



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**“Expressão e purificação de enzimas xilanolíticas  
recombinantes e estudo de suas atividades contra arabinoxilanas  
extraídas da cana de açúcar”.**

**Versão corrigida**

**Carolina Victal Garbelotti**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título  
de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Expressão e purificação de enzimas xilanolíticas  
recombinantes e estudo de suas atividades contra arabinoxilanas  
extraídas da cana de açúcar**

**Expression and purification of recombinants xylanolytic  
enzymes and study of their activities against sugar cane extracted  
arabinoxylans**

**Carolina Victal Garbelotti**

**Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências  
e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,  
como parte das exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

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.

Garbelotti, Carolina Victal

Expressão e purificação de enzimas xilanolíticas recombinantes e estudo de suas atividades contra arabinoxilanas extraídas da cana de açúcar. Ribeirão Preto, SP, 2022.

103p. :il

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Richard John Ward

Versão corrigida

1.Biomassa. 2.Arabinoxilano. 3.Enzimas hemicelulolíticas. 4.Espectrometria de massas. 5.Análise metabolômica. 6.Estrutura da biomassa. 7.Coquetéis enzimáticos.

## Folha de Aprovação

Carolina Victal Garbelotti

**Expressão e purificação de enzimas xilanolíticas recombinantes e estudo de suas atividades contra arabinosilanas extraídas da cana de açúcar.**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais Magali e Antonio, meus exemplos de vida, que sempre me incentivam e que me dão tanto amor, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao olhar o caminho percorrido ao final de uma grande caminhada, nos deparamos com os momentos e pessoas que foram especiais durante a jornada e a fizeram grandiosa como é. Gostaria de registrar meu agradecimento a todos que, de alguma forma, deram cor à minha caminhada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Magali e Antonio, pelo imenso amor, incentivo e apoio que sempre me deram em todas as etapas de minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível e eu não seria a pessoa que sou hoje. Amo muito vocês e os tenho como meus maiores exemplos de vida.

Aos meus tios e primos, que me incentivam e apoiam sempre.

Ao meu orientador, Prof. Richard John Ward, pela orientação, paciência, ensinamentos e por ter me acolhido desde a graduação no laboratório e me guiado no desenvolvimento desta tese e durante os cinco anos de doutorado.

Ao Matheus, pela amizade durante todos estes anos, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar e, claro, por alegrar o ambiente com muita energia. À Sibeli e Luana, que me ensinaram tanto nesta jornada e à Lara, que me guiou nos primeiros passos no laboratório. Também agradeço com carinho aos colegas do grupo, Jéssica, Douglas, Susana, aos alunos de treinamento técnico Letícia, Suellen e Rafael e ao técnico André Justino pelos momentos e experiências divididas durante estes anos.

Agradeço ao técnico Dr. Eduardo Crevelin pela disponibilidade em realizar as análises de espectrometria de massas e ao professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por me ajudar tanto a continuar as análises durante o período da pandemia e possibilitar grande parte deste trabalho. E à Dra. Adriana Grandis, por contribuir de forma significativa com o enriquecimento do projeto e estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas.

Aos professores do departamento de Química, que contribuíram, por meio das disciplinas, com conhecimento e desenvolvimento intelectual e científico.

Agradeço também ao meu namorado, Emanuel, por estar ao meu lado, me escutando e apoiando sempre com muito amor e compreensão.

Aos funcionários da FFCLRP, especialmente do departamento de Química, que estão sempre dispostos a ajudar e às agências de fomento CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida (processo n° 2018/25664-2), que possibilitou a realização deste trabalho.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*- José de Alencar*

## RESUMO

GARBELOTTI, C. V. **Expressão e purificação de enzimas xilanolíticas recombinantes e estudo de suas atividades contra arabinoxilanas extraídas da cana de açúcar.** 2022. Tese (Doutorado em Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022).

O Brasil possui grande força na agricultura, com a região de Ribeirão Preto sendo tradicional no cultivo de cana de açúcar. A procura por fontes alternativas de energia que sejam mais sustentáveis e renováveis têm encorajado estudos focados na obtenção de biocombustíveis e outros químicos de maior valor agregado derivados da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Com este objetivo, enzimas ativas em carboidratos têm atraído atenção por poderem hidrolisar de forma específica e mais sustentável, evitando geração de resíduos químicos e subprodutos indesejados. Porém, a recalcitrância da parede celular vegetal têm sido um obstáculo para a aplicação industrial da hidrólise enzimática e, para superá-lo, é necessário melhor compreensão da estrutura da parede celular da planta, pré-tratamentos eficientes da biomassa e coquetéis enzimáticos otimizados. Neste trabalho, estudamos a hidrólise enzimática de três frações arabinoxilanas extraídas do colmo da variedade de cana de açúcar SP80-3280 por deslignificação com clorito de sódio apenas, ou com tratamento adicional alcalino ou com DMSO. Combinações de enzimas hemicelulolíticas recombinantes incluíram as glicosil hidrolases xilanases GH10 e GH11, arabinofuranosidase GH43 e  $\alpha$ -glucuronidase GH67, junto de uma acetil xilano esterase CE4 e uma feruloil esterase CE1. Análises de açúcares redutores do hidrolisado foram correlacionadas com cromatografia líquida de interação hidrofóbica acoplada a espectrometria de massas e ferramentas de análise de metabolômica. Foi observado que os arabinoxilanos extraídos por métodos diferentes têm organização e estrutura diferentes, resultando em alterações nos perfis de digestão enzimática e nos produtos de hidrólise. O arabinoxilano extraído por tratamento alcalino foi o mais acessível à hidrólise completa por este conjunto de enzimas quando comparado com os polissacarídeos mais recalcitrantes dos extraídos com clorito e DMSO. Além disso, ensaios de combinações enzimáticas com as quatro hidrolases e acetil xilano esterase, apesar de não mostrarem sinergia, mostraram cooperatividade entre as enzimas acessórias e as xilanases. Como não houve comprovação da presença de decorações fenólicas nos arabinoxilanos extraídos, foi feita caracterização bioquímica e biofísica da enzima feruloil esterase, que demonstrou atividade ótima a 60°C e pH 6,5 e eficiência catalítica por volta de  $390 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$  contra o substrato sintético etil ferulato.



A enzima se mostrou estável e ativa também contra oligossacarídeos do arabinoxilano de farelo de trigo ramificados com grupos ferulato, com grande potencial para uso industrial.

Palavras-chave: Biomassa. Hemicelulose. Arabinoxilano. Enzimas hemicelulolíticas. Espectrometria de massas. Análise metabolômica. Estrutura da biomassa. Coquetéis enzimáticos.

## ABSTRACT

GARBELOTTI, C. V. **Expression and purification of recombinants xylanolytic enzymes and study of their activities against sugar cane extracted arabinoxylans** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Brazil maintains a strong agricultural base, with a long tradition of sugar cane cultivation in the region of Ribeirão Preto. The search for more sustainable and renewable alternative energy sources have encouraged studies focussed on obtaining biofuels and other valuable chemicals using sugars derived from the hydrolysis of lignocellulosic biomass. With this goal, carbohydrate active enzymes have also attracted attention as a means of sustainable and specific hydrolysis, avoiding chemical waste and unwanted by-products. However, plant cell wall recalcitrance has hindered the industrial application of enzymatic hydrolysis, and overcoming this obstacle requires a better comprehension of the plant cell wall structure, efficient biomass pre-treatments and improved enzyme cocktails. In this work, we have studied the enzymatic hydrolysis of three arabinoxylan fractions from sugar cane variety SP80-3280 extracted from delignified stem either with sodium chlorine only, or after alkaline treatment or after DMSO extraction. Combinations of recombinant hemicellulolytic enzymes used included the glycosyl hydrolases xylanases GH10 and GH11, arabinofuranosidase GH43, and  $\alpha$ -glucuronidase GH67 together with acetyl xylan esterase CE4 and feruloil esterase CE1. Hydrolysate analyses of total reducing sugar were correlated with mass spectrometry coupled with hydrophobic interaction liquid chromatography and metabolomics analysis tools. It was observed that the arabinoxylans from the different extraction methods had distinct structures and organization, resulting in altered enzymatic digestion profiles and hydrolysis products. The alkaline-treated arabinoxylan was most accessible to complete hydrolysis by this set of enzymes in comparison to the more recalcitrant polysaccharides in the chlorite and DMSO extracts. Furthermore, combinatory enzymatic assays with the four hydrolases and acetyl xylan esterase did not provide evidence of synergistic effects but demonstrated cooperativity between xylanases and the accessory enzymes. Although feruloyl esterase treatment did not provide evidence of phenolic decorations in any of the arabinoxylans, a detailed biochemical e biophysical characterization demonstrated the optimum activity of this enzyme at 60°C and pH 6.5 and a catalytic efficiency of about 390 s<sup>-1</sup>·mM<sup>-1</sup> against the synthetic substrate ethyl ferulate. The enzyme was stable at high

temperature, and active against feruloylated oligosaccharides from wheat bran arabinoxylan showing the great potential of the enzyme for industrial uses.

Keywords: Biomass. Hemicellulose. Arabinoxylan. Hemicellulolytic enzymes. Mass spectrometry. Metabolomics. Biomass structure. Enzymatic mixtures.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Produção por ano da safra e produto, Agosto (2021).....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema da composição da parede celular vegetal da biomassa lignocelulósica.....	18
<b>Figura 3.</b> Esquema ligações entre monômeros de glicose na celulose. ....	19
<b>Figura 4.</b> Esquema com possíveis estruturas de hemiceluloses.....	20
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura da lignina, com os principais monômeros fenólicos encontrados .....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema do efeito do pré-tratamento na parede celular vegetal.....	22
<b>Figura 7.</b> Exemplificação da atuação enzimática na <b>A)</b> celulose e <b>B)</b> xilana.....	23
<b>Figura 8.</b> Estruturas geradas pela plataforma SwissModel das enzimas xilanases GH11 de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 1XXN) e GH10 de <i>Clostridium thermocellum</i> (PDB: 1XYZ), homodímero da $\alpha$ -Glucuronidase GH67 ( $\alpha$ Glu) de <i>Bacillus stearothermophilus</i> T-6 (PDB: 1MPQ), $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (ARA) GH43 de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 3C7E), Acetil xilano esterase (AXE) CE4 de <i>Clostridium thermocellum</i> (PDB: 3C79) e enzima Feruloil esterase (FAE) CE1 de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> (a partir da sequência cadastrada no GenBank sob o código ADK73591.1). ....	24
<b>Figura 9.</b> Fluxograma análise dos dados de espectrometria de massas.....	42
<b>Figura 10.</b> Géis SDS-PAGE 12% da expressão das enzimas AXE, ARA ( <b>A</b> ), GH11, $\alpha$ Glu ( <b>B</b> ), GH10 ( <b>C</b> ) e FAE ( <b>D</b> ).....	43
<b>Figura 11.</b> Géis SDS-PAGE 12% das purificações das enzimas GH11, ARA ( <b>A</b> ), AXE, $\alpha$ Glu ( <b>B</b> ), GH10 e FAE ( <b>C</b> ).....	44
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas HILIC-MS da fração DMSO selecionados para os íons referentes às estruturas acetiladas de $m/z$ 479, 611 e 738 comparando as intensidades do controle com de amostra contendo a enzima AXE.....	45
<b>Figura 13.</b> Espectro de massas de ( <b>A</b> ) AXE e ( <b>B</b> ) controle contra a fração DMSO para o íon de $m/z$ 479.....	46

<b>Figura 14.</b> Espectro de massas de (A) AXE e (B) controle contra a fração DMSO para o íon de $m/z$ 611.....	46
<b>Figura 15.</b> Espectro de massas de (A) AXE e (B) controle contra a fração DMSO para o pico $m/z$ 738.....	47
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas HILIC-MS da fração NaOH selecionados para íon de estrutura metil glucuronada de $m/z$ 622 comparando as intensidades da amostras com GH10 e GH10+ $\alpha$ Glu. ....	48
<b>Figura 17.</b> Espectro de massas de (A) GH10+ $\alpha$ Glu e (B) GH10 contra a fração NaOH para o íon de $m/z$ 622.....	48
<b>Figura 18.</b> Fluxograma da extração da fração DMSO com fotos das principais etapas .....	50
<b>Figura 19.</b> Gráfico da composição de açúcares das frações DMSO, pós clorito e NaOH, em miligramas de monossacarídeo por grama de material.....	51
<b>Figura 20.</b> Gráficos de açúcares redutores totais de cada combinação enzimática para os substratos fração DMSO, fração pós clorito e fração NaOH.....	54
<b>Figura 21.</b> Gráfico PCA para os dois primeiros componentes principais das leituras de açúcares redutores pelos métodos DNS e NS com e sem a presença de xilanase GH11 das combinações enzimáticas contra os 3 diferentes substratos. ....	55
<b>Figura 22.</b> Contribuição das variáveis para cada componente principal (A) e <i>scree plot</i> com a contribuição para explicação da variância de cada dimensão (B) .....	55
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas das amostras controle para cada substrato .....	56
<b>Figura 24.</b> Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato DMSO. ....	57
<b>Figura 25.</b> Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato pós clorito.....	58
<b>Figura 26.</b> Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato NaOH. ....	59
<b>Figura 27.</b> Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO.....	62

<b>Figura 28.</b> <i>Heatmap</i> dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO. Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação.....	63
<b>Figura 29.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses não decoradas na fração DMSO .....	64
<b>Figura 30.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração DMSO, com ou sem acetilações.....	64
<b>Figura 31.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses ramificadas com acetilações na fração DMSO .....	65
<b>Figura 32.</b> Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito. ....	67
<b>Figura 33.</b> <i>Heatmap</i> dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito. Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação. ....	68
<b>Figura 34.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses ramificadas com acetilações na fração pós clorito.....	69
<b>Figura 35.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração pós clorito. ....	70
<b>Figura 36.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses não decoradas na fração pós clorito .....	71
<b>Figura 37.</b> Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração NaOH. ....	73
<b>Figura 38.</b> <i>Heatmap</i> dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito. Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação. ....	74
<b>Figura 39.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração NaOH e as três estruturas provavelmente acetiladas encontradas – PentAc2Glc2, PentAcGlc e Pent3Ac3.....	75
<b>Figura 40.</b> <i>Boxplot</i> dos íons de pentoses sem decorações na fração NaOH .....	76
<b>Figura 41.</b> Caracterização bioquímica a enzima FAE contra etil ferulato. O efeito da concentração de etil ferulato na catálise segue a cinética de Michaelis-Menten (o melhor ajuste para a equação de Michaelis-Menten é mostrado pela linha vermelha) (A). Determinação da pH (B) e temperatura (C) ótimos. Ensaio de termo estabilidade (D) e estabilidade de bancada (E). ....	80

**Figura 42.** (A) Ajuste da curva de Boltzmann dos dados normalizados de dicroísmo circular para a desnaturação da enzima FAE em água (preto) e tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M) pH 7,4 (vermelho) e (B) picos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a enzima FAE em água (preto), tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M) pH 7,4 (vermelho) e etil ferulato 20 mM em tampão. Perfil de espectroscopia CD da enzima FAE em água a 25 °C (C) ..... 82

**Figura 43.** Modelo de estrutura com gradiente de confiança para enzima Feruloil Esterase de *Thermobacillus xylanilyticus*..... 83

## LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

<b>Figura S 1.</b> Cromatograma do ensaio preliminar da fração DMSO. Amostras controle (somente o substrato), GH10 e GH11 contendo as respectivas xilanases .....	93
<b>Figura S 2.</b> Espectros anotados referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 5 minutos para o controle e amostras com xilanases GH11 e GH10 (A) e 6 minutos para amostras com xilanases (B) .....	94
<b>Figura S 3.</b> Espectros anotados das amostras com xilanases GH11 e GH10 referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 6,8 minutos (A) e 8,5 minutos (B).....	95
<b>Figura S 4.</b> Espectros anotados das amostras com xilanases GH11 e GH10 referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 9,5 minutos (A) e 11,4 minutos (B).....	96
<b>Figura S 5.</b> Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO.....	97
<b>Figura S 6.</b> Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito .....	98
<b>Figura S 7.</b> Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração NaOH.....	99



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições de expressão das enzimas e características .....	33
<b>Tabela 2.</b> Planejamento ensaio combinatório contra frações de cana de açúcar .....	39
<b>Tabela 3.</b> Rendimento da expressão e atividades específicas das enzimas .....	44
<b>Tabela 4.</b> Composição relativa de monossacarídeos da fração DMSO extraída .....	50
<b>Tabela 5.</b> Dados comparativos de atividade da enzima Feruloil esterase contra diversos substratos sintéticos .....	79
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros termodinâmicos obtidos da análise dos dados de espectroscopia de dicroísmo circular e calorimetria diferencial de varredura .....	82

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**ARA** –  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase

**AXE** – Acetil Xilano Esterase

**$\alpha$ Glu** –  $\alpha$ -Glucuronidase

**FAE** – Feruloil Esterase

**GH** – Glicosídeo Hidrolases

**pNP-Ara** – 4-nitrofenol-  $\alpha$ -L-Arabinofuranosídeo

**XOS** – Xilooligossacarídeos

**CE** – Carboidrato Hidrolases

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Performance

**HILIC** – Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**LC-MS** – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

**MS** – Espectrometria de Massas

**PCA** – Análise de Componentes Principais

**SDS-PAGE** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-1-Tiogalactopiranosídeo

**D.O.<sub>600</sub>** – Densidade Óptica medida a 600nm

**rpm** – Rotações Por Minuto

**LB** – Meio de cultura “*Lysogeny Broth*”

**TRIS** - Tris(hidroximetil)aminometano

**CD** – Dicroísmo Circular

**T<sub>m</sub>** – Temperatura de “*melting*”

**DSC** – Calorimetria Diferencial de Varredura

**DNS** - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

**U** – Unidade de atividade enzimática

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Sulfato de sódio

**NaCl** – Cloreto de sódio

**CH<sub>3</sub>COONa** – Acetato de sódio

**CuSO<sub>4</sub>** – Sulfato de Cobre II

**Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** – Arsenito de sódio hepta hidratado

**(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O** – Molibdato de amônio tetra hidratado

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cálcio

**AIR** – Resíduo Insolúvel em Álcool

**NaClO<sub>2</sub>** – Clorito de sódio

**ClO<sub>2</sub>** – Dióxido de cloro

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**HCl** – Ácido clorídrico

**Fração DMSO** – Arabinoxilano de cana de açúcar extraído por tratamento com DMSO

**Fração Pós Clorito** – Arabinoxilano da cana de açúcar extraído por tratamento com clorito de sódio

**Fração NaOH** - Arabinoxilano da cana de açúcar extraído por tratamento alcalino da fração pós clorito

**NaOH** – Hidróxido de sódio

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**HPAEC-PAD** – Cromatografia de Alta Performance de Troca Aniônica com Detecção Amperométrica Pulsada

**HILIC-MS** - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica Acoplada a Espectrometria de Massas

**NS** – Método de detecção de açúcares redutores de Nelson-Somogyi

**Pent** – Pentose

**Hex** – Hexose

**Ac** – Grupo Acetil

**MG** – Grupo Metil Glucurônico

**Glc** – Grupo Glucurônico

**GP** – Grau de Polimerização

**K<sub>M</sub>** – Constante de Michaelis Menten

**K<sub>cat</sub>** – Número de renovação

**K<sub>cat</sub>/ K<sub>M</sub>** – Constante de especificidade

**pNP-Acetato** - 4-nitrofenol Acetato

**ΔH** – Variação de entalpia

## Sumário

1	INTRODUÇÃO .....	17
1.1	Biomassa lignocelulósica.....	17
1.2	Degradação enzimática da biomassa lignocelulósica .....	21
1.2.1	Endoxilanasas.....	25
1.2.2	$\alpha$ -Glucuronidasas .....	26
1.2.3	Arabinofuranosidasas .....	26
1.2.4	Acetil xilano esterases.....	27
1.2.5	Feruloil esterases .....	27
1.3	Técnicas de análise de polissacarídeos .....	28
1.4	Quimiometria e análise metabolômica.....	29
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivos Gerais .....	31
2.2	Objetivos específicos .....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.1	Expressão e purificação das enzimas.....	32
3.1.1	Transformação e expressão em <i>E. coli</i> .....	32
3.1.2	Purificação por cromatografia de afinidade com metal .....	33
3.1.3	Espectroscopia de dicroísmo circular .....	34
3.1.4	Calorimetria diferencial de varredura .....	34
3.1.5	Atividades enzimáticas .....	35
3.2	Extração da fração xilana de cana-de-açúcar com DMSO .....	36
3.3	Outras frações extraídas da cana de açúcar.....	37
3.4	Análise de composição de monossacarídeos .....	38
3.5	Tratamento enzimático das frações da cana de açúcar .....	38
3.5.1	Avaliação inicial de composição da fração DMSO .....	38
3.5.2	Ensaio de combinações enzimáticas .....	39
3.6	Análise de produtos de hidrólise.....	40

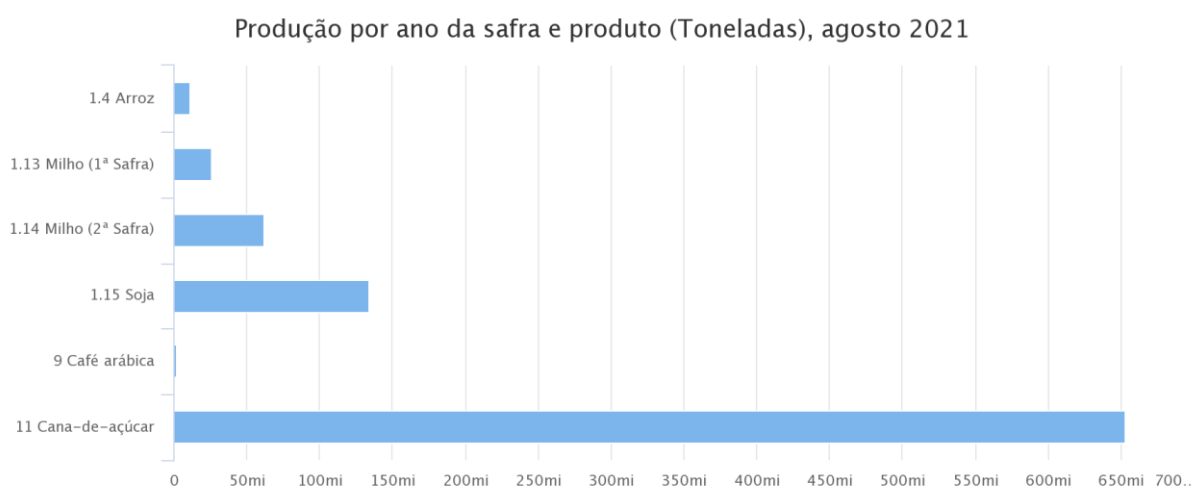
3.6.1	Açúcares redutores .....	40
3.6.2	HILIC-MS .....	41
3.7	Tratamento estatístico e análise metabolômica.....	41
4	RESULTADOS .....	43
4.1	Expressão e purificação das enzimas .....	43
4.2	Extração da fração xilana de cana de açúcar com DMSO .....	49
4.3	Tratamento enzimático e análise dos produtos de hidrólise .....	52
4.3.1	Avaliação inicial de composição da fração DMSO .....	52
4.3.2	Combinações enzimáticas contra os diferentes substratos.....	52
5	CONCLUSÃO ENSAIOS DE COMBINAÇÕES ENZIMÁTICAS CONTRA ARABINOXILANOS EXTRAÍDOS DA CANA DE AÇÚCAR.....	77
6	RESULTADOS CARACTERIZAÇÃO FERULOIL ESTERASE .....	79
6.1	Caracterização bioquímica e biofísica da enzima feruloil esterase de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i> .....	79
7	CONCLUSÃO CARACTERIZAÇÃO FERULOIL ESTERASE.....	84
8	CONCLUSÃO GERAL .....	85
9	REFERÊNCIAS .....	87
10	Material Suplementar .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biomassa lignocelulósica

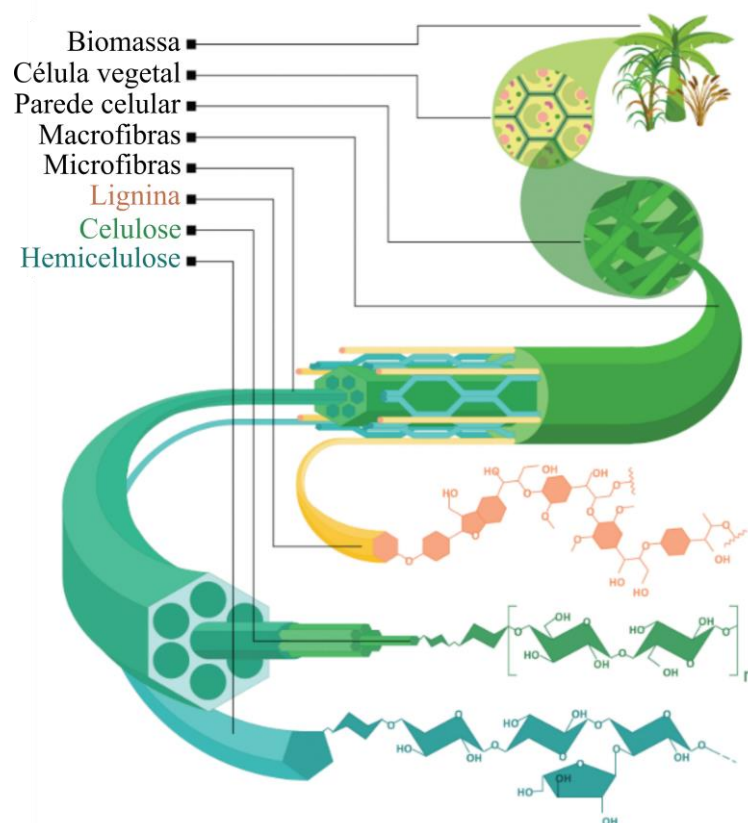
Com o crescente interesse pela redução do uso de combustíveis fósseis e da construção de uma economia sustentável, a biomassa lignocelulósica cresceu como uma alternativa sustentável aos combustíveis não renováveis, podendo ser utilizada para produção do etanol de segunda geração, além de atrair atenção como matéria prima de baixo valor e grande disponibilidade para obtenção de bioprodutos e químicos de maior valor agregado (ANTAR et al., 2021; CARVALHO et al., 2015; FERREIRA-LEITAO et al., 2010; KENNES et al., 2016; LIMAYEM; RICKE, 2012; LIN; TANAKA, 2006; PENG et al., 2009; SOCCOL et al., 2010).

O Brasil é um grande produtor agrícola, sendo o plantio de cana-de-açúcar um dos principais cultivos (Figura 1). Segundo dados do Observatório da Cana (<https://observatoriodacana.com.br/>), em 2018 o país possuía uma área plantada de 10.063.739 hectares e, somente na safra de 2020/21, foram moídos mais de 650 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para produção de etanol e açúcar. O bagaço restante é em grande parte utilizado para produção de energia pela queima ou deixado no solo, mas apresenta também grande potencial para obtenção de produtos de maior valor agregado – como etanol de segunda geração e outros químicos como xilooligossacarídeos para uso na indústria alimentícia – sem necessidade de aumento da área cultivada ou competição com produção de alimentos (ANTAR et al., 2021; FERREIRA-LEITAO et al., 2010; KENNES et al., 2016; LIMAYEM; RICKE, 2012; LIN; TANAKA, 2006; REDDY; KRISHNAN, 2016; SOCCOL et al., 2010; XUE et al., 2016).



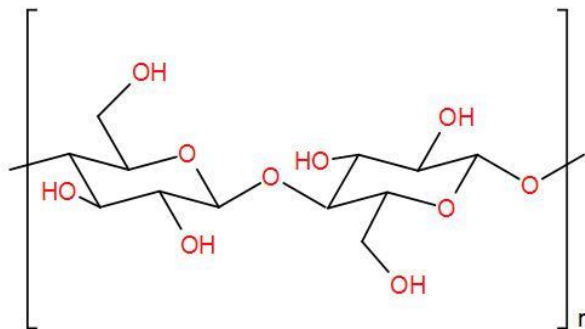
**Figura 1.** Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Produção por ano da safra e produto, Agosto (2021). Fonte: IBGE (<https://www.ibge.gov.br>), acesso em setembro, 2021.

O principal componente da biomassa é a lignocelulose, constituída de três principais polímeros: a celulose, a hemicelulose e a lignina, que interagem entre si por ligações covalentes e interações não covalentes (Figura 2) – conferindo a característica recalcitrante da biomassa. A porcentagem de cada polímero varia com a espécie, o tecido, estágio de desenvolvimento e condições climáticas em que a planta vive. (DE SOUZA et al., 2013; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; MORAIS DE CARVALHO et al., 2017). Porém, de forma geral, a celulose constitui a maior parte da biomassa (35 a 50%), seguida pela hemicelulose (20 a 35%) e a lignina (15 a 20%), além de pectina e proteínas em quantidades muito menores. (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).



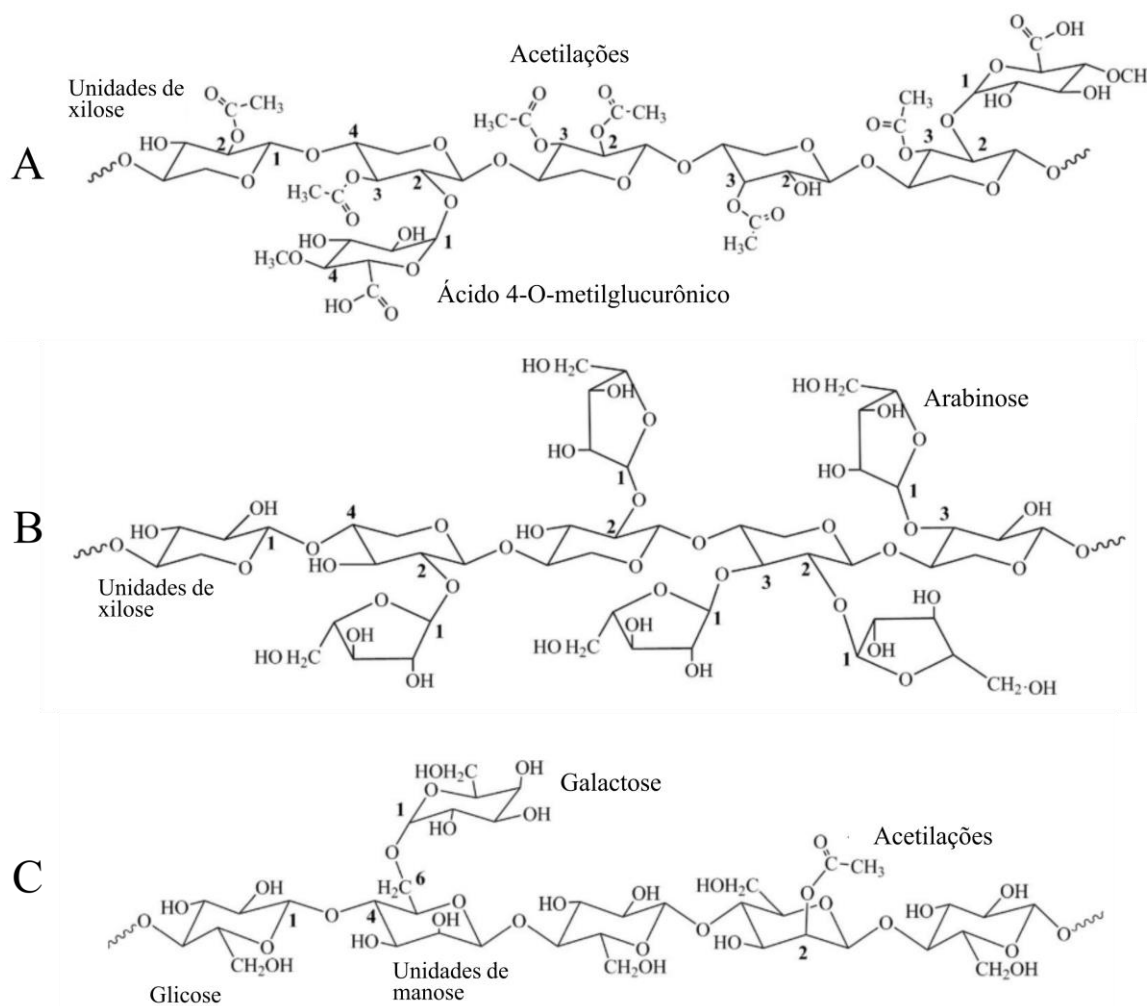
**Figura 2.** Esquema da composição da parede celular vegetal da biomassa lignocelulósica. Adaptado de (MAGALHÃES et al., 2019).

Componente principal dos materiais lignocelulósicos, a celulose é um homopolímero linear insolúvel de unidades de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) (Figura 3), com estrutura cristalina compacta devido às interações entre grupos hidroxila entre cadeias adjacentes. Geralmente se organiza em micro fibrilas e apresenta regiões amorfas ou menos compactas que são mais solúveis e acessíveis à hidrólise. (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo amorfo de estrutura variável que envolve as fibras de celulose, podendo conter pentoses como D-xilose e L-arabinose, hexoses como D-glucose, D-galactose e D-manose, ácidos urônicos e acetilações (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). As xilanas são o tipo de hemicelulose mais comumente encontrado na natureza (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005) e se constituem principalmente de resíduos de  $\beta$ -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). Sua cadeia principal é normalmente ramificada com  $\alpha$ -L-arabinose em ligações  $\alpha$ -(1,3), ácidos urônicos ligados e seus 4-O-metil derivados em  $\alpha$ -(1,2) e grupos acetil que podem se ligar nas posições C-2 ou C-3 dos resíduos de xilose, além de outros açúcares como galactose, manose, fucose e ramnose, que podem estar presentes em menor quantidade (Figura 4) (GLASS et al., 2013; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; SAHA, 2003; SUN et al., 2004; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).



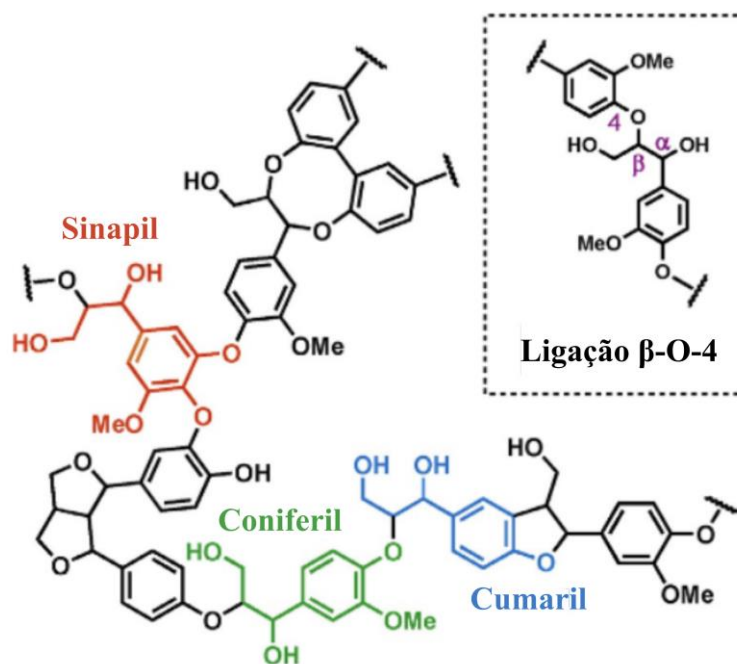
**Figura 3.** Esquema ligações entre monômeros de glicose na celulose.





**Figura 4.** Esquema com possíveis estruturas de hemiceluloses. **A)** Metilglucuroxilano acetilado; **B)** Acetilgalactomanano; **C)** Arabinoxilano. Adaptado de (FARHAT et al., 2017).

A lignina, por sua vez, é um heteropolímero amorfo constituído de unidades de monômeros fenólicos unidos por ligações cruzadas (Figura 5) e intimamente associado às fibras de celulose e cadeias de hemicelulose, conferindo impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e estresse oxidativo às paredes celulares das plantas. As unidades monoméricas são os álcoois p-cumaroil, coniferil e sinapil, organizadas em uma camada fenólica amorfa ligada covalentemente às glucuroarabinoxilanas, xiloglucanas e pectinas. (BAJPAI, 2016; LIMAYEM; RICKE, 2012).

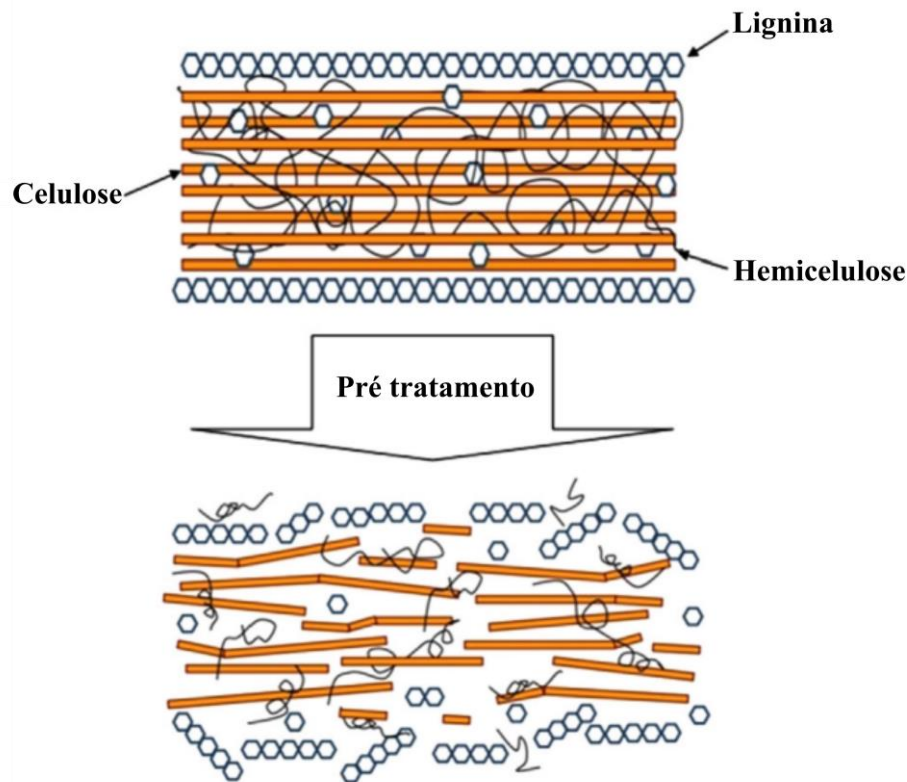


**Figura 5.** Representação da estrutura da lignina, com os principais monômeros fenólicos encontrados. Adaptado de (KÄRKÄS, 2017).

## 1.2 Degradação enzimática da biomassa lignocelulósica

O grande obstáculo para reaproveitamento da biomassa lignocelulósica é sua característica recalcitrante devido a composição heterogênea e organização altamente complexa. A hemicelulose envolve o polímero linear de celulose, interagindo fisicamente e por ligações de hidrogênio, além de estar covalentemente ligada ao polímero de lignina, que forma uma barreira de proteção externa rígida e impermeável ao ataque de microrganismos e estresse oxidativo (BAJPAI, 2016; KENNES et al., 2016; LIMAYEM; RICKE, 2012).

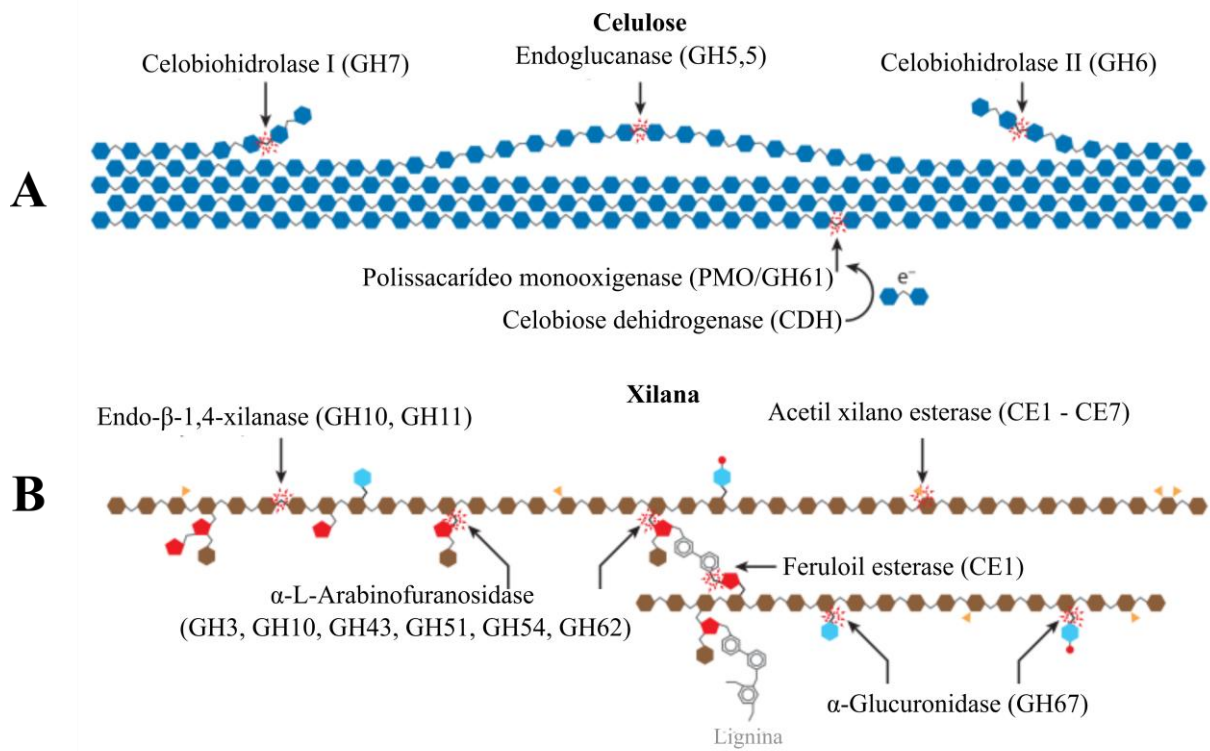
Após pré-tratamento para tornar a estrutura livre de parte da lignina e menos rígida (Figura 6), a hidrólise enzimática tem sido uma alternativa mais sustentável para degradação da biomassa do que o uso de tratamentos ácidos, gerando menos resíduos ao ambiente e subprodutos indesejáveis, como furfural e fenóis. Porém, com a composição química variada e os diferentes tipos de ligações presentes na parede celular vegetal, diversas enzimas são necessárias para sua hidrólise total (DODD; CANN, 2009; KENNES et al., 2016; LIMAYEM; RICKE, 2012).



**Figura 6.** Esquema do efeito do pré-tratamento na parede celular vegetal. Adaptado de (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

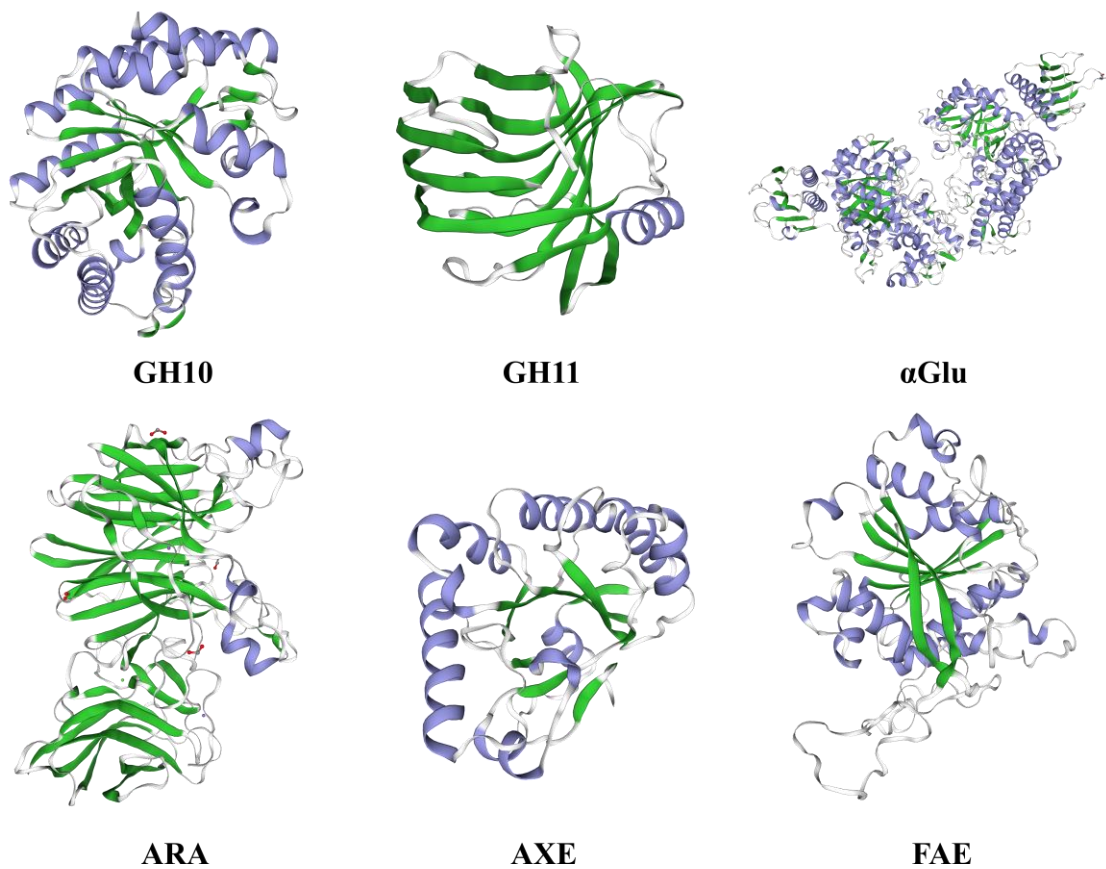
A cadeia celulósica é a mais recalcitrante e exige um conjunto de enzimas para a liberação de monômeros de glicose. As endo-1,4- $\beta$ -glucanases clivam as ligações internas da cadeia celulósica de forma aleatória, enquanto as exo-1,4- $\beta$ -glucanases, ou celobiohidrolases, clivam nas extremidades redutoras ou não redutoras, liberando celbiose, que é hidrolisada em dois monômeros de glicose pelas  $\beta$ -glicosidases (Figura 7A) (GLASS et al., 2013; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

A hemicelulose, sendo um polímero heterogêneo e ramificado, exige diversos tipos de enzimas para sua hidrólise e rompimento com os resíduos dos polímeros de lignina (GLASS et al., 2013; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Dentre estas estão as que atuam nos xilanos: endoxilanase e  $\beta$ -xilosidase, que atuam na cadeia principal de xilose e  $\alpha$ -glucuronidase, L-arabinofuranosidase e acetil xilano esterase, que atuam nas ramificações; as que atuam nas glucomananas:  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase, que clivam a cadeia principal; e as enzimas como a feruloil esterase, que clivam ligações com os resíduos que fazem parte da lignina, como ácido ferúlico e cumárico (Figura 7B) (GÍRIO et al., 2010; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; SAHA, 2003).



**Figura 7.** Exemplificação da atuação enzimática na **A**) celulose e **B**) xilana. Adaptado de (GLASS et al., 2013).

Deste modo, a atuação em conjunto de enzimas específicas para os diversos tipos de ligação promove uma melhor degradação da biomassa de estrutura complexa e, quando atuando sinergicamente, obtém-se aumento da atividade quando comparado com suas atividades quando isoladas. Neste trabalho, focamos em cinco enzimas de degradação de xilanos: duas endo-β-1,4-xilanases (GH10 e GH11), uma α-L-arabinofuranosidase (GH43), uma α-glucuronidase (GH67), uma acetil xilano esterase (CE4) e uma feruloil esterase (CE1).



**Figura 8.** Estruturas geradas pela plataforma SwissModel das enzimas xilanases GH11 de *Bacillus subtilis* (PDB: 1XXN) e GH10 de *Clostridium thermocellum* (PDB: 1XYZ), homo dímero da  $\alpha$ -Glucuronidase GH67 ( $\alpha$ Glu) de *Bacillus stearothermophilus* T-6 (PDB: 1MPQ),  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (ARA) GH43 de *Bacillus subtilis* (PDB: 3C7E), Acetil xilano esterase (AXE) CE4 de *Clostridium thermocellum* (PDB: 3C79) e enzima Feruloil esterase (FAE) CE1 de *Thermobacillus xylanilyticus* (a partir da sequência cadastrada no GenBank sob o código ADK73591.1).

### 1.2.1 Endoxilanases

Endo- $\beta$ -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) são glicosídeo hidrolases (GH) que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 do esqueleto interno das xilanas, liberando xilooligômeros menores. De acordo com a base de dados Carbohydrate Active-enZymes (CAZy - <http://www.cazy.org>) essas enzimas, que variam em preferência a certos tipos de xilanos, modo de ação, estruturas e funções fisiológicas, podem ser encontradas nas famílias 3, 5, 6, 8, 10, 11, 26, 30, 43 e 98, sendo que somente as pertencentes às famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 foram descritas como apresentando o domínio catalítico distinto com atividade endo- $\beta$ -1,4-xilanásica, enquanto as demais se mostraram bifuncionais, com dois domínios catalíticos e atividade xilanase secundária ou residual (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; MALGAS et al., 2019; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; PUCHART; ŠUCHOVÁ; BIELY, 2021).

Dentre as seis principais famílias, as GH10 e 11 são as endoxilanases mais estudadas e conhecidas. Endoxilanases da família 10 no geral apresentam massas moleculares acima de 30kDa, pontos isoelétricos baixos e apresentam estrutura barril  $\alpha/\beta$ , além de serem ativas em xilooligossacarídeos solúveis menores e mais ramificados, uma vez que necessitam apenas dois resíduos de xilose não substituídos para atuarem e podem hidrolisar também resíduos substituídos de ácido metil glucurônico (BIELY et al., 1997; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HU; SADDLER, 2018; MALGAS et al., 2019; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Por outro lado, xilanases da família 11 possuem baixas massas moleculares, pontos isoelétricos mais básicos, mecanismo catalítico de duplo reconhecimento de substrato, com dois glutamatos atuando como resíduos catalíticos e estrutura tipo " $\beta$ -jelly roll". Essas enzimas são mais ativas em regiões não ramificadas dos xilanos e xilanos insolúveis, atuando apenas com ao menos três resíduos consecutivos de xilose sem decorações e uma ligação antes de xiloses substituídas de ácido metil glucurônico (BIELY et al., 1997; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Para este trabalho foram utilizadas uma GH11 de *Bacillus subtilis*, codificada pelo gene XynA (BERNIER et al., 1983; MURAKAMI et al., 2005; RULLER et al., 2006) e uma GH10 de *Clostridium thermocellum*, codificada pelo gene CtGH10 ou XynZ (BIELY et al., 2013). Estruturas geradas no SwissModel são apresentadas na Figura 8.



### 1.2.2 $\alpha$ -Glucuronidasas

Enzimas  $\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) são encontradas na família 67 das glicosídeo hidrolases e catalisam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,2-glicosídicas entre resíduos de xilose e ácido D-glucurônico ou seu éster 4-O-metil-D-glucurônico do terminal não redutor de xilooligossacarídeos de cadeias curtas (BIELY et al., 2000; GOLAN et al., 2003; SHAO et al., 1995; ZAIDE et al., 2001). A ligação do ácido 4-O-metil-D-glucurônico é tida como altamente estável à hidrólise ácida e tem efeito estabilizante nas ligações xilosídicas vizinhas (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; DODD; CANN, 2009; ZAIDE et al., 2001) de modo que a utilização da enzima apresenta um passo importante na conversão da hemicelulose.

Neste trabalho foi utilizada uma GH67 de *Bacillus stearothermophilus* T-6, codificada pelo gene *aguA*, caracterizada por ZAIDE et al., 2001 e cristalizada por GOLAN et al., 2003. A estrutura do homo dímero, forma em que a enzima se apresenta em solução (GOLAN et al., 2003; ZAIDE et al., 2001), é mostrada na Figura 8.

### 1.2.3 Arabinofuranosidasas

$\alpha$ -L-arabinofuranosídeo hidrolases ou  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) são encontradas nas famílias 2, 3, 10, 39, 43, 51, 54 e 62 das glicosídeo hidrolases e atuam como enzimas acessórias na hidrólise de hemicelulose hidrolisando as ligações glicosídicas entre substituições de  $\alpha$ -L-arabinose não redutoras e resíduos de xilose da cadeia principal (BOURGOIS et al., 2007; MALGAS et al., 2019; PITSON; VORAGEN; BELDMAN, 1996; SAHA, 2000).

As arabinofuranosidasas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade por certos substratos – As do Tipo A são ativas em xilooligossacarídeos (XOS) de cadeia curta ou outros substratos pequenos, como 4-nitrofenol- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNP-Ara) enquanto as do tipo B também atuam em substratos poliméricos como arabinoxilanos e arabinanos e ainda um terceiro tipo, ativo apenas em arabinoxilanos (BOURGOIS et al., 2007; PITSON; VORAGEN; BELDMAN, 1996; SAHA, 2000; VANDERMARLIERE et al., 2009). Pode-se ainda classificá-las entre as que hidrolisam resíduos de xilose mono substituídos (AHX-m) ou duplamente substituídos (AHX-d) (BOURGOIS et al., 2007; KORMELINK et al., 1991; VAN LAERE; BELDMAN; VORAGEN, 1997).

Para este trabalho, foi utilizada uma  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GH43 de *Bacillus subtilis* codificada pelo gene *XynD* e classificada como AHX-m2,3, ou seja, que é capaz de clivar unidades de arabinose ligadas em O-2 ou O-3 a resíduos de xilose mono substituídos. Essa

enzima foi caracterizada bioquimicamente e estruturalmente por BOURGOIS et al., 2007 e VANDERMARLIERE et al., 2009, respectivamente. A Figura 8 mostra a estrutura da enzima.

#### 1.2.4 Acetil xilano esterases

Enzimas acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72), pertencem às famílias das carboidrato esterases (CE) 1 – 7 e hidrolisam ligações éster dos grupos O-acetil ligados nas posições 2 ou 3 aos resíduos de xilose mono ou di-O-substituídos da cadeia principal, liberando ácido acético como produto (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; TAYLOR et al., 2006). Essas enzimas têm papel importante na bioconversão da biomassa e sacarificação da parede celular de plantas, criando sítios mais propensos à ação de xilanases e  $\beta$ -xilosidades, permitindo a hidrólise completa do material (BIELY, 2012; BIELY et al., 2013; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; KORMELINK et al., 1993).

Para este trabalho utilizou-se uma acetil xilano esterase CE4 de *Clostridium thermocellum* codificada pelo gene Xyn11A. Enzimas da família CE4 não apresentam a tríade catalítica Ser-His-Asp e estrutura com dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase como as demais carboidrato esterases, além de precisarem de um grupo hidroxil vizinho livre para realizarem deacetilação, o que significa que não atuam em resíduos de xilose duplamente acetilados (BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; DODD; CANN, 2009; TAYLOR et al., 2006). Esta enzima, especificamente, tem sítio catalítico formado pelos resíduos Asp487, Asp488, His539 e Tyr543, é ativada pela presença de íons  $\text{Co}^{2+}$  e foi caracterizada por TAYLOR et al., 2006 e BIELY; MASTIHUBOVÁ; PUCHART, 2007. Sua estrutura é apresentada na Figura 8.

#### 1.2.5 Feruloil esterases

Feruloil esterases (EC 3.1.1.73), classificadas na família 1 das carboidrato esterases, são uma subclasse das esterases de ácido carboxílico que hidrolisam ligações éster entre ácido ferúlico (ácido 3-metóxi-4-hidroxicinâmico) e resíduos de arabinose das cadeias laterais em arabinoxilanos, liberando a hemicelulose acoplada à lignina e contribuindo para a solubilização por facilitar o acesso de outras enzimas como a xilanase e arabinofuranosidase à cadeia principal do xilano (FAULDS, 2010; OLIVEIRA et al., 2019; PRATES et al., 2001). Mais de 80 feruloil esterases já foram caracterizadas de fontes microbianas, com diferentes características bioquímicas, mas divergindo na presença da tríade formada pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou glutâmico) no sítio catalítico (OLIVEIRA et al., 2019).



Neste trabalho foi utilizado uma feruloil esterase CE1 de *Thermobacillus xylanilyticus* codificada pelo gene Tx-Est1 e caracterizada por (RAKOTOARIVONINA et al., 2011). Sua estrutura predita por modelagem é apresentada na Figura 8.

### 1.3 Técnicas de análise de polissacarídeos

A hidrólise enzimática resultante de um conjunto de enzimas que atuam de formas diferentes sobre um substrato complexo produz diversos produtos com estruturas e características diferentes. Assim, para o estudo de um hidrolisado extremamente heterogêneo, é necessária uma técnica analítica que seja sensível, preferencialmente capaz de realizar alguma separação dos diferentes produtos gerados, que possa trabalhar com misturas complexas e seja reprodutível para se obter dados confiáveis.

Alternativa ao mais comumente utilizado HPLC (do inglês *High-performance Liquid Chromatography*), a HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) utiliza fase estacionária hidrofílica e fase móvel inicialmente em solvente orgânico de baixa polaridade com eluição dos analitos polares em gradiente crescente de solução aquosa, permitindo eluir analitos que seriam insolúveis nos solventes da cromatografia de fase normal e que seriam pouco retidos na fase reversa (BUSZEWSKI; NOGA, 2012; CHURMS, 1996). Esta cromatografia tem se mostrado eficiente na análise de carboidratos em sistemas complexos e pode ser facilmente acoplada à espectrométrica de massas com ionização por *electrospray*, que, diferentes de técnicas como RMN, permite análise detalhada de misturas complexas de carboidratos, além de oferecer grande sensibilidade com pequenas quantidades de amostra; apesar de não fornecer tanto detalhe para elucidação estrutural como o RMN (BAUER, 2012; BUSZEWSKI; NOGA, 2012; WEITZEL et al., 2011).

Para a análise de polissacarídeos com espectrometria de massas, é ideal que as cadeias sejam clivadas em polissacarídeos menores, o que pode ser realizado tanto por hidrólise ácida parcial, quanto por clivagem enzimática, sendo a última mais específica e, portanto, pode conservar mais a estrutura, mantendo ramificações importantes para elucidação estrutural (BAUER, 2012), além de a ação enzimática fornecer sua própria informação sobre como é a composição do substrato em que atua. Unindo então a informação fornecida pela análise de espectros de massas, com a informação de ação enzimática específica, pode-se concluir diversos aspectos sobre o substrato – como presença de ramificações e localização destas, dependendo de como certa enzima atua, e se o polímero estudado contém muitas regiões recalcitrantes ou se é facilmente hidrolisado.

#### 1.4 Quimiometria e análise metabolômica

Sendo uma área que surgiu da união entre química analítica e a estatística, a quimiometria teve seu nome criado em 1971 pelo professor Svante Wold, da Universidade Umeå, na Suécia, e, em 1974, foi definida pelo mesmo como “a arte de extrair informação quimicamente relevantes de experimentos químicos”. Inicialmente focada na melhoria de métodos analíticos, o aumento do poder computacional aliado ao desenvolvimento de instrumentação automatizada capaz de gerar grandes quantidades de dados, levou a quimiometria a se tornar uma importante ferramenta para reconhecimento de padrões, sendo aplicada nas mais diversas áreas, como química de alimentos, forense, e especialmente na metabolômica (BRERETON et al., 2017; KIRALJ; FERREIRA, 2006; LAVINE; WORKMAN, 2008).

De forma geral, o uso das ferramentas da quimiometria dentro da metabolômica voltada para grandes quantidades de dados de LC-MS envolve, antes de tudo, o processamento dos dados crus, reduzindo a complexidade dos dados com filtragem de ruído e correção da linha de base, detecção e deconvolução de picos para identificação dos picos correspondentes à produtos de interesse, alinhamento dos picos identificados entre as amostras, e normalização para remover variações causadas por fatores experimentais ou analíticos, mantendo as variações causadas pelas condições experimentais. Após, é feita a identificação dos compostos de interesse levando em consideração a razão massa/carga ou perfis de fragmentação no caso de análises em tandem (MS/MS ou MS<sup>n</sup>), e a seleção de variáveis mais importantes caso seja necessário selecionar metabólitos dentro de um conjunto para responder a uma pergunta biológica específica. Por fim, é feita a modelagem dos dados, que no caso de uma análise exploratória, utiliza métodos não supervisionados de análise, que têm uma visão geral do conjunto de dados e buscam agrupamentos ou tendências entre as amostras. Existem diversos métodos de análise não supervisionada, sendo o PCA (do inglês *Principal Component Analysis* – análise de componentes principais) um dos mais utilizados, reduzindo variáveis de diversas dimensões em poucos fatores ortogonais (chamados componentes principais) que resumem grande parte da variância (YI et al., 2016).

Existem diversos algoritmos e programas disponíveis para esse tipo de análise, com múltiplas opções de métodos que podem ser empregados, dentre os principais e de acesso livre estão XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), MZmine (<http://sourceforge.net/projects/mzmine/>), OpenMS (<http://open-ms.sourceforge.net/>) e MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) (CHONG; WISHART; XIA, 2019; GOWDA et al., 2014; MAHIEU; GENENBACHER; PATTI, 2016; YI et al., 2016).

Tendo em mente tanto a hidrólise da biomassa, quanto as informações estruturais que ações de enzimas específicas podem trazer sobre esses biopolímeros, trabalhar com um conjunto de enzimas atuando de diferentes formas em um substrato extraído a partir da biomassa pode informar muito sobre a estrutura deste material, e a análise das misturas complexas de carboidratos produzidos pelas enzimas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) gera uma grande quantidade de informação, com um espectro que pode conter um conjunto de picos para cada pequena faixa de tempo de um cromatograma. Assim, unir a complexidade experimental do uso de mais de um tipo de enzima com a complexidade dos dados gerados pode tornar o trabalho de análise árduo e ineficiente se feito manualmente, observando espectro por espectro de cada condição ensaiada. E para lidar com a grande quantidade de informações, ferramentas da quimiometria podem ser de grande ajuda – desde o planejamento experimental adequado até a análise, sendo a base para a abordagem metabolômica (YI et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Utilizar ferramentas da análise metabolômica – com os softwares de livre acesso XCMS online e MetaboAnalyst – para processamento dos dados crus e posterior análise estatística completa, com PCA, dendrogramas e *heatmaps* para demonstrar os agrupamentos entre as amostras com diferentes tratamentos enzimáticos e *boxplots* para resumir os efeitos de cada tratamento em relação a certas estruturas de forma clara e concisa, reduzindo a complexidade da coleta de grande quantidade de dados. Buscar, com o uso da abordagem analítica aliada aos conjuntos diferentes de enzimas contra diferentes substratos naturais, uma visão ampla tanto da ação enzimática quanto da influência do tipo de substrato oferecido, concluindo também aspectos estruturais e relacionando com o tipo de extração realizada para a obtenção do material.

### 2.2 Objetivos específicos

1) Transformar e expressar as enzimas recombinantes  $\alpha$ -glucuronidase ( $\alpha$ Glu), acetil xilano esterase (AXE), feruloil esterase (FAE), xilanase (GH10 e GH11) e arabinofuranosidase (ARA) em *Escherichia coli* a partir dos vetores pET-28 contendo as sequências codificadoras destas enzimas e purificá-las por cromatografia de afinidade com metais.

2) Obtenção da fração xilana da cana-de-açúcar por extração com DMSO e precipitação em etanol. Esse material será comparado com duas outras frações xilanas, obtidas por tratamentos químicos diferentes da mesma fonte de biomassa – uma enriquecida em celulose e hemicelulose, obtida por deslignificação com clorito de sódio e outra enriquecida em hemicelulose, obtida pela tratamento alcalino do material já deslignificado.

3) Desenvolver metodologia analítica envolvendo planejamento experimental para o conjunto de enzimas e substratos, coleta de amostras tanto de medidas de açúcares redutores quanto de LC-MS e tratamento dos dados obtidos por meio de abordagem quimiométrica e uso de ferramentas da análise metabolômica.

4) Caracterizar os oligossacarídeos liberados após tratamento dos xilanas com as enzimas e comparar a atividade de cada enzima quando incluída em misturas equimolares para avaliar possível sinergismo, bem como efeitos inibitórios.

5) Identificar as combinações enzimáticas que favoreçam a degradação dos substratos através da análise comparativa dos produtos de hidrólise das reações com diferentes associações de enzimas.

6) Comparar a atuação dos conjuntos de enzimas nos diferentes substratos extraídos da mesma fonte de biomassa, buscando por diferenças e semelhanças na composição e organização estrutural e acessibilidade às enzimas quando se muda o pré-tratamento químico.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Expressão e purificação das enzimas

##### 3.1.1 Transformação e expressão em *E. coli*

As sequências codificadoras de todas as enzimas foram previamente clonadas em vetor de expressão pET28, que foram transformados em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) Star. Para isso, incubou-se aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial em 50 µL de células quimiocompetentes armazenadas em solução 10% glicerol+CaCl<sub>2</sub> 0,1 M por 10 minutos em gelo, após isso, submeteu-se a mistura a aquecimento a 42°C por 90 s seguido imediatamente de incubação em gelo e transferência da solução de células para 1 mL de meio de cultura LB (*Lysogeny broth*) gelado, que foi então incubado a 37°C e 200 rpm de agitação por 1 hora para recuperação e multiplicação celular. Após isso, a cultura foi inoculada em placa com meio LB sólido suplementado de Canamicina (50 mg·mL<sup>-1</sup>) na proporção de 1 µL para cada mL de meio e incubada por 16 horas em estufa a 37°C para seleção dos clones transformados. Uma placa controle com células sem adição de DNA plasmidial foi feita para garantir ausência de contaminação.

Para a expressão das enzimas foi preparado pré-inóculo a partir de uma colônia isolada da placa de células transformadas. O inóculo foi feito em meio LB suplementado com Canamicina (50mg·mL<sup>-1</sup>) na proporção de 1 µL para cada mL de meio e incubado durante 12 horas em um agitador orbital a 37°C e 200 rpm. O pré-inóculo foi adicionado ao meio da expressão em quantidade correspondente a 1% do volume total e incubado em agitador orbital a 37°C e 200 rpm até densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) entre 0,4 e 0,6, quando a expressão foi induzida com adição de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo (IPTG) nas devidas concentrações e incubado na temperatura de expressão por 16 horas. Na Tabela 1 são apresentadas as condições de expressão de cada enzima.

Após decorrido o tempo de expressão, as culturas foram centrifugadas e os sedimentatos seguiram para purificação ou foram armazenados a -20°C até que fossem utilizados (não mais de 2 semanas). A presença da proteína expressa foi avaliada por gel SDS-PAGE 12%.

**Tabela 1.** Condições de expressão das enzimas e características

<i>Enzima</i>	<i>Abreviação</i>	<i>Meio de cultura</i>	<i>IPTG (mM)</i>	<i>Temperatura Expressão (°C)</i>	<i>Massa molecular (kDa)</i>	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
Xilanase 11	<b>GH11</b>	LB	0,5	37	23	82850
Xilanase 10	<b>GH10</b>	LB	0,5	37	35	67185
Arabinofuranosidase	<b>ARA</b>	LB	0,5	30	51	91790
Acetil xilano esterase	<b>AXE</b>	LB	0,5	37	25	18450
Feruloil esterase	<b>FAE</b>	LB	0,5	37	37,4	50560
$\alpha$ -Glucuronidase	<b><math>\alpha</math>Glu</b>	HDM	0,15	30	78	148880

### 3.1.2 Purificação por cromatografia de afinidade com metal

Para a purificação, os sedimentatos celulares foram ressuspensos em tampão de purificação A (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) para a proporção de 5 a 10 mL·mL de cultura<sup>-1</sup> e adicionado de TRITON X-100 na proporção de 10  $\mu$ L·mL<sup>-1</sup> de tampão para lise celular e sonicados por 25 minutos em ciclos de 10 segundos a uma potência de 50% com intervalos de 10 segundos entre cada pulso em sonicador Sonic Dismembrator (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes incubados junto à 1- 2 mL da resina de níquel (HisPur Ni-NTA Resin, ThermoFisher Scientific) ambientada em Tampão A durante 1 hora em agitador orbital mantido sob temperaturas amenas (18-22°C). O sobrenadante incubado com resina foi vertido em coluna com membrana e proteínas não ligadas à resina foram eliminadas por lavagens com tampão . As proteínas de interesse foram eluídas com concentrações crescentes de imidazol e uma última lavagem com 15 mL de tampão A com 250 mM de imidazol. Essa última fração contém a enzima recombinante de interesse. A avaliação da purificação foi realizada por gel SDS-PAGE 12%.

Foi feita a troca de tampão por diálise em membrana de celulose em água para retirada do excesso de sais e imidazol presentes no meio, e concentração da enzima em tubos tipo Amicon (Millipore Sigma, Massachusetts, EUA), com corte molecular de 10 kDa. As proteínas foram quantificadas por Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) por absorvância a 280 nm, com os respectivos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) listados na Tabela 1.

### 3.1.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

A desnaturação térmica da enzima Feruloil Esterase foi monitorada utilizando espectrômetro de dicroísmo circular (CD) Jasco J-815 (JASCO Corporation, Easton, MD, USA) equipado com *Peltier* para controle de temperatura e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1mm. A concentração de enzima utilizada foi de 0,14 mg·mL<sup>-1</sup> para a solução em água e 0,157 mg·mL<sup>-1</sup> para a solução em tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M, pH, 7,4). A varredura de temperatura foi de 20 a 75°C, com taxa de acréscimo de 1 °C·min<sup>-1</sup> e espectros foram lidos a cada 5°C utilizando 4 varreduras de 190 a 260 nm, com velocidade de 100 nm·min<sup>-1</sup> e largura de banda (*spectral bandwidth*) de 2 nm. As temperaturas de fusão (*melting temperatures* – T<sub>m</sub>) foram obtidas ajustando equação de Boltzmann aos valores de elipticidades molares (normalizados para as concentrações) a 220 nm sobre a faixa de temperatura medida.

Para avaliação da presença de estruturas hélices, folhas e voltas, foi utilizado o software para análise de dados de espectroscopia CD “DichroWeb” (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>), utilizando o método “SELCON3” e o conjunto de dados de referência “Set 4” (SREERAMA; WOODY, 2000). Foi utilizado como *input* o espectro a 25°C da proteína em solução aquosa, com concentração de 0,14 mg·mL<sup>-1</sup>.

### 3.1.4 Calorimetria diferencial de varredura

Medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) da enzima Feruloil esterase foram realizadas no equipamento Nano-DSC II (Calorimetry Sciences Corporation, CSC, Lindon, Utah, USA). A concentração de enzima, tanto em água, tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M, pH 7,4), ou etil ferulato 20 mM em tampão, foi de 1,05 mg·mL<sup>-1</sup>. Varreduras de aquecimento foram obtidas de 10 a 100°C a uma taxa de 1,0°C·min<sup>-1</sup>. Varreduras controle foram realizadas com as respectivas soluções, sem adição de enzima. O desenovelamento e temperaturas de fusão (T<sub>m</sub>) para cada condição foram estimados pelo máximo dos picos de transição e entalpias de desenovelamento foram calculadas integrando as áreas sob os picos de transição.

### 3.1.5 Atividades enzimáticas

A fim de verificar se as enzimas expressas e purificadas estavam ativas, foram feitos testes para determinação de suas atividades específicas. Estes experimentos foram realizados no mesmo tampão e temperatura do ensaio com os substratos – acetato de amônio 100 mM pH 5,6 e 55°C, respectivamente, para as enzimas que fizeram parte dos ensaios de combinações, exceto para a acetil xilano esterase, cuja atividade foi verificada pela espectrometria de massas, mas não pode ser quantificada. Para a feruloil esterase, que foi caracterizada à parte, as condições são descritas em sua respectiva seção.

#### 3.1.5.1 Atividades específicas xilanase e arabinofuranosidase

Para as xilanases e arabinofuranosidase, foi utilizada metodologia de determinação de açúcares redutores com ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), com 150 µL da mistura reacional foi adicionada de 150µL de reagente DNS, 100 µL desta mistura foi fervida por 6 minutos a 100°C e transferiu-se 40 µL do fervido para placa de 96 poços, adicionando 200 µL de água para diluição. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com leitor de placas a 540 nm e a quantificação feita com base em curva padrão de xilose. A mistura reacional, para as xilanases, foi composta de 100uL de xilano de Beechwood (Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, EUA) 2% em tampão, 10uL de enzima devidamente diluída (em torno de 0,05 mg·mL<sup>-1</sup>) e 40 µL de água deionizada e os tempos de reação foram de 5 e 10 minutos. Para arabinofuranosidase, 75 µL de arabinoxilano de trigo de viscosidade média (Megazyme, Co. Wicklow, Ireland) 1% em água, 10 µL da enzima devidamente diluída (em torno de 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>) e 65 µL de tampão, com tempos de reação de 20, 30 e 40 minutos. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima para converter 1 µmol substrato por minuto.

#### 3.1.5.2 Atividade específica α-glucuronidase

A determinação de atividade específica para a α-glucuronidase foi realizada por método colorimétrico de quantificação de ácidos urônicos de Milner e Avigad (MILNER; AVIGAD, 1967), com mistura reacional composta de 95 µL de mistura de ácidos aldo urônicos (Megazyme, Co. Wicklow, Ireland) a 2mM em tampão e 5 µL de enzima devidamente diluída (em torno de 1 mg·mL<sup>-1</sup>), com tempo reacional de 5, 10 e 15 minutos. As reações foram paradas pela adição de 300uL do reagente de cobre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,97 M, NaCl 0,68 M, CH<sub>3</sub>COONa 0,2 M e CuSO<sub>4</sub> 20,8 mM, pH 4,8), fervura por 10 minutos, seguido de descanso em gelo por mais 10 minutos e a coloração foi obtida pela adição de 200 µL do reagente de arsenomolibdato de amônio (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 19,2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 40,5 mM e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 788 mM) e



agitação da solução. 200  $\mu\text{L}$  desta solução foram medidos em leitor de placa a 620 nm e comparados a uma curva padrão de ácido glucurônico. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima para converter 1  $\mu\text{mol}$  substrato por minuto.

### 3.1.5.3 Caracterização bioquímica da feruloil esterase de *Thermobacillus xylanilyticus* contra etil ferulato

Para caracterização bioquímica da enzima feruloil esterase (FAE), os ensaios de atividade contra o substrato modelo sintético etil ferulato (Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA) foram feitos baseados em (RALET et al., 1994), com detecção espectrofotométrica do consumo de etil ferulato. Para tal, 10  $\mu\text{L}$  de solução de enzima ( $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi incubada com 100  $\mu\text{M}$  de etil ferulato em tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M) e a atividade – medida pelo consumo do substrato - foi acompanhada a 350 nm após 2 minutos de reação, comparando-se com um controle sem adição de enzima. As reações foram realizadas entre pH 4,0 e 8,0 e 40 a 70°C para determinação de pH e temperatura ótimos, respectivamente. Para termo estabilidade, a enzima foi incubada em temperaturas entre 35 e 60°C e sua atividade ensaiada em intervalos de tempo de 0 a 1800 minutos (ou até que a enzima apresentasse menos de 20% de atividade residual).

Determinação das constantes cinéticas foi realizada com concentrações de substrato entre 5 e 160  $\mu\text{M}$ . Uma unidade (U) de atividade foi definida com a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto.

## 3.2 Extração da fração xilana de cana-de-açúcar com DMSO

A extração do arabinoxilano de cana de açúcar foi realizada em uma série de etapas, baseado no procedimento descrito por ROWLEY et al., 2015, a partir do bagaço de cana-de-açúcar da linhagem SP80-2380 seco, moído em moinho de facas e separado em peneira de 20 mesh.

Primeiramente foi feita extração em aparelho Soxhlet com água deionizada, para eliminação de compostos solúveis e, posteriormente, com etanol 80% para eliminação de lipídeos e outros compostos solúveis em etanol. Tanto a água quanto o etanol foram mantidos em temperatura de refluxo durante todo o processo e a extração se deu por aproximadamente 18 horas para cada etapa, ou até que não se observasse mais coloração no líquido da alça do Soxhlet. A biomassa resultante, chamada de fração AIR (*Alcohol-Insoluble Residue*) então foi seca em estufa a 50 °C por 24 horas e prosseguiu-se para a etapa de deslignificação com clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ), em que a biomassa, em uma garrafa com tampa, foi misturada a água deionizada para uma consistência de 10% e adicionou-se 4 g de  $\text{NaClO}_2/10\text{g}_{\text{biomassa}}$  e 500  $\mu\text{L}$  de

ácido acético/ 10g<sub>biomassa</sub>. A garrafa foi tampada e colocada em banho a 60 °C por 3 horas, sendo que a cada 1 hora foi adicionado mais 4 g de NaClO<sub>2</sub>/10g<sub>biomassa</sub>. Foi necessário também abrir a tampa da garrafa a cada 30 minutos para liberar a pressão e excesso de gás ClO<sub>2</sub> formado. O sólido resultante desta etapa foi filtrado a vácuo, lavado com água deionizada e seco em estufa a 50°C por 24 horas.

A última etapa consistiu na extração dos polissacarídeos acetilados com DMSO (dimetilsulfóxido), em que a biomassa deslignificada foi incubada com DMSO na proporção de 14 mL de DMSO/g<sub>biomassa</sub> a 70°C e agitação a 20 rpm por 2 horas. O sólido foi filtrado e o líquido armazenado. O mesmo procedimento foi repetido com o sólido filtrado, sendo que foi realizada, ao final, uma lavagem com etanol absoluto. Os filtrados das duas etapas foram unidos e adicionou-se 3,8 L de etanol absoluto e 0,66 mL de HCl concentrado/ L<sub>solução</sub> filtrada. Essa solução foi armazenada em geladeira (4°C) por 18 horas para precipitação total do arabinoxilano. A solução foi então filtrada a vácuo ainda fria e o sólido foi lavado com etanol e incubado em frasco com etanol por mais 18 horas a 4°C, com agitação.

O sólido foi novamente filtrado, lavado com etanol e incubado a 4°C com agitação, mas desta vez por apenas 5 horas, filtrado novamente, lavado com éter etílico e incubado em frasco com éter por 18 horas a 4°C, com agitação. Após isso, a última etapa consistiu em mais uma filtração a vácuo do sólido até evaporação total do éter residual. O produto extraído é a fração arabinoxilana e será mencionado neste trabalho como “fração DMSO”.

### 3.3 Outras frações extraídas da cana de açúcar

As frações de cana de açúcar (Tipo SP80-3280) enriquecidas com celulose e hemicelulose, e hemicelulose foram cedidas pela Dra. Adriana Grandis, do Instituto de Biociências da USP de São Paulo.

Essas frações foram obtidas de uma série sequencial de extrações, iniciando com a obtenção do AIR por sucessivas extrações com etanol 80% (v/v) a 80°C, que foi recuperado por filtração, seco em estufa e utilizado para extração de pectinas com oxalato de amônio 0,5% (m/v) a 80°C. Esse material foi filtrado e dialisado para remoção de resíduos do reagente e liofilizados, seguindo então para a remoção de lignina com extração com NaClO<sub>2</sub> 3% (m/v) e ácido acético 0,3% (v/v) a 100°C, cujo material precipitado enriquecido em celulose e hemicelulose resultante é referido aqui como “pós clorito”. Por fim, a partir da fração “pós clorito”, foram feitas duas extrações com NaOH (hidróxido de sódio) 4 M para remoção de toda hemicelulose aderida à celulose e o solubilizado foi coletado, dialisado, congelado e liofilizado,

resultando na fração enriquecida com hemicelulose arabinoxilano aqui referida como “fração NaOH”.

### **3.4 Análise de composição de monossacarídeos**

Para obter informação sobre a composição de açúcares da fração DMSO extraída, parte do obtido foi enviado para o Instituto de Biociências da USP de São Paulo, onde a análise foi realizada pela Dra. Adriana Grandis. A mesma análise já havia sido feita para as demais frações cedidas e os resultados serão mostrados em conjunto para comparação.

Em resumo, as frações foram liofilizadas e submetidas a hidrólise ácida com ácido trifluoroacético (TFA – 2N) por 1h a 100°C. Os monossacarídeos foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução HPAEC-PAD (High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) com coluna CarboPac SA10 (ICS 5.000 system, Dionex-Thermo) eluindo com 99,2% de água e 0,8% (v/v) de NaOH com fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. A detecção dos monossacarídeos foi feita usando a adição de pós coluna de 500 mM de hidróxido de sódio (0,5 mL·min<sup>-1</sup>) e a quantificação de acordo com as curvas padrão para cada açúcar.

### **3.5 Tratamento enzimático das frações da cana de açúcar**

#### **3.5.1 Avaliação inicial de composição da fração DMSO**

Para avaliação da composição geral do arabinoxilano extraído de cana-de-açúcar (Fração DMSO), foram feitos ensaios preliminares contra as enzimas xilanases (GH10 e GH11). Esses ensaios visaram mostrar que tipos de ramificações estariam presentes para elaboração de ensaio combinatório mais focado, evitando desperdício de enzimas, tempo de análise e equipamento e reagentes.

O ensaio consistiu em incubar por 1 hora a 50°C e 550 rpm de agitação, 1 nmol das enzimas GH10 e GH11, separadamente, em mistura reacional contendo 1% (m/v) final da fração DMSO extraída suspenso em tampão acetato de amônio 100 mM pH 5,6, para volume final de reação de 1,0 mL. As reações foram interrompidas com fervura por 10 minutos e as amostras centrifugadas para separação do substrato insolúvel. O sobrenadante foi submetido à análise de HILIC-MS para análise dos oligossacarídeos gerados.

### 3.5.2 Ensaio de combinações enzimáticas

Como a avaliação inicial com xilanases não mostrou presença de estruturas contendo compostos fenólicos (ver item 4.3.1), foi planejado um ensaio combinatório com 5 enzimas: GH10, ARA, AXE,  $\alpha$ Glu e GH11, uma vez que não se observou nenhuma estrutura em que a feruloil esterase (FAE) seria ativa, diminuindo assim o número de combinações de 32 para 16 condições. Essa decisão evitou o gasto desnecessário de reagentes e tempo de análise, tornando o experimento mais sucinto e focado nas enzimas que poderiam ser ativas nos substratos escolhidos como modelos. As frações “pós clorito” e NaOH” também não receberam enzima feruloil esterase para efeito de comparação do mesmo conjunto enzimático em todos os ensaios, além de o tratamento químico realizado para sua obtenção, assim como o realizado para obtenção da fração DMSO, remover as ligações fenólicas por oxidação (DE SOUZA et al., 2013). A análise combinatória foi escolhida por mostrar tanto a ação das enzimas separadamente como a de todas as possíveis interações entre elas, podendo mostrar efeitos sinérgicos, inibitórios ou mesmo cooperativos.

As reações para avaliação da atividade das enzimas separadas e em diferentes combinações (planejamento mostrado na Tabela 2) foram feitas com  $1 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada enzima contra o arabinosilano extraído de cana de açúcar e fração pós clorito e NaOH 1% (m/v) final em tampão acetato de amônio 100 mM, pH 5,6. Primeiro foi feita a reação das enzimas combinadas por 16 horas, a  $55^\circ\text{C}$  e agitação de 550 rpm. Essa reação foi interrompida com fervura das amostras por 5 minutos, seguido de centrifugação e retirada das alíquotas para quantificação da açúcares redutores. Após isso, foi realizada reação com xilanase GH11 – na mesma concentração de  $1 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  – por 30 minutos e nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas anteriormente. A reação foi interrompida da mesma forma, as amostras centrifugadas e retiradas as alíquotas para determinação de açúcares redutores e espectrometria de massas. Os ensaios foram feitos em triplicata e o controle composto da mesma mistura reacional adicionada de tampão no lugar das enzimas.

**Tabela 2.** Planejamento ensaio combinatório contra frações de cana de açúcar

	<i>controle</i>	<i>Única enzima (1c4)</i>				<i>Pares (2c4)</i>						<i>Trios (3c4)</i>				<i>Todas (4c4)</i>
#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>GH10</i>		•				•	•	•				•	•	•		•
<i>AXE</i>			•			•			•	•		•	•		•	•
<i>ARA</i>				•			•		•		•		•	•		•
<i><math>\alpha</math>Glu</i>					•			•		•	•		•	•	•	•

Casas em cinza com pontos indicam presença da(s) enzima(s) indicada(s).

### 3.6 Análise de produtos de hidrólise

As análises dos produtos de hidrólise provenientes das reações foram realizadas por quantificação de açúcares redutores totais pelos métodos ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) e de Nelson-Somogyi e por espectrometria de massas HILIC-MS. A análise de açúcares redutores dá uma visão sobre a hidrólise da cadeia principal, sendo maior liberação de terminais redutores indicativo de maior degradação da cadeia principal de xilose, além de a comparação entre metodologias de quantificação indicar sobre como as enzimas estão atuando na estrutura do substrato. A espectrometria de massas, por outro lado, fornece informações estruturais mais detalhadas e visão ampla dos produtos de hidrólise liberados.

#### 3.6.1 Açúcares redutores

Para quantificação de açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática com metodologia de Nelson-Somogyi, foi utilizado protocolo estabelecido no laboratório para micro reação em que 125  $\mu\text{L}$  da mistura reacional foi adicionada de 125  $\mu\text{L}$  de Reagente D, preparado de acordo com NORTON, 1944 e SMOGYI, 1952, fervido por 6 minutos a 100°C. Em 200 $\mu\text{L}$  desta mistura, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do reagente E, também preparado de acordo com NORTON, 1944 e SMOGYI, 1952. 200 $\mu\text{L}$  desta mistura foram transferidos para placa de 96 poços e lido em espectrofotômetro com leitor de placas a 520 nm. Os valores, em  $\mu\text{mol}$  de xilose, são comparados com curva padrão feita com este monossacarídeo e os valores são subtraídos de branco contendo apenas o substrato, submetido às mesmas condições das demais amostras.

De forma semelhante, a determinação de açúcares redutores com ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) foi realizada de acordo com MILLER, 1959 e protocolo estabelecido no laboratório para micro reação, em que 150  $\mu\text{L}$  da mistura reacional foi adicionada de 150 $\mu\text{L}$  de reagente DNS, 100  $\mu\text{L}$  desta mistura foi fervida por 6 minutos a 100°C e transferiu-se 40  $\mu\text{L}$  do fervido para placa de 96 poços, adicionando 200  $\mu\text{L}$  de água para diluição. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com leitor de placas a 540 nm. Os valores, em  $\mu\text{mol}$  de xilose, foram comparados com curva padrão feita com este monossacarídeo e os valores são subtraídos do branco contendo apenas o substrato, submetido às mesmas condições das demais amostras.

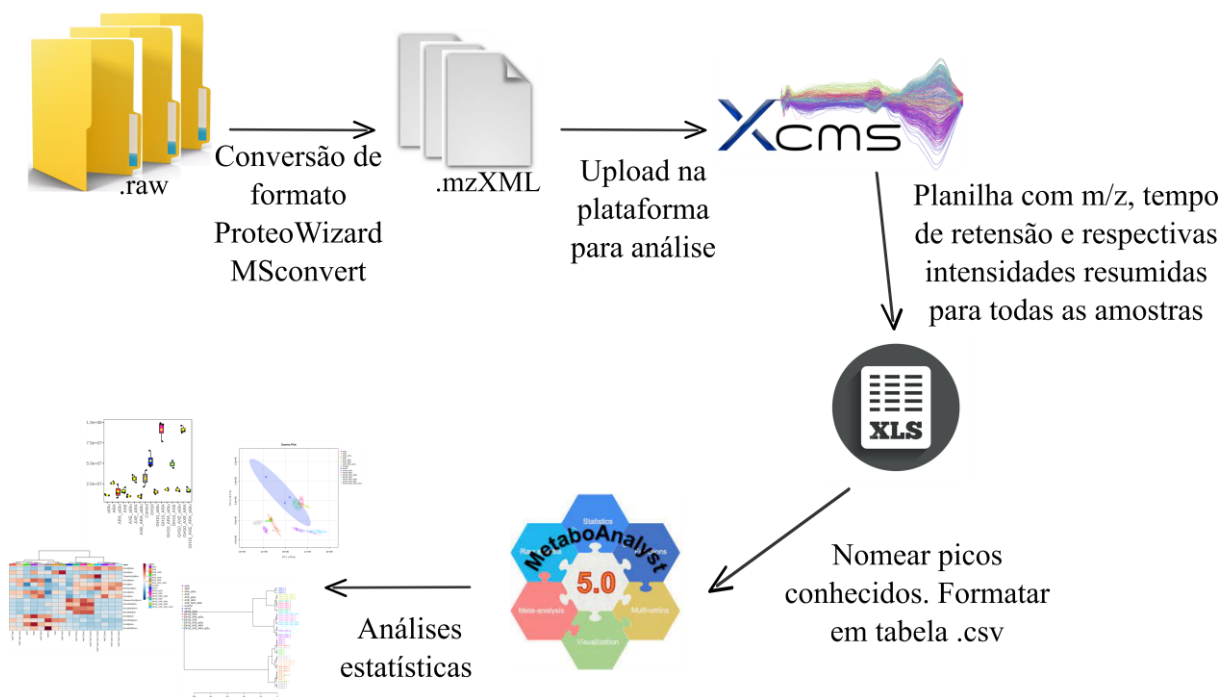
### 3.6.2 HILIC-MS

Os oligossacarídeos produzidos a partir da atividade enzimática foram separados usando cromatografia líquida por interação hidrofóbica em coluna HILIC (Ascentis Express HILIC, Supelco - EUA) com dimensões 10 cm x 4,5 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ . As análises foram feitas com injeção de 3  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas duas vezes, com coluna a 40°C e método de eluição com fluxo 0,5 mL.min<sup>-1</sup> inicialmente composto de fase A e B na proporção 10:90, passando para 50:50 em 6 minutos e voltando para a proporção inicial em 6,10 min até o final da corrida, sendo a fase móvel A composta por acetato de amônio 0,1% em água e a fase móvel B composta por hidróxido de amônio 0,1% em acetonitrila e tempo de desenvolvimento cromatográfico de 20 minutos. A coluna cromatográfica foi acoplada a espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters Corporation – Milford, EUA), com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas do tipo quadrupolo, operando no modo de aquisição positivo, com voltagem do capilar de 3,2 kV e temperatura da fonte de 150°C e o gás de solvatação será o N<sub>2</sub> a 300°C. Os dados foram coletados pelo software MassLynx 4.1 (Waters Corporation – Milford, EUA).

### 3.7 Tratamento estatístico e análise metabolômica

Os arquivos de HILIC-MS em formato .RAW foram convertidos em .mzXML com uso do programa “*ProteoWizard – MSConvert*” utilizando o filtro “PeakPicking” e algoritmo “CWT” (*Continuous Wavelet Transform*) com os parâmetros *Min SNR* = 0,2 (para o valor mínimo de relação sinal-ruído) e *Min Peak Spacing* = 0,2 (para o valor mínimo de espaçamento entre os picos). Os arquivos convertidos foram carregados na plataforma de análise de dados online “*XCMS online*” (<https://xcmsonline.scripps.edu>), para obtenção de uma tabela com valores de razão massa-carga e intensidades de picos mais significativos para cada amostra. Os parâmetros selecionados foram *p-value* < 0,05, correção de tempo de retenção aceitando desvio de 10 segundos, e reconhecimento de um pico com faixa de *m/z* de 0,5. Essa análise gerou uma tabela de resultados com as razões massa/carga, tempo de retenção em que se encontram, a significância – com confiança de 95% – e as intensidades destes picos para cada amostra. Essa tabela, em formato .csv foi modificada, nomeando os picos de massa-carga conhecidos e filtrando alguns picos com valores de massa-carga ainda dentro da faixa de 0,5 para serem considerados como referentes a uma mesma estrutura, uma vez que o aparelho não fornece análise de massa exata, e exportada para a plataforma de análise estatística de metabolômica “*MetaboAnalyst*” (<https://www.metaboanalyst.ca>) no módulo “*Statistical Analysis*”, para tratamento estatístico com as seguintes configurações: dados não pareados, filtro de dados tipo IQR (*Interquartile Range*), sem normalização/transformação, e *scaling* centrado na média.

Foram feitas análises de correlação entre as amostras por meio de dendrograma com distâncias calculadas pelo método de Spearman e algoritmo de *clustering* de Ward. Os dendrogramas são ferramentas de fácil observação de agrupamento de amostras, mostrando a separação de grupos desde as maiores até as menores distâncias, ou seja, das amostras mais diferentes entre si até as mais semelhantes. A análise de componentes principais (PCA), aqui feita com as duas primeiras dimensões, além de mostrar de forma simples os agrupamentos já verificados pelo dendrograma, resume grande parte da variância em poucas dimensões – os fatores – facilitando a observação dos efeitos de cada tratamento (variável) na resposta (produtos de hidrólise). Por fim, foi obtido também o *heatmap*, correlacionando a intensidade de cada pico identificado com o tratamento enzimático realizado. Um fluxograma resumido do processamento dos dados é mostrado na Figura 9.



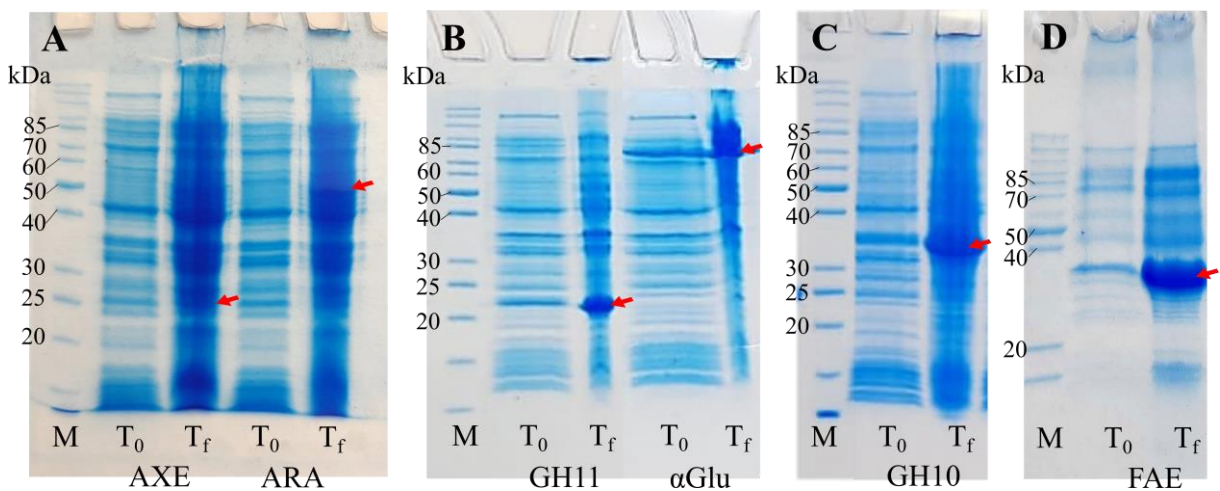
**Figura 9.** Fluxograma análise dos dados de espectrometria de massas.



## 4 RESULTADOS

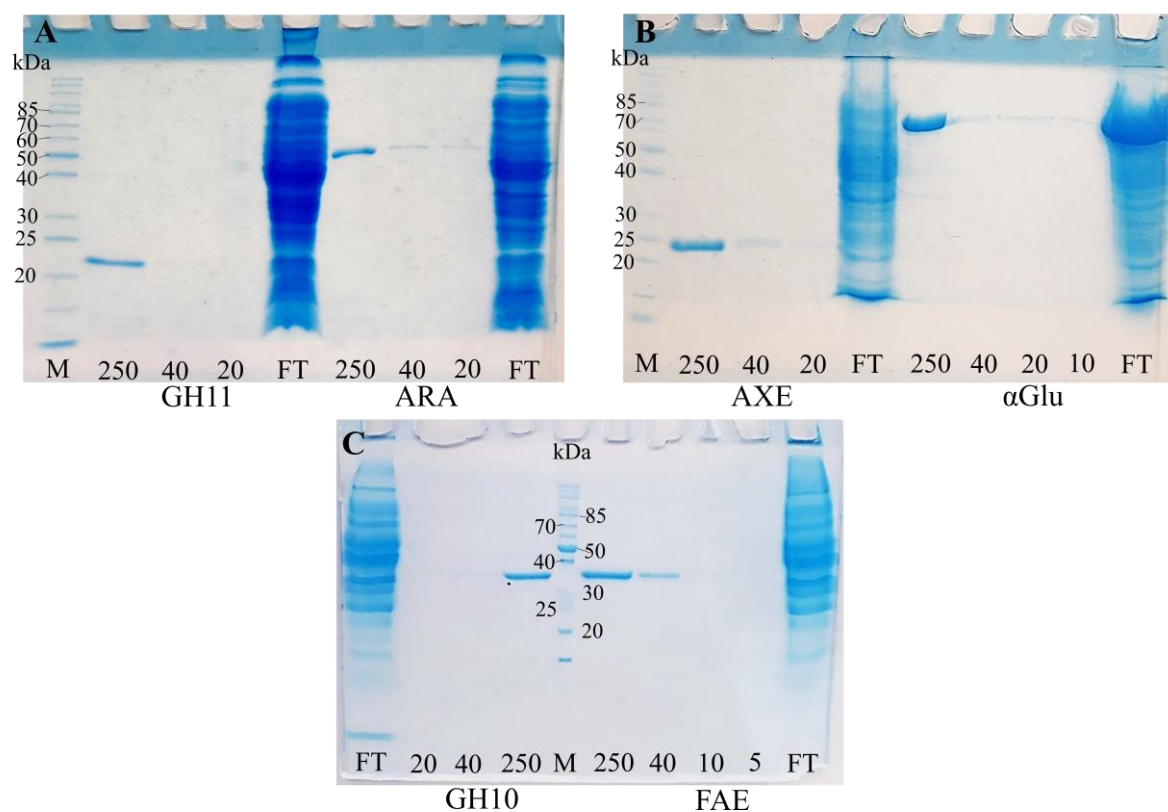
### 4.1 Expressão e purificação das enzimas

A expressão e purificação de todas as enzimas foram avaliadas por gel SDS-PAGE, que mostraram tanto a presença de bandas da proteína expressa após o período de 16 horas da indução com IPTG, quanto a proteína pura após as etapas de eluição com imidazol na cromatografia de afinidade por níquel pela interação com a sequência de histidinas. As Figuras 10 e 11 mostram os géis SDS-PAGE. O rendimento de todo o processo de expressão e purificação variou entre as enzimas, ficando na faixa de 1 a 25 mg de proteína por litro de cultivo, com ARA e AXE sendo as que apresentam menor rendimento de expressão e GH10 e  $\alpha$ Glu as com maior rendimento. Essa média de quantidade obtida foi mantida nas diversas expressões realizadas durante o desenvolvimento do trabalho. A Tabela 3 resume os valores médios de rendimento obtidos, assim como uma média das atividades específicas (em unidades por nmol de enzima) obtidos em ensaios colorimétricos em condições semelhantes às da reação contra os substratos extraídos.



**Figura 10.** Géis SDS-PAGE 12% da expressão das enzimas AXE, ARA (A), GH11,  $\alpha$ Glu (B), GH10 (C) e FAE (D). M = marcador de proteínas, T<sub>0</sub> = Tempo inicial da expressão, logo após indução com IPTG, T<sub>f</sub> = Tempo final da expressão.





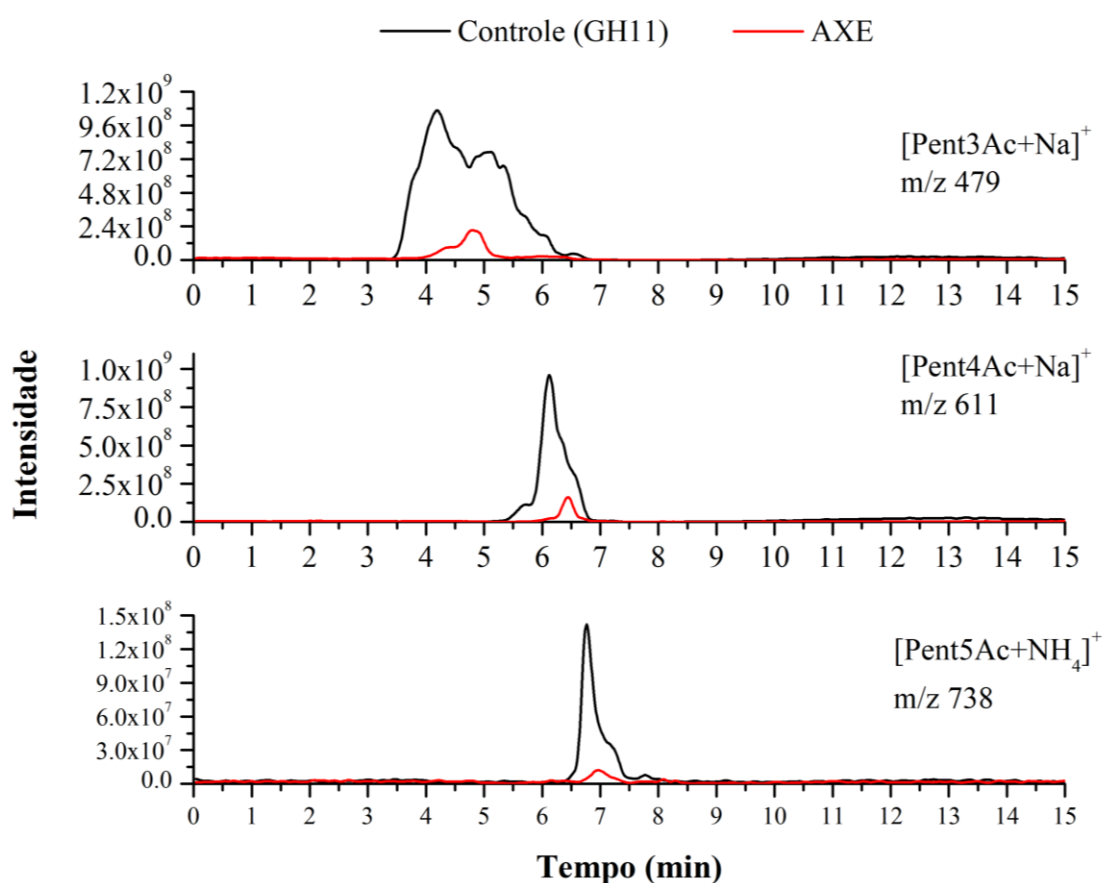
**Figura 11.** Géis SDS-PAGE 12% das purificações das enzimas GH11, ARA (A), AXE,  $\alpha$ Glu (B), GH10 e FAE (C). M = Marcador de proteína, FT = fração *flow through* eluída, 5, 10, 20, 40 e 250 = concentração (em mM) de imidazol utilizada nas etapas de eluição.

**Tabela 3.** Rendimento da expressão e atividades específicas das enzimas

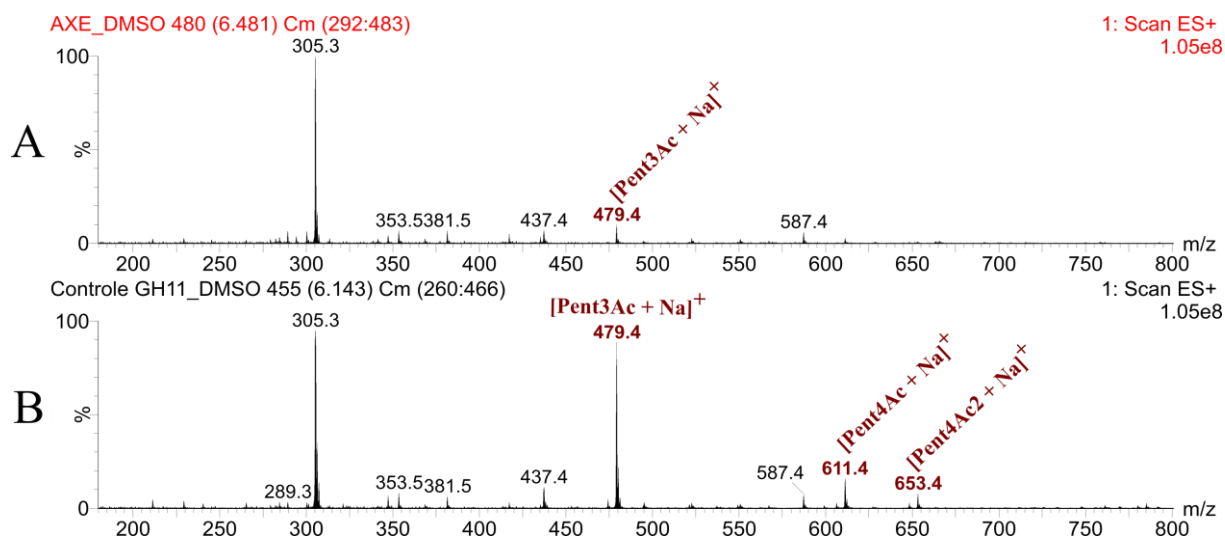
Enzima	Rendimento médio expressão (mg·L <sup>-1</sup> cultura)	Atividade específica média (U·nmol <sup>-1</sup> )	Substrato ensaiado	Método quantificação
<b>GH10</b>	25,0	0,65	Xilano Beechwood	DNS
<b>GH11</b>	10,0	0,60	Xilano Beechwood	DNS
<b>ARA</b>	1,0	0,44	Arabinoxilano de Trigo	DNS
<b><math>\alpha</math>Glu</b>	20,0	0,005	Mistura de ácidos urônicos	Reagente de cobre
<b>FAE</b>	10,0	1.09	Etil ferulato	Absorção etil ferulato
<b>AXE</b>	3,0	ND*	-	-

\* Não foi possível detectar atividade da AXE por métodos colorimétricos disponíveis. Sua atividade foi constatada na espectrometria de massas, porém, não foi quantificada.

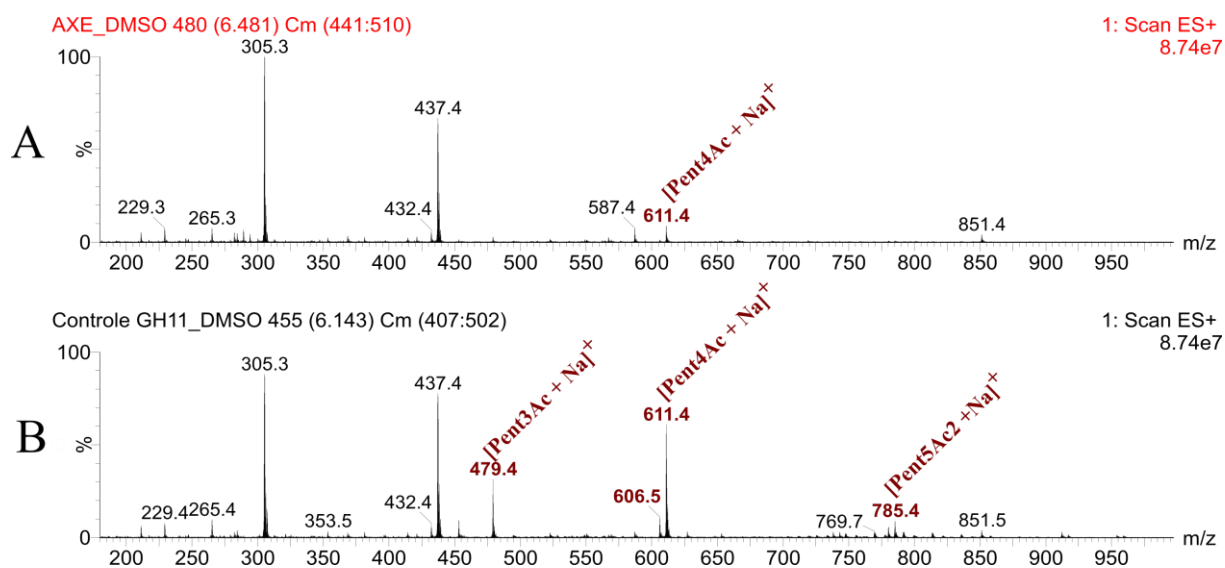
Para a enzima AXE não foi possível quantificar a atividade por ensaios colorimétricos disponíveis, mas observamos pelos ensaios HILIC-MS que estava ativa e foi capaz de remover acetilações dos substratos poliméricos estudados, como mostrado nos exemplos de alguns dos cromatogramas de picos selecionados comparando a intensidade de sinal destas estruturas acetiladas no controle apenas com GH11 e amostra com a enzima AXE contra a fração DMSO (Figura 6). Os espectros de massas destes picos selecionados são mostrados nas Figuras 12 a 15, com as estruturas acetiladas destacadas, mostrando que a presença da acetil xilano esterase removeu grande parte das acetilações, com a ausência ou considerável diminuição dos picos de estruturas acetiladas na presença da enzima. A AXE também foi ativa contra a fração pós clorito, como será discutido mais a fundo na sessão 4.3.2.



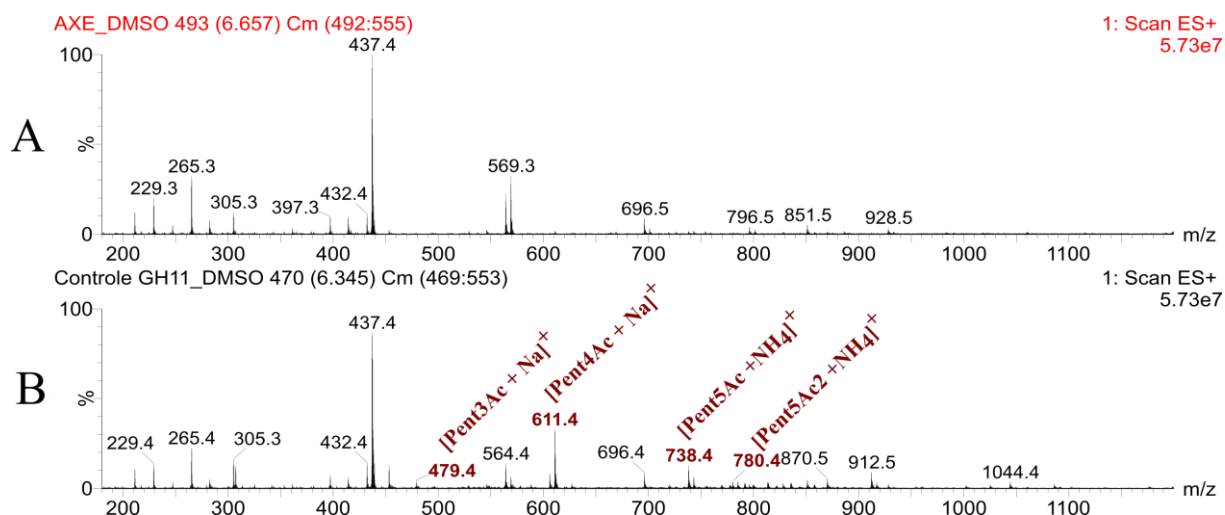
**Figura 12.** Cromatogramas HILIC-MS da fração DMSO selecionados para os íons referentes às estruturas acetiladas de  $m/z$  479, 611 e 738 comparando as intensidades do controle com de amostra contendo a enzima AXE.



**Figura 13.** Espectro de massas de (A) AXE e (B) controle contra a fração DMSO para o íon de  $m/z$  479. Referente ao cromatograma da Figura 6.

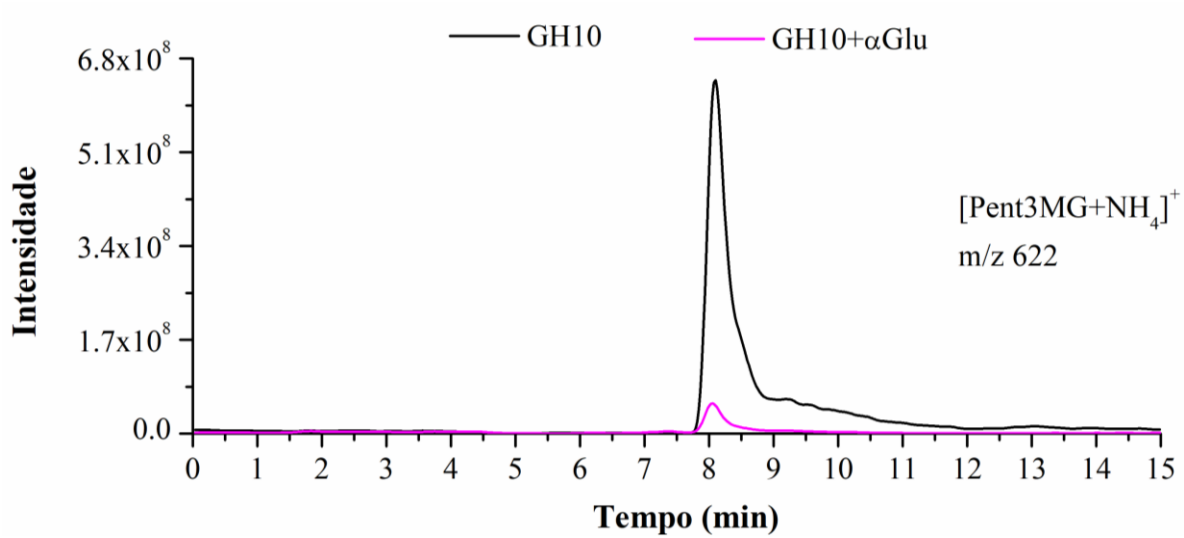


**Figura 14.** Espectro de massas de (A) AXE e (B) controle contra a fração DMSO para o íon de  $m/z$  611. Referente ao cromatograma da Figura 6.

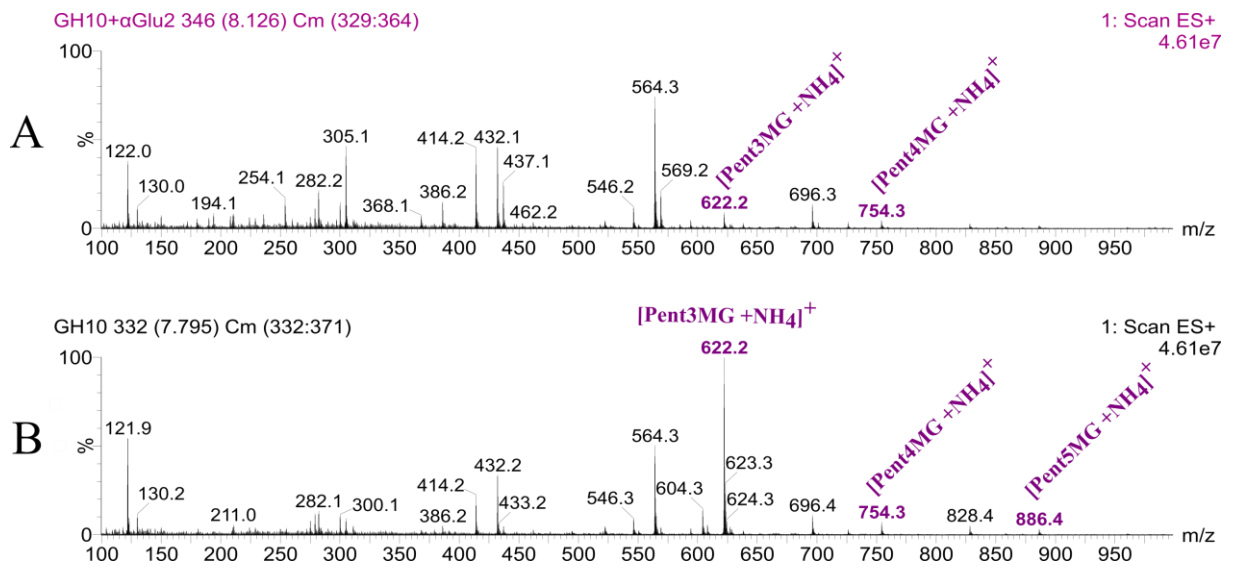


**Figura 15.** Espectro de massas de (A) AXE e (B) controle contra a fração DMSO para o pico  $m/z$  738. Referente ao cromatograma da Figura 6.

Para a  $\alpha$ Glu, como não houve atividade quantificável contra substratos poliméricos pelo método colorimétrico para ácidos urônicos, optamos por utilizar substrato sintético de mistura de ácidos urônicos, onde a atividade observada foi consideravelmente baixa em comparação com as demais enzimas, mas, assim como para AXE, a atividade da enzima foi observada nos experimentos de espectrometria de massas, como mostra o exemplo do cromatograma HILIC-MS selecionado para o pico de  $m/z$  622 – referente à estrutura contendo 3 pentoses com ramificação de metil glucurônico – para a enzima GH10 sozinha e GH10 junto da  $\alpha$ Glu contra a fração NaOH (Figura 16) e os respectivos espectro de massas, com as estruturas contendo ramificação de metil glucuronato destacadas (Figura 17). Demais características da ação desta enzima contra os substratos estudados serão discutidas com detalhes na sessão 4.3.2.



**Figura 16.** Cromatogramas HILIC-MS da fração NaOH selecionados para íon de estrutura metil glucuronada de  $m/z$  622 comparando as intensidades da amostras com GH10 e GH10+  $\alpha$ Glu.



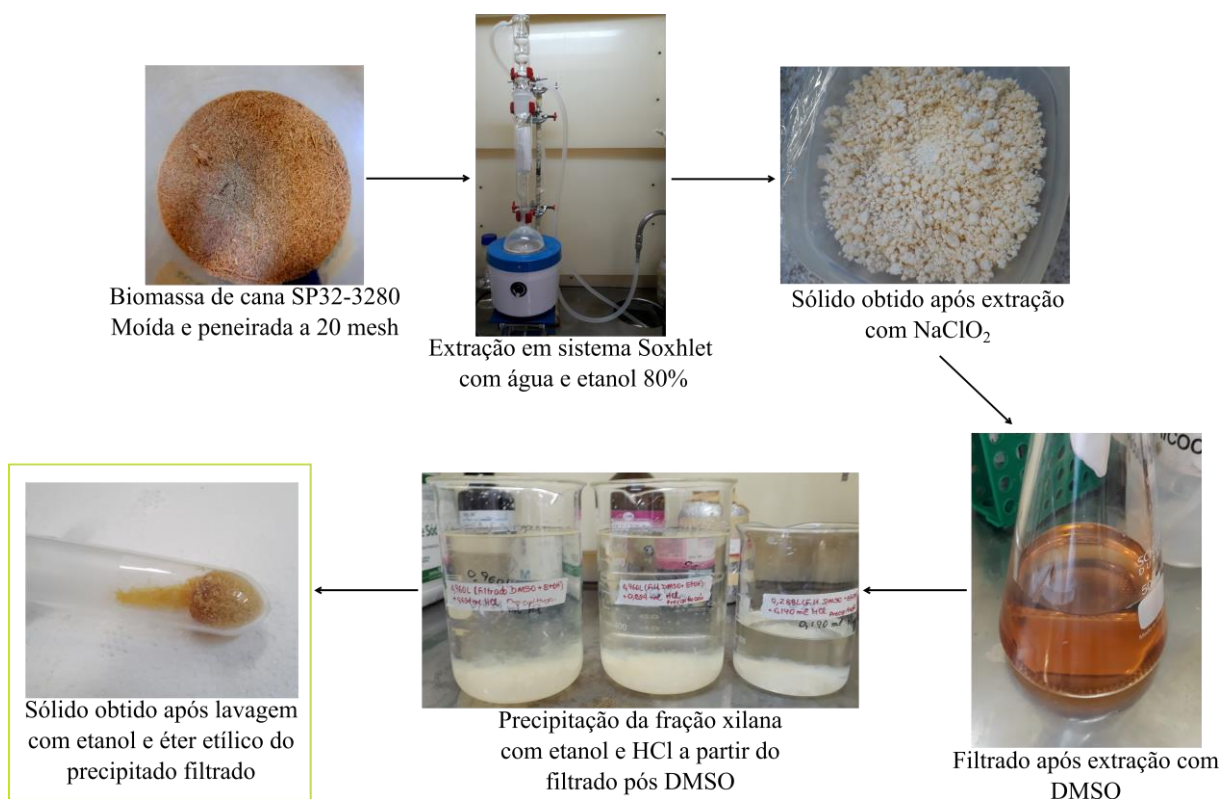
**Figura 17.** Espectro de massas de (A) GH10+  $\alpha$ Glu e (B) GH10 contra a fração NaOH para o íon de  $m/z$  622. Referente ao cromatograma da Figura 10.

## 4.2 Extração da fração xilana de cana de açúcar com DMSO

O rendimento da obtenção da fração DMSO, ou fração arabinoxilana, foi em torno de 6% – o que é esperado, já que é uma pequena fração da composição total da planta. O processo de extração leva tempo e grande volume de solventes – especialmente etanol – além de gerar quantidade elevada de resíduo químico, como o grande volume de etanol com DMSO e o filtrado e lavagens do tratamento com clorito de sódio. A Figura 18 mostra um fluxograma com fotos das principais etapas da extração.

Análise de composição de açúcares feita no Instituto de Biociências da USP de São Paulo pela Dra. Adriana Grandis, mostrou que o extraído é composto principalmente por xilose, seguido de arabinose e um pouco de glicose – sugerindo que realmente foi obtido uma fração enriquecida de arabinoxilano, com quantidades muito pequenas de glicose e galactose ainda presentes. A Tabela 4 resume os valores relativos para a composição de açúcares da fração DMSO extraída.

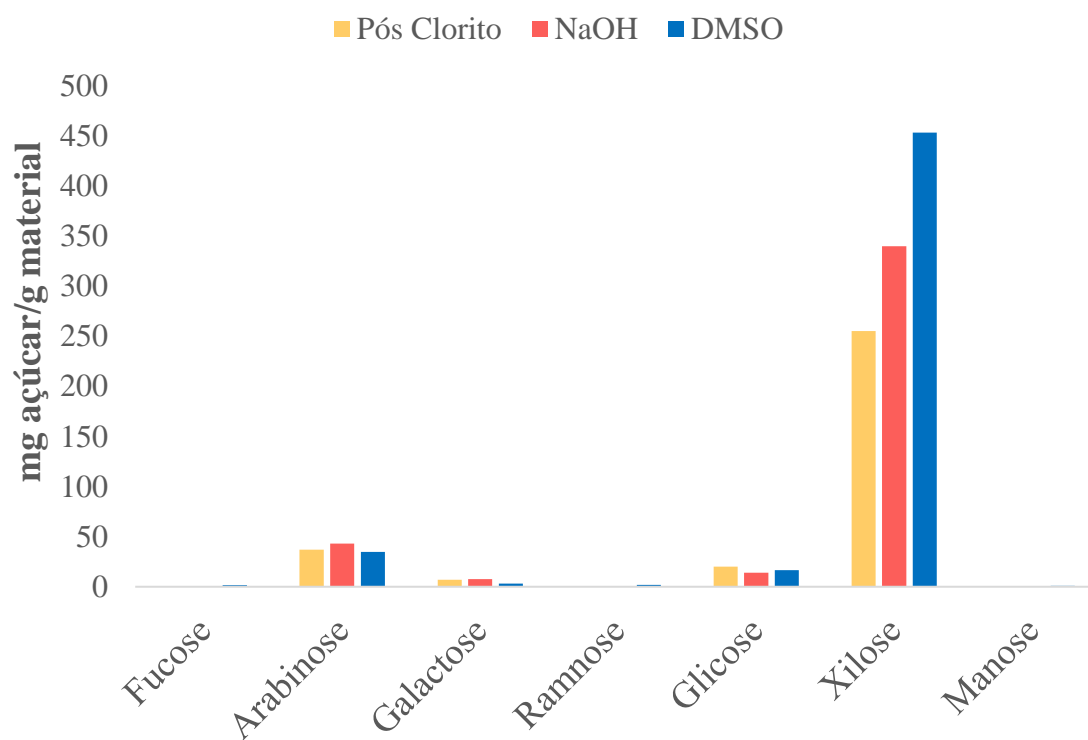
Para comparação, a mesma análise de composição de açúcares foi realizada para os demais substratos, e os valores são resumidos no gráfico da Figura 19, mostrando que a composição de monossacarídeos das frações é muito semelhante, apesar de a fração DMSO apresentar conteúdo relativo maior de xilose, com razão xilose/arabinose de 13,0 enquanto as frações NaOH e pós clorito mostraram valores de 7,9 e 6,9, respectivamente. Isso pode indicar que a extração com DMSO foi mais eficiente em obter um arabinoxilano mais puro em relação a compostos que não são açúcares e menos ramificado – inclusive em relação à presença de arabinoses.



**Figura 18.** Fluxograma da extração da fração DMSO com fotos das principais etapas

**Tabela 4.** Composição relativa de monossacarídeos da fração DMSO extraída

<i>Açúcar</i>	<i>Composição Relativa (%)</i>
<b>Xilose</b>	88,51 ± 0,23
<b>Arabinose</b>	6,81 ± 0,06
<b>Glicose</b>	3,21 ± 0,21
<b>Galactose</b>	0,61 ± 0,03
<b>Ramnose</b>	0,35 ± 0,02
<b>Fucose</b>	0,31 ± 0,02
<b>Manose</b>	0,21 ± 0,02



**Figura 19.** Gráfico da composição de açúcares das frações DMSO, pós clorito e NaOH, em miligramas de monossacarídeo por grama de material. Todos os ensaios foram realizados pela Dra. Adriana Grandis, do Instituto de Biociências USP/SP.



### 4.3 Tratamento enzimático e análise dos produtos de hidrólise

#### 4.3.1 Avaliação inicial de composição da fração DMSO

Ensaio de avaliação inicial da composição com as enzimas xilanase GH10 e GH11 contra o substrato extraído fração DMSO apontou para a presença principalmente de porções acetiladas, além de grupos metil glucurônico e estruturas contendo ambas as ramificações (Figuras S1 a S4). Não foi encontrado nenhum pico de razão massa-carga que indicasse presença de estruturas ramificadas com compostos fenólicos, como grupos ferulato, cumarato ou sinapil. Desta forma, foi decidido não utilizar a enzima FAE (feruloil esterase) no grupo de combinações de enzimas, evitando gasto desnecessário de substrato, reagentes e tempo de equipamento para análise das amostras. Para efeito de comparação, o mesmo conjunto de enzimas foi utilizado em todos os três substratos estudados, além disso, pelo tratamento químico de deslignificação que todos passaram, não seria esperado a presença destes fenólicos.

#### 4.3.2 Combinações enzimáticas contra os diferentes substratos

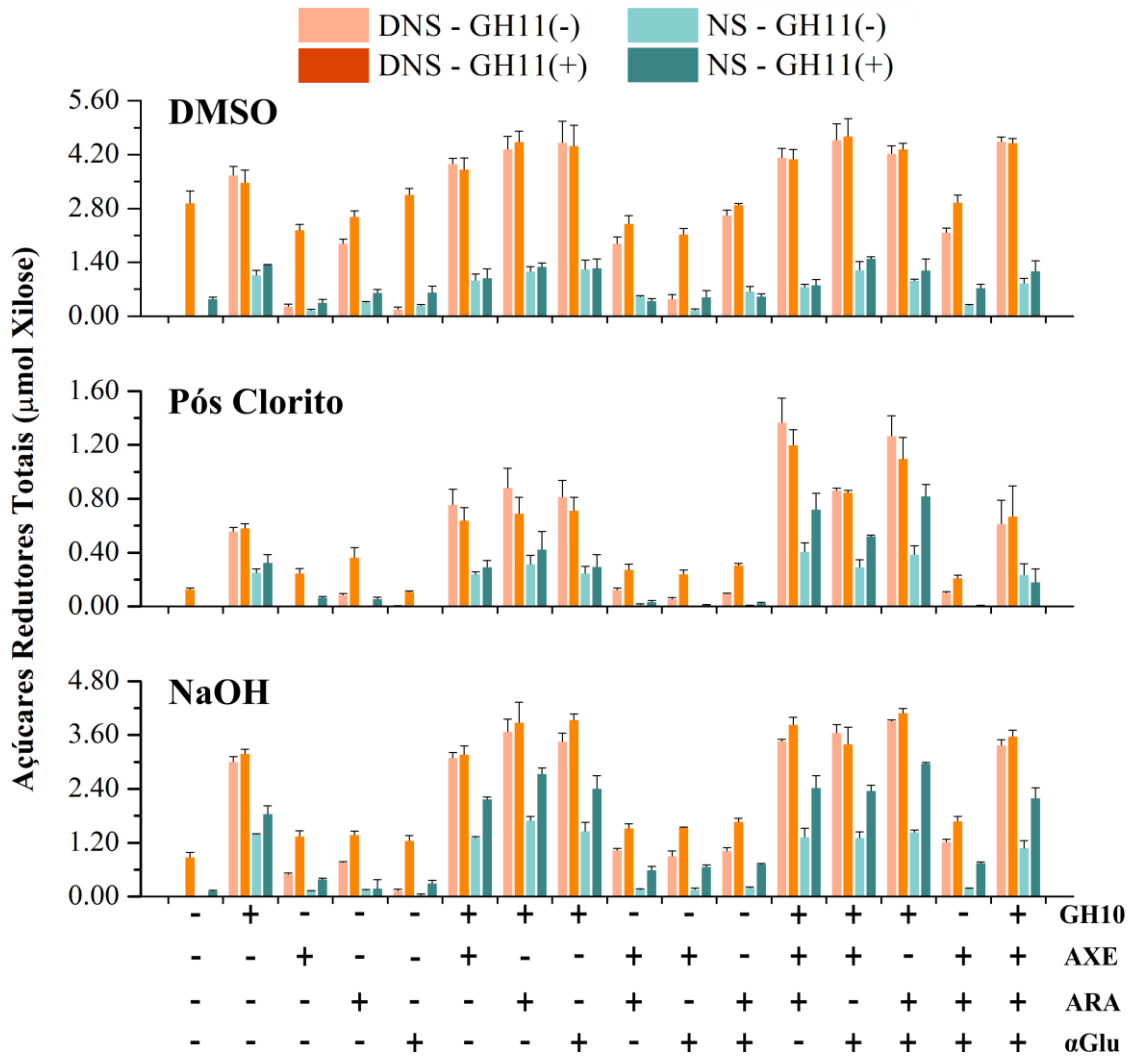
##### 4.3.2.1 Açúcares redutores

O ensaio de açúcares redutores mostrou que as arabinoxilanas extraídas de diferentes formas apresentam comportamento bem diferente frente às combinações de enzimas (Figura 20). Foi realizada análise de componentes principais (PCA) das concentrações médias obtidas para cada amostra tendo como variáveis os métodos (DNS e NS) e a presença ou não de xilanase GH11 e agrupando as amostras de acordo com a presença de xilanase GH10 e fração – grupos que foram escolhidos para melhor mostrar, com esquema de cores, a localização das amostras de cada substrato e a influência da presença da GH10. Essa escolha não influenciou a análise realizada nem a localização dos pontos, sendo apenas para efeito de visualização. O gráfico PCA dos componentes 1 e 2 (Figura 21), mostra separação dos grupos e reflete o comportamento das enzimas frente ao substrato resumindo o observado no gráfico da Figura 20, com leituras maiores por DNS contribuindo negativamente para PC1 e positivamente para PC2 e por NS contribuindo negativamente para ambos, como mostrado na Figura 22A. Dessa forma, o grupo DMSO com GH10 (azul claro) se destacou no segundo quadrante devido às altas leituras obtidas por DNS e leituras mais baixas com NS, enquanto a fração NaOH com presença de xilanase 10 (azul escuro) obteve leituras mais próximas em para ambos os métodos, posicionando o grupo no terceiro quadrante do gráfico. O grupo da fração DMSO (amarelo) mostrou menor concentração de açúcares liberados na ausência da GH11 e por isso foi deslocado para o centro dos quadrantes superiores. A fração NaOH foi pouco acessível para

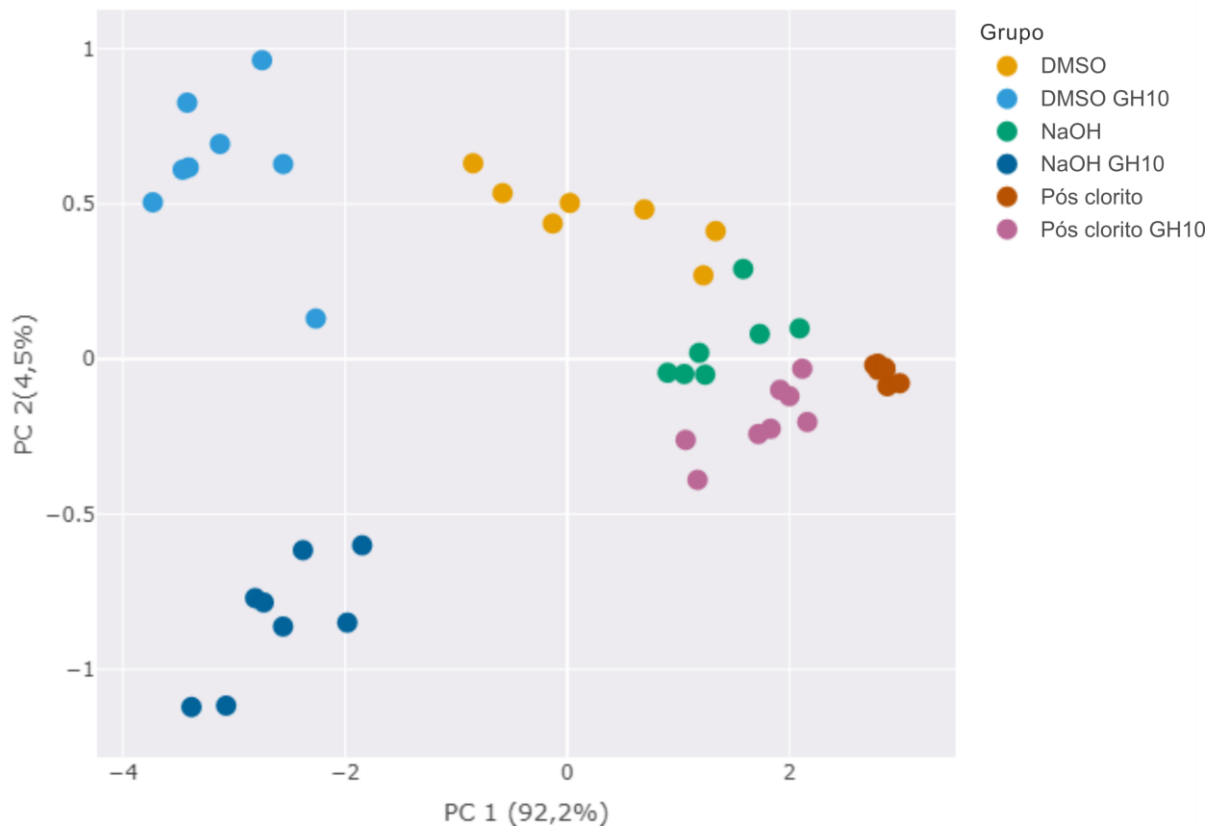
liberação de açúcares na ausência da xilanase 10 (verde), e a fração pós clorito teve no geral pouca liberação de açúcares, diferindo pouco com a presença da GH10 (rosa) e praticamente nada com apenas GH11 como xilanase (vermelho), cujo grupo ficou bastante concentrado.

Levando em consideração que o método com DNS apresenta resposta de intensidade maior com o aumento do grau de polimerização da cadeia, enquanto o método de Nelson-Somogyi mantém resposta semelhante (MCCLEARY; MCGEOUGH, 2015), pode-se dizer que a fração DMSO teve mais produtos de hidrólise com cadeias maiores do que a fração NaOH e pós clorito, em especial na presença de xilanase 10, já que para este as concentrações medidas por DNS foram significativamente maiores do que as medidas com SN (chegando a mais de 5x a diferença entre concentração obtida com DNS em relação à com NS para DMSO). As leituras sem xilanases de AXE e  $\alpha$ Glu não são consideradas nessa comparação, pois foram muito baixas para ambos os métodos, uma vez que quantificam a liberação de terminais redutores e estas enzimas não possuem mecanismo de clivagem de ligações que resultem em novos terminais redutores.

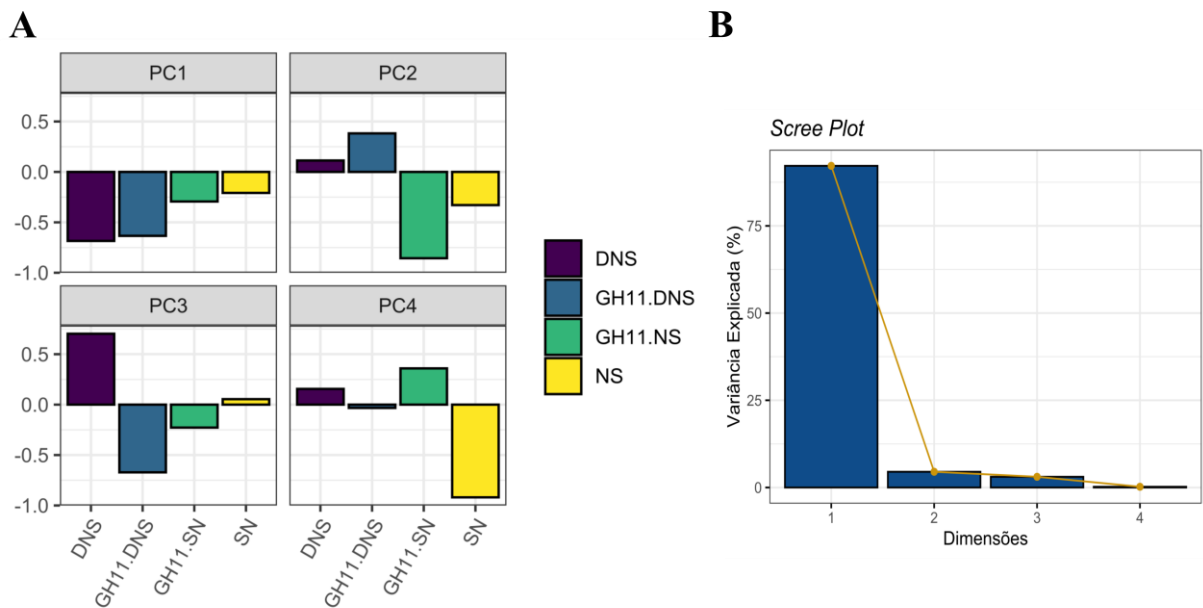
O fato de a xilanase GH11 sozinha apresentar atividade muito baixa nas frações pós clorito e NaOH indica que estes substratos devem apresentar estrutura com mais ramificações, impedindo o acesso da enzima, enquanto a fração DMSO provavelmente contém regiões com menos ramificações e que puderam ser substrato para a GH11.



**Figura 20.** Gráficos de açúcares redutores totais de cada combinação enzimática para os substratos fração DMSO, fração pós clorito e fração NaOH. “+” indica presença da enzima indicada.



**Figura 21.** Gráfico PCA para os dois primeiros componentes principais das leituras de açúcares redutores pelos métodos DNS e NS com e sem a presença de xilanase GH11 das combinações enzimáticas contra os 3 diferentes substratos. Para melhor observação, a legenda ao lado indica algumas características das amostras, mostrando que a separação de grupos foi fortemente influenciada pelo tipo de substrato e presença ou não de xilanase GH10. Versão interativa disponível em <http://rpubs.com/CarolVictalG/887673> - este link permite observar o nome de cada amostra.

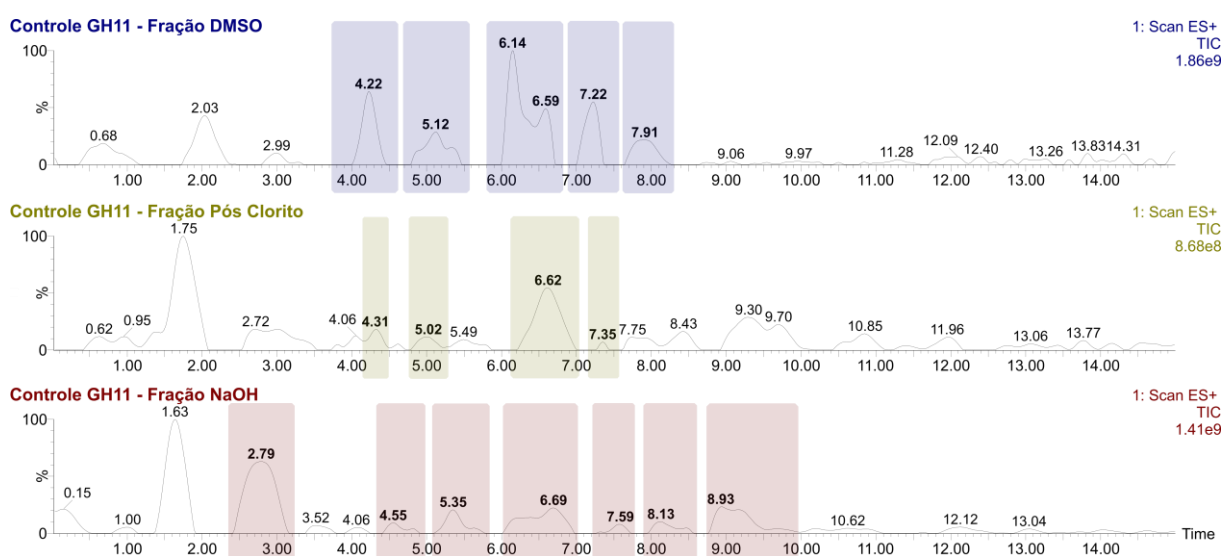


**Figura 22.** Contribuição das variáveis para cada componente principal (A) e *scree plot* com a contribuição para explicação da variância de cada dimensão (B)

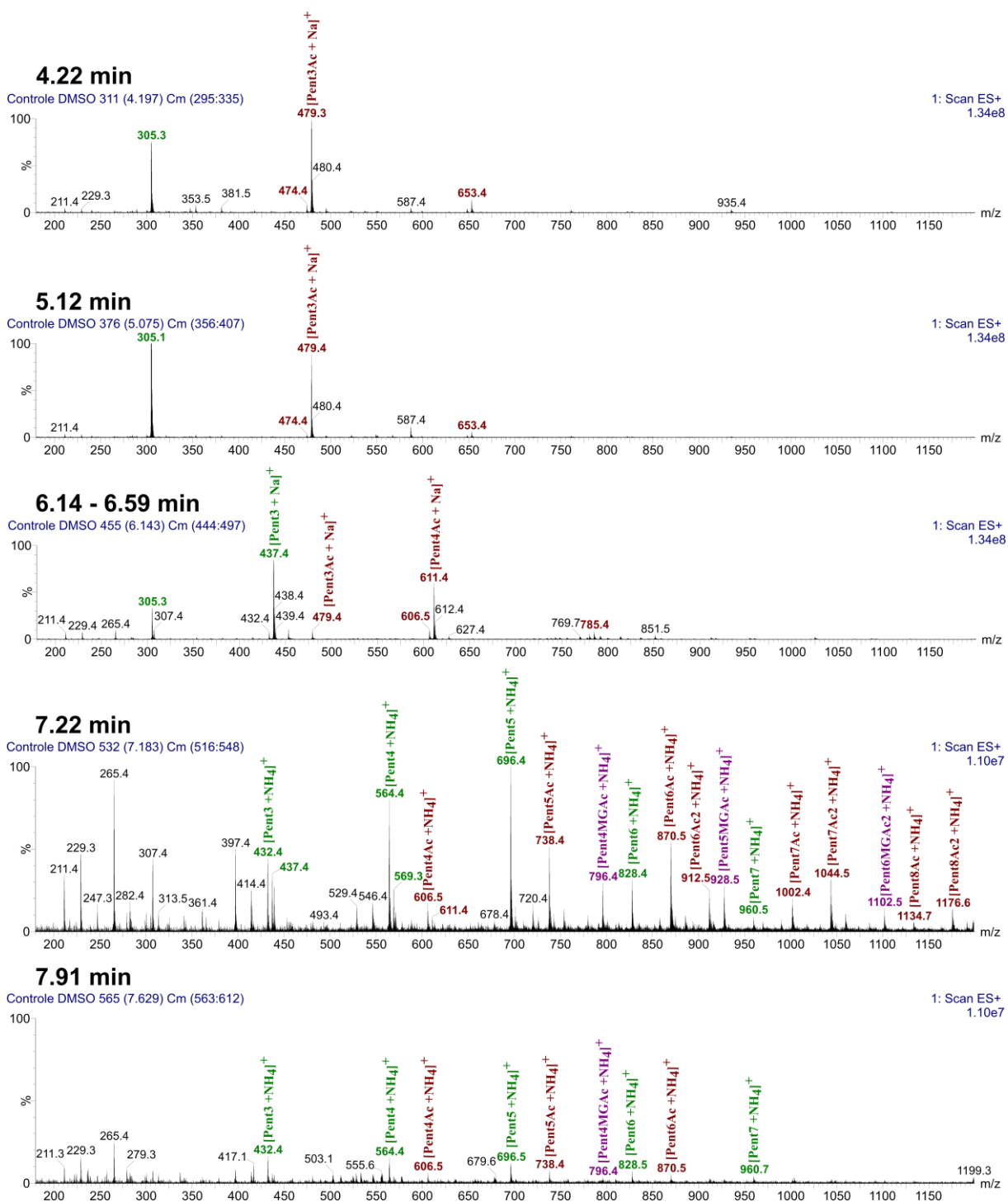
### 4.3.2.2 HILIC-MS

A análise de espectrometria de massas complementou o que foi primeiramente observado com a quantificação de açúcares redutores, oferecendo detalhes, como estruturas recalcitrantes para o conjunto de enzimas utilizado e perfil dos oligossacarídeos liberados para cada substrato estudado. Cromatogramas e os espectros dos principais picos para a amostra controle (tratada apenas com xilanase GH11) dos três substratos são mostrados nas Figuras 23 a 26, já indicando como as frações obtidas por diferentes extrações mostram composições distintas e como a enzima xilanase se comporta de maneira diferente em cada uma. A fração extraída com DMSO apresentou maior variedade de estruturas, com picos acetilados, com metil glucurônico e ambas as ramificações, além de certa quantidade dos oligossacarídeos com grau de polimerização 2, os menores que podem ser obtidos com esse conjunto enzimático. Na fração pós clorito, observou-se principalmente picos acetilados, destacando o alto grau de acetilação – até 4 grupos acetil para oligossacarídeos de 6 ou 7 pentoses. E a fração NaOH, que não apresentou picos acetilados, mas um conjunto de cadeias de pentoses com diferentes graus de polimerização – sendo mais abundantes com 3 a 6 pentoses – e ramificações de grupos metil glucurônico.

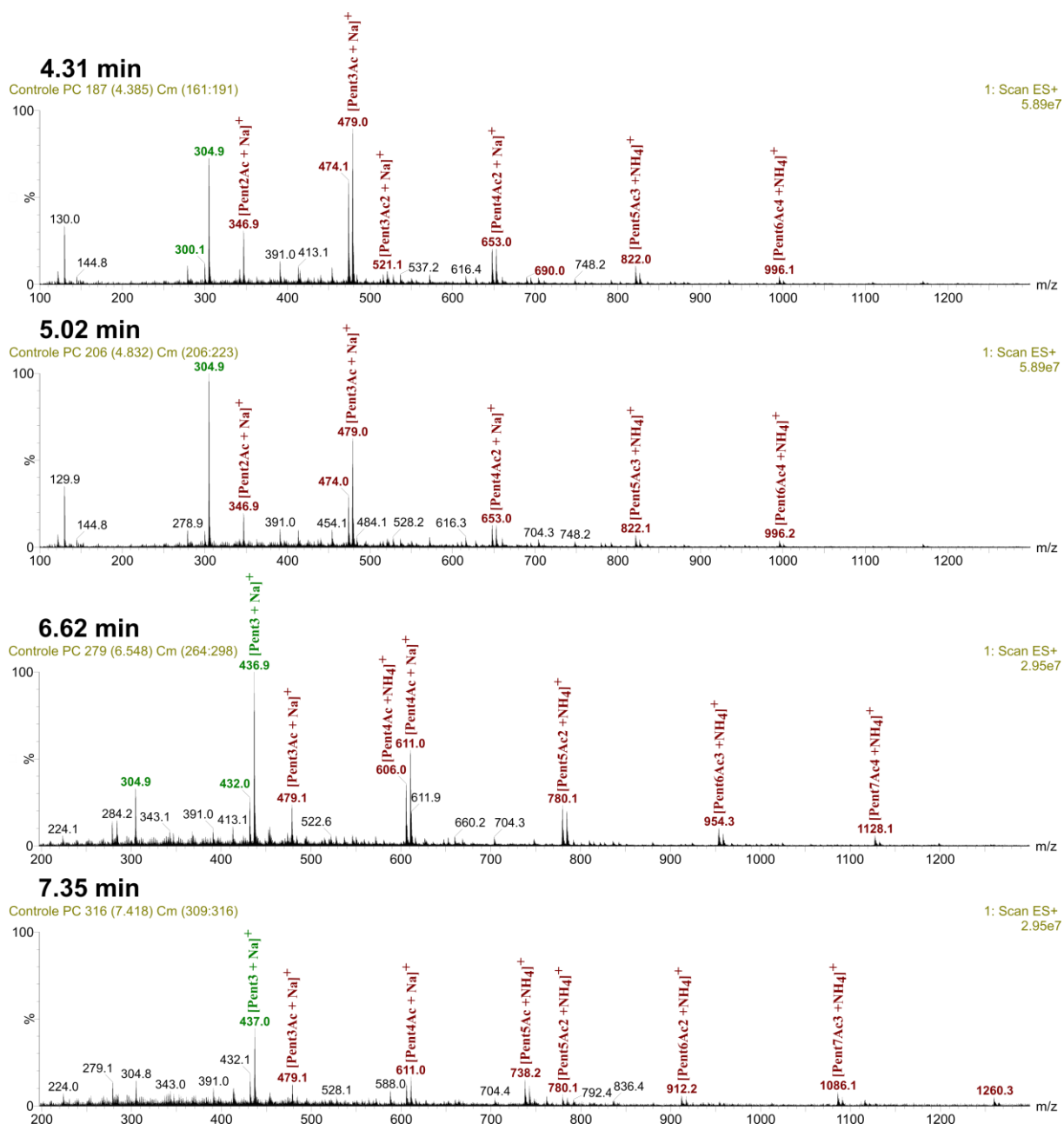
Devido ao grande volume de dados gerados pelos espectros de todas as amostras, os resultados são mostrados através de análises estatísticas com ferramentas da quimiometria e metabolômica para cada substrato ensaiado, facilitando assim a visualização e interpretação dos resultados.



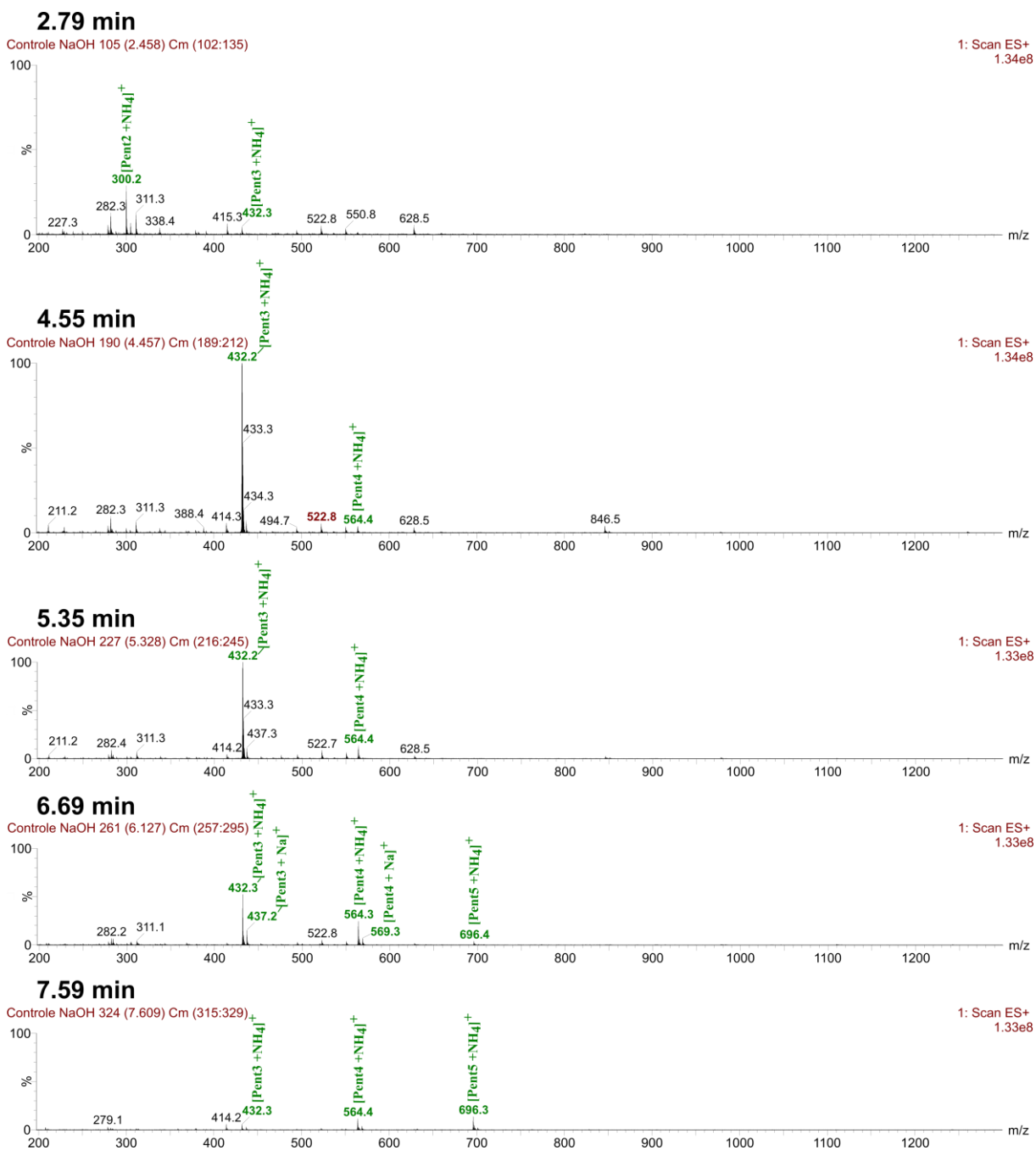
**Figura 23.** Cromatogramas das amostras controle para cada substrato, mostrando de forma geral como os cromatogramas saíram e a composição de xilooligossacarídeos observada nesta condição de tratamento comum a todas as amostras das combinações. As amostras “controle” foram tratadas apenas com xilanase GH11. Os picos com tempo de retenção destacados são os que concentraram mais informação sobre as estruturas de interesse nos espectros.



**Figura 24.** Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato DMSO. Íons identificados foram nomeados, considerando adutos de sódio ou amônio. Pent = pentose, Ac = acetilação, MG = metil glucurônico.

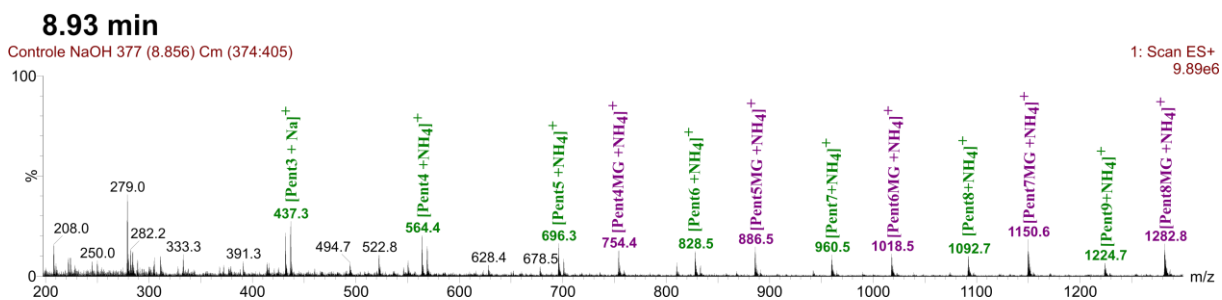
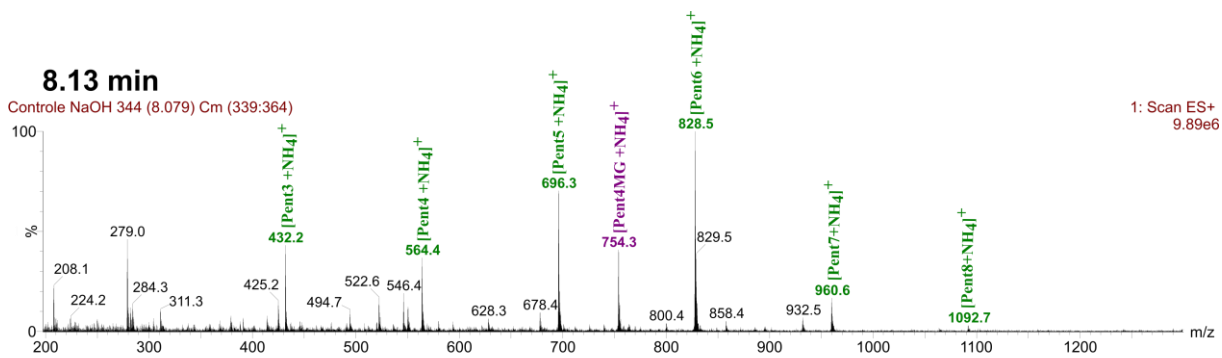


**Figura 25.** Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato pós clorito. Íons identificados foram nomeados, considerando adutos de sódio ou amônio. Pent = pentose, Ac = acetilação, MG = metil glucurônico.



**Figura 26.** Espectros nas janelas de tempo de retenção mais importantes para a amostra controle do substrato NaOH. Íons identificados foram nomeados, considerando adutos de sódio ou amônio. Pent = pentose, Ac = acetilação, MG = metil glucurônico.





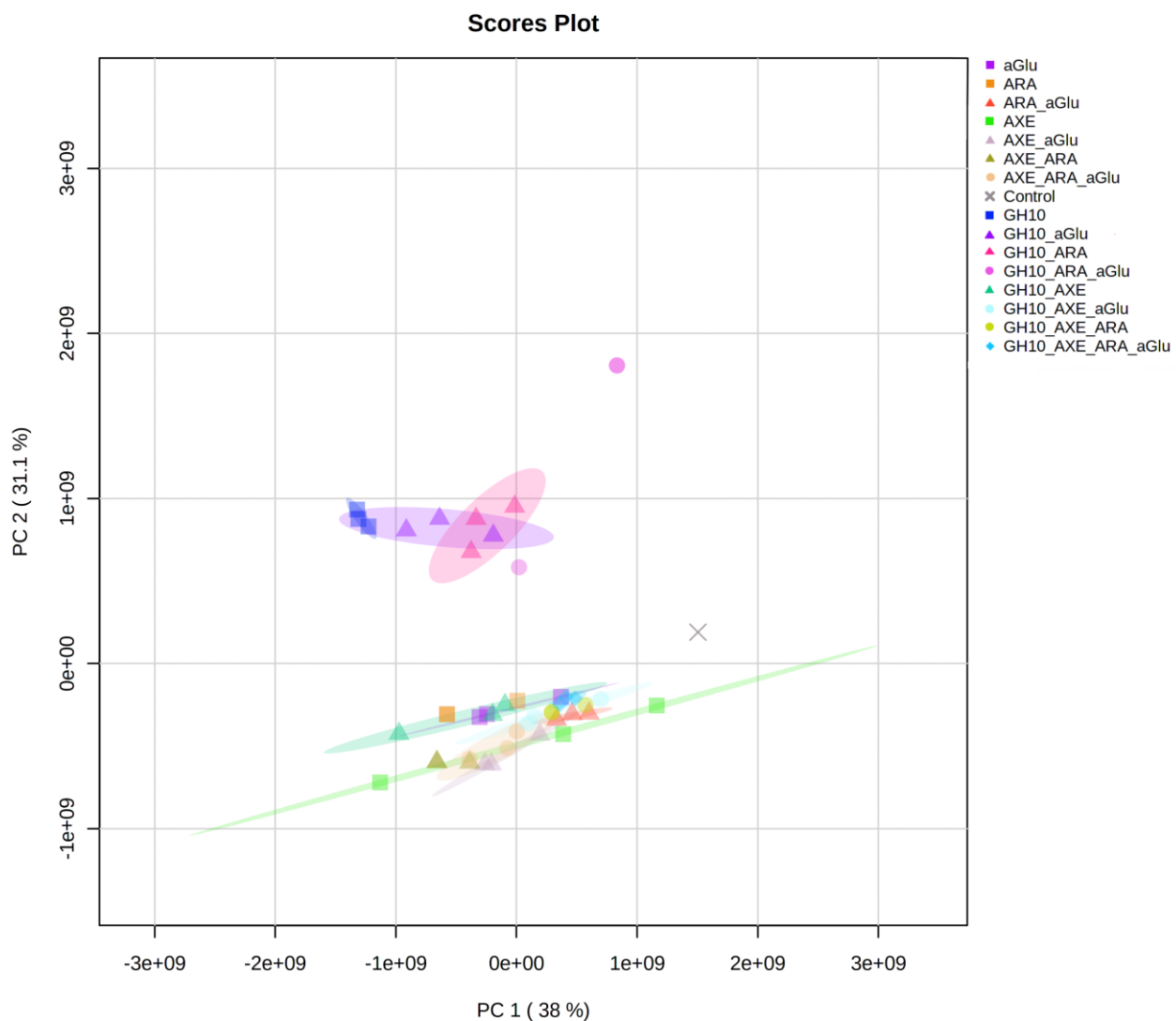
Continuação Figura 26

#### 4.3.2.2.1 Fração DMSO

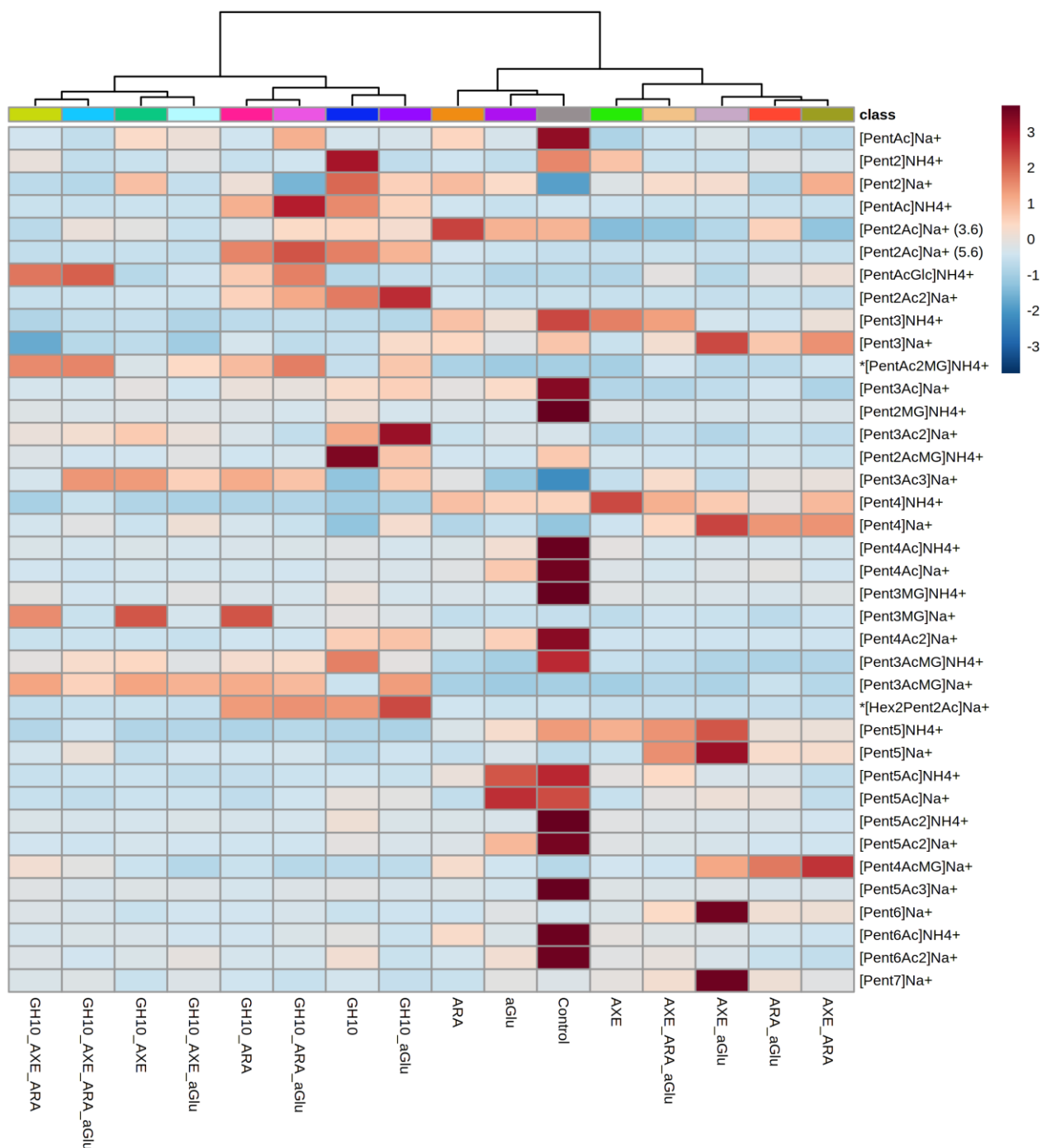
O gráfico de PCA da análise metabolômica dos dados de HILIC-MS (Figura 27) mostrou separação entre as amostras com GH10 e depois as com AXE.  $\alpha$ Glu se diferenciou levemente de ARA e do controle na presença de GH10, mas na ausência desta ou acompanhada de AXE não houve diferença significativa, assim, no gráfico, o grupo superior contém as amostras com GH10 e sem AXE, e abaixo uma leve separação entre o grupo de amostras GH10+AXE mais à direita e o grupo contendo AXE sem GH10 mais abaixo. Essa separação é mais detalhada no dendrograma (material suplementar Figura S4)

O *Heatmap* das amostras contra os picos identificados (Figura 28) mostra o perfil geral do substrato e os *boxplots* (Figuras 29 a 31) resumem as intensidades dos picos em cada combinação. Amostras tratadas com GH10 produziram mais picos com grau de polimerização menores (Figura 29) e os com maior quantidade de ramificações por pentose, quando não tratado com enzimas acessórias. Nota-se que a presença da xilanase 10 foi essencial para a ação da  $\alpha$ Glu, sendo que esta só foi capaz de remover os grupos metil glucurônicos (MG) de estruturas com menos de 4 pentoses (Pent). A presença de acetilações (Ac) junto ao grupo metil glucurônico afeta a ação tanto da esterase quanto da glucuronidase, já que ambas as enzimas não podem atuar em estruturas contendo as duas ramificações (Pent4AcMG e Pent3AcMG, na Figura 30), como já descrito em (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016), fazendo dessas, porções recalcitrantes neste substrato para o conjunto de enzimas. Nota-se que quando se tem duas acetilações junto ao metil glucurônico ou acetilação junto ao ácido glucurônico (Glc), como em PentAc2MG e PentAcGlc, respectivamente, as combinações GH10+AXE e GH10+AXE+  $\alpha$ Glu parecem surtir efeito e se supõe que a acetil xilano esterase consegue retirar essas acetilações por estarem mais distantes do grupo urônico ou pelo grupo glucurônico não metilado oferecer menor impedimento para a remoção da acetilação.

A ação da AXE é comprovada pela ausência da maior parte dos grupos acetil na presença desta enzima, como mostrado na Figura 31, em que apenas a estrutura Pent3Ac3 permaneceu recalcitrante.

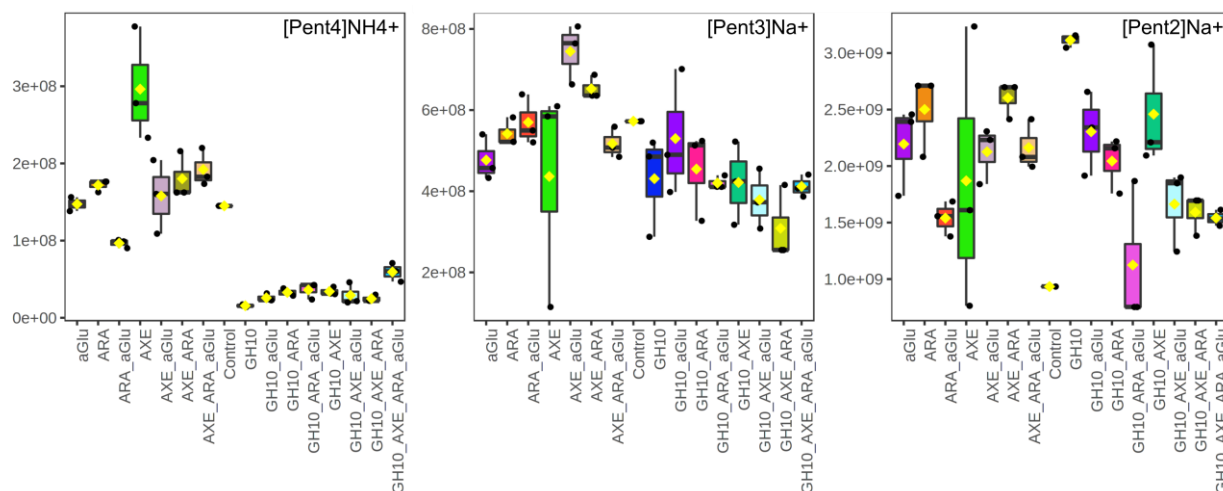


**Figura 27.** Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst.

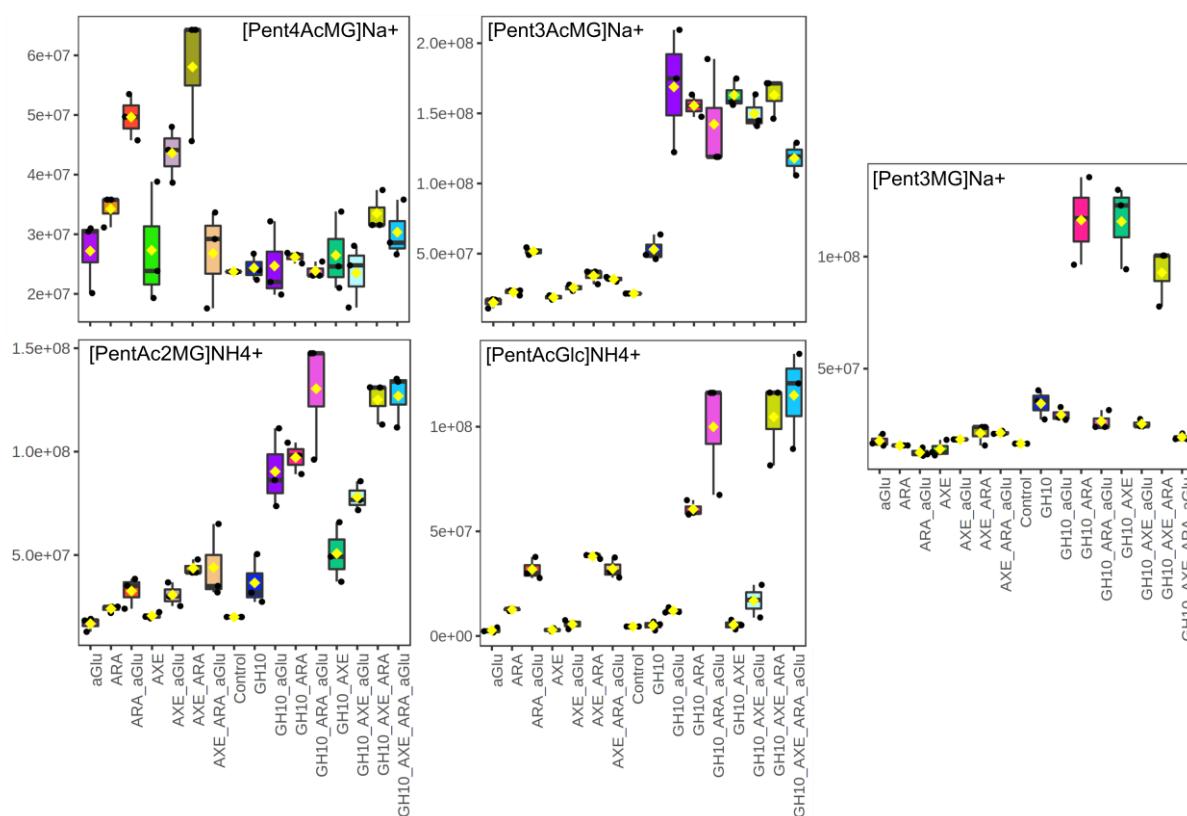


**Figura 28.** Heatmap dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO.

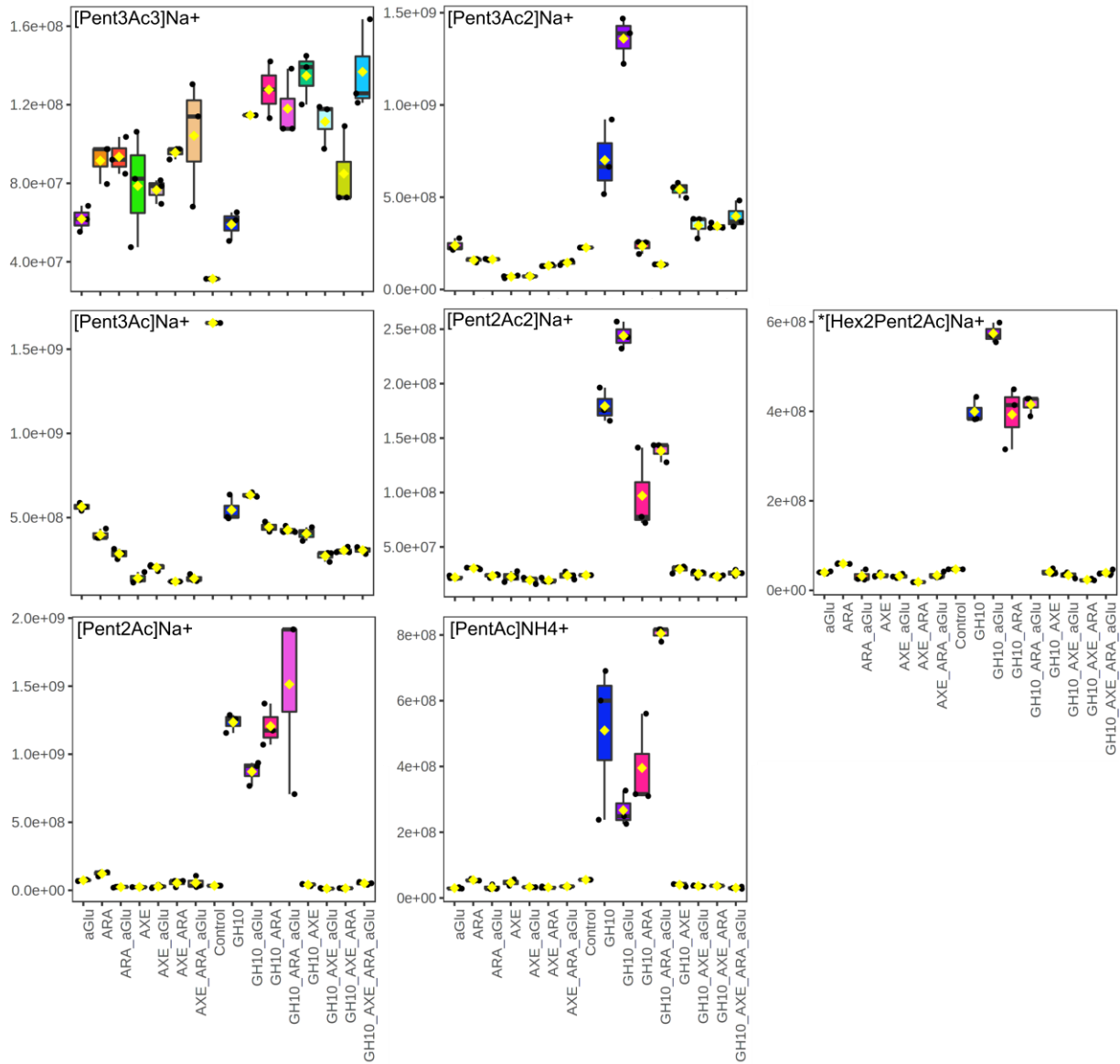
Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Pent = pentose, Hex = hexose, Ac = acetato, MG = ácido metil glucurônico, Glc = ácido glucurônico. Números que seguem as abreviações indicam quantidade desta estrutura. \* Íons anotados com incerteza sobre estrutura



**Figura 29.** *Boxplot* dos íons de pentoses não decoradas na fração DMSO, mostrando que a atividade da xilanase 10 favorece a produção de oligossacarídeos menores. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.



**Figura 30.** *Boxplot* dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração DMSO, com ou sem acetilações. Mostra que a presença de acetilações ou grupos grandes impedem ação da glucuronidase. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.



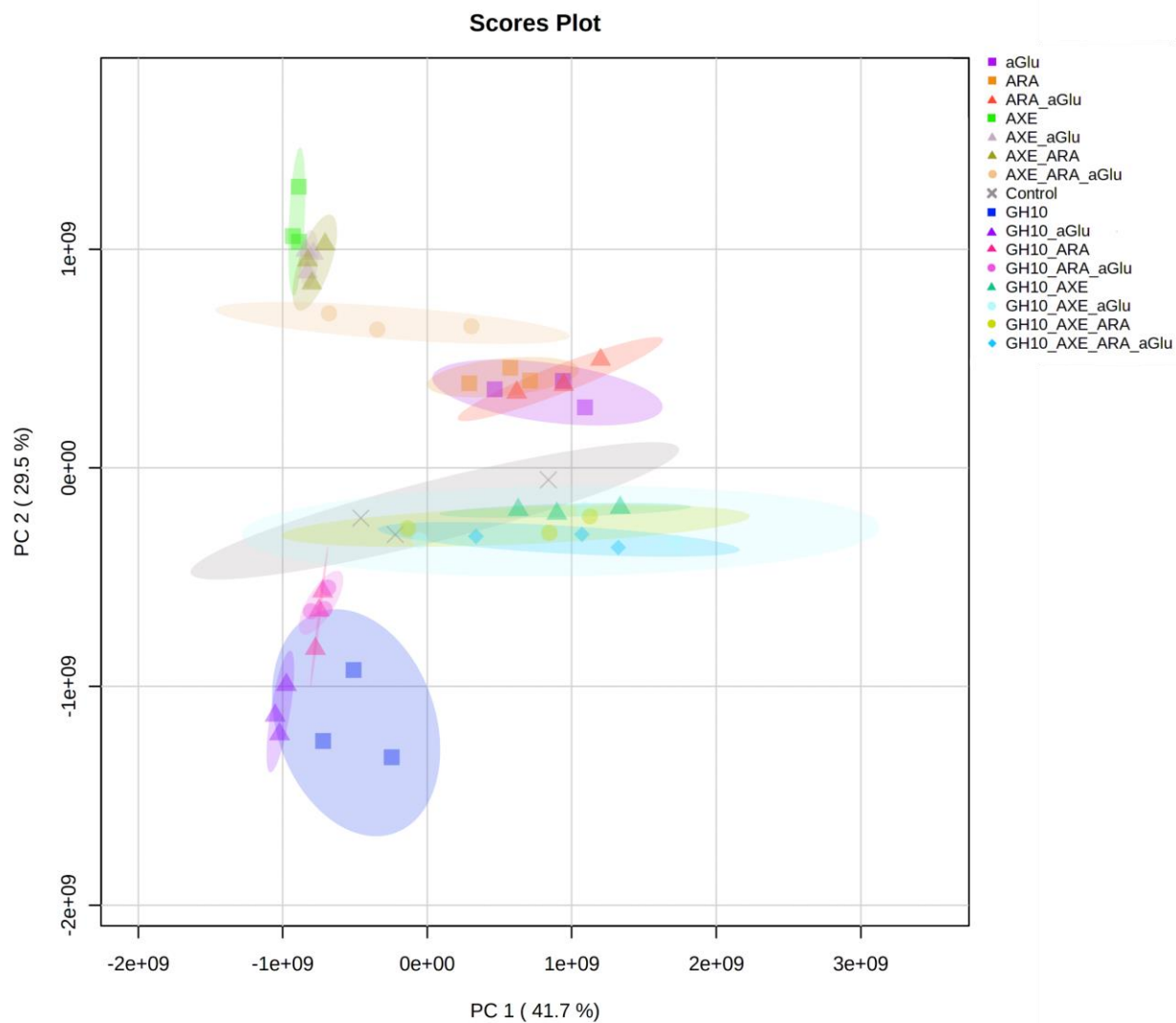
**Figura 31.** *Boxplot* dos íons de pentoses ramificadas com acetilações na fração DMSO, mostrando ação da enzima acetil xilano esterase. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.

#### 4.3.2.2 Fração pós clorito

Semelhante à fração DMSO, a fração pós clorito mostrou separação entre grupos de amostras contendo ou não GH10 e grupos com ou sem AXE, mas a presença de ARA e  $\alpha$ Glu não mostrou efeito significativo para diferenciar entre as amostras. Os agrupamentos podem ser visualizados pelo dendrograma no material suplementar (Figura S5) e pelo gráfico de análise de componentes principais na Figura 32, com um grupo inferior contendo GH10, GH10+ARA, GH10+  $\alpha$ Glu e GH10+ARA+  $\alpha$ Glu, um grupo logo acima com GH10+AXE, GH10+AXE+ARA, GH10+AXE+  $\alpha$ Glu, GH10+AXE+ARA+  $\alpha$ Glu e o controle; um terceiro grupo mais acima consistindo em ARA,  $\alpha$ Glu e ARA+  $\alpha$ Glu e o grupo mais superior com as demais amostras contendo AXE.

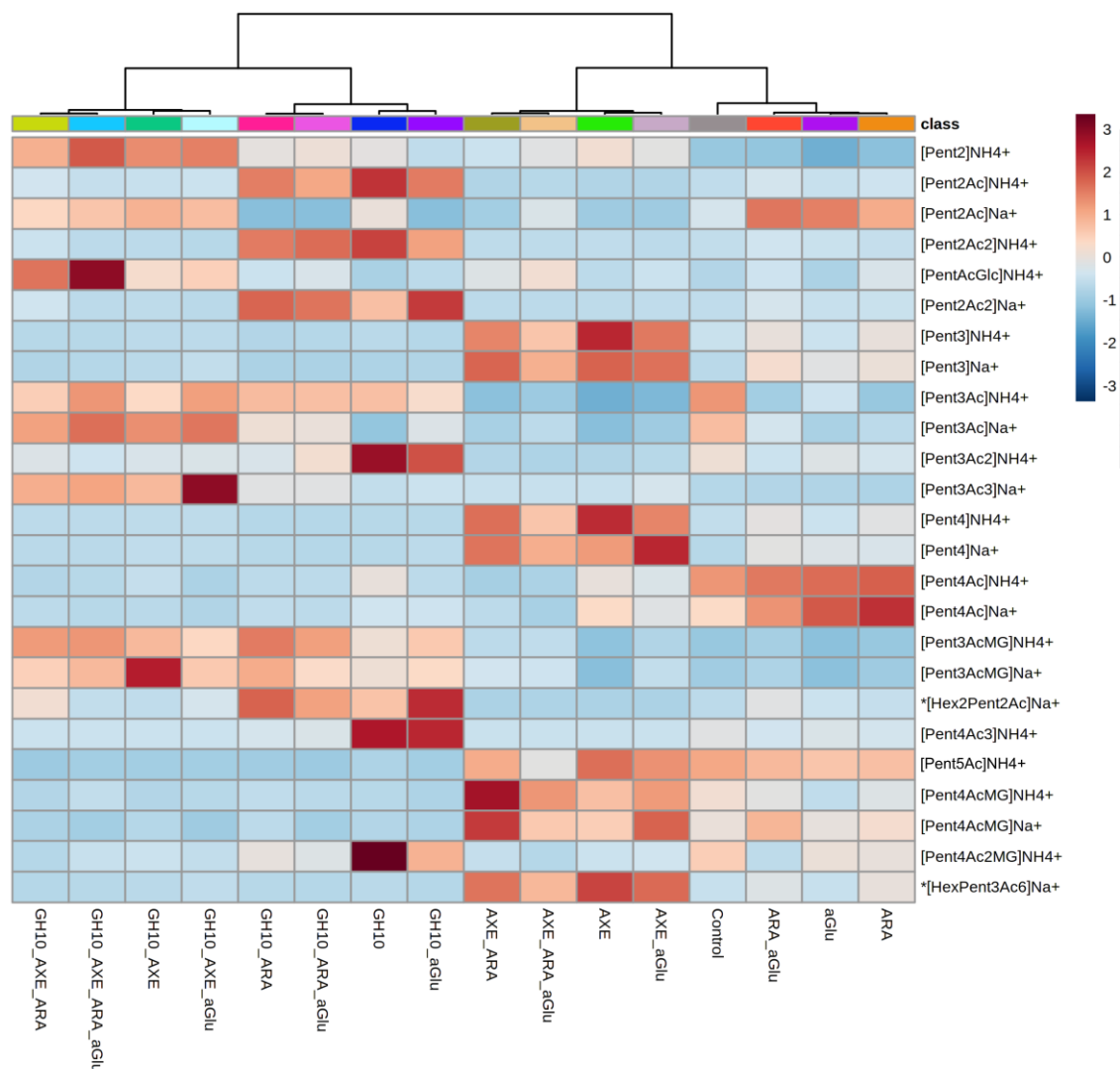
Para a fração pós clorito, os grupos se destacaram de forma mais clara do que para a fração DMSO, e esse destaque, principalmente na atividade da acetil xilano esterase, da GH10 e do conjunto delas, pôde ser visto no *heatmap* das amostras contra os íons identificados (Figura 33) e nos *boxplots* da Figura 34 com estruturas contendo acetilações ausentes nas amostras contendo AXE, e as estruturas menores e acetiladas que aparecem na presença de GH10 e também têm os grupos acetil removidos na presença conjunta de AXE. As únicas exceções foram Pent3Ac e Pent3Ac3, onde não se observou menor intensidade na presença da esterase.

A ação da  $\alpha$ Glu não pôde ser observada (Figura 35), uma vez que as únicas estruturas com grupos metil glucurônico encontradas foram as recalcitrantes acetiladas (Pent3AcMG, Pent4AcMG e Pent4Ac2MG). Ainda assim, foi observado melhor obtenção de oligossacarídeos de cadeia menor e não ramificados – como Pent2 – com as combinações mais completas de enzimas (Figura 36).



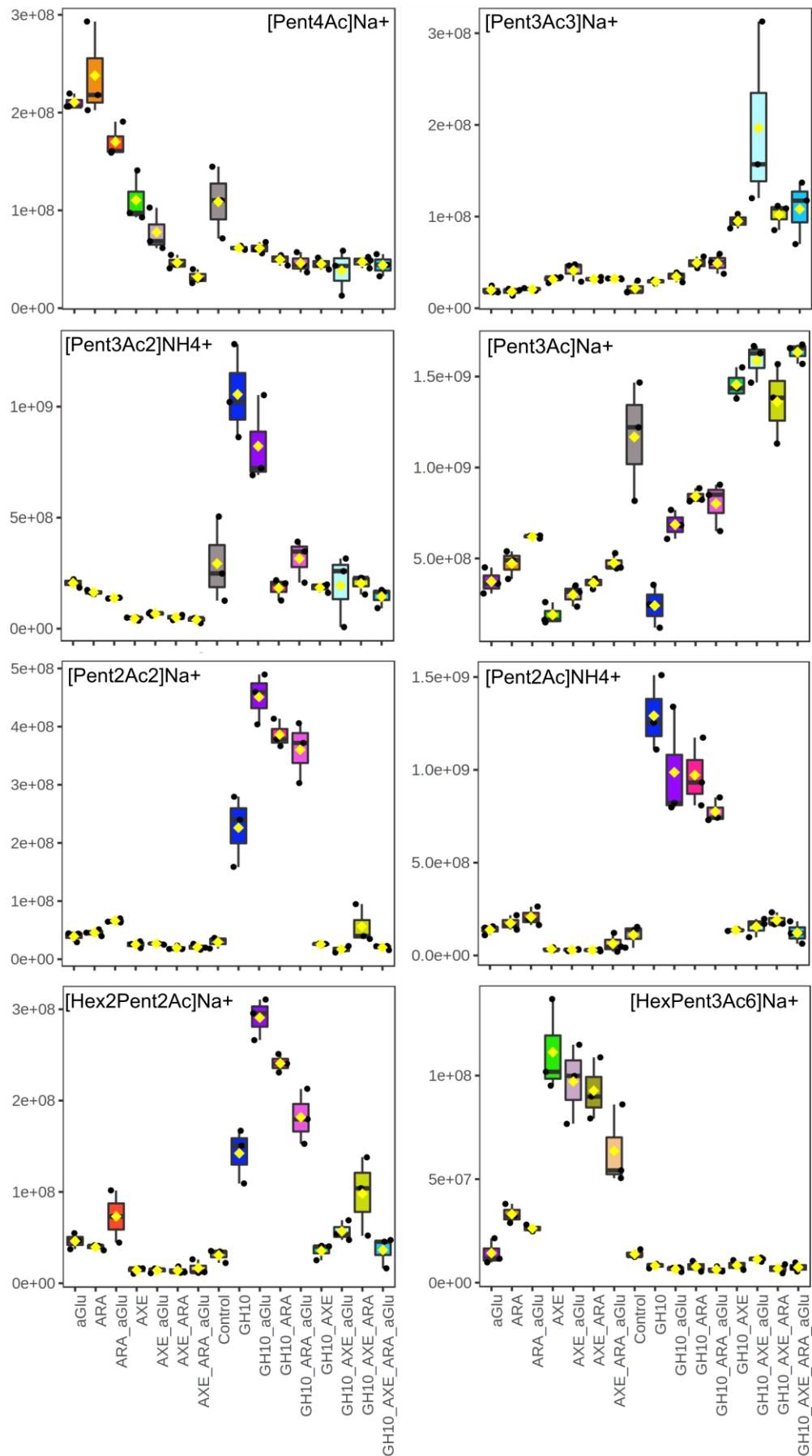
**Figura 32.** Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst.



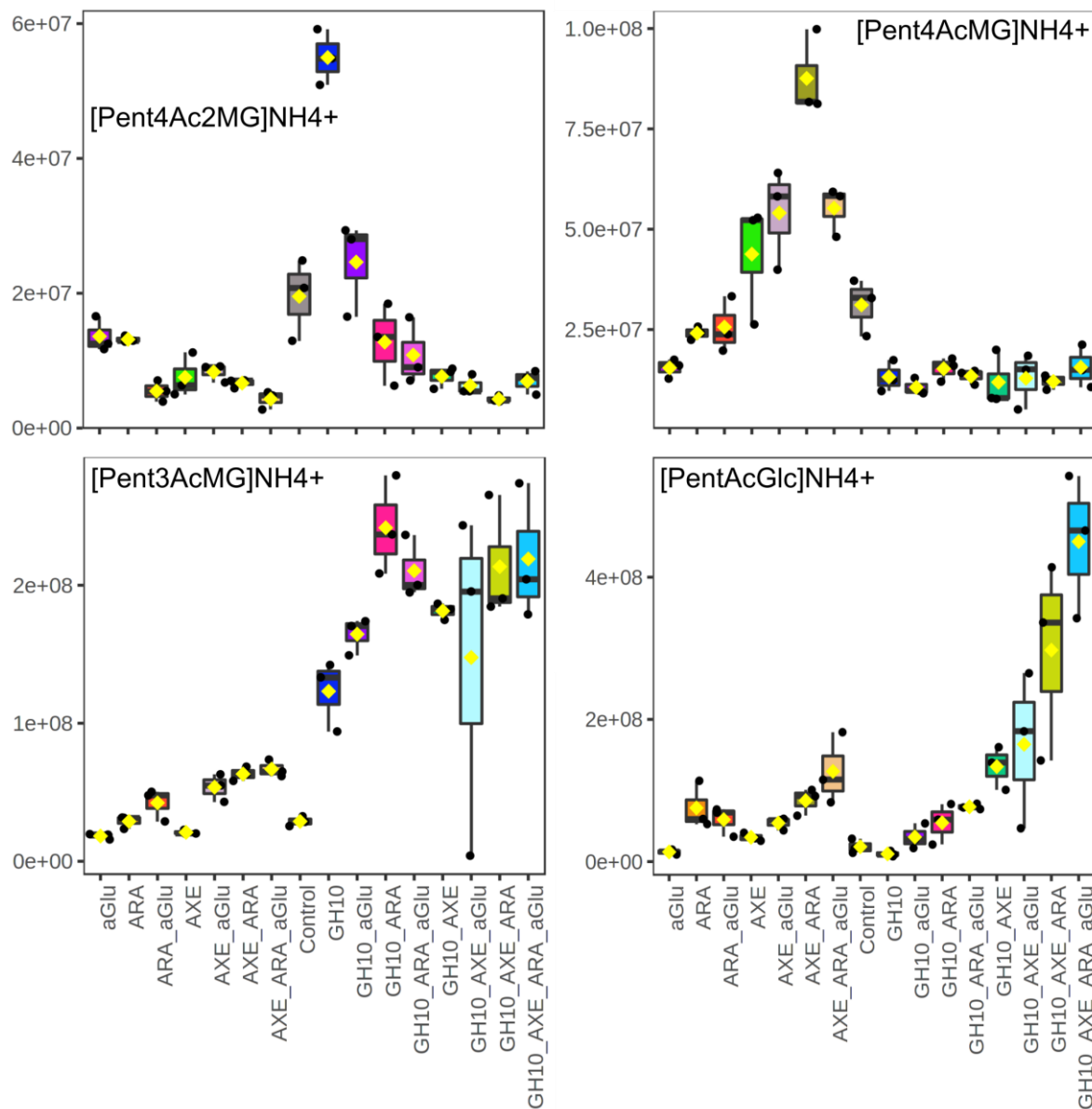


**Figura 33.** *Heatmap* dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito.

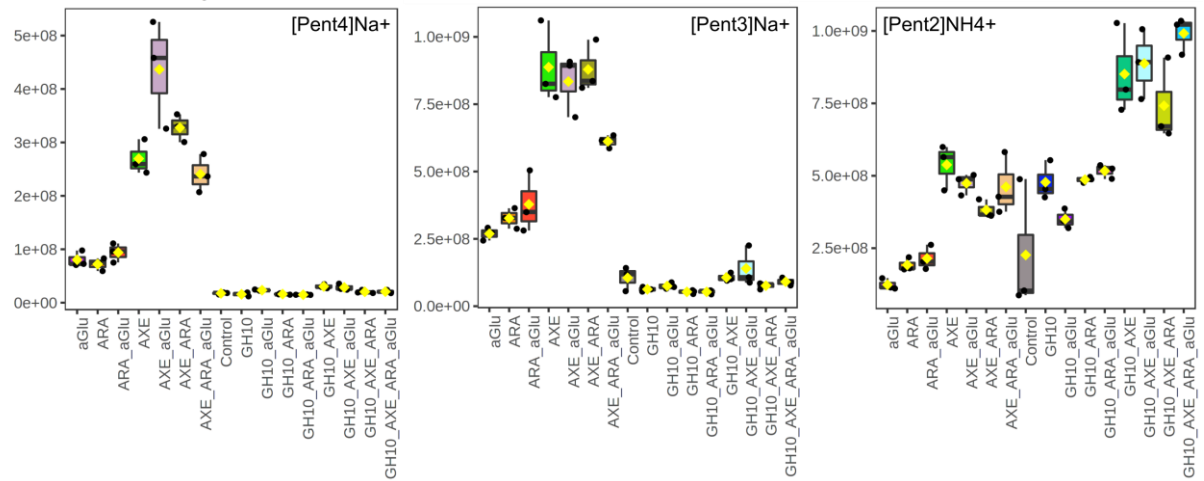
Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Pent = pentose, Hex = hexose, Ac = acetato, MG = ácido metil glucurônico, Glc = ácido glucurônico. Números que seguem as abreviações indicam quantidade desta estrutura. \* Íons anotados com incerteza sobre estrutura.



**Figura 34.** *Boxplot* dos íons de pentoses ramificadas com acetilações na fração pós clorito, mostrando ação da enzima acetil xilano esterase. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.



**Figura 35.** *Boxplot* dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração pós clorito. Mostra que a presença de acetilações ou grupos grandes impedem ação da glucuronidase. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.



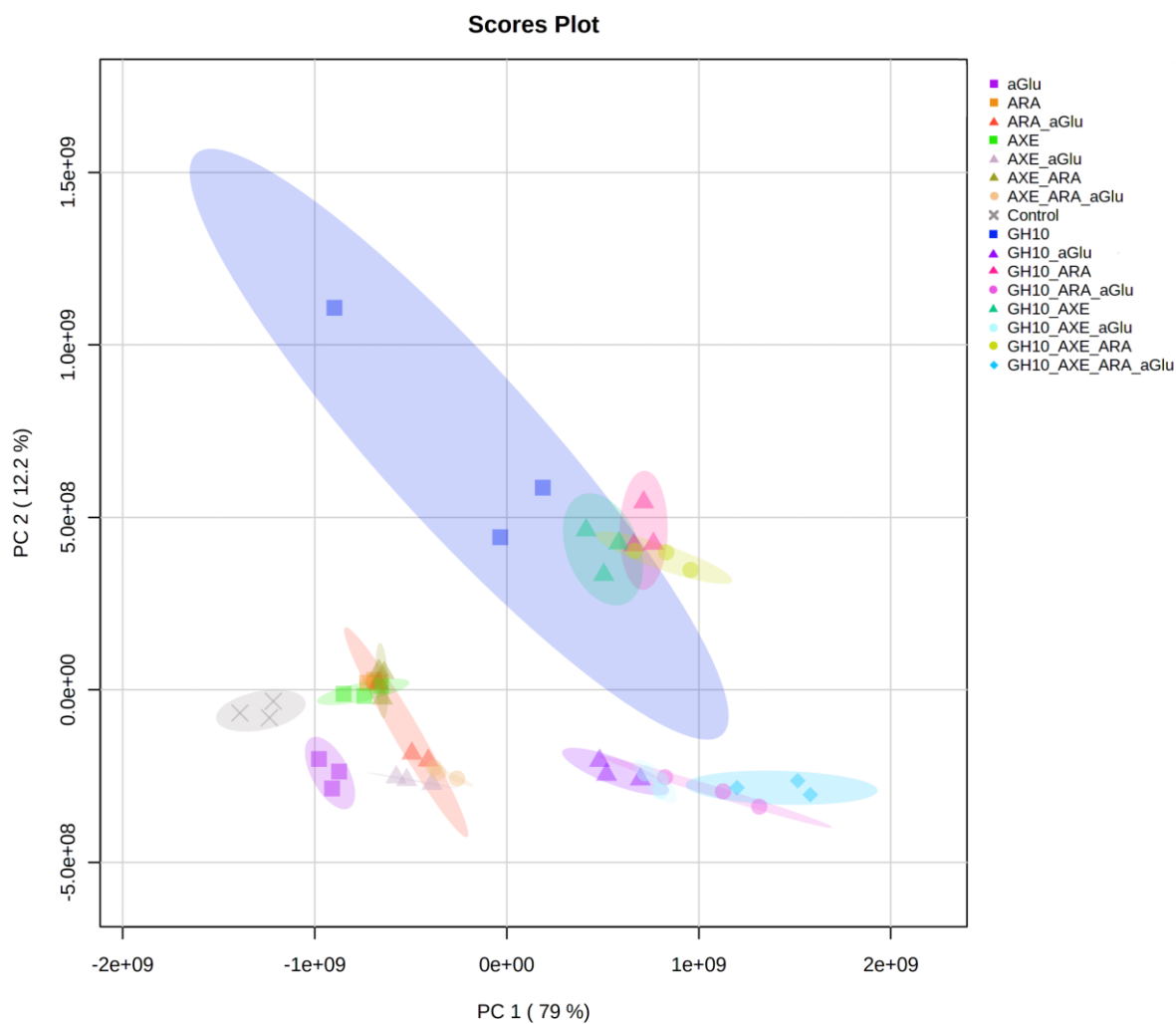
**Figura 36.** *Boxplot* dos íons de pentoses não decoradas na fração pós clorito, mostrando que a atividade da xilanase 10 favorece a hidrólise em estruturas menores, assim como a adição das demais enzimas acessórias em conjunto. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.

#### 4.3.2.2.3 Fração NaOH

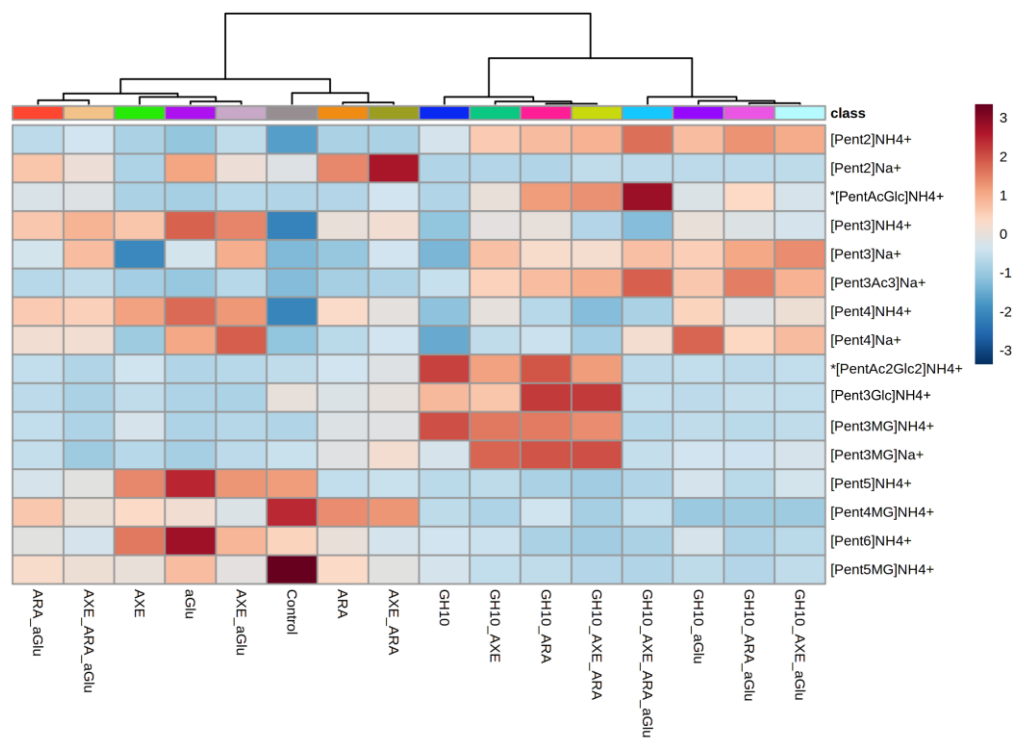
Devido ao tratamento químico extremamente alcalino feito para obter esta fração, que remove todas as ramificações ligadas por ligações éster, como acetilações e compostos fenólicos, não houve detecção da atividade acetil xilana esterase para este substrato e, por isso, a separação das amostras em grupos ocorreu de forma diferente comparada às frações anteriores, não havendo a contribuição da presença da enzima AXE. Além da importância da atividade xilanolítica da GH10, responsável pela primeira separação de grupos de mostras, a atividade  $\alpha$ -glucuronidase foi o segundo fator mais importante para diferenciação pelos produtos de hidrólise detectados. O PCA (Figura 37) mostra o grupo superior composto por GH10, GH10+AXE, GH10+ARA e GH10+AXE+ARA, o grupo inferior direito contendo amostras das combinações GH10+ $\alpha$ Glu, GH10+ARA+  $\alpha$ Glu, GH10+AXE+  $\alpha$ Glu e GH10+AXE+ARA+  $\alpha$ Glu e no canto inferior esquerdo o controle levemente deslocado de AXE, ARA e AXE+ARA e acima de AXE+  $\alpha$ Glu, ARA+  $\alpha$ Glu e AXE+ARA+  $\alpha$ Glu e, um pouco mais à esquerda, as amostras contendo apenas  $\alpha$ Glu. O dendrograma da Figura S6 do material suplementar mostra a separação de cada amostra de forma mais detalhada.

Esses grupamentos são explicados pelo *heatmap* (Figura 38), com amostras contendo GH10+ $\alpha$ Glu não apresentarem íons com ramificação metil glucurônico (MG) ou glucurônico (Glc), criando clara diferença com as amostras contendo GH10 mas ausentes de  $\alpha$ Glu (também observado nos *boxplots* da figura 39), enquanto que as amostras com  $\alpha$ Glu sem GH10 não foram tão eficientes em remover essas ramificações dos oligossacarídeos de cadeia maior (pent4MG e Pent5MG), comprovando que a  $\alpha$ -glucuronidase GH67 aqui estudada atua melhor nas cadeias ramificadas mais curtas. As poucas acetilações encontradas foram junto de grupos glucurônico ou na estrutura Pent3Ac3 e não puderam ser removidas, sendo PentAcGlc também recalcitrante na presença da glucuronidase (Figura 39)

A fração NaOH também se destaca das demais pela menor faixa de tamanho das cadeias, estruturas indo de 1 a 6 pentoses (com ou sem ramificações) – fato que explica a menor diferença entre medidas de açúcares redutores – e ausência das acetilações, exceto pelas prováveis estruturas PentAcGlc, PentAc2Glc2 e Pent3Ac3, que não foram totalmente recalcitrantes. Assim, este substrato foi o que mostrou estruturas mais acessíveis para o conjunto de enzimas utilizado, obtendo mais dos xilooligossacarídeos menores e não ramificados (Pent3 e Pent2) quando utilizado as combinações mais completas de enzimas (Figura 40).

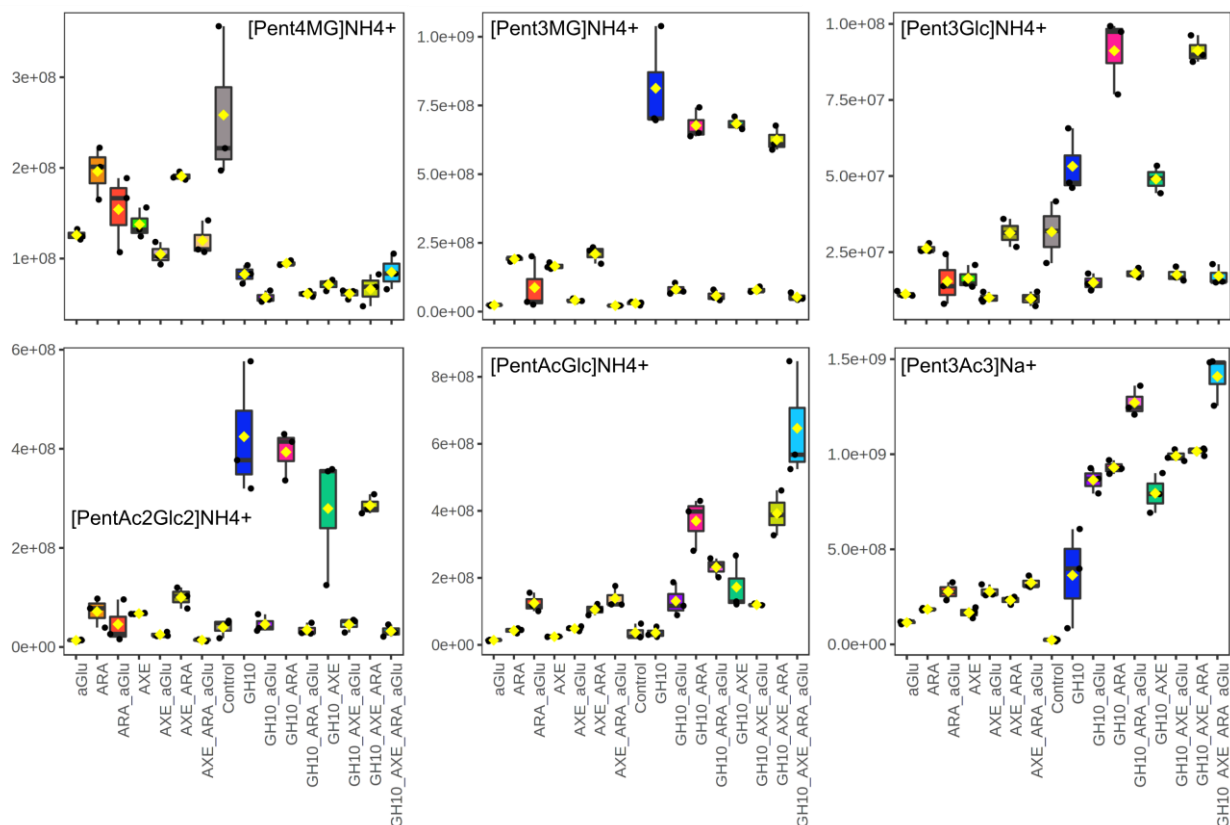


**Figura 37.** Gráfico de análise de componentes principais dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração NaOH. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst.



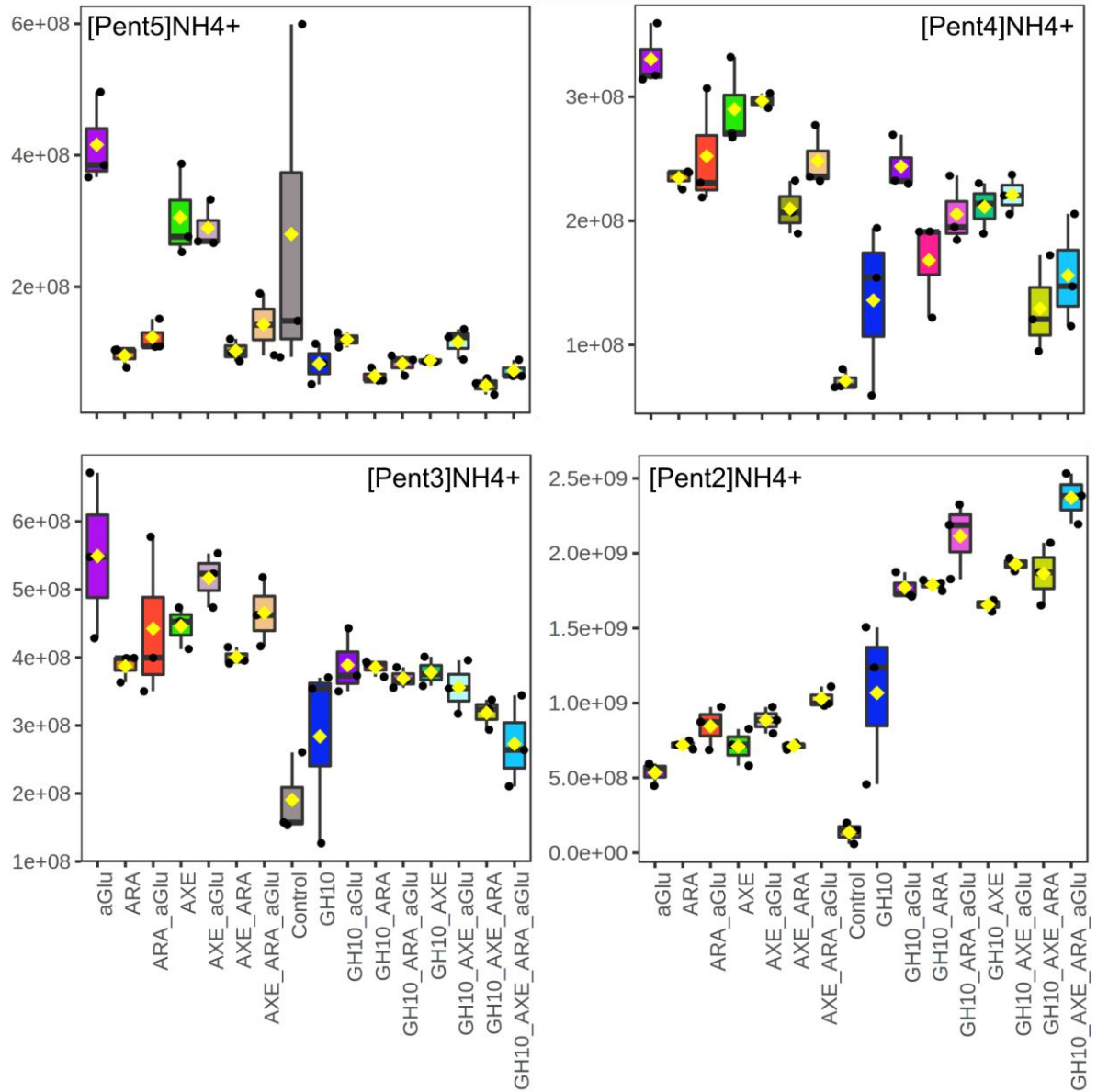
**Figura 38.** Heatmap dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito.

Agrupado pelas médias das triplicatas de cada combinação. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Pent = pentose, Hex = hexose, Ac = acetato, MG = ácido metil glucurônico, Glc = ácido glucurônico. Números que seguem as abreviações indicam quantidade desta estrutura. \* Íons anotados com incerteza sobre estrutura.



**Figura 39.** *Boxplot* dos íons de pentoses ramificadas com ácido metil glucurônico e glucurônico na fração NaOH e as três estruturas provavelmente acetiladas encontradas – PentAc2Glc2, PentAcGlc e Pent3Ac3. Mostra que houve ação glucuronidase tanto contra grupos glucurônico e metil glucurônico e provável remoção de um dos grupos glucurônico em PentAc2Glc2, sendo melhor na presença de GH10 e nas cadeias curtas. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.





**Figura 40.** *Boxplot* dos íons de pentoses sem decorações na fração NaOH, mostrando que a atividade da xilanase 10 favorece a hidrólise em estruturas menores, assim como a adição das demais enzimas acessórias em conjunto. Intensidade dos íons no eixo das ordenadas.

## 5 CONCLUSÃO ENSAIOS DE COMBINAÇÕES ENZIMÁTICAS CONTRA ARABINOXILANOS EXTRAÍDOS DA CANA DE AÇÚCAR

As enzimas foram expressas e purificadas de forma simples, não havendo formação de corpos de inclusão, precipitações nem a necessidade de realização de outras etapas para re-novelamento ou purificações além da afinidade por níquel. Todas as enzimas apresentaram-se ativas nas condições experimentais, inclusive a acetil xilano esterase, que teve sua atividade comprovada nos ensaios de espectrometria de massas, sendo capaz de remover de forma eficaz as acetilações.

As frações extraídas de diferentes formas do bagaço de cana de açúcar são compostas principalmente de xiloses e arabinoses, com quantidade ínfima de glicose presente, indicando que as extrações foram assertivas na obtenção de frações arabinoxilanas e não houve contaminação de outras estruturas. Além disso, mostraram comportamentos distintos quando tratados com os mesmos conjuntos de enzimas xilanolíticas, mesmo apresentando composição de monossacarídeos muito semelhantes, o que indica que a organização e disponibilidade das estruturas é modificada, evidenciando a importância do pré-tratamento escolhido para posterior aplicação de coquetéis enzimáticos.

A fração pós clorito, contendo ainda ligações entre celulose e hemicelulose, foi a mais recalcitrante, sendo a ação das enzimas limitada às poucas porções que provavelmente foram expostas e ganhando destaque pela grande quantidade de acetilações, que certamente contribuíram para a dificuldade na hidrólise mais completa e baixa leitura de açúcares redutores, em especial com a xilanase 11, que foi praticamente inativa neste substrato.

A fração DMSO, apesar de mais acessível às enzimas – principalmente à  $\alpha$ Glu – e conter a maior composição de xilose, mostrou ainda algumas estruturas recalcitrantes para o conjunto de enzimas escolhido, além de apresentar mais oligossacarídeos com grau de polimerização maior ( $GP > 5$ ) do que as demais frações e ainda conter muitas acetilações, que impedem a ação completa da glucuronidase e, por consequência, dificultam a obtenção de xilooligossacarídeos de cadeia curta e não ramificados. Apesar de sua obtenção ser semelhante à da fração pós clorito, a etapa de extração com DMSO e posterior precipitação em etanol certamente selecionou estruturas diferentes, removendo mais as ligações com celulose e mantendo provavelmente cadeias longas de xilano com algumas porções mais ramificadas que outras – em especial acetilações. Essa provável característica diversificada resultou em certa dificuldade na interpretação dos produtos de hidrólise obtidos, principalmente pelo fato de não ter sido possível observar um aumento claro na produção de xilooligossacarídeos menores e não decorados com o conjunto mais completo de enzimas, como ocorreu nas demais frações.

A fração mais acessível foi a que recebeu tratamento alcalino – NaOH – resultando em um arabinosilano sem acetilações, com composição mais homogênea, cadeias de xilano menores e poucas estruturas recalcitrantes. Com este substrato, foi possível verificar a ação da enzima glucuronidase de forma mais clara e observou-se a melhor obtenção de estruturas mais simples e maior leitura de açúcares redutores com o uso das combinações contendo as xilanases, em especial a GH10, junto de ARA e  $\alpha$ Glu. Sendo assim, o pré-tratamento alcalino seria o mais indicado para obtenção de XOS de cadeia curta e não ramificados.

Quanto à ação das enzimas, a acetil xilano esterase se destacou por ser eficaz nos dois arabinosilanos acetilados, sendo de grande importância na hidrólise completa e impedida apenas por algumas estruturas recalcitrantes contendo grupos metil glucurônico ou glucurônico ou com muitas acetilações, como em Pent3Ac3. A  $\alpha$ - glucuronidase GH67, apesar de ser capaz de remover ramificações de ácidos glucurônico e metil glucurônico, é muito mais sensível à estrutura, como localização da ramificação na cadeia principal, tamanho da cadeia e grupos vizinhos, sendo altamente dependente do auxílio da atividade da xilanase 10, grande responsável pela obtenção dos produtos de hidrólise mais completa. A arabinofuranosidase mostrou ser cooperativa em algumas combinações com AXE e  $\alpha$ Glu, provavelmente por eliminar impedimentos estruturais causados pela ramificação de arabinose, mas, como os substratos continham baixos teores deste monossacarídeo, não se pode concluir muito sobre sua ação.

Entre as xilanases, a GH10 foi de grande importância para obter melhor hidrólise, atuando em cooperação com as enzimas acessórias e até mesmo com a GH11, sendo capaz de hidrolisar em regiões mais decoradas e recalcitrantes. Além disso, as atividades das xilanases foram um grande guia para compreender a estrutura e organização dos substratos estudados, com atividade GH10 maior indicando regiões contendo mais ramificações e melhor atividade GH11 apontando para a presença de cadeias longas de xilose com poucas decorações e/ou ligações cruzadas, o que permitiu concluir que a fração DMSO deve conter porções de xilano pouco ramificado, onde a xilanase 11 foi mais ativa, com produtos de hidrólise mais longos; e outra porção mais recalcitrante e ramificada, onde a GH10 atuou melhor, produzindo XOS substrato para AXE e  $\alpha$ Glu.

De forma geral, as melhores combinações enzimáticas continham as xilanases – principalmente GH10, com AXE e/ou  $\alpha$ Glu, dependendo de substrato conter ou não acetilações. Apesar de não haver evidência de atividade sinérgica entre as enzimas utilizadas, houve sim clara cooperação, com a xilanase 10 sendo essencial para ação mais eficaz das demais enzimas.

## 6 RESULTADOS CARACTERIZAÇÃO FERULOIL ESTERASE

### 6.1 Caracterização bioquímica e biofísica da enzima feruloil esterase de *Thermobacillus xylanilyticus*

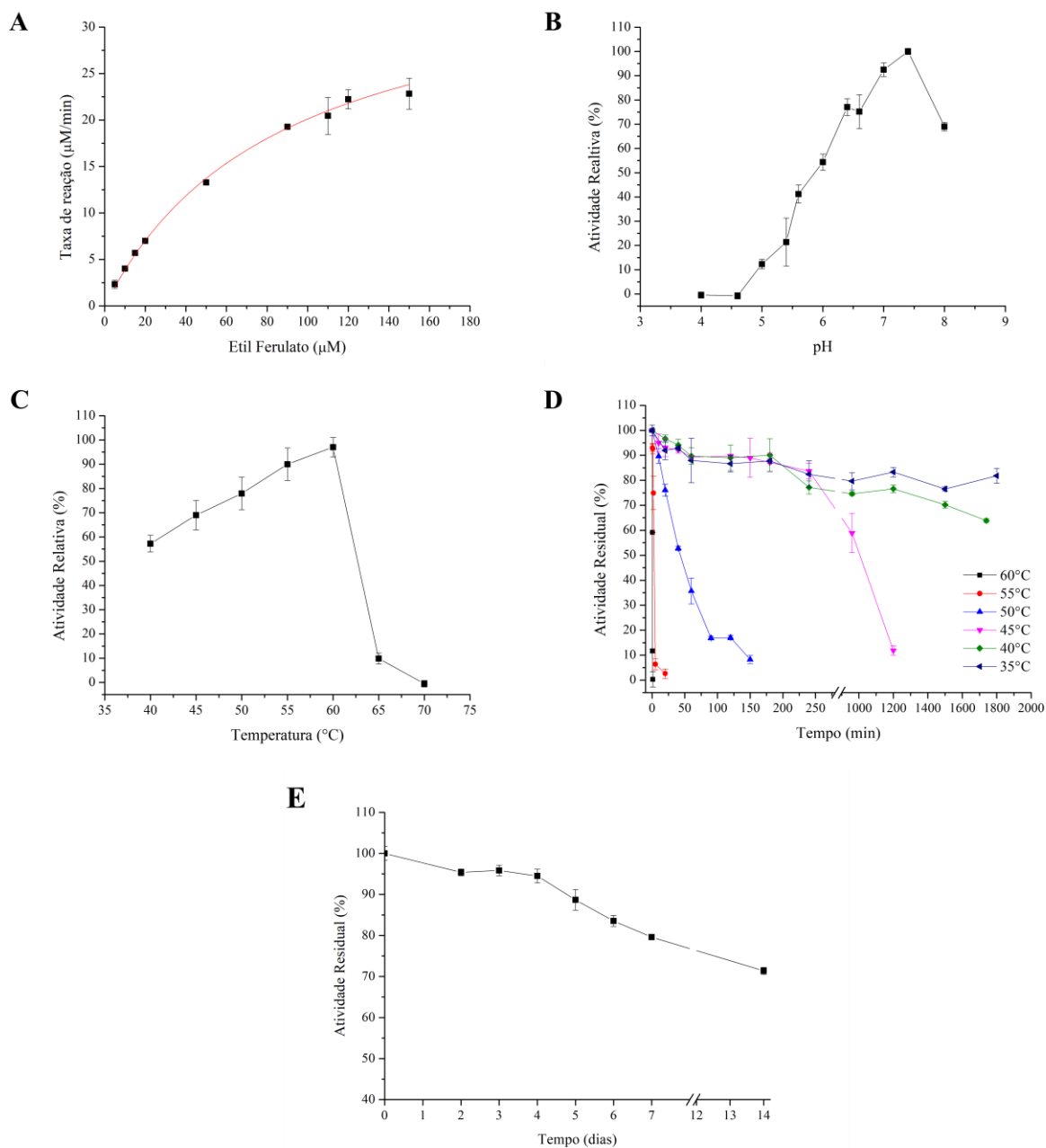
A enzima feruloil esterase (FAE) de *Thermobacillus xylanilyticus* apresentou atividade específica de  $29,20 \pm 2,90 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,  $K_M$  de  $0,09 \pm 0,02 \text{ mM}$  e eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) de  $393,70 \pm 9,80 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$  contra o substrato sintético etil ferulato. O valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) para o etil ferulato, foi comparável com os valores descritos na literatura para os substratos sintéticos metil ferulato, metil sinapinato, metil *p*-coumarato e *p*NP acetato, e eficiência catalítica 2, 3, 44 e 3x, respectivamente. A atividade específica em etil ferulato foi comparável à descrita para metil ferulato e 5, 15, 8 e 8x maior em comparação com os respectivos substratos citados anteriormente (RAKOTOARIVONINA et al., 2011), conforme resumido na tabela 5.

**Tabela 5.** Dados comparativos de atividade da enzima Feruloil esterase contra diversos substratos sintéticos

<i>Substrato</i>	$K_M$ (mM)	$K_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ )	<i>Aktividade Específica</i> ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ proteína}$ )
Metil ferulato *	$0,11 \pm 0,02$	$130,84 \pm 9,80$	$25,41 \pm 0,41$
Metil sinapinato *	$0,10 \pm 0,01$	$198,05 \pm 10,22$	$6,32 \pm 0,36$
Metil <i>p</i> -coumarato *	$1,28 \pm 0,06$	$9,03 \pm 1,62$	$1,87 \pm 0,05$
<i>p</i> NP-acetato *	$1,21 \pm 0,12$	$122,41 \pm 13,14$	$3,87 \pm 0,27$
<b>Etil ferulato</b>	<b><math>0,09 \pm 0,02</math></b>	<b><math>393,70 \pm 9,80</math></b>	<b><math>29,20 \pm 2,90</math></b>

\* Dados de (RAKOTOARIVONINA et al., 2011)

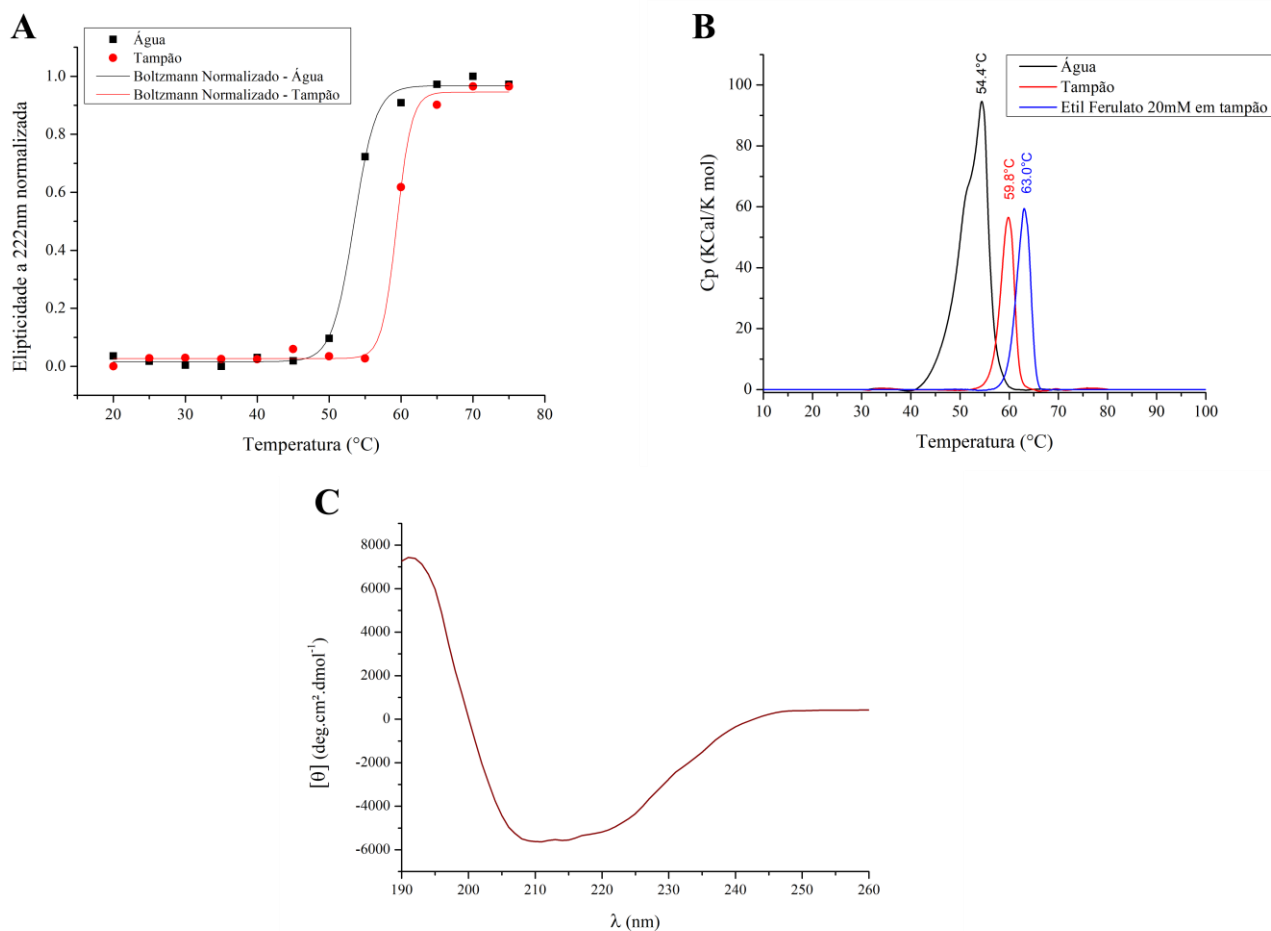
Neste substrato, a enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 7,4 e 60 °C, respectivamente, mantendo mais de 50% de atividade na faixa de pH entre 6,0 e 8,0 e temperaturas na faixa de 40 a 60 °C (Figura 41B e C). Quando exposta a temperaturas acima de 50 °C, a enzima perdeu rapidamente atividade, mas abaixo disso, apresentou-se bem estável, mantendo mais de 60% de sua atividade após incubação por 16h a 45 °C e 30h a 40 e 35 °C (Figura 41D), além de ter retido mais de 70% de atividade após 14 dias exposta a temperatura ambiente em bancada (Figura 41E).



**Figura 41.** Caracterização bioquímica a enzima FAE contra etil ferulato. O efeito da concentração de etil ferulato na catálise segue a cinética de Michaelis-Menten (o melhor ajuste para a equação de Michaelis-Menten é mostrado pela linha vermelha) (A). Determinação da pH (B) e temperatura (C) ótimos. Ensaio de termo estabilidade (D) e estabilidade de bancada (E).

A baixa estabilidade em temperaturas acima de 50 °C, mas temperatura ótima a 60 °C pôde ser explicada pela desnaturação a 54 °C em solução aquosa, mas aumento da estabilidade estrutural na presença do tampão e substrato, com  $T_m$  de 60 e 63 °C, respectivamente (Figura 42 A e B e Tabela 6), indicando que houve a desnaturação na incubação para os ensaios de estabilidade, pois nestes a enzima estava apenas suspensa em água, enquanto que nas reações de temperatura ótima, a enzima estava já na presença do substrato e tampão de reação, que conferiram estabilidade estrutural.

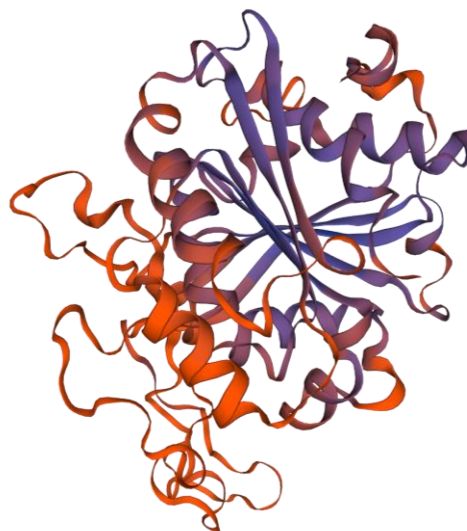
O espectro de dicroísmo circular da proteína (Figura 42C) mostrou estrutura secundária organizada e o diagnóstico dado pelo software DichroWeb mostrou presença principalmente de hélices  $\alpha$  e estruturas desordenadas (30,3% para ambas), seguido de folhas  $\beta$  (22,1%) e voltas (17,5%), condizendo com a estrutura secundária predita pelo SwissModel (Figura 43), que mostrou modelo contendo algumas folhas  $\beta$  centrais, rodeadas por hélices  $\alpha$  e, mais externamente, estruturas desordenadas com pouca confiança de localização.



**Figura 42.** (A) Ajuste da curva de Boltzmann dos dados normalizados de dicroísmo circular para a desnaturação da enzima FAE em água (preto) e tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M) pH 7,4 (vermelho) e (B) picos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a enzima FAE em água (preto), tampão McIlvine (citrato-fosfato 0,2 M) pH 7,4 (vermelho) e etil ferulato 20 mM em tampão. Perfil de espectroscopia CD da enzima FAE em água a 25 °C (C)

**Tabela 6.** Parâmetros termodinâmicos obtidos da análise dos dados de espectroscopia de dicroísmo circular e calorimetria diferencial de varredura

	Espectroscopia CD		DSC		
	Concentração de enzima (mg·mL <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	Concentração de enzima (mg·mL <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH (Kcal·mol <sup>-1</sup> )
Est em água	0,140	53,45 ± 0,21	1,05	54,4	636,12
Est em tampão McIlvine pH 7,4	0,157	59,40 ± 0,26	1,05	59,8	208,33
Est com etil ferulato 20 mM em tampão McIlvine pH 7,4	-	-	1,05	63,0	213,4



**Figura 43.** Modelo de estrutura com gradiente de confiança para enzima Feruloil Esterase de *Thermobacillus xylanilyticus*. Modelo gerado pela plataforma SwissModel a partir da sequência cadastrada no GenBank sob o código ADK73591.1.



## 7 CONCLUSÃO CARACTERIZAÇÃO FERULOIL ESTERASE

A enzima feruloil esterase de *Thermobacillus xylanilyticus* foi expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade com sucesso, apresentando bom rendimento em fração solúvel. O substrato sintético etil ferulato se mostrou bom substrato para a enzima, apresentando eficiência catalítica melhor do que para os demais substratos sintéticos que já haviam sido testados na literatura. A enzima mostrou atividade em uma faixa de temperatura que permite o trabalho em conjunto com demais enzimas de degradação da biomassa e até mesmo com organismos vivos (como em fermentadores), já que ainda mantém boa atividade abaixo de 50°C. Sua estabilidade estrutural em temperaturas amenas (abaixo de 45°C) e capacidade de manter atividade por mais de 6 meses quando estocada em geladeira (-4°C) e por 2 semanas em temperatura ambiente em bancada, facilitam seu manuseio e possibilitam redução de gastos realizando estoques e eliminando a necessidade de se produzir quantidades reduzidas para uso imediato.

Além disso, pelo que se sabe, foi realizado pela primeira vez a caracterização biofísica desta proteína, juntamente de caracterização bioquímica mais completa. Esses dados foram submetidos para publicação em colaboração com a Universidade de Manchester (artigo anexado), onde mostramos também a possibilidade do uso desta enzima na obtenção de ácido ferúlico a partir de oligossacarídeos ramificados com ácido ferúlico obtidos do farelo de trigo sem amido, observando-se sua capacidade de acomodar substratos de estruturas diferentes – podendo ser cadeias de xiloses com diferentes graus de polimerização com apenas uma arabinose  $\alpha$ -1,3 ligada esterificada com ácido ferúlico ou ainda com dupla ramificação de arabinose  $\alpha$ -1,2/  $\alpha$ -1,3 ligadas.

A FAE também foi capaz de liberar ácido ferúlico de substratos naturais complexos obtidos do trigo, como arabinoxilano insolúvel, arabinoxilano tratado com ácido e diretamente da matriz de polímeros da parede celular de farelo de trigo, revelando ainda possível sinergia com xilanase GH11 para aumentar a produção de ácido ferúlico. Em substratos poliméricos como bagaço de cana de açúcar tratado com clorito de sódio e palha de trigo, a feruloil esterase não apresentou atividade, o que pôde ser relacionado com o acesso restringido ou solubilidade diminuída pelo conteúdo elevado de lignina – 25 a 32% e 21%, respectivamente – comparado a 3% no caso do farelo de trigo (LEQUART et al., 1999; ZENG et al., 2014).

Este conjunto de dados indica o potencial que esta enzima tem na aplicação industrial para obtenção de ácido ferúlico a partir de biomassa lignocelulósica ou oligossacarídeos extraídos dela, e abre caminho para futuros estudos, uma vez que se trata de uma enzima de

fácil expressão e bom rendimento em sistema *E. coli*, facilmente purificada por cromatografia de afinidade, com estrutura estável e com atividade flexível para substratos poliméricos e oligoméricos com diferentes organizações estruturais.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

- As enzimas recombinantes  $\alpha$ -glucuronidase, acetil xilano esterase, feruloil esterase e xilanases GH10 e GH11 e arabinofuranosidase foram transformadas em *E. coli*, expressas e purificadas, observando-se bandas puras nos géis SDS-PAGE.

- A fração xilana extraída por DMSO foi obtida, com rendimento de aproximadamente 6% e análises de composição mostraram que tanto a fração extraída quanto as cedidas tiveram composição de açúcares semelhante, sendo caracterizadas como arabinoxilanas. As frações não apresentaram conteúdo de fenólicos, de modo que, para as combinações enzimáticas, a feruloil esterase foi excluída.

- A metodologia analítica desenvolvida uniu análises de açúcares redutores e HILIC-MS e mostrou resultados interessantes quanto a composição e ação enzimática nas frações arabinoxilanas extraídas – destacando para a diferença no perfil de produtos de hidrólise obtidos e acessibilidade enzimática para cada pré-tratamento realizado – e a importância, em todos os casos, da presença da xilanase GH10 para uma hidrólise mais completa, fornecendo substratos para as enzimas acessórias, em especial para a  $\alpha$ -glucuronidase.

- Os oligossacarídeos liberados foram caracterizados de acordo com suas razões massa/carga e, apesar de não haver resolução suficiente para diferenciação entre tipos de pentoses (xilose ou arabinose), os resultados obtidos foram suficientes para se obter conclusões sobre como cada enzima está agindo nas frações extraídas por diferentes pré-tratamentos.

- O substrato que passou pelo tratamento mais brando (fração pós clorito), foi o mais recalcitrante, com diversas ramificações e cujas estruturas não foram totalmente acessíveis às enzimas. Algo semelhante ocorreu na fração DMSO, que continha diversas acetilações, com a diferença que neste substrato foram observados possíveis regiões menos ramificadas. A fração NaOH, por fim, foi a que passou pelo pré-tratamento mais severo, removendo-se estruturas éster-ligadas, e apresentou maior acessibilidade para o conjunto de enzimas utilizado, apontando para a importância das acetilações na recalcitrância da biomassa.

- A xilanase GH10 foi essencial para uma melhor hidrólise, sendo observado um efeito de cooperação desta com as demais enzimas, em especial a  $\alpha$ -glucuronidase. Apesar disso, não houve efeito sinérgico ou mesmo de inibição.

- A feruloil esterase, não sendo utilizada nos ensaios combinatórios, foi caracterizada bioquímica e biofisicamente, apresentando propriedades interessantes para aplicação industrial em substratos que contenham conteúdo fenólico, além de ter sido observado efeito de estabilização estrutural na presença de seu substrato/produto.

## 9 REFERÊNCIAS

ANTAR, M. et al. Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, n. December 2020, p. 110691, 2021.

BAJPAI, P. **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. Singapore: Springer Singapore, 2016.

BAUER, S. Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 45, 2012.

BERNIER, R. et al. **Isolation and Characterization of a Xylanase from *Bacillus subtilis*** **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>.

BIELY, P. et al. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1–3, p. 151–166, 1997.

BIELY, P. et al. Inverting character of  $\alpha$ -glucuronidase A from *Aspergillus tubingensis*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1474, n. 3, p. 360–364, 2000.

BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1575–1588, 2012.

BIELY, P. et al. Mode of action of acetylxylan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5075–5086, 2013.

BIELY, P.; MASTIHUBOVÁ, M.; PUCHART, V. The vicinal hydroxyl group is prerequisite for metal activation of *Clostridium thermocellum* acetylxylan esterase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 4, p. 565–570, 2007.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BOURGOIS, T. M. et al. Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: A GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1309–1317, 2007.

BRERETON, R. G. et al. Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 25, p. 5891–5899, 1 out. 2017.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231–247, 2012.

CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1–128, 2019.

CHURMS, S. C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. **Journal of Chromatography A**, v. 720, n. 1–2, p. 75–91, 1996.

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

DE SOUZA, A. P. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. Em: **Polysaccharides I**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 1–67.

FARHAT, W. et al. A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. **ChemSusChem**, v. 10, n. 2, p. 305–323, 2017.

FAULDS, C. B. What can feruloyl esterases do for us? **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 121–132, 2010.

FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 2010.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GLASS, N. L. et al. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013.

GOLAN, G. et al. Crystal Structures of *Geobacillus stearothermophilus*-Glucuronidase Complexed with Its Substrate and Products MECHANISTIC IMPLICATIONS\*□ S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 3014–3024, 2003.

GOWDA, H. et al. Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6931–6939, 2014.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HU, J.; SADDLER, J. N. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? **Biomass and Bioenergy**, v. 110, n. November 2017, p. 13–16, 2018.

KÄRKÄS, M. D. Lignin Hydrogenolysis: Improving Lignin Disassembly through Formaldehyde Stabilization. **ChemSusChem**, v. 10, n. 10, p. 2111–2115, 22 maio 2017.

KENNES, D. et al. Bioethanol production from biomass: Carbohydrate vs syngas fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 304–317, 2016.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. The past, present, and future of chemometrics worldwide: some etymological, linguistic, and bibliometric investigations. **Journal of Chemometrics**, v. 20, n. 6–7, p. 247–272, jun. 2006.

KORMELINK, F. J. M. et al. Purification and characterization of a (1,4)- $\beta$ -d-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. v. 35, n. 6, p. 753–758, 1991.

KORMELINK, F. J. M. et al. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 267–282, 1993.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377–391, 2008.

LAVINE, B.; WORKMAN, J. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4519–4531, 1 jun. 2008.

LEQUART, C. et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 319, n. 1–4, p. 102–111, 30 jun. 1999.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.

MAGALHÃES, A. I. et al. Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 6, p. 1505–1519, 2019.

MAHIEU, N. G.; GENENBACHER, J. L.; PATTI, G. J. A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 30, n. December 2015, p. 87–93, 2016.

MALGAS, S. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1–13, 2019.

MCCLEARY, B. V.; MCGEOUGH, P. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- $\beta$ -Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 5, p. 1152–1163, 2015.

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

MILNER, Y.; AVIGAD, G. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. **Carbohydrate Research**, v. 4, n. 4, p. 359–361, 1 jun. 1967.

MORAIS DE CARVALHO, D. et al. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, n. December 2018, p. 223–234, 2017.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Em: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] InTech, 2013.

MURAKAMI, M. T. et al. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). 2005.

NORTON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 03, n. 2, p. 375–380, 1944.

OLIVEIRA, D. M. et al. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. **Bioresource Technology**, v. 278, n. December 2018, p. 408–423, 2019.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009.

PITSON, S. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. **FEBS Letters**, v. 398, n. 1, p. 7–11, 1996.

PRATES, J. A. M. et al. The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. **Structure**, v. 9, n. 12, p. 1183–1190, 2001.

PUCHART, V.; ŠUCHOVÁ, K.; BIELY, P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. **Biotechnology Advances**, v. 47, n. September 2020, 2021.

RAKOTOARIVONINA, H. et al. A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 541–552, 2011.

RALET, M.-C. et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger* t. **Carbohydrate Research**, v. 263, p. 257–269, 1994.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

ROWLEY, J. et al. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. **Efficiency and Sustainability in Biofuel Production: Environmental and Land-Use Research**, p. 175–186, 2015.

RULLER, R. et al. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 9, 2006.

SAHA, B. C.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: Biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 403–423, 2000.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SHAO, W. et al. Purification and characterization of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485, an important enzyme for the utilization of substituted xylans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1077–1081, 1995.

SOCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.



SOMOGYI, M. NOTES ON SUGAR DETERMINATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19–23, mar. 1952.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 15 dez. 2000.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

TAYLOR, E. J. et al. Structure and Activity of Two Metal Ion-dependent Acetylxyylan Esterases Involved in Plant Cell Wall Degradation Reveals a Close Similarity to Peptidoglycan Deacetylases \*. 2006.

VAN LAERE, K. M. J.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. v. 47, n. 3, p. 231–235, 1997.

VANDERMARLIERE, E. et al. Structural analysis of a glycoside hydrolase family 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase in complex with xylotetraose reveals a different binding mechanism compared with other members of the same family. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 1, p. 39–47, 2009.

WEITZEL, K. et al. Bond-Dissociation Energies of Cations — Pushing the. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, n. i, p. 221–235, 2011.

XUE, J. L. et al. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 130–138, 2016.

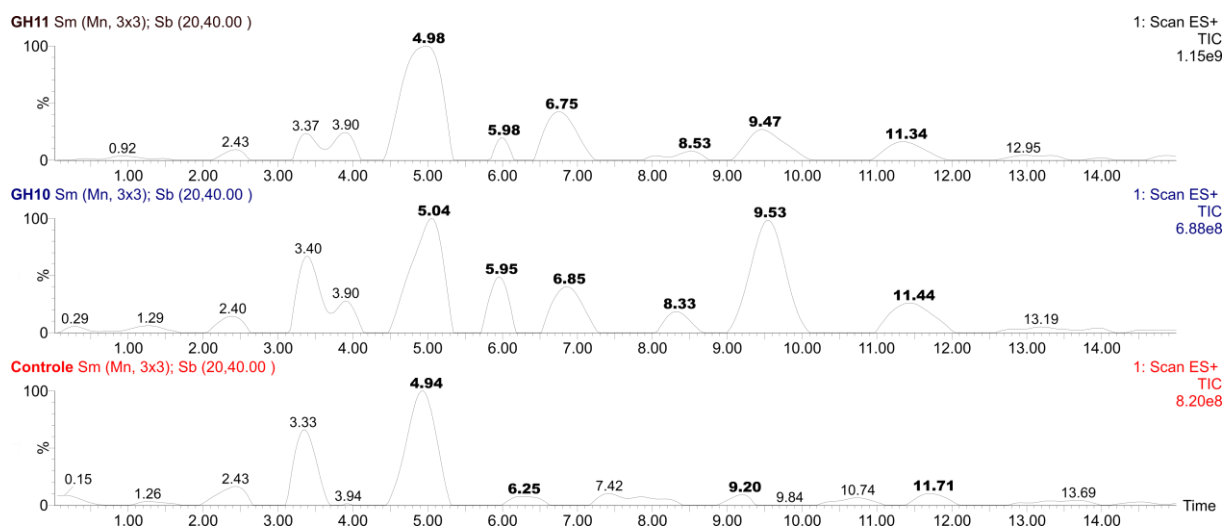
YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016.

ZAIDE, G. et al. Biochemical characterization and identification of catalytic residues in  $\alpha$ -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 10, p. 3006–3016, 2001.

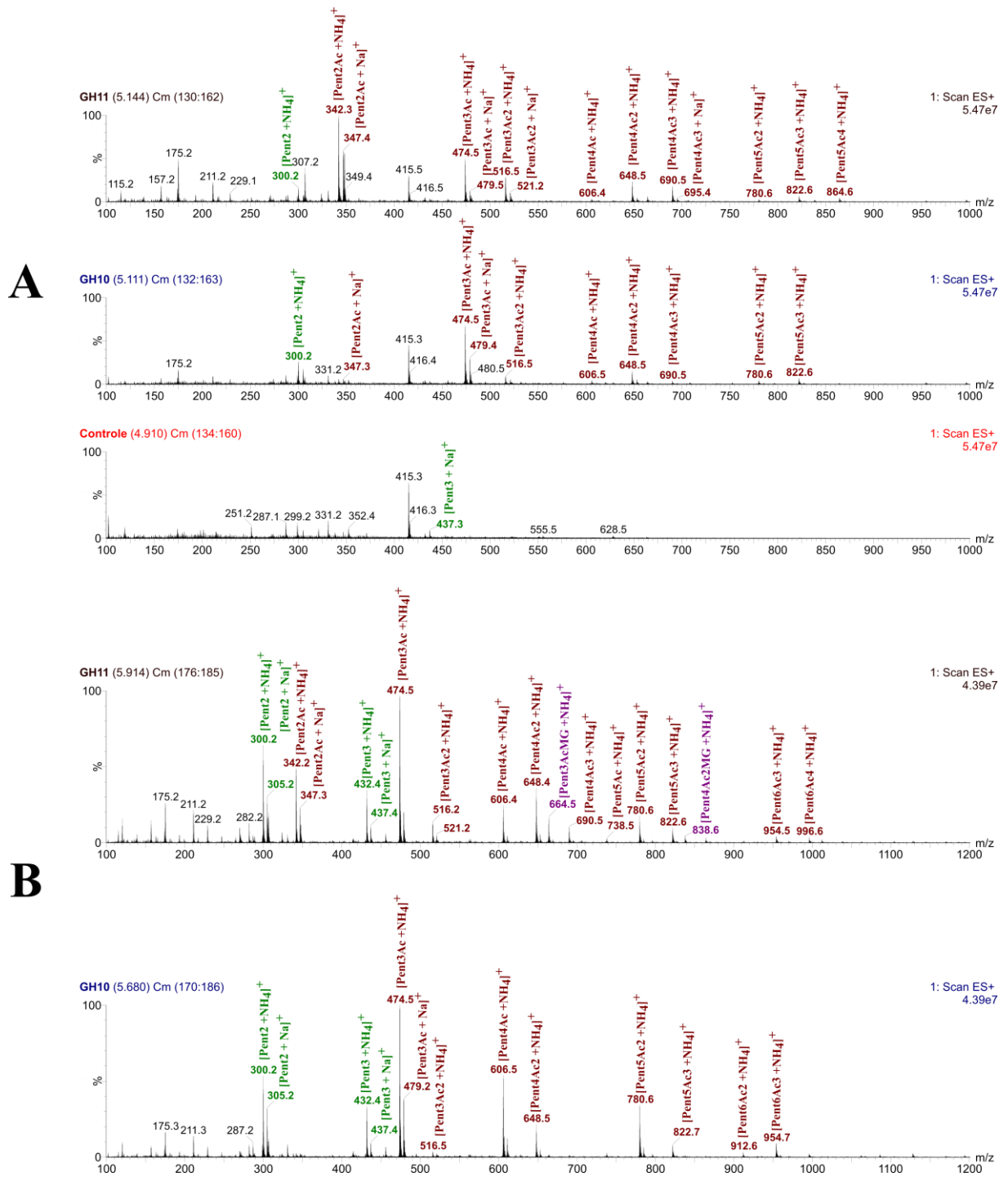
ZENG, J. et al. Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 274–281, 1 fev. 2014.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465–482, jul. 2012.

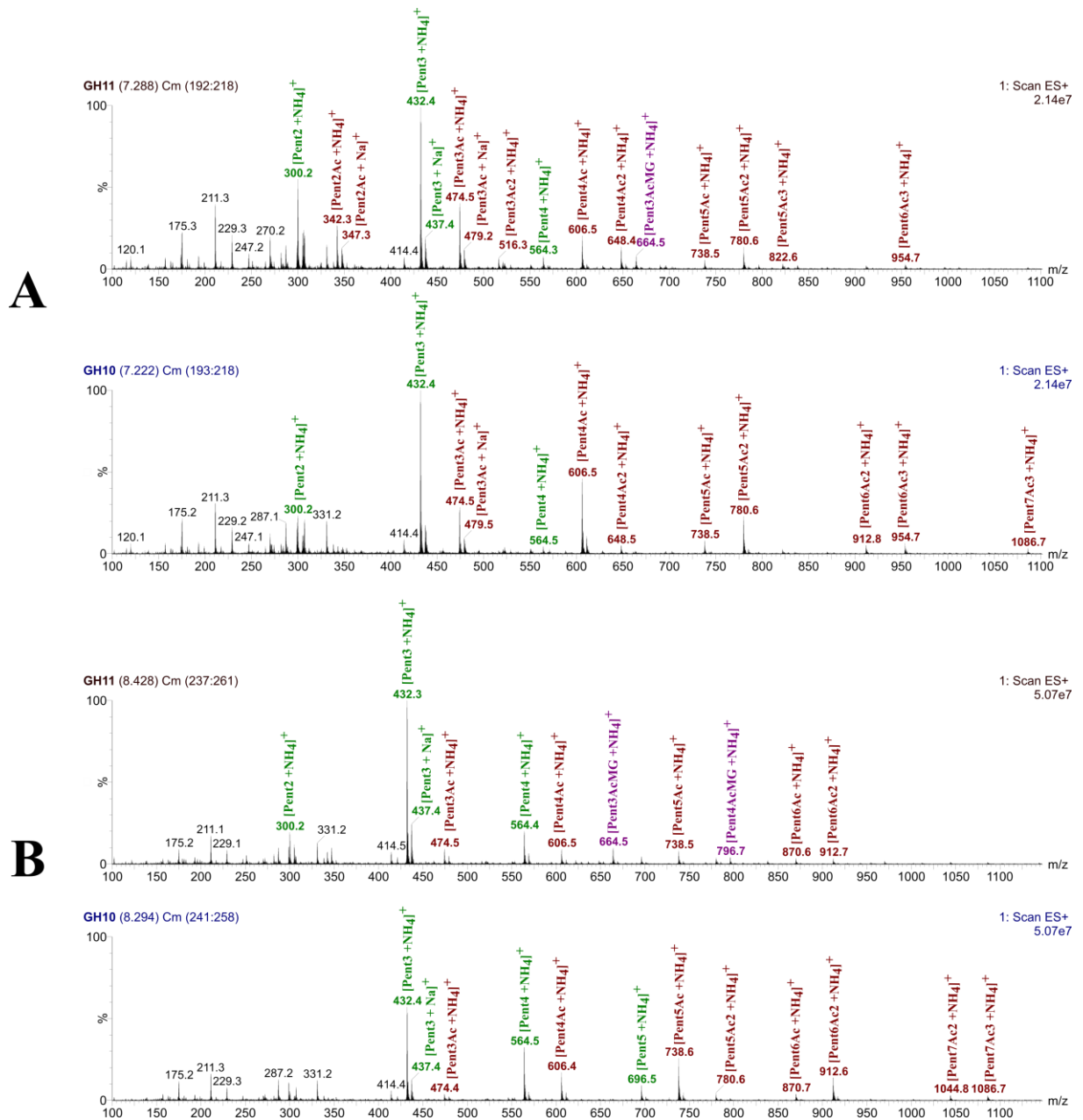
## 10 Material Suplementar



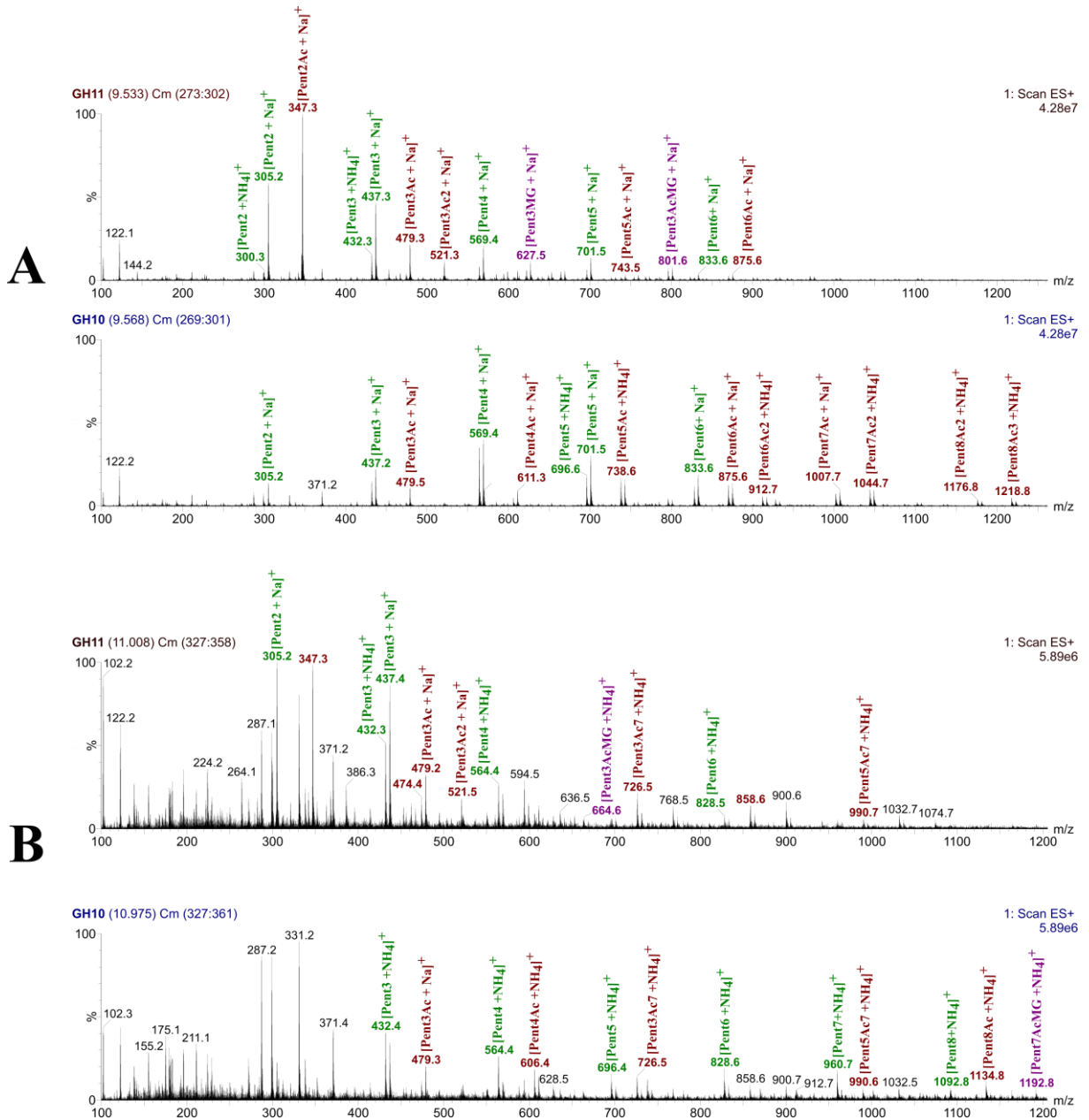
**Figura S 1.** Cromatograma do ensaio preliminar da fração DMSO. Amostras controle (somente o substrato), GH10 e GH11 contendo as respectivas xilanases. Os cromatogramas foram tratados no Software MassLynx<sup>®</sup> realizando subtração com ordem polinomial 20, 40% abaixo da curva e tolerância de 0,01 e *smooth* pelo método de média, com tamanho de janela de 3 e número de *smooths* igual a 3. Os números acima dos picos marcam os tempos de retenção em minutos e os marcados em negrito foram os picos observados.



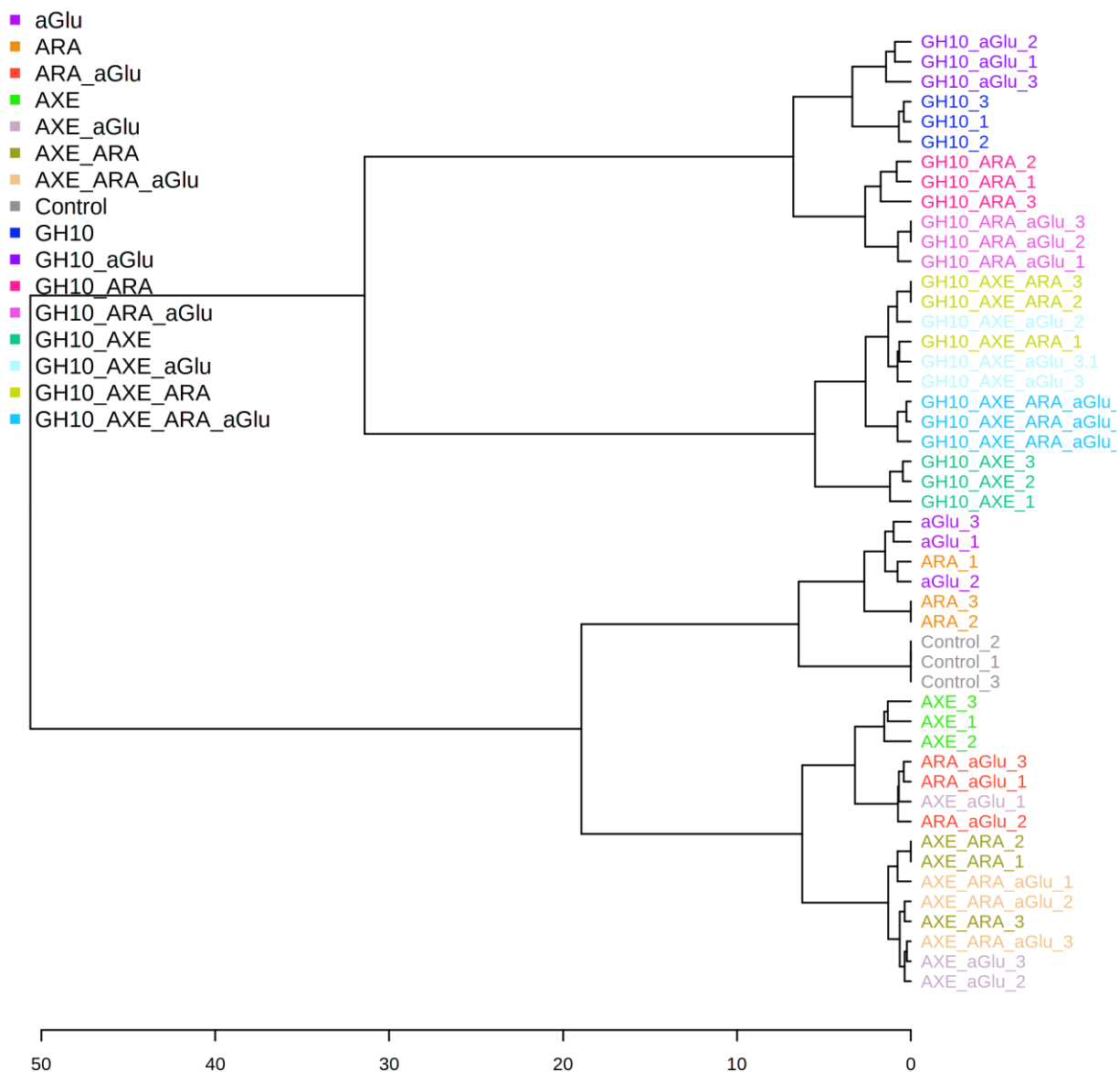
**Figura S 2.** Espectros anotados referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 5 minutos para o controle e amostras com xilanases GH11 e GH10 (A) e 6 minutos para amostras com xilanases (B). O controle não mostrou picos para o tempo de retenção do último espectro. Pent = pentose, Ac = grupo acetato, MG = grupo metil glucurônico.



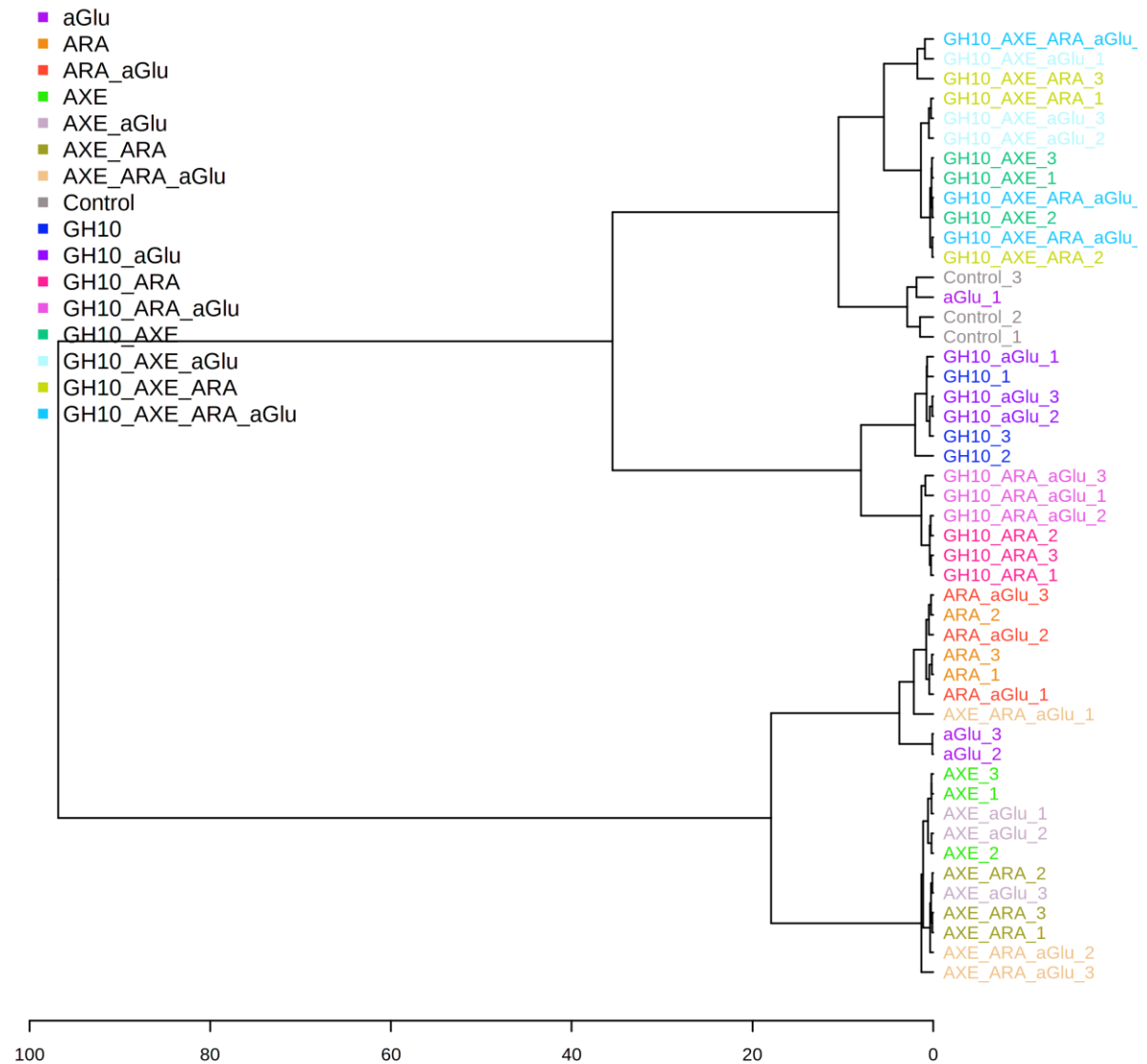
**Figura S 3.** Espectros anotados das amostras com xilanases GH11 e GH10 referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 6,8 minutos (**A**) e 8,5 minutos (**B**). O controle não mostrou picos para estes tempos de retenção. Pent = pentose, Ac = grupo acetato, MG = grupo metil glucurônico.



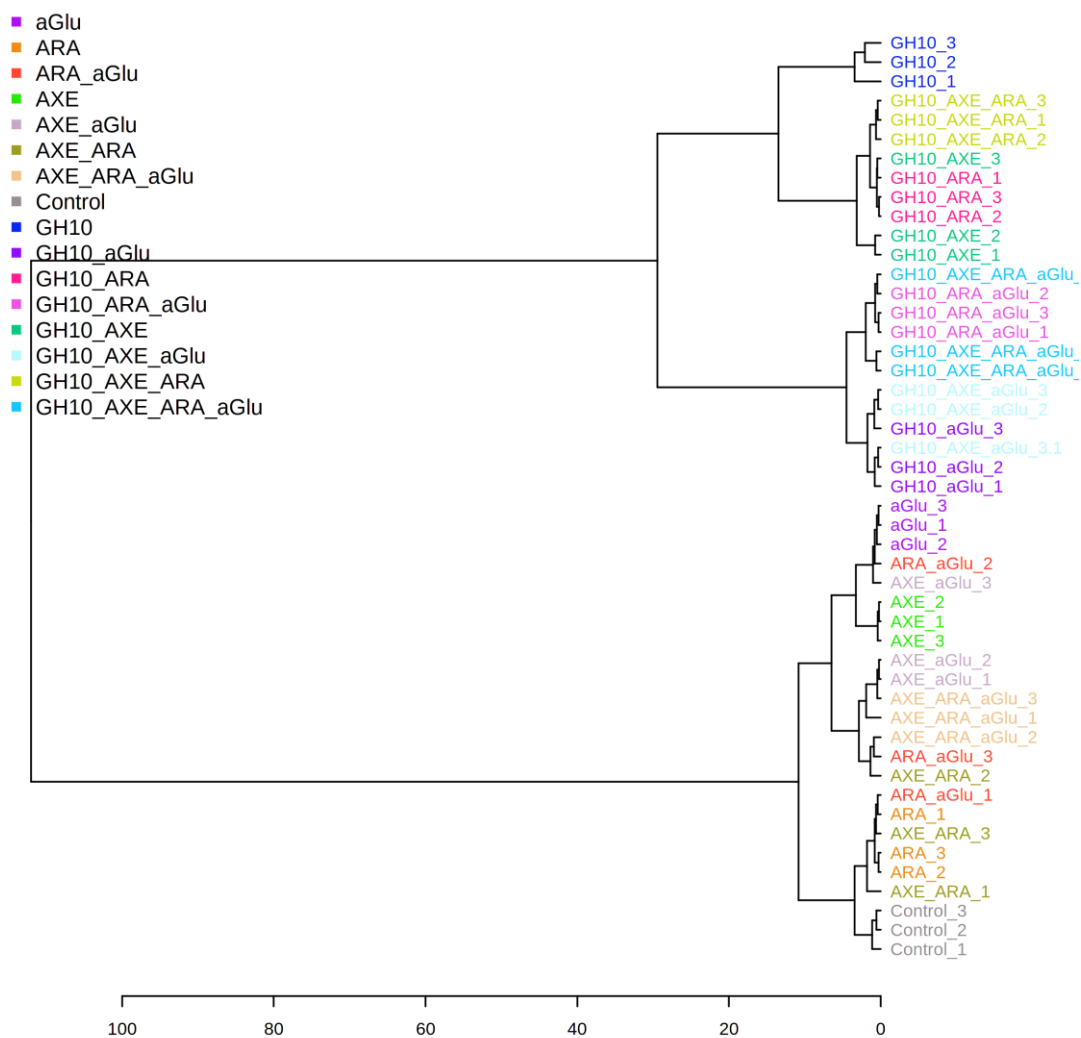
**Figura S 4.** Espectros anotados das amostras com xilanases GH11 e GH10 referentes aos picos cromatográficos de aproximadamente 9,5 minutos (**A**) e 11,4 minutos (**B**). O controle não mostrou picos para estes tempos de retenção. Pent = pentose, Ac = grupo acetato, MG = grupo metil glucurônico.



**Figura S 5.** Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração DMSO. Foi utilizado o método de Spearman para cálculo das distâncias e o algoritmo de *clustering* de Ward. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Maiores distâncias (eixo inferior) indicam grupos com as maiores diferenças.



**Figura S 6.** Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração pós clorito. Foi utilizado o método de Spearman para cálculo das distâncias e o algoritmo de *clustering* de Ward. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Maiores distâncias (eixo inferior) indicam grupos com as maiores diferenças.



**Figura S 7.** Dendrograma dos dados HILIC-MS para as combinações enzimáticas contra fração NaOH. Foi utilizado o método de Spearman para cálculo das distâncias e o algoritmo de *clustering* de Ward. Plotagem gerada no software MetaboAnalyst. Maiores distâncias (eixo inferior) indicam grupos com as maiores diferenças.