

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAIO CESAR DE MELLO CAPETTI

Aplicação de arabinofuranosidase em sinergismo com xilanases para
produção de oligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar

São Carlos
2023

CAIO CESAR DE MELLO CAPETTI

Aplicação de arabinofuranosidase em sinergismo com xilanases para produção de oligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ENLETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Capetti, Caio Cesar de Mello

Aplicação de arabinofuranosidase em sinergismo com xilanases para produção de oligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar / Caio Cesar de Mello Capetti; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

68 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Arabinofuranosidase. 2. Xilooligossacarídeos. 3. Bagaço de cana-de-açúcar. 4. Sinergismo. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço minha família, em especial meus pais, Cesar e Mariselma, pelo apoio incondicional que me permitiu estar aqui e realizar este trabalho. Agradeço também meus amigos, que o tempo todo me incentivaram e me encorajaram a seguir em frente, mesmo em momentos difíceis. Estendo meus agradecimentos aos participantes diretos deste projeto: prof. Dr. Igor Polikarpov, que ofereceu direcionamentos cruciais e me deu liberdade para moldar e conduzir a pesquisa segundo minhas curiosidades, além de possibilitar colaborações que a enriqueceram enormemente; à Dra. Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini, que contribuiu para as discussões, sempre com boas ideias e me ofereceu muito apoio ao longo desses anos de convivência, sem o qual esta dissertação provavelmente não existiria. Aos professores Leonardo Gomez e Eleonora Campos e Dras. Rachael Simister, Ornella Ontañon e Laura Navas, pelo apoio durante o intenso mês de colaboração na Universidade de York. E também aos colegas de GBM, tanto os atuais integrantes (todos), que estão comigo no dia-a-dia, como aqueles que já tomaram novos rumos profissionais. Tive incalculável sorte de ter ao meu lado pessoas tão enriquecedoras, que muito contribuíram para meu crescimento no curso desses cinco anos, oferecendo algum tipo de valioso aprendizado. Finalmente, agradeço às instituições que possibilitaram o desenvolvimento e apoiaram a condução da pesquisa: O Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) e o *Centre for Novel Agricultural Products* (CNAP - York). Encerro a redação deste trabalho convicto de que o crescimento e evolução que ele me proporcionou, desde sua concepção, foram o maior objetivo conquistado, muito por conta das pessoas nele envolvidas, direta ou indiretamente. Muito obrigado a todos.

“Faz-se ciência com os fatos, como se faz uma casa com pedras; mas uma acumulação de fatos não é ciência, assim como um monte de pedras não é uma casa.”

Jules Henri Poincaré

RESUMO

CAPETTI, C. C. M. **Aplicação de arabinofuranosidase em sinergismo com xilanases para produção de oligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2023. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, um insumo industrial versátil e de alta demanda, tendo em vista a importância de seus subprodutos, como o açúcar e o etanol. O bagaço de cana-de-açúcar é o principal rejeito agroindustrial do processamento desse insumo e rotas biotecnológicas de valorização desse material lignocelulósico estão sendo cada vez mais aprimoradas para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como xilooligossacarídeos (XOS) pré-bióticos, que são produzidos por meio da hidrólise do arabinoxilano. Este trabalho apresenta a caracterização bioquímica detalhada de uma arabinofuranosidase de *Bifidobacterium longum* pertencente à família GH43 (*BIAbf43*), em que se observou pH ótimo de 6,0 em um perfil restrito e temperatura ótima de 55 °C, com atividade mais elevada na faixa de 35-60 °C. O teste de estabilidade térmica da enzima mostrou meia-vida de 7,5 minutos na temperatura ótima, em contraste com 110 minutos a 45 °C. Os ensaios cinéticos mostraram maior afinidade e maior eficiência da enzima por arabinoxilano de trigo que por pNP- α -L-arabinofuranosídeo (k_M de 1,60 μ M e de 1,5 mM, respectivamente e k_{cat}/k_M de 0,67 $s^{-1} \mu M^{-1}$ e de 31 $s^{-1} mM^{-1}$, respectivamente). Os ensaios de sinergismo de *BIAbf43* com xilanases em arabinoxilano de trigo mostrou grau de sinergismo de 1,35 quando combinada com xilanase da família GH10 equitativamente e de 1,7 quando combinada com xilanase da família GH11 em proporção de 10 para 30 miliunidades (xilanase para arabinofuranosidase). *BIAbf43* possibilitou também aumento nos rendimentos de XOS produzidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, além de aumentar a proporção de XOS curtos nos hidrolisados, que possuem efeito pré-biótico mais destacado. A análise de perfil de clivagem de arabinofuranosil-xilooligossacarídeos (AXOS) e de XOS lineares pela enzima, utilizando cromatografia de troca aniônica de alta performance, comprovou que *BIAbf43* é um módulo multifuncional, apresentando também atividades xilobiohidrolase e xilosidase, pois foi capaz de produzir xilose a partir de A2XX e xilobiose a partir de XOS lineares. O estudo do modelo estrutural da enzima e os resultados de *docking* molecular revelaram que *BIAbf43* apresenta um bolso catalítico capaz de acomodar uma única molécula de arabinofuranose que esteja substituída na unidade terminal de xilose em AXOS, além disso, uma molécula de xilopirranose também pode ser acomodada em tal bolso, provocando a flexão da molécula de XOS lineares e consequente hidrólise, levantando hipóteses para as bases moleculares da multifuncionalidade dessa enzima. Este estudo demonstra o potencial biotecnológico dessa ferramenta enzimática para incremento nos rendimentos de XOS pré-bióticos, além de elucidar os mecanismos de sinergismo com xilanases para desconstrução do arabinoxilano de cana-de-açúcar e os fundamentos estruturais de sua atividade múltipla.

Palavras-chave: Arabinofuranosidase. Xilooligossacarídeos. Bagaço de cana-de-açúcar. Sinergismo

ABSTRACT

CAPETTI, C. C. M. **Application of arabinofuranosidase in synergy with xylanases for xylooligosaccharides production from sugarcane bagasse.** 2023. 68 p. Dissertation (Master in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Brazil is the global largest sugarcane producer, an industrially versatile feedstock that is high demanded due to the importance of its byproducts, which include sugar and ethanol. The bagasse is an ubiquitous residue of sugarcane processing and biotechnological routes for valorization of this lignocellulosic material helps solving storage problems and obtaining value-added products, such as prebiotic xylooligosaccharides (XOS), which are produced through arabinoxylan hydrolysis. This work presents detailed biochemical characterization of an arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*, belonging to GH43 family (*B*lAbf43), which presented optimum pH of 6.0 in a narrow profile and optimum temperature of 55 °C, with higher activity in the range of 35-60 °C. Thermal stability test showed that enzyme half-life was 7,5 minutes at optimum temperature, contrasting with 110 minutes at 45. Kinetic assays showed higher affinity and efficiency of the enzyme towards wheat arabinoxylan than pNP- α -L-arabinofuranoside (K_m of 1,60 μ M and 1.5 mM, respectively and k_{cat}/K_M of 0.67 $s^{-1} \mu M^{-1}$ and 31 $s^{-1} mM^{-1}$, respectively). *B*lAbf43 synergy assays using wheat arabinoxylan showed degree of synergism of up to 1.35 when equally combined to GH10 xylanase and up to 1.7 when combined to GH11 xylanase in 10:30 enzymatic unit ratio (xylanase to arabinofuranosidase). The use of *B*lAbf43 also caused increase in XOS yields from pretreated sugarcane bagasse, as well as a shift in XOS profile towards shorter XOS, which present enhanced prebiotic activity. Enzyme cleavage pattern of arabinofuranosyl-xylooligosaccharides (AXOS) and linear XOS, assessed through high performance anion exchange chromatography, confirmed that *B*lAbf43 is a multifunctional module, also presenting xylobiohydrolase and xylosidase activities, since it was able to produce xylose from A2XX and xylobiose from linear XOS. Analysis of the structural model and molecular docking results showed that *B*lAbf43 presents a catalytic pocket that can accommodate a single arabinofuranose molecule which must be substituted in the terminal xylose unit in AXOS, furthermore, a xylopyranose molecule can also occupy the pocket volume, causing the linear XOS molecule to flex and consequently hydrolyze, which helps gaining insights on the molecular basis for enzyme multifunctionality. This study demonstrates the biotechnological potential of this enzymatic tool to enhance prebiotic XOS yields, while also sheds light on the synergy mechanisms with xylanases for sugarcane arabinoxylan deconstruction and the structural fundamentals of its multiple activities.

Keywords: Arabinofuranosidase. Xylooligosaccharides. Sugarcane bagasse. Synergism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização da estrutura molecular do arabinoxilano de cana-de-açúcar	20
Figura 2 – Esquematização da estrutura do material lignocelulósico recalcitrante.....	21
Figura 3 – Ferramentas enzimáticas envolvidas na desconstrução total do arabinoxilano	23
Figura 4 – Estruturas moleculares dos substratos testados em <i>BIAbf43</i>	37
Figura 5 – Gel SDS-Page da expressão e purificação	40
Figura 6 – Temperaturas de melting avaliadas por ensaio de deslocamento térmico	42
Figura 7 – Ensaio de concentração enzimática e tempo de reação	43
Figura 8 – Perfis de pH e temperatura de <i>BIAbf43</i>	44
Figura 9 – Atividade residual de <i>BIAbf43</i>	46
Figura 10 – Ensaio cinético com <i>BIAbf43</i>	47
Figura 11 – Ensaio de sinergismo de <i>BIAbf43</i> com endo-xilanases	49
Figura 12 – Oligossacarídeos presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	53
Figura 13 – Monossacarídeos presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	54
Figura 14 – Perfil de produto liberado por <i>BIAbf43</i>	56
Figura 15 - Modelo estrutural de <i>BIAbf43</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de ajuste dos dados experimentais de atividade residual a um modelo de decaimento exponencial.....	48
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos de <i>B/Abf43</i>	50
Tabela 3 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a realização do pré-tratamento alcalino.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AXOS	Arabinofuranosil-xilooligossacarídeos
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
HPAEC	High performance anion exchange chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
LIC	Ligation independent cloning
PAD	Pulsed amperometric detection
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
pNP-araf	4-nitrofenol- α -L-arabinofuranosídeo
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TEV	Tobacco Etch virus
XOS	Xilooligossacarídeos
CBM	Carbohydrate binding module

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivos gerais	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Expressão heteróloga e purificação da arabinofuranosidase	29
3.2	Ensaio enzimáticos	30
3.2.1	Ensaio de deslocamento térmico (Thermofluor)	30
3.2.2	Concentração enzimática e tempo de reação	31
3.2.3	Perfis de pH e temperatura.....	31
3.2.4	Atividade residual.....	32
3.2.5	Determinação de parâmetros cinéticos.....	32
3.3	Ensaio de sinergismo	33
3.4	Pré-tratamento da biomassa	34
3.5	Caracterização química da biomassa.....	35
3.6	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	36
3.7	Perfil de produto liberado a partir de oligossacarídeos	36
3.8	Modelo tridimensional, <i>docking</i> molecular e análise estrutural.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1	Expressão heteróloga e purificação da arabinofuranosidase	39
4.2	Ensaio enzimáticos	40
4.2.1	Ensaio de deslocamento térmico (Thermofluor)	40
4.2.2	Concentração enzimática e tempo de reação	43
4.2.3	Perfis de pH e temperatura.....	43
4.2.4	Atividade residual.....	45
4.2.5	Determinação de parâmetros cinéticos.....	47
4.3	Ensaio de sinergismo	48
4.4	Caracterização química da biomassa.....	50
4.5	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	51
4.6	Perfil de produto liberado a partir de oligossacarídeos	55
4.7	Estudo estrutural	57
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma das principais culturas agrícolas em países tropicais, como Brasil, Índia e China. A importância e abundância desse insumo se deve a sua alta versatilidade industrial e à alta demanda de seus subprodutos, como açúcar e etanol. Na safra 2022/2023, o Brasil, maior produtor global de cana-de-açúcar, teve produção de aproximadamente 610 milhões de toneladas, com projeção de aumento de 7% para a safra seguinte. (1) No mesmo período, a partir desse insumo agrícola, foram produzidos aproximadamente 37 milhões de toneladas de açúcar e 27 bilhões de litros de etanol (1), um combustível popular no Brasil, que se constitui alternativa rentável, disponível e sustentável para combustíveis fósseis, cuja combustão é uma das causas da emissão de gases que concorrem para intensificação do efeito estufa. (2)

Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, sejam gerados 280 kg de bagaço de cana-de-açúcar. (3) No passado, por conta da escala da produção brasileira, esse rendimento de produção de rejeitos criava um problema de estocagem, o que levava agricultores a frequentemente deixá-los no solo ou queimá-los para produção de energia elétrica. (4) Entretanto, sob a luz do conceito de biorrefinaria e economia circular, rotas biotecnológicas de valorização desse material têm sido estabelecidas, sendo alguns exemplos: a produção de etanol de segunda geração, biogás, oligossacarídeos pré-bióticos, celulose nanofibrilada, que é um material promissor no contexto da indústria biomédica e de embalagens, e produção de furfural, uma importante plataforma para síntese química. (4–8)

O reaproveitamento da biomassa lignocelulósica passa, inicialmente, pelo conhecimento de seus componentes estruturais e das interações entre eles. O bagaço de cana-de-açúcar, como um material lignocelulósico, é constituído principalmente por celulose, que corresponde a cerca de 40% de seu peso seco, hemicelulose, que compreende cerca de 20% da massa seca, e lignina, correspondente a aproximadamente 35% da massa do material. (9) Completando a composição da parede celular vegetal da cana-de-açúcar, há ainda componentes minoritários, como pectinas, compostos inorgânicos e extrativos, que compreendem óleos e produtos do metabolismo secundário vegetal. (9-10)

Enquanto a celulose é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose unidas por ligação β -1,4, a hemicelulose é, na verdade, um grupo heterogêneo de polissacarídeos, que usualmente são formados por um esqueleto principal de unidades de pentoses (xilose, arabinose) ou hexoses (glicose, manose, galactose) e podem apresentar substituintes laterais. (11) Particularmente, o polissacarídeo hemicelulósico mais abundante no bagaço de cana-de-

açúcar é o arabinxilano, que apresenta um esqueleto principal de unidades de D-xilose ligados via ligação β -1,4, em que se observam cerca de 20% de decorações de L-arabinose anexadas por ligação α -1,2 ou α -1,3. (10) Esse polissacarídeo apresenta, ainda, cerca de 33% de acetilação, que ocorrem mais frequentemente na posição O2, mas também podem ocorrer na posição O3, ou até mesmo em O2 e O3 concomitantemente. (10,12) Uma esquematização do arabinxilano de cana de açúcar pode ser vista na Figura 1.

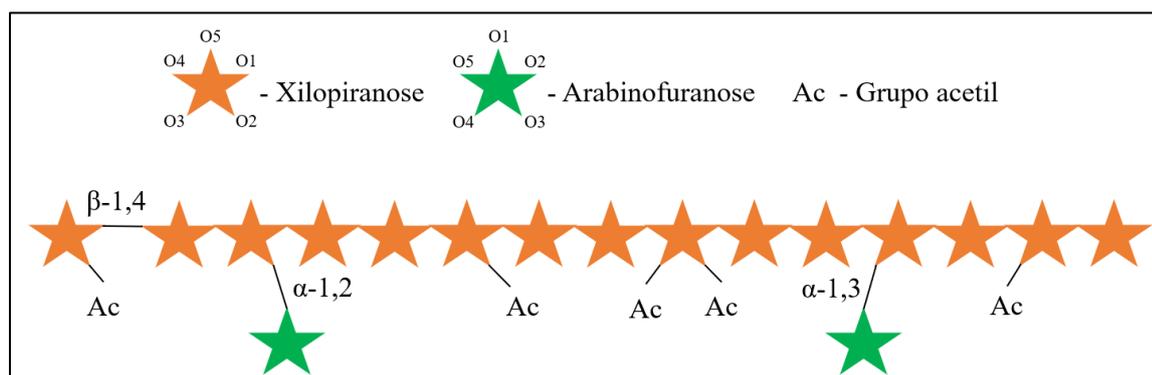


Figura 1- Esquematização da estrutura molecular do arabinxilano de cana-de-açúcar, constituído por um esqueleto principal de xiloses e contando com substituintes laterais de arabinofuranose e grupos acetil. Na figura, estão evidenciados os principais tipos de ligação que se estabelecem entre os monossacarídeos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora presentes em proporções significativas, os carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar não estão prontamente disponíveis para aproveitamento, devido a uma intrincada rede de interações entre os componentes, que formam o complexo lignocelulósico, altamente recalcitrante, esquematizado na Figura 2. Na estrutura da parede celular de monocotiledônias, as microfibras de celulose são recobertas pelo arabinxilano e β -glucano, polissacarídeos da hemicelulose, que não estabelecem com as fibras uma interação específica, mas sim uma interação de interface que reduz a exposição da superfície hidrofóbica da celulose. (13–15) O conjunto celulose-hemicelulose estabelece-se sobre uma rede de pectinas e proteínas que contribuem para a estruturação do complexo. (15) Além disso, sabe-se que o arabinxilano também está envolvido em ligações da hemicelulose com a lignina, que é mediada pela molécula de ácido ferúlico usualmente esterificada à arabinose do arabinxilano. (15)

A arquitetura da parede celular de cana-de-açúcar

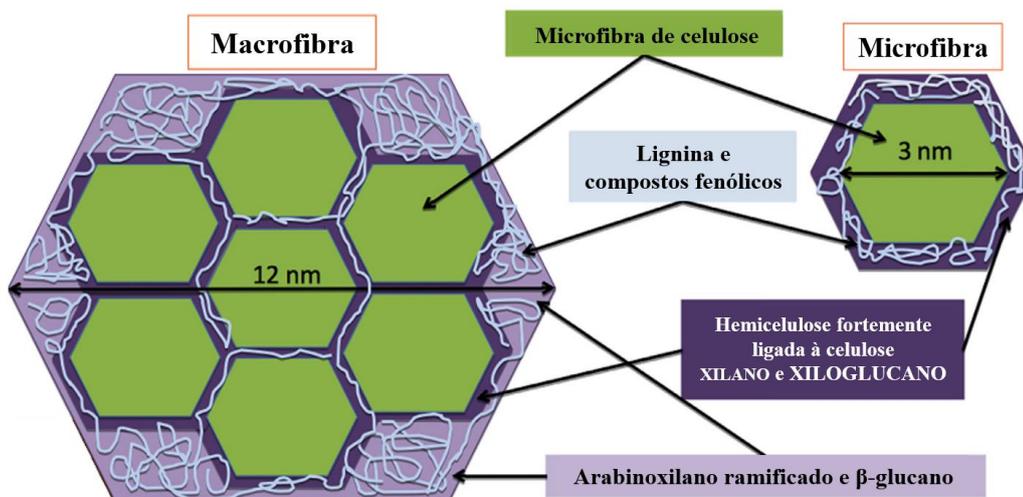


Figura 2 – Esquemática da estrutura do material lignocelulósico recalcitrante, mostrando a organização dos principais grupos de biopolímeros.

Fonte: Adaptada de BUCKERIDGE; GRANDIS; TAVARES. (15)

Tendo em vista a alta recalcitrância do material lignocelulósico, que constitui um desafio biotecnológico para seu aproveitamento, explicita-se a necessidade de desestruturação da rede de interações entre seus componentes, antes que seus polissacarídeos estejam efetivamente acessíveis. Por isso, uma etapa fundamental do processo de valorização da biomassa é o pré-tratamento, que pode ser mecânico, químico, físico-químico ou biológico. Um pré-tratamento amplamente utilizado e altamente eficaz na redução da recalcitrância de materiais lignocelulósicos é o pré-tratamento alcalino. (16-17) A aplicação de soluções alcalinas sobre a biomassa atua quimicamente enfraquecendo a ligação de hidrogênio entre celulose e hemicelulose e rompendo a ligação éster entre o ácido ferúlico do arabinoxilano e a lignina. (17) Dessa forma, o tratamento desconstrói parcialmente o complexo lignocelulósico ao promover a solubilização de parte da lignina, de maneira que o sólido resultante possui maior teor de celulose e hemicelulose comparado ao material não tratado. Um efeito secundário desse pré-tratamento é a neutralização dos grupos acetil do xilano pela solução alcalina, fazendo com que o xilano resultante fique desprovido de acetilações, que, embora melhorem a solubilidade do xilano, comprometem sua digestibilidade por enzimas. (18-19)

O estado da arte da degradação de biomassa lignocelulósica contempla o emprego de ferramentas enzimáticas como alternativas eficientes para a desconstrução dos polissacarídeos da parede celular vegetal, após redução de sua recalcitrância por meio de alguma estratégia de pré-tratamento. (20) Apesar de possuir custo frequentemente mais elevado que intervenções

puramente químicas, a via enzimática para hidrólise de carboidratos apresenta como principais vantagens as condições brandas de reação, a melhor preservação dos reatores, os tempos reduzidos de reação e o maior controle sobre os produtos obtidos. (21)

Consequência da diversidade estrutural dos polissacarídeos da hemicelulose, enzimas com grande variedade de atividades são necessárias para a desconstrução completa da hemicelulose. Tomando como foco o arabinoxilano de cana-de-açúcar, a hidrólise das ligações β -1,4 entre unidades de xilose no interior do esqueleto principal é feita por endo-xilanases (EC 3.2.1.8), enquanto a hidrólise de unidades de xilose terminais é feita por exo-xilosidases (EC 3.2.1.37), essenciais quando se objetiva a desconstrução total do polissacarídeo para geração de açúcares fermentáveis. (18) A Figura 3 A mostra as enzimas envolvidas na desconstrução do arabinoxilano e seus respectivos locais de atuação.

As xilanases são encontradas principalmente nas famílias de glicosil hidrolases (GH) 10 e 11, segundo classificação do banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes - <http://www.cazy.org/>). Enzimas dessas famílias diferem em sequência e estrutura terciária; enquanto enzimas da família GH10 possuem enovelamento do tipo *TIM barrel*, as da família GH11 são mais compactas e apresentam enovelamento do tipo *β -jelly roll* (22) e a diferença anatômica dos sítios ativos das enzimas dessas famílias reflete diferentes tolerâncias para com substituintes na cadeia principal de xilano. (22–24)

Em 1977, Davies e colaboradores propuseram um padrão de nomenclaturas para os subsítios de ligação entre enzima e substrato, em que cada unidade formadora do polissacarídeo ocupa uma subunidade na fenda catalítica e a hidrólise ocorre entre os subsítios nomeados como -1 e +1, com os subsítios negativos estando mais próximos do terminal não redutor e, os positivos, mais próximos do terminal redutor. (25) Nessa proposta de nomenclatura, enquanto xilanases da família 10 usualmente possuem restrição a decorações nos subsítios -1 e +1 (Figura 3 B), as da família 11 frequentemente não comportam restrições nos subsítios -2, -1 e +1 (Figura 3 C). Consequentemente, membros da família GH10 requerem duas unidades de xilose não decoradas para realizar hidrólise eficiente, sendo mais permissivas que enzimas da família GH11, as quais requerem três unidades sem substituintes laterais. (23-24)

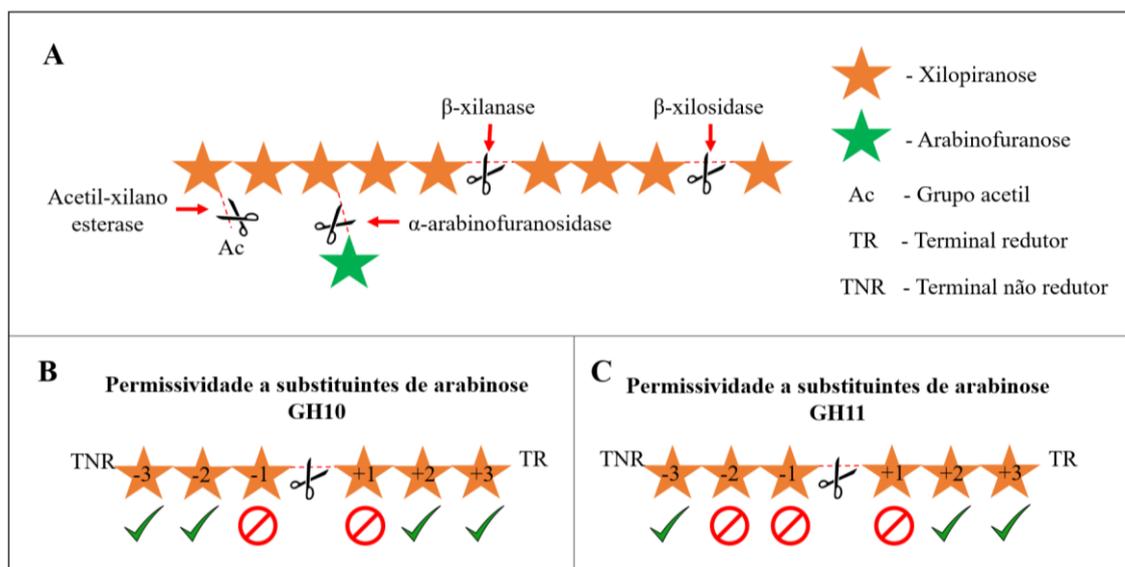


Figura 3 - (A) Ferramentas enzimáticas envolvidas na desconstrução total do arabinoxilano (B) Permissividade dos subsítios de uma típica endo-xilanase da família GH10 para substituições de arabinofuranose, baseado em KARLSSON *et al.* (23) (C) Permissividade dos subsítios de uma típica endo-xilanase da família GH11 para substituições de arabinofuranose, baseado em KARLSSON *et al.* (23)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tendo em vista que os substituintes de arabinose e grupos acetil constituem restrição importante a xilanases, aumentando a recalcitrância do xilano, uma estratégia frequentemente utilizada para otimizar o processo de desconstrução do xilano é o emprego de enzimas acessórias, que se encarregam da remoção de substituintes laterais. (26) As acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) são enzimas que promovem a excisão de grupos acetil do esqueleto de xilano, um resultado que também pode ser obtido via tratamento alcalino. (19,26) No entanto, a ligação entre arabinose e o esqueleto de xilano não é rompida pelo pré-tratamento alcalino, requerendo a ação de α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) para redução do grau de substituição do xilano, o que aumenta o número de possíveis sítios de clivagem para as xilanases. Essa abordagem já se provou bem sucedida, tendo em vista que uma ação sinérgica entre xilanases e arabinofuranosidases foi constatada para a desconstrução de arabinoxilano. (27–30)

As arabinofuranosidases podem ser encontradas em 8 famílias de glicosil hidrolases (famílias GH2, 3, 5, 39, 43, 51, 54 e 62), indicando grande variedade estrutural dessas enzimas, compatível com a diversidade de polissacarídeos em que L-arabinose está presente, como arabinanos, arabinogalactanos e arabinoxilano. (31) No contexto da degradação de arabinoxilano ou de xilooligossacarídeos substituídos, uma das principais famílias é a GH43, que compreende ampla gama de atividades e, por isso, foi segmentada em subfamílias. (32) Além da divisão por similaridade de sequência e estrutural, as arabinofuranosidases são

classificadas em dois tipos de acordo com sua capacidade de clivagem: as enzimas do tipo m-2,3 são capazes de promover a hidrólise de substituintes únicos, que podem estar anexadas ao xilano tanto por ligação α -1,2 como por α -1,3; já as do tipo d3 reconhecem dupla substituição, atuando em unidades de xilose que estejam substituídas em O2 e em O3 simultaneamente, com a enzima promovendo a hidrólise somente do substituinte em O3. (18) Não é incomum a ocorrência, na família GH43, de enzimas que apresentam mais de uma função, como arabinofuranosidases/xilanases ou arabinofuranosidases/xilosidases, entretanto, detalhes dos mecanismos moleculares por trás da flexibilidade de atividades, que permite um mesmo sítio catalítico hidrolisar ligações glicosídicas de tipos diferentes, carecem de maior aprofundamento. (33-34)

A hidrólise incompleta do xilano gera sacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10, chamados xilooligossacarídeos (XOS), ou, no caso de haver ramificações de arabinose, arabinofuranosil-xilooligossacarídeos (AXOS). (22) XOS têm sido avaliados em rotas de valorização de biomassa como efetivos pré-bióticos, isto é, agentes que promovem crescimento seletivo de bactérias benéficas do microbioma humano, destacadamente, aquelas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. (35–38) A capacidade dos pré-bióticos em modular a composição da microbiota se deve a dois mecanismos principais, a saber, (i) a eficiência diferencial dos microrganismos em utilizarem os oligossacarídeos como fonte de carbono para seu metabolismo e (ii) a alteração do pH do meio causada pelos produtos da fermentação dos oligossacarídeos: os ácidos graxos de cadeia curta. (39) Para além do efeito pré-biótico, a liberação de ácidos graxos de cadeia curta provê aos XOS, quando administrados juntos às bactérias probióticas, propriedades antioxidantes (40), anti-inflamatórias (41), antibióticas (42,43) e até mesmo anticarcinogênicas. (44) A coletividade das propriedades benéficas à saúde humana e animal dos XOS fundamentam o elevado interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia e veterinária na produção desses oligossacarídeos, que são empregados em cosméticos e como aditivos em ração animal e em comidas funcionais, por exemplo (45), e que constituem um mercado crescente que movimentou cerca de 70 milhões de dólares em 2023, com perspectiva de atingir 90 milhões de dólares até 2028. (46)

Como bactérias probióticas são dotadas de eficiente maquinaria metabólica para degradação de fibras vegetais ricas em material lignocelulósico, esses organismos são frequentemente estudados como fontes de ferramentas enzimáticas robustas, que são clonadas e expressas em sistema heterólogo para emprego biotecnológico. Em particular, *Bifidobacterium longum* é uma espécie de bactéria anaeróbica, gram-positiva, em formato de bastão, que compõe a microbiota intestinal humana e em cujo genoma já foram identificadas

diversas glicosil hidrolases (47-48) mostrando-se, portanto, um organismo promissor para prospecção de alvos enzimáticos.

Recentemente, uma xilanase de *Thermobacillus composti*, da família GH10 (*TcXyn10*), e uma de *Paenibacillus xylanivorans*, da família GH11 (*PxXyn11*), foram identificadas como promissoras ferramentas para produção de XOS a partir de biomassa lignocelulósica. (49,50) A primeira mostrou-se uma enzima mais tolerante a substituições que comumente observado para membros dessa família, apresentando apenas o subsítio -1 impedido, o que favorece a hidrólise do arabinoxilano e aumenta a eficiência de produção de AXOS. (49) A segunda mostrou-se uma ferramenta eficiente na hidrólise de arabinoxilano de trigo e apresenta um perfil de clivagem que maximiza a produção de oligossacarídeos e minimiza o rendimento de xilose, um produto indesejado no processo de produção de XOS. (50) Embora estratégias para hidrolisar arabinoxilanos altamente substituídos e os efeitos sinérgicos entre xilanases e arabinofuranosidases sejam bem conhecidos, são necessárias investigações a respeito do potencial da administração conjunta dessas enzimas para degradação de arabinoxilanos de menor grau de substituição, característicos de rejeitos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar. Com isso, poder-se-ia avaliar potenciais aumentos de rendimento de XOS pré-bióticos, de alto valor agregado, a partir desse rejeito agroindustrial, valendo-se dos modernos processos de biorrefinaria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho visou a expressão heteróloga, purificação e caracterização de uma arabinofuranosidase de *Bifidobacterium longum*, pertencente à família 43 de glicosil hidrolases (*BIAbf43*), a ser avaliada, juntamente com xilanases, como ferramenta biotecnológica para produção de xilooligossacarídeos a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, objetivou-se a compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares da hidrólise do arabinoxilano de cana-de-açúcar, elucidando o papel de cada ferramenta enzimática nesse processo e as bases para o sinergismo entre xilanases e arabinofuranosidases.

2.2 Objetivos específicos

- Produção heteróloga de *BIAbf43* com elevado grau de pureza;
- Determinação de pH e temperatura ótimos da enzima e sua resistência térmica;
- Quantificação do sinergismo de *BIAbf43* com xilanases das famílias GH10 e GH11 para desconstrução de arabinoxilano;
- Emprego das enzimas (arabinofuranosidase e xilanases) para produção de xilooligossacarídeos pré-bióticos a partir de bagaço de cana-de-açúcar;
- Compreensão das bases moleculares da desconstrução do arabinoxilano de cana-de-açúcar pelas enzimas;
- Investigação da capacidade de *BIAbf43* como ferramenta para remover ramificações de arabinofuranosil-xilooligossacarídeos;
- Análise de possível bifuncionalidade de *BIAbf43* e compreensão estrutural de atividades secundárias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão heteróloga e purificação da arabinofuranosidase

A identificação do alvo foi feita a partir do alinhamento das sequências genômicas de organismos disponíveis na biblioteca do Grupo de Biotecnologia Molecular com banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZy - <http://www.cazy.org/>).

Uma sequência (NCBI WP_101027186.1) contendo um provável módulo catalítico com atividade α -L-arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55) pertencente à família GH43, subfamília 16, e dois módulos de ligação a carboidratos (CBM) foi identificada no genoma da bactéria *Bifidobacterium longum* (BlAbf43) e selecionada para clonagem e expressão em sistema heterólogo.

Primeiramente, a sequência foi utilizada como base para o planejamento de oligonucleotídeos específicos para clonagem do DNA genômico de *B. longum* em vetor pETTRX-1a/LIC, utilizando a técnica de clonagem independente de ligase (LIC), descrita anteriormente. (51) Para propagação do plasmídeo, estes foram transformados em células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5- α e, para expressão heteróloga, os vetores extraídos e purificados foram transformados em células competentes *Escherichia coli*, linhagem Arctic Express.

O processo de expressão iniciou-se com o preparo de pré-cultura das células transformadas em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 μ g/mL de canamicina e 10 μ g/mL de gentamicina, que foi incubada a 37 °C, sob agitação (180 RPM), *overnight*. Então, a pré-cultura foi diluída em 1 L de meio LB contendo os antibióticos anteriormente descritos e incubada a 37 °C, sob agitação (180 RPM) até que a densidade óptica, medida a 600 nm, atingisse um valor na faixa 0,5-0,6. Nesse momento, foi adicionado 1 mM (concentração final) de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a temperatura de incubação foi reduzida para 15 °C.

Após aproximadamente 17 horas, a cultura de células foi centrifugada por 30 minutos a 6000 RPM e 4 °C para separação da massa celular e do meio de cultura. As células foram coletadas, ressuspensas em 20 mL de tampão para lise (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 0,25 mg/mL lisozima; 0,1 mM fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF)) e deixadas em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, foram realizados 8 ciclos de 30 s *on* + 30 s *off* em ultrassom, com amplitude de 30%, e o lisado foi centrifugado 30 minutos a 13000 RPM, 4 °C.

A fração solúvel foi recolhida e aplicada em coluna contendo 3 mL de resina Ni-NTA agarose (McLAB, California, EUA) pré-equilibrada, para cromatografia de afinidade por metal imobilizado. Seguiu-se a lavagem da coluna com 10 volumes de coluna de tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol) e, na sequência, foi realizada eluição com 5 volumes de tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol). Finalmente, foram aplicados 5 volumes de tampão de eluição contendo 500 mM de imidazol para limpeza da coluna.

A concentração de imidazol na fração de eluição foi reduzida para menos de 5 mM por meio de filtração em membrana de corte molecular de 30 kDa (GE-Healthcare, Chicago, EUA) e subsequente adição de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl. Após a diluição do imidazol, foi realizada clivagem da cauda de histidinas e tiorredoxina utilizando protease de Tobacco Etch Virus (TEV) em uma proporção de 1:10 (massa protease : massa proteína), em reação com 5 mM Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), mantida a 4 °C sob agitação orbital, *overnight*.

As eficiências da cromatografia de afinidade por metal imobilizado e da clivagem da cauda de histidinas utilizando TEV protease foram avaliadas por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE, com 15% acrilamida (Bio-Rad, Hercules, EUA), em condições desnaturantes. O gel foi corado utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250 (AMRESCO, Solon, EUA) e revelado em 10% ácido acético. A quantificação da proteína foi feita por espectroscopia UV (280 nm), usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA), com informações de massa molecular e coeficiente de extinção molar de 69,6 kDa e 124800 M⁻¹·cm⁻¹, respectivamente, obtidos com base na sequência de aminoácidos, usando a ferramenta ExpASy ProtParam. (52)

3.2 Ensaios enzimáticos

3.2.1 Ensaio de deslocamento térmico (Thermofluor)

A determinação da estabilidade da estrutura terciária de *BlAbf43* em 48 diferentes tampões foi realizada por meio do ensaio de deslocamento térmico (Thermofluor). Nessa técnica, utiliza-se uma sonda fluorescente, SYPRO Orange (Invitrogen, California, EUA), que se liga a regiões hidrofóbicas de proteínas desnaturadas, fazendo com que o sinal de

fluorescência, medido nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 490/530 nm, seja tanto maior quanto maior a população de proteínas desoveladas.

Para o ensaio, *B1Abf43* a 250 µg/mL foi adicionada a um dos variados tampões na faixa de pH 1,2-10,0 (concentração de 50 mM, contendo ou não 300 mM NaCl), na presença do corante SYPRO Orange, preparado conforme instruções do fabricante. A reação foi elaborada em uma placa de PCR, que foi selada com selo óptico Microseal® 'B' (Bio-Rad, Hercules, EUA) e incubada em sistema de PCR em tempo real CFX96™ (Bio-Rad, Hercules, EUA), programado para variar a temperatura de 25 a 90 °C, mantendo 10 s em cada temperatura e aumentando a uma taxa de 1 °C a cada 30 s. A temperatura de *melting* de cada condição foi determinada como a temperatura do ponto de inflexão do sinal de fluorescência.

3.2.2 Concentração enzimática e tempo de reação

As primeiras condições determinadas para a realização dos ensaios bioquímicos foram a concentração de enzima a ser utilizada e o tempo de reação. Para isso, esses parâmetros foram variados em reações de 100 µL utilizando tampão 50 mM citrato de sódio/ácido cítrico pH 6,0 e 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNP-araf) (Megazyme, Wicklow, Irlanda) 1 mM como substrato. O tampão e a temperatura, de 55 °C, foram selecionados com base no resultado do ensaio de deslocamento térmico.

Para o teste de concentração, a enzima foi utilizada em uma faixa de 1,5 a 55 µg/mL (concentração final), em reações de 5 minutos, e, para o teste de tempo, a concentração foi fixada em 2,5 µg/mL e tempos de reação na faixa de 1 a 25 minutos foram testados. Para interrupção das reações e revelação dos resultados, foram adicionados 100 µL de carbonato de cálcio 400 mM e, em seguida, as reações foram centrifugadas a 2000 RPM, por 5 minutos. Finalmente, 100 µL do sobrenadante foram coletados para medida de absorbância a 405 nm em espectrofotômetro SPECTRAmax Plus 384 (Molecular Devices, San José, EUA). As reações foram realizadas em duplicata, com amostra-controle em que a enzima não foi adicionada.

3.2.3 Perfis de pH e temperatura

Para obtenção dos perfis de pH e temperatura de *B1Abf43*, foram conduzidos ensaios em que, primeiramente, variou-se o pH na faixa 2,0-10,0 utilizando tampão acetato-borato-fosfato (100 mM), com temperatura fixa em 55 °C e, em seguida, variou-se a temperatura na

faixa de 30-75 °C, com pH fixo no valor ótimo determinado. As reações foram conduzidas e interrompidas conforme descrito anteriormente, com a concentração enzimática de 2,5 µg/mL e o tempo de reação de 5 minutos. O teste foi feito em triplicata, na presença de amostra-controle em que não se adicionou enzima.

3.2.4 Atividade residual

A avaliação da estabilidade da enzima foi testada em duas temperaturas diferentes: 45 °C e 55 °C. Para isso, uma solução da enzima a 50 µg/mL foi incubada nessas temperaturas e alíquotas de 10 µL foram coletadas depois de tempos específicos para realização de teste de atividade enzimática, em triplicata, conforme descrito previamente.

A partir dos dados de atividade residual, foi determinado o tempo de meia-vida da enzima para cada uma das temperaturas, isto é, o tempo após o qual a enzima retém metade de sua atividade inicial. Isso foi feito por meio do ajuste de uma função decaimento exponencial (equação 1) no conjunto de dados, utilizando o software OriginLab 2018. Na equação 1, $y(t)$ é a atividade residual relativa em um dado tempo t , $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima e A_0 e y_0 são parâmetros de ajuste.

$$y(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{t_{1/2}}\right) + y_0 \quad (1)$$

3.2.5 Determinação de parâmetros cinéticos

Modelo amplamente empregado para cinética enzimática, o modelo de Michaelis-Menten (equação 2) relaciona a velocidade inicial de conversão (v) com a concentração de substrato ($[S]$) por meio da velocidade máxima de conversão (V_{max}) e da constante de Michaelis (k_M). (53,54) A partir desse modelo, são determinadas a constante de Michaelis (k_M), definida como a concentração de substrato que faz com que a velocidade seja metade da velocidade máxima; o número de renovação (k_{cat}) que corresponde ao número de moléculas de substrato que uma molécula de enzima converte por unidade de tempo, obtida pela divisão de V_{max} pela concentração de enzima; e a eficiência catalítica (k_{cat}/k_M) que contabiliza o número de moléculas de produto geradas por unidade de tempo por concentração de substrato. Tais parâmetros de *BIAbf43* foram obtidos com pNP-araf e arabinosilano de trigo como substratos, em ensaios nos quais foi variada a concentração de substrato em uma faixa de 0,05-5,6 mM para o primeiro e 0,7-22 µM para o segundo.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{k_M + [S]} \quad (2)$$

Para pNP-araf, as reações foram conduzidas e interrompidas conforme metodologia previamente apresentada. Para arabinosilano de trigo, a atividade foi determinada através do método do açúcar redutor. (55) Resumidamente, *BlAbf43* a 0,4 mg/mL foi adicionada ao substrato arabinosilano de trigo em tampão 50 mM citrato de sódio/ácido acético, pH 6,0, e a reação de 100 µL foi conduzida em placa de PCR também por 5 minutos a 55 °C. Ao final do tempo, 100 µL de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados à reação, que foi aquecida a 95 °C por 5 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2000 RPM, por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante foram coletados para medida de absorvância a 540 nm.

As reações foram realizadas em triplicata e os valores de absorvância foram convertidos em concentração de produto por meio de uma curva padrão de 4-nitrofenol para pNP-araf e de arabinose para arabinosilano. O conjunto de dados foi ajustado à uma curva de Michelis-Menten, usando o software OriginLab 2018, para obtenção da velocidade máxima de conversão (V_{max}) e constante de Michaelis (k_M).

3.3 Ensaios de sinergismo

A determinação do sinergismo entre *BlAbf43* e xilanases na hidrólise de arabinosilano foi feita usando duas xilanases distintas. A primeira é uma xilanase pertencente à família GH10 identificada no organismo *Thermobacillus composti* (*TcXyn10*), enquanto a outra pertence à família GH11 e seu organismo de origem é *Paenibacillus xylanivorans* (*PxXyn11*). Ambas enzimas foram caracterizadas anteriormente e seus dados bioquímicos estão disponíveis na literatura. (49-50)

De posse dos perfis de pH e temperatura das três enzimas, foi definida a temperatura de 50 °C e o pH 6,0 (citrato de sódio/ácido cítrico, 50 mM) para condução dos testes de sinergismo, condições em que todas enzimas apresentam atividade significativa. Uma carga total de 40 mU de enzima foi empregada e, além das enzimas como monocomponentes, foram testadas combinações nas razões de 10:30, 20:20 e 30:10 (mU *BlAbf43*:mU xilanase), com testes separados usando *BlAbf43+TcXyn10* e *BlAbf43+PxXyn11*. Como substrato, foi utilizado 0,1% (m/m) arabinosilano de trigo, e a determinação dos produtos gerados foi feita pelo método do açúcar redutor, conforme anteriormente descrito.

O ensaio foi conduzido em triplicata, com a presença de controle em que nenhuma enzima foi adicionada. Realizou-se análise estatística do grau de sinergismo utilizando o software OriginLab 2018. Análise de variância (ANOVA) foi conduzida, com comparação de médias por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

O grau de sinergismo (GS) das enzimas foi calculado segundo a equação 3, em que $abs_{mistura}$ é a absorbância (a 540 nm) da amostra contendo combinação de enzimas, F_{xyn} é a fração de xilanase presente na mistura, abs_{xyn} é a absorbância da amostra hidrolisada apenas com xilanase, F_{abf} é a fração de arabinofuranosidase presente na mistura e abs_{abf} é a absorbância da amostra hidrolisada apenas com arabinofuranosidase. Para exemplificar, tomemos a amostra em que xilanase e arabinofuranosidase foram combinadas na proporção de 10:30. A absorbância dessa amostra é $abs_{mistura}$, F_{xyn} vale 0,25 (10/40) e F_{abf} vale 0,75 (30/40). Dessa definição, decorre, naturalmente, que as amostras hidrolisadas apenas com xilanase ($abs_{mistura}=abs_{xyn}$; $F_{xyn}=1$; $F_{abf}=0$) ou apenas com arabinofuranosidase ($abs_{mistura}=abs_{abf}$; $F_{xyn}=0$; $F_{abf}=1$) possuem $GS=1$, e que $GS > 1$ implica que a combinação das enzimas deu resultado maior que a soma das enzimas separadamente.

$$GS = \frac{abs_{mistura}}{(F_{xyn} \cdot abs_{xyn}) + (F_{abf} \cdot abs_{abf})} \quad (3)$$

3.4 Pré-tratamento da biomassa

Para desestruturação do complexo lignocelulósico presente no bagaço de cana-de-açúcar, foi realizado o pré-tratamento alcalino da biomassa, uma estratégia simples e eficiente para remoção de lignina. (56)

O bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente cedido por Raízen (Piracicaba, Brasil) foi seco em estufa, moído em moinho de facas e teve sua umidade aferida em balança MOC-120H (Shimadzu, Quioto, Japão). Em seguida, foram adicionados 300 mL de solução NaOH 1% (m/v) em 30 g (massa seca) de biomassa, e homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. A mistura foi então levada para autoclave, por 40 minutos a 121 °C.

Após despressurização da autoclave e resfriamento do material, foi feita filtragem para recuperação da fração sólida, que foi extensivamente lavada, até neutralização do pH. O material foi então colocado para secar em estufa de circulação a 50 °C, novamente moído e armazenado em sacos plásticos em temperatura ambiente para análises subsequentes.

3.5 Caracterização química da biomassa

A determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento foi realizada de acordo com metodologia já estabelecida na literatura. (57–59) Em síntese, 1 g (massa seca) do material foi hidrolisado com 10 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 7 minutos a 45 °C. Em seguida, o ácido foi diluído para 4% e a mistura foi levada à autoclave por 30 minutos a 121 °C e, após resfriamento e despressurização, o material foi filtrado para separação das frações sólida e líquida. O procedimento foi realizado em triplicata.

A fração sólida foi seca em estufa de circulação a 50 °C por 1 dia e pesada para determinação da proporção de lignina insolúvel. A secagem total dos sólidos foi confirmada deixando o material a 105 °C em mufla e verificando que sua massa não se alterava. A fração líquida teve seu volume completado para 500 mL e foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (do inglês, HPLC), para determinação dos carboidratos e ácidos estruturais. A partir da fração líquida, também se determinou a proporção de lignina solúvel, por meio da medida de absorvância a 280 nm. A obtenção da concentração de lignina solúvel (C) a partir do valor de absorvância (A) foi feito de acordo com a equação 4, em que ε é a absorvância da lignina, com valor de $4,187 \cdot 10^{-2} \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e b é o coeficiente linear, com valor de $-3,279 \cdot 10^{-4} \text{ g/L}$. (60)

$$C = \varepsilon \cdot A + b \quad (4)$$

A técnica cromatográfica foi conduzida em sistema LC-20 (Shimadzu, Quito, Japão), equipado com coluna HPX-87H, acondicionada a 65 °C (Bio-rad, Hercules, EUA) e detector de índice de refração. Como eluente, foi utilizada 5 mM H₂SO₄ com fluxo de 0,6 mL/min, em corrida de 60 minutos, com volume de injeção de 20 µL. Curvas-padrão para quantificação de arabinose, glicose, xilose e ácido acético (todos Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram preparadas e, a partir das concentrações desses compostos no hidrolisado, foram determinadas as proporções de glucano, xilano, arabinose e grupos acetil no material lignocelulósico.

Finalmente, a determinação das cinzas foi realizada por meio da queima do material em mufla programada para rampa de temperatura, sendo 1 hora a 200 °C, seguida de 1 hora a 400 °C e 2 horas a 800 °C. A proporção de cinzas foi determinada pela massa obtida após a queima em relação à massa seca inicial, em triplicata.

3.6 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar sujeito ao pré-tratamento alcalino foi hidrolisado com xilanases (*TcXyn10* e *PxXyn11*) e *BlAbf43* para produção de xilooligossacarídeos pré-bióticos. As enzimas foram utilizadas sozinhas e na combinação que rendeu maior grau de sinergismo no experimento anteriormente descrito (seção 3.3). Uma carga enzimática total de 40 mU foi aplicada em 100 mg de substrato em uma reação de volume total 1,15 mL, realizada em tampão 50 mM citrato de sódio/ácido cítrico pH 6,0, por 3 horas a 50 °C, em duplicatas e na presença de controle em que não foram adicionadas quaisquer enzimas.

A reação foi interrompida com aquecimento a 95 °C por 5 minutos e posterior centrifugação a 13300 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado, utilizando filtro de seringa 0,22 µm, para análise de mono e oligossacarídeos em cromatografia de troca aniônica de alta performance (do inglês, HPAEC).

A cromatografia foi realizada em sistema Dionex ICS-3000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA), equipado com coluna CarboPac PA20 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) e detector de amperometria pulsada (do inglês, PAD). A coluna foi acondicionada a 30 °C e, como eluente, foram utilizados 200 mM NaOH e um gradiente linear de acetato de sódio de 0 a 100 mM em 30 minutos, com posterior reequilíbrio da coluna em 100 mM NaOH. Foi utilizado fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 5 µL. Padrões de xilooligossacarídeos lineares (Megazyme, Wicklow, Irlanda), de arabinofuranosil-xilooligossacarídeos (AXOS) (Megazyme, Wicklow, Irlanda) e de monossacarídeos (fucose, arabinose, glicose, galactose, xilose e manose, todos Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizados para identificação e quantificação dos produtos de hidrólise.

3.7 Perfil de produto liberado a partir de oligossacarídeos

Para avaliar a capacidade da enzima de hidrolisar oligossacarídeos e entender seu padrão de clivagem, reações foram conduzidas utilizando AXOS e XOS lineares como substratos, a uma concentração final de 0,2 mg/mL, com 0,4 mg/mL de enzima em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 50 mM pH 6,0. A reação foi incubada a 55 °C por 5 minutos. Foram utilizados como substratos: 3²-α-L-Arabinofuranosil-xilobiose (A3X), 2³-α-L-Arabinofuranosil-xilotriose (A2XX), 3³-α-L-Arabinofuranosil-xilotetraose (XA3XX),

xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5), todos Megazyme (Wicklow, Irlanda). Para maior clareza, as estruturas moleculares desses substratos estão mostradas na Figura 4.

A reação foi interrompida fervendo as amostras a 95 °C por 5 minutos. Em seguida, elas foram centrifugadas a 13300 RPM por 5 minutos e filtradas em filtros de seringa para análise em HPAEC-PAD. A cromatografia foi realizada em sistema ICS-5000 (Dionex, Sunnyvale, EUA), equipado com coluna CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, EUA), acondicionada a 30 °C e utilizando como eluente gradiente de acetato de sódio de 0 a 120 mM (em 100 mM NaOH) em 15 minutos, com posterior limpeza da coluna utilizando gradiente de acetato de sódio de 120 mM a 1M (em 100 mM NaOH) em 5 minutos e reequilíbrio da coluna em 100 mM NaOH por 8 minutos.

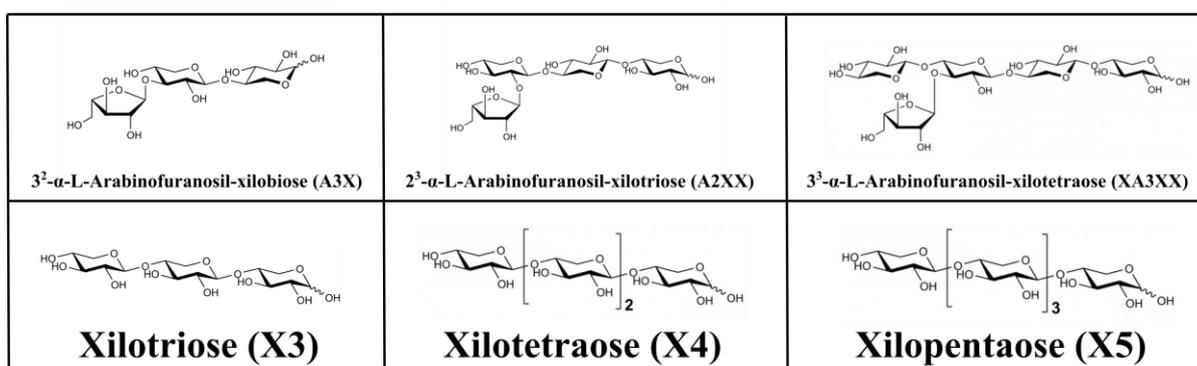


Figura 4 – Estruturas moleculares dos substratos testados em *B/A*b43. Na primeira linha, os três arabinofuranosil-xilooligosacarídeos (AXOS), todos com uma única unidade de arabinose, substituída por meio de ligação α -1,3 em A3X e XA3XX e por meio de ligação α -1,2 em A2XX. Esses substratos diferem no tamanho da cadeia de xiloses (2 unidades em A3X, 3 em A2XX e 4 em XA3XX) e no posicionamento da ramificação, estando na unidade de xilose da extremidade não redutora em A3X e em A2XX e na unidade de xilose adjacente a esta em XA3XX. Na segunda linha, estão os três xilooligosacarídeos lineares testados, diferindo na extensão da cadeia de xiloses.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.8 Modelo tridimensional, *docking* molecular e análise estrutural

O modelo tridimensional da proteína foi obtido utilizando algoritmo de predição AlphaFold 2 (61), implementado por meio do ColabFold (62), com configurações padrão. Geraram-se 5 modelos do domínio catalítico, que foram classificados de acordo com o pLDDT, e o modelo de maior confiabilidade (maior pLDDT) foi submetido a relaxação usando campo de forças Amber. (63) Para avaliação da posição e da forma do sítio catalítico, a superfície eletrostática da proteína foi revelada utilizando o complemento PyMOL's APBS Electrostatic

do *software* PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC), que foi utilizado para análise do modelo, geração de figuras e também superposição com modelos cristalográficos depositados no Protein Data Bank – PDB. (64)

Os modelos selecionados para superposição foram obtidos por meio de alinhamento local da sequência do módulo catalítico de *BIAbf43* com as sequências disponíveis no PDB, utilizando o algoritmo BLASTp. (65) Uma arabinosilano-arabinofuranohidrolase de *Bacillus subtilis*, que pertence à família GH43 (*BsAXH-m2,3* - PDB 3C7G) foi superposta com o modelo de *BIAbf43* para identificação dos resíduos de aminoácidos conservados que interagem com o substrato, bem como para identificação dos resíduos catalíticos.

Para melhor compreensão do modo de encaixe do substrato no sítio catalítico de *BIAbf43*, modelos de um substrato ramificado (A2XX) e de um não ramificado (X4) foram obtidos por meio da ferramenta *Carbohydrate Builder*, do GLYCAM-web (<https://glycam.org/>) e estes foram usados como ligantes para *docking* molecular sobre o modelo preditivo de *BIAbf43*, utilizando a ferramenta SwissDock. (66) Os clusters foram visualizados e avaliados por meio do *software* Chimera (67), versão 1.17.3 e as figuras foram elaboradas utilizando o *software* PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Expressão heteróloga e purificação da arabinofuranosidase

O processo de expressão heteróloga de *BIAbf43* em *E. coli* da cepa Arctic Express, bem como os passos de purificação por cromatografia de afinidade por metal imobilizado, foram bem sucedidos como pode ser observado na Figura 5. A Figura 5 A evidencia que, na primeira etapa de purificação, grande quantidade de proteína é eluída em 250 mM de imidazol, o que acarreta saturação do gel e dificuldade em estimar sua massa molecular a partir dessa fração, que também apresenta, em menor proporção, outras proteínas de diversas massas. Nas frações não ligada, de lavagem e de eluição em 500 mM de imidazol é possível perceber uma banda, de menor intensidade comparada com aquela da eluição, entre as marcações de 75 e 100 kDa, que provavelmente representa *BIAbf43* e se deve à saturação da resina de níquel. Tal migração é compatível com a massa de 84 kDa predita a partir da sequência de aminoácidos de *BIAbf43* com seus domínios auxiliares, *tag* de histidinas e tiorredoxina.

A Figura 5 B mostra, primeiramente, o sucesso da proteólise da cauda de histidinas, uma vez que, após o processo, a banda que migrava entre 75 e 100 kDa, passa a migrar até a região entre 63 e 75 kDa. Esse resultado é compatível com a perda de 14 kDa esperada pela perda da cauda de histidinas e da tiorredoxina, fazendo com *BIAbf43* (com seus domínios auxiliares) tenha uma massa predita de 70 kDa sem esse fragmento. Corroborando essa ideia, tal banda foi observada nas frações não ligada e de lavagem na segunda etapa de purificação, e nenhuma banda foi identificada na fração de eluição. Essa figura também mostra a pureza das frações, que apresentam banda única.

Esses resultados mostram que *BIAbf43* foi produzida e purificada com sucesso, com rendimento de aproximadamente 40 mg de proteína pura por litro de cultura e novas etapas de purificação não se mostraram necessárias antes da realização da caracterização bioquímica.

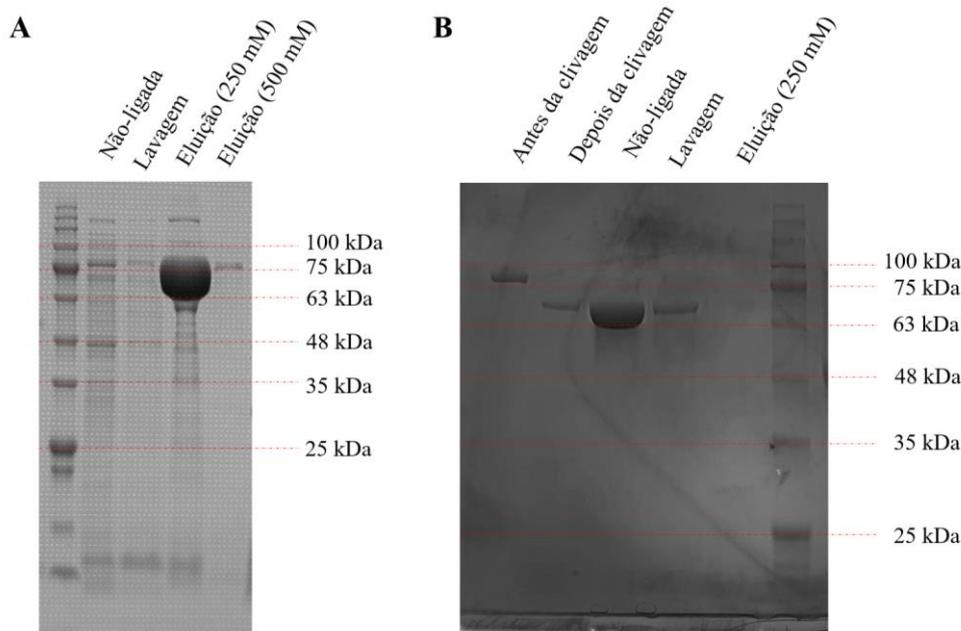


Figura 5- Imagens de gel SDS-Page avaliando (A) o primeiro processo de purificação por cromatografia de afinidade por metal imobilizado e (B) o segundo processo de purificação, utilizando a mesma técnica, após proteólise da *tag* de histidinas e da tiorredoxina, evidenciando o sucesso da clivagem, que deve resultar em perda de massa de 14 kDa.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Ensaio enzimáticos

4.2.1 Ensaio de deslocamento térmico (Thermofluor)

O ensaio de deslocamento térmico avaliou a estabilidade de *BIAbf43* em 48 diferentes tampões, que estão listados na Figura 6, juntamente com as respectivas temperaturas de *melting* (T_m). Esse parâmetro indica a temperatura na qual metade da população de moléculas encontra-se desnaturada, dessa forma, quanto maior T_m , maior é a estabilidade da proteína naquela condição.

Os dados da Figura 6 mostram que tampões na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 foram aqueles onde se mediram as maiores T_m . O maior valor de T_m foi de 64 °C para acetato de amônio, pH 7,3, e outros tampões, como MES (pH 6,5), Bis-Tris (pH 6,2 e 6,7) e cacodilato de sódio (pH 6,5) também se mostraram adequados para o armazenamento de *BIAbf43*, com T_m de 63 °C. Tampões frequentemente usados em ensaios bioquímicos, como citrato de sódio (pH 5,5) e fosfato de sódio (pH 5,5) não se mostraram impeditivos para a estabilidade de *BIAbf43*, com T_m de 61 e 62 °C, respectivamente.

A presença de 300 mM de NaCl não impactou significativamente T_m para tampões de pH próximos ao neutro (6,0-8,0), com diminuição menor que 3 °C na presença do sal. Para tampões ácidos, no entanto, a presença de cloreto de sódio provocou redução de até 11 °C na T_m , como observado em Bis-Tris (pH 5,5).

Esses dados foram usados para a definição dos valores de pH e de temperatura a serem fixados nos primeiros testes bioquímicos: foram selecionados tampão citrato de sódio, pH 6,0, em uma temperatura de 55 °C, que é aproximadamente 10 °C abaixo da temperatura de *melting* máxima observada.

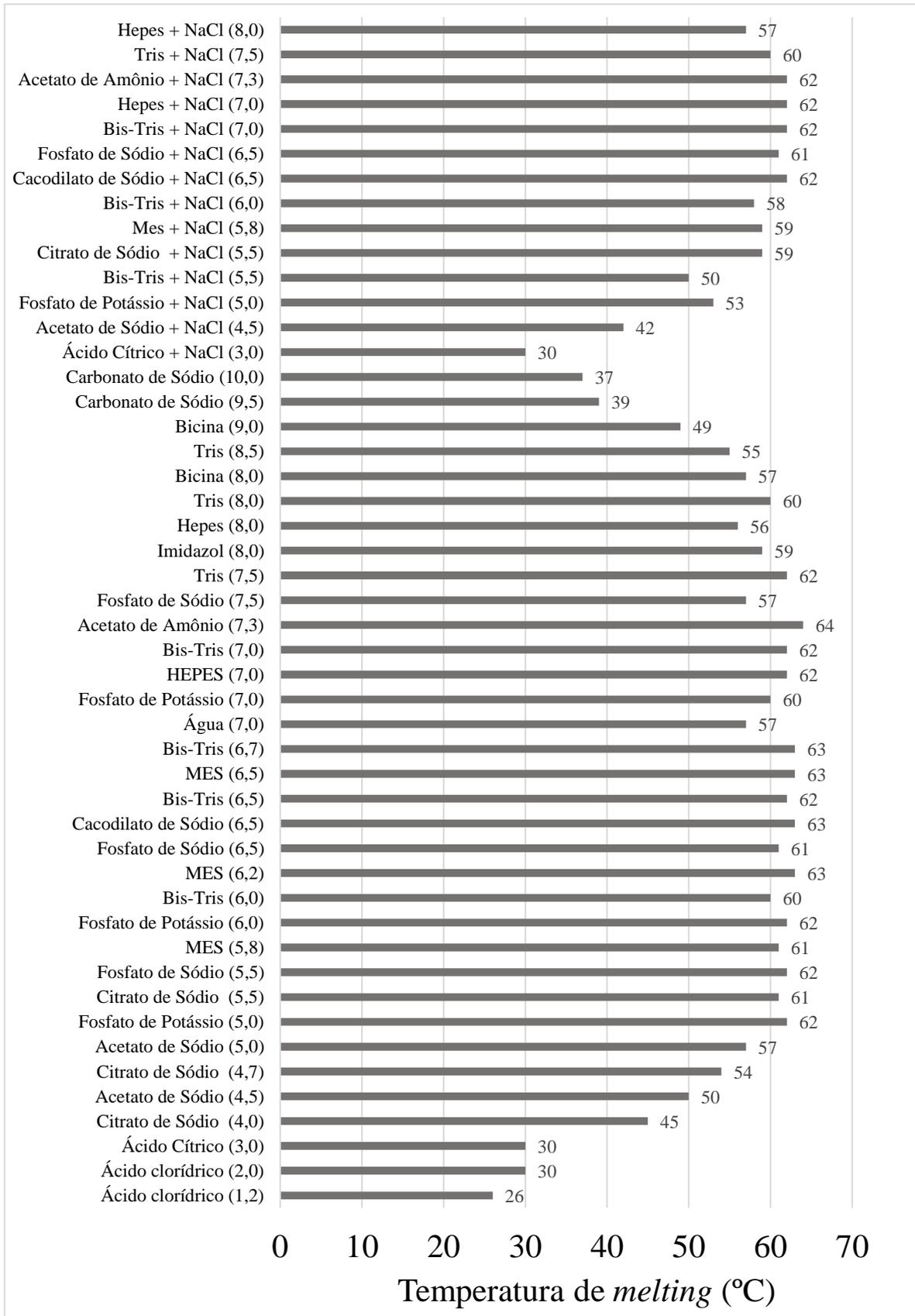


Figura 6 - Medidas de temperatura de *melting* para cada um dos 48 tampões testados no ensaio de deslocamento térmico. Entre parênteses, à direita da identificação de cada tampão, está o respectivo pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.2 Concentração enzimática e tempo de reação

Os primeiros parâmetros de reação a serem investigados foram a concentração de enzima e o tempo de reação, utilizando 1 mM pNP-araf como substrato. Foi feita a medida da atividade enzimática com a variação de cada um desses parâmetros separadamente, e os resultados podem ser visualizados na Figura 7. Na faixa entre 1,65 e 13,25 $\mu\text{g/mL}$, o efeito do aumento da concentração enzimática foi um incremento proporcional na quantidade de produto gerado. Para concentrações enzimáticas maiores, observou-se incremento menor na quantidade de produto, que rapidamente atinge um máximo (Figura 7 A).

Efeito similar foi observado com o aumento do tempo de reação (Figura 7 B), avaliado entre 1 e 25 minutos: aumento proporcional na concentração de produto até 5 minutos e estagnação para tempos maiores. De posse desses dados, foram fixadas a concentração de enzima em 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de reação em 5 minutos, valores que estão dentro da faixa onde se observa relação proporcional com a quantidade de produto gerado.

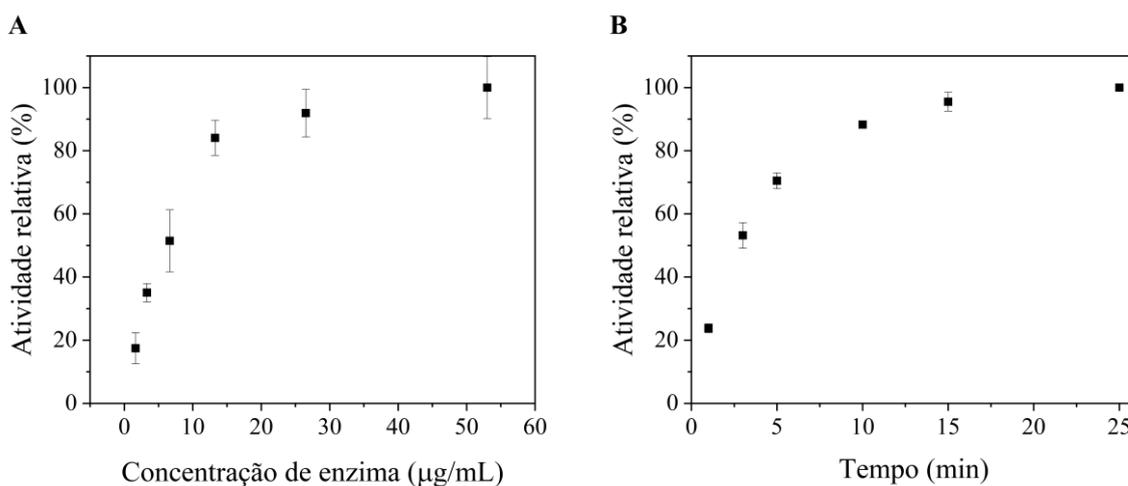


Figura 7 - Avaliação da atividade de *BlAbf43* com a variação (A) da concentração enzimática e (B) do tempo de reação. Os resultados são expressos como média de duplicatas e o erro é dado pelo desvio padrão ($n=2$).
Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.3 Perfis de pH e temperatura

Tendo em vista que o emprego de arabinofuranosidases frequentemente se dá em conjunto com outras hemicelulases no contexto de desestruturação da biomassa lignocelulósica, é crucial conhecer, além dos valores ótimos, os perfis de pH e temperatura da enzima, para que

uma condição adequada de hidrólise possa ser selecionada. Dessa forma, a atividade de *BIAbf43* foi avaliada em diferentes pH e temperaturas, utilizando 1 mM pNP-araf como substrato, e os resultados são mostrados na Figura 8.

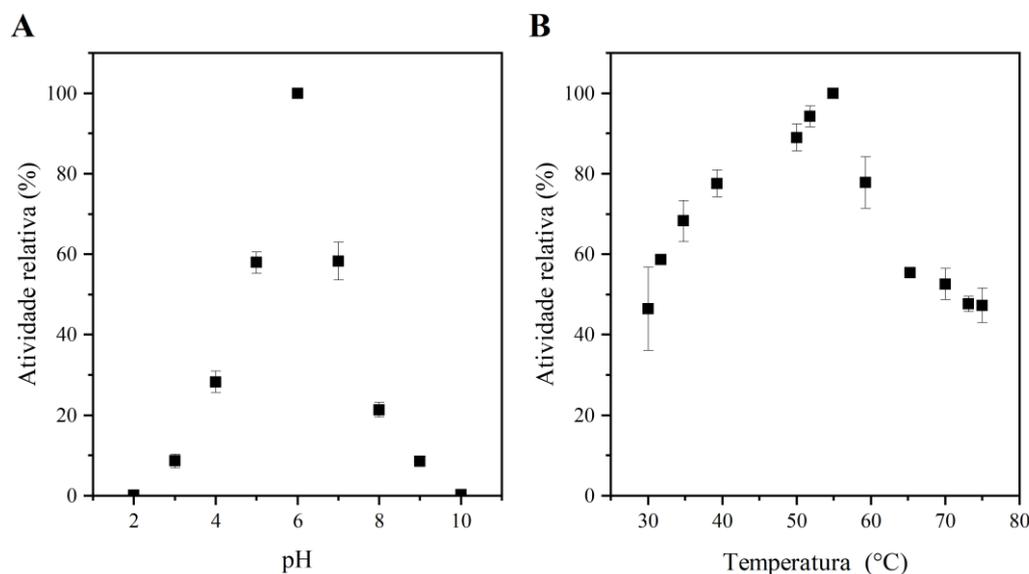


Figura 8 - Perfis de (A) pH e (B) temperatura de *BIAbf43*. Os resultados são expressos como média de triplicatas e o erro é dado pelo desvio padrão (n=3).

Fonte: Elaborada pelo autor

O pH ótimo de *BIAbf43* foi identificado como 6,0, apresentando um perfil restrito em tampão Acetato-Borato-Fosfato, com atividade maior que 50% na faixa entre 5,5 e 6,5 (Figura 8 A). Esse resultado é compatível com o observado no ensaio de deslocamento térmico, uma vez que a proteína demonstrou estabilidade nessa faixa de pH. Ademais, ainda baseado nos resultados de Thermofluor, é possível que uma atividade maior na faixa de pH entre 6,0-8,0 seja obtida com uma escolha diferente de tampão. Esse perfil de pH é semelhante ao observado para uma α -L-arabinofuranosidase da família GH43 de *Bifidobacterium adolescentis* e também ao de uma da família GH51 de *Bifidobacterium longum* B667 descritas na literatura (68-69), nas quais também se identificou pH ótimo de 6,0 e atividade em uma faixa mais ampla, de 4,5 a 7,5, embora no segundo caso se tenha usado tampão McIlvaine, cujo efeito tamponante se restringe à faixa entre 2,2 e 8,5. (70)

O perfil de temperatura de *BIAbf43* se mostrou bastante amplo, com atividade superior a 75% na faixa entre 40 e 60 °C e valor ótimo de 55 °C (Figura 8 B). A 37 °C, temperatura aproximada do intestino humano, onde *Bifidobacterium longum* pode ser encontrada, sua atividade é entre 68% e 78% da máxima. De maneira geral, arabinofuranosidases de origem bacteriana apresentam pH próximo ao neutro e atividade na faixa de 50 a 90 °C (31), o que pôde

ser observado em *BlAbf43*. Novamente, o perfil de temperatura se assemelha àquele observado para *AbfA*, da família GH43, de *Bifidobacterium adolescentis*, que tem atividade maior que 70% da máxima entre 40 e 60 °C e ótima em 50 °C (69), também sendo compatível com o perfil da arabinofuranosidase da família GH51 de *Bifidobacterium longum*, que apresenta atividade maior que 70% da máxima entre 30 e 60 °C, embora a temperatura ótima identificada para esta seja de 45 °C. (68)

Esses resultados, quando comparados aos perfis de pH e temperatura de xilanases de *Thermobacillus composti* (*TcXyn10*) e *Paenibacillus xylanivorans* (*PxXyn11*), anteriormente caracterizadas (49-50), evidenciam a possibilidade de combinação dessas enzimas de atividades complementares em estudos sinérgicos. Particularmente, tais estudos podem ser conduzidos a 50 °C e pH 6,0, condição em que todas as enzimas apresentam alto percentual de atividade em relação às suas respectivas máximas.

4.2.4 Atividade residual

A estabilidade térmica de proteínas é um fator preponderante para a viabilidade de seu emprego industrial, uma vez que é importante garantir que o catalisador esteja viável durante todo o tempo do bioprocessamento. Essa propriedade é reflexo de uma série de fatores, como (i) o efeito hidrofóbico, pelo qual regiões hidrofóbicas ficam internalizadas na estrutura terciária, formando um núcleo hidrofóbico, cujas interações favorecem a termoestabilidade (71) e (ii) a quantidade e extensão de alças, cuja mobilidade concorre para facilitar o início de um processo de desenovelamento, entre outros fatores relacionados à sequência e à estrutura tridimensional do peptídeo. (71) A resistência térmica de *BlAbf43* foi avaliada na temperatura ótima (55 °C) e 10 °C abaixo (45 °C), e os resultados em cada uma das temperaturas podem ser encontrados nas Figuras 9 A e B, respectivamente.

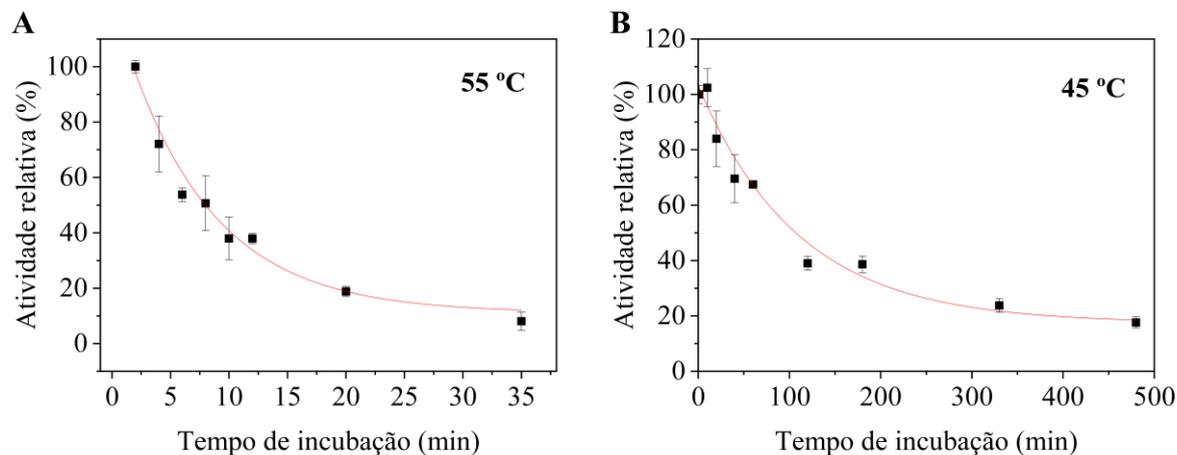


Figura 9 - Atividade residual de *BIAbf43* a (A) 55 °C e (B) 45°C. Em vermelho, as curvas correspondentes ao modelo matemático (equação 1) ajustado ao conjunto de dados pelo software OriginLab2018. Os resultados são expressos como média de triplicatas e o erro é dado pelo desvio padrão (n=3).

Fonte: Elaborada pelo autor

O modelo mais frequentemente usado para relacionar a atividade enzimática com o tempo de incubação é o modelo de decaimento exponencial, mostrado na equação 1 (72), com o qual é possível definir a meia-vida da enzima como parâmetro para medir sua estabilidade. Os dados experimentais para *BIAbf43* foram ajustados ao modelo, e o valor dos parâmetros, bem como a qualidade do ajuste, podem ser vistos na Tabela 1. A meia-vida de *BIAbf43* foi de aproximadamente 7,5 minutos na temperatura ótima e de 1 hora e 50 minutos a 45 °C, um resultado que é coerente com o fato de que, a despeito de a temperatura ótima da enzima ser 55 °C, na natureza, tal enzima deve catalisar reações a 37 °C, uma temperatura muito menor. Esse resultado mostra a possibilidade do emprego de *BIAbf43*, em temperaturas menores que a ótima, para processos de algumas horas.

Tabela 1 - Parâmetros de ajuste dos dados experimentais de atividade residual a um modelo de decaimento exponencial, descrito pela equação 1

Parâmetros de ajuste	55 °C	45 °C
A_0	113,2 ± 7,2	85,8 ± 4,4
$t_{1/2}$ (min)	7,5 ± 1,3	110,5 ± 13,1
γ_0	11,1 ± 5,2	17,4 ± 3,0
R^2	0,97	0,98

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.5 Determinação de parâmetros cinéticos

BlAbf43 teve sua atividade avaliada em concentrações variadas de pNP-araf e arabinosilano de trigo para determinação de seus parâmetros cinéticos em cada um dos substratos e avaliação de sua eficiência frente a outras enzimas descritas na literatura. Os resultados do ensaio de sinergismo estão mostrados na Figura 10.

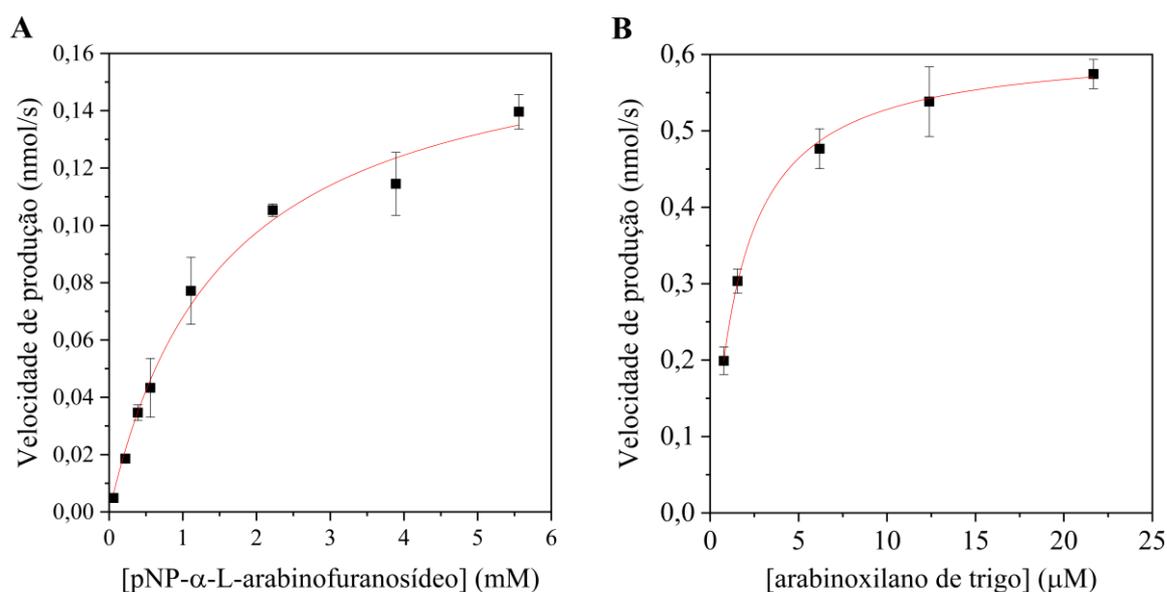


Figura 10- Dados do ensaio cinético utilizando como substratos pNP-araf (A) e arabinosilano de trigo (B). Dados experimentais são representados pela média de triplicatas e os erros são dados pelo desvio padrão ($n=3$). A curva em vermelho representa o modelo matemático da curva de Michaelis-Menten (equação 2) ajustado ao conjunto de dados pelo software OriginLab 2018.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir do conjunto de dados da Figura 10, foi ajustado o modelo de Michaelis-Menten (equação 2), por meio do qual foram determinados os parâmetros cinéticos registrado na Tabela 2. É possível perceber que o número de renovação (k_{cat}) de *BlAbf43* é aproximadamente 47 vezes maior para pNP-araf comparado com arabinosilano de trigo, compatível com uma atividade específica de 31 ± 2 U/mg para o primeiro substrato e de $1,7 \pm 0,2$ U/mg para o segundo (ambos medidos a 50°C , por 5 minutos), o que pode ser explicado pelo fato de o substrato sintético apresentar estrutura química mais simples e compacta, permitindo que uma mesma molécula de enzima catalise maior número de hidrólises.

Por outro lado, a afinidade de *BlAbf43*, que possui relação inversa com k_M , se mostrou cerca de 1000 vezes maior pelo arabinosilano de trigo, sugerindo que a arquitetura do sítio catalítico da enzima provavelmente comporta, além do resíduo de arabinose, o esqueleto

principal do xilano, estabelecendo, com ele, interações de hidrogênio ou de empilhamento, por exemplo, as quais não ocorrem com pNP-araf. Por conta dessa disparidade de afinidades, a eficiência catalítica de *B*lAbf43 se mostrou maior por arabinoxilano de trigo que por pNP-araf, o que é compatível com o observado antes em outras enzimas da mesma família e subfamília de *B*lAbf43 (73-74), oriundas de *Bacillus*, que apresentaram atividade específica maior para o polissacarídeo.

Tabela 2- Parâmetros cinéticos de *B*lAbf43 medidos em pNP-araf e arabinoxilano de trigo

Parâmetro cinético	pNP-araf	Arabinoxilano de trigo
V_{\max} (nmol/s)	$0,17 \pm 0,01$	$0,613 \pm 0,006$
K_M	$1,5 \pm 0,2$ mM	$1,60 \pm 0,05$ μ M
k_{cat} (s^{-1})	47 ± 3	$1,07 \pm 0,01$
k_{cat} / K_M	31 ± 5 s^{-1} mM^{-1}	$0,67 \pm 0,02$ s^{-1} μM^{-1}

Fonte: Elaborada pelo autor

Considerando a relativa escassez de dados de afinidade de arabinofuranosidases por arabinoxilano de trigo, *B*lAbf43 se destaca nesse quesito comparativamente aos dados levantados recentemente por Pisalwar *et al.* (31) e ao banco de dados BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>). Tomando a totalidade das propriedades bioquímicas de *B*lAbf43 investigadas até aqui, fica claro seu potencial para emprego no contexto de desconstrução de biomassa lignocelulósica, em conjunto com outras enzimas, para obtenção de produtos de valor agregado.

4.3 Ensaio de sinergismo

A aplicação de *B*lAbf43 para desconstrução de arabinoxilano foi estudada em conjunto com xilanases das famílias GH10 e GH11, as quais possuem diferentes restrições à disposição das ramificações. Para isso, *B*lAbf43, *Tc*Xyn10 e *Px*Xyn11 foram combinadas em diversas proporções para despolimerização de arabinoxilano de trigo, o qual apresenta 38% de ramificações, e os resultados estão apresentados na Figura 11.

A combinação de *B*lAbf43 com *Tc*Xyn10 (Figura 11 A) resultou efeito sinérgico entre as enzimas, com a mistura gerando mais produto que a soma das enzimas separadamente. O grau de sinergismo (GS) depende da proporção entre as enzimas, aumentando com o aumento da proporção de arabinofuranosidase, até atingir um máximo de 1,35, observado na combinação equitativa (em termos de unidades de atividade) de xilanase com arabinofuranosidase (20:20).

A partir dessa proporção, o aumento da quantidade relativa de arabinofuranosidase resultou no decréscimo do GS.

Por outro lado, a combinação de *B/Abf43* com *PxXyn11* (Figura 11 B), apresentou um comportamento diferente, com GS sempre crescendo com a proporção de arabinofuranosidase dentro do intervalo avaliado, atingindo um máximo de 1,7 na proporção de 10 mU de xilanase para 30 mU de arabinofuranosidase (10:30). Dessa forma, fica demonstrado que a atividade da enzima da família GH11 se beneficia em maior intensidade da presença da arabinofuranosidase, e em quantidades maiores desta.

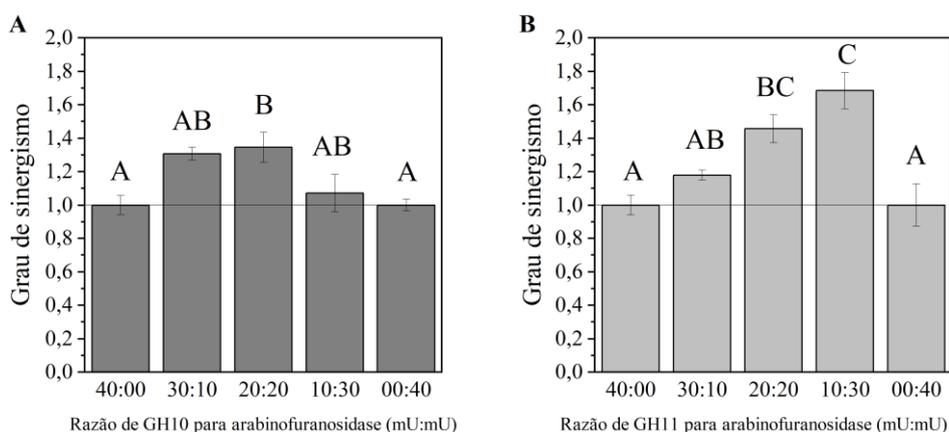


Figura 11 - Resultados do grau de sinergismo medido para a combinação de *B/Abf43* com as endo-xilanases (A) *TcXyn10* e (B) *PxXyn11* em diversas proporções. Graus de sinergismo maiores que 1 indicam que a combinação das enzimas produz mais produto que as enzimas separadamente somadas, conforme visto na equação 2. Colunas rotuladas com letras distintas apresentam médias significativamente distintas, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$), conduzido no software OriginLab 2018. Os resultados são apresentados como média de triplicatas, e o erro é dado pelo desvio-padrão ($n=3$).

Fonte: Elaborada pelo autor

Esse resultado é compatível com as conhecidas restrições estruturais de enzimas das famílias GH10 e GH11 quanto a ramificações no esqueleto de xilano. As xilanases da família GH10 apresentam maior permissividade a ramificações, necessitando apenas duas unidades de xilose consecutivas sem substituintes para realizar a hidrólise, ao passo que xilanases da família GH11 possuem uma cavidade catalítica mais restrita, e requerem três unidades consecutivas de xilose sem substituintes para clivagem eficiente, como visto nas Figuras 3 B e C. (18) Assim, xilanases da família GH11 devem ter atividade mais elevada na presença de maiores quantidades de arabinofuranosidase, que removem as decorações do esqueleto de xilano, disponibilizando mais sítios de clivagem que atendam às restrições das xilanases GH11, sobretudo na presença de um substrato altamente ramificado, como o arabinoxilano de trigo.

Esses resultados comprovam que *B/Abf43* é uma ferramenta enzimática eficiente para melhorar rendimentos de produção de xilooligossacarídeos, atuando em sinergismo com

xilanases, destacadamente aquelas da família GH11. Resta investigar, no entanto, se tal efeito também pode ser observado ao utilizar um substrato de menor grau de substituição, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar, um insumo muito utilizado no âmbito biotecnológico para produção de XOS. Ademais, convém também aprofundar a análise dos produtos gerados, identificando seu grau de polimerização e quantidades relativas entre os oligômeros.

4.4 Caracterização química da biomassa

O reaproveitamento de rejeitos agroindustriais para geração de produtos de valor agregado a partir de sua fração hemicelulósica, passa, necessariamente, por um processo de pré-tratamento que visa reduzir a recalcitrância do complexo lignocelulósico. Nesse contexto, o pré-tratamento alcalino é um procedimento simples e eficiente no contexto da produção de XOS. (5,75) Os impactos do pré-tratamento sobre a composição química do bagaço de cana-de-açúcar foram avaliados e podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a realização do pré-tratamento alcalino. A comparação entre as composições dos dois materiais revela o impacto causado pelo pré-tratamento alcalino sobre a biomassa. Os resultados são expressos como média de triplicatas e o erro é dado pelo desvio padrão (n=3).

Componente	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço álcali
Glucano	37.50 ± 0.20%	46.20 ± 0.20%
Xilano	23.10 ± 0.09%	24.70 ± 0.10%
Lignina total	25.00 ± 0.40%	12.70 ± 0.30%
Arabinose	2.70 ± 0.09%	2.68 ± 0.20%
Grupos acetil	3.01 ± 0.04%	0%
Cinzas	4.90 ± 0.10%	2.40 ± 0.50%
Extrativos	0.90 ± 0.20 %	Não medido
Total	97 ± 1 %	89 ± 1 %

Fonte: Elaborada pelo autor

Inicialmente, fica evidente que o pré-tratamento foi eficiente para promover a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, com o teor de lignina reduzido à metade após o

pré-tratamento. Balanceando a queda na proporção de lignina, as proporções de xilano e glucano aumentaram, este último de maneira mais significativa, com incremento de quase 9%. Levando-se em conta a proporção de recuperação de sólidos, que foi de 60%, é possível observar a conservação de 74% do glucano da biomassa original e de 55% do xilano, ao passo que apenas cerca de 8% da lignina inicial se encontra na fração sólida da biomassa pré-tratada.

Esses dados revelam, ainda, detalhes a respeito da estrutura molecular do xilano encontrado na cana-de-açúcar. No material *in natura*, a proporção molar de substituintes indica que o xilano possui aproximadamente 11% de ramificações de arabinose e 45% de acetilações, que é compatível com levantamentos disponíveis na literatura. (10) A composição de bagaço álcali mostra que as substituições de arabinose não são afetadas pelo pré-tratamento, permanecendo com a mesma proporção relativa à xilose, ao passo que as acetilações são totalmente removidas pelo pré-tratamento, um efeito decorrente da neutralização dos grupos acetil pelo hidróxido de sódio, e que já foi observado, por exemplo, no tratamento de sabugo de milho. (45)

Diante dos dados apresentados, observa-se que o pré-tratamento alcalino foi efetivo em reduzir o teor de lignina na biomassa, e, portanto, sua recalcitrância, tornando-o um material promissor para hidrólise enzimática. Um outro fator que favorece a hidrólise enzimática desse material é que o xilano presente no bagaço pré-tratado é desprovido de acetilações, que dificultam o acesso de xilanases ao esqueleto principal do xilano, sobretudo se estiverem fisicamente próximas de outras ramificações, o que prejudica o rendimento de XOS. (18) Resta, assim, avaliar o rendimento de XOS a ser obtido a partir da hidrólise enzimática desse material utilizando xilanases e *BlAbf43* como enzima acessória, uma vez que já se constatou que essas ferramentas são capazes de atuar em sinergia.

4.5 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Uma vez que os alvos enzimáticos e o substrato foram caracterizados, foi possível prosseguir com a aplicação de *BlAbf43* e xilanases nas proporções identificadas anteriormente como as de maior grau de sinergismo para desconstrução do arabinoxilano de cana-de-açúcar, produzindo, dessa forma, xilooligossacarídeos. Para compreender os incrementos nos rendimentos de XOS e verificar possíveis mudanças nos perfis de produto liberado, foram realizadas hidrólises com as xilanases sozinhas e na presença da arabinofuranosidase e a fração solúvel foi analisada por cromatografia.

A Figura 12 A mostra, qualitativamente, os oligossacarídeos presentes em cada hidrolisado. É possível notar que *PxXyn11* produz variedade maior de produtos quando comparada com *TcXyn10*, sendo que a primeira gera XOS com grau de polimerização entre 2 e 5 (em especial X3 e X4), ao passo que a segunda gera majoritariamente X2 e X3. Esse padrão é compatível com o que foi anteriormente descrito para essas enzimas (49,50) e corrobora o perfil típico das famílias a que essas enzimas pertencem, sendo que hidrolases da família GH10 geram menor variedade e maior quantidade de oligômeros mais curtos que membros da família GH11, o que se deve à diferença morfológica de seus sítios ativos. (22) A adição de *BIAbf43* às xilanases não alterou qualitativamente os produtos gerados pelas xilanases sozinhas, como pode ser visto na Figura 12 A, mas causou aumento na quantidade de produtos gerados (Figura 12 B). Além disso, a Figura 12 B mostra que, curiosamente, XA3XX, um tetrassacarídeo com ramificação de arabinose, presente no hidrolisado de *PxXyn11* se mostrou presente também no hidrolisado de *PxXyn11+BIAbf43*, evidenciando que a arabinofuranosidase apresenta restrições para determinados substratos ramificados. Esse resultado sugere, ainda, que a hidrólise das decorações de arabinose pela arabinofuranosidase é um evento cronologicamente posterior à clivagem do esqueleto principal pelas xilanases, pois, de outra forma, XA3XX não estaria presente ou estaria em quantidades significativamente menores no hidrolisado contendo *BIAbf43*, indicando que a arabinofuranosidase possui maior afinidade por oligossacarídeos (com exceções, como XA3XX) que pelo arabinoxilano de alto grau de polimerização.

A Figura 12 C mostra as proporções de cada oligossacarídeo na mistura de XOS que representa cada hidrolisado. Para *TcXyn10*, a presença de *BIAbf43* resultou em uma redução na proporção de X3 de 28% para 24% e aumento de X2 de 70% para 76%, enquanto para *PxXyn11*, a variação da proporção de X2 foi mais significativa, aumentado de 11% sem a arabinofuranosidase para 31% na presença desta, com queda proporcional dos demais oligossacarídeos. Esses resultados mostram que a presença de *BIAbf43* causa um aumento na proporção de oligossacarídeos mais curtos, que são aqueles que apresentam efeito pré-biótico mais destacado. (38)

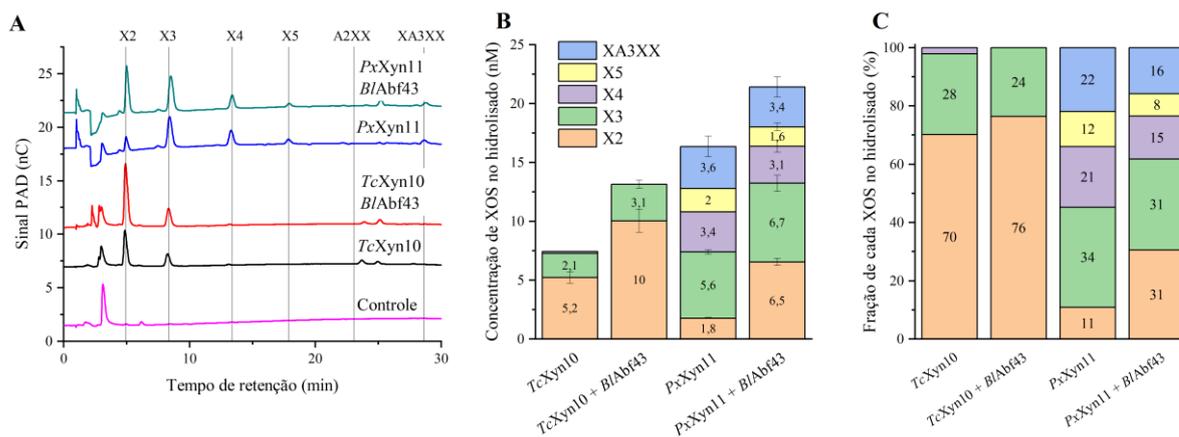


Figura 12 - Análise cromatográfica dos oligossacarídeos presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanases das famílias GH10 e GH11 sozinhas e combinadas com *BIAbf43*. (A) Mostra o cromatograma em que são identificados os oligossacarídeos presentes em cada hidrolisado. A partir das áreas dos picos, cada produto foi quantificado em concentração, o que pode ser visto no painel (B). O painel (C) mostra as proporções relativas de cada oligossacarídeo no total da mistura. Os tempos de retenção dos oligossacarídeos foram definidos com auxílio de amostras padrão. A quantificação foi realizada em duplicatas, com as medidas sendo representadas pela média e o erro pelo desvio-padrão (n=2).

Fonte: Elaborada pelo autor

Para melhor compreender a ação de *BIAbf43* na degradação do arabinosilano de cana-de-açúcar, os hidrolisados foram analisados para presença de monossacarídeos por cromatografia. A Figura 13 A indica, como esperado, a presença de arabinose nos hidrolisados em que *BIAbf43* foi adicionada, comprovando que, apesar de não remover a ramificação de XA3XX, essa enzima de fato tem papel ativo na hidrólise do arabinosilano, que se traduz nos aumentos de rendimentos observados na Figura 12 B. Além disso, confirma-se que o hidrolisado de *TcXyn10* apresenta xilose, ao passo que o de *PxXyn11* não, novamente compatível com seus perfis de clivagem. (49,50) No entanto, surpreendentemente, no hidrolisado de *PxXyn11+BIAbf43*, foi observada presença de xilose, indicando que ou *BIAbf43* induziu mudanças no perfil de clivagem de *PxXyn11*, ou a enzima da família GH43 produziu, ela mesma, xilose, revelando potencial atividade secundária.

Na Figura 13 B estão mostradas as quantidades de xilose e arabinose em cada um dos hidrolisados, medidas a partir das áreas dos picos relativos a cada um dos monossacarídeos na Figura 13 A. É digno de destaque o fato de que no hidrolisado de *TcXyn10+BIAbf43* há o dobro da quantidade de arabinose em comparação com o de *PxXyn11+BIAbf43* (3,4 vs 1,7 nM), sendo que, neste último hidrolisado, foi utilizado três vezes mais arabinofuranosidase que no primeiro, em virtude das diferentes características dos sinergismos de GH10 e GH11 com arabinofuranosidase identificados anteriormente. Essa discrepância se deve ao fato de que

XA3XX, um AXOS cuja ramificação *BlAbf43* não consegue hidrolisar, é produto de *PxXyn11*, mas não de *TcXyn10*. De fato, levando-se em consideração a presença de 3,4 nM de XA3XX no hidrolisado de *PxXyn11+BlAbf43*, fica claro que, nesta amostra, parte da arabinose está, na verdade, ligada a este particular AXOS.

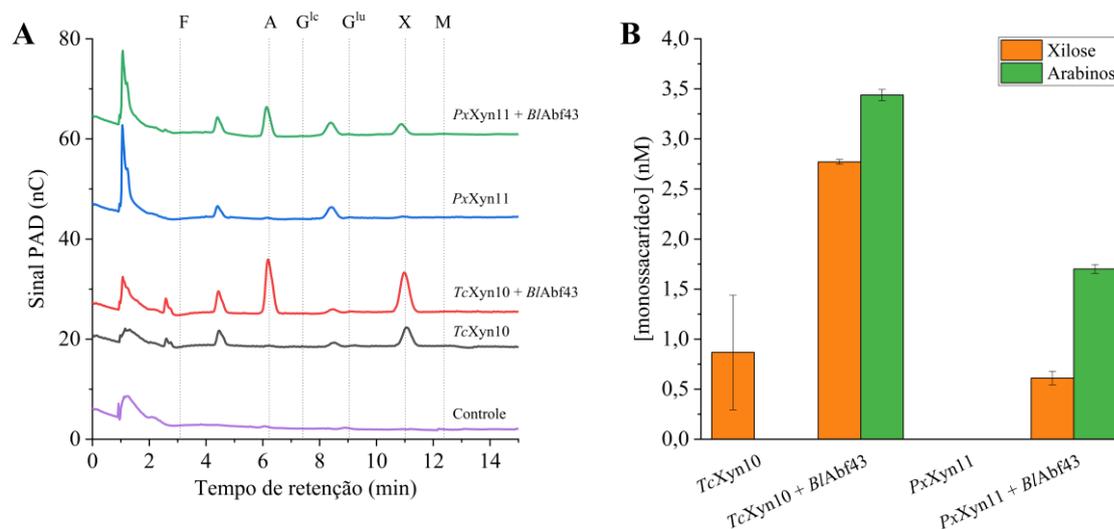


Figura 13 - Análise cromatográfica dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanases das famílias GH10 e GH11 sozinhas e combinadas com *BlAbf43*. (A) mostra o cromatograma identificando quais monossacarídeos estão presentes em cada hidrolisado e (B) mostra as concentrações de xilose e arabinose obtidos a partir das áreas dos picos no cromatograma. Legenda: F-Fucose; A-Arabinose; G^{lc}-Galactose; G^{lu}-Glicose; X-Xilose e M-Manose. Os tempos de retenção desses monossacarídeos foram definidos com auxílio de amostras padrão. A quantificação foi realizada em duplicatas, com as medidas sendo representadas pela média e o erro pelo desvio-padrão (n=2).

Fonte: Elaborada pelo autor

Conjuntamente, esses resultados evidenciam a capacidade de *BlAbf43* de aumentar os rendimentos de oligossacarídeos pré-bióticos a partir de biomassa lignocelulósica pré-tratada quando em sinergismo com xilanases, além de aumentar as proporções de oligossacarídeos curtos no hidrolisado, que são aqueles de efeito pré-biótico mais destacado. Ademais, os resultados revelam uma ordem cronológica para a hidrólise do arabinoxilano, com o esqueleto principal sendo hidrolisado pelas xilanases em uma primeira etapa e a arabinofuranosidase removendo os substituintes dos AXOS em um passo subsequente. Resta investigar, no entanto, as restrições de *BlAbf43* para com determinados AXOS, uma vez que XA3XX não foi utilizado como substrato pela enzima, e também elucidar uma possível bifuncionalidade da enzima alvo deste trabalho.

4.6 Perfil de produto liberado a partir de oligossacarídeos

Buscando entender quais oligossacarídeos ramificados *BIAbf43* pode utilizar como substratos, foram testados 3²- α -L-Arabinofuranosil-xilobiose (A3X), 2³- α -L-Arabinofuranosil-xilotriose (A2XX), 3³- α -L-Arabinofuranosil-xilotetraose (XA3XX) (estruturas químicas na Figura 4), cujas características moleculares de extensão e distribuição de decorações permitirão levantar hipóteses sobre as restrições da enzima.

Confirmando o resultado obtido na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, novamente se observou a incapacidade de *BIAbf43* em remover o substituinte lateral de XA3XX (Figura 14 A, cromatograma amarelo). Por outro lado, A3X e A2XX foram convertidos, evidenciando que o tipo de ligação da arabinose com a xilose ser α -1,3 (como em A3X) ou α -1,2 (como em A2XX) não afeta o reconhecimento da enzima, como é característico de arabinofuranosidases do tipo m-2,3. (18) Uma diferença estrutural entre os substratos que pode responder pelo comportamento diferente da enzima é o fato de que em XA3XX, a ramificação não está na unidade terminal, como no caso de A3X e A2XX, indício de que *BIAbf43* cliva decorações nos terminais não redutores de oligossacarídeos.

A3X, conforme esperado, foi transformado em arabinose e xilobiose após a ação de *BIAbf43* (Figura 14 A, cromatograma vermelho). A2XX, no entanto, além dos produtos esperados (arabinose e xilotriose), originou xilose e xilobiose após ação da arabinofuranosidase (Figura 14 A, cromatograma verde), que provavelmente são resultado da hidrólise da xilotriose. Isso fortalece a hipótese de que *BIAbf43* apresenta múltiplas atividades, e seria capaz de hidrolisar não só os substituintes de arabinose do arabinoxilano, mas também seu esqueleto principal. Para confirmar essa hipótese, em definitivo, a enzima foi testada na presença de XOS lineares e os produtos foram avaliados por cromatografia.

É possível observar na Figura 14 B que *BIAbf43* foi capaz de utilizar os XOS lineares como substratos, e converteu parcialmente X5 em X2+X3 e X4 em X2. Além disso, houve alguma conversão de X3 em X1+X2, mas com menor geração de produtos comparada com a observada em A2XX. Embora a eficiência da hidrólise seja baixa, haja vista que nenhum dos substratos foi totalmente convertido, esse resultado comprova que *BIAbf43*, na verdade, é uma enzima com mais de uma função. Como visto, seu principal produto a partir de XOS lineares é xilobiose, o que sugere que uma das atividades dessa enzima é xilobiohidrolase, atuando na extremidade da cadeia, ou xilanase, atuando no interior no esqueleto principal.

Tendo em vista que xilose foi observada como produto em casos particulares (contra X3 e, principalmente, contra A2XX), um teste para clivagem de 4-nitrofenol β -D-xilopiranosídeo foi conduzido para avaliar a atividade β -xilosidase de *BIAbf43* e revelou a incapacidade da enzima para clivagem desse substrato sintético. Dado que (i) xilose só foi observada como produto quando trissacarídeos foram usados como substratos, que (ii) a enzima atua preferencialmente a partir dos terminais não redutores, como visto na hidrólise dos AXOS e que (iii) xilobiose é um produto mais frequente para hidrólise de XOS mais longos, postulamos que a atividade secundária de *BIAbf43* é xilanase/xilobiohidrolase, com β -xilosidase sendo uma atividade terciária, menos proeminente que as outras, fazendo de *BIAbf43* um módulo multifuncional.

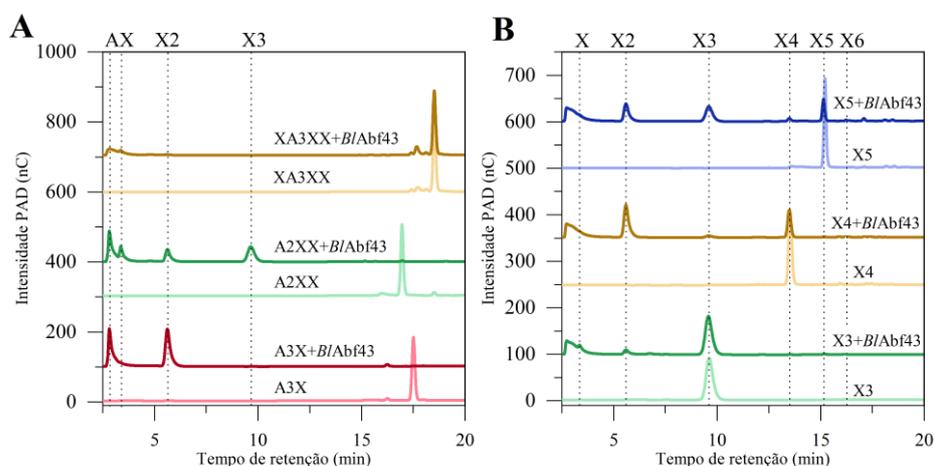


Figura 14 – Perfil de produto liberado por *BIAbf43* utilizando como substratos (A) arabinofuranosil-xilooligosacarídeos (AXOS) e (B) xilooligosacarídeos lineares (XOS). Os tempos de retenção desses sacarídeos foram definidos com auxílio de amostras padrão. Legenda: A – Arabinose; X – xilose; X2 – xilobiose; X3 – xilotriose; X4 – xilotetraose; X5 – xilopentaose; X6 - xilohexaose

Fonte: Elaborada pelo autor

Nas famílias GH3, GH43 e GH51, em que arabinofuranosidas se encontram, há ocorrência de enzimas bifuncionais, apresentando atividade secundária xilosidase (33,76), xilanase (34,77,78), ou xilobiohidrolase. (79) Em particular, na família GH43, subfamília 16, à qual pertence *BIAbf43*, há descrição de um alvo enzimático multifuncional de *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, que apresenta atividade arabinofuranosidase, xilanase e xilosidase, um comportamento que remete ao que foi observado em *BIAbf43*. (80) Apesar da diversidade de atividades identificadas, os mecanismos estruturais por trás da flexibilidade do sítio catalítico das arabinofuranosidas multifuncionais carecem de maiores elucidacões. Também se faz necessário colher evidências estruturais para determinar se a produção de xilobiose é fruto de uma atividade xilobiohidrolase ou xilanase.

4.7 Estudo estrutural

O advento do algoritmo AlphaFold foi um evento transformador no ramo da biologia estrutural. A ideia de usar inteligência artificial para predição de estruturas tridimensionais de proteínas com base em estruturas já determinadas e depositadas em bancos de dados se provou, ao mesmo tempo, acurada e conveniente. (61) Tal ferramenta permite que estudos estruturais iniciais sejam conduzidos mesmo sem a obtenção da proteína purificada. Utilizando o algoritmo de predição AlphaFold2, implementado por meio do ColabFold (62), foi gerado um modelo preditivo do domínio catalítico de *BIAbf43* para melhor compreensão de seus mecanismos moleculares de catálise.

Como representante da família GH43, o domínio catalítico de *BIAbf43* apresenta um enovelamento do tipo β -*propeller* com um total de 32 fitas β , organizadas em 5 eixos, cada qual apresentando uma longa alça central, identificadas de 1-5 na Figura 15 A, que, juntas, formam o túnel onde o sítio catalítico pode ser localizado. A catálise nesta família tipicamente ocorre por meio do mecanismo de inversão da configuração anomérica. (81)

A análise da superfície eletrostática de *BIAbf43* evidencia a morfologia do sítio ativo, que compreende um canal longo (marcado pela elipse azul na Figura 15 B), perpendicular ao qual se encontra um bolso (marcado pelo círculo verde na Figura 15 B), uma morfologia compatível com arabinofuranosidases da mesma família e distinta da de arabinanases e xilosidases da mesma família. (82) O resultado do *docking* molecular com A2XX indica que o canal é responsável pela acomodação do esqueleto principal do xilano e, o bolso, pela acomodação de um único resíduo de arabinose, como esperado para arabinofuranosidases do tipo m-2,3, incapazes de comportar dupla ramificação de arabinose (Figura 15 F).

A comparação do modelo preditivo com o modelo cristalográfico de *BsAXH-m2,3*, uma arabinofuranosidase da família GH43 de *Bacillus subtilis* (PDB 3C7G), revela os aminoácidos envolvidos na rede de interações com o substrato. No bolso, são encontrados os resíduos catalíticos, a saber: D189, atuando como base; D334, modulador de pKa e E390, atuando como ácido (os três em magenta na Figura 15 C). Além destes, outros resíduos estão posicionados de maneira a possibilitar interações de hidrogênio com o resíduo de arabinose do bolso, são eles: W272, A273, N456 e H458 (Figura 15 C). No canal, embora F389, W331 e F233 estejam na vizinhança, nenhum deles está posicionado de maneira propícia a estabelecer interações com as duas primeiras unidades de xilopiranosose de A2XX (contando do terminal não-redutor). No entanto, para a terceira unidade de xilose, há três resíduos em distância compatível com

interação de hidrogênio: D230, G454 e Q475 (Figura 15 D), fazendo com que a ancoragem do esqueleto de xilose ocorra, de fato, por meio deste terceiro resíduo. Tal configuração confirma a hipótese levantada a partir dos resultados do ensaio cinético, em que k_M foi menor para arabinoxilano de trigo que para pNP-araf, o que se explica pelas interações da enzima com a terceira unidade de xilose a partir do terminal não-redutor do arabinoxilano, as quais não ocorrem em pNP-araf.

Observando o modelo estrutural, é possível perceber que o canal de acomodação do esqueleto de xiloses parece ser interrompido por uma barreira estérica formada pelas cadeias laterais dos resíduos W272, G295 e W331, indicados pela superfície em vermelho na Figura 15 E. Tal barreira pode ser o motivo pelo qual a enzima é mais efetiva ao hidrolisar ramificações que se encontram no terminal não redutor, afinal, o alinhamento da ramificação com o bolso só será possível se ela estiver na unidade de xilose terminal, como pode ser visto na Figura 15 F.

Ademais, como mostram as Figuras 15 F e G, tanto arabinose como xilose são capazes de ocupar o bolso catalítico, portanto, é possível que a hidrólise de XOS lineares se dê pelo encaixe do terminal do oligossacarídeo no bolso catalítico, flexionando o esqueleto e promovendo a excisão das duas unidades terminais, como mostrado na Figura 15 G, corroborando a hipótese de que a liberação de xilobiose é devida à atividade xilobiohidrolase, em vez de atividade xilanase. Adicionalmente, os dados de perfil de clivagem indicam que tal flexão somente resulta em hidrólise eficiente quando o esqueleto apresenta pelo menos quatro unidades, sendo menos efetiva quando o substrato é um trissacarídeo, caso em que a tensão na molécula de substrato pode não ser intensa o suficiente para a clivagem da ligação. Isso é compatível com o modelo de ancoragem do esqueleto de xilano no canal observado anteriormente, que ocorre fundamentalmente por meio do terceiro resíduo de xilopiranosose.

Intuitivamente, a partir do modelo de hidrólise de arabinose, o produto esperado a partir do processo de hidrólise de XOS lineares seria xilose, em vez de xilobiose. Inicialmente, cumpre ressaltar o posicionamento diferencial dos grupos hidroxila entre xilose e arabinose, bem como a torção diferente causada pelo tipo de ligação (ligação α com a arabinose e ligação β com xilose), que fazem com que a ligação glicosídica entre xiloses fique projetada para o lado da barreira estérica W272-G295-W331, em vez de ficar projetada para o lado do ácido catalítico E390, como pode ser visto comparativamente nas Figuras 15 E e F. Recentemente, Limsakul *et al.* (80) demonstraram que a remoção do CBM 36 da sequência contendo uma GH43_16 multifuncional (arabinofuranosidase/endoxilanase/xilosidase) resultou na perda completa da atividade xilanase da enzima. Dessa forma, sabendo que *BlAbf43* apresenta dois CBMs (um da família 4_9 e um da família 6) em sua sequência, especulamos que a atividade xilobiohidrolase

de *BlAbf43* seja devida à presença de um dos CBMs, que poderia se dobrar para próximo do sítio ativo de tal forma que um resíduo de caráter ácido pertencente ao CBM fique projetado favoravelmente para sua atuação como doador de elétrons na catálise. Assim, explicar-se-ia a produção de xilobiose a partir de oligossacarídeos lineares.

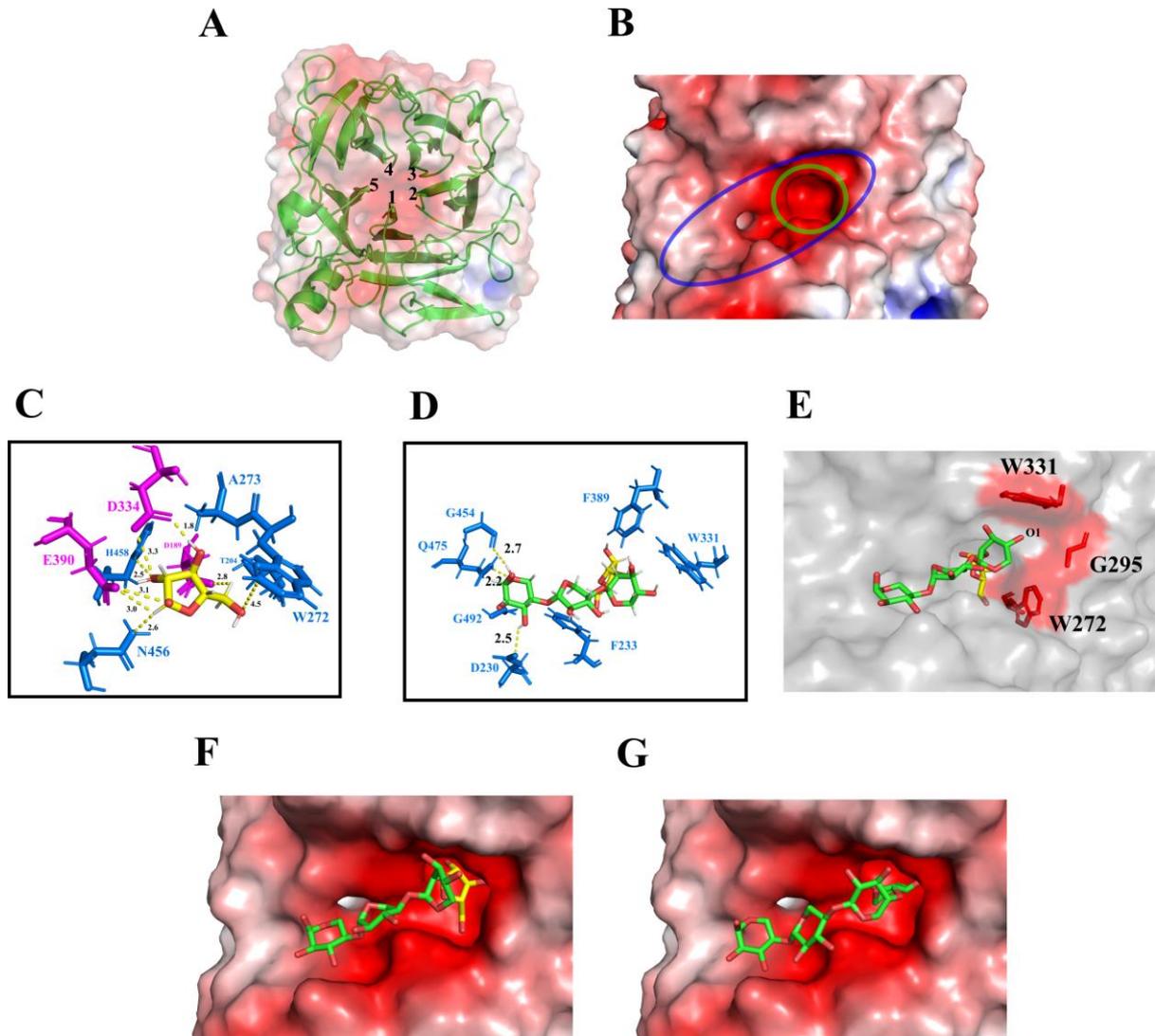


Figura 15 - Modelo estrutural de *BlAbf43*, mostrando: (A) as 5 alças características do enovelamento β -propeller, (B) a morfologia do sítio catalítico, composto por um canal longitudinal (em azul) capaz de acomodar o esqueleto principal do arabinoxilano e um bolso (em verde), perpendicular a ele, onde acomoda-se a unidade de arabinose que é hidrolisada, (C) a rede de resíduos de aminoácido na superfície do sítio catalítico que podem estabelecer interações de empilhamento ou de hidrogênio com o substrato acomodado no canal longitudinal (em azul) e os aminoácidos catalíticos (em magenta), (D) a barreira estérica formada pelos resíduos W272, G294, G295 e S296 e (E) o resultado do *docking* molecular de A2XX, como a arabinofuranose em amarelo e as unidades de xilopirranose em verde e de (F) xilotetraose.

Fonte: Elaborada pelo autor

A baixa disponibilidade de estruturas cristalográficas de arabinofuranosidases da família GH43 com atividade secundária xilobiohidrolase dificulta análises mais sólidas a

respeito dos mecanismos de produção de xilobiose de *BIAbf43*, sendo as discussões estruturais trazidas aqui de caráter especulativo. A elucidação de tais mecanismos está além do escopo deste trabalho e poderá ser melhor elaborada com simulações de dinâmica molecular usando um modelo cristalográfico de mutantes catalíticos de *BIAbf43* com ligantes posicionados no sítio ativo, o que permitirá melhor compreender o papel dos CBMs, determinar energias de ligação e estabelecer hipóteses sólidas para os processos de hidrólise catalisados pela enzima.

5 CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho, que se propôs a avaliar *BIAbf43* como ferramenta enzimática no contexto biotecnológico de produção de oligossacarídeos, foi realizada com sucesso a expressão da enzima em sistema heterólogo, sua purificação e aprofundada caracterização bioquímica, na qual sua atividade foi medida como função de diversos parâmetros (tempo, concentração de enzima, pH e temperatura), o que evidenciou a compatibilidade de *BIAbf43* para ser empregada em conjunto com as xilanases *TcXyn10* e *PxXyn11*. Nos estudos de sinergismo entre as enzimas, identificou-se que *BIAbf43* atuou sinergicamente tanto com a xilanase da família GH10, como da família GH11, com maior grau de sinergismo com esta última. Ademais, demonstrou-se que o emprego de *BIAbf43* com xilanases, para desconstrução do xilano de bagaço de cana-de-açúcar, provocou aumento nos rendimentos de oligossacarídeos, bem como aumentou a proporção de oligossacarídeos de menor extensão, que possuem atividade pré-biótica mais acentuada. Adicionalmente, estudos em cromatografia de alta performance demonstraram tendência da enzima para remover substituintes na unidade de xilose do terminal não redutor, e sua multifuncionalidade, já que é capaz de hidrolisar a ligação β -1,4 entre xiloses de XOS lineares, apresentando também atividades xilobiohidrolase e xilosidase, sobre cujos mecanismos foi possível levantar hipóteses a partir do modelo preditivo e dos resultados de *docking* molecular. Fica comprovado, aqui, a eficiência de *BIAbf43* como ferramenta biotecnológica para produção de oligossacarídeos pré-bióticos e abrem-se oportunidades para que futuros estudos estruturais, apoiados em simulações de dinâmica molecular com modelo cristalográfico, elucidem os mecanismos da produção de xilobiose por essa enzima.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Boletim da safra de cana-de-açúcar**: 2º levantamento - safra 2023/24. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em 03 nov 2023.
- 2 BALA, R.; MONDAL, M. K. Opportunities and challenges in industrial production of biofuels. *In*: GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R.; ZAKARIA, Z. A. (ed.) **Biofuels and bioenergy**: opportunities and challenges. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 3–21.
- 3 CRUZ, S. H. Bagaço e palha da cana são fontes de celulose para gerar álcool. **Visão Agrícola**, v. 8, p. 13–14, 2008.
- 4 RABELO, S. C. *et al.* Chemical and energy potential of sugarcane. *In*: SANTOS, F.; RABELO, S. C.; MATOS, M.; EICHLER, P.(ed.). **Sugarcane biorefinery, technology and perspectives**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 141–163.
- 5 POLETTI, P. *et al.* Xylooligosaccharides: transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. **Process Biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 352–363, 2020.
- 6 SOCCOL, C. R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101,n. 13, p. 4820–4825, 2010.
- 7 GOMES, G. R. *et al.* Valorization of sugarcane bagasse C5-fraction by furfural production mediated by renewable glycine-based ionic liquid. **Industrial Crops and Products**, v. 191, p. 115940, 2023. DOI: [10.1016/j.indcrop.2022.115940](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115940).
- 8 ROSSI, B. R. *et al.* Cellulose nanofibers production using a set of recombinant enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, p. 117510, 2021. DOI: [10.1016/j.carbpol.2020.117510](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117510).
- 9 ESPIRITO SANTO, M. *et al.* Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 64–74, 2018. DOI: [10.1016/j.indcrop.2018.01.014](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.014).
- 10 SOUZA, A. P. *et al.* Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 564–579, 2013. DOI: [10.1007/s12155-012-9268-1](https://doi.org/10.1007/s12155-012-9268-1).
- 11 BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n.3, p. 550–848, 2013.
- 12 CARVALHO, D. M. *et al.* Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223–234, 2017. DOI: [10.1016/j.carbpol.2016.09.022](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022).
- 13 MIKKELSEN, D. *et al.* Interactions of Arabinoxylan and (1,3)(1,4)-β-Glucan with Cellulose Networks. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 4, p. 1232–1239, 2015.
- 14 SIMMONS, T. J. *et al.* Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. **Nature Communications**, v. 7, p. 13902, 2016. DOI: [10.17863/CAM.7288](https://doi.org/10.17863/CAM.7288).

- 15 BUCKERIDGE, M. S.; GRANDIS, A.; TAVARES, E. Q. P. Disassembling the glycomic code of sugarcane cell walls to improve second-generation bioethanol production. *In: RAY, R. C.; RAMACHANDRAN, S. (ed.). Bioethanol production from food crops*. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 31–43.
- 16 RABELO, S. C.; BRENELLI, L. B.; PIN, T. C.; SCOPEL, E.; COSTA, A. C. Pretreatments as a key for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *In: GOLDBECK, R.; POLETTO, P. (ed.). Polysaccharide-degrading biocatalysts*. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 109–137.
- 17 ZHANG, Z. Waste pretreatment technologies for hydrogen production. *In: ZHANG, Q.; HE, C.; REN, J.; GOODSITE, M. (ed.). Waste to renewable biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 109–122.
- 18 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.
- 19 CASTRO, R. C. A. *et al.* Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 65–73, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.08.053.
- 20 GRANDIS, A.; FORTIRER, J. S.; NAVARRO, B. V.; OLIVEIRA, L. P.; BUCKERIDGE, M. S. Biotechnologies to improve sugarcane productivity in a climate change scenario. **BioEnergy Research**, 2023. DOI:10.1007/s12155-023-10649-9.
- 21 ZABED, H. M. *et al.* Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 105–128, 2019. DOI: 10.1016/j.rser.2019.01.048.
- 22 CAPETTI, C. C. M. *et al.* Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 169, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03139-7.
- 23 KARLSSON, E. N.; SCHMITZ, E.; LINARES-PASTÉN, J. A.; ADLERCREUTZ, P. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9081–9088, 2018.
- 24 LINARES-PASTEN, J. A.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. N. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, n. 1, p. 48–67, 2016.
- 25 DAVIES, G. J.; WILSON, K. S.; HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 321, n. 2, p. 557–559, 1997.
- 26 PUCHART, V.; ŠUCHOVÁ, K.; BIELY, P. Importance of accessory enzymes in hemicellulose degradation. *In: GOLDBECK, R.; POLETTO, P. (ed.). Polysaccharide-degrading biocatalysts*. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 109–137.
- 27 XUE, Y. *et al.* Characterization of the recombinant GH10 xylanase from *Trichoderma orientalis* EU7-22 and its synergistic hydrolysis of bamboo hemicellulose with α -glucuronidase and α -L-arabinofuranosidase. **Industrial Crops and Products**, v. 194, p. 116330, 2023. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.116330.
- 28 PATEL, H.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Improved yield of α -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of

crude enzyme on saccharification of maize stover. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, p. 11, 2015. DOI: 10.1186/s40643-015-0039-7.

29 LI, C. *et al.* Expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase derived from *Aspergillus awamori* and its enzymatic degradation of corn byproducts with xylanase. **Bioresource Technology**, v. 384, p. 129278, 2023. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129278.

30 MARTINS, M.; TRAMONTINA, R.; SQUINA, F. M.; DINAMARCO, T. M.; GOLDBECK, R. Synergism for xylo-oligosaccharides, *p*-coumaric and ferulic acid production, and thermostability modulation of GH 62 α -l-arabinofuranosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, p. 102469, 2022. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102469.

31 PISALWAR, P.; FERNANDES, A.; TRIBHUVAN, D.; GITE, S.; AHMED, S. Arabinofuranosidases. *In*: GOYAL, A.; SHARMA, K. (ed.). **Glycoside hydrolases**. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 187–211.

32 MEWIS, K.; LENFANT, N.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1686–1692, 2016.

33 SALEH, M. A. *et al.* Biochemical and molecular dynamics study of a novel GH 43 α -l-arabinofuranosidase/ β -Xylosidase from *caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM8903. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.810542.

34 WANG, R.; ZHANG, Y.; LIU, L.; YANG, J.; YUAN, H. Discovery of a bifunctional xylanolytic enzyme with arabinoxylan arabinofuranohydrolase-d3 and endo-xylanase activities and its application in the hydrolysis of cereal arabinoxylans. **Microbial Biotechnology**, v. 16, p. 1536–1547, 2023.

35 GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, 2017. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75

36 MÄKELÄINEN, H.; SAARINEN, M.; STOWELL, J.; RAUTONEN, N.; OUWEHAND, A. C. Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 2, p. 139–148, 2010.

37 VACILOTTO, M. M. *et al.* *Paludibacter propionicigenes* GH10 xylanase as a tool for enzymatic xylooligosaccharides production from heteroxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 275, p. 118684, 2022. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118684.

38 VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, 2000.

39 DAVANI-DAVARI, D. *et al.* Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

40 VALLS, C. *et al.* Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 43–50, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.028.

41 HANSEN, C. H. F. *et al.* Dietary xylooligosaccharide downregulates IFN- γ and the low-

grade inflammatory cytokine IL-1 β systemically in Mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, p. 533–540, 2013. DOI: 10.3945/jn.112.172361.

42 BRIENZO, M. *et al.* Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharide production. *In*: RILEY, G. L. (ed.). **Food waste**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2016. p. 155-188.

43 FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, p. 100184, 2019. DOI: 10.1016/j.bcdf.2019.100184.

44 MAEDA, R.; IDA, T.; IHARA, H.; SAKAMOTO, T. Induction of apoptosis in MCF-7 cells by β -1,3-Xylooligosaccharides prepared from caulerpa lentillifera. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1032–1034, 2012.

45 CAPETTI, C. C. M. *et al.* Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn cobs: Assessment of two different pretreatment strategies. **Carbohydrate Polymers**, v. 299, p. 120174, 2023. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.120174.

46 FUTURE MARKET INSIGHTS. **Xylooligosaccharide market outlook (2023 to 2033)**. 2023. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/xylooligosaccharide-market>. Acesso em 03 nov. 2023.

47 BLANCO, G. *et al.* Revisiting the metabolic capabilities of bifidobacterium longum subsp. longum and bifidobacterium longum subsp. infantis from a glycoside hydrolase perspective. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 723, 2020.

48 VAN DEN BROEK, L. A. M.; VORAGEN, A. G. J. Bifidobacterium glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 401–407, 2008.

49 SEPULCHRO, A. G. V. *et al.* Transformation of xylan into value-added biocommodities using Thermobacillus composti GH10 xylanase. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, p. 116714, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116714.

50 GHIO, S. *et al.* Paenibacillus sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion. **BioEnergy Research**, v. 11, n. 3, p. 174–190, 2018.

51 CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 35–42, 2014. DOI: 10.1016/j.pep.2014.03.008.

52 GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In*: WALKER, J. M.(ed.). **Proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005. p. 571–607.

53 MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, n. 37, p. 333–369, 1913.

54 JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–menten paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.

55 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

56 WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – conventional processing and recent advances.

Bioresource Technology, v. 304, p. 122848, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122848.

57 GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. D.; SOUTO-MAIOR, A. M.; de ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

58 SLUITER, A. *et al.* **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP)** (revised August 2012) issue date: 4/25/200. Disponível em: https://nrel.primo.exlibrisgroup.com/permalink/01NREL_INST/1e90bo2/alma991000608779703216. Acesso em: 03 nov 2023.

59 SLUITER, A. *et al.* **Determination of Ash in biomass**: National Renewable Energy Laboratory (NREL/ TP-510-42622), 2008. Disponível em: https://nrel.primo.exlibrisgroup.com/permalink/01NREL_INST/1e90bo2/alma991000370179703216. Acesso em: 03 nov 2023.

60 ESPIRITO SANTO, M. C. do **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. Orientador: Eduardo Ribeiro de Azevêdo. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

61 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

62 MIRDITA, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.

63 EASTMAN, P. *et al.* OpenMM 7: rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 7, p. e1005659, 2017.

64 BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

65 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

66 GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.

67 PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

68 MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C. G. Purification and functional characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5096–5103, 2003.

69 LAGAERT, S. *et al.* Substrate specificity of three recombinant α -l-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 4, p. 644–650, 2010.

70 MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183–186, 1921.

- 71 RAHBAN, M. *et al.* Thermal stability enhancement: fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 214, p. 642–654, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.154
- 72 CARDOSO, J. P.; Emery, A. N. A new model to describe enzyme inactivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, n. 9, p. 1471–1477, 1978.
- 73 VALLS, A.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J.; VALENZUELA, S. V. A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1743–1751, 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-7061-8.
- 74 SAKKA, M. *et al.* Characterization of Xyn30A and Axx43A of *Bacillus licheniformis* SVD1 identified by its genomic analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 4, p. 193–199, 2012.
- 75 BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1195–1205, 2010. DOI: 10.1007/s12010-009-8892-5.
- 76 ZHANG, X. J.; WANG, L.; WANG, S.; CHEN, Z. L.; LI, Y. H. Contributions and characteristics of two bifunctional GH43 β -xylosidase / α -L-arabinofuranosidases with different structures on the xylan degradation of *Paenibacillus physcomitrella* strain XB. **Microbiological Research**, v. 253, p. 126886, 2021. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126886.
- 77 GIBBS, M. D. *et al.* Multidomain and multifunctional glycosyl hydrolases from the extreme thermophile caldicellulosiruptor isolate Tok7B.1. **Current Microbiology**, v. 40, p. 333–340, 2000. DOI: 10.1007/s002849910066.
- 78 YANG, W. *et al.* A novel bifunctional GH51 exo- α -L-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 197, 2015. DOI: 10.1186/s13068-015-0366-0
- 79 RAVANAL, M. C.; CALLEGARI, E.; EYZAGUIRRE, J. Novel Bifunctional α -L-Arabinofuranosidase/Xylobiohydrolase (ABF3) from *Penicillium purpurogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5247–5253, 2010.
- 80 LIMSAKUL, P. *et al.* A novel multifunctional arabinofuranosidase/endoxylanase/ β -xylosidase GH43 enzyme from *paenibacillus curdlanolyticus* B-6 and its synergistic action to produce arabinose and xylose from cereal arabinoxylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 24, p. e0173021, 2021.
- 81 DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853–859, 1995.
- 82 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.