



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Jéssica de Araújo Zanoni

Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.

São José do Rio Preto
2022

Jéssica de Araújo Zanoni

Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

Locais de execução: Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP); Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicadas (LBMA); Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP.

Z33a

Zanoni, Jéssica de Araújo

Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural in silico de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*. / Jéssica de Araújo Zanoni. -- São José do Rio Preto, 2022

121 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Eleni Gomes

1. Endoxilanase. 2. Cinética enzimática. 3. Termodinâmica. 4. Maceração enzimática. 5. Xilooligossacarídeos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Jéssica de Araújo Zanoni

Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilanase heteróloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris*.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
USP – Campus de São Paulo

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado
UNESP – Campus de Ilha Solteira

Profa. Dra. Marcela Marques de Freitas Lima
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP - Campus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
3 de junho de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela oportunidade, orientação e paciência.

A minha co-orientadora, professora Dra Eleni Gomes, pela disponibilidade e apoio a execução desse trabalho.

A todos os integrantes e amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (LBP), Guilherme, Izabella, Moisés e Matheus, por todos os momentos compartilhados durante os últimos anos.

O mesmo se estende aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada (LBMA), Cíntia, Vitória, Carlos, Maitê, Erik, Eduardo.

A todos os professores e alunos do programa de pós-graduação em Biofísica Molecular, em especial para Ângela, Isabela, Ícaro, Murilo e Jorge.

Agradecimento especial aos membros da minha banca de qualificação Márcia e Roni, que foram de suma importância para o trabalho.

A toda minha família, que sempre me apoiou.

Ao meu pai, que eu sei que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu querido Daniel pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

RESUMO

Este trabalho realizou estudos sobre propriedades bioquímicas, estruturais e aplicação de uma endoxilanase pertencente à família GH 11 do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Foram avaliadas características estruturais através de análises de bioinformática, identificando uma estrutura composta por 65% de folhas beta, apenas 7% de uma alfa hélice e os outros 27% da estrutura total correspondem a enovelamento aleatório (random coil). Os resíduos catalíticos da enzima foram identificados como glutamatos nas posições 89 e 181. A produção da enzima foi feita por expressão heteróloga em *Pichia pastoris* linhagem X33 (*Komagataella phaffii*) durante 144 horas a 28 °C induzida por metanol. A presença da glicosilação na região N-terminal inibiu a afinidade por íons metálicos imobilizadas da cauda de histidina, por isso o protocolo alternativo de purificação foi estabelecido onde obtivemos um rendimento final de 6,0% da purificação. A enzima purificada foi analisada quanto à influência do glicerol sobre parâmetros termodinâmicos e cinéticos, onde o glicerol aumentou significativamente V_{max} não apresentando variações significativas sobre K_m , diminuiu a energia de ativação da reação e da desnaturação térmica, aumentou os valores de meia vida, entropia e entalpia, porém não promoveu alterações nos valores de energia livre de Gibbs da desnaturação térmica. Simulações de dinâmica molecular evidenciaram que a presença do glicerol promoveu menores valores de RMSD e Rg. Os parâmetros cinéticos também foram avaliados na presença de compostos fenólicos, onde apenas os valores de V_{max} foram aumentados na presença de ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido vanílico. Análises de *docking* molecular não identificaram sítios de ligação na superfície da estrutura enzimática. Os efeitos observados podem ser atribuídos à adsorção dos fenólicos sobre as fibras de xilana, favorecida pelo pH do meio reacional. A aplicação de 10 U.g⁻¹ da enzima na maceração enzimática para extração do mosto de uva, proporcionou aumento de 8% no rendimento após 2 horas em 55°C, diminuição da acidez total e aumento nos valores de pH, sólidos solúveis, açúcares redutores e conteúdo de polifenólicos totais. A qualificação dos produtos de hidrólise da endoxilanase foi feita sobre os substratos xilana beechwood e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Em 24 horas de hidrólise foi possível identificar X1, X2 e X5 como produtos principais para a xilana beechwood, a presença de X5 foi relacionada ao mecanismo de transglicosilação descrito na literatura. No mesmo tempo para a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foram identificados X1, X2 e X4. A diferença entre os produtos encontrados deve-se à constituição estrutural dos substratos avaliados.

Palavras-chave: Endoxilanase. Cinética enzimática. Termodinâmica. Maceração enzimática. Xilooligossacarídeos.

ABSTRACT

This work carried out studies on the biochemical and structural properties and application of an endoxylanase belonging to the GH11 family of the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Structural characteristics were evaluated through bioinformatics analyses, identifying a structure composed by 65% of beta sheets, only 7% of an alpha helix and the other 27% of the total structure correspond to random coiling. The enzyme catalytic residues were identified as glutamates at positions 89 and 181. Enzyme production followed by heterologous expression in *Pichia pastoris* lineage X33 (*Komagataella phaffii*) for 144 hours at 28°C induced by methanol. The presence of glycosylation in the N-terminal region inhibited the affinity for immobilized metal ions from the histidine tail, so the alternative purification protocol was established where we obtained a final yield of 6.0 %. The purified enzyme was analyzed for the influence of glycerol on thermodynamic and kinetic parameters, where glycerol significantly increased V_{max} without showing significant variations over K_m , decreased the activation energy of the reaction and thermal denaturation, increased the half-life values, entropy and enthalpy, but did not promote changes in the values of Gibbs free energy of thermal denaturation. Molecular dynamic simulations showed smaller RMSD and R_g on the presence of glycerol. The kinetic parameters were also evaluated in the presence of phenolic compounds, where only the V_{max} values were increased in the presence of syringic acid, ferulic acid and vanillic acid. Molecular docking analyzes did not identify binding sites on the surface of the enzymatic structure. The observed effects can be attributed to the adsorption of phenolics on the xylan fibers, favored by the pH of the reaction medium. The application of 10 U.g⁻¹ of the enzyme in the enzymatic maceration to extract the grape must, provided an 8% increase in yield after 2 hours at 55°C, a decrease in total acidity and an increase in pH values, soluble solids, reducing sugars and of total polyphenols. The qualification of endoxylanase hydrolysis products was performed on beechwood xylan substrates and hemicellulose extracted from sugarcane bagasse. In 24 hours it was possible to identify X1, X2 and X5 as main products for beechwood xylan, the presence of X5 was related to the transglycosylation mechanism described in the literature. At the same time, for hemicellulose extracted from sugarcane bagasse, X1, X2 and X4 were identified. The difference between the products found is due to the structural constitution of the evaluated substrates.

Keywords: Endoxylanase. Enzyme kinetics. Thermodynamics. Enzymatic maceration. Xylooligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do arranjo da parede celular vegetal.	19
Figura 2. Representação esquemática das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana, assim como a estrutura do polissacarídeo.....	20
Figura 3. Mecanismo de duplo deslocamento de Koshland de β -glicosidases	22
Figura 4. Comparação entre as estruturas terciárias de endoxilanasas pertencentes às famílias GH 10 e GH 11.	23
Figura 5. Sítios de clivagem das enzimas das famílias GH10 e GH11 em relação ao substrato 4-O-metil-D-glucuronoxilano.....	24
Figura 6. Esquema representativo da etapa de clonagem do DNA durante o processo de produção da proteína recombinante.....	27
Figura 7. Estrutura terciária de endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, modelada por homologia pelo Swiss-Model.	51
Figura 8. Gráfico de Ramachandran para o modelo da estrutura terciária de endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, modelada por homologia pelo Swiss-Model.....	52
Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, destacando os resíduos catalíticos no sítio ativo, Glu89 e 181.....	53
Figura 10. Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4, em A modelo de superfície e em B sobreposição de modelos.....	54
Figura 11. Representação do modelo estrutural glicosilado da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4.....	55
Figura 12. Orientação do substrato no sítio ativo da enzima. Os subsítios estão identificados como -3; -2; -1; +1 e +2.....	56
Figura 13. Perfil de produção da endoxilanase recombinante (U mL ⁻¹) expressa por <i>Pichia pastoris</i> cultivada em meio BMMY em diferentes tempos após a indução por metanol.....	57

Figura 14. Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 12% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) do cultivo da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> em diferentes tempos a indução com metanol.....	58
Figura 15. Gráfico de Fischer do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida a 10 %.....	59
Figura 16. Precipitação do extrato enzimático contendo a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando diferentes concentrações de etanol.....	61
Figura 17. Perfil de eluição na filtração em gel do sobrenadante da precipitação com etanol aplicado em coluna cromatográfica GE XK-16/100 com Sephadex G-50 operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min.....	62
Figura 18. Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) das frações após a precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio.....	63
Figura 19. Perfil de eluição na filtração em gel do precipitado por 80% de sulfato de amônia aplicado em coluna cromatográfica de filtração em gel Superdex 75 10/300 GL operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min.....	64
Figura 20. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na ausência de glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood.....	67
Figura 21. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na presença de 20 % glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood.....	68
Figura 22. Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	71
Figura 23. Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , na presença de 20% de glicerol.....	72
Figura 24. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para a determinação da energia de ativação de desnaturação ($E_{a(D)}$) da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> . (●) ensaio conduzido na ausência de glicerol, (■) ensaio conduzido na presença de 20% de glicerol.....	73

Figura 25. Representação esquemática das mudanças de energia durante a desnaturação térmica de proteínas.....	76
Figura 26. Estabilidade estrutural da endoxilanase avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....	78
Figura 27. Estabilidade estrutural da endoxilanase na presença de glicerol avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....	79
Figura 28. Estabilidade estrutural da endoxilanase na ausência (A) e presença de glicerol (B) avaliada por raio de giro (Rg) obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.....	80
Figura 29. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL ⁻¹ . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo e velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença de 20% de glicerol.....	82
Figura 30. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL ⁻¹ . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e na presença de 20% de glicerol.....	83
Figura 31. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL ⁻¹ . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença dos compostos fenólicos.....	85
Figura 32. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL ⁻¹ . Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto na presença de 10 mmol L ⁻¹ dos compostos fenólicos (A) ácido siríngico; (B) ácido ferúlico; (C) ácido vanílico e (D) ácido 4-hidroxibenzoico.....	86
Figura 33. Sobreposição dos modelos obtidos das duas metodologias de aprendizado de máquina, alphafolda (em azul) e o RoseTTaFold (em ciano).....	90

Figura 34. Localização das cavidades (em verde) encontradas pelo programa Molegro na estrutura da endoxilanase.....	91
Figura 35. Sobreposição das estruturas modeladas da endoxilanase sobrepostas. A região da cavidade 2 mostra Trp 177 descoberto na estrutura sem a presença de his-tag (azul), e rotacionado para o interior da cavidade, ocupando o espaço do sítio nas duas estruturas com a his-tag modeladas por aprendizagem de máquina, RoseTTaFold (bege) e Alphafold (verde).....	91
Figura 36. Rendimento da extração de mosto de uva por maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	93
Figura 37. Análise dos produtos de hidrólise enzimática por cromatografia em camada delgada (CCD).....	100
Figura 38. Representação esquemática da estrutura da xilana de beechwood. A) Unidade de 4-O-metil-glucoroxilana, onde a substituição ocorre no terceiro resíduo por uma ligação tipo alfa entre o carbono 2 do xilopiranosil e o carbono 1 da glicose metilada em seu quarto carbono.....	101
Figura 39. Análise dos produtos de hidrólise enzimática prolongada por cromatografia em camada delgada (CCD).....	102
Figura 40. Proposta de competição do caminho da reação entre transglicosilação e hidrólise no sítio ativo das endoxilanasas. 1, hidrólise; 2, transglicosilação.....	105
Figura 41. Esquema do modo de ação da endoxilanase sobre xilana beechwood (4-O-metil-glucoroxilana).	106

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Parâmetros físico-químicos da endoxilanase recombinante de <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4.	48
Tabela 1. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	64
Tabela 2. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> estimados com base no gráfico de Arrhenius de primeira ordem.	68
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica irreversível da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	69
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível na ausência e presença de 20% de glicerol para a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	74
Tabela 5. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> na presença de 10 mmol L ⁻¹ dos compostos fenólicos.	86
Tabela 6. Resíduos constituintes das cavidades encontradas pelo programa Molegro na estrutura modelada da endoxilanase.	87
Tabela 7. Escores médios das cinco melhores poses de cada ligante, em cada cavidade avaliada.	88
Tabela 8. Análises físico-químicas do mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	94
Tabela 9. Conteúdo de fenólicos totais presentes no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	96
Tabela 10. Parâmetros de cor avaliados no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	97
Tabela 11. Quantificação por HPLC de xilooligossacarídeos obtidos após processo de hidrólise enzimática sobre substratos xilana beechwood e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar.	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Endoxilanasas e as famílias Glicosídeos Hidrolases (GH 10) e (GH 11)	19
2.2 Interesse industrial sobre as xilanases	24
2.3 Proteínas recombinantes	26
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 Caracterização estrutural por homologia	30
5.1.1 Análise in silico da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante	30
5.1.2 Predição da estrutura por análises computacionais	30
5.1.3 Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato	31
5.2 Produção por expressão heteróloga da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i>	32
5.2.1 Vetor de expressão	32
5.2.2 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> com o plasmídeo pPICZαA_XylMh	32
5.2.3 Ensaio de expressão	32
5.3 Purificação da endoxilanase recombinante	33
5.3.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	33
5.3.2 Protocolo alternativo de purificação	34
5.4 Ensaio enzimático: dosagem da atividade xilanolítica	34

5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE	35
5.6 Precipitação com TCA das amostras a serem utilizadas para as análises eletroforéticas	36
5.7 Determinação da concentração de proteína	36
5.8 Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	37
5.8.1 Caracterização quanto à temperatura ótima.....	37
5.8.2 Cálculo da energia de ativação da reação (E_a).....	37
5.8.3 Cálculo do coeficiente da temperatura.....	38
5.8.4 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível.....	38
5.8.4.1 Tempo de meia vida.....	38
5.8.4.2 Cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$).....	39
5.8.4.3 Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D (kJ mol^{-1}).....	39
5.8.4.4 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D (kJ mol^{-1}).....	39
5.8.4.5 Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D (kJ mol^{-1}).....	40
5.8.5 Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol.....	40
5.9 Avaliação do efeito do glicerol e de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	41
5.9.1 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	41
5.9.2 <i>Docking</i> molecular.....	41
5.10 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (uva-Vitória)	41
5.10.1 Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	43

5.10.2 Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	43
5.10.2.1 Sólidos solúveis totais.....	43
5.10.2.2 pH e acidez total.....	43
5.10.2.3 Determinação de açúcares redutores totais	44
5.10.3 Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	44
5.10.4 Determinação de parâmetros de cor do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	44
5.10.5 Determinação da clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	45
5.11 Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e xilana da cana-de-açúcar.....	45
5.11.1 Processo de hidrólise enzimática do substrato xilana.....	45
5.11.2 Caracterização do material hidrolisado.....	46
5.11.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	46
5.11.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Análise <i>in silico</i> da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo <i>Myceliophthora heterothallica</i> F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante.....	48
6.1.1 Parâmetros físico-químicos.....	48
6.1.2 Domínio conservado.....	49
6.1.3 Modificações pós-traducionais: N e O-glicosilação.....	50
6.2 Predição da estrutura tridimensional.....	50

6.3 Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato	54
6.4 Produção por expressão heteróloga da endoxilanase de <i>Myceliophthora heterothallica</i> em <i>Pichia pastoris</i>	57
6.2 Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes	58
6.3 Purificação da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> ...	59
6.3.1 Precipitação com etanol.....	60
6.3.2 Cromatografia de exclusão molecular em resina de Sephadex G-50.....	61
6.3.3 Precipitação com Sulfato de amônio.....	62
6.3.4 Cromatografia de exclusão molecular Superdex-75.....	63
6.4 Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	66
6.4.1 Efeito da temperatura na hidrólise do substrato da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática.....	66
6.4.2 Análise da termoestabilidade da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> , nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática.....	69
6.4.3 Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol.....	77
6.5 Efeito do glicerol sobre Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	81
6.6 Efeito de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	83
6.7 Docking molecular	88
6.8 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (uva-Vitória)	92

6.8.1	Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	93
6.8.2	Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	94
6.8.3	Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	96
6.8.4	Determinação dos parâmetros de cor e clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>	97
6.9	Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e hemicelulose da cana-de-açúcar, pela endoxilanase recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i>.....	99
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

Tem-se intensificado, especialmente nos últimos anos, a preocupação com a sustentabilidade ambiental e os efeitos negativos provocados pela exacerbada produção de resíduos industriais e agroindustriais, que necessitam de tratamento antes de retornarem ao meio ambiente ou podem ser empregados como matéria-prima para novos produtos. Dentre esses resíduos encontra-se a biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celuloses, hemiceluloses e lignina.

Desde a descoberta da fermentação acetona-butanol por Chaim Weizmann se abriu o caminho para a obtenção de produtos de elevado valor agregado utilizando microrganismos adequados e substratos de baixo custo (NUNCIRA, 2013). Essa abordagem possibilita a obtenção de produtos como exemplo xilooligossacarídeos (XOS) com propriedades prebiótica que facilitam o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. no trato gastrointestinal (ROBERFROID, 1997), o etanol de segunda geração (RAELE et al., 2014), gás metano (IBRAHIM et al., 2017), e ácido cítrico (FRANÇA, 2016), a partir da hidrólise dos polissacarídeos para liberação de seus açúcares constituintes.

O conjunto lignina-hemicelulose-celulose compreende diversos tipos de carboidratos interligados de modo a garantir a sustentabilidade da planta, constituindo um material muito resistente, que apresenta desafio ao ser degradado. Essa decomposição pode ser realizada com o auxílio de enzimas, que atuam como catalisadores biológicos altamente desejáveis devido à sua especificidade e por poderem agir com eficiência em condições suaves de reação. (ALAM et al., 1994; CHANWICHA et al., 2015; DE MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal, dentre as quais a xilana é o principal. A xilana apresenta em sua cadeia principal unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, e cadeias laterais contendo resíduos de L-arabinose, ácidos urônicos e diferentes carboidratos (SILVA et al., 1998), tais características tornam esse material atraente para aplicações biotecnológicas.

A degradação da xilana envolve uma associação de enzimas denominada “complexo xilanolítico”, cuja aplicações industriais são as mais diversas incluindo capacidade de remover a hemicelulose das polpas de celulose, sendo aplicadas na

indústria em substituição ao cloro para promover o branqueamento da polpa de celulose na fabricação de papel (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014).

Além disso, muitos outros processos podem ser incrementados com a utilização dessas enzimas em substituição aos processos químicos convencionais, como é o caso da liberação de monômeros de xilose para a fermentação de leveduras e produção do adoçante não cariogênico xilitol (TAMANINI; HAULY, 2004).

As xilanases também são utilizadas na complementação alimentar de animais como frangos, pois degradam ingredientes que não fornecem muitos nutrientes às aves, uma vez que elas não possuem essas enzimas em seu aparelho digestivo, possibilitando a utilização de novas fontes de alimentos (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Na indústria alimentícia, o uso de xilanase destaca-se na maceração enzimática de polpa de frutas (KAUSHAL et al., 2021), facilitando o processo de extração do mosto, melhorando características organolépticas como cor e aroma através da maior extração de compostos fenólicos e diminuição da turvação do material (DALAGNOL et al., 2017; NOGALES-BUENO et al., 2020). O uso de xilanases estende-se na panificação, com a finalidade de promover a degradação das pentosanas, polissacarídeos constituídos de D-xilose e L-arabinose, para facilitar o manuseio da massa, aumentando o crescimento da mesma e resultando em pães de maiores volumes (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

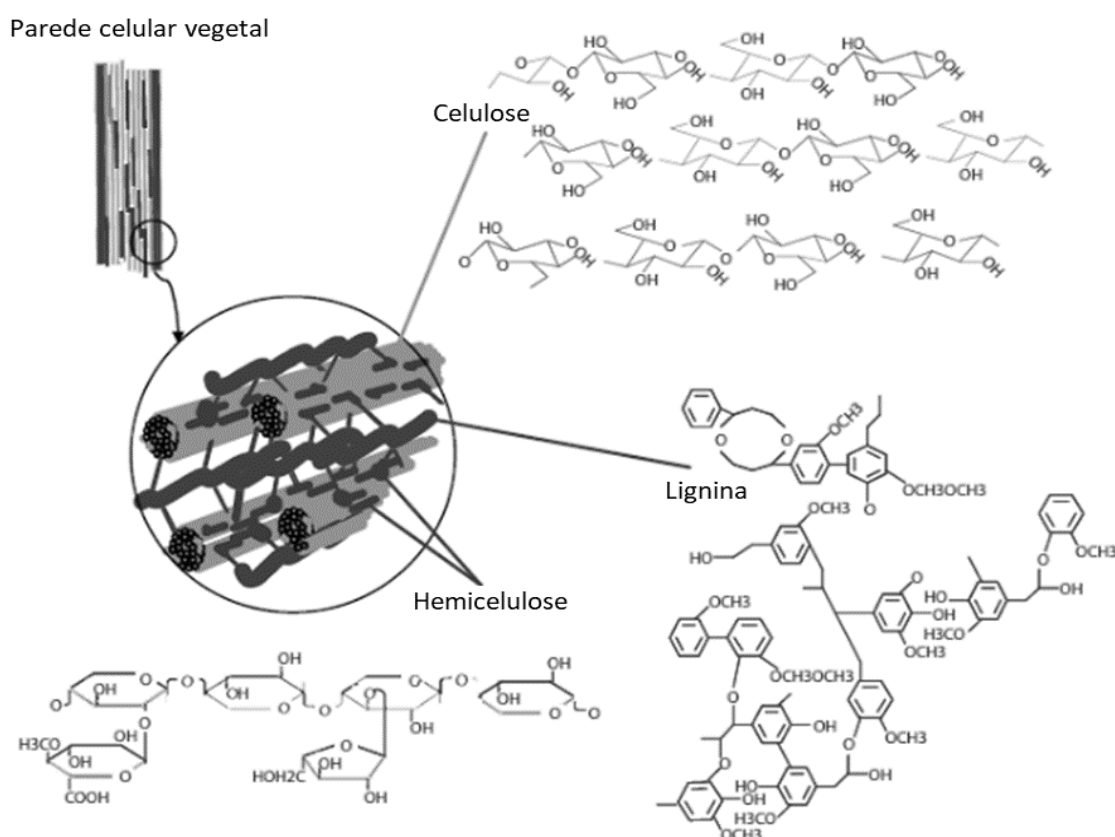
Estudos de caracterização bioquímica sobre parâmetros cinéticos e termodinâmicos, e caracterização estrutural sobre estrutura tridimensional, interações com substrato ou outros compostos, garantem entendimento sobre aspectos importantes para o desenvolvimento de novos métodos de utilização de enzimas, ou para o aperfeiçoamento de métodos já existentes. Nesse contexto se enquadra o presente projeto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Endoxilanasas e as famílias de Glicosídeos Hidrolases (GH 10) e (GH 11).

A degradação da xilana, principal polissacarídeo presente na hemicelulose das paredes celulares vegetais (Figura 1) demanda uma associação de enzimas denominada “complexo xilanolítico”. Essa denominação se deve à heterogeneidade desse polissacarídeo, que apresenta uma cadeia principal constituída de resíduos de D-xilopiranosose ligados através de ligações glicosídicas β -1,4, e é geralmente substituída por ácidos acético e D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico e L-arabinofuranose. Além disso a posição 5 das unidades de arabinofuranose algumas vezes esterificada por ácidos ferúlico ou p-cumárico (Figura 2) (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Figura 1. Representação do arranjo estrutural da parede celular vegetal.

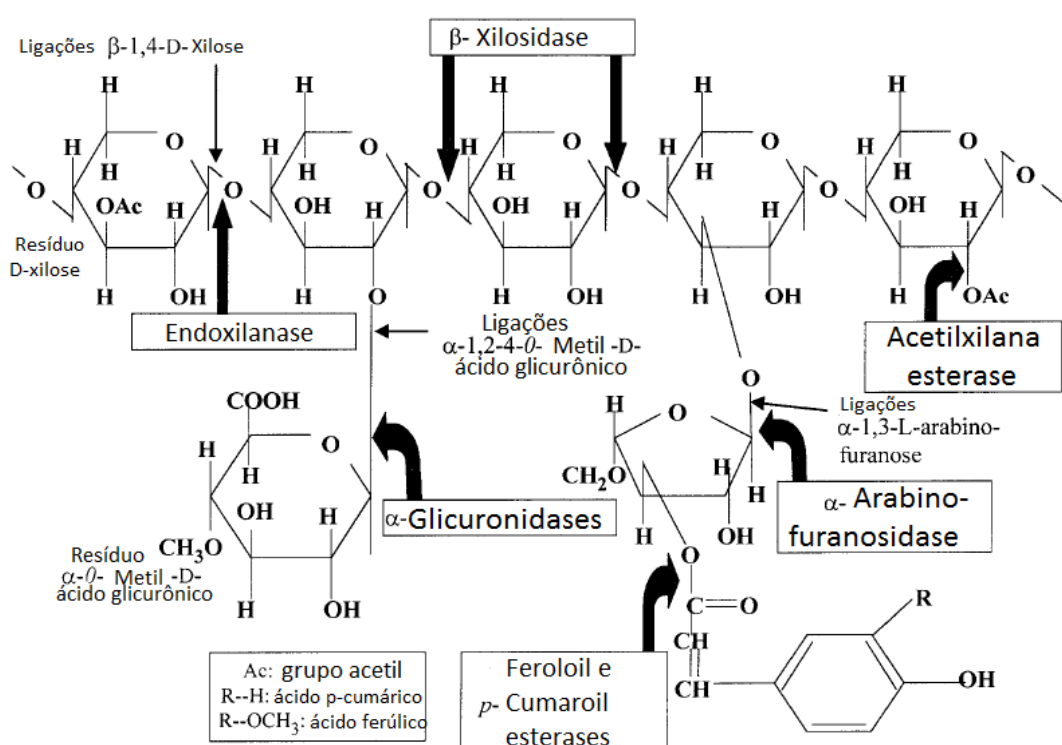


Fonte: Cam Kowsari, 2012 disponível em <<

<https://biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose>>>

Fazem parte do complexo xilanolítico (Figura 2) todas as enzimas associadas à hidrólise das ligações glicosídicas, que resultem na liberação de monômeros de D-xilose e demais componentes do polissacarídeo (SÁ-PEREIRA et al., 2003). Essas enzimas podem ser produzidas por uma variedade de fontes, como fungos filamentosos, macromicetos, bactérias, algas marinhas e algumas sementes de plantas em estado germinativo (BASTAWDE, 1992).

Figura 2. Representação esquemática das principais enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana, assim como a estrutura do polissacarídeo.



Fonte: Adaptado (BEG et al., 2001).

As endo-1,4- β -xilanases (E.C 3.2.1.8) são responsáveis por realizar a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo β entre os carbonos 1 e 4 dos monômeros de xilose. Por outro lado, as endo-1,3- β -xilanases (E.C 3.2.1.32) hidrolisam de forma randômica as ligações β entre os carbonos 1 e 3 das cadeias de xilana. As exo-1,4- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37) e as exo-1,3- β -xilosidases (E.C. 3.2.1.72) hidrolisam as ligações β entre os carbonos 1 e 3 ou 4 dos resíduos de xilose do terminal não redutor da cadeia de xilana (NC-IUB, 1979).

Também fazem parte do complexo as enzimas acessórias, que hidrolisam as ligações das ramificações da cadeia principal de xilana, entre estas as acetilxilana esterases (E.C. 3.1.1.72) que promovem a desacetilação da cadeia de xilana e de xilo-oligosacarídeos; feruloil e cumaroil esterases (E.C. 3.1.1.73) que catalisam a hidrólise dos ácidos ferúlicos e cumáricos ligados à arabinofuranose; as α -L-arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55) responsáveis por hidrolisar as ligações alfa entre os carbonos 1 e 3 ou 1 e 5 dos terminais não redutores de α -L-arabinofuranosídeo, liberando α -L-arabinofuranose; as enzimas α -D-glicuronidasas (E.C. 3.2.1.131) hidrolisam as ligações tipo alfa entre os carbonos 1 e 2 dos resíduos de ácido glicurônicos; já as glicuronoarabinoxilana endo-1,4- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.136) apresentam a capacidade de hidrolisar as ligações β entre os carbonos 1 e 4 dos resíduos de D-xilose e algumas glicuronoarabinoxilanas (NC-IUB, 1979).

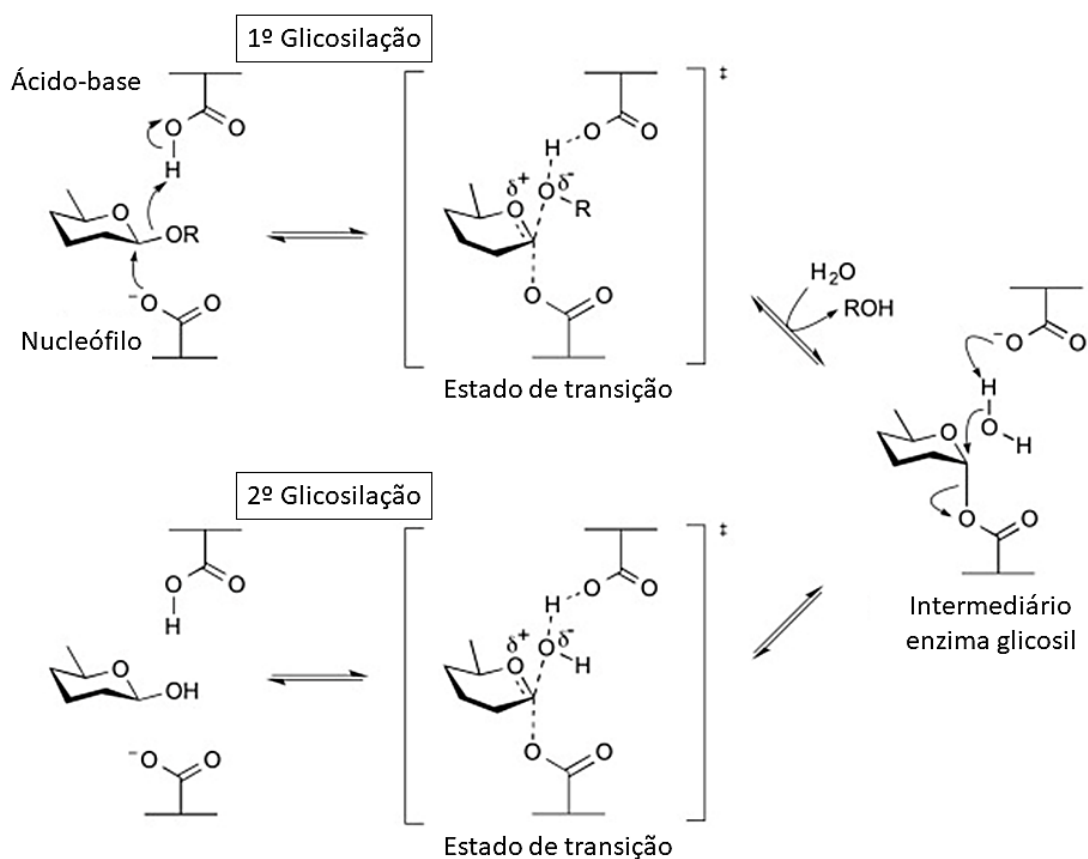
De acordo com a classificação enzimática atual, que se baseia na análise dos domínios catalíticos e nas semelhanças das sequências de aminoácidos, disponível em CAZypedia (*carbohydrate-active enzymes*), as endoxilanasas pertencem às famílias glicosídeo hidrolases GH10 e GH11, embora algumas outras famílias também apresentem diferentes modos de ação sobre a cadeia de xilana, como as GHs 5, 7, 8 e 43 (LOMBARD et al., 2014).

A família 10 envolve as endoxilanasas com capacidade de hidrolisar as ligações β -1,4 e uma pequena parte das enzimas dessa família também hidrolisam ligações β -1,3, podendo as primeiras agir de modo limitado sobre as arilcelobiosídeos e não sobre a celulose. Por outro lado, as endoxilanasas da família 11 são enzimas com retenção de configuração e hidrolisam apenas as ligações tipo β -1,4 e nenhuma outra atividade foi observada até o momento (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006).

As enzimas pertencentes a ambas as famílias seguem o clássico mecanismo de duplo deslocamento de Koshland (Figura 3), onde a glicosilação é a primeira etapa e necessita o desempenho de um resíduo nucleofílico sobre o ataque ao centro anomérico para deslocar a aglicona e formar o intermediário glicosil-enzima, simultaneamente ocorre a protonação do oxigênio glicosídico à medida que a ligação se cliva pela ação de um resíduo como catalisador ácido, a segunda etapa é denominada desglicosilação, onde o intermediário glicosila é hidrolisado pela água. Essa etapa conta com a ação de um resíduo como catalisador básico que irá

desprotonar a molécula de água à medida que o intermediário é hidrolisado (WICKI et al., 2007).

Figura 3. Mecanismo de duplo deslocamento de Koshland de β -glicosidases



Fonte: Adaptado de

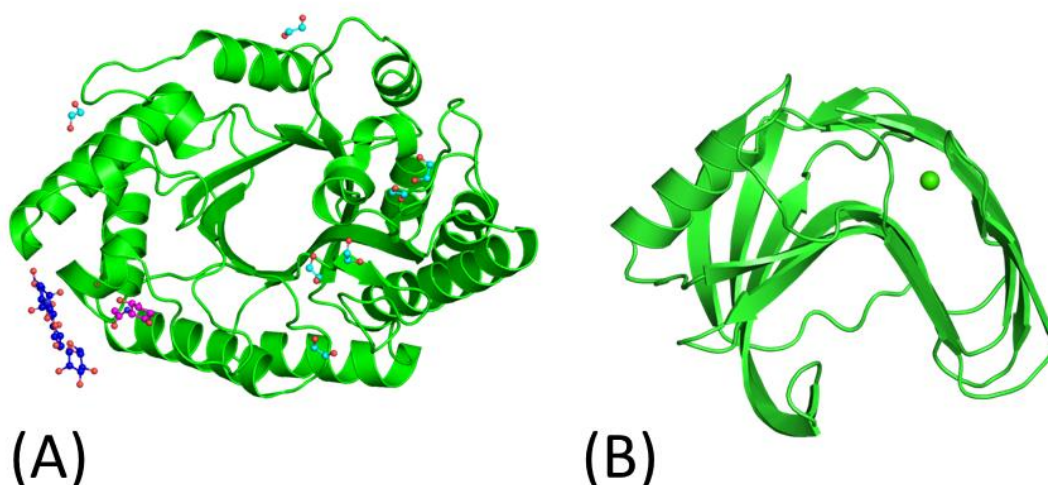
<<https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#bibkey_McIntosh1996>>

As GH 10 apresentam glutamatos como resíduos catalíticos, um deles participando como nucleófilo (Glu233) e o outro como ácido-básico geral (Glu127), e uma asparagina (Asn126) vizinha a este resíduo ácido-básico, que é responsável por realizar ligações de hidrogênio com o substrato 2-hidroxila (MACLEOD et al., 1994). A estrutura tridimensional dessas enzimas é composta por uma clássica dobra em barril com os dois principais ácidos glutâmicos do sítio ativo ácido-base e nucleófilo localizados nas extremidades C-terminais das fitas beta 4 e 7 respectivamente (Figura 4) (DIMAROGONA et al., 2012).

As GH 11 também apresentam glutamatos como resíduos catalíticos, sendo o resíduo que atua como nucleófilo é um glutamato na posição 78 (Glu78) que age

sobre a formação do intermediário, e o outro resíduo de glutamato atua como em um mecanismo ácido-básico geral (Glu127) (MACLEOD et al., 1994; MIAO et al., 1994). A estrutura tridimensional das enzimas desta família é composta por uma dobra flexível de resíduos sobre a fenda do sítio ativo onde encontram-se os resíduos catalíticos (TORRONEN; ROUVINEN, 1995), conforme mostrado na figura 4, que reúne uma estrutura tridimensional representativa de cada uma das famílias de glicosídeo hidrolases citadas anteriormente. As informações e imagens dos modelos utilizados foram acessadas pelo site Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) e obtidas pelo direcionamento ao banco de dados *Protein Data Bank in Europe*. As referências dos trabalhos de cada modelo estão descritas na legenda.

Figura 4. Comparação entre as estruturas terciárias de endoxilanasas pertencentes às famílias GH 10 (A) Conjunto monomérico 1 da entrada 3u7b.pdb visto de frente e GH 11 (B) 1xyn.pdb e visto de frente, ambos representados pela configuração *cartoon*.

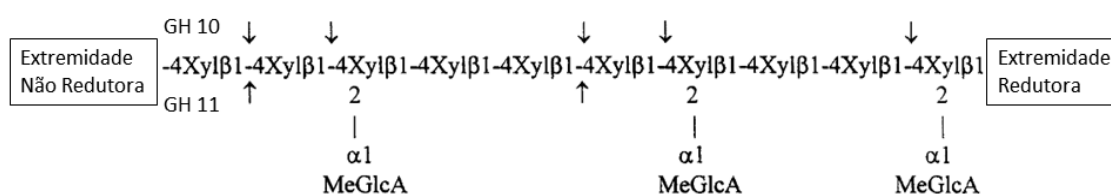


Fonte: Adaptado de (A) (DIMAROGONA et al., 2012) e (B) (TORRONEN; ROUVINEN, 1995) disponíveis em *Protein Data Bank in Europe* << <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/node/1>>>

Embora apresentem o mesmo mecanismo de ação para hidrólise das ligações glicosídicas do substrato, os produtos de hidrólise diferem entre as enzimas das famílias GH 10 e GH 11. A ação das enzimas em relação aos substratos polissacarídicos é limitada pela substituição de unidades xilopiranosila (Figura 5). Enzimas da família GH 10 clivam ligações glicosídicas na cadeia principal de xilana mais próximas aos substituintes, cerca de um resíduo antes e/ou três resíduos após a ramificação em direção à extremidade redutora. Como resultado, enzimas GH 10

liberam produtos mais curtos do que os produtos de enzimas da família GH 11, que por sua vez clivam ligações glicosídicas na cadeia principal de xilana três resíduos após a ramificação (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006). Outra diferença está na quantidade de resíduos de xilopiranosila não substituídos entre as ramificações; enquanto enzimas da família 10 requerem dois resíduos, aquelas da família 11 requerem três resíduos de xilopiranosila consecutivos não substituídos (BIELY et al., 1997).

Figura 5. Sítios de clivagem das enzimas das famílias GH 10 e GH 11 em relação ao substrato 4-O-metil-D-glucuronoxilano.



Fonte: Adaptado (BIELY et al., 1997).

2.2. Interesse industrial sobre as xilanases

Nas últimas décadas tem se intensificado o interesse sobre enzimas com capacidade para catalisar a desconstrução da parede celular vegetal, resultando na liberação de seus monômeros constituintes, que podem ser utilizados em uma ampla variedade de processos biotecnológicos gerando produtos de maior valor agregado.

Em relação aos processos envolvendo as endoxilanases, podemos listar a obtenção de produtos para indústria alimentícia como adoçantes não cariogênicos, o xilitol (TAMANINI; HAULY, 2004) e xilooligossacarídeos (XOS) com propriedades prebióticas que facilitam o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. no trato gastrointestinal (ROBERFROID, 1997). Algumas outras propriedades benéficas têm sido relacionadas aos xilooligossacarídeos (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006), como a redução ao risco de câncer de cólon em ratos (HSU et al., 2004), ou ainda a ação como reguladores de crescimento de plantas (KATAPODIS et al., 2003) e agentes antibacterianos (CHRISTAKOPOULOS et al., 2003) apresentadas

por xilooligossacarídeos ácidos, produtos de hidrólise do 4-O-metil-D-glucurono-D-xilano.

As xilanases também são utilizadas no branqueamento de polpa de celulose durante a fabricação industrial de papel, substituindo parcialmente a utilização do cloro na remoção da fração hemicelulose das polpas, principalmente as enzimas pertencentes à família glicosídeo hidrolases GH 11, por apresentarem facilidade de penetração na fibra de celulose devido a sua baixa massa molecular (GANGWAR; PRAKASH; PRAKASH, 2014).

Também são utilizadas na complementação alimentar de animais, para animais de granja as enzimas agem degradando ingredientes que não fornecem nutrientes às aves, possibilitando assim a utilização de novas fontes de alimentação (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005). Já para ruminantes, o pré-tratamento do material de plantas forrageiras utilizadas na sua alimentação pode ser feito com estas enzimas para degradação dos polissacarídeos, melhorando a qualidade nutricional e a digestibilidade (YANG et al., 2001).

Uma aplicação promissora das xilanases está na produção de biocombustíveis como o etanol de segunda geração, a partir da fermentação de monossacarídeos liberados pela ação hidrolítica dessas enzimas sobre subprodutos agroindustriais (GONÇALVES et al., 2014; MORETTI et al., 2012).

Na indústria alimentícia o uso dessa classe de enzimas destaca-se na maceração enzimática de polpa de frutas (KAUSHAL et al., 2021), facilitando o processo de extração do mosto, melhorando características organolépticas como cor e aroma através da maior extração de compostos fenólicos e diminuição da turvação do material (DALAGNOL et al., 2017; NOGALES-BUENO et al., 2020). Ainda na indústria alimentícia são utilizadas na panificação, com a finalidade de promover a degradação das pentosanas, polissacarídeos constituídos de D-xilose e L-arabinose, para facilitar o manuseio da massa, aumentando o crescimento da mesma e resultando em pães de maiores volumes (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

2.3. Proteínas recombinantes

Mesmo com a enorme variedade de fontes naturais de enzimas, algumas aplicações necessitam de quantidades muito elevadas desses bioprodutos, e como estratégia para produzi-las em quantidades satisfatórias pode-se adotar a estratégia

de produção de proteínas recombinantes através da expressão heteróloga. Isso permite a obtenção de enzimas em larga escala adotando meios de cultura de baixo custo, aumentando a eficiência no processo de sua purificação.

A produção de proteínas recombinantes segue os princípios da tecnologia do DNA recombinante, tendo início na clonagem molecular, que consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Primeiramente a sequência do DNA de interesse, comumente chamado de inserto, é inserida em outra molécula de DNA, comumente chamada de vetor, formando então o DNA recombinante, que segue para a próxima etapa onde é introduzido em uma célula hospedeira compatível, durante o processo de transformação. A célula transformante ou célula transformada passa por vários ciclos de divisão celular, resultando em colônias que contém milhares de cópias do DNA recombinante (Figura 6) (CREAGER, 2020). Quando cultivados em condições ideais, os transformantes podem ser induzidos para a produção da proteína de interesse, cujas informações genéticas estão contidas na molécula do DNA recombinante.

Os avanços da biotecnologia e da engenharia genética permitiram o desenvolvimento de inúmeros sistemas para expressão de proteínas recombinantes, temos disponíveis atualmente linhagens celulares de bactérias, fungos, plantas, mamíferos ou insetos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

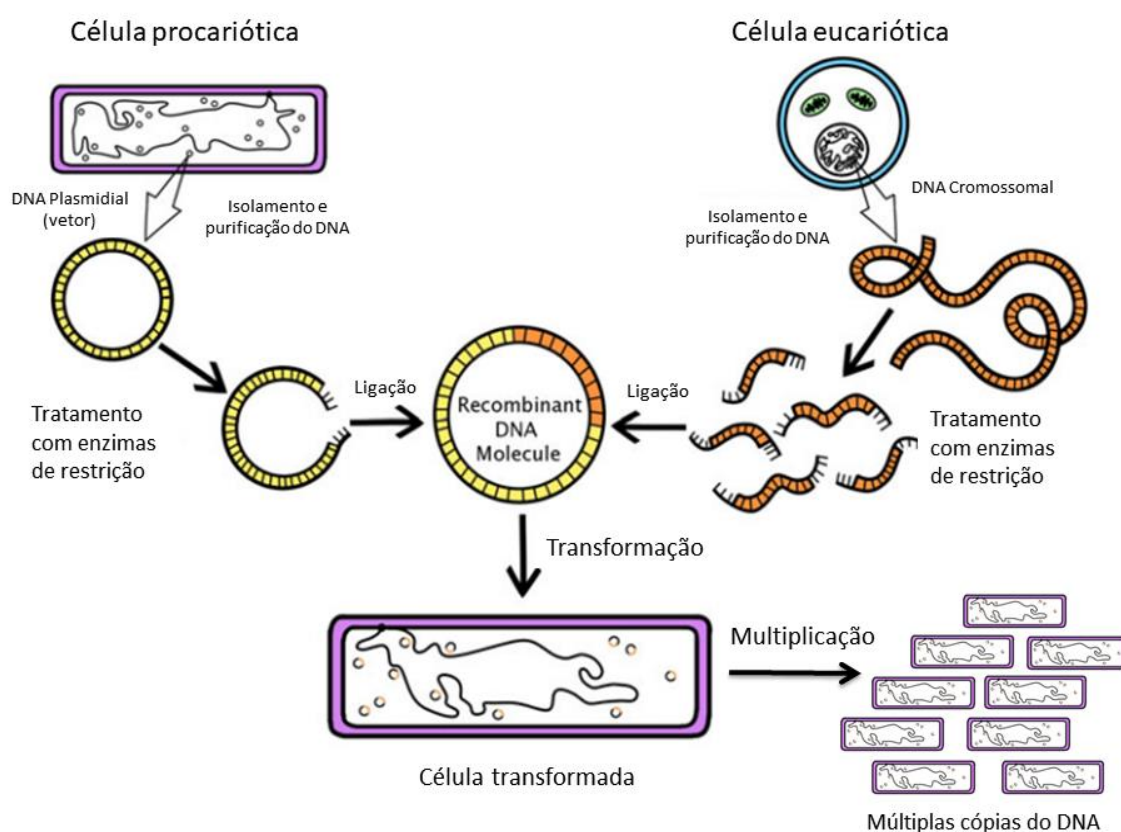
Proteínas de elevado peso molecular, ricas em pontes de sulfeto e que requeiram modificações pós-traducionais específicas, são preferivelmente expressas em sistemas eucarióticos, por serem células com aparato celular mais completo (GOPAL; KUMAR, 2013). As células leveduriformes são as escolhidas na maioria dos casos, por apresentarem facilidades de manipulação, entre essas *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são as mais utilizadas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica que se destaca como sistema de expressão de proteínas heteróloga, devido sua alta eficiência de secreção e densidades celulares, e da facilidade de aumento de escala do processo a níveis industriais, além da disponibilidade de promotores fortes e reguladores do metabolismo do metanol (AHMED; RIAZ; JAMIL, 2009).

Inicialmente foram isoladas cepas de *Pichia pastoris* na França por Alexandre Guillermond em 1920 recebendo o nome de *Zygosaccharomyces pastori* (HENRICI, 1941), posteriormente foram isoladas na Califórnia por Herman Phaff em 1956 recebendo o nome de *Pichia pastoris* (PHAFF; MILLER; SHIFRINE, 1956). Ambas as

cepas foram renomeadas após a criação do gênero *Komagataella* (YAMADA et al., 1995), a cepa isolada na França recebeu o nome de *Komagataella pastoris* e a cepa isolada na Califórnia recebeu o nome de *Komagataella phaffi* (KURTZMAN, 2009).

Figura 6. Esquema representativo da etapa de clonagem do DNA durante o processo de produção da proteína recombinante.



Fonte: Adaptado de CREAGER (2020).

3. JUSTIFICATIVA

Um trabalho anterior (AMO, 2018) avaliou diferentes sistemas de expressão da enzima recombinante objeto deste estudo. A enzima expressa por células eucarióticas (*Pichia pastoris*) apresentou superior estabilidade térmica em comparação com a enzima expressa por células procarióticas (*Escherichia coli*), pois parâmetros como energia de ativação da desnaturação térmica, tempo de meia vida, e energia de ativação da desnaturação térmica, foram superiores para a enzima expressa por *P. pastoris*.

O glicerol mostrou um efeito termo protetor no trabalho antes citado, assim como os compostos fenólicos mostraram-se ativadores da atividade enzimática. Tendo tais resultados como base, o projeto propôs avaliar os efeitos destas substâncias sobre a termoestabilidade estrutural e sobre os parâmetros cinéticos da enzima recombinante. Ao fim, espera-se desvendar a estrutura proteica e as alterações sofridas por esta, possibilitando maior entendimento sobre a enzima em questão.

Foram realizados testes para avaliar potenciais aplicações industriais, como a maceração enzimática para extração do mosto de frutas, e a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, liberando xilooligossacarídeos de interesse para aplicação na indústria de alimento como prebióticos, e também monossacarídeos que podem ser utilizados para a produção de etanol de segunda geração, resultando em um melhor aproveitamento desses subprodutos agroindustriais, que atualmente são utilizados para produção de energia nas usinas de açúcar e álcool.

4. OBJETIVOS

Gerais

O projeto teve como objetivo produzir uma endoxilanase homóloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 através da expressão heteróloga em levedura *Pichia pastoris*, comparar a termoestabilidade estrutural da enzima recombinante na presença de glicerol e avaliar as alterações sobre as cinéticas enzimáticas na presença de compostos fenólicos, bem como avaliar potenciais aplicações industriais.

Específicos

1. Melhorar a expressão heteróloga em *Pichia pastoris*, variando as condições de expressão.
2. Estudar a desnaturação térmica da enzima recombinante avaliando o efeito do glicerol sobre a termoestabilidade estrutural.
3. Determinar os parâmetros cinéticos sobre a atividade enzimática na presença de glicerol e compostos fenólicos.
4. Buscar informações em análises computacionais para entendimento da estrutura tridimensional da enzima, possíveis interações entre compostos fenólicos, e dinâmica molecular na presença de glicerol.
5. Realizar experimentos de aplicação da endoxilanase em procedimentos com potencial aplicação industrial como na maceração enzimática para extração do mosto de uva.
6. Avaliar os principais xilooligossacarídeos produzidos a partir da hidrólise do substrato comercial xilana beechwood e a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização estrutural por homologia

5.1.1 Análise *in silico* da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante

A predição de parâmetros físico-químicos foi realizada pelo *Web-software* ProtParam, disponível no Portal de Recursos de Bioinformática (*Expasy*) do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) – (<http://web.expasy.org/protparam/>). Foram avaliadas as modificações pós-traducionais, por meio da predição de N-glicosilação realizada pelo servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e para O-glicosilação utilizou-se o servidor NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). A busca por domínios conservados foi realizada pela base de dados Pfam (<https://pfam.xfam.org>), que dispõe de uma coleção de família de proteínas representadas por múltiplos alinhamentos de sequências e modelos ocultos de Markov (HMMs), sendo esse último o modelo responsável por reconhecimento de parâmetros ocultos a partir de parâmetros observáveis.

5.1.2 Predição da estrutura por análises computacionais

Para visualizar a estrutura terciária proteica tridimensional foi utilizado o método de modelagem por homologia. Primeiro realizou-se o alinhamento e busca por similaridade utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no Web service UniprotKB – (<http://www.uniprot.org/>), na busca por sequências com maior identidade, foram escolhidas quatro sequências com maior identidade, sendo duas com 100% (XP_003667299.1 (*Myceliophthora thermophila*) e QBC65279.1 (*Thermotheomyces heterothallicus*)) uma com 90,37% (XP_001228486.1 (*Chaetomium globosum*)) e outra com 87,16% (KXX78410.1 (*Madurella mycetomatis*)). Essas sequências serviram como base para a construção do modelo estrutural por homologia empregando a “web server” *Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Os modelos com maior identidade foram

sobrepostos utilizando o programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*). A validação do modelo foi realizada a partir do gráfico de Ramachandran, através do servidor SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) adotando a ferramenta PROCHECK que analisa a geometria geral do modelo com a geometria de resíduo por resíduo e fornece a qualidade estereoquímica do modelo previsto.

5.1.3 Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato

Uma nova estrutura tridimensional foi gerada por modelagem por homologia empregando o servidor do SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). A estrutura da xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (PDB ID: 2VGD) foi escolhida após a busca de homólogos feita pelo Swissmodel como o molde mais adequado. A qualidade do modelo foi avaliada empregando dois indicadores. O primeiro sendo a função de pontuação QMEAN do próprio SWISS-MODEL, que utiliza de potenciais estatísticos para comparar as características geométricas do modelo, atribuindo uma pontuação de confiabilidade entre 0 e 1, onde números mais altos indicam maior confiabilidade. O segundo é o gráfico de Ramachandran, que determina as regiões da proteína que apresentam diedros do backbone Psi e Phi desfavoráveis.

As glicosilações foram acrescentadas nos sítios preditos após construir as cadeias glicosídicas no site do <http://glycam.org/>, que permite ao usuário criar diferentes oligossacarídeos. Estes últimos foram manualmente aproximados usando o Pymol (Schrödinger) ao sítio de glicosilação da proteína.

Duas unidades repetitivas do substrato da xilanase foram manualmente colocados no sítio ativo da enzima utilizando como molde o ligante no PDB 2VGD. O programa Pymol foi utilizado para fazer essa etapa.

5.2 Produção por expressão heteróloga da endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* em *Pichia pastoris*

5.2.1 Vetor de expressão

O plasmídeo de expressão (pPICZ α A_XylMh) foi confeccionado pela empresa Fastbio (Ribeirão Preto, SP), utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para digestão prévia do vetor pPICZ α A.

5.2.2 Transformação de *Pichia pastoris* com o plasmídeo pPICZ α A_XylMh

Foi realizada por método químico, utilizando solução de acetato de lítio (100 mmol L⁻¹) para suspender 50 μ L das células competentes da levedura, essa suspensão foi centrifugada por 11200xg em temperatura ambiente (\pm 27 °C) durante 20 minutos para remoção do sobrenadante. Em seguida adicionou-se ao *pellet*: 240 μ L de polietilenoglicol (PEG) 50 %; 36 μ L de acetato de lítio 1 mol L⁻¹; 25 μ L de DNA de esperma de salmão (2 mg mL⁻¹), o qual foi previamente fervido durante 5 minutos; 5 μ g do plasmídeo pPICZ α A_XylMh, previamente linearizado com a enzima de restrição *SacI*. A mistura seguiu para incubação por 30 minutos a 30 °C, seguido por 25 minutos a 42 °C, e posterior centrifugação de 11200xg em temperatura ambiente (\pm 27 °C) durante 20 minutos, sendo a solução de transformação removida. O *pellet* celular foi ressuspendido em 1 mL de meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e mantido a 30 °C com 240 rpm de agitação por 1 e 4 horas. Na sequência, as células foram plaqueadas em meio YPD contendo 100 μ g mL⁻¹ do antibiótico zeocina.

5.2.3 Ensaio de expressão

Uma colônia transformante da etapa anterior foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão fosfato pH 6,0 100 mmol L⁻¹, YNB a 1,34 %, biotina a 4x10⁻⁵% e glicerol a 1%) e cultivada a 28 °C em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 240 rpm de agitação até atingir densidade óptica acima de 2,0, sendo então centrifugado a 1500xg por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* celular foi ressuspenso em 200 mL de meio BMMY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, tampão fosfato pH 6,0 100 mM, YNB a 1,34 %, biotina a 4.10⁻⁵% e metanol a 0,5%).

O cultivo seguiu por 144 horas em Erlenmeyer haletado de 2 L, a 28 °C com 240 rpm de agitação. Um mL de metanol foi adicionado a cada 24 horas para promover a indução da expressão da xilanase recombinante, e 2 mL do cultivo foram coletados e clarificados por centrifugação a 16.000xg durante 40 minutos a 4 °C. O material clarificado foi utilizado como extrato enzimático para determinação da atividade enzimática e análise do perfil proteico por eletroforese SDS-PAGE.

5.3 Purificação da endoxilanase recombinante

5.3.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

Após clarificado o extrato enzimático foi submetido a duas estratégias de purificação por cromatografia de afinidade. A primeira foi utilizando a HisTrap™ High Performance, contendo íons Ni²⁺ imobilizados, e a segunda utilizando a coluna His GraviTrap™ TALON® contendo íons Co²⁺ imobilizados.

A cromatografia com HisTrap™ High Performance foi realizada em sistema ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão de ligação (50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, 10 mmol L⁻¹ de imidazol). Após a injeção da amostra, as proteínas recombinantes foram eluidas em passos (*stepwise elution*) com gradiente de 0 até atingir 100 % do tampão de eluição (50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, 500 mmol L⁻¹ de imidazol). Em cada passo de eluição foram coletadas frações e submetidas a dosagem do ensaio enzimático.

A cromatografia com His GraviTrap™ TALON® foi realizada em bancada. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão de ligação (50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio). A amostra foi aplicada e seguiu-se por lavagem de 5 volumes de coluna com tampão de ligação. Após as proteínas foram eluidas com o tampão de eluição (50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 500 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, 500 mmol L⁻¹ de imidazol), por meio de lavagens sequenciais aumentando a concentração do tampão de eluição. Em cada passo de eluição foram coletadas frações e submetidas a dosagem do ensaio enzimático.

Diversos testes foram realizados para tentar atingir uma condição de adsorção das proteínas recombinantes a coluna de purificação, incluindo a mudança da resina para

5.3.2 Protocolo alternativo de purificação

O extrato enzimático foi submetido a uma precipitação com etanol na proporção de 25% (v/v), a mistura foi mantida *overnight* a -20 °C e posteriormente centrifugada a 10000xg por 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante removido e aplicado em cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50 com tampão fosfato (50 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl), as frações coletadas foram analisadas quanto a atividade enzimática de xilanase, as frações que apresentaram atividade foram coletadas e submetidas a uma precipitação com 80% de sulfato de amônio, permanecendo *overnight* a 4 °C e após centrifugado a 10.000 xg por 30 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em 500 µL de tampão MES 100 mmol L⁻¹ pH 6,5 e aplicado em cromatografia de filtração em gel em resina Superdex 75 (10/300) com tampão fosfato (50 mmol L⁻¹ fosfato, 150 mmol L⁻¹ NaCl). Após cada etapa do processo, as amostras foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE e foi realizado o ensaio enzimático para confecção da tabela de purificação.

A força centrífuga relativa (RCF) foi calculada pela fórmula ($RCF=0,00001118 \times \text{raio} \times \text{rpm}^2$), onde RCF é a força centrífuga relativa, Raio é o raio da centrífuga em centímetros e rpm abrevia “rotações por minuto”.

5.4 Ensaio enzimático: dosagem da atividade xilanolítica

A atividade enzimática foi determinada quantificando-se o produto liberado por minuto ($\Delta[P]/\Delta t$), através do método de dosagem de açúcares redutores (MILLER, 1959) liberados pela hidrólise dos substratos lignocelulósicos ou da xilana de madeira de faia (*beechwood*). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e realizados em microplacas pela mistura de 10 µL de amostra enzimática com 90 µL de tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6, que corresponde ao pH ótimo da enzima. O tampão foi acrescido com 1% (m/v) de xilana *de beechwood*, a mistura foi incubada por 5 minutos em termociclador a 70 °C, em seguida adicionou-se 100 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) sendo a mistura aquecida novamente a 95 °C por 5 minutos e resfriada a 4 °C durante 1 minuto. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®). A reta de calibração foi confeccionada com D-xilose. Os ensaios controle foram realizados

substituindo o volume correspondente de enzima por água ultrapura. O branco foi feito pela mistura do reagente DNS e água ultrapura na proporção de 1:1 (v/v).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, seguindo a definição da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, IUBMB (NC-IUB, 1979). A liberação do produto por minuto e por mL foi quantificada pela fórmula $([(dA/dt)/\epsilon] \times V_f/V_a \times 1000)$ (JOHN, 2002). Na fórmula dA se refere à absorvância (já descontado o valor do controle), dt é o tempo de incubação em minutos, e ϵ o coeficiente de extinção molar do produto. V_f e V_a se referem aos volumes, em mL, do ensaio e da solução enzimática no mesmo.

5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

O perfil de proteínas foi analisado por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de corrida foi preparado na concentração de 10% com o gel de empilhamento a 5%. Como método de coloração adotou-se Nitrato de prata. Como padrão foi utilizado 5 μL da mistura dos marcadores de massa *molecular Low range* 6,5 – 66,0 kDa (Sigma-Aldrich).

A massa molecular da xilanase foi estimada em comparação com padrões de proteínas globulares de massa conhecida, através da confecção de um gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular em função da migração relativa no gel (distância percorrida pela banda em relação à migração do azul de bromofenol, representando este a máxima migração). Este procedimento foi realizado para distinguir a banda correspondente à enzima de outras proteínas presentes em solução.

5.6 Precipitação com TCA das amostras a serem utilizadas para as análises eletroforéticas

As amostras proteicas foram previamente precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA). Para isso, um volume de solução estoque de TCA a 100 % (m/v) foi adicionado a 4 volumes de amostra e a mistura foi incubada por 10 minutos a 4 °C. Após a incubação o material foi centrifugado a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C, o precipitado foi lavado 3 vezes com 200 µL de acetona gelada e centrifugado a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. O material precipitado foi seco em estufa a 40 °C para evaporação da acetona, posteriormente ressuspenso em tampão de amostra para eletroforese e fervido durante 10 minutos antes de ser aplicado no gel de poliacrilamida.

5.7 Determinação da concentração de proteína

Foi realizada através de ensaios de espectrofotometria, utilizando espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific™ Evolution 201®), em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, sendo a leitura realizada em 280 nm. Os resultados de absorbância são tratados seguindo a equação 1:

Equação 1:

$$[\text{molar de proteína}] = \frac{\text{Abs } 280\text{nm}}{\text{Coef. extinção molar}}$$

$$[\text{g/L}] = [\text{molar de proteína}] \times \text{massa molecular}$$

O coeficiente de extinção molar utilizado no cálculo foi obtido pela análise da sequência primária da proteína pelo site ProtParam, sendo o valor de 74830 M⁻¹cm⁻¹. O valor da concentração molar resultante do cálculo anterior foi então multiplicado pelo valor da massa molecular da proteína, 25.192 Da, para obter os resultados em g/L.

5.8 Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática.

A avaliação seguiu as linhas gerais de Saqib e colaboradores (SAQIB et al., 2010, 2012), com base em ensaios experimentais, baseando-se na determinação da temperatura ótima e da estabilidade térmica da enzima, para calcular os parâmetros de energia de ativação (E_a), energia de ativação da desnaturação ($E_{a(d)}$), coeficiente de temperatura (Q_{10}), tempo de meia vida $t_{1/2}$, entalpia ΔH_D , energia livre de Gibbs ΔG_D e entropia ΔS_D .

5.8.1 Caracterização quanto à temperatura ótima

A caracterização da temperatura ótima da endoxilanase recombinante após o procedimento de purificação foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em microplaca variando a temperatura de incubação da amostra enzimática com o substrato xilana *beechwood* 1%, em 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C durante 10 minutos. A partir dos resultados obtidos foi confeccionado o gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (ln) da atividade em U mL⁻¹ vs. 1000/T (onde T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin: °C + 273,15), sendo a interseção no eixo x do encontro das linhas ascendentes e descendentes utilizado para calcular o valor de temperatura ótima.

Equação 2:

$$T(^{\circ}C) = \left(\frac{1000}{x}\right) - 273,15$$

5.8.2 Cálculo da energia de ativação da reação (E_a)

A energia de ativação da enzima (E_a) foi calculada pelo ajuste linear da porção descendente do gráfico de Arrhenius utilizando o valor de inclinação da reta multiplicado pela constante universal dos gases ($R = 8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Equação 3:

$$E_a = -(inclinação \cdot R)$$

5.8.3 Cálculo do coeficiente da temperatura

O coeficiente da temperatura foi calculado utilizando os valores de E_a e diversas temperaturas, a partir da equação a seguir:

Equação 4:

$$\ln Q_{10} = \frac{(E_a \cdot 10)}{R \cdot T^2}$$

5.8.4 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Para calcular o efeito da temperatura sobre a desnaturação irreversível, a enzima foi incubada em termociclador sob diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 e 90°C) variando o tempo de incubação (15, 30, 60, 120 e 150 minutos), sendo posteriormente colocada em banho de gelo, permanecendo *overnight* a 4°C para restabelecimento de qualquer desdobramento reversível nas estruturas secundárias e terciárias. A atividade endoxilanolítica foi determinada e comparada com uma amostra não exposta à incubação térmica (atividade residual).

Com os valores obtidos pelos procedimentos acima descritos foi confeccionado um gráfico do logaritmo natural da atividade residual no eixo y e o tempo de incubação térmica no eixo x. Aplicando-se a regressão linear sobre as retas, foi obtido o valor da inclinação, que corresponde a $-k_d$ (min^{-1}) (taxa de primeira ordem da inativação térmica).

5.8.4.1 Tempo de meia vida

O tempo de meia vida da endoxilanasase recombinante após o procedimento de purificação foi calculado para todas as temperaturas testadas na desnaturação térmica irreversível, por meio da seguinte equação:

Equação 5:

$$T_{1/2} = \ln \frac{2}{k_d} = \frac{0,693}{k_d}$$

5.8.4.2 Cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$)

Para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica (K J mol^{-1}), foi construído um gráfico do logaritmo natural do k_d obtido anteriormente no eixo y vs. $1000/T$ (T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin), e aplicou-se a regressão linear, sendo a inclinação da curva multiplicada pela constante universal dos gases ($R = 8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) na equação:

Equação 6:

$$E_{a(d)} = -(inclinação \cdot R)$$

5.8.4.3 Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D (kJ mol^{-1})

Os valores foram calculados seguindo a equação 7:

Equação 7:

$$\Delta H_D = E_{a(d)} - R \cdot T$$

5.8.4.4 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D (kJ mol^{-1})

Para o cálculo foi utilizada a equação 8.

Equação 8:

$$\Delta G_D = -R \cdot T \times \ln \left(\frac{k_d \times h}{k_b \times T} \right)$$

k_b : Constante de Boltzmann = $1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$

h : Constante de Planck = $6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$

5.8.4.5 Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D (kJ mol^{-1})

Para calcular a entropia de ativação da desnaturação são necessários os valores de ΔH_D e ΔG_D calculados anteriormente e aplicados na equação:

Equação 9:

$$\Delta S_D = \frac{(\Delta H_D - \Delta G_D)}{T}$$

5.8.5. Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol

A estrutura analisada por difração de raios X de uma estrutura da xilanase de *Neocallimastix patriciarum* disponível no Protein Data Bank (PDB ID: 2VGD) complexada com duas unidades repetitivas do substrato no sítio ativo, utilizando como molde o ligante no PDB 2VGD, resolvido para resolução de 1.80 Å (VARDAKOU et al., 2008), foi usada como modelo para a estrutura fechada (ativa). A simulação da dinâmica molecular do complexo 2VGD com água SPC explícita (10.265 moléculas) foi realizada por 1 nanosegundo (ns), usando o campo de força AMBER 99 (WANG; CIEPLAK; KOLLMAN, 2000) e aplicando condições de contorno periódicas. O volume da célula de simulação cúbica foi de 360.546 nm³. Detalhes da configuração e parâmetros usados na simulação de dinâmica molecular foram descritos na parte I (PETERS et al., 1999). As análises das trajetórias e os exames das estruturas moleculares foram realizados usando o programa de modelagem VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). A avaliação de várias propriedades geométricas indicou que a proteína é equilibrada após menos de 1 ns.

As simulações foram iniciadas a partir da estrutura cristalográfica 2VGD e submetidas a uma minimização de energia de descidas mais acentuadas até que nenhuma mudança significativa de energia pudesse ser detectada (<0,01 kJ/mol). Isto foi seguido por uma corrida de inicialização de 5 picosegundos (ps), tomando as velocidades iniciais de uma distribuição Maxwelliana e usando uma constante de acoplamento de temperatura de 0,01 ps e uma constante de acoplamento de pressão de 0,05 ps (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987). A lista de pares não ligados foi atualizada a cada 10 femtosegundos (fs), e as interações não ligadas foram truncadas em 8 e 10 Å, respectivamente. O algoritmo SHAKE (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) foi aplicado para restringir os comprimentos de ligação às suas posições de equilíbrio, e as equações de movimento foram resolvidas usando o

algoritmo de Verlet (ALLEN; TILDESLEY, 1989). As simulações foram realizadas com um passo de tempo de 2 fs, e as coordenadas foram salvas a cada 0,05 ps

5.9 Avaliação do efeito do glicerol e de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

As análises desta etapa foram realizadas com a finalidade de estabelecer se a presença dessas substâncias é capaz de promover alterações sobre os parâmetros cinéticos. Os ensaios com glicerol foram conduzidos em condições de presença e ausência de 20% (v/v) de glicerol. Os ensaios com compostos fenólicos foram realizados durante a coorientação de iniciação científica dos alunos Izabela Karolina Costa Zilli e Guilherme de Paula Pretto. Nesses experimentos a amostra enzimática foi submetida à presença dos fenólicos na concentração final de 20 mmol L⁻¹ dos seguintes compostos: ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido siríngico. Para cada condição de exposição da enzima foi adotado como controle a substituição do volume de substância utilizado por água ultrapura. Após a pré-incubação da enzima durante 30 minutos à temperatura ambiente com as substâncias correspondentes foram realizadas análises descritas a seguir.

5.9.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

A atividade enzimática foi determinada conforme o item 5.3, variando-se a concentração de substrato (xilana *beechwood*) entre 1 a 50 mg mL⁻¹ dissolvido em tampão MES 100 mmol L⁻¹ pH 6,5, e determinando a atividade específica da enzima pela taxa ou velocidade inicial de reação (V_o) em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para cada concentração. Os valores da Constante de Michaelis K_m e da taxa ou velocidade máxima de reação V_{max} foram obtidos no programa QtiPlot versão 0.9.9.11 (©Ion Vasilief 2004–2017) para Linux, por meio do ajuste não linear de parâmetros utilizando como modelo a equação de Michaelis-Menten e à equação de Hill derivada da equação anterior, na qual K_m e $[S]$ são elevados ao expoente “h”, referente à cooperatividade:

Equação 10:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]^h}{(K_m)^h + [S]^h}$$

5.9.2 Docking molecular

Essas simulações foram feitas em parceria com o Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas, da Universidade Estadual de Maringá, campus de Umuarama, PR.

A estrutura modelada da xilanase de *Myceliophthora thermophila* na presença dos oligossacarídeos glicosilados foi utilizada nas simulações de docking cego, por meio do software Molegro Virtual Docker v6.01. Todas as moléculas de água e os sais foram removidos da estrutura simulada e, a partir da cadeia polipeptídica foram identificadas as cavidades pelo método Expanded Van der Waals, com volumes entre 5 e 100.000 Å³, sonda (probe) de 1,2 e resolução do grid de 0,80 Å. O raio de busca foi configurado como sendo de 35 Å centrado nas coordenadas 4.50; -9.04; e -21.59 e a função de busca MolDock Simplex Evolution e função de ranqueamento MolDock Score [GRID], ambos nas configurações padrão foram escolhidas. As estruturas tridimensionais dos compostos foram obtidas da base de dados PubChem, no formato *.sdf e foram utilizadas como biblioteca em 5 simulações para obter 10 poses por simulação de cada um dos compostos analisados. Após ordenar os escores por Rerank Score, os escores das cinco melhores poses, em cada cavidade, foram utilizados no cálculo do escore médio.

5.10 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (uva-Vitória)

As amostras da uva vitória (preta e sem semente) foram adquiridas no supermercado local. A extração do mosto de uva seguiu conforme descrito por (DALAGNOL et al., 2017) salva algumas modificações. As bagas foram separadas dos cachos e lavadas manualmente em água corrente, posteriormente 25 g foram acondicionadas em Becker de 125 mL, as películas foram rompidas suavemente com auxílio de pistilo, em seguida adicionou-se a solução enzimática previamente diluída em tampão ADA 0,1 mol. L⁻¹ pH 6,99 até a concentração de 10 U.g⁻¹ (unidades de

enzima por grama de uva). A extração seguiu por 60, 120 e 210 minutos, a temperatura de 55° C, sendo extraída ao final de cada tempo por prensagem manual. O material resultante, agora chamado de mosto, foi direcionado para as análises a seguir.

5.10.1 Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Após a extração o rendimento do processo foi determinado através da diferença entre a massa final e inicial, conforme equação 11:

Equação 11:

$$\% = \frac{\text{massa do mosto}}{\text{massa inicial da uva}} \times 100$$

5.10.2 Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

5.10.2.1 Sólidos solúveis totais

Para determinação dos sólidos solúveis totais foi utilizado um refratômetro de bancada tipo ABBE a 20,0 ± 0,5 °C, sendo os resultados expressos em °Brix.

5.10.2.2 pH e acidez total

Os valores de pH foram determinados em pHmetro digital de bancada, já a acidez total foi determinada por titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 mol. L⁻¹ até atingir pH na faixa de 8,2 – 8,4.

5.10.2.3 Determinação de açúcares redutores totais

Foram quantificados através do método de dosagem de açúcares redutores (MILLER, 1959). Os ensaios foram conduzidos em triplicata e realizados em

microplacas pela mistura de 100 µL do material hidrolisado com igual volume do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) permanecendo sob aquecimento a 95 °C por 5 minutos e resfriamento a 4 °C durante 1 minuto, sendo a absorbância medida em 540 nm no leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®). A reta de calibração foi confeccionada com D-xilose.

5.10.3 Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Para a determinação de polifenóis totais adotou-se o método de espectrofotométrico proposto por (SINGLETON; ROSSI, 1965), utilizando o reagente Folin- Ciocalteu e o ácido gálico como padrão para construção da reta de calibração.

5.10.4 Determinação de parâmetros de cor do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Os parâmetros de cor foram determinados por espectrofotometria conforme proposto por (RIZZON, 2010). O mosto foi diluído na proporção de 1:10 e em seguida foi medida a absorbância nos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm em aparelho espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®). Os resultados obtidos permitiram calcular os parâmetros de intensidade e tonalidade de cor, através das seguintes equações:

Equação 12:

$$\text{Intensidade} = \text{Abs } 420\text{nm} + \text{Abs } 520\text{nm} + \text{Abs } 620\text{nm}$$

Equação 13:

$$\text{Tonalidade} = \frac{\text{Abs } 420 \text{ nm}}{\text{Abs } 520 \text{ nm}}$$

5.10.5 Determinação da clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

A porcentagem de clarificação foi avaliada ao final do processo de extração, para isso as amostras de mosto extraídas com e sem a endoxilanase objeto deste estudo, foram submetidas a leitura da absorbância a 660 nm em aparelho espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®), seguindo o cálculo conforme a equação 14.

Equação 14:

$$\% \text{ clarificação} = \frac{\text{Abs } 660 \text{ nm mosto extraído com enzima}}{\text{Abs } 660 \text{ nm mosto extraído sem enzima}} \times 100$$

5.11 Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e xilana da cana-de-açúcar.

O objetivo desse teste foi identificar qual o produto liberado a partir da hidrólise promovida pela endoxilanase desse estudo sobre diferentes substratos. Nesse caso os substratos escolhidos foram o comercial xilana beechwood, que foi descontinuado pela fabricante Sigma-Aldrich, e a xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar por Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento (NASCIMENTO, 2019).

5.11.1 Processo de hidrólise enzimática do substrato xilana

Para avaliar os produtos de hidrólise resultantes da atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*, a fração solúvel após a precipitação com etanol, foi misturada em tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 acrescido de substrato, adotando-se a proporção de 2,5 U.g⁻¹ (unidades de enzima por grama de substrato). A mistura foi mantida em frascos de vidro com rolhas de borracha em banho-maria a 50° C com agitação orbital de 150 rpm, durante diferentes tempos. Ao final de cada tempo os frascos foram retirados e a enzima inativada por fervura durante 10 minutos e posteriormente submetida à análise de caracterização do material hidrolisado. Foram utilizados dois substratos separadamente, o comercial

xilana beechwood e a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar, o controle foi realizado pela substituição do volume correspondente a enzima por tampão MES 100 mmol L⁻¹ pH 6,5.

5.11.2 Caracterização do material hidrolisado

O material hidrolisado foi analisado em relação aos xilooligossacarídeos (XOOS) liberados de forma qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) e quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

5.11.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os produtos de hidrólise foram analisados qualitativamente por cromatografia em camada delgada. Para isso, as placas de sílica foram expostas à fase móvel composta por uma solução saturada 5:3:2 (v/v/v) de n-butanol, etanol e água, respectivamente, por aproximadamente 1 hora. Ao final, as placas foram reveladas pela imersão em uma mistura de metanol, ácido sulfúrico e α -naftol na proporção de 95:5:5 (v/v/m), respectivamente, e secas em manta de aquecimento até aparecimento das bandas correspondentes aos açúcares. Foram utilizados como marcadores os seguintes sacarídeos: xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e xilohexose (X6).

5.11.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O material hidrolisado foi analisado por HPLC para determinação das concentrações de XOS. Essa análise foi realizada em parceria com o Laboratório de Caracterização e Conversão de Biomassa (LCCB) no Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) na UNESP campus de Rio Claro, sob responsabilidade do professor Dr. Michel Brienza.

A análise seguiu em equipamento SHIMADZU, modelo NEXERA XR, acoplado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm), sob temperatura de 80°C, utilizando água ultrapura como eluente em fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Foram aplicados 20 μ L das amostras pré-filtradas por filtro de seringa com corte de 0,22 μ m. Cada análise teve tempo de duração de 15 minutos e foram realizadas em duplicata.

O pH das amostras foi ajustado entre 5 e 9 com 1 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH). Xilose (X1) (Sigma), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexaose (X6) (Megazyme-Irlanda) foram utilizadas como padrões para construção da curva padrão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Análise *in silico* da sequência de aminoácidos da endoxilanase homóloga do fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. utilizada para produção heteróloga da endoxilanase recombinante

A análise *in silico* da proteína ocorreu por meio da inserção da sequência primária da endoxilanase desse estudo em diversos softwares disponíveis na internet, para predição de parâmetros físico-químicos, domínios conservados e possíveis modificações pós-traducionais.

6.1.1. Parâmetros físico-químicos

A endoxilanase com a cauda de poli histidina (his-tag) apresenta um total de 224 aminoácidos em sua sequência primária, que totalizam uma massa molecular de 25,2 kDa. O ponto isoelétrico foi predito como sendo de 8,07, valor de pH onde a carga líquida da proteína se encontra nula.

Quadro 1. Parâmetros físico-químicos da endoxilanase recombinante de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4.

Nº de aminoácidos	224
Massa Molecular (kDa)	25,192
Ponto Isoelétrico	8,07
Resíduos – (Asp+Glu)	18
Resíduos + (Arg+Lys)	19
Fórmula	C ₁₁₃₂ H ₁₆₆₇ N ₃₁₅ O ₃₃₈ S ₃
Coeficiente de Extinção (M⁻¹ cm⁻¹) em 280 nm mensurado em água	74830
Absortividade	2,970
Índice de Instabilidade	28,54
Índice Alifático	59,60
Taxa de hidrofobicidade (GRAVY)	-0,646

Fonte: ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

6.1.2. Domínio conservado

A sequência correspondente à endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. apresenta um domínio inteiro conservado correspondente à família GH11, sendo considerada a região funcional da proteína. O alinhamento desse domínio tem início em uma histidina na posição 35 e termina em uma isoleucina na posição 213, e apresenta um E-value calculado pelo BLAST de $2.8e^{-74}$, E-values próximos de 1

indicam maior probabilidade de o alinhamento acontecer ao acaso, enquanto aqueles mais distante e menores do que 1 indicam que se pode considerar o alinhamento mais preciso, e menor a probabilidade de acaso (VANDERWEELE; DING, 2017).

A família GH11 é composta por enzimas que apresentam apenas atividade xilanolítica específica em hidrolisar as ligações glicosídicas do tipo β 1-4 entre as xiloses constituintes do polímero de xilana (BIELY et al., 1997). A presença do domínio completo correspondente a essa classe na sequência da endoxilanase avaliada, confirma sua classificação e função específica.

6.1.3. Modificações pós-traducionais: N e O-glicosilação

Glicosilações do tipo N acontecem pela adição de carboidratos ao nitrogênio da cadeia lateral de resíduos de Asparagina (N) que ocorrem em uma sequência específica de aminoácidos (N-X-T/S), onde T e S representam Treonina e Serina, respectivamente, e X um resíduo variável (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Essa região se repete por duas vezes na sequência da endoxilanase em questão, sendo a asparagina localizada nas posições 87 e 122. Porém a sequência observada para N 122 (N-P-S) não é um sítio válido de glicosilação, devido à presença da Prolina na posição 123 (MONONEN; KARJALAINEN, 1984). Assim sendo, apenas o sítio N 87 poderia ocorrer durante o enovelamento da proteína.

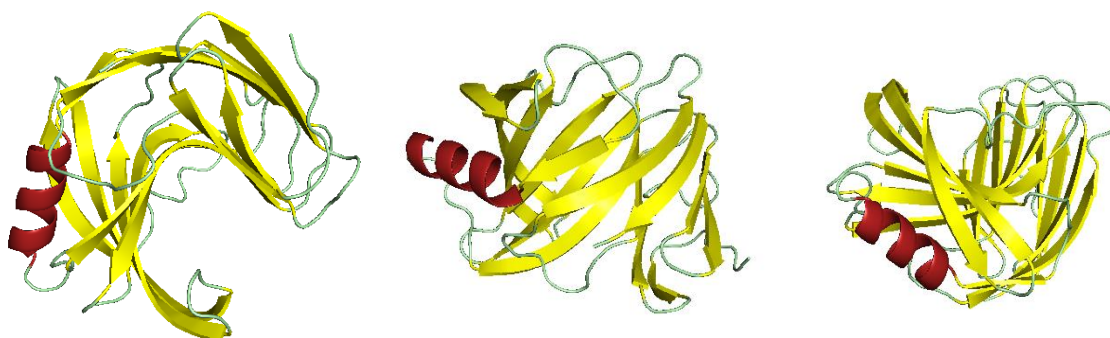
Glicosilações do tipo O acontecem pela adição de carboidratos à hidroxila das cadeias laterais de serina, treonina da proteína totalmente dobrada (STEEN et al., 1998). Nesse estudo apenas um resíduo de treonina na posição 16 foi identificado como passível de receber a adição de carboidratos. Contudo, tal resíduo se encontra na região excluída da sequência da enzima, por ter sido identificada como peptídeo sinal através do software online SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>), sendo o sítio de clivagem apontado para a posição 18 da estrutura primária da enzima.

6.2. Predição da estrutura tridimensional

A estrutura terciária da endoxilanase foi desenhada por homologia e resultou em uma estrutura composta majoritariamente de folhas beta (Figura 7), sendo 65 % da estrutura terciária formada por essa estrutura secundária; apenas uma alfa hélice

foi identificada e corresponde a 7% da estrutura total, enquanto os outros 27% correspondem a enovelamento aleatório (*random coil*).

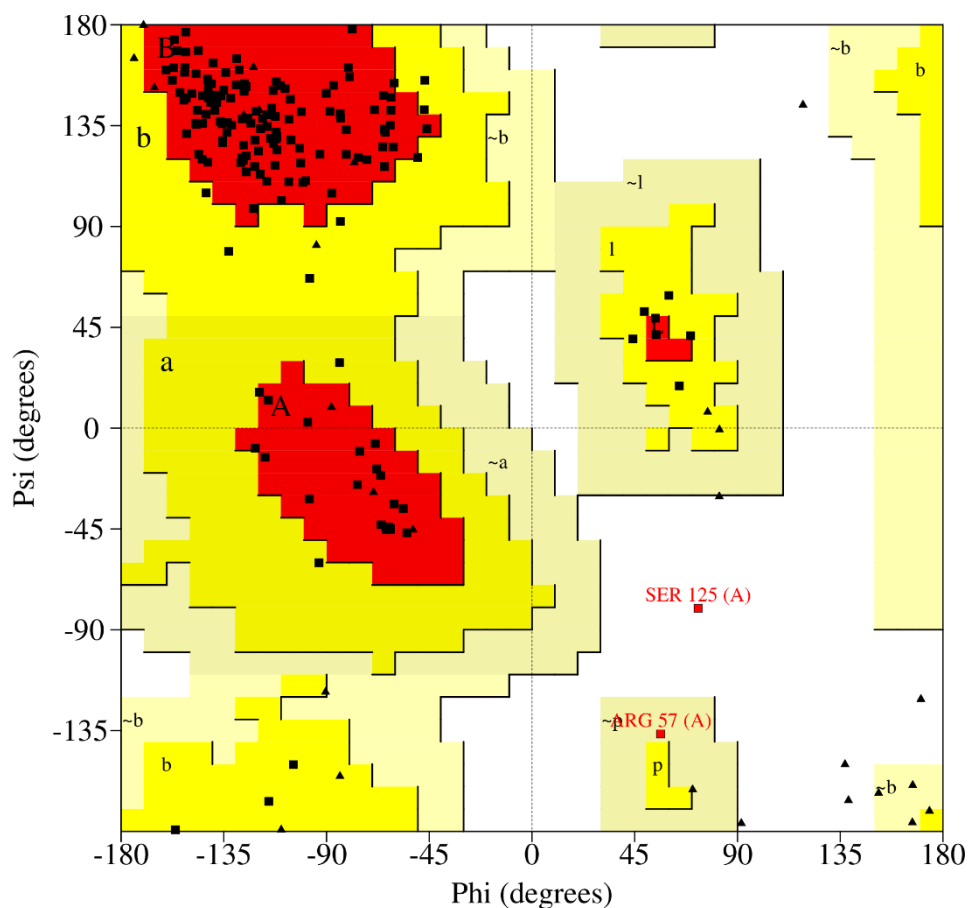
Figura 7. Estrutura terciária de endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, modelada por homologia pelo *Swiss-Model*. Representação em três perspectivas diferentes, evidenciando o sítio ativo (primeira representação), as estruturas secundárias: alfa hélice em vermelho, folhas betas em amarelo e as regiões de *random coil* em verde.



Fonte: autoria própria usando *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) representada pelo programa PyMOL (Schrödinger, Inc.).

O modelo da estrutura desenhada por homologia (Figura 7) foi validado a partir do gráfico de Ramachandran (Figura 8), onde 91,1% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favorecidas (A, B e C), 7,6 % dos resíduos encontram-se em regiões adicionais permitidas (a,b,l,p), 0,6 % dos resíduos encontram-se em regiões generosamente permitidas (~a,~b,~l,~p) (Arg57), e 0,6 % dos resíduos encontram-se em regiões não permitidas (Ser125).

Figura 8. Gráfico de Ramachandran para o modelo da estrutura terciária de endoxilanasase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, modelada por homologia pelo *Swiss-Model*. As regiões em vermelho identificadas por (A,B e C) correspondem a regiões mais favorecidas. As regiões em amarelo identificadas por (a,b,l,p) correspondem a em regiões adicionais permitidas. As regiões em bege identificadas por (~a,~b,~l,~p) correspondem a regiões adicionais permitidas. As demais regiões do gráfico são regiões não permitidas.



Fonte: autoria própria usando servidor SAVES v6.0 e ferramenta PROCHECK.

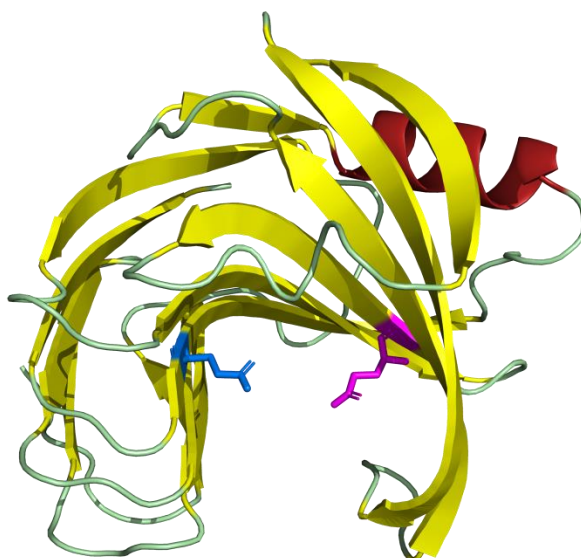
Na figura 9 é possível observar as cadeias laterais dos resíduos catalíticos de glutamato, Glu89 em magenta (nucleófilo) e Glu181 em azul (resíduo ácido/básico) no mecanismo de duplo deslocamento de Koshland. A posição dos resíduos catalíticos está relacionada com regiões específicas da sequência primária.

O resíduo nucleófilo foi descrito pela primeira vez como sendo Glu78 na xilanasase de *Bacillus subtilis* (MIAO et al., 1994) sendo a região em que se encontra esse aminoácido de "PLIEYYV" ao buscarmos por essa região em nossa sequência encontramos "PLVEYYI" nas posições 86 a 92, ao realizarmos o alinhamento múltiplo

das sequências foi possível observar que essa região é idêntica para todas endoxilanasas com elevada identidade.

O Glu181 foi identificado como sendo o resíduo ácido/base da catálise, esse resíduo foi descrito para a xilanase de *Cellulomonas fimi* como sendo Glu127 (MACLEOD et al., 1994) e para a região de repetição “ITELD”, encontramos em nossa sequência a região padrão “ATEGY” na posição 179 a 183, que se repete nos alinhamentos múltiplos com sequências de endoxilanasas de elevada identidade.

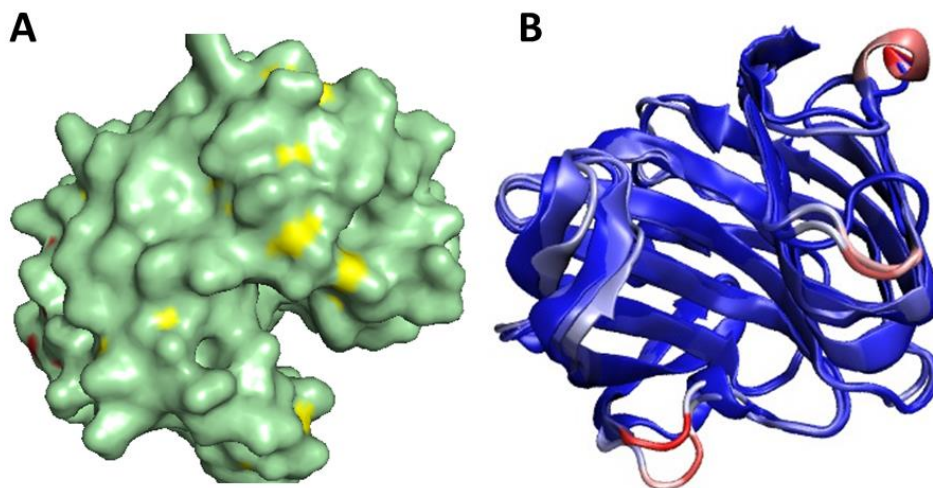
Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, destacando os resíduos catalíticos no sítio ativo, Glu89 em magenta (nucleófilo) e Glu181 em azul (resíduo ácido/básico), característicos do mecanismo de duplo deslocamento de Koshland.



Fonte: autoria própria usando *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) representado pelo programa PyMOL (Schrödinger, Inc.).

A figura 10 representa o modelo de superfície e a imagem de sobreposição do modelo estrutural da endoxilanase com os modelos das proteínas de maior identidade na sequência (100% XP_003667299.1 e QBC65279.1; 90,37% XP_001228486.1 e 87,16% KXX78410.1). Nota-se que a maior parte das regiões de folhas beta da estrutura possui grande similaridade com as demais estruturas sobrepostas, enquanto apenas algumas regiões de enovelamento aleatório e de alfa hélices diferem entre os modelos.

Figura 10. Representação da estrutura tridimensional da endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, em A modelo de superfície e em B sobreposição de modelos.



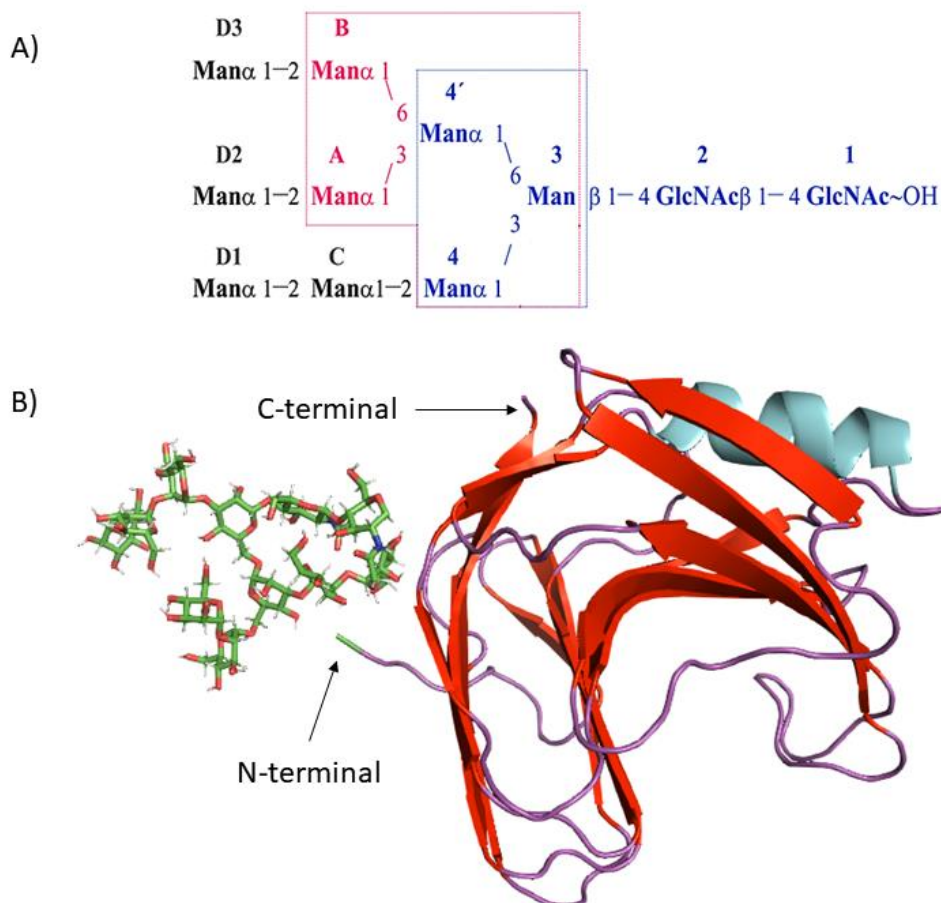
Fonte: autoria própria usando *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) representado por PyMOL.

6.3. Visualização das glicosilações tipo N no modelo da estrutura tridimensional e interação do modelo com o substrato

Os modelos com maior similaridade entre as sequências primárias, que foram utilizados como base para a construção do modelo representativo da estrutura tridimensional da endoxilanase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, iniciavam a sequência com uma valina na posição 23 (Val 23), com isso a glicosilação tipo O predita para ocorrer em Thr 16 (treolina) não pode ser desenhada no modelo da estrutura.

O servidor Net-N-glic identificou dois locais de glicosilação Asn69 e Asn104. Esta segunda está próxima de uma prolina, que é uma sequência proibida, então apenas Asn69 foi considerada. As glicosilações tipo N em Asn69 foram desenhadas pelo Glycan.com, utilizando a estrutura de oligomanose, classificada como glicano tipo alta manose, composta por N-acetilglicosamina com 9 resíduos de manose ramificados e ligados por ligações alfa 1,2 entre si, e por ligações alfa 1,3 e alfa 1,6 nas ramificações (Figura 11) (FURUKAWA; KOBATA, 1992; WELLENS et al., 2008).

Figura 11. Representação do modelo estrutural glicosilado da endoxilanasase de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. (A) estrutura da oligomanose utilizada como modelo de glicosilação, (B) perspectiva de visualização da estrutura glicosilada, observando-se as regiões N e C terminais do template (modelo).

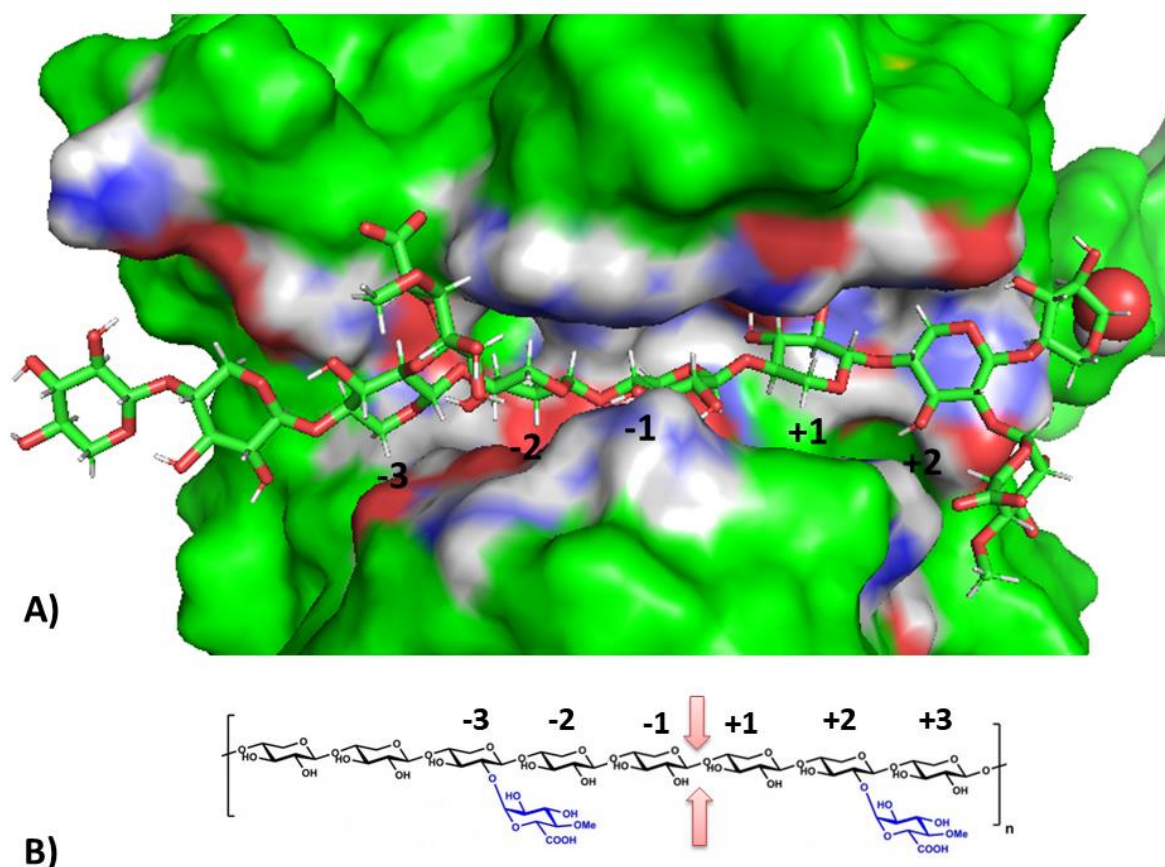


Fonte: autoria própria, com base em WELLENS et al., 2008 e *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>), representado por PyMOL.

O papel principal da glicosilação está relacionado com o objetivo de assegurar o correto enovelamento e estabilidade na conformação das glicoproteínas (FURUKAWA; KOBATA, 1992). Não observamos interação entre os átomos das estruturas de glicosilações com o substrato quando avaliada a distância de 4 Ångströms pelo PyMOL, apenas resíduos próximos ao sítio ativo da enzima parecem interagir com o substrato. Os resíduos identificados foram: Q7; T10; S19; W21; N47; V49; N74; Y78; Y80; W82; E89; Y99; T123; R125; P129; S130; I131; G133; Y175; E181 e Y183, sendo E89 e E181 os resíduos catalíticos do sítio de clivagem da enzima.

A ramificação do substrato se encontra ligada aos subsítios -3 e +2 (VARDAKOU et al., 2008), identificamos que o resíduo de arginina na posição 125 (R125) pode estabelecer ligações de hidrogênio com o substrato, entre o hidrogênio do grupo NH_2 da cadeia lateral do resíduo e o oxigênio do grupo ácido carboxílico ligado ao carbono 5 da ramificação do subsítio -3. A ramificação do subsítio +2 encontra-se próxima ao resíduo de tirosina na posição 99, onde a interação poderia ser estabelecida entre o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral e a hidroxila ligada ao carbono 2 da ramificação (Figura 12).

Figura 12. Orientação do substrato no sítio ativo da enzima. Os subsítios estão identificados como -3; -2; -1; +1 e +2. A) modelo de superfície da estrutura enzimática e substrato representado em bastões. B) representação do substrato e identificação dos subsítios com base no sítio de hidrólise, as setas vermelhas indicam a ligação a ser hidrolisada pela enzima.



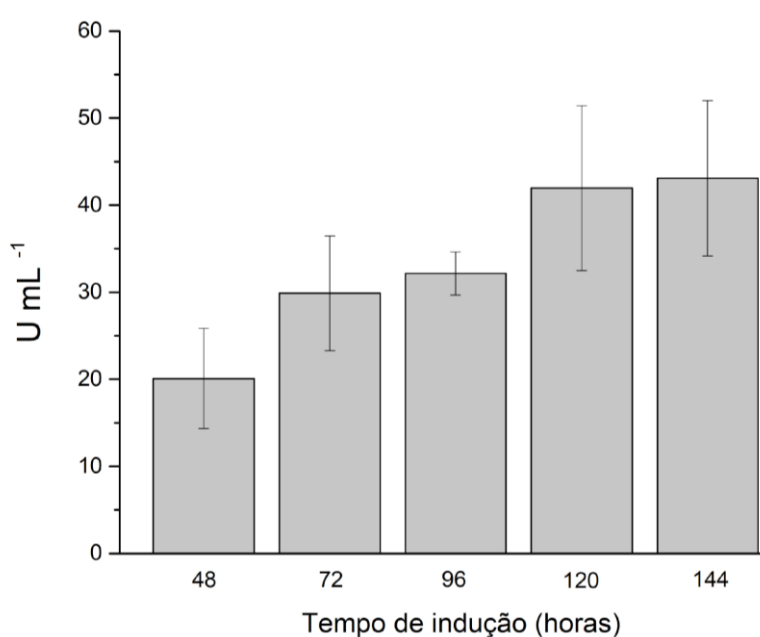
Fonte: autoria própria usando *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) representado por PyMOL.

Tais interações resultariam na orientação adequada do substrato em relação ao sítio catalítico, evidenciando a especificidade catalítica da enzima em hidrolisar a ligação três resíduos após a ramificação (BIELY et al., 1997).

6.4. Produção por expressão heteróloga da endoxilanasase de *Myceliophthora heterothallica* em *Pichia pastoris*

As amostras foram retiradas a cada 24 horas do início do cultivo, decorridas as primeiras 48 horas. Observou-se aumento na quantidade de enzima ao longo do tempo, com 20 U mL⁻¹ sendo produzidas nas primeiras 48 horas de cultivo e a máxima de 42,0 U mL⁻¹ em 120 horas de indução. Após esse período os valores não apresentaram aumento considerável, onde observamos produção enzimática de 43,1 U mL⁻¹ para o tempo de 144 horas (Figura 13). Com isso o tempo utilizado para produzir maiores volumes de extrato enzimático para realização dos demais ensaios permaneceu 120 horas como descrito anteriormente na tese de doutorado de Gabriela Salvador de Amo (AMO, 2018), que no tempo mencionado alcançou a produção de 48,8 U mL⁻¹

Figura 13. Perfil de produção da endoxilanasase recombinante (U mL⁻¹) expressa por *Pichia pastoris* cultivada em meio BMMY em diferentes tempos após a indução por metanol. A barra representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



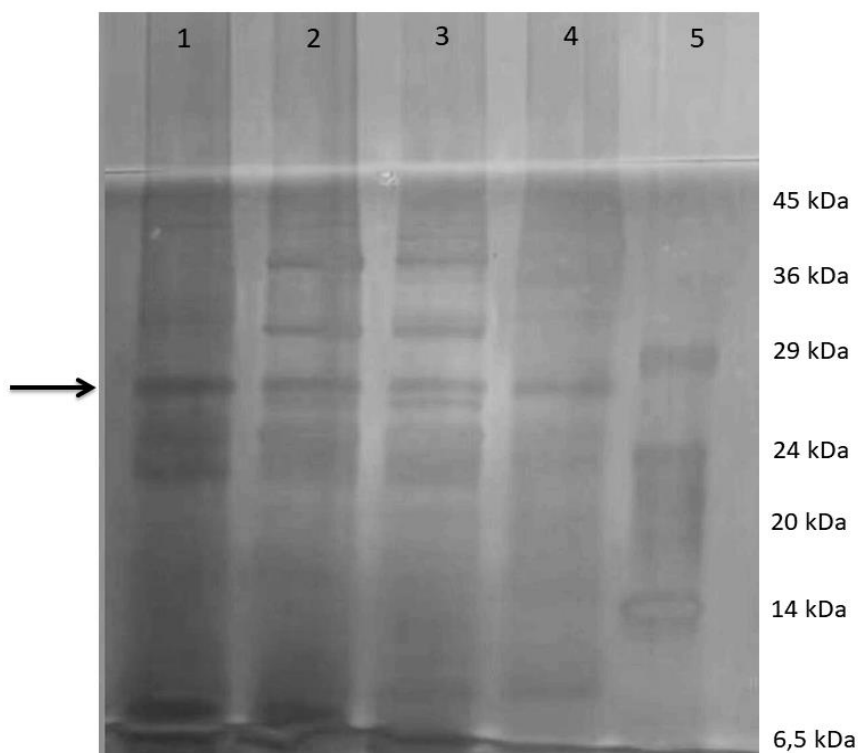
Fonte: autoria própria.

Os valores de unidades enzimáticas obtidos nesse estudo são superiores aos relatados na literatura, onde a expressão por *Pichia pastoris* de uma endoxilanase termoestável de *Cryptococcus flavescens*, apresentou valores de $10,4 \text{ U/mL}^{-1}$ em 60 horas de indução com 50% glicose m/v (MARTINS et al., 2020).

6.2 Estimativa da Massa Molecular em condições desnaturantes

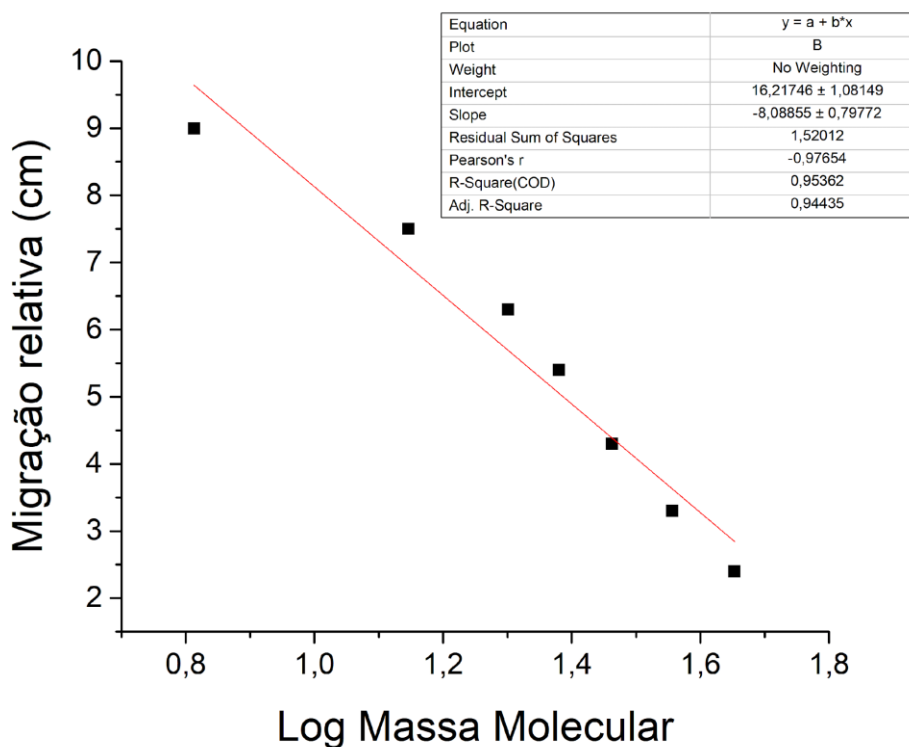
Com base nos resultados obtidos a partir da técnica de eletroforese SDS-PAGE (Figura 14) foi confeccionado um gráfico da migração relativa no gel de poliacrilamida x Log Massa Molecular (Figura 15) e por meio da regressão linear obteve-se a seguinte equação da reta $y = 16,22 + (-8,08 * x)$, sendo x correspondente à migração relativa no gel e y o log da massa molecular.

Figura 14. Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 12% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) do cultivo da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* em diferentes tempos a indução com metanol. A canaleta 5 corresponde ao marcador de massa molecular Low Range (6,5 – 66 kDa), enquanto aquelas de 1 a 4 correspondem aos tempos de cultivo 48, 72, 120 e 144 horas em tampão de amostra com SDS e exposição de +/- 5 minutos de fervura antes de serem aplicadas ao gel.



Fonte: autoria própria.

Figura 15: Gráfico de Fischer do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração relativa em gel de poliacrilamida a 10 %.



Fonte: autoria própria.

A fim de observar com exatidão as proteínas contidas no material analisado, todas as amostras foram previamente precipitadas com 10% de TCA (Ácido Tricloroacético) e posteriormente aplicadas no gel de SDS-PAGE. Com base na equação da reta obtida através do gráfico de Fischer (Figura 15) calculou-se a massa molecular da banda correspondente à endoxilanase recombinante, resultando no valor de 25,2 kDa. O valor encontrado é correspondente ao predito pelo *Web-software* ProtParam de 25,2 kDa para a sequência com a cauda de poli-histidina na região N-terminal.

6.3 Purificação da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

A purificação da proteína explorando a afinidade entre a cauda de histidina inserida na região N-terminal da sequência da proteína e a cromatografia de afinidade com metais imobilizados (IMAC) não promoveu a retenção da enzima, sendo eluído durante a etapa de lavagem com 20 mM de imidazol (dados não mostrados). Por esse

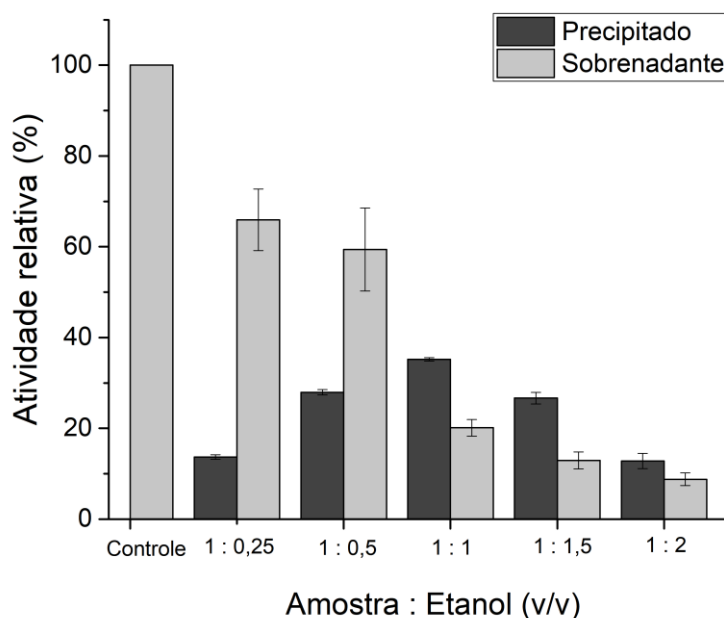
motivo foi estabelecido um novo protocolo de purificação para a endoxilanasase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

O novo protocolo de purificação conta com uma etapa inicial de precipitação com etanol para remoção de parte das proteínas contaminantes, seguindo para uma etapa de cromatografia de exclusão molecular, posterior concentração das frações por precipitação com sulfato de amônio 80%, e por fim uma nova cromatografia de exclusão molecular para obtenção da proteína livre de contaminantes. Os resultados de cada uma das etapas serão apresentados a seguir.

6.3.1. Precipitação com etanol

O extrato enzimático foi incubado com as seguintes concentrações de etanol: 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2 (v/v). Nas proporções de 1:0,25 e 1:0,5 (v/v) os maiores valores de atividade xilanolítica foram observados no sobrenadante do processo de precipitação, já nas proporções a partir de 1:1 (v/v), as maiores atividades xilanolíticas se encontram no precipitado (Figura 16). Embora a proteína de interesse tenha sido precipitada na presença de 100% (v/v) de etanol, os valores de atividade enzimática se mostraram baixos, com 35% de atividade relativa para o precipitado com essa concentração. As proporções de 1:1,5 e 1:2 (v/v) também mantiveram esse perfil de baixos valores de atividade enzimática, tanto na fração precipitada, quanto na fração sobrenadante.

Figura 16. Precipitação do extrato enzimático contendo a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* utilizando diferentes concentrações de etanol. As barras escuras indicam os valores da média de três réplicas da atividade relativa do material precipitado e as barras claras indicam a atividade relativa do material sobrenadante, as linhas verticais indicam o desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

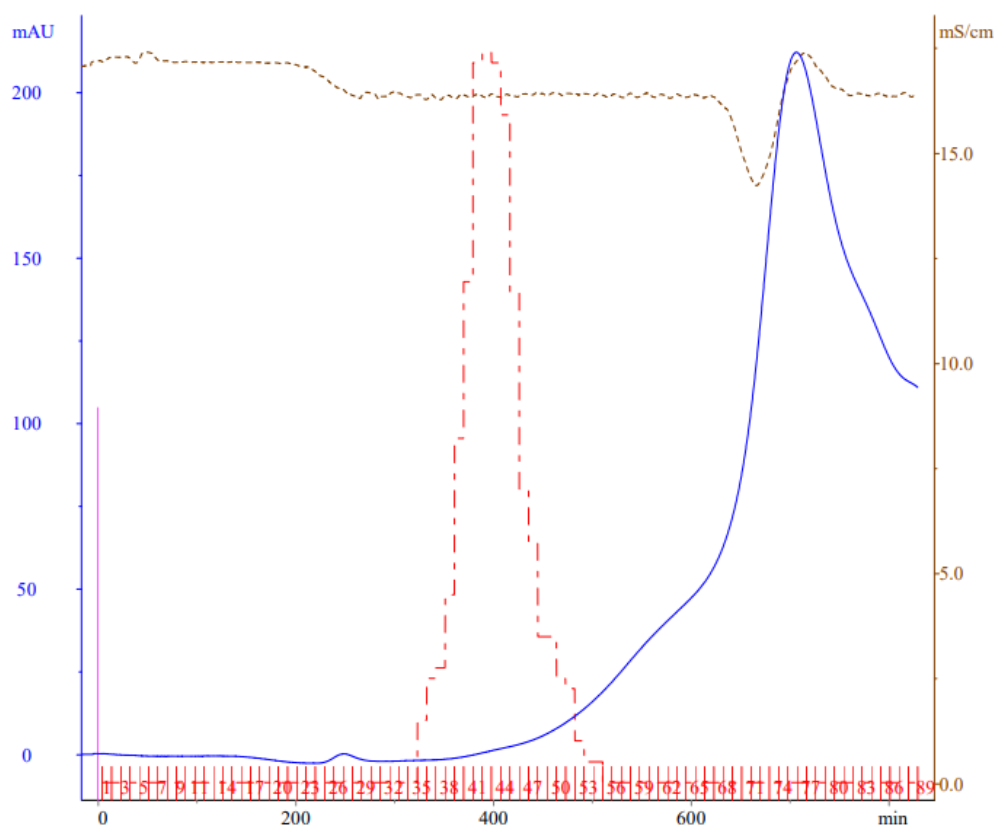
Com base nesses resultados, a proporção de etanol adotada foi de 1:0,25 (v/v), pois foi observado que com esse valor é possível precipitar proteínas contaminantes e manter a proteína de interesse na fração sobrenadante, mantendo 70 % de atividade enzimática xilanolítica.

Após a etapa de precipitação com etanol na proporção de 1:0,25 (v/v), a fração sobrenadante do processo é aplicada em cromatografia de filtração em gel.

6.3.2. Cromatografia de exclusão molecular em resina de Sephadex G-50

A amostra (sobrenadante da precipitação com etanol na proporção de 1:0,25 (v/v)) foi aplicada na coluna e a cromatografia foi realizada com fase móvel composta por tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ acrescido de 150 mmol L⁻¹ NaCl em fluxo de 0,160 mL/min, sendo coletadas frações de 1,5 mL que posteriormente foram submetidas a dosagem da atividade enzimática. Seguindo essas condições, a máxima atividade xilanolítica foi detectada em 64 mL de eluição (Figura 17).

Figura 17. Perfil de eluição na filtração em gel do sobrenadante da precipitação com etanol aplicado em coluna cromatográfica GE XK-16/100 com Sephadex G-50 operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min. A linha inteira azul representa os valores de absorbância em 280 nm, a linha tracejada vermelha representa os valores de absorbância em 540 nm após quantificação de açúcares redutores resultantes da atividade enzimática, e a linha pontilhada marrom representa o valor de condutividade da fase móvel.



Fonte: autoria própria.

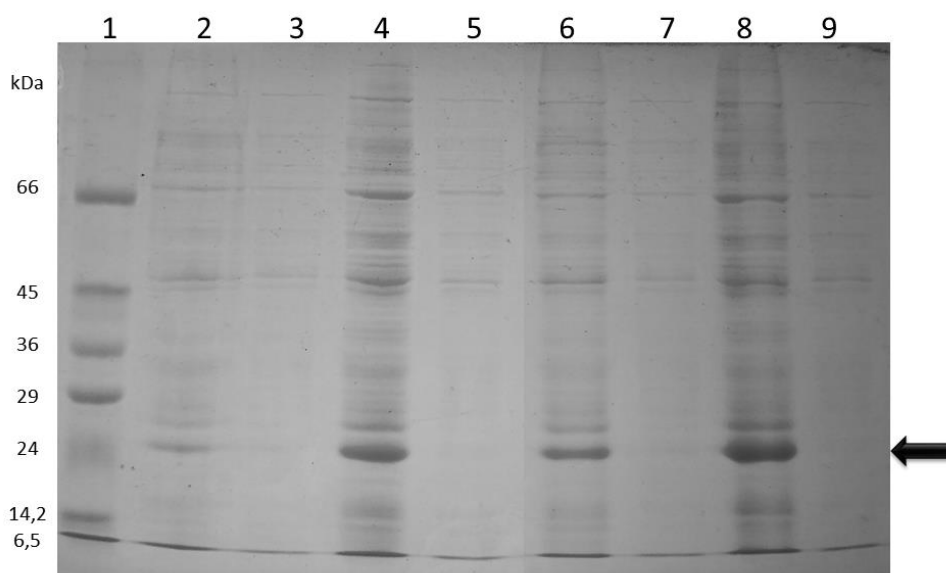
As frações coletadas que apresentaram atividade enzimática xilanolítica, foram agrupadas em uma única fração, totalizando um volume de 13,5 mL que foi submetido à precipitação com sulfato de amônio com a finalidade de concentrar essa amostra para as etapas seguintes de purificação.

6.3.3. Precipitação com Sulfato de amônio

Foi realizada uma análise preliminar para determinar a melhor concentração de sulfato de amônio a ser utilizada com a finalidade de concentrar a solução de proteínas obtidas após a cromatografia de filtração em gel pela resina Sephadex G-

50. Avaliaram-se as concentrações de 50, 60, 70 e 80 % de saturação de sulfato de amônio ao extrato enzimático (Figura 18).

Figura 18. Análise eletroforética SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) das frações após a precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio. A canaleta 1 corresponde ao marcador de massa molecular *Low range* 6,5 – 66 kDa. As canaletas 2 e 3 correspondem, respectivamente, ao precipitado e ao sobrenadante da concentração de 50% de saturação. As canaletas 4 e 5 correspondem, respectivamente, ao precipitado e ao sobrenadante da concentração de 60% de saturação. As canaletas 6 e 7 correspondem, respectivamente, ao precipitado e ao sobrenadante da concentração de 70% de saturação. As canaletas 8 e 9 correspondem, respectivamente, ao precipitado e ao sobrenadante da concentração de 80% de saturação.



Fonte: autoria própria.

É possível observar que em todas as concentrações de saturação de sulfato de amônio, a banda sugestiva da endoxilanase recombinante encontra-se nas frações precipitadas. Com isso estabeleceu-se a concentração de 80 % de sulfato de amônio para realizar a precipitação de todas as proteínas contidas na amostra pós Sephadex G-50.

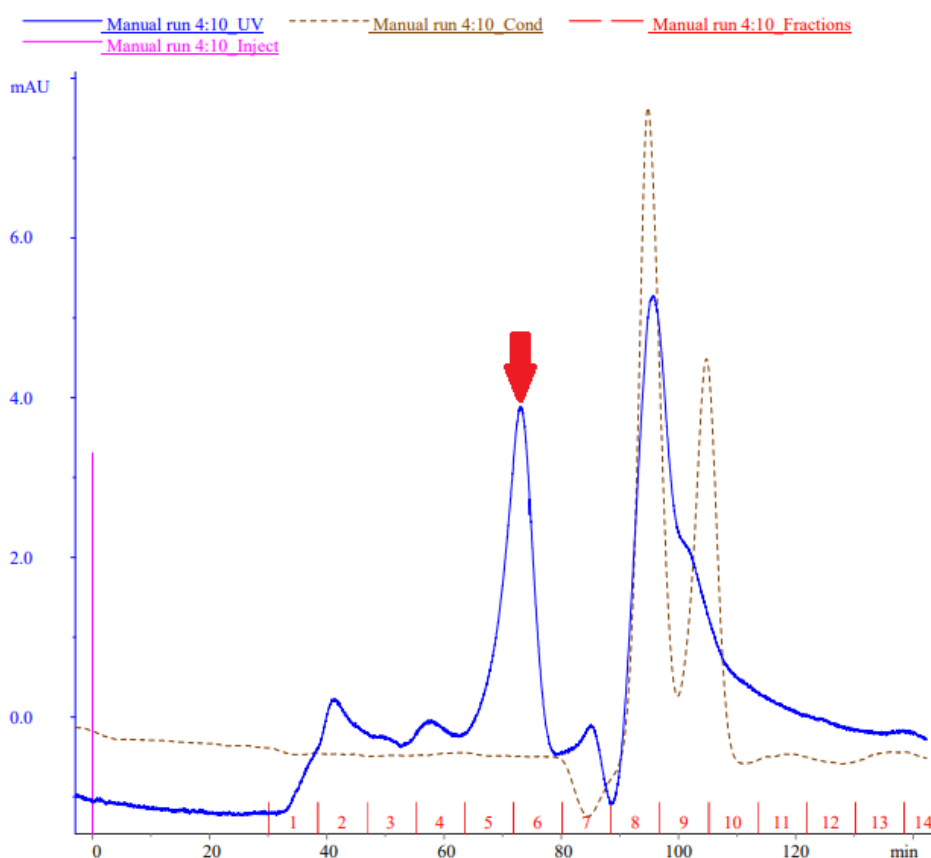
6.3.4. Cromatografia de exclusão molecular Superdex-75

A última etapa do processo de purificação contou com uma cromatografia de filtração em gel de alta performance, utilizada em etapas finais de purificação. A

amostra obtida na cromatografia em Sephadex G-50 e concentrada com 80 % de sulfato de amônia foi ressuspendida em 0,5 mL de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ acrescido de 150 mmol L⁻¹ NaCl, e aplicada a uma coluna de cromatografia de filtração em gel Superdex 75 10/300 GL, com fluxo de 0,16 mL/min. Foram coletadas amostras de 1,5 mL a partir de 5 mL decorridos da corrida cromatográfica, sendo essas frações submetidas à dosagem da atividade enzimática.

A atividade enzimática xilanolítica foi detectada com 11 mL de eluição, a seta vermelha na figura 19 indica o pico de absorbância UV correspondente às frações com atividade xilanolítica.

Figura 19. Perfil de eluição na filtração em gel do precipitado por 80% de sulfato de amônia aplicado em coluna cromatográfica de filtração em gel Superdex 75 10/300 GL operada em sistema Äkta Purifier, com fluxo de fase móvel em 0,16 mL/min. A linha contínua azul representa os valores de absorbância em 280 nm, e a linha pontilhada marrom representa o valor de condutividade da fase móvel. A seta vermelha indica o pico de absorbância UV correspondente às frações com atividade xilanolítica.



Fonte: autoria própria.

Para elaboração da tabela de purificação, as amostras provenientes de cada etapa do processo foram submetidas à dosagem da atividade enzimática, dosagem da concentração total de proteínas, tendo seus volumes documentados. A atividade total (U) foi calculada multiplicando a atividade enzimática (U/mL) pelo volume da amostra (mL), já a atividade específica (U/mg) é calculada dividindo a atividade total (U) pela concentração de proteína (mg). Para calcular o rendimento, a atividade total do material de partida (extrato enzimático) foi utilizada como 100 % de referência, e o fator de purificação foi obtido dividindo a atividade específica de cada etapa pela atividade específica do material de partida.

Tabela 1. Tabela de purificação da xilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

	Volume (mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato enzimático	1	35,65	35,65	0,474	75,22	100	1
Pós prec. Etanol	1,25	27,78	34,73	0,472	73,58	97,41	0,98
Pós G50	13,5	1,16	15,74	0,135	116,61	44,14	1,55
Pós prec. Sulfato de amônio	1	7,27	7,27	0,197	36,92	20,40	0,49
Pós superdex75	3	0,71	2,13	0,0345	61,85	5,97	0,82

Fonte: autoria própria.

A atividade enzimática é perdida no decorrer do processo de purificação, ao mesmo tempo a concentração de proteína não sofre tamanha variação, com isso obtivemos baixos fatores de purificação a cada etapa do processo. Observa-se na literatura valores maiores de rendimento da purificação, Terrone e colaboradores, obtiveram 58,7 para α -arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai*, que seguiu o

processo de purificação iniciado pela precipitação com 65% de sulfato de amônio, seguida por cromatografia CM Sephadex C-50 e após por cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-100 (TERRONE et al., 2020). Outros trabalhos apresentam valores mais próximos de fator de purificação, como Gomes em 2014 que relata o fator de purificação de 1,4 para endoxilanase do fungo *Chrysosporthe cubensis*, após duas etapas de purificação iniciando por cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose, seguida de cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200 (GOMES, 2014).

6.4. Avaliação do efeito do glicerol sobre a desnaturação térmica irreversível pela atividade enzimática da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Durante as análises desenvolvidas por (AMO, 2018) a presença de 50 % de glicerol foi capaz de manter 99,3% da atividade enzimática após 24 horas a 25 °C, já a presença de 10 mmol L⁻¹ de compostos fenólicos como ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido vanílico e ácido 4-hidroxibenzóico, após 24 horas foram capaz de aumentar a atividade residual da endoxilanase em 138; 133; 123 e 115%, respectivamente.

Para explorar melhor o efeito protetor do glicerol sobre a endoxilanase recombinante expressa *Pichia pastoris*, a presença da substância foi avaliada na determinação de parâmetros termodinâmicos e simulações de dinâmica molecular, e comparadas com os resultados obtidos pela enzima na ausência da substância.

6.4.1. Efeito da temperatura na hidrólise do substrato da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*, nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática

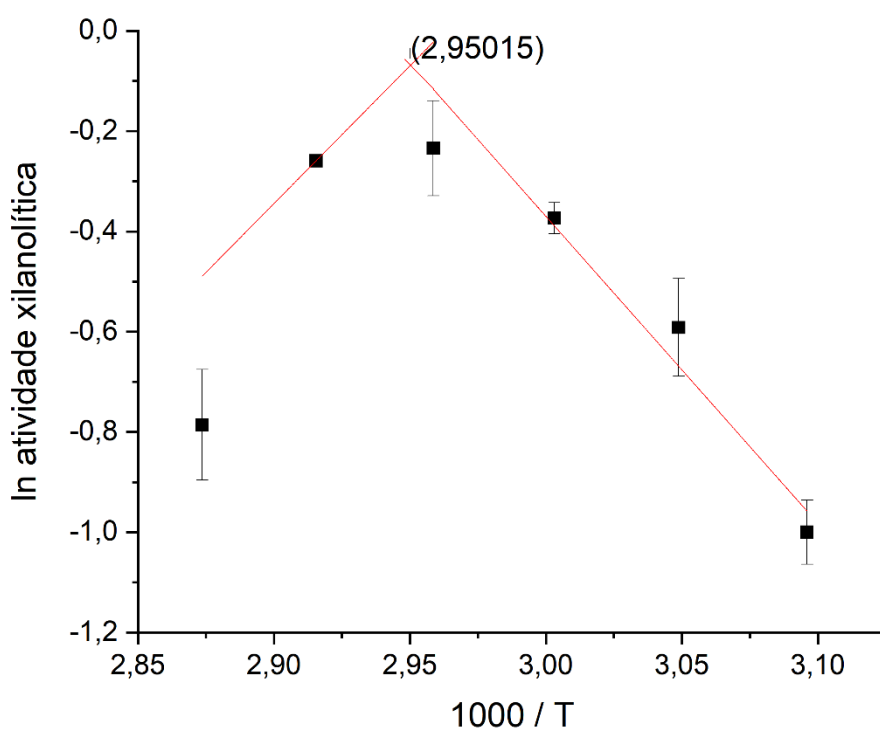
O aumento da temperatura em um sistema promove um aumento na velocidade de movimentação das moléculas. No caso de uma reação enzimática, a temperatura é um fator importante para a formação do complexo enzima-substrato (ES), uma vez que a velocidade ideal de movimentação das moléculas no sistema reacional irá assegurar a máxima probabilidade de colisão entre as moléculas de enzima e de substrato, e conseqüentemente a máxima probabilidade de formação do

complexo ES (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Os valores de temperatura ótima são aqueles onde a máxima probabilidade é assegurada, valores abaixo das condições ótimas resultam em menores velocidades de reações, e valores acima acabam favorecendo o processo de desnaturação térmica.

Para determinar os valores de temperatura ótima, energia de ativação da reação (E_a) e coeficiente de temperatura (Q_{10}), a atividade enzimática foi determinada em diferentes valores de temperaturas e os produtos quantificados pelo método de Miller antes mencionado.

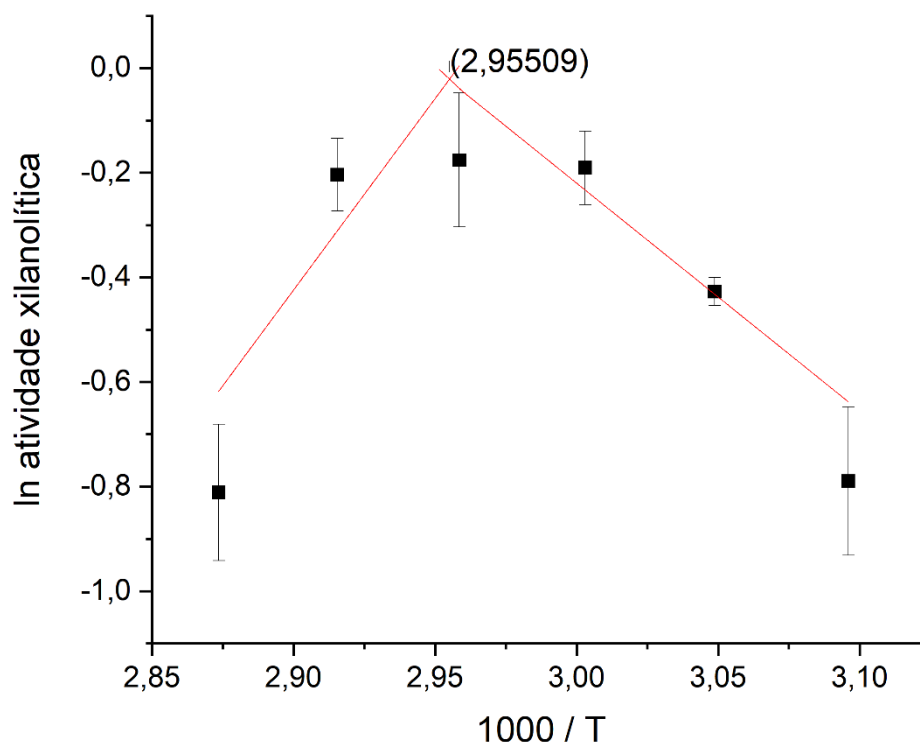
A temperatura ótima da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* determinada nas condições ótimas de pH, foi calculada (equação 2) a partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as porções ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius. Na ausência de glicerol o valor estimado foi de 66,0 °C (Figura 20), enquanto na presença de 20% de glicerol (Figura 21), o valor foi de 65,4 °C.

Figura 20. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*, na ausência de glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood. As barras verticais indicam o desvio padrão das medidas (n=3).



Fonte: autoria própria.

Figura 21. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o efeito da temperatura sobre a atividade da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*, na presença de 20 % glicerol nos ensaios para hidrólise da xilana de Beechwood. As barras verticais indicam desvio padrão das medidas (n=3).



Fonte: autoria própria.

Foi observada uma diminuição na energia de ativação da enzima quando ensaiada na presença de glicerol. A energia de ativação (E_a) (equação 3) foi calculada em $50,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$ na ausência de glicerol e $36,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ na presença de 20% de glicerol, diminuindo aproximadamente 1,4 vezes. Esse resultado indica que a presença do glicerol no ensaio faz com que a enzima enfrente menor barreira de energia a ser superada durante a reação de hidrólise do substrato, e que a ausência desse osmólito no ensaio resulta em menor eficiência no trabalho catalítico da enzima. É possível supor que a causa dessa diminuição da energia de ativação seja a desnaturação térmica mais rápida sobre a enzima na ausência do glicerol.

Com o valor da energia de ativação foi possível calcular os coeficientes de cada temperatura (Q_{10}) (equação 4) indicam a variação na taxa de reação em resposta a elevação de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, esses valores geralmente variam entre 1 e 2 para enzimas, sendo os valores próximos a 2 refletindo maior sensibilidade das estruturas em

relação à temperatura (SAQIB et al., 2010). Os valores de Q_{10} (tabela 2) foram praticamente os mesmos para os dois ensaios, havendo diferenças apenas na terceira casa decimal.

Tabela 2. Coeficientes de temperatura (Q_{10}) da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* estimados com base no gráfico de Arrhenius de primeira ordem.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Q_{10} Ausência de glicerol	Q_{10} Presença de 20% de glicerol
55	328	1,77	1,50
60	333	1,74	1,48
65	338	1,71	1,46
70	343	1,67	1,45

Fonte: autoria própria.

6.4.2. Análise da termoestabilidade da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*, nas condições de ausência e presença de 20% de glicerol durante a reação enzimática

Os parâmetros termodinâmicos que nos permitem avaliar a termoestabilidade das enzimas incluem o tempo de meia vida ($T_{1/2}$), a energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$), a temperatura de fusão (T_m) além dos parâmetros de variação da entalpia (ΔH_D), entropia (ΔS_D), e energia livre de Gibbs (ΔG_D) da desnaturação térmica. Para serem calculados é necessário incubar a enzima na ausência de substrato em diferentes temperaturas por diferentes tempos, ao final permanecer a enzima em repouso na temperatura de 4 °C, para que a estrutura nativa possa eventualmente ser revertida e posteriormente determinar a atividade enzimática para calcular a taxa de perda da atividade da enzima (SAQIB et al., 2012).

O tempo de meia vida ($T_{1/2}$) de uma enzima trata-se do tempo necessário para que a enzima perca 50% da atividade original em uma determinada temperatura, assim valores maiores de meia vida indicam que a enzima é capaz de suportar os efeitos da desnaturação térmica por tempos mais longos. Conforme esperado para

esse teste, a endoxilanase avaliada na presença de glicerol 20 % apresentou valores de meia vida maiores do que os ensaios na ausência do composto (Tabela 3). Os valores de k_d para o cálculo do tempo de meia vida (equação 5) foram obtidos pelo negativo da inclinação das retas obtidas nas figuras 22 e 23.

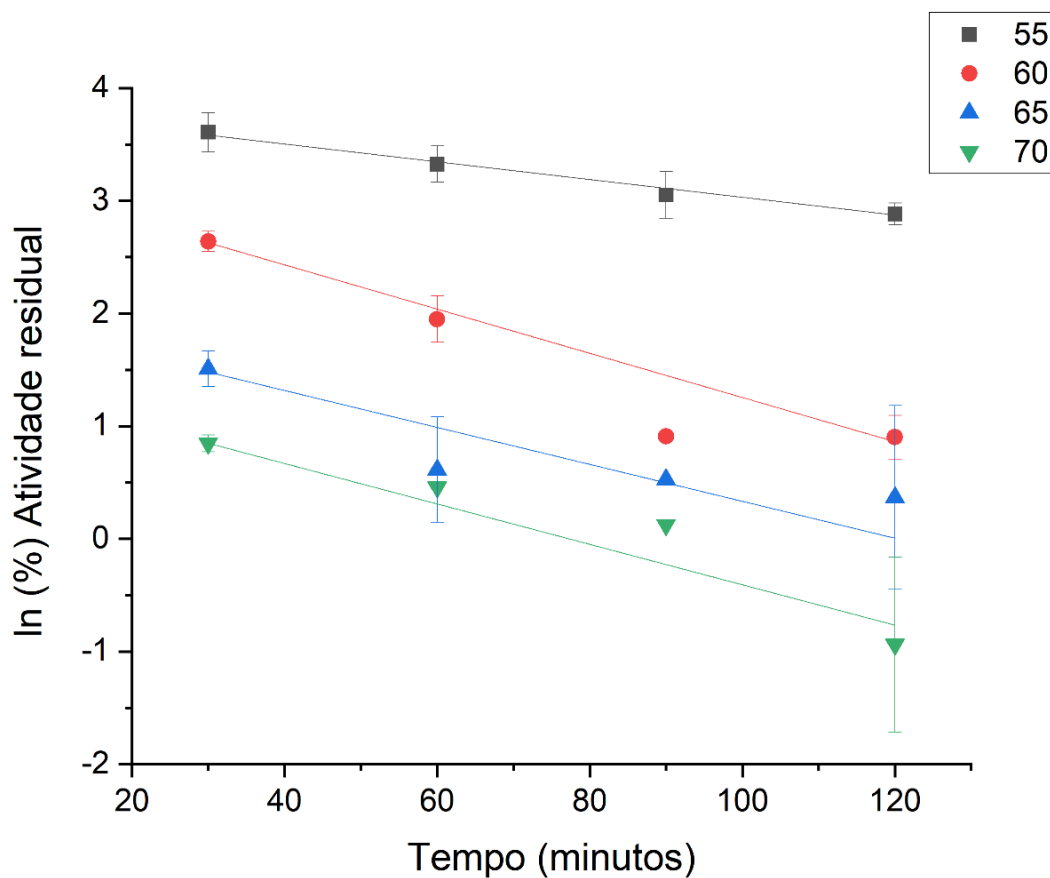
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica irreversível da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

Temperatura		Ausência de glicerol		Presença 20 % de glicerol	
°C	K	k_d (min ⁻¹)	T ½ (min)	k_d (min ⁻¹)	T ½ (min)
55	313,15	0,00793	87,39	0,00156	444,22
60	323,15	0,0184	37,65	0,00859	80,67
65	333,15	0,0164	42,27	0,00919	75,41
70	343,15	0,0203	34,14	0,00395	74,12

Fonte: autoria própria.

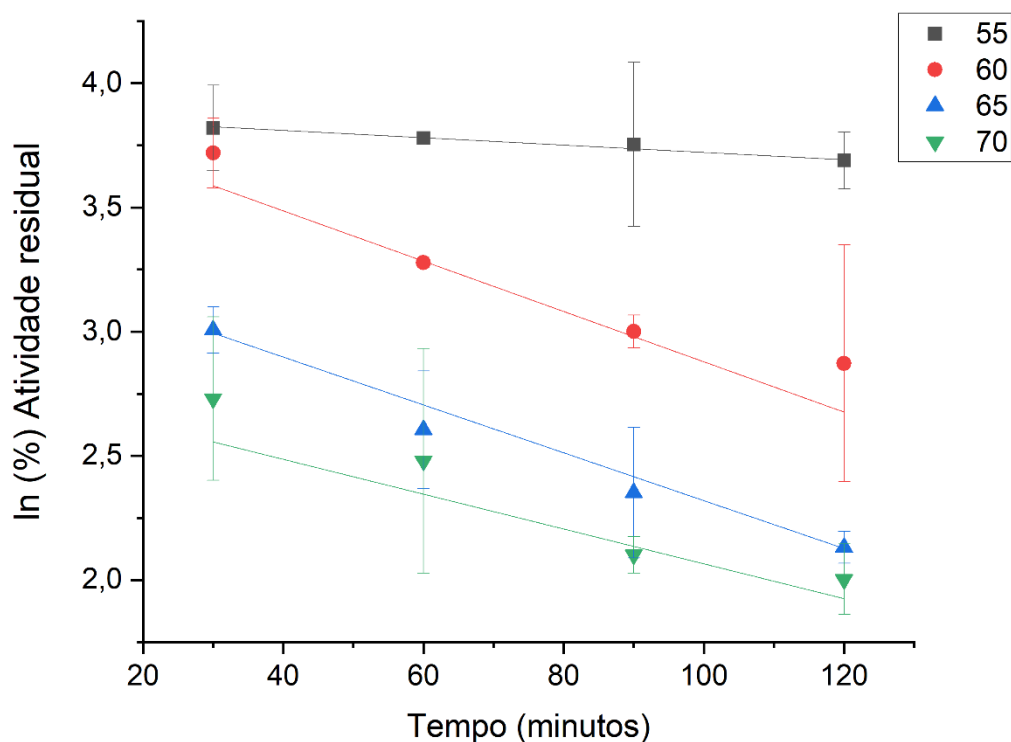
Ambas as condições de ensaio apresentaram tempos de meia vida maiores a 55 °C. Na presença de 20% de glicerol os valores apresentados são aproximadamente 2 vezes maiores do que o observado para o ensaio na ausência do composto, em todas as temperaturas avaliadas, exceto para a temperatura de 55°C onde o valor mostra-se 5 vezes maior.

Figura 22. Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanasase recombinante expressa em *Pichia pastoris*. As amostras de enzima foram incubadas a 40 °C (■), 50 °C (●), 60 °C (▲), e 70 °C (▼) e determinada a atividade residual na ausência de glicerol.



Fonte: autoria própria.

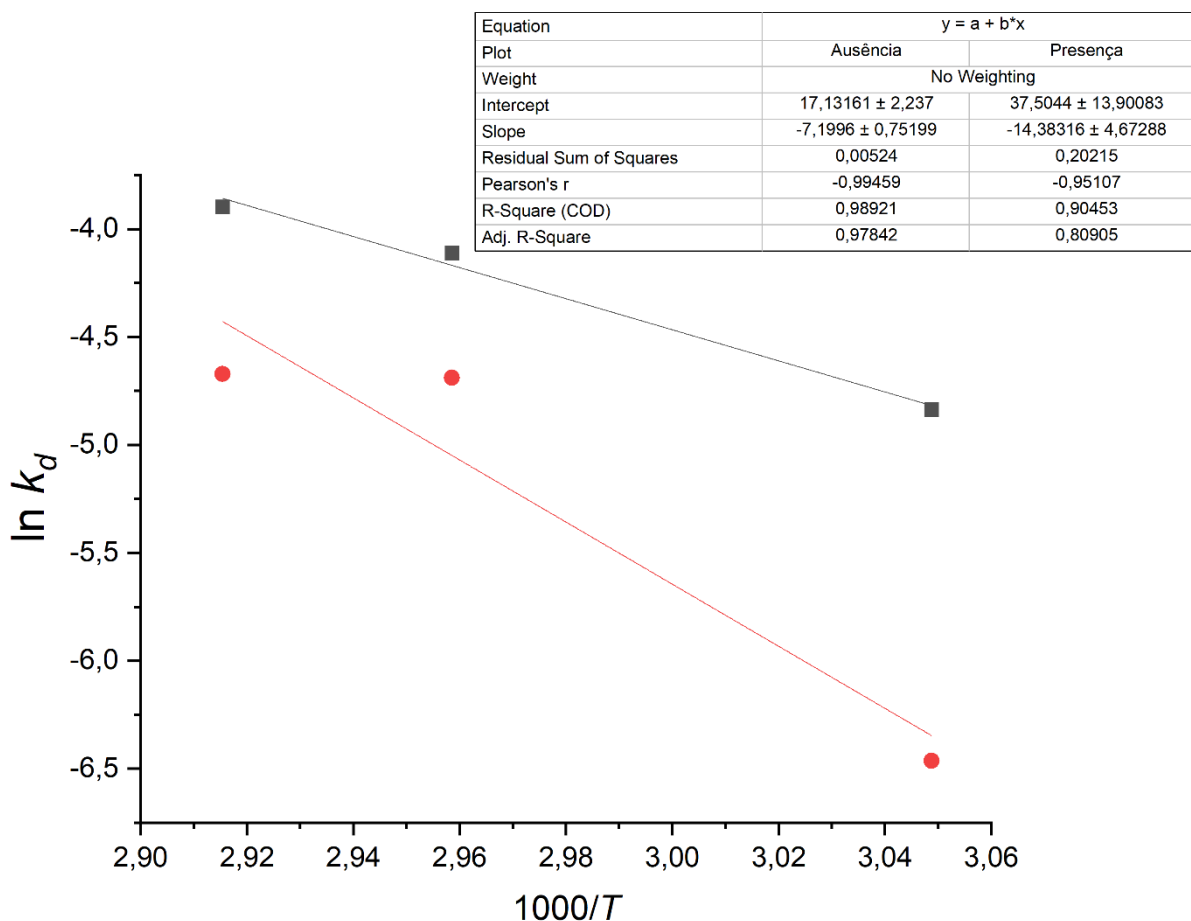
Figura 23. Gráfico de primeira ordem para o efeito da desnaturação térmica sobre a atividade enzimática da endoxilanasase recombinante expressa em *Pichia pastoris*. As amostras de enzima foram incubadas a 40 °C (■), 50 °C (●), 60 °C (▲), e 70 °C (▼) e determinada a atividade residual na presença de 20% de glicerol.



Fonte: autoria própria.

Os valores de k_d (min^{-1}) de cada temperatura foram utilizados para construir o gráfico (Figura 24), o qual nos forneceu dados para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica, e com ela os demais parâmetros termodinâmicos.

Figura 24. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para a determinação da energia de ativação de desnaturação ($E_{a(D)}$) da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*. (●) ensaio conduzido na ausência de glicerol, (■) ensaio conduzido na presença de 20% de glicerol. As constantes de taxa de primeira ordem para a desnaturação térmica (k_d) da enzima conduzida sob as duas condições de ensaio são obtidas a partir dos declives nas Figuras 21 e 22.



Fonte: autoria própria.

Uma quantidade mínima de energia, energia de ativação da desnaturação ($E_{a(d)}$) é requerida para a eficiência do processo de desnaturação térmica das enzimas, ou seja, uma dada quantidade de energia deve ser fornecida à enzima que se encontra no estado nativo para iniciar o processo de desnaturação. Esse processo segue para a formação de um estado de transição intermediário instável. Caso a quantidade inicial de energia seja menor que a ($E_{a(d)}$) o intermediário instável poderá redobrar-se novamente para o estado de enzima nativa após a interrupção da exposição ao calor, porém se a quantidade inicial de energia for maior o intermediário instável irá seguir para o estado desnaturado da enzima, concretizando assim o processo de desnaturação térmica irreversível da enzima (SAQIB et al., 2010).

A energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$) (equação 6) foi maior na presença de 20% de glicerol no ensaio enzimático ($119,47 \text{ K J mol}^{-1}$) e menor na ausência de glicerol no ensaio enzimático ($59,86 \text{ K J mol}^{-1}$). Esse resultado evidencia que a presença do glicerol no sistema promove a necessidade de aproximadamente duas vezes mais energia para que a enzima sofra o processo de desnaturação térmica.

Utilizando os valores da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$) calculamos a entalpia do processo (ΔH_D) (equação 7), que é descrita como a quantidade total de energia necessária para levar a enzima do estado nativo (N) para o intermediário instável (U^*). A literatura descreve como regra geral valores altos e positivos de ($E_{a(D)}$) e (ΔH_D) associados a maior termoestabilidade da enzima (MARANGONI, 2003). Assim sendo o efeito termo estabilizador do glicerol sobre a endoxilase desse estudo é novamente comprovado, uma vez que os valores de entalpia (tabela 4) foram maiores em todas as temperaturas na presença do glicerol (116 K J mol^{-1}) do que os apresentados pela enzima na ausência do composto (57 K J mol^{-1}), e em ambos os casos houve uma ligeira diminuição nas casas decimais dos valores de entalpia com o aumento da temperatura.

A energia livre de Gibbs (ΔG_D) (equação 8) reflete as centenas de interações de hidrogênio e forças de Van der Waals presentes na estrutura da proteína e responsáveis por estabilizar a conformação terciária das mesmas, sendo perdidas durante o processo de desnaturação (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Ao comparar os valores de (ΔG_D) entre as duas condições de ensaio (tabela 4), observa-se a maior diferença para o ensaio na presença de glicerol na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, onde ocorre um aumento de 4,4 vezes, passando de $93,78 \text{ K J mol}^{-1}$ na ausência para $98,2 \text{ K J mol}^{-1}$ na presença de glicerol. As demais temperaturas apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes. A ocorrência de maiores valores de energia livre de Gibbs (ΔG_D) para os ensaios na presença de glicerol, indica que o composto é capaz de proteger as interações que estabilizam a conformação tridimensional da enzima, sendo necessária maiores quantidades de energia para que a reação de desnaturação ocorra.

Durante a reação de desnaturação térmica ocorre um aumento na entropia (ΔS_D) do sistema, ocasionado pelo enfraquecimento das interações de hidrogênio e forças de Van der Waals presentes na estrutura da proteína à medida que a temperatura aumenta. Os valores de entropia (ΔS_D) (equação 9) foram maiores na

presença de glicerol (tabela4), porém esse resultado pode não estar associado apenas a desordem da estrutura tridimensional da enzima, mas também em relação as moléculas de água que se organizam na vizinhança de aminoácidos polares que são expostos durante a desnaturação térmica da enzima (SIDDIQUI et al., 1997).

Sendo assim, o ensaio na ausência do glicerol promove uma desestabilização da estrutura tridimensional de modo mais rápido e eficiente que o ensaio na presença do mesmo, fato verificado pelos valores de ($E_{a(D)}$) e (ΔH_D). Dessa forma os aminoácidos polares são expostos e as moléculas de água do meio reacional se organizam em torno destes, promovendo menores valores de (ΔS_D). Enquanto na presença do glicerol, essa região de moléculas de água organizadas é menor e conseqüentemente os valores de (ΔS_D) são maiores.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível na ausência e presença de 20% de glicerol para a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

Temperatura		Sem glicerol			Com glicerol		
°C	K	ΔH_D (K J mol ⁻¹)	ΔG_D (K J mol ⁻¹)	ΔS_D (J mol ⁻¹)	ΔH_D (K J mol ⁻¹)	ΔG_D (K J mol ⁻¹)	ΔS_D (J mol ⁻¹)
55	328,15	57,13	93,78	-111,72	116,75	98,21	56,50
60	333,15	57,09	92,92	-107,59	116,70	95,03	65,09
65	338,15	57,05	94,68	-111,34	116,66	96,31	60,22
70	343,15	57,01	95,52	-112,26	116,62	97,73	55,09

Fonte: Autoria própria.

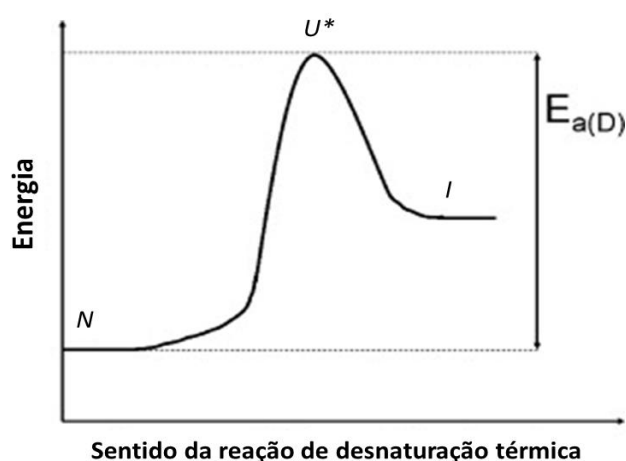
A estabilidade conformacional de proteínas em relação a reação de desnaturação térmica (equação 16) pode ser assegurada pelo efeito de osmólitos (VIANA; DA SILVA GARROTE FILHO; PENHA-SILVA, 2005). O glicerol é um osmólito classificado como poliálcool, que atua no equilíbrio entre os estados conformacionais nativo (*N*) e inativo, no qual se distinguem duas populações moleculares: uma *U** inativa desnaturada reversível (instável) e outra *I* irreversivelmente desnaturada. O glicerol aumenta o conteúdo energético em proporções diferentes para ambos os sentidos. O equilíbrio da reação de desnaturação é deslocado para o estado menos

energético (Figura 25), o que torna a cadeia polipeptídica mais compacta e menos flexível, favorecendo o dobramento da proteína (estado nativo) (BHATNAGAR; BOGNER; PIKAL, 2007).

Equação 16:



Figura 25. Representação esquemática das mudanças de energia durante a desnaturação térmica de proteínas. A quantidade mínima de energia ($E_a(D)$) deve ser fornecida à enzima nativa (N) para que o estado de transição intermediário instável (U^*) seja convertido na enzima inativa irreversivelmente por estar desnaturada (I).



Fonte: Adaptado de SAQIB et al., 2010.

A interação da enzima com o osmólito não é favorável para sua função, por isso eles são excluídos da superfície da proteína, onde ocorre a formação de uma camada de hidratação, formada por várias moléculas de água altamente organizadas e menos flexíveis que as demais. Sendo assim o estado desenovelado apresenta maior superfície de contato da cadeia polipeptídica com as moléculas de água, resultando em uma camada de hidratação maior, que necessitará de mais energia para estabilização, por essa razão o glicerol irá atuar deslocando o equilíbrio da reação no sentido do estado nativo, elevando assim os níveis de atividade enzimática (QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

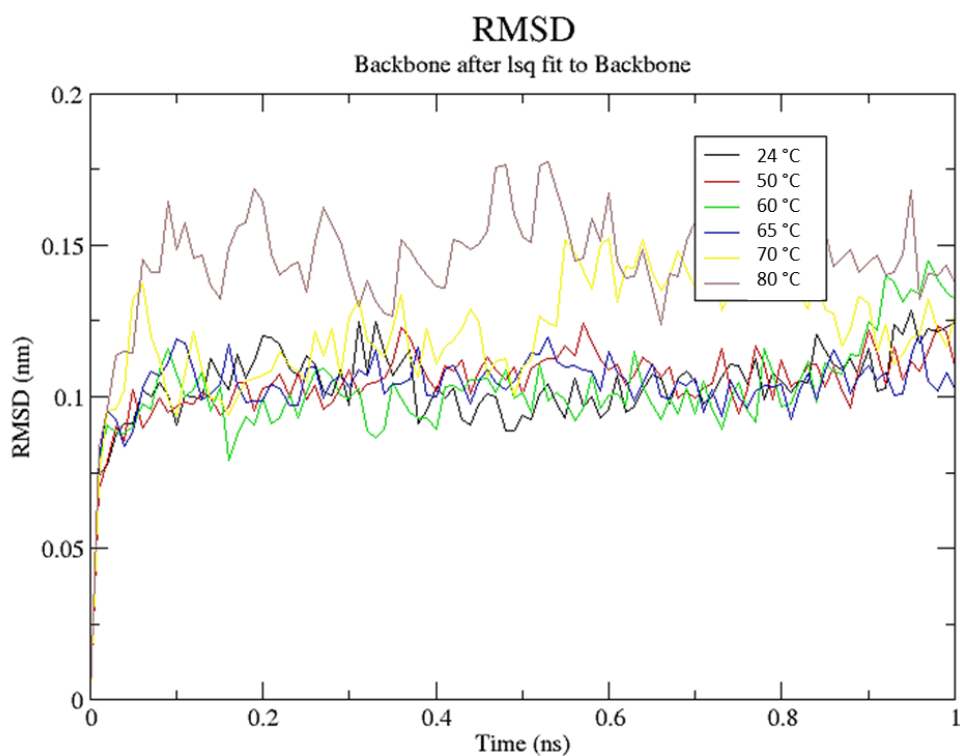
6.4.3. Dinâmica molecular da endoxilanase na ausência e presença de glicerol

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas pela colaboradora Prof. Dra. Marcela Marques de Freitas Lima, com o objetivo de procurar confirmar o efeito estabilizador do glicerol sobre a estrutura da enzima. Para tanto, as possíveis perturbações estruturais promovidas pelo composto foram investigadas através da comparação entre desvio quadrático média das posições atômicas (RMSD) e os valores de raio de giro (Rg) obtidos das simulações com a enzima livre e com a enzima na presença de glicerol.

Os resultados obtidos a partir das simulações de dinâmica molecular estão de acordo com o perfil da termoestabilidade descrito no item 6.4.2, evidenciando o efeito estabilizador do glicerol sobre a estrutura da proteína. Observa-se esse fato nos menores valores de RMSD e Rg apresentados nas simulações contendo glicerol, conforme veremos a seguir.

Para a enzima livre (Figura 26) o valor de RMSD aumentou rapidamente durante os primeiros 0,1 ns atingindo 0,1 nm para as temperaturas de 24; 50; 60 e 65 °C, flutuando de forma constante durante todo o tempo até o final da simulação. Apenas as temperaturas de 70 e 80 °C apresentaram maiores valores de RMSD e bastante flutuação após 0,1 ns onde atingiram valores próximos de 0,15 nm.

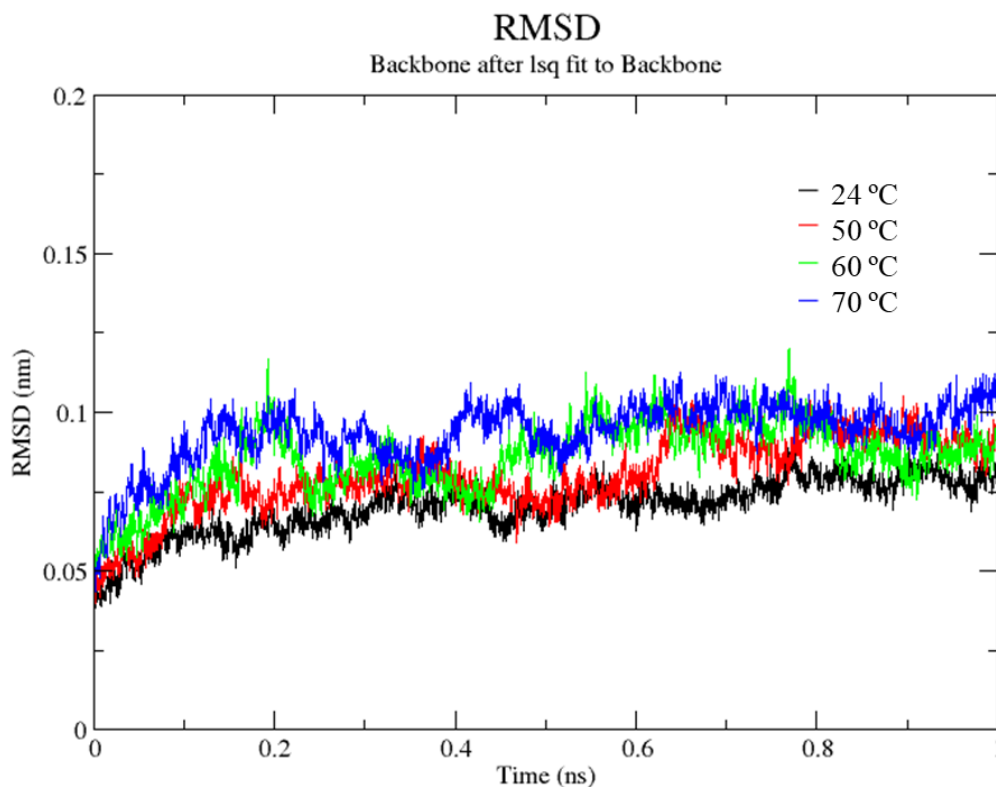
Figura 26. Estabilidade estrutural da endoxilanase avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.



Fonte: autoria própria.

A presença de glicerol (Figura 27) diminuiu os valores de RMSD em todas as temperaturas avaliadas, atingindo a estabilidade em 0,2 ns, e flutuando em valores próximos a 0,075 nm, enquanto a enzima livre flutuou em valores próximos a 0,1 nm (Figura 26).

Figura 27. Estabilidade estrutural da endoxilanase na presença de glicerol avaliada por desvio quadrático médio RMSD obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.



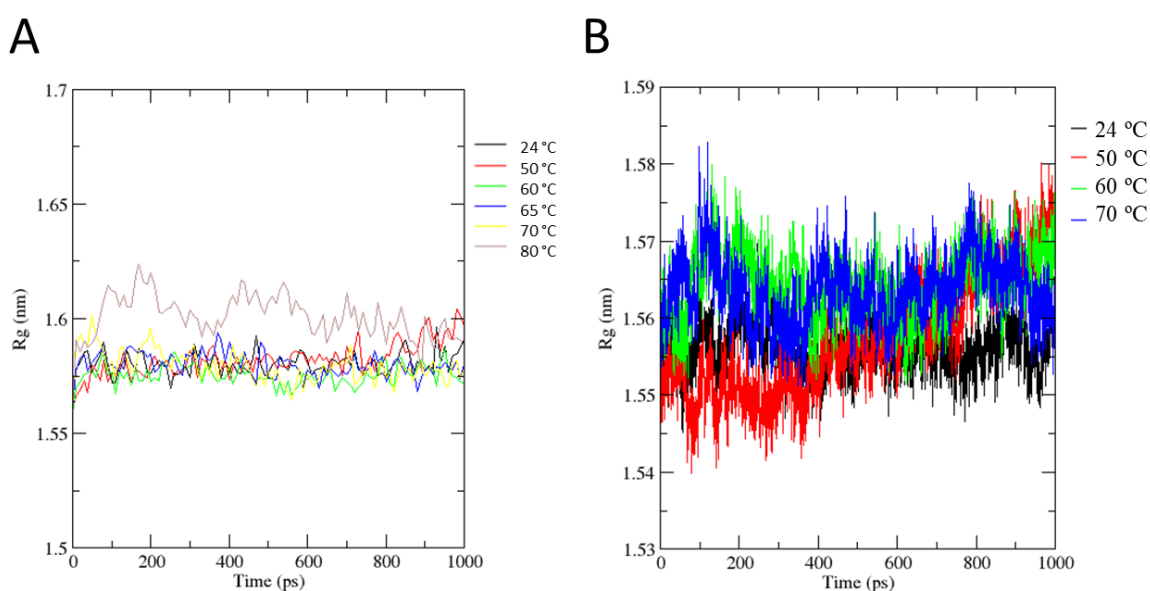
Fonte: autoria própria.

Valores inferiores foram apresentados pela xilanase da família GH 11 de *Bacillus subtilis*, que apresentou flutuações nos valores de RMSD em 0,15 nm em temperatura de 25 °C (WANG et al., 2021a), e semelhantes aos relatados para a xilanase hipertermófila da família GH 10 de *Thermotoga marítima*, que flutuaram entre 0,1 e 0,15 nm em temperatura de 90 °C atingindo picos de 0,2 nm em tempos maiores de simulação (MANNA; GHOSH, 2021).

Os valores de RMSD indicam quanto o esqueleto primário ou cadeia polipeptídica da enzima movimenta-se durante o período de simulação nas condições avaliadas. Assim sendo, a presença do glicerol foi capaz de diminuir a movimentação da estrutura proteica, garantindo maior resistência à desnaturação térmica. Este fato é reforçado pelos valores de raio de giro.

Os valores de raio de giro (Rg) foram ligeiramente menores na presença de glicerol (figura 28 B), oscilando em uma média de 1,56 nm, do que para a enzima livre (figura 28 A) que oscilou em média próximo à 1,58 nm. Em ambos os casos os valores obtidos nesse estudo estão abaixo do reportado para a xilanase GH10 de *Aspergillus fumigatus* complexada com a proteína inibidora de xilanase *Oryza sativa*, que oscilou em uma média de 2,75 nm nos últimos 50 ns de simulação (WANG et al., 2021b).

Figura 28. Estabilidade estrutural da endoxilanase na ausência (A) e presença de glicerol (B) avaliada por raio de giro (Rg) obtido a partir das simulações de dinâmica molecular sob diferentes temperaturas.



Fonte: autoria própria.

É possível observar que as temperaturas de 60, 65 e 70 °C apresentaram variações semelhantes nos valores de raio de giro ao longo do tempo de simulação com a enzima livre. O mesmo acontece para a enzima na presença de glicerol para as temperaturas de 60 e 70 °C. Em ambos os casos os valores para a temperatura de 24 °C não sofreram tanta variação ao longo da simulação, enquanto para a temperatura de 50 °C observa-se um aumento nos últimos 200 ps. Outro fato a ser destacado é o máximo valor de Rg atingido à temperatura de 70 °C, que nas simulações com a enzima livre atingiu valores de 1,6 nm e na presença de glicerol o máximo foi de 1,58 nm.

Esses resultados indicam que a presença de glicerol foi capaz de diminuir o volume ocupado pela enzima durante o processo de simulação, evidenciando que a enzima se manteve mais compacta e sofreu menor efeito desnaturante do que na ausência do osmólito. Mostrando-se em concordância com relatos do que o glicerol é capaz de induzir a compactação e reduzir a flexibilidade das proteínas (VAGENENDE; YAP; TROUT, 2009).

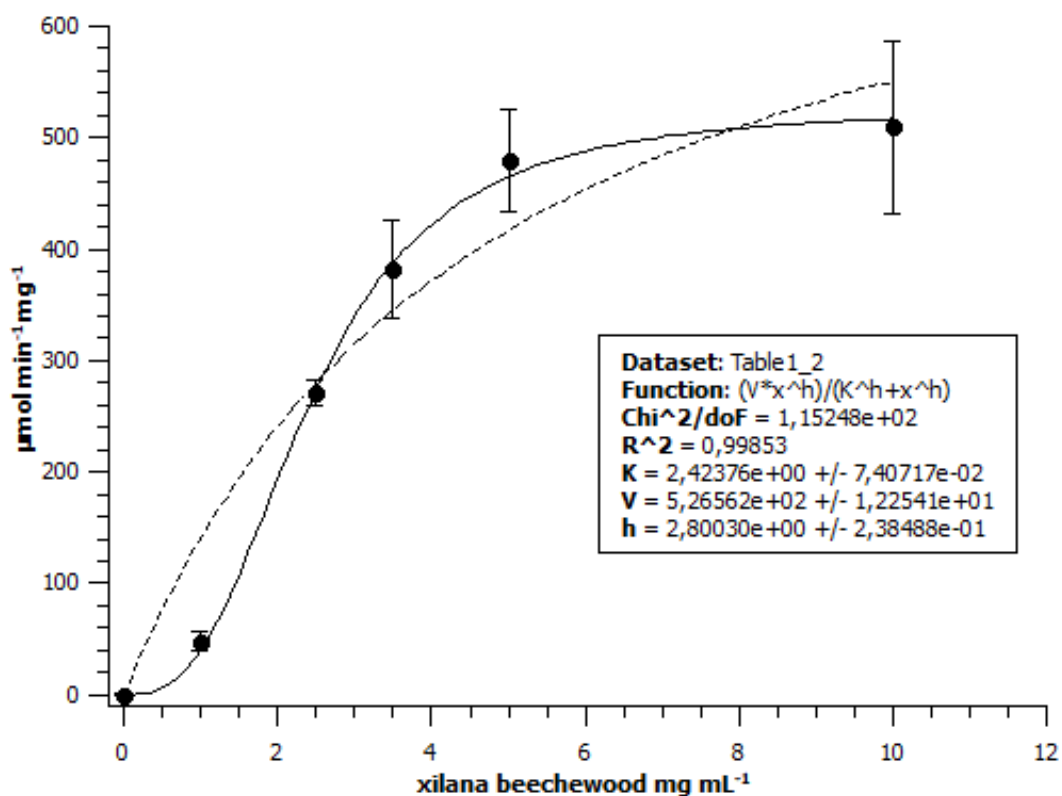
6.5. Efeito do glicerol sobre Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Para avaliar os efeitos do glicerol sobre os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da endoxilanase recombinante, a enzima foi submetida à avaliação da sua atividade sobre o substrato xilana de *beechwood* nas concentrações de 1, 2,5, 3,5, 5, e 10 mg mL⁻¹, nas condições ótimas de pH e velocidade inicial aferida após 1 minuto (tempo previamente determinado como sendo aquele que garante a liberação linear do produto).

O comportamento cinético da endoxilanase não seguiu os parâmetros propostos por Michaelis e Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913), uma vez que a curva obtida da velocidade inicial vs. a concentração de substrato apresentou formato sigmoidal e não hiperbólico. Portanto foi adotada a equação de Hill para cinética enzimática do tipo cooperativo, onde o coeficiente de Hill (h) representa uma medida do grau de cooperatividade.

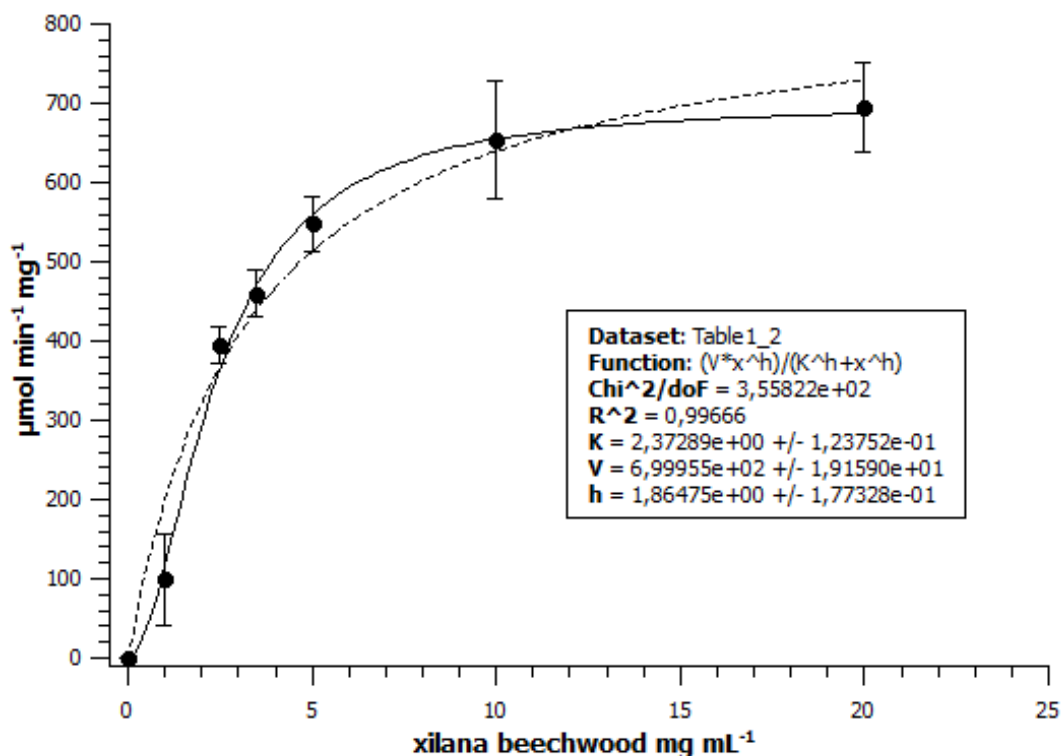
Na ausência de glicerol nos ensaios o K_m observado de acordo com a equação de Hill foi de $2,41 \pm 0,073$ mg mL⁻¹, V_{max} $526,6 \pm 12,2$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $2,79 \pm 0,2$ (Figura 29), já na presença de glicerol o K_m observado foi $2,36 \pm 0,11$ mg mL⁻¹, V_{max} $699,9 \pm 19,1$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $1,85 \pm 0,18$ (Figura 30). Os parâmetros cinéticos observados nesse estudo diferem dos relatados para a endoxilanase recombinante de *Penicillium occitanis* expressa em *Pichia pastoris*, cujo valores de K_m foram superiores ($8,33 \pm 0,7$ mg mL⁻¹) e valores de V_{max} inferiores ($58,82 \pm 0,9$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$), utilizando xilana Oat Spelled como substrato em ensaios com pH 3,0 há 50 °C.

Figura 29. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo e velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença de 20% de glicerol. A linha tracejada representa a equação de Michaelis-Menten. A linha retilínea representa o correspondente pela equação de Hill, cuja função e os valores calculados estão apresentados no quadro junto ao gráfico.



Fonte: autoria própria.

Figura 30. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e na presença de 20% de glicerol. A linha tracejada representa a equação de Michaelis-Menten. A linha retilínea representa a equação de Hill, cuja função e os valores calculados estão apresentados no quadro junto ao gráfico.



Fonte: autoria própria.

Observa-se que os valores de K_m não mostram diferença entre as duas condições de ensaio ($2,41 \pm 0,073$ mg mL⁻¹ para a enzima na ausência e $2,36 \pm 0,11$ mg mL⁻¹ para a enzima na presença do glicerol), mostrando que o glicerol não foi capaz de aumentar a afinidade da endoxilanase com o substrato xilana beechwood. Por outro lado, o valor de V_{max} foi maior na presença do glicerol ($699,9 \pm 19,1$ μmol min⁻¹mg⁻¹) e menor para a enzima na ausência do glicerol ($526,6 \pm 12,2$ μmol min⁻¹mg⁻¹), indicando que o glicerol pode aumentar a velocidade máxima da reação.

Para uma enzima ser considerada alostérica, ou seja, que necessita de outros fatores para determinar sua interação com o substrato, os valores de "h" na equação de Hill ($V_{max} \cdot [S]^h / (K_m^h + [S]^h)$) devem ser maiores que 1; os valores iguais ou menores que 1 para esse parâmetro indicam uma interação não cooperativa da enzima com o

substrato (MARANGONI, 2003). Esse tipo de alosteria é denominada homotrópica, se manifestando principalmente em enzimas oligoméricas. Contudo, no caso da xilanase recombinante deste estudo testes efetuados por cromatografia de exclusão molecular (resultados não mostrados) apresentaram volume de eluição compatível com a enzima monomérica, sem formas diméricas ou superiores.

Existem raros exemplos de enzimas monoméricas e cooperativas, o caso mais conhecido é o da glicocinase da via glicolítica, com $h \sim 1,7$, onde uma transição molecular seria a explicação para essa cooperatividade (MIN et al., 2013).

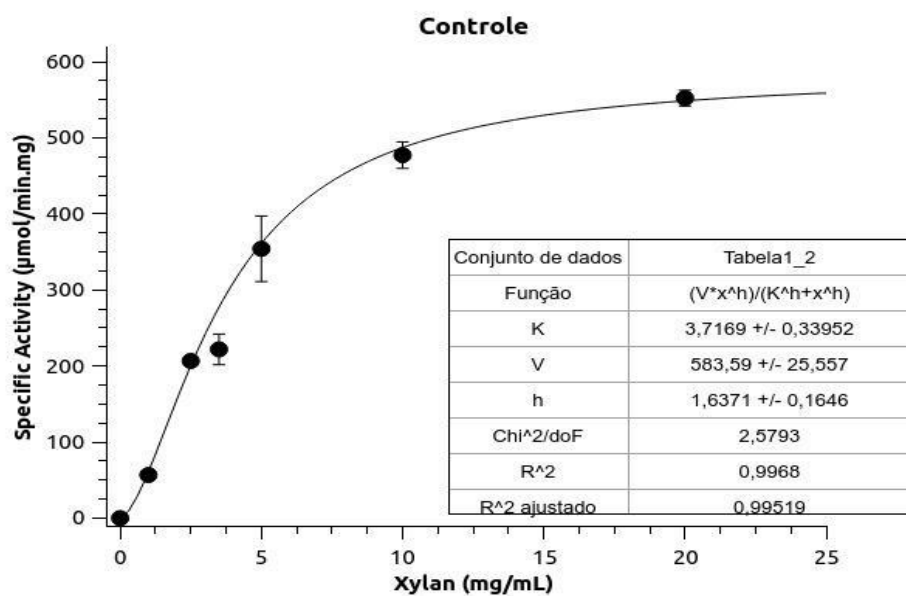
No momento não temos uma explicação para o fenômeno observado, e não sabemos se poderia ser exclusivamente da enzima ou por interação com as fibras de xilana.

6.6. Efeito de compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Para avaliar os efeitos dos compostos fenólicos sobre os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da endoxilanase recombinante, a enzima foi submetida à avaliação da sua atividade sobre o substrato xilana de *beechwood* nas concentrações de 1, 2,5, 3,5, 5, e 10 mg mL⁻¹, nas condições ótimas de pH e velocidade inicial aferida após 1 minuto (tempo previamente determinado como sendo aquele que garante a liberação linear do produto).

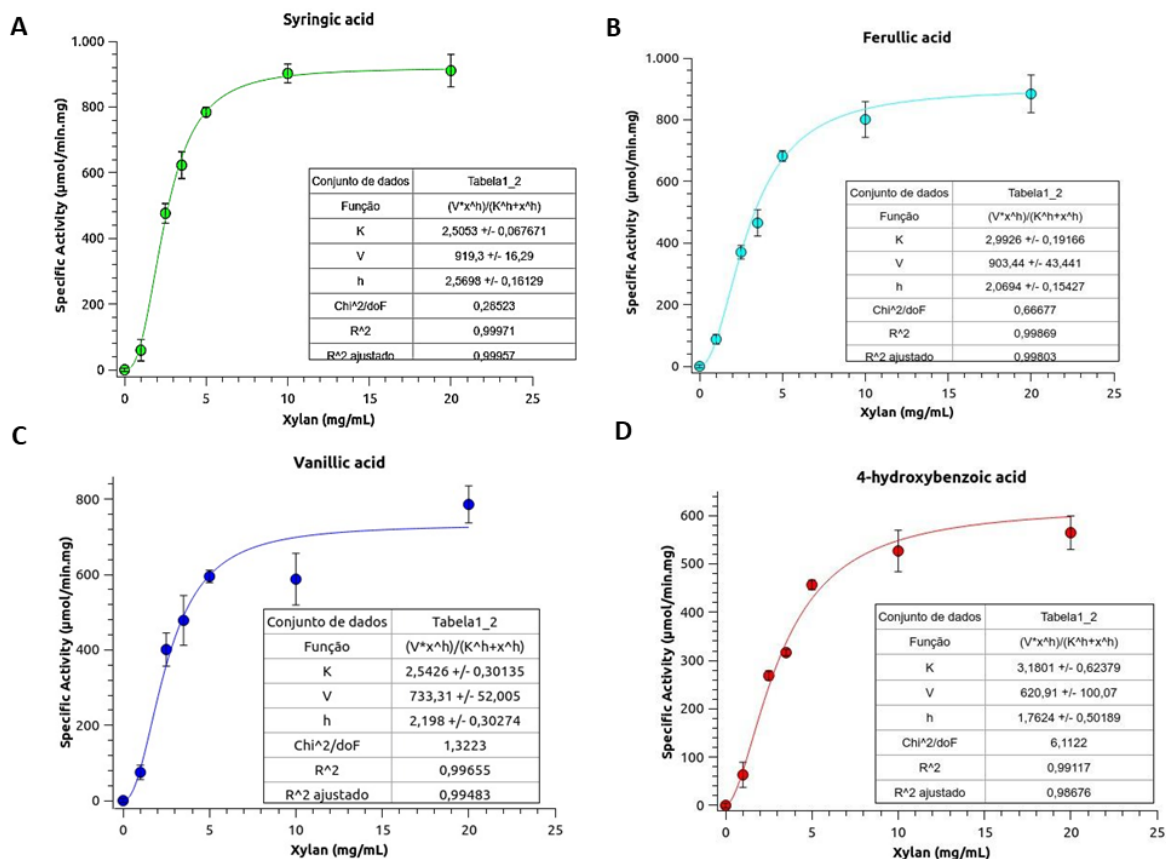
Na ausência dos compostos o K_m observado de acordo com a equação de Hill foi de $3,72 \pm 0,34$ mg mL⁻¹, V_{max} $583,6 \pm 25,56$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $1,64 \pm 0,2$ (Figura 31), já na presença dos compostos fenólicos os valores variaram (tabela 6), para o ácido siríngico o K_m foi $2,50 \pm 0,07$ mg mL⁻¹, V_{max} $919,3 \pm 16,29$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $2,57 \pm 0,16$ (Figura 32 A). Para o ácido vanílico o K_m foi $2,54 \pm 0,30$ mg mL⁻¹, V_{max} $733,31 \pm 52$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $2,20 \pm 0,30$ (Figura 32 B). Para o ácido ferúlico o K_m observado foi $2,99 \pm 0,19$ mg mL⁻¹, V_{max} $309,44 \pm 43,44$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $2,07 \pm 0,15$ (Figura 32 C). Para o ácido 4-hydroxybenzoico o K_m foi $3,18 \pm 0,62$ mg mL⁻¹, V_{max} $620,91 \pm 100,07$ $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, e h igual a $1,76 \pm 0,50$ (Figura 32 D).

Figura 31. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto e utilizados como controle na comparação com ensaios na presença dos compostos fenólicos. A linha representa o ajuste resultante da Equação de Hill, cuja função e os valores calculados estão apresentados no quadro junto ao gráfico.



Fonte: autoria própria.

Figura 32. Parâmetros cinéticos da endoxilanasase recombinante expressa em *Pichia pastoris* utilizando-se o substrato xilana de beechwood nas concentrações de 1 a 10 mg mL⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no pH ótimo com velocidade inicial de 1 minuto na presença de 10 mmol L⁻¹ dos compostos fenólicos (A) ácido síringico; (B) ácido ferúlico; (C) ácido vanílico e (D) ácido 4-hidroxibenzoico. A linha representa o ajuste resultante da Equação de Hill, cuja função e os valores calculados estão apresentados no quadro junto ao gráfico.



Fonte: autoria própria.

Os valores obtidos a partir dos gráficos da figura 32 foram reunidos e expressos na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* na presença de 10 mmol L⁻¹ dos compostos fenólicos.

	K_m (mg mL ⁻¹)	V_{max} (μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹)	h
Ácido siríngico	2,50 \pm 0,07	919,30 \pm 16,29	2,57 \pm 0,16
Ácido ferúlico	2,99 \pm 0,19	903,44 \pm 43,44	2,07 \pm 0,15
Ácido vanílico	2,54 \pm 0,30	733,31 \pm 52,00	2,20 \pm 0,30
Ácido 4-hidroxibenzoico	3,18 \pm 0,62	620,91 \pm 100,07	1,76 \pm 0,50
Controle	3,72 \pm 0,34	583,60 \pm 25,56	1,64 \pm 0,20

Fonte: autoria própria.

A presença de ácido ferúlico e ácido 4-hidroxibenzoico não afetou significativamente os valores de K_m , diferentemente de ácido siríngico e ácido vanílico (tabela 5). Diminuição de K_m e aumento de V_{max} foram observados para uma celulase comercial na presença de ácido ferúlico (TIAN; JIANG; OU, 2013). No caso de duas β -xilanasas de *Aspergillus terreus*, os valores de K_m foram aumentados e V_{max} diminuídos na presença de ácido ferúlico e ácido 4-hidroxibenzoico, indicando um efeito inibitório dos compostos sobre a ação enzimática (DE SOUZA MOREIRA et al., 2013).

Os efeitos dos compostos fenólicos sobre a atividade enzimática têm sido descritos na literatura através de interações covalentes e não covalentes entre fenólicos e os resíduos de aminoácidos aromáticos na estrutura enzimática (TIAN; JIANG; OU, 2013). Tais interações resultariam em alterações na organização da estrutura tridimensional da enzima, através da diminuição de estruturas rígidas (α -hélice) e aumento de estruturas flexíveis (folhas β e random coil), proporcionando maior liberdade conformacional que resultaria em maiores atividades enzimáticas (KAYA; HEITMANN; JOYCE, 2000), ou na inativação estérica das mesmas (BOUKARI et al., 2011; GONZÁLEZ-BAUTISTA et al., 2017).

Tendo em vista as informações disponíveis na literatura e os resultados da cinética da endoxilanase na presença dos compostos fenólicos aqui observados, análises de dinâmica e *docking* molecular foram realizados para investigar a existência de possíveis sítios de interação entre os fenólicos e a estrutura tridimensional da endoxilanase.

6.7. Docking molecular

Inicialmente a estrutura modelada da endoxilanase de *Myceliophthora thermophila* na presença do oligossacarídeo glicosilado (N69) foi utilizada nas simulações de docking cego, por meio do software Molegro Virtual Docker v6.01. Foram identificadas duas cavidades pelo método Expanded Van der Waals, com volumes de 1,3 e 95,0 Å³. A cavidade 1 corresponde ao sítio ativo da enzima, enquanto a cavidade 2 é menor e está presente na superfície da proteína oposta ao sítio ativo (tabela 6).

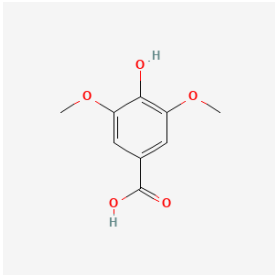
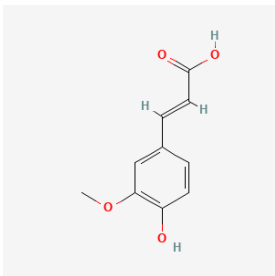
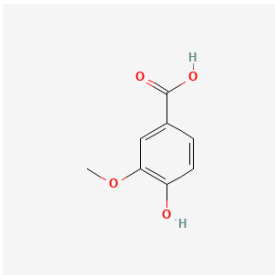
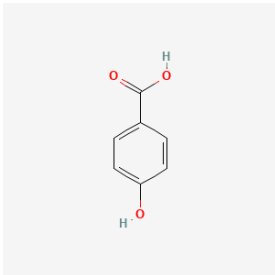
Tabela 6. Resíduos constituintes das cavidades encontradas pelo programa Molegro na estrutura modelada da endoxilanase.

Cavidade	Volume (Å ³)	Resíduos constituintes
1	195,0	Sítio ativo
2	11,3	Pro60, Gly61, Pro62, Pro63, Trp86, Thr87, Arg88, Tyr94, Phe163, Leu174, Gly175, Thr176, Trp177, Asn178, Tyr179, Met180

Fonte: autoria própria.

Após a identificação das cavidades procedeu-se o docking dos ligantes, resultando em 50 poses de cada ligante em 5 simulações. Foram selecionadas as 5 melhores poses em cada cavidade e calculados o escore médio (Tabela 7).

Tabela 7. Escores médios das cinco melhores poses de cada ligante, em cada cavidade avaliada.

Ligante (PubChem CID)	Cavidade 1 Score (sd)	Cavidade 2 Score (sd)	Massa molecular	pKa	Estrutura 2D (PubChem)
Ácido siríngico (10742)	-61,2 (0,11) ^a	-62,5 (0,93) ^b	198,17	4,33	
Ácido ferúlico (445858)	-65,4 (0,17) ^a	-69,1 (0,78) ^b	194,18	4,58	
Ácido vanílico (8468)	-56,5 (2,59) ^a	-61,1 (1,87) ^b	168,15	4,45	
Ácido 4- hidroxibenzoico (135)	-42,9 (0,67) ^a	-52,4 (0,05) ^b	138,12	4,54	

Fonte: autoria própria.

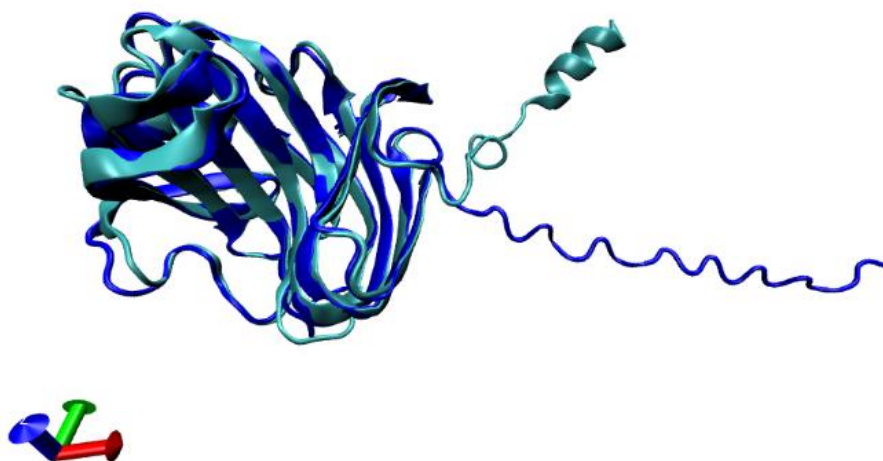
Os valores dos escores na cavidade 1 são menores que na cavidade 2, indicando que os compostos possuem uma tendência de interagirem primeiro na cavidade 2 e posteriormente na cavidade 1. O ácido siríngico apresentou valores bem próximos para as duas cavidades, indicando que o composto poderia se ligar tanto a

cavidade 2 quanto ao sítio ativo. Já o ácido 4-hidroxibenzoico apresentou maior probabilidade de ligação a cavidade 2.

Supondo-se que a ligação dos compostos fenólicos a cavidade 2 poderia promover um efeito de ativação alostérica, foram realizadas análises de dinâmica molecular na presença dos compostos, os resultados obtidos (dados não mostrados) evidenciaram a expulsão dos ligantes da cavidade 2, mostrando-se conflitantes com os observados experimentalmente durante a análise da influência dos compostos na determinação dos parâmetros cinéticos.

Portanto, uma nova modelagem estrutural foi realizada pelo colaborador Prof. Dr. Gabriel Zazeri, com a finalidade de representar com maior exatidão a estrutura da enzima utilizada nos ensaios de cinética, para isso a sequência de 6 resíduos de histidina mais o sítio de clivagem para TEV-protease foi acrescentada na região N-terminal, essa estrutura foi submetida a duas metodologias de aprendizado de máquina, o AlphaFold e o RoseTTaFold. Os dois modelos gerados foram sobrepostos (Figura 33) apresentando diferença apenas no início da sequência, onde o modelo RoseTTaFold apresentou uma α -hélice, e o AlphaFold apresentou uma região de random coil.

Figura 33. Sobreposição dos modelos obtidos das duas metodologias de aprendizado de máquina, AlphaFold (em azul) e o RoseTTaFold (em ciano).

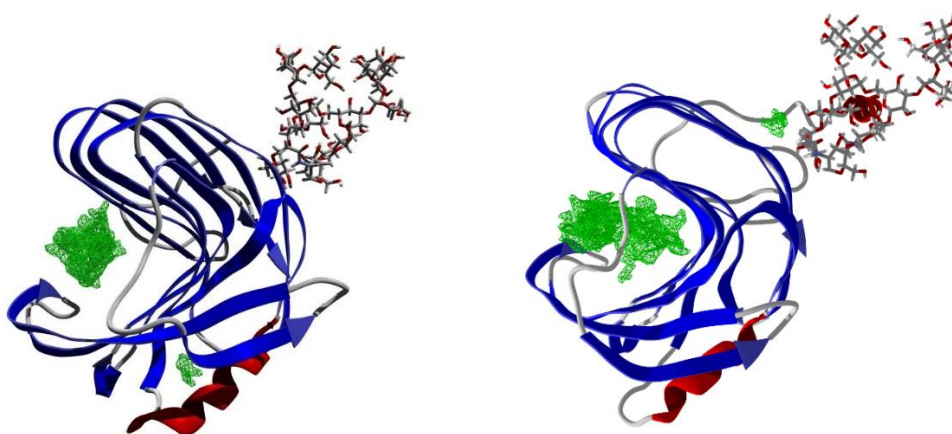


Fonte: autoria própria.

Essa nova estrutura foi submetida a busca por cavidades, e surpreendentemente, a presença da cauda de histidina (his-tag) promoveu a exclusão da cavidade 2 observada anteriormente (Figura 34). No modelo anterior o resíduo de

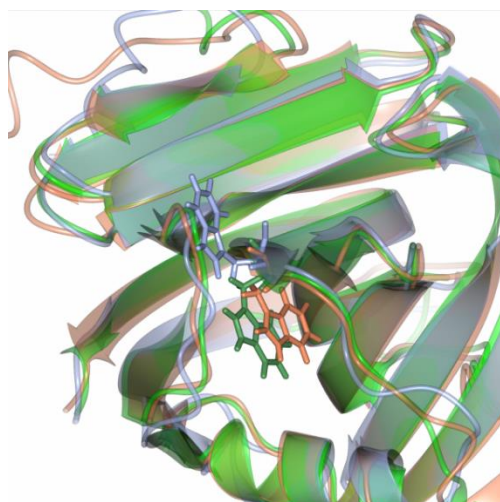
triptofano localizado na posição 177 foi observado descoberto, podendo estabelecer interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos dos compostos fenólicos, no novo modelo o Trp177 de encontra-se rotacionado para o interior da molécula (Figura 35), promovendo a perda da cavidade 2.

Figura 34. Localização das cavidades (em verde) encontradas pelo programa Molegro na estrutura da endoxilanase. (A) representa a estrutura modelada sem a His-tag, mostrando a cavidade maior (cavidade 1) corresponde ao sítio ativo da enzima e a menor (cavidade 2) na superfície da proteína oposta ao sítio ativo. (B) representa a estrutura modelada com a presença da His-tag na posição N-terminal, mostrando apenas a grande cavidade do sítio ativo.



Fonte: autoria própria.

Figura 35. Sobreposição das estruturas modeladas da endoxilanase sobrepostas. A região da cavidade 2 mostra Trp 177 descoberto na estrutura sem a presença de his-tag (azul), e rotacionado para o interior da cavidade, ocupando o espaço do sítio nas duas estruturas com a his-tag modeladas por aprendizagem de máquina, RoseTTaFold (bege) e Alphafolda (verde).



Fonte: autoria própria.

Nesse sentido, o efeito positivo dos compostos fenólicos observados nos ensaios cinéticos não ocorreria por meio de ligação alostérica entre os compostos e a estrutura da endoxilanase.

Foram consultados artigos a fim de procurar esclarecer outras possibilidades que expliquem o efeito dos compostos fenólicos. Uma possibilidade é que os fenólicos interfiram no próprio substrato, por meio de adsorção dos compostos fenólicos as fibras da xilana.

Segundo relatado, o processo de adsorção é considerado rápido e dependente do pH, uma vez que o composto fenólico irá dissociar-se em meio aquoso liberando prótons e ânions fenolatos (PhO^-) (MWANGI et al., 2014). Valores muito abaixo do pKa deslocam o equilíbrio da reação para o composto fenólico em sua fórmula molecular, diminuindo a capacidade de adsorção por atração eletrostática, o mesmo acontece para valores muito acima do pKa (MWANGI et al., 2014). Outros autores relatam que a adsorção do ácido ferúlico sobre fibras de xilana foi diminuída com o aumento do pH e aumentada no decorrer do tempo de exposição (COSTA; ROGEZ; PENA, 2015).

O valor de pH ótimo da enzima encontra-se acima dos valores de pKa dos ácidos fenólicos avaliados, o que poderia resultar em uma atração eletrostática entre os compostos e a fibra de xilana, podemos supor que essa interação promoveu o favorecimento da formação do complexo enzima-substrato (ES). Porém os ensaios disponíveis não nos forcem dados que possam explicar como a adsorção dos compostos fenólicos as fibras de xilana é capaz de favorecer as interações da enzima com o substrato.

6.8 Aplicação da endoxilanase recombinante na extração do mosto de uva preta (Vitória)

A aplicação de enzimas na indústria alimentícia é usada como estratégia para substituição de aditivos químicos. No caso do processamento de sucos de frutas, enzimas degradadoras de carboidratos como pectinases, celulasas e xilanases são empregadas para otimizar os processos de extração e produção do suco, pois promovem a decomposição de polissacarídeos responsáveis por proporcionar turbidez e viscosidade (pectinas, amido e hemiceluloses), facilitando a filtração posterior, aumentando o rendimento, garantindo maior extração de compostos

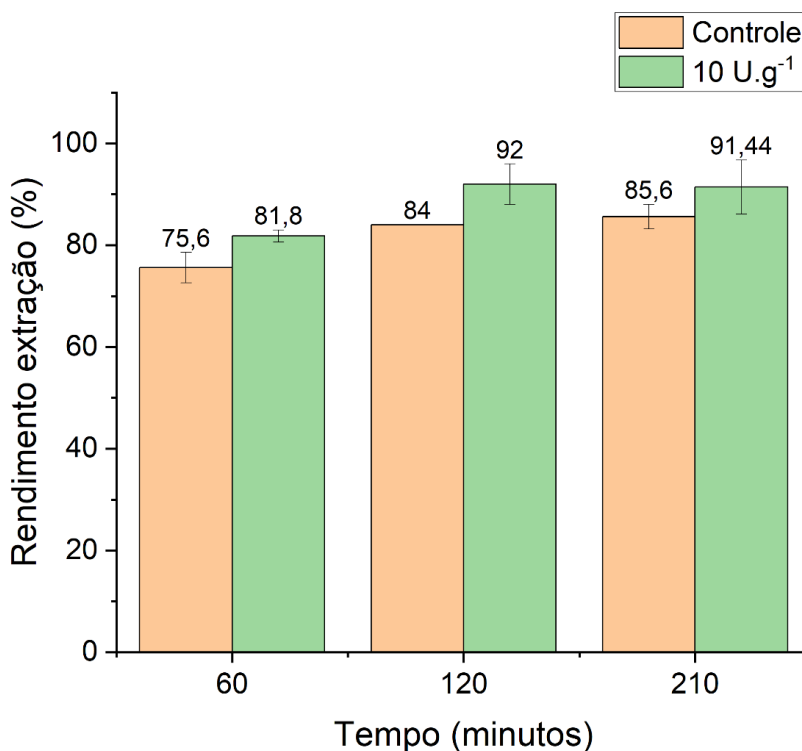
melhorando assim a qualidade e assegurando a estabilização da cor do produto (CAKMAK; SAGLAM ERTUNGA, 2016; DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; KAUSHAL et al., 2021) .

Nesse sentido, a endoxilanase recombinante foi empregada durante o processo de extração do mosto de uva. Inicialmente foram testadas as uvas: Arra 15 (verde, sem semente); Candy dreams (roxa, sem semente) e Vitória (preta, sem semente), foram observados os resultados mais promissores para a uva Vitória (dados não mostrados), sendo essa a escolhida para análise posterior.

6.8.1. Rendimento da extração do mosto de uva por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

O rendimento da extração foi avaliado pela diferença entre as massas finais e iniciais (equação 11) do processo de extração do mosto, os resultados estão expressos na figura 36.

Figura 36. Rendimento da extração de mosto de uva por maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*. As barras representam os valores da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: autoria própria

A presença da endoxilanase durante o processo de extração do mosto de uva, também conhecido como maceração enzimática, foi capaz de aumentar o rendimento da extração em 6, 8 e 6% para os tempos de 60, 120 e 210 minutos respectivamente (Figura 36). Resultados semelhantes foram observados para tratamento de polpas de frutas utilizando-se de uma mistura de pectinase ($1,5 \text{ U.g}^{-1}$), celulase ($0,68 \text{ U.g}^{-1}$) e xilanase ($1,8 \text{ U.g}^{-1}$), após 2 horas o aumento percentual no rendimento de suco foi de 8% para banana, 10% para uva, e 18% para maçã (KAUR; KUMAR; SATYANARAYANA, 2004). Ao associar o tratamento enzimático com mecânico, a presença da preparação enzimática comercial Zimopec PX5, foi capaz de aumentar em aproximadamente 3,6 % o rendimento de suco para o tratamento com micro-ondas e em aproximadamente 2 % para o tratamento com ultrassom (DALAGNOL et al., 2017).

6.8.2. Análises físico-químicas do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Os resultados das análises físico-químicas realizadas após a extração do mosto de uva na presença da endoxilanase estão representados na tabela 8.

Tabela 8. Análises físico-químicas do mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

		Controle	10 U.g ⁻¹
Sólidos solúveis totais (°Brix)	60 minutos	13,75 ± 0,62	14,6 ± 0,53
	120 minutos	13,75 ± 0,59	15,3 ± 0,60
	210 minutos	13,5 ± 0,27	14,95 ± 0,07
pH	60 minutos	3,76 ± 0,04	3,88 ± 0,03
	120 minutos	3,72 ± 0,01	3,8 ± 0,08
	210 minutos	3,73 ± 0,03	3,81 ± 0,01
Acidez total (g.ácido cítrico/100mL⁻¹)	60 minutos	0,45 ± 0,01	0,40 ± 0,02
	120 minutos	0,44 ± 0,02	0,40 ± 0,00
	210 minutos	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,03
% ART	60 minutos	100	104 ± 4
	120 minutos	100	110 ± 6
	210 minutos	100	110 ± 8

Fonte: autoria própria.

O tratamento de sucos de frutas por xilanase resulta na degradação dos componentes hemicelulolíticos (xilana) liberando unidades redutoras de carboidratos, sendo esse parâmetro um indicador da ação enzimática no processo (DA SILVA et al., 2019). Observa-se que a presença da enzima durante a extração do mosto da uva proporcionou um ligeiro aumento nos valores de açúcares redutores (4%, 10% e 10% para os tempos de 60, 120 e 210 minutos respectivamente) e de sólidos solúveis totais (0,85, 1,55 e 1,45 para os tempos de 60, 120 e 210 minutos respectivamente), indicando que a endoxilanase é capaz de favorecer a extração de açúcares presentes na uva, tornando o material de acordo com o mínimo exigido de 14^o Brix para sucos integrais de uva, segundo a legislação brasileira (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Estudos anteriores utilizaram uma endo- β -1,4-xilanase de *Pediococcus acidilactici* GC25 para tratamento do suco de uva, e observaram um aumento de aproximadamente 3% nos valores de açúcares redutores após 60 minutos de exposição a enzima sob a temperatura de 40° C (ADIGUZEL et al., 2019). Valores semelhantes foram observados para a utilização de endoxilanase de *Geobacillus* sp. TF16 no tratamento de suco de laranja, 3% com a enzima livre durante 60 minutos a 55° C, e 6% com a enzima imobilizada covalentemente em quitosana usando glutaraldeído durante o mesmo tempo a 65° C (CAKMAK; SAGLAM ERTUNGA, 2016).

Segundo (ELIAS, 2008) ao longo da maturação dos frutos, as concentrações de sólidos solúveis e pH aumentam enquanto a acidez titulável diminui, o mesmo comportamento foi identificado com o tratamento enzimático desse estudo (tabela 02). Tal resultado mostra-se necessária maior atenção ao tempo do processo posterior de pasteurização, uma vez que é recomendado a utilização de temperaturas menores ou menores tempos de exposição a levadas temperaturas (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006), para impedir a volatilização de compostos aromáticos característicos do suco de uva, e a utilização de temperaturas mais amenas é facilitado por valores mais baixos de pH (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

6.8.3. Determinação de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Em relação ao conteúdo de polifenóis totais (tabela 9), observa-se que a presença da endoxilanase proporcionou um aumento na liberação desses compostos durante o processo de extração do mosto de uva. Em termos de porcentagem em comparação com o controle (extração do mosto sem enzima), observamos aproximadamente +10% nos ensaios conduzidos com 10 U.g⁻¹ da endoxilanase. Valores semelhantes foram observados na presença de 0,5 U.g⁻¹ da enzima pectinase associada a agitação mecânica durante a extração do mosto de *Vitis vinifera Cabernet Sauvignon*, que resultaram em +7% de compostos fenólicos no material avaliado (DALAGNOL et al., 2017).

Tabela 9. Conteúdo de polifenóis totais presentes no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

	Controle	10 U.g ⁻¹
60 minutos	1603 ± 11	1917 ± 100
120 minutos	1482 ± 06	1622 ± 189
210 minutos	1475 ± 17	1652 ± 141

Fonte: autoria própria.

A utilização de enzimas celulolíticas durante o processo de extração do suco de uva já foi relatada como responsável por maiores extrações de fenólicos totais (NOGALES-BUENO et al., 2020). Tais compostos encontram-se na composição das cascas (antocianinas e taninos condensados) e sementes (taninos condensados) da uva (FOGAÇA, 2012). O aumento da temperatura durante o processo de extração favorece a solubilidade das antocianinas, em contrapartida pode resultar na degradação das mesmas a partir da ação de enzimas endógenas da fruta (glicosidases, polifenol oxidases e peroxidases) ou pela condensação com taninos (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006). Esses fatos explicam a diminuição da quantidade de compostos fenólicos nos tempos maiores de extração.

6.8.4. Determinação dos parâmetros de cor e clarificação do mosto de uva extraído por maceração enzimática pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Características sensoriais colaboram com a aceitação do produto pelo consumidor, dentre elas o aspecto de cor dos sucos de uva é um dos primeiros a ser avaliado pelo consumidor no momento da compra. A tabela 10 reúne os valores de intensidade e tonalidade de cor dos mostos extraídos sem tratamento enzimático (controle) e com 10 U.g-1 da endoxilanase recombinante. Os valores referentes a clarificação foram calculados com base na absorbância a 660 nm, e utilizaram os resultados do controle como referência para o cálculo da porcentagem de clarificação.

Tabela 10. Parâmetros de cor avaliados no mosto de uva extraído após maceração enzimática utilizando a endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*.

	Controle			10 U.g ⁻¹		
	Intensidade	Tonalidade	Clarificação (%)	Intensidade	Tonalidade	Clarificação (%)
60 minutos	10,07	0,78	100	11,34	0,84	76,50 ± 1,3
120 minutos	9,34	0,89	100	10,64	0,89	72,08 ± 6,3
210 minutos	8,36	0,89	100	10,62	0,90	72,68 ± 5,4

Fonte: autoria própria.

Como esperado, a presença da endoxilanase foi capaz de clarificar o material extraído da uva, resultando em algo próximo a 30% menos absorvância em 660 nm, consequência da diminuição de substâncias causadoras de turbidez, como a hemicelulose. Esses resultados são semelhantes aos relatados quanto a utilização de endoxilanase de *Streptomyces sp.* para tratamento da polpa de abacaxi com 27% de clarificação após 90 minutos a 55° C (ROSMINE et al., 2017), e xilanase produzida por *Bacillus pumilus* VLK-1 para tratamento da polpa de uva com 27% de clarificação para a enzima livre e 30% para a enzima imobilizada em em pastilhas de óxido de alumínio (KUMAR et al., 2014). Observa-se leve diminuição da clarificação ao decorrer do tempo de tratamento enzimático, alguns autores atribuem esse fato a formação de complexos proteicos ou pela complexação das proteínas aos carboidratos da amostra (ROSMINE et al., 2017).

A intensidade de cor correlaciona-se diretamente com a quantidade de compostos fenólicos totais, uma vez que as antocianinas são as substâncias responsáveis pela cor do produto (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006). Portanto os resultados apresentados na tabela 10 estão em concordância aos obtidos na tabela 10, indicando que a maceração enzimática promovida pela endoxilanase recombinante foi capaz de aumentar a extração de compostos fenólicos, melhorando a intensidade de cor do mosto extraído da uva.

Esses resultados são promissores, pois de acordo com análise sensorial realizada com sucos produzidos a partir de diferentes variedades de uvas, os produtos mais bem avaliados são aqueles que apresentam maiores valores de intensidade de cor e conseqüentemente maiores quantidades de compostos fenólicos como antocianinas (BENDER et al., 2020; CANOSSA et al., 2017).

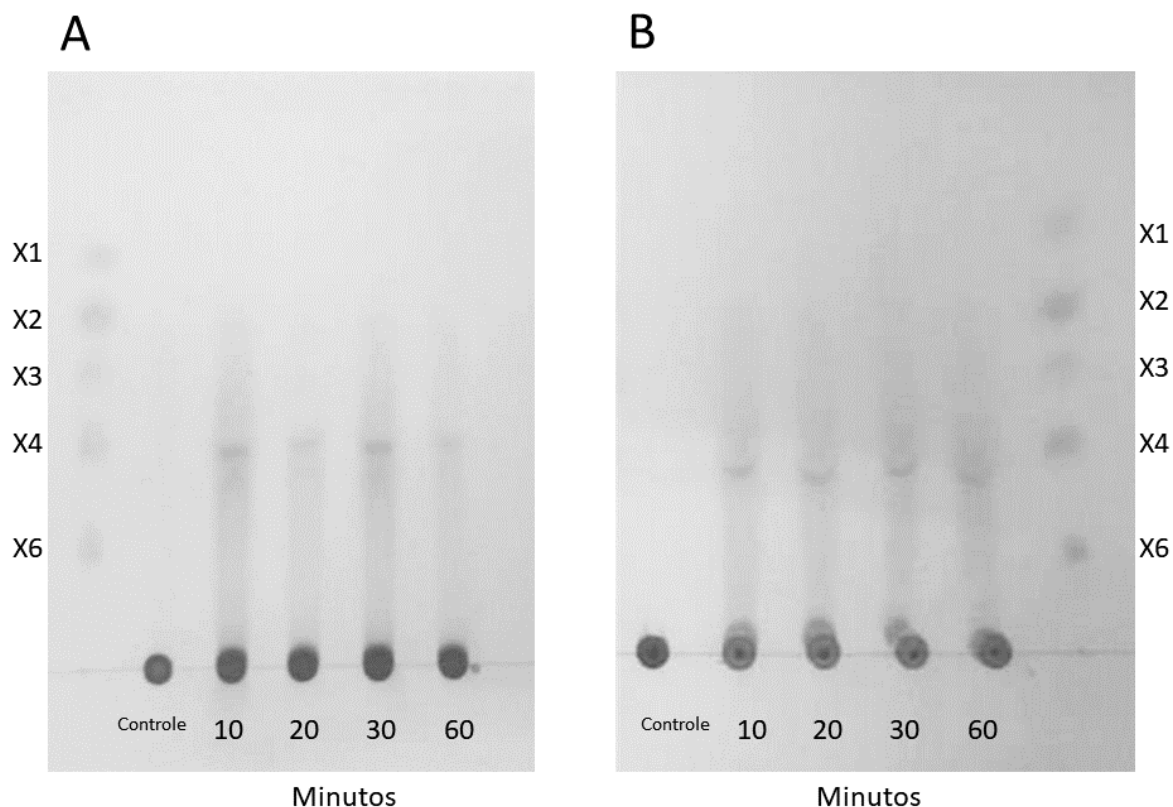
6.9. Liberação de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de xilana beechwood e hemicelulose da cana-de-açúcar, pela endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris*

Os xilooligossacarídeos apresentam como principal constituinte unidades de xilose ligadas por ligações β 1-4, sendo consideradas fibras alimentares solúveis com atividade prebiótica, capaz de promover melhora das funções intestinais e imunológicas, além de poderem ser utilizados como adoçantes dietéticos e não serem cariogênicos (CARVALHO et al., 2013).

A massa molecular desses compostos está relacionada a sua atividade biológica, com isso desperta-se o interesse em estudar enzimas capazes de produzir esses oligossacarídeos a partir de diferentes fontes de resíduos agroindustriais. Nesse trabalho avaliamos a capacidade de hidrólise da endoxilanase sobre a hemicelulose extraída a partir do bagaço de cana-de-açúcar, e comparamos o perfil de produção de XOS encontrado com a produção dos mesmos pela hidrólise do substrato comercial xilana beechwood.

A capacidade hidrolítica da endoxilanase recombinante expressa em *Pichia pastoris* foi avaliada inicialmente por tempos curtos de ação sobre o substrato comercial xilana *beechwood*, e sobre a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar, foi adotada carga enzimática de 2,5 U.g⁻¹ e 2% (m/v) de substrato, os produtos da hidrólise enzimática foram analisados qualitativamente em cromatografia de camada delgada (CCD) (Figura 37).

Figura 37. Análise dos produtos de hidrólise enzimática por cromatografia em camada delgada (CCD). Marcador de xilooligosacarídeos (X_1 = xilose; X_2 = xilobiose; X_3 = xilotriose; X_4 = xilotetraose e X_6 = xilohexose). Controle: tempo zero. Tempos de hidrólise enzimática 10, 20, 30 e 60 minutos a 50 °C sobre xilana *Beechwood* (A) e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar (B).

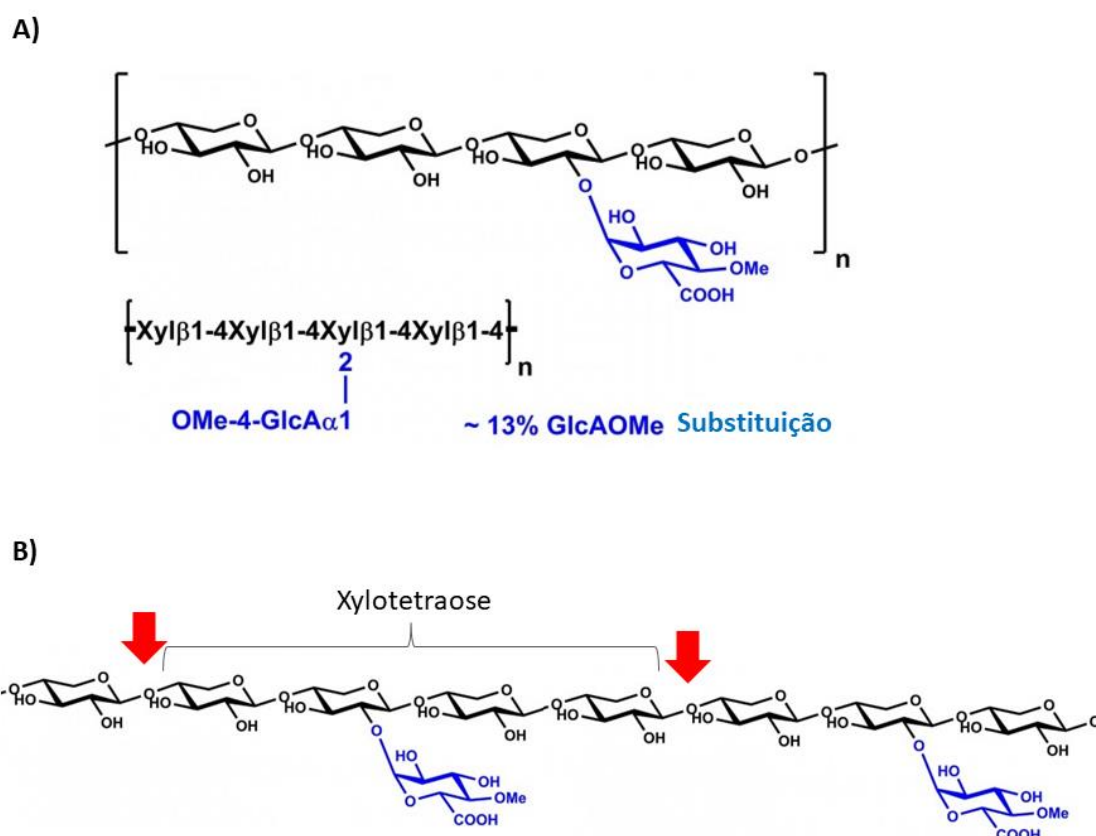


Fonte: autoria própria.

Observa-se na figura 37 que para os tempos menores avaliados (10, 20, 30 e 60 minutos) a liberação dos xilooligosacarídeos aparentemente foi semelhante, em todos os tempos o xilooligosacarídeo mais bem definido e aparentemente em maior concentração (em relação a intensidade da banda correspondente) é a xilotetraose (X_4), indicando que esse seria o produto principal da hidrólise endoxilanólítica sobre a xilana *Beechwood*. Esse resultado mostra-se de acordo com a capacidade hidrolítica da família 11 de glicosídeo hidrolases (GH11), que realizam hidrólises de ligações glicosídicas na cadeia principal de xilana três resíduos após a ramificação (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006), requerendo três resíduos de xilopiranosil consecutivos não substituídos (BIELY et al., 1997).

O substrato xilana de beechwood apresenta uma estrutura formada por repetidas unidades de 4-O-metil-glucuroxilana, que são compostas por 4 resíduos de xilopiranosil, sendo o terceiro substituído na posição orto, por uma ligação glicosídica tipo alfa entre o carbono 2 do xilopiranosil e o carbono 1 de um resíduo de glicose metilada em seu quarto carbono (Figura 38) (MCCLEARY; MCGEOUGH, 2015).

Figura 38. Representação esquemática da estrutura da xilana de beechwood. A) Unidade de 4-O-metil-glucuroxilana, onde a substituição ocorre no terceiro resíduo por uma ligação tipo alfa entre o carbono 2 do xilopiranosil e o carbono 1 da glicose metilada em seu quarto carbono. B) Duas unidades de 4-O-metil-glucuroxilana onde as setas vermelhas indicam o sítio de hidrólise das endoxilanases pertencentes à família GH11.



Fonte: Adaptada de www.magazyme.com

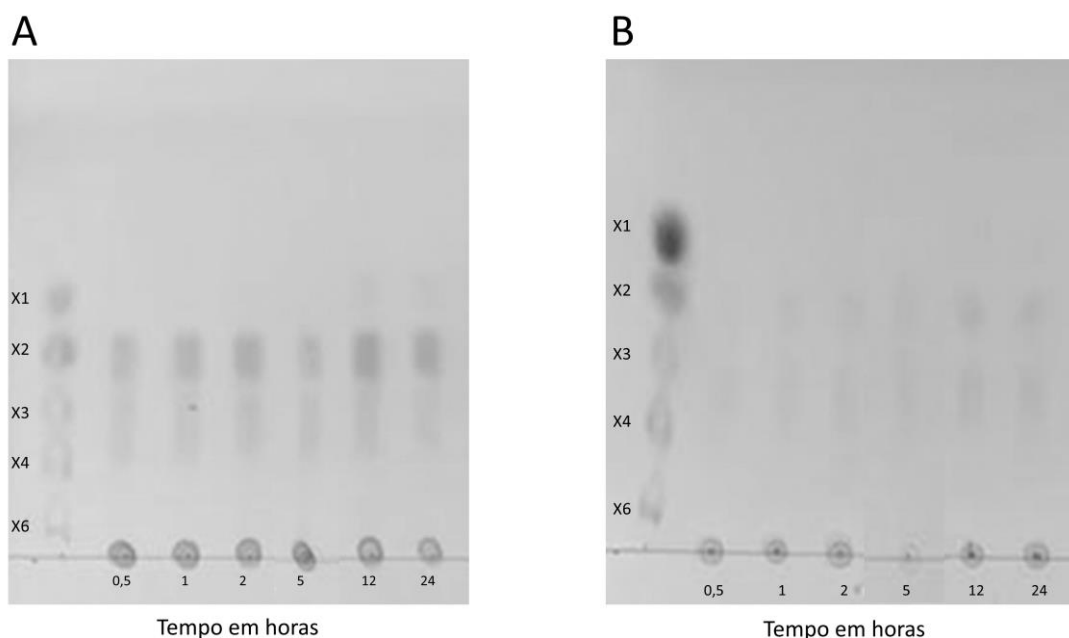
Conforme observado na figura anterior, a estrutura do substrato, principalmente a posição da substituição/ramificação, e a especificidade da endoxilanase GH11, asseguram a produção de xilotetraose (Xyl4) como produto principal da hidrólise de xilana de beechwood pela enzima de estudo. Embora os

demais açúcares não tenham apresentado bandas definidas, é possível observar indícios da presença de açúcares até a altura de X₂, e não se observa a presença de monômeros de xilose.

Nesse sentido foram avaliados tempos maiores de hidrólise enzimática a 50° C, sobre o substrato comercial xilana *beechwood*, e sobre a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Ambas as hidrólises ocorreram em tempos de 0,5; 1; 2; 5; 12 e 24 horas, e os produtos analisados qualitativamente em cromatografia de camada delgada (CCD), e qualitativamente por HPLC (tabela 12).

A hidrólise prolongada da xilana *beechwood* resultou na diminuição na concentração de X₄ enquanto a concentração de X₃ e X₂ aumentava, e após 12 horas é possível identificar material correspondente a xilose (Figura 39 A). Já para a hidrólise da hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar não é visível a presença de xilose, sendo o produto predominante entre X₄, X₃ e X₂ (Figura 39 B).

Figura 39. Análise dos produtos de hidrólise enzimática prolongada por cromatografia em camada delgada (CCD). Marcador de xilogossacarídeos (X₁ = xilose; X₂ = xilobiose; X₃ = xilotriose; X₄ = xilotetraose e X₆ = xilohexose). Tempos de hidrólise enzimática 0,5; 1; 2; 5; 12 e 24 horas a 50 °C sobre xilana *Beechwood* (A) e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar (B).



Fonte: autoria própria.

A quantificação desse material foi feita por HPLC e os resultados estão expressos na tabela 11. Após 30 minutos de hidrólise enzimática sobre a xilana

beechwood são formados X2, X3 e X4, variando suas concentrações até 12 horas, a partir do qual observamos a presença de xilose (X1). Em 24 horas ocorreu a formação de X5, com significativa diminuição de X3 e X4 (tabela 11).

A hidrólise do material hemicelulósico extraído do bagaço de cana-de-açúcar apresentou X2 e X4 como produtos principais, ao decorrer do processo é possível observar aumento de X2 até 12 horas, tempo no qual ocorre a presença de xilose.

Tabela 11. Quantificação por HPLC de xilooligossacarídeos obtidos após processo de hidrólise enzimática sobre substratos xilana beechwood e hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar.

Hidrólise enzimática (xilana beechwood)							
Tempo (horas)	X1	X2	X3	X4	X5	X6	TOTAL
0,5	--	2,22	3,18	1,96	--	--	7,36
1	--	2,59	2,54	1,70	--	--	6,83
5	--	3,37	2,85	1,70	--	--	7,91
12	1,96	3,54	3,00	1,94	--	--	10,45
24	1,72	3,01	0,10	0,54	2,85	--	9,12
Hidrólise enzimática (hemicelulose bagaço de cana-de-açúcar)							
Tempo (horas)	X1	X2	X3	X4	X5	X6	TOTAL
0,5	--	2,22	--	2,43	--	--	4,65
1	--	2,59	--	2,17	--	--	4,76
5	--	3,37	--	2,19	--	--	5,56
12	1,96	3,54	--	2,42	--	--	7,92
24	0,92	3,01	--	2,01	--	--	5,94

Fonte: autoria própria.

Em relação a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar o material utilizado foi obtido e caracterizado por (NASCIMENTO et al., 2022), sendo composto por lignina $12,3 \pm 3,04$ hemicelulose $83,41 \pm 2,08$ celulose $3,02 \pm 1,77$ (valores em %). Tipicamente a estrutura molecular de xilanas do bagaço de cana-de-açúcar é complexa, sendo composta por 4-O-metil-glucuronoarabinoxilanas consistindo de um

esqueleto β -1,4- D -xilopiranosil linear, ligado com ramificações em O-2 de unidades ácido 4-O-metilglucurônico e O-3 de unidades arabinofuranosil (BIAN et al., 2012; MORAIS DE CARVALHO et al., 2017).

A complexidade estrutural da xilana presente na hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, transforma esse material em potencial para obtenção de materiais com maior valor agregado. Os resultados obtidos nesse estudo mostram a produção de xilose ($0,92 \text{ g.L}^{-1}$), xilobiose ($3,01 \text{ g.L}^{-1}$) e xilotetraose ($2,01 \text{ g.L}^{-1}$) após 24 horas de hidrólise enzimática (tabela 11). Valores de xilobiose são superiores, enquanto xilotetraose são inferiores, e não observamos a formação de oligômeros maiores como os relatados para a utilização de 30 U/g de endoxilanase de *Aspergillus versicolor* sobre a hidrólise de 2% (m/v) do pseudo-caule de bananeira, que após 24 horas obtiveram a produção $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ de xilobiose, $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ de xilotetraose e $4,24 \text{ g.L}^{-1}$ de xilopentose+xilohexose (FREITAS, 2019).

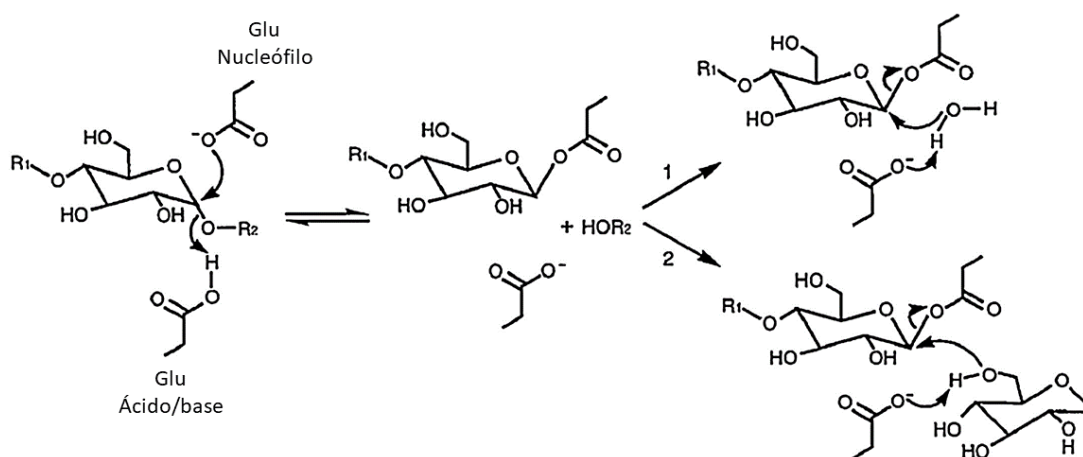
A presença de polímeros com menor grau de polimerização durante a hidrólise de xilana beechwood é semelhante ao observado quando aplicada endoxilanase GH11 recombinante de *Bacillus subtilis* Lucky9 sobre o mesmo substrato, obtendo-se X2, X3 e X4 como produtos principais após 4 horas (CHANG et al., 2017).

Tempos prolongados de hidrólise com endoxilanase recombinante de *Kitasatospora* sp. sobre xilana oat spelt, apresentaram oligômeros de X2 a X5 e pequenas quantidades de X6 e X7 após 72 horas (RAHMANI et al., 2019). Enquanto a endoxilanase recombinante de *Nonomuraea flexuosa* produziu de X2 a X5 após 2 horas de hidrólise, e ao avançar o tempo de hidrólise para 48 horas observou-se apenas X1, X2 e X3 como produtos (ZHANG et al., 2011).

Autores relatam a atividade de transglicosilação ocorrendo simultaneamente a atividade hidrolítica de endoxilanasas pertencentes a família GH 11 (LI et al., 2017) ou no caso do subsítio -2 não estar ocupado em decorrência de razões estéricas ou de alta concentração de substrato (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006).

Durante a atividade hidrolítica, as moléculas de água entram no sítio ativo em uma região próxima à ligação glicosídica, atacando o cátion carbônio intermediário e promovendo a clivagem da ligação glicosídica. Porém o caminho da reação pode mudar para a transglicosilação na presença de alta concentração de moléculas atuando como receptor (KIM et al., 1999; LI et al., 2017). Essa proposta de caminho da reação está exemplificada na figura 40.

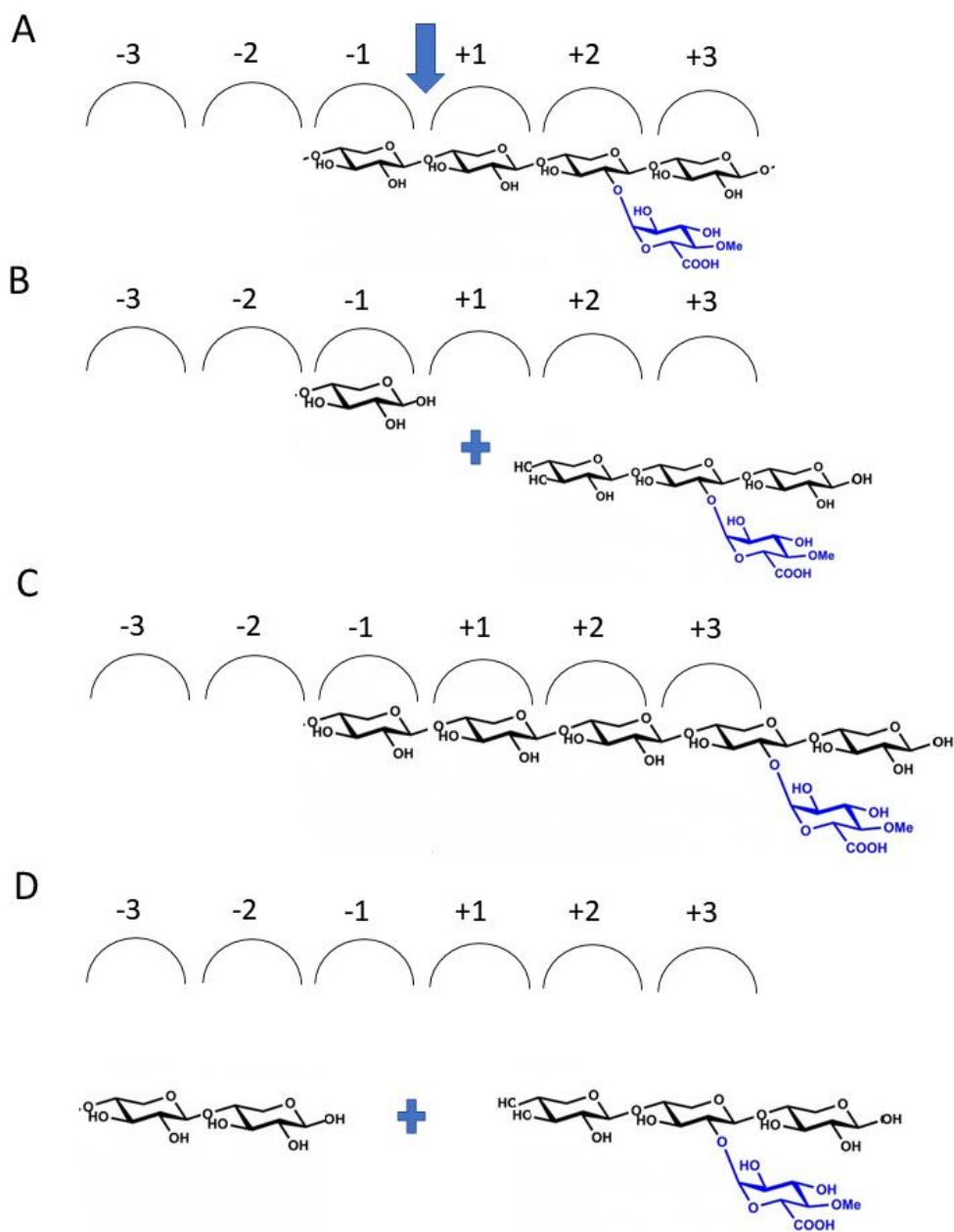
Figura 40. Proposta de competição do caminho da reação entre transglicosilação e hidrólise no sítio ativo das endoxilanases. 1, hidrólise; 2, transglicosilação.



Fonte: (KIM et al., 1999; LI et al., 2017)

O caminho da reação proposto foi abordado como responsável pela hidrólise de ácido aldohexaurônico em ácido aldopentaurônico e xilobiose, através da ação de quatro endoxilanases GH11 distintas (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006). Com bases na literatura, foi construído um esquema para propor o mecanismo de ação da endoxilanase em estudo sobre o substrato xilana beechwood, demonstrando a reação de transglicosilação que resultaria na formação de xilobiose e xilotriose como produtos principais da ação enzimática (Figura 41).

Figura 41. Esquema do modo de ação da endoxilanasase sobre xilana beechwood (4-O-metilglucoroxilana). (A) formação do complexo enzima-substrato, do qual é liberado xilotriose; (B) intermediário covalente é atacado por outra molécula de substrato; (C) xilopentose é formado e deslocado; (D) xilopentose é clivado em xilotriose e xilobiose.



Fonte: Autoria própria baseado em (KOLENOVÁ; VRŠANSKÁ; BIELY, 2006)

Assim sendo, a utilização da endoxilanasase para produção de xilooligossacarídeos mostra-se atraente para a produção de oligossacarídeos com menor grau de polimerização, que podem ser utilizados como prébióticos.

7. CONCLUSÕES

Em relação aos parâmetros termodinâmicos, o glicerol foi capaz de favorecer a reação de hidrólise do substrato por meio da diminuição na energia de ativação da reação (E_a), e de aumentar a resistência da enzima à desnaturação térmica, através do aumento da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$). O efeito termoprotetor do glicerol sobre a estrutura terciária da enzima foi evidenciado pelos valores de entalpia (ΔH_D) e entropia (ΔS_D) e energia de Gibbs (ΔG_D). O efeito termoprotetor do glicerol sobre a estrutura da endoxilanase foram confirmados pelos resultados das simulações de dinâmica molecular, uma vez que os valores de RMSD e Rg foram menores quando simulados na presença do composto do que nos ensaios com a enzima livre. O glicerol também foi capaz de afetar os parâmetros cinéticos da enzima, por meio de aumento da velocidade máxima da reação (V_{max}), porém não houve alteração na afinidade da enzima pelo substrato avaliado (K_m).

Os parâmetros cinéticos da endoxilanase sofreram alterações na presença de compostos fenólicos. Ácido siríngico e ácido ferúlico apresentaram os maiores valores de velocidade máxima (V_{max}), seguido por ácido vanílico, e os valores de K_m foram menores na presença desses compostos. Já o ácido 4-hidroxibenzoico não apresentou influência sobre os parâmetros cinéticos da endoxilanase.

Análises de docking molecular foram realizadas em busca de sítios de interação para os compostos fenólicos na estrutura da endoxilanase. Quando a estrutura modelada sem a his-tag na região N-terminal foi submetida as análises de docking, uma cavidade oposta ao sítio ativo foi identificada, despertando a ideia de que a ligação dos fenólicos nessa cavidade poderia promover uma modulação alostérica e potencializar os parâmetros cinéticos. Uma nova análise foi realizada com a estrutura tridimensional modelada com a his-tag na região N-terminal, nesse caso observamos a rotação de Trp 177 para o interior da estrutura proteica, o que resultou na perda da cavidade anteriormente descrita, não demonstrando sítios de interação para os compostos fenólicos avaliados, além do sítio ativo da enzima.

A aplicação da endoxilanase na extração do mosto de uva mostrou-se efetiva até o tempo de 120 minutos a 50°C, promovendo maiores rendimentos de extração, maior quantidade de sólidos totais, açúcares redutores totais e compostos fenólicos. Além de melhorar os parâmetros de cor como intensidade e tonalidade, assim como a clarificação do material obtido, tornando o mosto de uva mais adequado aos

parâmetros sensoriais exigidos pelos consumidores de produtos a base de suco de uva.

Os produtos principais da hidrólise de endoxilanase sobre xilana beechwood são os oligossacarídeos X4, X3 e X2, sendo observado a presença de xilopentose ao final de 24 horas de hidrólise, atribuindo esse fato a especificidade de interação e reconhecimento do sítio de clivagem características das enzimas pertencentes à família GH 11, e a competição do caminho da reação com o mecanismo de transglicosilação. Os produtos principais da hidrólise de endoxilanase sobre a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foram X4 e X2, com a presença de xilose após 12 horas de hidrólise.

REFERÊNCIAS

ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 571–578, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018362251>>

AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 19–35, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2079-4>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

ALAM, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 298–302, 1994.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. Oxford: Clarendon. **Computer Simulation of Liquids**, [s. l.], 1989.

AMO, G. S. De. Expressão heteróloga e caracterização de xilanase de *Myceliophthora heterothallica* F. 2.1. 4. [s. l.], 2018.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 353–368, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01198746>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 326–338, 2001.

BENDER, A.; SOUZA, A. L. K. De; CALIARI, V.; MALGARIM, M. B.; COSTA, V. B.; GOULART, C. Caracterização físico-química e sensorial de sucos da uva Isabel em cortes com diferentes variedades produzidas na região do Vale do Rio do Peixe-SC. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 23, 2020.

BHATNAGAR, B. S.; BOGNER, R. H.; PIKAL, M. J. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. **Pharmaceutical development and technology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 505–523, 2007.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X.-P.; XU, F.; SUN, R.-C.; KENNEDY, J. F. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 638–645, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712000124>>

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 151–166, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697000965>>

BOUKARI, I.; O'DONOHUE, M.; RÉMOND, C.; CHABBERT, B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 130–138, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138117711001470>>

CAKMAK, U.; SAGLAM ERTUNGA, N. Gene cloning, expression, immobilization and characterization of endo-xylanase from *Geobacillus* sp. TF16 and investigation of its industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 133, p. S288–S298, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138117717300164>>

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. Da; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 254–267, 2005.

CANOSSA, A. T.; REINEHR, J.; DE BEM, B. P.; ALLEBRANDT, R.; WURZ, D. A.; KRETZSCHMAR, A. A. Composição química e análise sensorial do suco de uva elaborado com três variedades cultivadas em Lages–Santa Catarina. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, [s. l.], p. 972–981, 2017.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. de O.; DA SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004905>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

CHANG, S.; GUO, Y.; WU, B.; HE, B. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 249–256, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301631594X>>

CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **mycoscience**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 171–175, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181300200079X>>

COSTA, T. dos S.; ROGEZ, H.; PENA, R. da S. Adsorption capacity of phenolic compounds onto cellulose and xylan. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 35, p. 314–320, 2015.

CREAGER, A. N. H. Recipes for recombining DNA: A history of Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **BJHS Themes**, [s. l.], v. 5, v. 2020/12/08, p. 225–243, 2020. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/recipes-for-recombining-dna-a-history-of-molecular-cloning-a-laboratory-manual/F4EE6A7FFA4991B714A33D474BC1CF76>>

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulasas, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 249–260, 1997.

DA SILVA, P. O.; DE ALENCAR GUIMARÃES, N. C.; SERPA, J. D. M.; MASUI, D. C.; MARCHETTI, C. R.; VERBISCK, N. V.; ZANOELO, F. F.; RULLER, R.; GIANNESI, G. C. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 21, p. 101312, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119303500>>

DALAGNOL, L. M. G.; DAL MAGRO, L.; SILVEIRA, V. C. C.; RODRIGUES, E.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 105, p. 197–204, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308517300949>>

DE MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em**

Engenharia, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 68–78, 2009.

DE OLIVEIRA, R. L.; DA SILVA, O. S.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 1088–1093, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301830878X>>

DE SOUZA MOREIRA, L. R.; DE CARVALHO CAMPOS, M.; DE SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FILHO, E. X. F. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 60, p. 46–52, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184513001278>>

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000202>>

DENNISON, C. **A Guide to Protein Isolation**. [s.l.] : Springer Netherlands, 2003.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; CHRYSINA, E. D. The structure of a GH10 xylanase from *Fusarium oxysporum* reveals the presence of an extended loop on top of the catalytic cleft. **Acta Crystallographica Section D**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 735–742, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1107/S0907444912007044>>

ELIAS, H. H. de S. **Caracterização física, química e bioquímica de cultivares de videira durante a maturação**. 2008. 74f, Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Departamento de Ciência dos ..., 2008.

FOGAÇA, A. de O. **Compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade Merlot**, Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

FRANÇA, H. C. R. Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico. [s. l.], 2016.

FREITAS, C. De. Hidrólise enzimática de hemicelulose do pseudocaulo de bananeira com endoxilanase I de *Aspergillus versicolor* para produção de xilooligossacarídeos e avaliação do seu efeito prebiótico. [s. l.], 2019.

FURUKAWA, K.; KOBATA, A. Protein glycosylation. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 554–559, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095816699290085W>>

GANGWAR, A. K.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: a review. **BioResources**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 3733–3754, 2014.

GOMES, K. de S. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. [s. l.], 2014.

GONÇALVES, L. R. B.; GOMES, S. D. L.; ALBUQUERQUE, T. L.; JUNIOR, J. E. M.; ROCHA, M. V. P. PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CAJU. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 683–688, 2014.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; SANTANA-MORALES, J. C.; RÍOS-FRÁNQUEZ, F. J.; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; CRISTIANI-URBINA, E.; PONCE-NOYOLA, T. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, [s. l.], v. 196, p. 32–35, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236117300947>>

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 419–425, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>>

HENRICI, A. T. The yeasts: genetics, cytology, variation, classification and identification. **Bacteriological Reviews**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 97–179, 1941.

HSU, C.-K.; LIAO, J.-W.; CHUNG, Y.-C.; HSIEH, C.-P.; CHAN, Y.-C. Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. 1523–1528, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1523>>

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>>

IBRAHIM, S. B. S.; LIRA, R. C.; SANTOS, E. L.; AMORIM, E. L. C.; DE LIMA BELEM, T. J.; MACEDO, W. V.; SOUZA, S. P. L.; DA SILVA, S. J. C.; DA SILVA, J. C.; LIRA, J. P. A. Biodigestão anaeróbia do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado e utilizando excretas de frango como inóculo. **PUBVET**, [s. l.], v. 11, p. 1188–1297, 2017.

JOHN, R. A. Photometric assays. In: EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. (Eds.). **Enzyme assays: A practical approach**. [s.l.] : Oxford University Press, 2002. p. 49–78.

KATAPODIS, P.; KINTZIOS, S.; KONSTAS, J.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Enzymic production of aldopentauronic acid and use as a bioregulator in plant airlift bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 630–632, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303801755>>

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 239–243, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404000276>>

KAUSHAL, J.; KHATRI, M.; SINGH, G.; ARYA, S. K. A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1350–1361, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021023606>>

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 241–247, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165600002650>>

KIM, J.-S.; CHA, S.-S.; KIM, H.-J.; KIM, T.-J.; HA, N.-C.; OH, S.-T.; CHO, H.-S.; CHO, M.-J.; KIM, M.-J.; LEE, H.-S.; KIM, J.-W.; CHOI, K. Y.; PARK, K.-H.; OH, B.-H. Crystal Structure of a Maltogenic Amylase Provides Insights into a Catalytic Versatility *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 37, p. 26279–26286, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26279>>

KOLENOVÁ, K.; VRŠANSKÁ, M.; BIELY, P. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 338–345, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165605004736>>

KUMAR, L.; NAGAR, S.; MITTAL, A.; GARG, N.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1737–1749, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1268-z>>

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1435, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0638-4>>

LI, Q.; SUN, B.; XIONG, K.; TENG, C.; XU, Y.; LI, L.; LI, X. Improving special hydrolysis characterization into *Talaromyces thermophilus* F1208 xylanase by engineering of N-terminal extension and site-directed mutagenesis in C-terminal. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 451–458, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016319377>>

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>>

MACLEOD, A. M.; LINDHORST, T.; WITHERS, S. G.; WARREN, R. A. J. The Acid/Base Catalyst in the Exoglucanase/Xylanase from *Cellulomonas fimi* Is Glutamic Acid 127: Evidence from Detailed Kinetic Studies of Mutants. **Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 20, p. 6371–6376, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00186a042>>

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. ANTHOCYANIS IN GRAPE JUICE: COMPOSITION AND STABILITY. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2006.

MANNA, B.; GHOSH, A. Understanding the conformational change and inhibition of hyperthermophilic GH10 xylanase in ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 332, p. 115875, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732221006012>>

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2003.

MARTINS, M.; ÁVILA, P. F.; PAIM DE ANDRADE, C. C.; GOLDBECK, R. Synergic recombinant enzyme association to optimize xylo-oligosaccharides production from agricultural waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 28, p. 101747, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881812030476X>>

MCCLEARY, B. V.; MCGEOUGH, P. A. Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 177, n. 5, p. 1152–1163, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1803-z>>

MIAO, S.; ZISER, L.; AEBERSOLD, R.; WITHERS, S. G. Identification of Glutamic Acid 78 as the Active Site Nucleophile in *Bacillus subtilis* Xylanase Using Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 23, p. 7027–7032, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00189a002>>

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. z.**, [s. l.], v. 49, n. 333–369, p. 352, 1913.

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

MIN, C. J.; MOON-HYEONG, S.; HYUN-HO, K.; EUNKYUNG, K.; HAK-SUNG, K. Molecular basis for the role of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 25, p. 10171–10176, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1300457110>>

MONONEN, I.; KARJALAINEN, E. Structural comparison of protein sequences around potential N-glycosylation sites. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 788, n. 3, p. 364–367, 1984. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483884900505>>

MORAIS DE CARVALHO, D.; MARTÍNEZ-ABAD, A.; EVTUGUIN, D. V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 156, p. 223–234, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310761>>

MORETTI, M. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R. D.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Braz J Microbiol**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 1062–1071, 2012.

MWANGI, I. W.; NGILA, J. C.; NDUNG'U, P.; MSAGATI, T. A. M. Removal of phenolics from aqueous media using quaternised maize tassels. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 134, p. 70–79, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479713007792>>

NASCIMENTO, C. E. de O. Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação. [s. l.], 2019.

NASCIMENTO, C. E. de O.; SIMÕES, L. C. de O.; PEREIRA, J. de C.; DA SILVA, R. R.; DE LIMA, E. A.; DE ALMEIDA, G. C.; PENNA, A. L. B.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 347, p. 1–8, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165622000268>>

NC-IUB. Units of Enzyme Activity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 319–320, 1979.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. [s.l.] : Macmillan, 2008.

NOGALES-BUENO, J.; BACA-BOCANEGRA, B.; HEREDIA, F. J.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M. Phenolic compounds extraction in enzymatic macerations of grape skins identified as low-level extractable total anthocyanin content. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 324–331, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15006>>

NUNCIRA, D. L. V. **Análise termodinâmica da produção de biobutanol em uma biorefinaria brasileira**, Dissertação de mestrado. Engenharia de Energia, UNIFEI. Minas Gerais, 2013.

PETERS, G. H.; FRIMURER, T. M.; ANDERSEN, J. N.; OLSEN, O. H. Molecular Dynamics Simulations of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. I. Ligand-Induced Changes in the Protein Motions. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 505–515, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349599769079>>

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 145–161, 1956. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02538322>>

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 95, n. 16, p. 9268–9273, 1998.

RAELE, R.; BOAVENTURA, J. M. G.; FISCHMANN, A. A.; SARTURI, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, [s. l.], v. 87, p. 205–223, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004016251300317X>>

RAHMANI, N.; KAHAR, P.; LISDIYANTI, P.; LEE, J.; YOPI; PRASETYA, B.; OGINO, C.; KONDO, A. GH-10 and GH-11 Endo-1,4- β -xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 272, p. 315–325, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418314214>>

RIZZON, L. A. Metodologia para análise de vinho. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, [s. l.], p. 120, 2010.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. [s.l.] : Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e ..., 2007.

ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Dietary fiber in health and disease**, [s. l.], p. 211–219, 1997.

ROSMINE, E.; SAINJAN, N. C.; SILVESTER, R.; ALIKKUNJU, A.; VARGHESE, S. A. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 393–401, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X1730029X>>

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021999177900985>>

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases. **Molecular biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 257–281, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a**

laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Author Affiliation: University of Texas South Western Medical Center, USA.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2012, 2012.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>>

SIDDIQUI, K. S.; SAQIB, A. A. N.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. I. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 325–330, 1997.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, [s. l.], v. 8, p. 25–33, 1998.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

STEEN, P. Van den; RUDD, P. M.; DWEK, R. A.; OPDENAKKER, G. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 151–208, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10409239891204198>>

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 315–330, 2004.

TERRONE, C. C.; MONTESINO DE FREITAS NASCIMENTO, J.; FANCHINI TERRASAN, C. R.; BRIENZO, M.; CARMONA, E. C. Salt-tolerant α -arabinofuranosidase from a new specie *Aspergillus hortai* CRM1919: Production in acid conditions, purification, characterization and application on xylan hydrolysis.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, [s. l.], v. 23, p. 101460, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119312575>>

TIAN, Y.; JIANG, Y.; OU, S. Interaction of cellulase with three phenolic acids. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 1022–1027, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612017037>>

TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. Structural Comparison of Two Major endo-1,4-Xylanases from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 847–856, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00003a019>>

VAGENENDE, V.; YAP, M. G. S.; TROUT, B. L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 46, p. 11084–11096, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi900649t>>

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Gromos manual. **BIOMOS, Biomolecular Software, Laboratory of Physical Chemistry, University of Groningen, The Netherlands**, [s. l.], 1987.

VANDERWEELE, T. J.; DING, P. Sensitivity Analysis in Observational Research: Introducing the E-Value. **Annals of internal medicine**, United States, v. 167, n. 4, p. 268–274, 2017.

VARDAKOU, M.; DUMON, C.; MURRAY, J. W.; CHRISTAKOPOULOS, P.; WEINER, D. P.; JUGE, N.; LEWIS, R. J.; GILBERT, H. J.; FLINT, J. E. Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 375, n. 5, p. 1293–1305, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283607014672>>

VIANA, Y. A.; DA SILVA GARROTE FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2005.

WANG, J.; CIEPLAK, P.; KOLLMAN, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1049–1074, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/1096-987X\(200009\)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:12%3C1049::AID-JCC3%3E3.0.CO)>

WANG, L.; CAO, K.; PEDROSO, M. M.; WU, B.; GAO, Z.; HE, B.; SCHENK,

G. Sequence- and structure-guided improvement of the catalytic performance of a GH11 family xylanase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 297, n. 5, p. 101262, 2021. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925821010656>>

WANG, Y.; LIU, M.; LI, J.; WEI, H.; ZHANG, K. Experimental and in silico studies of competitive inhibition of family GH10 *Aspergillus fumigatus* xylanase A by *Oryza sativa* xylanase inhibitor protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1391–1399, 2021. b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021023667>>

WELLENS, A.; GAROFALO, C.; NGUYEN, H.; VAN GERVEN, N.; SLÄTTEGÅRD, R.; HERNALSTEENS, J.-P.; WYNS, L.; OSCARSON, S.; DE GREVE, H.; HULTGREN, S. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH–oligomannose-3 complex. **PloS one**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. e2040, 2008.

WICKI, J.; SCHLOEGL, J.; TARLING, C. A.; WITHERS, S. G. Recruitment of Both Uniform and Differential Binding Energy in Enzymatic Catalysis: Xylanases from Families 10 and 11. **Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 23, p. 6996–7005, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi700359e>>

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (*Saccharomycetaceae*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.59.439>>

YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresour. Technol.**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 277–280, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401000244>>

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 12, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-12>>