alça originada do domínio 2. Esta alça fecha a fenda de um lado para formar a topologia de bolso, a qual é fundamental para o modo de ação exo das  $\beta$ -1,4-xilosidases, ou seja, a alça restringe o comprimento do substrato de entrada (número de unidades de xilose) resultando em uma exo-enzima que libera apenas unidades de xilose únicas da extremidade não redutora dos xilo-oligossacarídeos (BRÜX et al., 2006; ROHMAN et al., 2018). Além de sua presença em algumas enzimas da família GH43, o domínio sanduíche  $\beta$  também está presente em outros tipos de enzimas, tais como:  $\beta$ -glucanases, lectinas, celulases e sialidases. Tem sido especulado que este domínio funcionou anteriormente como um módulo de ligação a carboidratos, mas perdeu a função durante a evolução. De acordo com a classificação das enzimas GH43, com base em sua arquitetura de domínio, a GeoXIL é uma enzima do tipo II, pois além do domínio hélice  $\beta$  de cinco pás comum a todas as enzimas GH43 (além de GH32, GH62, GH68 e GH117), também possui o domínio adicional sanduíche  $\beta$  (ROHMAN et al., 2018). É importante destacar que há enzimas com atividade  $\beta$ -1,4-xilosidase GH43 que possuem apenas o domínio hélice  $\beta$ , estas representam a minoria, de acordo com as estruturas disponíveis no PDB (MATSUZAWA et al., 2017; MORAIS et al., 2021).

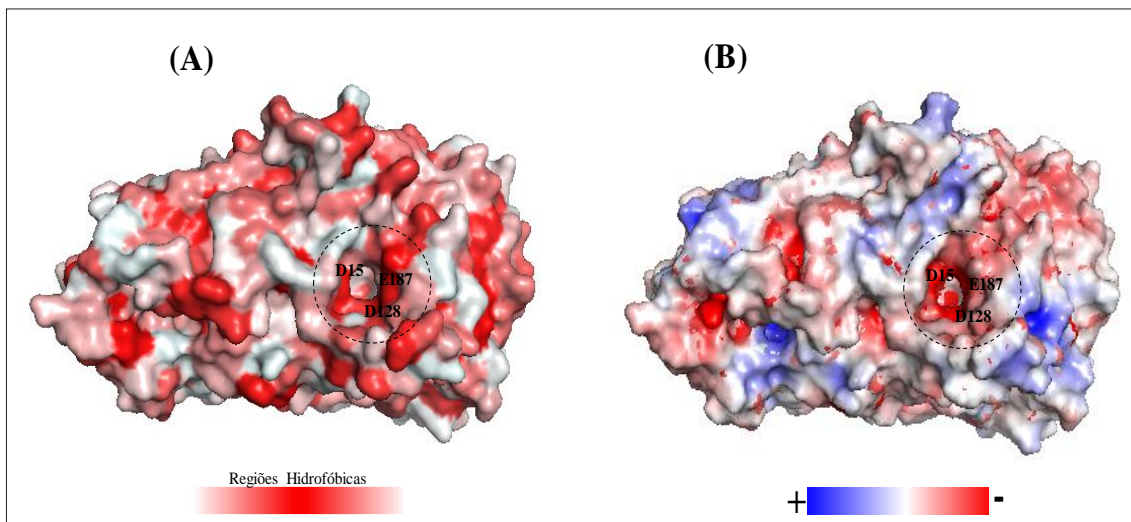


**Figura 22: Estrutura tridimensional predita da GeoXIL.** Em A: estrutura monomérica, onde estão destacados os domínios hélice  $\beta$  de cinco pás e o domínio sanduíche  $\beta$ . Os resíduos catalíticos D15, D128 e E187 estão indicados no domínio hélice  $\beta$ . Em B: estrutura monomérica, onde estão destacadas as estruturas secundárias (fitas  $\beta$  em vermelho,  $\alpha$ -hélices em azul e elementos de conexão em rosa). Em C: estrutura dimerica. Em D: estrutura tetramérica. Os modelos das estruturas tridimensionais foram construídos pela ferramenta Swiss Model, usando a estrutura da  $\beta$ -xilosidase XynB3 de *G. stearothermophilus* T-6 (PDB: 2EXH). As figuras foram obtidas pelo programa PyMol.

A estrutura quaternária da enzima GeoXIL é composta por dois homodímeros. Cada um desses dímeros consistem em dois monômeros idênticos que são alinhados antiparalelamente um ao outro, de modo que o domínio N-terminal da hélice  $\beta$  de cinco pás de um monômero interage intimamente com o domínio C-terminal do sanduíche  $\beta$  do segundo monômero e vice-versa. A interação monômero-monômero é estabelecida principalmente por meio de interações de hidrogênio entre resíduos presentes em alças do domínio hélice  $\beta$  e do domínio sanduíche  $\beta$  de monômeros vizinhos (Figura 22C). O tetrâmero por sua vez, é composto por dois dímeros que estão posicionados a  $90^\circ$  um do outro. A interação dímero-dímero também é estabelecida principalmente por interações de hidrogênio entre resíduos presentes em alças oriundas apenas dos domínios hélice  $\beta$  de cada monômero (Figura 22D).

#### 4.2.1.4 Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície

O perfil de hidrofobicidade da região do sítio ativo da GeoXIL, contendo os resíduos catalíticos D15, D128 e E187, mostrou que a região apresenta predominantemente característica hidrofóbica (Figura 23A) com potencial eletrostático predominantemente negativo (Figura 23B).



**Figura 23: Perfil de hidrofobicidade e potencial eletrostático de superfície da GeoXIL.** Em A: perfil de hidrofobicidade destacando-se (círculo preto) a região do sítio catalítico da enzima, predominantemente hidrofóbica, contendo os resíduos D15, D128 e E187. As regiões hidrofóbicas são apresentadas em vermelho e as regiões hidrofílicas são apresentadas em branco. Em B: potencial eletrostático destacando-se (círculo preto) a região do sítio catalítico da enzima, predominantemente negativa, contendo os resíduos D15, D128 e E187. As regiões eletrostáticas negativas são apresentadas em vermelho, regiões neutras são apresentadas em branco e regiões positivas são apresentadas em azul.

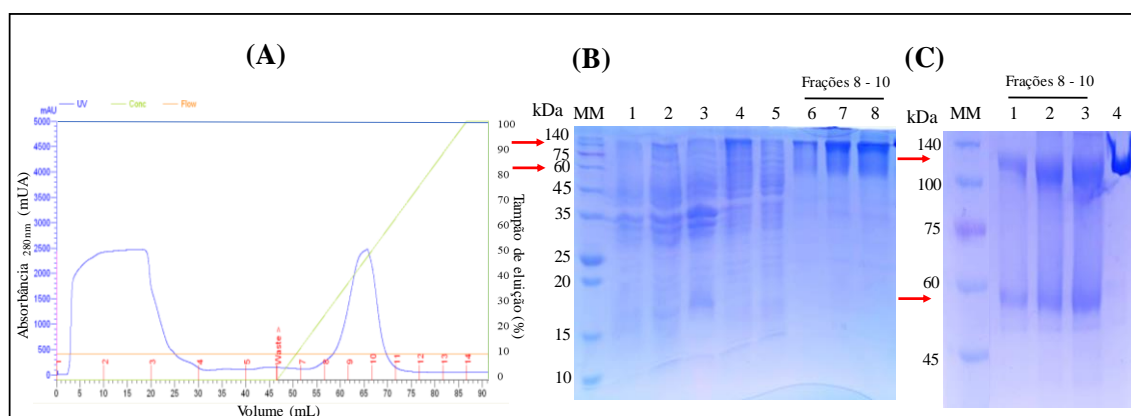
O sítio ativo da  $\beta$ -xilosidase XynB3 (94,58% de identidade com GeoXIL) também apresentou vários resíduos hidrofóbicos conservados que podem criar interações hidrofóbicas com o substrato, dentre eles destaca-se: Trp74 e Phe506 (único resíduo do sítio ativo que se origina do domínio sanduíche  $\beta$ ) presentes no sítio ativo e Phe32, Leu265, Phe127, Trp146 e Phe155 localizados na vizinhança do sítio ativo. Tais resíduos interagem diretamente com o substrato (BRÜX et al., 2006). De acordo com a literatura, as interações hidrofóbicas e de empilhamento, juntamente com as ligações de hidrogênio, são as interações dominantes nos complexos proteína-carboidrato (BRÜX et al., 2006; QUIOCHO, 1989; ZOLOTNITSKY et al., 2004).

Para a análise e comparação do potencial eletrostático da GeoXIL em relação à outras  $\beta$ -xilosidases, também não foi localizado na literatura dados que contribuíssem para a discussão do resultado obtido. Em síntese, pode-se inferir, previamente, que o caráter hidrofóbico e negativo do sítio ativo da GeoXIL, contribui para a interação com seu substrato.

Em suma, a elevada identidade de GeoXIL com a  $\beta$ -xilosidase XynB3, agrupamento com  $\beta$ -xilosidasas bacterianas, a presença de resíduos catalíticos importantes e conservados, bem como a constituição estrutural predita da proteína, indicam que a GeoXIL é uma enzima com atividade de  $\beta$ -xilosidase da família GH43, tornando-se necessária a caracterização bioquímica para elucidar sua função.

#### 4.2.2 Expressão e purificação da GeoXIL

A enzima recombinante GeoXIL foi expressa em células de *E. coli* BL21 e visualizada, em SDS-PAGE, na fração solúvel após o processo de sonicação. Por meio da purificação por cromatografia de afinidade, foi possível observar a presença de um único pico no cromatograma, indicando a purificação da proteína (Figura 24A).



**Figura 24: Purificação da enzima GeoXIL por cromatografia de afinidade.** (A) Perfil cromatográfico da enzima durante processo de purificação; (B) SDS-PAGE 12%: (1) cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida com 0,5 mM de IPTG; (3) precipitado bacteriano (4) sobrenadante bacteriano (5) *flow-through*; e (6 a 8) frações de eluição coletadas após a purificação; (C) SDS-PAGE 8%: (1 a 3) frações de eluição coletadas após a purificação e (4) fração dialisada e concentrada (não aquecida e em tampão de amostra não desnaturante); as setas em vermelho indicam a posição da enzima recombinante. MM - Marcador molecular TrueColor High Range Protein – Sinapse.

O SDS-PAGE apresentou duas bandas da proteína purificada (Figura 24 A e B), sendo uma banda com massa molecular estimada em 124 kDa e a outra banda com massa molecular estimada em 55 kDa (Figura 24C, poços 1 a 3), conforme determinada pelo programa GelAnalyzer 19.1. O valor da banda menor difere do valor estimado por análise de bioinformática, sendo este de 63,1 kDa com base nos 535 resíduos de aminoácidos da sequência proteica, mais 6 resíduos de histidinas e 5 resíduos de aminoácidos espaçadores presentes na região N-terminal. A banda maior por sua vez, apresentou uma massa molecular correspondente à duas moléculas de GeoXIL, de acordo com o valor determinado pelo programa GelAnalyzer (124 kDa) e pela ferramenta ProtParam (126,2 kDa), sendo estes similares.

A fim de confirmar se as duas bandas eram de fato formas oligoméricas da enzima GeoXIL, também foi aplicado no gel de poliacrilamida uma amostra da proteína em

condições não desnaturantes (Figura 24C, poço 4), ou seja, utilizou-se tampão de amostra não desnaturante e ausência de tratamento térmico da amostra. A presença de uma única banda, correspondente ao tamanho da banda maior, indica que a forma predominante da GeoXIL em solução é a dimérica.

As  $\beta$ -xilosidases que apresentaram maior relação evolutiva e de identidade com a GeoXIL (Figura 19 e 20), possuem estruturas diméricas ou tetraméricas, como mostrado na Tabela 8. A estrutura cristalina da  $\beta$ -xilosidase XynB3 de *G. stearothermophilus* (94,58% de identidade com a GeoXIL), foi obtida na forma de tetrâmero, no entanto o seu verdadeiro estado oligomérico em solução ainda não foi confirmado. De acordo com o resultado obtido por cromatografia de permeação em gel, acredita-se que XynB3 seja um trímero em solução, entretanto este método possui baixa precisão. Também é possível que a enzima seja um dímero em solução, uma vez que nenhum dos pares de resíduos que conectam os dímeros para formar a estrutura tetramérica é conservado (BRÜX et al., 2006). Por sua vez, a estrutura cristalina da enzima BpXynB de *B. pumilus* (64,17% de identidade com a GeoXIL) foi obtida na forma de dímero. Para investigar os estados oligoméricos da enzima em solução, BpXynB foi submetida a análise de dispersão de luz multi-ângulo (MALS). Ambas as formas tetramérica (32%) e dimérica (68%) foram detectadas, o que indica a existência das duas formas em solução (HONG et al., 2018). A estrutura cristalina da enzima rHJ14GH43 de *B. pumilus* (65,17% de identidade com a GeoXIL) também foi obtida na forma de dímero. De acordo com os resultados de PAGE não desnaturante, o estado oligomérico de rHJ14GH43 em solução é dimérico (ZHANG et al., 2019b).

**Tabela 8:** Dados comparativos do estado oligomérico de  $\beta$ -xilosidases GH43 cristalizadas.

Organismo	Enzima	Nº de aminoácidos	Estado Oligomérico	PDB	Referência
<i>G. stearothermophilus</i> T-6	XynB3	535	Tetrâmero	2EXH	BRÜX et al., 2006
<i>B. subtilis</i>	B-1,4-xilosidase	533	Tetrâmero	1YIF	Não publicado
<i>B. pumilus</i>	BpXynB	541	Dímero	5ZQJ	HONG et al., 2018
<i>B. pumilus</i>	rHJ14GH43	553	Dímero	6IFE	ZHANG et al., 2019a
<i>G. thermodenitrificans</i>	<b>GeoXIL</b>	<b>535</b>	<b>Dímero</b>		<b>Este trabalho</b>

A literatura também tem relatado a estrutura monomérica de  $\beta$ -xilosidases da família GH43 (MATSUZAWA et al., 2017; MORAIS et al., 2021). No entanto, até o momento, nenhuma estrutura trimérica foi resolvida. Poucos trabalhos têm relatado a presença de trímeros de  $\beta$ -xilosidases da família GH52 e GH120 em solução, baseado em

análises de cromatografia por gel filtração e PAGE não desnaturante (JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2014; QUINTERO et al., 2007; SHAO et al., 2011). Apenas uma dessas enzimas apresenta sua estrutura resolvida, a enzima XylC GH120 de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 (PDB: 3VSV), e quando observado o estado oligomérico da enzima cristalizada, este é um tetrâmero (HUANG et al., 2012). Nesse sentido, verifica-se a necessidade de diferentes metodologias para a determinação do estado oligomérico nativo em solução das  $\beta$ -xilosidases e como mencionado, a forma da estrutura cristalizada pode diferir da encontrada em solução, bem como coexistirem diferentes formas da enzima em solução.

#### 4.2.3 Especificidade ao substrato

Inicialmente a GeoXIL apresentou atividade apenas contra p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNP-Xil) nas condições iniciais de caracterização (pH 6,0 e temperatura de 40 °C), porém quando avaliada a atividade nas condições de maior atividade da GeoXIL (pH 5,0 e temperatura de 60 °C), a enzima também apresentou atividade contra p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNP-Ara), contudo nenhuma atividade detectável foi encontrada contra os demais substratos (Tabela 9). A maior atividade específica sobre pNP-Xil foi de  $18,33 \pm 0,60$  (U/mg), enquanto que a atividade sobre pNP-Ara foi de  $0,62 \pm 0,02$  (U/mg), portanto, sendo 30 vezes mais ativa sobre pNP-Xil do que em pNP-Ara.

**Tabela 9:** Atividade específica da GeoXIL para diferentes substratos testados.

Substrato	Atividade Enzimática (U/mg) $\pm$ DP	
	pH 6,0; 40 °C	pH 5,0; 60 °C
Arabinana desramificada de beterraba-sacarina	ND	ND
Arabinana ramificada de beterraba-sacarina	ND	ND
Arabinoxilana de centeio de alta viscosidade	ND	ND
Arabinoxilana de farinha de trigo	ND	ND
Xilana de madeira de faia	ND	ND
Ramnogalacturonana I de batata	ND	ND
Xiloglucana de tamarindo	ND	ND
$\beta$ -glucana de cevada de baixa viscosidade	ND	ND
Galactomanana de alfarroba de baixa viscosidade	ND	ND
p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo	ND	$0,62 \pm 0,02$
p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo	$4,85 \pm 0,31$	$18,33 \pm 0,60$
p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo	ND	ND
p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	ND	ND

A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 6,0 a 40 °C e pH 5,0 a 60°C por 10 minutos (substratos sintéticos – 1mM) ou 30 minutos (substratos naturais – 0,4% p/v).

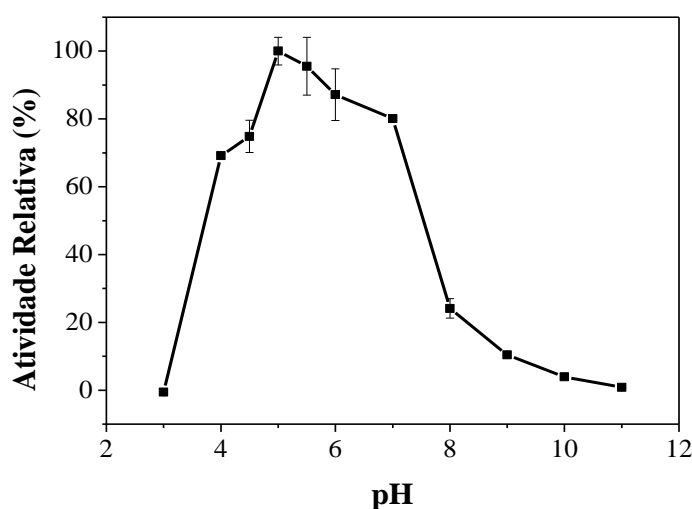
ND – não detectada.



A capacidade de hidrolisar pNP-Xil e pNP-Ara, indica que a GeoXIL é uma enzima bifuncional que possui ambas as atividades de  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, respectivamente, destacando-se a primeira. Como se sabe, as enzimas bifuncionais são benéficas para muitos processos biotecnológicos utilizando enzimas para a degradação de biomassa devido às suas atividades sinérgicas (CINTRA et al., 2017). As enzimas bifuncionais do tipo  $\beta$ -xilosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de diferentes microrganismos e famílias têm sido relatadas, no qual destacam-se as enzimas das famílias GH3 e GH43 (Tabela 10). As atividades bifuncionais das  $\beta$ -xilosidases têm sido associadas às semelhanças espaciais entre os açúcares D-xilopiranosose e L-arabinofuranose, particularmente as suas ligações glicosídicas e grupos hidroxilas (HUY et al., 2013).

#### 4.2.4 Influência do pH e temperatura

A maior atividade enzimática da GeoXIL foi obtida em pH 5,0, mantendo uma estabilidade significativa  $\geq 70\%$ , na faixa de pH 4,0 a 7,0. Não foi detectada atividade em pH 3,0 e em pH alcalino a enzima diminuiu consideravelmente sua atividade (Figura 25). A literatura tem relatado uma maior atividade das  $\beta$ -xilosidases fúngicas e bacterianas em pH ácido a neutro (Tabela 10). As  $\beta$ -xilosidases Ppxyl43B de *Paenibacillus physcomitrellae* XB (ZHANG et al., 2021), rPcXyl de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (HUY et al., 2013),  $\beta$ -D-xilosidase de *Scytalidium thermophilum* 77.7.8 (ZANOELO et al., 2004) e T81Xyl5\_22A de *Thermogemmatispora* sp. T81 (TOMAZINI et al., 2019), também apresentaram maior atividade em pH 5,0.



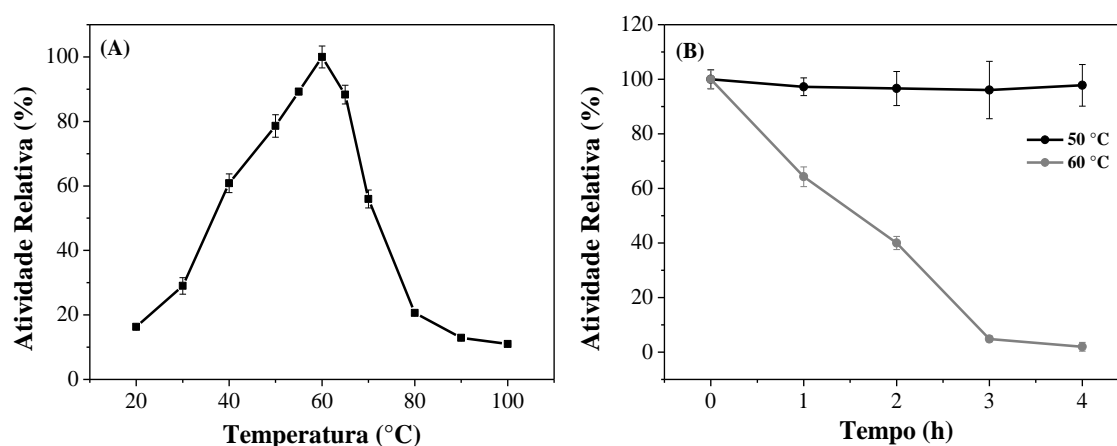
**Figura 25: Efeito do pH na atividade da GeoXIL.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM (pH de 3,0 a 8,0) e tampão Glicina-NaOH 50 mM (pH 9,0 a 11,0) a 40 °C.

**Tabela 10:** Dados comparativos do pH e temperatura de  $\beta$ -xilosidases de alguns microrganismos.

Organismo de origem	Enzima	Família	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Anoxybacillus</i> sp. 3M	AbXyl	GH52	5,5	60-65	MARCOLONGO et al., 2019
<i>Aspergillus</i> sp. BCC125	$\beta$ -xylosidase	GH3	4,0-5,0	60	WONGWISANSRI et al., 2013
<i>Bacillus pumilus</i> TCCC 11.350	rXYL	GH43	7,0	30	LIU et al., 2019
<i>Bacillus</i> sp. HJ14 ( <i>B. pumilus</i> )	rHJ14GH43	GH43	7,0	25	ZHANG et al., 2019 <sup>a</sup>
<i>Geobacillus pallidus</i>	$\beta$ -xylosidase <sup>SP</sup>	GH52	8,0	70	QUINTERO et al., 2007
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	WSUCF1 $\beta$ -xilosidase	GH39	6,5	70	BHALLA et al., 2014
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	XynB3	GH43	6,5	65	SHALLOM et al., 2005
	XynB1	GH39	6,5	60	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	XynB2	GH52	6,0	65	HUANG et al., 2017
	XynB3	GH43	5,5-6,0	65	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TSAA1	XsidB	GH52	7,0	60	JAIN et al., 2014
<i>Paenibacillus physcomitrellae</i> XB	Ppxyl43A	GH43	6,0	50	ZHANG et al., 2021
	Ppxyl43B		5,0	40	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Xyl2	GH3	2,0	28	FAÚNDEZ et al., 2019
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	rPcXyl	GH43	5,0	45	HUY et al., 2013
<i>Pseudozyma hubeinsis</i> NCIM 3574	PhXyl	NI	4,5	60	MHETRAS et al., 2016
<i>Scytalidium thermophilum</i> 77.7.8	$\beta$ -D-xilosidase	NI	5,0	60	ZANOELO et al., 2004
<i>Thermogemmatispora</i> sp. T81	T81Xyl5_22 <sup>a</sup>	GH5	5,0	65	TOMAZINI et al., 2019
<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	Tth xynB3	GH3	6,0	95	SHI et al., 2013
<b><i>Geobacillus thermodenitrificans</i></b>	<b>GeoXIL</b>	<b>GH43</b>	<b>5,0</b>	<b>60</b>	<b>Este trabalho</b>

NI: não informado.

A temperatura de maior atividade da GeoXIL é de 60 °C, com atividade relativa superior a 50% entre 40 °C a 70 °C, o que indica uma maior estabilidade enzimática nessa faixa de temperatura (Figura 26A). Algumas  $\beta$ -xilosidases oriundas de bactérias do gênero *Geobacillus* têm apresentado uma maior atividade na faixa de 60 °C a 70 °C, estando a GeoXIL em conformidade com tais enzimas. No geral, a temperatura de maior atividade de  $\beta$ -xilosidases tem variado entre 25 °C a 95 °C, evidenciando a grande diversidade dessas enzimas (Tabela 10). Apesar da elevada identidade com a GeoXIL, a enzima XynB3 de *G. stearothermophilus* apresentou maior atividade sobre o pNP-Xil em pH 6,5 e temperatura de 65 °C, o que mostra algumas diferenças entre XynB3 e GeoXIL (SHALLOM et al., 2005).



**Figura 26: Efeito da temperatura na atividade da GeoXIL.** Em A: a atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0 em temperaturas variando de 20 °C a 100 °C. Em B: a atividade foi avaliada em pH 5,0, a 50 °C e 60 °C por 4 horas.

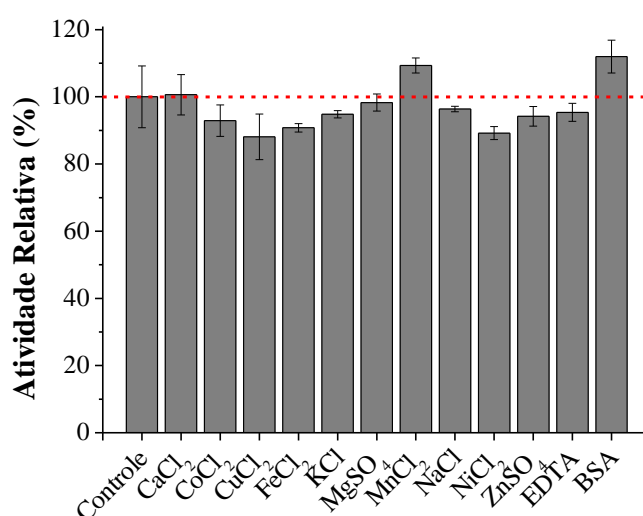
Verificou-se também a termoestabilidade da GeoXIL em temperaturas de 50 °C, 60 °C e 70 °C durante 4 horas. Conforme mostrado na Figura 26B, a GeoXIL permaneceu estável a 50 °C, no entanto, a 60 °C a enzima perdeu 60% de atividade após 2 horas, apresentando apenas 2% de atividade residual após 4 horas. A enzima não se mostrou ativa após 10 minutos a 70 °C (dado não mostrado). A  $\beta$ -xilosidase PhXyl de *Pseudozyma hubeinsis* NCIM 3574 apresentou estabilidade de 100% e 50% a 50 °C e 60 °C respectivamente, após 4 horas de incubação, com um desempenho melhor que a GeoXIL a 60°C (MHETRAS; LIDDELL; GOKHALE, 2016). De modo geral, a GeoXIL possui baixa termoestabilidade ao longo do tempo, em temperatura de maior atividade (60 °C), quando comparada à outras  $\beta$ -xilosidases de organismos termófilos. A enzima WSUCF1  $\beta$ -xilosidase de *Geobacillus* sp. WSUCF1 reteve mais de 94% de sua atividade a 70 °C após 24 horas, com meia-vida de 9 dias (BHALLA; BISCHOFF; SANI, 2014); por sua

vez a  $\beta$ -xilosidase Xln-DT de *Dictyoglomus thermophilum* DSM 3960 apresentou uma meia-vida de 29 horas a 75 °C (LI et al., 2018).

Processos de sacarificação utilizando enzimas têm sido realizados em pH 4,8 – 5,2 e temperatura de 45 °C – 50 °C (FOCKINK et al., 2017; GANDLA; MARTÍN; JÖNSSON, 2018; LÓPEZ-LINARES et al., 2014; SAHA et al., 2005; ZHANG; XIE; ZHANG, 2021). Nesse sentido, a maior termotolerância a 50 °C (79% de atividade relativa) e maior atividade em pH 5,0, torna a GeoXIL uma alternativa atraente para utilização na hidrólise de biomassa vegetal.

#### 4.2.5 Influência de íons metálicos e reagentes químicos

O efeito de íons metálicos e reagentes químicos na atividade enzimática da GeoXIL foi estudado. De um modo geral, a GeoXIL não sofreu influência significativa dos íons testados (Figura 27). A atividade enzimática foi levemente estimulada na presença do íon  $Mn^{2+}$  ( $109,33 \pm 2,27\%$ ). A  $\beta$ -xilosidase Thxyl43A *Thermobifida halotolerans* YIM também apresentou um leve aumento em sua atividade na presença de 1 mM de  $Mn^{2+}$  (103,8%), no entanto foi fortemente inibida por  $Cu^{2+}$  (YIN et al., 2019). Em contrapartida, a  $\beta$ -xilosidase XsidB de *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 foi fortemente inibida por 1 mM de  $Mn^{2+}$  (53,19%), além dos íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Na^+$  (JAIN et al., 2014). Em suma, tais resultados destacam a aplicabilidade da GeoXIL no processo de bioconversão de resíduos lignocelulósicos, muitas vezes ricos em impurezas de íons metálicos que podem potencialmente inibir a atividade enzimática (MARCOLONGO et al., 2019).



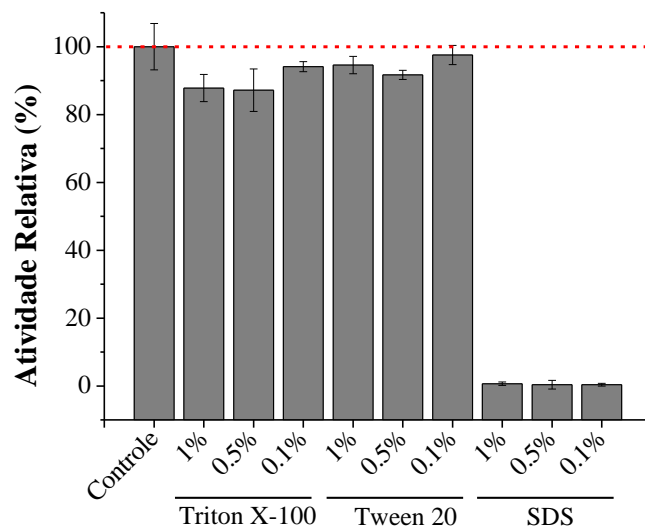
**Figura 27: Influência de íons metálicos, EDTA e BSA na atividade da GeoXIL.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0 a 60 °C.

A GeoXIL foi levemente afetada na presença do agente quelante EDTA ( $95,38 \pm 2,67\%$ ), sugerindo que não houve dependência de íons metálicos para a sua atividade catalítica ou então não é uma metaloenzima, em conformidade com outras  $\beta$ -xilosidases relatadas (MARTINS et al., 2018; QUINTERO et al., 2007; SHALLOM et al., 2005; SHI et al., 2013; YAN et al., 2008; YIN et al., 2019).

Também foi analisada a influência da proteína albumina na atividade enzimática da GeoXIL (Figura 27), visto que já foi relatado que a BSA pode aumentar a hidrólise enzimática da celulose (YANG; WYMAN, 2006), como já mencionado, além disso é sugerido seu uso (1 mg/mL) no meio reacional contendo a  $\beta$ -xilosidase de *B. pumilus* (E-BXSEBP) comercializada pela empresa Megazyme (MEGAZYME, 2022b). No entanto, foi observado que a presença de BSA aumenta levemente a atividade da GeoXIL ( $111,98 \pm 4,88\%$ ).

A atividade da GeoXIL foi fortemente inibida pelo detergente SDS (0,67% - 0,34%) e levemente inibida por Triton X-100 e Tween 20 (Figura 28). A maioria dos trabalhos tem relatado a diminuição ou completa inibição da atividade enzimática na presença de SDS. As  $\beta$ -xilosidases rXYL de *Bacillus pumilus* TCCC 11.350 (LIU et al., 2019) e  $\beta$ -xilosidase de *Bacillus thermantarcticus* DSM 9572 foram moderadamente inibidas (LAMA et al., 2004); XsidB de *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 (JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2014), XylA4 de *Alicyclobacillus* sp. A4. (ZHANG et al., 2014) e Thxyl43A de *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T (YIN et al., 2019) foram fortemente inibidas; e XynB3 de *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (HUANG et al., 2017), rHJ14GH43 de *Bacillus* sp. HJ14 (ZHANG et al., 2019a) e Thxyl43A de *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T foram completamente inibidas por SDS. Em contrapartida, foi relatado o aumento de atividade (111%) da  $\beta$ -xilosidase de AbXyl de *Anoxybacillus* sp. 3M na presença de SDS (MARCOLONGO et al., 2019).

A inibição da atividade de  $\beta$ -xilosidases por SDS tem sido atribuída às mudanças na constante de equilíbrio ou na carga superficial destas (CHOENGPANYA et al., 2015), bem como na natureza oligomérica das enzimas (HUANG et al., 2017), no entanto AbXyl foi caracterizada como uma enzima dimérica em solução (MARCOLONGO et al., 2019). De acordo com Liu et al., (2019) a inativação por SDS indica a importância de interações hidrofóbicas para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima. De fato, a superfície da GeoXIL apresentou um maior caráter hidrofóbico (Figura 23A).

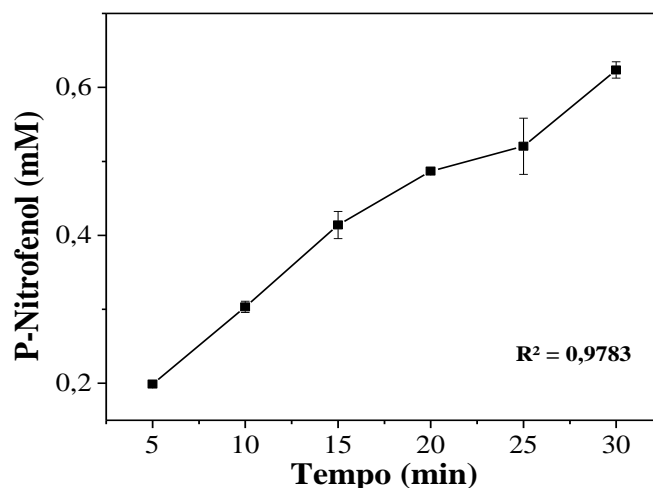


**Figura 28: Influência de detergentes na atividade da GeoXIL.** A atividade foi avaliada em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0 a 60 °C.

De forma semelhante a GeoXIL, a enzima rXYL também apresentou uma leve inibição na presença de Triton X-100 (LIU et al., 2019), enquanto que a enzima Thxyl43A apresentou uma atividade relativa de 94,9% e 67,4% na presença de Tween 20 0,1% e 1,0%, respectivamente (YIN et al., 2019). Em suma, verifica-se uma influência negativa de detergentes na atividade das  $\beta$ -xilosidases.

#### 4.2.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

A construção de uma curva de progresso da reação catalisada pela GeoXIL foi realizada em diferentes tempos, a fim de determinar o melhor tempo para realização dos ensaios de cinética enzimática. Nesse sentido, verificou-se que o tempo de 10 minutos seria o ideal para determinação dos parâmetros cinéticos (Figura 29).



**Figura 29: Curva de progresso da reação catalisada pela GeoXIL.** As atividades foram avaliadas com pNP-Xil 1 mM em tampão *MacIlvine* 50 mM, pH 5,0 a 60 °C nos tempos de 5 minutos a 30 minutos.

Os parâmetros cinéticos da GeoXIL foram determinados nas condições de maior atividade da enzima. A enzima apresentou valores de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten),  $V_{max}$  (velocidade inicial máxima),  $k_{cat}$  (número de renovação) e  $k_{cat}/K_m$  (eficiência catalítica) de  $9,56 \pm 1,33$  mM,  $210,78 \pm 14,70$   $\mu$ mol/min/mg,  $193,22 \pm 19,45$  /s,  $20,21$  /mM/s, respectivamente (Tabela 11).

De acordo com os resultados obtidos, a GeoXIL possui um  $K_m$  e eficiência catalítica dentro da faixa dos valores relatados para outras  $\beta$ -xilosidases, como pode ser observado na Tabela 11. A enzima apresentou uma eficiência catalítica de 673,7 vezes maior em relação a  $\beta$ -xilosidase Xyl43B de *Humicola insolens* Y1 (YANG et al., 2014), no entanto, sua eficiência foi 386,4 vezes menor do que a eficiência da  $\beta$ -xilosidase Tpxyl3 de *Thermotoga petrophila* DSM13995 (ZHANG et al., 2019b). Os parâmetros cinéticos de XynB3 (94,58% de identidade com a GeoXIL) foram determinados em condições diferentes de pH e temperatura do que foi relatado de maior atividade da enzima, além disso houve a adição de 1 mg/mL de BSA no meio reacional (SHALLOM et al., 2005), dessa forma, não foi possível uma comparação dos parâmetros cinéticos entre XynB3 e GeoXIL.

#### **4.2.7 Análise de termoestabilidade por Dicroísmo Circular**

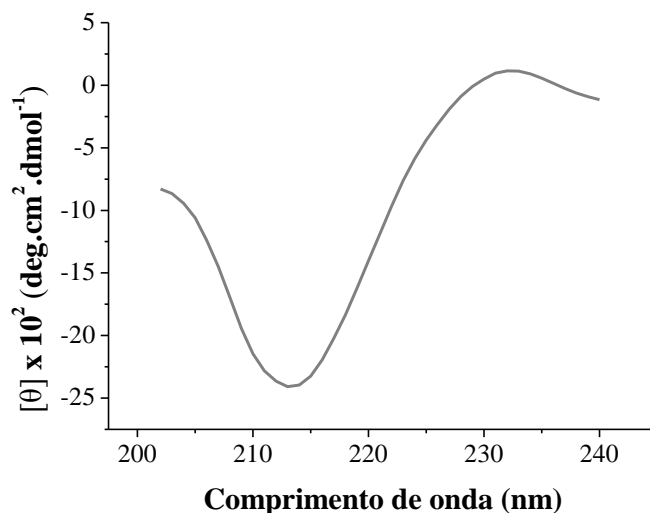
A estabilidade térmica e estrutura secundária predominante da GeoXIL também foram verificadas por meio de dicroísmo circular. Como pode ser observado na Figura 30, a GeoXIL possui uma estrutura secundária composta predominantemente por folhas  $\beta$ , em conformidade com os modelos tridimensionais obtidos. Os espectros mostraram um pico negativo entre 210-220 nm característico de folhas  $\beta$  (CORRÊA; RAMOS, 2009), no entanto não foi possível observar o pico positivo entre 195-200 nm em virtude do aumento do valor do HT (tensão aplicada no fotomultiplicador) acima do limite de segurança (700 V), o que resultou na seleção de comprimentos de onda na faixa de 202 nm a 240 nm.

**Tabela 11:** Dados comparativos dos parâmetros cinéticos de  $\beta$ -xilosidases de alguns microrganismos.

Organismo de origem	Enzima	Família	Substrato	Atividade Relativa (%)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min/mg)	$k_{cat}$ (/s)	$k_{cat}/K_m$ (/mM/s)	Referência
<i>Bacillus pumilus</i> TCCC 11.350	rXYL	GH43	pNP-Xil pNP-Ara	100 70,89	3,78	9,7	10,1	2,67	LIU et al., 2019
<i>Bacillus</i> sp. HJ14 ( <i>B. pumilus</i> )	rHJ14GH43	GH43	pNP-Xil pNP-Ara	100 1,3	3,64	6,56	6,94	1,9	ZHANG et al., 2019a
<i>Geobacillus pallidus</i>	$\beta$ -xylosidase <sup>SP</sup>	GH52	pNP-Xil pNP-Ara	100 NI	2,4	4,72	18,9	7,9	QUINTERO et al., 2007
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	XynB3	GH43	pNP-Xil pNP-Ara	100 4,5	17	NI	57	3,3	SHALLOM et al., 2005
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	XynB1	GH39	pNP-Xil pNP-Ara	100 26,6	4,33	988,6	15,24	3,52 <sup>a</sup>	HUANG et al., 2017
	XynB2	GH52	pNP-Xil pNP-Ara	100 ND	0,68	1456,1	27,36	40,24 <sup>a</sup>	
	XynB3	GH43	pNP-Xil pNP-Ara	100 4,1	60,41	271,3	4,58	0,08 <sup>a</sup>	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TSAA1	$\beta$ -xylosidase	GH52	pNP-Xil pNP-Ara	100 NI	2,8	4,16	262	93,5	ANAND; KUMAR; SATYANARAYANA, 2013
<i>Humicola insolens</i> Y1	Xyl43A	GH43	pNP-Xil e pNP-Ara	100 e 23,7	12,2	203,8	5,21	0,43 <sup>a</sup>	YANG et al., 2014
	Xyl43B		pNP-Xil e pNP-Ara	100 e 56,6	1,29	2,18	0,04	0,03 <sup>a</sup>	
<i>Thermobifida halotolerans</i> YIM 90462T	Thxyl43A	GH3	pNP-Xil pNP-Ara	100 6,72	0,78	43,9	50	64,1	YIN et al., 2019
<i>Thermotoga petrophila</i> DSM13995	Tpexyl3	GH3	pNP-Xil pNP-Ara	73,46 100	0,13	671,66	982,32	7808,73	ZHANG et al., 2019b
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> JW/SL-YS485	XylC rec	GH120	pNP-Xil pNP-Ara	100 ND	28	276	189,3	6,76 <sup>a</sup>	SHAO et al., 2011
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	<b>GeoXIL</b>	<b>GH43</b>	<b>pNP-Xil</b> <b>pNP-Ara</b>	<b>100</b> <b>3,4</b>	<b>9,56</b>	<b>210,78</b>	<b>193,22</b>	<b>20,21</b>	<b>Este trabalho</b>

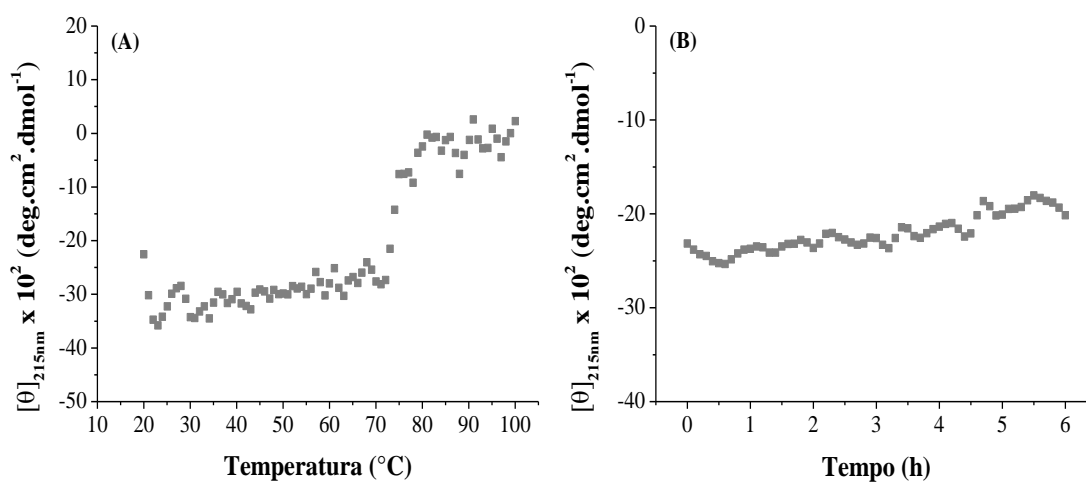
NI: não informado; ND: não detectada; a: valores não informados na literatura, porém deduzidos pelo autor.





**Figura 30: Perfil estrutural de dicroísmo circular da GeoXIL.** A enzima recombinante foi diluída (0,2 mg/mL) em tampão *MacIlvine* 6 mM, pH 5,0.

O comprimento de onda de maior sinal de CD da GeoXIL foi de 215 nm, sendo selecionado para análises de termoestabilidade. A desnaturação térmica da GeoXIL foi monitorada variando a temperatura de 20 °C a 100 °C. Como observado na Figura 31A, o processo de desnaturação mostrou uma transição brusca do estado enovelado para o desenovelado a partir de 70 °C ( $T_m = 74,1$ ), semelhante a GeoARA. No entanto diferente da GeoARA, a enzima GeoXIL não apresentou sinal de CD após sua completa desnaturação, evidenciando a ausência de ligações dissulfeto, também ausentes em análise por meio do servidor PDBsum.



**Figura 31: Perfil de desnaturação térmica por dicroísmo circular da GeoXIL.** Em A: variação da temperatura de 20 °C a 100 °C. Em B: variação do tempo de 0 a 6 horas a 60 °C. A enzima recombinante foi diluída (0,2 mg/mL) em tampão *MacIlvine* 6 mM, pH 5,0. Utilizou-se o comprimento de onda de 215 nm para as análises.

A fim de verificar a estrutura da GeoXIL ao longo do tempo e em temperatura de maior atividade, foi realizada a análise de termoestabilidade da enzima por CD a 60 °C durante 6 horas. Verificou-se que ao longo desse tempo houve uma pequena diminuição do sinal de CD, indicando uma leve alteração na estrutura proteica. Apesar da boa termotolerância da GeoXIL demonstrada por análise de CD, dados experimentais indicaram o contrário. Houve uma perda quase total da atividade enzimática após 4 horas de incubação. Isso indica que pequenas alterações na estrutura da GeoXIL afetam fortemente sua atividade.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu a caracterização bioquímica de uma endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA) de *Geobacillus* sp. JS12 e de uma  $\beta$ -xilosidade de *Geobacillus thermodenitrificans* (GeoXIL). Até o momento, a GeoARA é a primeira endo-arabinanase de *Geobacillus* sp. JS12 descrita.

Por meio das análises de bioinformática, foi possível visualizar domínios e resíduos conservados relacionados com a atividade catalítica da GeoARA e GeoXIL e, além disso, a obtenção de um modelo tridimensional de cada enzima permitiu obter informações sobre sua possível estrutura 3D, que ainda não foram disponibilizadas na literatura, e fazer suposições sobre a função destas proteínas. Estas informações permitiram um direcionamento sobre os experimentos a serem realizados para demonstrar a atividade enzimática.

De fato, os ensaios bioquímicos demonstraram que ambas as proteínas são enzimas que podem ser classificadas dentro da família de glicosil hidrolase 43, em conformidade com os resultados de bioinformática, sendo confirmada a atividade putativa das enzimas em endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase (GeoARA) e  $\beta$ -xilosidade (GeoXIL). Ademais, além de atividade de  $\beta$ -xilosidade a GeoXIL também apresentou atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, caracterizando-a como uma enzima bifuncional.

Os ensaios de atividade mostram que a enzima GeoARA apresenta pH e temperatura de maior atividade de 7,0 e 70 °C respectivamente, conseguindo manter mais de 50% de sua atividade na faixa de pH entre 6,0 e 8,0 e temperatura entre 50 °C e 80 °C. A enzima apresenta uma significativa estabilidade térmica em 70 °C, principalmente na presença do íon  $\text{Co}^{2+}$ , tendo retido 60,5% da atividade após 48 horas. Tais resultados e dados obtidos de CD, indicam que este íon é importante para a termotolerância da GeoARA. Ademais, em condições de maior atividade, a GeoARA apresenta uma significativa atividade sobre a arabinana desramificada (226,67 U/mg), com uma eficiência catalítica (53 mL/mg/s) superior à maioria das endo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases já relatadas.

Por sua vez, a enzima GeoXIL apresenta pH e temperatura de maior atividade de 5,0 e 60 °C, respectivamente. A atividade relativa da enzima foi superior a 50% entre 40 °C a 70 °C, apresentando-se estável a 50 °C quando analisada por 4 horas.

Apesar da GeoXIL possuir parâmetros cinéticos dentro da faixa dos valores relatados para outras enzimas, sua maior atividade em pH 5,0 e termotolerância a 50 °C a destaca, tornando-a uma alternativa para utilização em processos de sacarificação convencionais realizados em pH 4,8 - 5,2 e temperatura de 45 °C - 50 °C.

Em síntese, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a GeoARA e GeoXIL oferecem vantagens potenciais na hidrólise de materiais lignocelulósicos, principalmente em virtude da atuação em altas temperaturas, termoestabilidade, boa eficiência catalítica e estabilidade na presença de íons metálicos.

Análises posteriores de simulação com Dinâmica Molecular (DM) das estruturas 3D obtidas das enzimas GeoARA e GeoXIL poderão ser realizadas a fim de verificar a estabilidade das estruturas em diferentes condições e sua interação com substratos e íons metálicos. Além disso, a realização de testes de atividade enzimática na presença de arabinose e xilose deverá ser realizada para avaliar a existência de repressão catabólica nas enzimas. Outros testes, incluem a análise de sinergismo com outras glicosil hidrolases caracterizadas pelo Laboratório de Biotecnologia da EACH-USP, a fim de avaliar o potencial das enzimas GeoARA e GeoXIL na desconstrução de biomassa vegetal.

É importante ressaltar que apesar das dificuldades enfrentadas durante a pandemia da COVID-19, como por exemplo o acesso limitado à instituição de ensino e laboratórios, foi possível realizar as atividades propostas para caracterização das enzimas GeoARA e GeoXIL. Nesse sentido, a aluna optou em concluir seu mestrado no período previsto de 24 meses.

## REFERÊNCIAS

- ACHINAS, Spyridon; EUVERINK, Gerrit Jan Willem. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 44-53, 2016.
- AGUIAR, Andre et al. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, p. 105896, 2021.
- AGUILAR, Daniela L. et al. Operational strategies for enzymatic hydrolysis in a biorefinery. In: **Biorefining of Biomass to Biofuels**. Springer, Cham, 2018. p. 223-248.
- ALBERSHEIM, P. et al. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: **Progress in biotechnology**. Elsevier, 1996. p. 47-55.
- ALHASSID, Anat et al. Crystal structure of an inverting GH 43 1, 5- $\alpha$ -L-arabinanase from *Geobacillus stearothermophilus* complexed with its substrate. **Biochemical Journal**, v. 422, n. 1, p. 73-82, 2009.
- ANAND, Ashima; KUMAR, Vikash; SATYANARAYANA, T. Characteristics of thermostable endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. **Extremophiles**, v. 17, n. 3, p. 357-366, 2013.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E B. Produção e Fornecimento de Biocombustíveis - Dados Estatístico: Produção de Etanol. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/dados-estatisticos>>. Acesso em: 27 jan. 2022b.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E B. RenovaBio. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/renovabio>>. Acesso em: 27 jan. 2022a.
- ARORA, Richa; BEHERA, Shuvashish; KUMAR, Sachin. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: a future perspective. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 51, p. 699-717, 2015.
- BAKER, Nathan A. et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 18, p. 10037-10041, 2001.
- BARTOSIAK-JENTYS, Jeremy et al. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius*. **Microbiology**, v. 159, n. Pt\_7, p. 1267-1275, 2013.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: A hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 28 jan. 2015.
- BENEDETTI, M. et al. Design of a highly thermostable hemicellulose-degrading blend from *Thermotoga neapolitana* for the treatment of lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 296, p. 42–52, 20 abr. 2019.

- BERLIN, Alex et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.
- BHALLA, A.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Highly thermostable GH39  $\beta$ -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, 23 dez. 2014.
- BHALLA, Aditya et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.
- BHATTACHARYA, Ankita Shrivastava; BHATTACHARYA, Abhishek; PLETSCHE, Brett I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 6, p. 1117-1129, 2015.
- BIELY, Peter; SINGH, Suren; PUCHART, Vladimír. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1-6, p. 41-55, maio 2014.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BROEKER, J. et al. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: Comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, 23 ago. 2018.
- BRÜX, C. et al. The Structure of an Inverting GH43  $\beta$ -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Three Catalytic Residues. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 1, p. 97-109, 26 maio 2006.
- BURLACU, Aglaia et al. Microbial xylanase: a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335-342, 2016.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 28 set. 2009.
- CAGNON, B. et al. Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 292-298, 1 jan. 2009.
- CAMPOS, E. et al. Purification and characterization of a GH43  $\beta$ -xylosidase from *Enterobacter* sp. identified and cloned from forest soil bacteria. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2-3, p. 213-220, 2014.
- CARAPITO, R. et al. Molecular basis of arabinobio-hydrolase activity in phytopathogenic fungi. Crystal structure and catalytic mechanism of *Fusarium graminearum* GH93 EXO- $\alpha$ -L-arabinanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12285-12296, 1 maio 2009.
- CHANDEL, A. K. et al. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 4, p. 994-1014, 1 jul. 2019.
- CHEN, Z. et al. Biochemical characterization of a novel endo-1,5- $\alpha$ -l-arabinanase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 1226-1233, 4 fev. 2015.

- CHOENGPANYA, K. et al. Cloning, expression and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus Niger* ASKU28. **Protein Expression and Purification**, v. 115, p. 132–140, 1 nov. 2015.
- CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342–346, 1 mar. 2017.
- 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, 1 dez. 2017.
- CINTRA, L. C. et al. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, 1 fev. 2020.
- CIOLACU, Diana; CIOLACU, Florin; POPA, Valentin I. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and technology**, v. 45, n. 1, p. 13, 2011.
- CORRÊA, D.; RAMOS, C. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164–173, 2009.
- CORTEZ, L. A. BARBOSA.; LORA, E. E. SILVA.; GÓMEZ, E. OLIVEIRA. **Biomassa para energia**. [s.l.] Editora Unicamp, 2008.
- DAAS, M. J. A. et al. Complete Genome Sequence of *Geobacillus thermodenitrificans* T12, A Potential Host for Biotechnological Applications. **Current Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 49–56, 1 jan. 2018.
- DELABONA, Priscila et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase. **Bioresource technology**, v. 131, p. 500-507, 2013.
- DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. D. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124–154, mar. 2005.
- EISENBERG, D. et al. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **Journal of molecular biology**, v. 179, n. 1, p. 125-142, 1984.
- EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Overview of Greenhouse Gases**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gases>>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- FARRO, E. G. S. et al. GH43 endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis*: Structure, activity and unexpected synergistic effect on cellulose enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 7–16, 1 out. 2018.
- FAÚNDEZ, C. et al. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: Heterologous expression and characterization of the enzyme. **Carbohydrate Research**, v. 482, 1 ago. 2019.
- FEHÉR, Csaba. Novel approaches for biotechnological production and application of L-arabinose. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 251-284, 2018.

FLORENCIO, Camila; BADINO, Alberto Colli; FARINAS, Cristiane Sanchez. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, p. 1082-1093, 2017.

FOCKINK, D. H. et al. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Treated Sugarcane Bagasse: Effect of Enzyme Loading and Substrate Total Solids on Its Fractal Kinetic Modeling and Rheological Properties. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 6, p. 6211–6220, 15 jun. 2017.

FOGOLARI, Federico; BRIGO, Alessandro; MOLINARI, Henriette. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. **Journal of Molecular Recognition**, v. 15, n. 6, p. 377-392, 2002.

GANDLA, Madhavi Latha; MARTÍN, Carlos; JÖNSSON, Leif J. Analytical enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for conversion to biofuels and bio-based chemicals. **Energies**, v. 11, n. 11, p. 2936, 2018.

GAO, D. et al. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011.

GÍRIO, Francisco M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GODDARD-BORGER, E. D. et al.  $\alpha$ -l-Arabinofuranosylated pyrrolidines as arabinanase inhibitors. **Chemical Communications**, v. 47, n. 34, p. 9684–9686, 14 set. 2011.

GOLDEMBERG, José. Ethanol for a sustainable energy future. **science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GONCALVES, Fabiano Avelino; DOS SANTOS, Everaldo Silvino; DE MACEDO, Gorete Ribeiro. Use of cultivars of low cost, agroindustrial and urban waste in the production of cellulosic ethanol in Brazil: a proposal to utilization of microdistillery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1287-1303, 2015.

GOUVÊA, P. F. et al. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 3 abr. 2018.

GRANBIO. Bioflex® 1: Produção de Biocombustível. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/bioflex-biocombustiveis/>>. Acesso em: 29 jan. 2022a.

GRANBIO. Colheita de Palha. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/colheita-de-palha/>>. Acesso em: 29 jan. 2022b.

GRANBIO. Novo impulso ao etanol celulósico no país. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/noticias/novo-impulso-ao-etanol-celulosico-no-pais/>>. Acesso em: 30 jan. 2022c.

HAGEMANS, Dominique et al. A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 2, p. 56, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HIDER, R. C. et al. Origin of the positive 225–230 nm circular dichroism band in proteins: Its application to conformational analysis. **Biophysical Chemistry**, v. 31, n. 1-2, p. 45-51, 1988.



- HILL, Jason et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.
- HO, Dang P.; NGO, Huu Hao; GUO, Wenshan. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource technology**, v. 169, p. 742-749, 2014.
- HONG, M. R.; PARK, C. S.; OH, D. K. Characterization of a thermostable endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1439-1443, ago. 2009.
- HONG, S. et al. Structure-based protein engineering of bacterial  $\beta$ -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 3, p. 703-710, 27 jun. 2018.
- HUANG, C. H. et al. The substrate/product-binding modes of a novel GH120  $\beta$ -xylosidase (XylC) from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Biochemical Journal**, v. 448, n. 3, p. 401-407, 2012.
- HUANG, D. et al. Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases,  $\beta$ -xylosidases, and an  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 6023-6037, 1 ago. 2017.
- HUY, N. D. et al. Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from *Phanerochaete chrysosporium* and its synergistic action with endo-xylanase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 677-685, jun. 2013.
- IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Data and statistics. Disponível em: <<https://www.iea.org/data-and-statistics/data-browser/?country=BRAZIL&fuel=Energy%20consumption&indicator=TFCShareBySector>>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Energy Balances Overview (2020 edition). 2020. Disponível em: <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-product/world-energy-balances#energy-balances>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- INÁCIO, J. M.; DE SÁ-NOGUEIRA, I. Characterization of *abn2* (*yxiA*), encoding a *Bacillus subtilis* GH43 arabinanase, *Abn2*, and its role in arabino-polysaccharide degradation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 12, p. 4272-4280, jun. 2008.
- JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Applicability of recombinant  $\beta$ -xylosidase from the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* in synthesizing alkyxylosides. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 462-469, 2014.
- JEON, S. J. et al. Complete genome sequence of the crude oil-degrading thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. JS12. **Journal of Biotechnology**, v. 230, p. 28-29, 20 jul. 2016.
- JYOTHI PRIYA, K.; BHAVANA, M.; NAGA MOHANA KUMARI, U. A multifaceted review journal in the field of pharmacy Nanofibrils-Current and Future Aspects. **Sys Rev Pharm**, v. 12, n. 11, p. 589-593, 2021.
- KANANAVIČIŪTĖ, Rūta; ČITAVIČIUS, Donaldas. Genetic engineering of *Geobacillus* spp. **Journal of microbiological methods**, v. 111, p. 31-39, 2015.

- KIM, Jae-Han; BLOCK, David E.; MILLS, David A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1077-1085, 2010.
- KROON, P. A<sup>H</sup> et al. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 428-434, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAGAERT, Stijn et al.  $\beta$ -Xylosidases and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 316-332, 2014.
- LAMA, L. et al. Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 283-289, maio 2004.
- LANG, C. et al. An Acid-Adapted Endo- $\alpha$ -1,5-l-arabinanase for Pectin Releasing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 5, p. 900-916, 1 nov. 2016.
- LEAL, T. F.; SÁ-NOGUEIRA, I. DE. Purification, characterization and functional analysis of an endo-arabinanase (AbnA) from *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 1, p. 41-48, 1 dez. 2004.
- LEITE, Débora Chaves Coelho. **Modificações da parede celular durante a formação de aerênquima em raízes de cana-de-açúcar**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- LI, Q. et al. Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, 21 maio 2018.
- LI, Qing; GÄNZLE, Michael G. Characterization of two extracellular arabinanases in *Lactobacillus crispatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 23, p. 10091-10103, 2020.
- LI, Xinliang; CHANG, Sandra H.; LIU, Rui. Industrial applications of cellulases and hemicellulases. In: **Fungal cellulolytic enzymes**. Springer, Singapore, 2018. p. 267-282.
- LIM, Y. R. et al. Synergistic production of l-arabinose from arabinan by the combined use of thermostable endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4277-4280, mar. 2011.
- LIU, Y. et al. Biochemical characterization of a novel GH43 family  $\beta$ -xylosidase from *Bacillus pumilus*. **Food Chemistry**, v. 295, p. 653-661, 15 out. 2019.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 1 jan. 2014.
- LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112-118, 15 abr. 2014.
- LORENZO, Giulia et al. Cell wall traits that influence plant development, immunity, and bioconversion. **The Plant Journal**, v. 97, n. 1, p. 134-147, 2019.
- LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374-381, fev. 2012.

MACHADO, Cristina Maria Monteiro. Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos. Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, 2013.

MAKI, Miranda; LEUNG, Kam Tin; QIN, Wensheng. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 5, p. 500, 2009.

MAMO, Gashaw. Alkaline active hemicellulases. In: **Alkaliphiles in biotechnology**. Springer, Cham, 2019. p. 245-291.

MARCOLONGO, L. et al. A novel  $\beta$ -xylosidase from *Anoxybacillus* sp. 3M towards an improved agro-industrial residues saccharification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1224–1234, 1 fev. 2019.

MARTINS, M. P. et al. The  $\beta$ -xylosidase from *Ceratocystis fimbriata* RM35 improves the saccharification of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 291–298, 1 jan. 2018.

MATSUNAGA, T. et al. Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 339–351, 2004.

MATSUZAWA, T. et al. Crystal structure of metagenomic  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activated by calcium. **Journal of Biochemistry**, v. 162, n. 3, p. 173–181, 1 set. 2017.

MEELUA, W. et al. Active site dynamics and catalytic mechanism in arabinan hydrolysis catalyzed by GH43 endo-arabinanase from QM/MM molecular dynamics simulation and potential energy surface. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2021.

MEGAZYME. Endo-1,5- $\alpha$ -L-ARABINANASE from *A. niger* (Lot140201c). Disponível em: <<https://www.megazyme.com/endo-15-alpha-l-arabinanase-aspergillus-niger>>. Acesso em: 31 jan. 2022a.

MEGAZYME. exo-1,4- $\beta$ -D-XYLOSIDASE from *B. pumilus* (Lot 120201b). Disponível em: <<https://www.megazyme.com/beta-xylosidase-bacillus-pumilus?sSearch=E-BXSEBP>>. Acesso em: 1 fev. 2022b.

MHETRAS, N.; LIDDELL, S.; GOKHALE, D. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from *Pseudozyma hubeiensis* NCIM 3574 (PhXyl), an unexplored yeast. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MOHNEN, Debra. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MORAIS, M. A. B. et al. Two distinct catalytic pathways for GH43 xylanolytic enzymes unveiled by X-ray and QM/MM simulations. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

NAJAR, Ishfaq Nabi; THAKUR, Nagendra. A systematic review of the genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*: their evolution, current taxonomic status and major applications. **Microbiology**, v. 166, n. 9, p. 800-816, 2020.

NETO, A. C.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 184, p. 168–178, 20 maio 2018.

NOVACANA. Levantamento inédito detalha produção de etanol celulósico de Raízen e GranBio. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/levantamento-inedito-detalhes-producao-etanol-celulosico-raizen-granbio-270820>>. Acesso em: 30 janeiro 2022a.

NOVACANA. Exclusivo: custo de produção estimado do etanol celulósico nas 6 maiores usinas do mundo. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/custo-producao-etanol-celulosico-usinas-mundo-150316>. Acesso em: 27 março 2022b.

NUMAN, Mondher Th; BHOSLE, Narayan B.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

OBENG, Eugene M. et al. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2017.

O'NEILL, Malcolm A. et al. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 109-139, 2004.

PARK, J. M. et al. Detailed modes of action and biochemical characterization of endo-arabinanase from *Bacillus licheniformis* DSM13. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1041–1046, dez. 2012.

PATEL, A.; SHAH, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 2, p. 108–128, maio 2021.

PENG, Feng et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, Gerald D. Deconvolution of the circular dichroism spectra of proteins: The circular dichroism spectra of the antiparallel  $\beta$ -sheet in proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 57-69, 1992.

PONS, Tirso et al. Three acidic residues are at the active site of a  $\beta$ -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. **PROTEINS: structure, function, and bioinformatics**, v. 54, n. 3, p. 424-432, 2004.

POSÉ, Sara et al. A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 87, p. 47-58, 2019.

Q QUIROZ-CASTAÑEDA, Rosa E.; FOLCH-MALLOL, Jorge L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnología Aplicada**, v. 28, n. 4, p. 205-215, 2011.

QUINTERO, D. et al. Isolation and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase in the thermophilic bacterium *Geobacillus pallidus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 4, p. 510–518, abr. 2007.

QUIOCHO, Florante A. Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1293-1306, 1989.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol 101. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/ethanol-101/environment>>. Acesso em: 27 jan. 2022a.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Markets and Statistics: Annual Ethanol Production. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 27 jan. 2022b.

RICHARDSON, Jane S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Advances in protein chemistry**, v. 34, p. 167-339, 1981.

ROBAK, Katarzyna; BALCEREK, Maria. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.

RODRIGUES, José Augusto R. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química nova**, v. 34, p. 1242-1254, 2011.

ROHMAN, A. et al. Structural basis of product inhibition by arabinose and xylose of the thermostable GH43  $\beta$ -1,4-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2018.

RUIZ, Héctor A. et al. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35-51, 2013.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693–3700, dez. 2005.

SAHA, Badal C.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 403-423, 2000.

SAINI, Jitendra Kumar; SAINI, Reetu; TEWARI, Lakshmi. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SAKAMOTO, T. et al. Biochemical characterization and gene expression of two endo-arabinanases from *Penicillium chrysogenum* 31B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1087–1096, fev. 2012.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANCTIS, D. et al. New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. **FEBS Journal**, v. 277, n. 21, p. 4562–4574, nov. 2010.

SANTOS, C. R. et al. Mechanistic strategies for catalysis adopted by evolutionary distinct family 43 arabinanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7362–7373, 14 mar. 2014.

- SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, Fernando; COLODETTE, J.; QUEIROZ, J. H. Bioenergia e Biorrefinaria: Cana-de-açúcar e espécies florestais. **Editora da UFV, Viçosa, MG, 551p**, 2013.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2 jun. 2010.
- SEO, E. S. et al. Characterization of a recombinant endo-1, 5- $\alpha$ -L-arabinanase from the isolated bacterium *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 590–594, 2010.
- SHALLOM, D. et al. Biochemical characterization and identification of the catalytic residues of a family 43  $\beta$ -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. **Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 387–397, 11 jan. 2005.
- SHAO, W. et al. Characterization of a novel  $\beta$ -xylosidase, XylC, from thermoanaerobacterium *saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 719–726, fev. 2011.
- SHI, H. et al. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinosidase from *Thermotoga thermarum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.
- SHI, H. et al. Expression and characterization of a GH43 endo-arabinanase from *Thermotoga thermarum*. **BMC Biotechnology**, v. 14, 30 abr. 2014.
- SILVA, Caio OG; VAZ, Raissa P.; FILHO, Edivaldo XF. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 2, p. 277-289, 2018.
- SINNOTT, Michael L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 7, p. 1171-1202, 1990.
- SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, jul. 2010.
- SOCCOL, C. R. et al. Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 331–354.
- SQUINA, F. M. et al. Substrate cleavage pattern, biophysical characterization and low-resolution structure of a novel hyperthermostable arabinanase from *Thermotoga petrophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 4, p. 505–511, set. 2010.
- TAKAO, M.; AKIYAMA, K.; SAKAI, T. Purification and characterization of thermostable endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1639–1646, 2002.
- TAKAO, Makoto et al. Molecular cloning of the gene encoding thermostable endo-1, 5- $\alpha$ -L-arabinase of *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 and its expression in *Bacillus subtilis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 430-433, 2002.
- THOMPSON, Wyatt; MEYER, Seth. Second generation biofuels and food crops: co-products or competitors?. **Global Food Security**, v. 2, n. 2, p. 89-96, 2013.

- TOMAZINI, A. et al. A novel thermostable GH5  $\beta$ -xylosidase from *Thermogemmatispora* sp. T81. **New Biotechnology**, v. 53, p. 57–64, 25 nov. 2019.
- VAN DEN BRINK, Joost; DE VRIES, Ronald P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.
- VAN RIJN, R. et al. Techno-Economic Evaluation of Cellulosic Ethanol Production Based on Pilot Biorefinery Data: a Case Study of Sweet Sorghum Bagasse Processed via L+SScF. **Bioenergy Research**, v. 11, n. 2, p. 414–425, 1 jun. 2018.
- WADA, M.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 543–548, abr. 2010.
- WANG, S. et al. Characterization of abnZ2 (YxiA1) and abnZ3 (yxiA3) in *Paenibacillus polymyxa*, encoding two novel endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanases. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, 1 dez. 2014b.
- WANG, S. et al. Cloning and characterization of a cold-adapted endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase from *Paenibacillus polymyxa* and rational design for acidic applicability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8460–8469, 20 ago. 2014a.
- WILLATS, William GT et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant molecular biology**, v. 47, n. 1, p. 9-27, 2001.
- WONG, D. W. S.; CHAN, V. J.; BATT, S. B. Cloning and characterization of a novel exo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 941–949, jul. 2008.
- WONG, Dominic WS; CHAN, Victor J.; MCCORMACK, Amanda A. Functional cloning and expression of a novel endo- $\alpha$ -1, 5-L-arabinanase from a metagenomic library. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 12, p. 1435-1441, 2009.
- WONGWISANSRI, S. et al. High-level production of thermotolerant  $\beta$ -xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 410–413, 2013.
- YAMAGUCHI, A. et al. Structural basis for thermostability of endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase from *Bacillus thermodenitrificans* TS-3. **Journal of Biochemistry**, v. 137, n. 5, p. 587–592, maio 2005.
- YAMAGUCHI, A. et al. Structures of endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanase mutants from *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 in complex with arabino-oligosaccharides. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 74, n. 12, p. 774–780, 1 dez. 2018.
- YAN, Q. J. et al. A xylose-tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: Characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5402–5410, set. 2008.
- YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 611–617, 5 jul. 2006.
- YANG, Hong et al. Synergy between an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus oryzae* and an endo-arabinanase from *Streptomyces coelicolor* for degradation of arabinan. **Food science and technology research**, v. 12, n. 1, p. 43-49, 2006.

YANG, X. et al. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ - arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**, v. 148, p. 381–387, 2014.

YAPO, Beda M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins— A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

YIN, Y. R. et al. Expression and characterisation of a pH and salt tolerant, thermostable and xylose tolerant recombinant GH43  $\beta$ -xylosidase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T for promoting hemicellulose degradation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 339–350, 15 mar. 2019.

ZANOELO, F. F. et al. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant  $\beta$ -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 170–176, 2004.

ZHANG, J.; XIE, J.; ZHANG, H. Sodium hydroxide catalytic ethanol pretreatment and surfactant on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 319, 1 jan. 2021.

ZHANG, N. et al. Production of thermostable endo-1,5- $\alpha$ -l-arabinanase in *Pichia pastoris* for enzymatically releasing functional oligosaccharides from sugar beet pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 4, p. 1595–1607, 1 fev. 2020.

ZHANG, R. et al. Biochemical and structural properties of a low-temperature-active glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase: Activity and instability at high neutral salt concentrations. **Food Chemistry**, v. 301, 15 dez. 2019a.

ZHANG, S. et al. Cloning, expression, and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1422–1428, 2014.

ZHANG, S. et al. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Thermotoga petrophila* and cooperated transformation of ginsenoside extract to ginsenoside 20(S)-Rg3 with a  $\beta$ -glucosidase. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 159–167, 1 abr. 2019b.

ZHANG, X. J. et al. Contributions and characteristics of two bifunctional GH43  $\beta$ -xylosidase / $\alpha$ -L-arabinofuranosidases with different structures on the xylan degradation of *Paenibacillus physcomitrellae* strain XB. **Microbiological Research**, v. 253, 1 dez. 2021.

ZHANG, Y.-H. Percival; HIMMEL, Michael E.; MIELENZ, Jonathan R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p. 611–622, nov. 2012.

ZHOU, Xiaowei et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, n. 1, p. 52-79, 2017.

ZOLOTNITSKY, Gennady et al. Mapping glycoside hydrolase substrate subsites by isothermal titration calorimetry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11275-11280, 2004.



## APÊNDICE A – PREPARO DE SUBSTRATOS NATURAIS E SINTÉTICOS

<b>Substratos Naturais 1% (p/v)</b>	<b>Preparo</b>
Arabinana desramificada de beterraba-sacarina	Foi adicionado 0,1 g do substrato em 8 mL de água destilada, temperatura ambiente, e dissolvido por aproximadamente 10 minutos utilizando vortex. O volume foi completado para 10 mL.
Arabinana ramificada de beterraba-sacarina	
Ramnogalacturonana I de batata	
Arabinosilana de farinha de trigo	Foi adicionado 0,1 g do substrato em 8 mL de água destilada e aquecida até aproximadamente 50 °C, em seguida o substrato foi dissolvido por aproximadamente 10 minutos utilizando vortex. O volume foi completado para 10 mL.
Xiloglucana de tamarindo	
Arabinosilana de centeio de alta viscosidade	Foi adicionado 0,1 g do substrato em 8 mL de água destilada e aquecida até aproximadamente 100 °C, em seguida o substrato foi dissolvido por aproximadamente 10 minutos utilizando vortex. O volume foi completado para 10 mL.
Xilana de madeira de faia	
$\beta$ -glucana de cevada de baixa viscosidade	
Galactomanana de alfarroba de baixa viscosidade	
<b>Substratos Sintéticos 10 mM</b>	<b>Preparo</b>
p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo	Foram adicionados 10 mM do substrato em 800 $\mu$ L de água destilada e dissolvido por aproximadamente 5 minutos utilizando vortex, em seguida o volume foi completado para 1 mL.
p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo	
p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo	
p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	

Os substratos naturais foram obtidos da empresa Megazyme (Irlanda) e os substratos sintéticos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA), conforme descrito na Tabela 4.