

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 24/03/2025



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

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de
Klebsiella pneumoniae TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-
vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de
Klebsiella pneumoniae TD 4.7 y aplicación de la enzima en la
producción de 4-vinilguayacol

São José do Rio Preto

2023

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 y aplicación de la enzima en la producción de 4-vinilguayacol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Brasil e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Castilla-La Mancha, Câmpus de Ciudad Real, Castilla-La Mancha, Espanha como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Microbiologia e Química, respectivamente.

Financiadoras: CNPq Proc.140035/2019-2, PDSE/CAPES Proc. 88881.622878/2021-01 e UCLM-2021-GRIN-31106

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

Orientador: Prof. Dr. Sergio Gómez Alonso

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ruller

Tutora: Profa. Dra. Ana Isabel Briones Pérez

São José do Rio Preto

2023

S237p	Santos, Maitê Bernardo Correia dos Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaicol / Maitê Bernardo Correia dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2023 155 p. : il. Tese (doutorado com dupla titulação) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto e Universidade de Castilla-La Mancha. Orientadora: Eleni Gomes Orientador: Sergio Gómez Alonso Coorientador: Roberto Ruller Tutora: Ana Isabel Briones Pérez 1. Ácido ferúlico. 2. Ácido p- umárico. 3. 4-vinilguaicol. 4. 4-vinilfenol. 5. Bagaço de cana de açúcar. 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.

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaiacol

Producción de descarboxilasa de ácido ferúlico heterólogo a partir de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 y aplicación de la enzima en la producción de 4-vinilguayacol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP, Brasil e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Castilla-La Mancha, Câmpus de Ciudad Real, Castilla-La Mancha, Espanha como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Microbiologia e Química, respectivamente.

Financiadoras: CNPq Proc.140035/2019-2, PDSE/CAPES Proc. 88881.622878/2021-01 e UCLM-2021-GRIN-31106

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Eleni Gomes

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Prof. Dr. Sergio Gómez Alonso

UCLM – Câmpus de Ciudad Real

Orientador

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de Rio Claro-SP

Profa. Dra. Ellen Silva Lago Vanzela

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de São José do Rio Preto-SP

Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Câmpus de Jaboticabal-SP

São José do Rio Preto-SP, Brasil

24 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrada toda minha gratidão às forças a que estiveram presentes durante a realização desta etapa, sendo a primeira e mais importante a Luz Divina que sempre me guiou e forneceu energia nos momentos necessários.

Demonstrar eterna gratidão aos meus orientadores Eleni Gomes e Sergio Gómez Alonso, ela que me aceitou e confiou que juntas poderíamos construir conhecimento e sempre esteve ao meu lado durante todo o desenvolvimento e ele que me recebeu de portas abertas em seu grupo de pesquisa na Espanha e me forneceu todos recursos necessários para o pleno desenvolvimento de uma importante etapa deste projeto que culminou numa bela parceria que veio a se tornar um Doutorado em regime de Cotutela. Mas acima de tudo, demonstrar que estive muito bem amparada em momentos imprescindíveis à conclusão deste trabalho. Bem como ao meu coorientador Roberto Ruller que foi imprescindível em etapas importantes deste trabalho, compartilhando seu conhecimento que permitiu a obtenção de bons resultados.

Ao meu amado esposo Jorge, o qual não mediu esforços para que fosse possível cada vírgula aqui presente, sendo companheiro e sempre disposto a encarar todo e qualquer desafio para a plena conclusão deste trabalho. Gostaria de demonstrar gratidão e reconhecimentos especiais, pois sei o quão singular é a vida de um pós graduando e quanto isso pode modificar a rotina de quem se dispõe a vivenciar, e hoje olhando cada momento que compartilhamos sei o quão importante é ter um verdadeiro companheiro ao lado.

Aos meus pais Isabel e Edgar, irmão Edgar, irmãs Isabella e Pamella que sempre compreenderam minhas ausências e me acalentavam o coração compartilhando suas melhores energias.

Agradecimentos especiais a amiga Josiani de Cassia por todo auxílio e ação com as análises estatísticas e melhoria da discussão e ao amigo Jorge Hernandez com as análises computacionais, sem ambos estes trabalhos não se completariam. Aos colegas de laboratório pelas conversas, risos e compartilhamento de conhecimentos que muitas vezes deixavam leve um dia longo de experimentos, são eles: Eduardo Simioni, Roni, Cíntia, Vitória, Érike, Anas, Anna, Matheus, Jana, Ana,

Gustavo, José, Eduardo, Tania, Inés, Yara e Thiago. Aos professores Maurício Boscolo, Roberto da Silva, Arni, Gustavo Bonilla, Ricardo Mariutti, Roberto Ruller e Ellen Lago por todo suporte e auxílio nos momentos de dúvida ao longo do desenvolvimento do trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88881.622878/2021-01, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Proc.140035/2019-2, à qual agradeço. Também agradeço a Universidad de Castilla-La Mancha - UCLM -2021-GRIN-31106, mantenedora do laboratório onde realizei parte dos meus estudos.

RESUMO

Derivados vinílicos comercialmente importantes podem ser obtidos em bioprocessos por descarboxilação de ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico, por enzima como a ácido ferúlico descarboxilase, resultando em compostos de valor agregado como 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol, respectivamente. Neste estudo, o gene que codifica a ácido ferúlico descarboxilase em *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 foi isolado e identificado como um fragmento de 504 pb, que codifica um polipeptídeo de 167 resíduos de aminoácidos. O gene foi expresso em *Escherichia coli* BL21(DE3), e a enzima recombinante, purificada como uma proteína de 22 kDa, com maior atividade em pH 5,5 e a 40°C. A ácido ferúlico descarboxilase recombinante foi completamente inibida por Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺² e Cd⁺² e apresentou aumento de atividade na presença de Co⁺² (aproximadamente +20%). Os valores de K_m e V_{max} foram estimados para o substrato ácido ferúlico em 2,95 mM e 102,10 μmol.min⁻¹.mg⁻¹. A enzima ácido ferúlico descarboxilase teve seu modelo predito gerado usando os programas de predição estrutural *AlphaFold Multimer* e *Swissmodel*, com um RMSD de apenas 0,7 Å, demonstrando a ausência de cisteína e pontes dissulfeto no homodímero, a presença de grandes quantidades de lisina, e os resíduos envolvidos no ciclo catalítico Tyr27, Glu134 e Asn23. A enzima foi testada para conversão dos ácidos ferúlico e *p*-cumarico obtidos por hidrólise de bagaço de cana de açúcar em método de extração sólido-líquido alcalina convencional. Nessa hidrólise, obteve-se 135,41 mg L⁻¹ de ácido ferúlico e 948,82 mg L⁻¹ de ácido *p*-cumárico, dos quais foram obtidos 53,58 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiaicol e 437,89 mg L⁻¹ 4-vinilfenol, rendimentos de 43% e 55% respectivamente. Estes resultados indicaram a viabilidade do uso destes compostos obtidos de fonte renovável, para a produção de *flavours* naturais de valor comercial.

Palavras chave: Ácido ferúlico. Ácido *p*-cumárico. 4-vinilguaiaicol. 4-vinilfenol. Bagaço de cana de açúcar. *Flavours* naturais.

RESUMEN

Los derivados vinílicos comercialmente importantes se pueden obtener a través de bioprocesos por descarboxilación de sus ácidos fenólicos precursores, como el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico, que, mediante enzimas como la ácido ferúlico descarboxilasa, dan como resultado compuestos de valor añadido como el 4-vinilguayacol y el 4-vinilfenol, respectivamente. En este estudio, el gen que codifica la ácido ferúlico descarboxilasa en *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 se aisló e identificó como un fragmento de 504 pb, que codifica un polipéptido de 167 residuos de aminoácidos. El gen se expresó en *Escherichia coli* BL21(DE3), y la enzima recombinante se purificó como una proteína de 22 kDa, con mayor actividad a pH 5,5 y a 40 °C. La ácido ferúlico descarboxilasa recombinante fue completamente inhibida por Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Cd^{+2} y mostró una mayor actividad en presencia de Co^{+2} (con un incremento de actividad cercano al 20%). Los valores de K_m y V_{max} encontrados para el sustrato ácido ferúlico fueron 2.95 mM y $102.10 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente. La estructura del enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilasa se regeneró usando los programas de predicción estructural *AlphaFold Multimer* y *Swissmodel*, con un RMSD de solo 0.7 Å, demostrando la ausencia de enlaces de cisteína y disulfuro en el homodímero, la presencia de grandes cantidades de lisina, y residuos involucrados en el ciclo catalítico Tyr27, Glu134 y Asn23. La enzima se probó para la conversión de ácidos ferúlico y *p*-cumárico obtenidos por hidrólisis de bagazo de caña de azúcar en un método de extracción sólido-líquido alcalino convencional. En esta hidrólisis se obtuvieron $135,41 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido ferúlico y $948,82 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico, a partir de los cuales, por acción del enzima recombinante, se obtuvieron $53,58 \text{ mg L}^{-1}$ de 4-vinilguayacol y $437,89 \text{ mg L}^{-1}$ de 4-vinilfenol, lo que representa rendimientos de conversión del 43% y del 55% respectivamente. Estos resultados indicaron la factibilidad de usar ácidos hidroxicinámicos obtenidos de fuentes renovables, para la producción de aromatizantes naturales comercialmente valiosos.

Palabras clave: Ácido ferúlico. Ácido *p*-cumárico. 4-vinilguayacol. 4-vinilfenol. Bagazo de caña de azúcar. Sabores naturales.

ABSTRAT

Decarboxylation of phenolic acids in bioprocesses, like ferulic acid and p-coumaric acid, can provide commercially profitable vinyl derivatives by using enzymes, such as ferulic acid decarboxylase, which result in compounds with additional value like 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol, respectively. In this study, the gene encoding ferulic acid decarboxylase in *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 was isolated and identified as a 504 bp fragment, which encodes a polypeptide of 167 amino acid residues. The gene was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and the recombinant enzyme was purified as a 22 kDa protein with higher activity at pH 5.5 and 40°C. Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , and Cd^{+2} completely inhibited recombinant ferulic acid decarboxylase, however Co^{+2} boosted activity (about +20%). The ferulic acid substrate's K_m and V_{max} values were estimated to be 2.95 mM and 102.10 $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. The enzyme ferulic acid decarboxylase had its predicted model generated using the structural prediction programs *AlphaFold Multimer* and *Swissmodel*, with an RMSD of only 0.7 Å, demonstrating the absence of cysteine and disulfide bonds in the homodimer, the presence of large amounts of lysine, and residues involved in the catalytic cycle Tyr27, Glu134, and Asn23. In a conventional alkaline solid-liquid extraction approach, the enzyme was evaluated for the conversion of ferulic and p-coumaric acids derived from the hydrolysis of sugarcane bagasse. This hydrolysis produced 135.41 mg L^{-1} of ferulic acid and 948.82 mg L^{-1} of p-coumaric acid, from which 53.58 mg L^{-1} of 4-vinylguaiacol and 437.89 mg L^{-1} of 4-vinylphenol were produced, yielding 43% and 55%, respectively. These findings revealed the feasibility of employing these compounds derived from renewable sources to produce commercially valuable natural flavors.

Keywords: Ferulic acid. *P*-coumaric acid. 4-vinylguaiacol. 4-vinylphenol. Sugar cane bagasse. Natural flavors.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	9
Geral	9
Específico	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
Biomassa lignocelulósica	10
Extração e fracionamento da lignina	15
Compostos Fenólicos	18
Ácido ferúlico	20
Ácido <i>p</i> -cumárico	22
Microrganismos e suas enzimas aplicados à bioprocessos	24
Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol por descarboxilação não oxidativa	31
REFERENCIAS	36
CAPÍTULO II	44
Expressão e caracterização bioquímica da enzima ácido ferúlico descarboxilase nativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7	44
RESUMO	45
RESUMEN	46
CAPÍTULO III	58
Expressão heteróloga e caracterização da enzima ácido ferúlico descarboxilase de <i>Klebsiella pneumoniae</i> TD 4.7 em <i>Escherichia coli</i>	58
RESUMO	59
RESUMEN	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
Expressão heteróloga	63
Linhagens de microrganismos e plasmídeos	63
Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase	65
Construção do sistema de expressão para <i>E.coli</i>	67
Sequenciamento e análise da sequência	68
Padronização da expressão da proteína recombinante	68
Produção da enzima heteróloga em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e purificação	69

Determinação da atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase	70
Caracterização bioquímica da enzima heteróloga	71
Tempo de atividade enzimática	71
Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima	71
Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima quando em ausência de substrato	71
Efeito de agentes químicos sobre a atividade da enzima	72
Caracterização dos parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	72
Estimativa da massa molar da enzima	73
Determinação de proteínas totais	73
Modelagem computacional	73
Métodos analíticos para análises de ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
Produção da enzima heteróloga em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e purificação	75
Caracterização bioquímica da enzima recombinante ácido ferúlico descarboxilase	77
Tempo de reação enzimática	77
Efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima heteróloga purificada	78
Efeitos do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima purificada	79
Efeito de cátions sobre a atividade da enzima	81
Parâmetros cinéticos e especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	83
Modelagem computacional	84
Modelos estruturais da enzima ácido ferúlico descarboxilase	84
CONCLUSÃO	89
REFERENCIAS	90
CAPÍTULO IV	93
Extração e fracionamento de lignina para obtenção de ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico a partir de bagaço de cana de açúcar e talos de uva	93
RESUMO	94
RESUMEN	96
INTRODUÇÃO	98
MATERIAL E MÉTODOS	101
Biomassa lignocelulósica de cana de açúcar	101
Biomassa lignocelulósica de talos de uva	101
Procedimentos de extração	102
Preparo de amostra e análise de parâmetros gerais	103
Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	104

Produção enzimática de 4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico de bagaço de cana de açúcar	105
Análise estatística	106
RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
Parâmetros gerais e quantificação de açúcares, fenólicos totais, ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico	107
Biomassa de bagaço de cana de açúcar	107
Talos de uva	117
Produção enzimática de 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol a partir de ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico de bagaço de cana de açúcar	122
CONCLUSÃO	125
REFERENCIAS	126
CONCLUSÕES FINAIS	129
CONCLUSIONES FINALES	131
ANEXO 1	133
Sequências da enzima AFDase para o gênero <i>Klebsiella</i> e alinhamento	133
ANEXO 2	136
Extração de DNA total e obtenção do gene da ácido ferúlico descarboxilase para construção do plasmídeo de clonagem e plasmídeo de expressão	136
Análise da sequência	139
Transformação de diferentes linhagens de <i>Escherichia coli</i> para expressão	143
Otimização de expressão e extração da proteína recombinante	144
ANEXO 3	148
Gene da enzima ácido ferúlico descarboxilase	148

INTRODUÇÃO

A utilização de biomassa lignocelulósica como precursora de bioprodutos de valor agregado e biocombustíveis, por meio de processos biológicos fecha um ciclo de processos ambientalmente seguros e sustentáveis. Corroborando ao modelo de economia circular descrito por Ghisellini e colaboradores (2018), onde o desenvolvimento econômico promove o máximo aproveitamento, reaproveitamento/reciclagem de materiais, bens e componentes de forma a diminuir ao máximo a geração de resíduos; inovando a cadeia de produção, consumo, distribuição e recuperação de materiais e energia (NADDEO; TAHERZADEH, 2021).

Biocompostos, definidos como compostos de origem unicamente biológica, têm sido preferidos frente produtos de síntese química, dentro daquela perspectiva de consumo e entre eles, estão os aromatizantes para aplicação em alimentos e cosmética. Um desses aromatizantes de amplo uso é o 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol), produto da bioconversão do ácido ferulico, com aroma de cravo e um alto poder aromatizante, frequentemente aplicado em bebidas, alimentos e cosméticos (BURANOV; MAZZA, 2009; LI; LONG; DING, 2020, SAUCEDO-CASTAÑEDA, 2010).

O ácido ferúlico é um composto encontrado na parede celular de células vegetais fazendo a ligação entre resíduos da lignina e a hemicelulose e liberado durante os processos químicos e/ou biológicos de desconstrução da biomassa lignocelulósica. O ácido ferúlico, assim como vários outros derivados da quebra da lignina, podem ser convertidos a outros compostos por atividade metabólica microbiana, garantindo característica de origem biológica dos produtos (BILAL; IQBAL, 2020).

Assim como o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico é um dos ácidos fenólicos encontrados em abundância na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente à lignina (VIRKLUND et al., 2022; ZHAO et al., 2011). Estudos demonstram que o ácido *p*-cumárico apresenta valor em sua forma natural e/ou biotransformado em produtos como 4-vinilfenol, entretanto a fonte que tem sido explorada pela indústria na geração das moléculas oriundas é sintética originada da síntese química de derivados do petróleo (PAZ et al., 2019).

A utilização de derivados dos resíduos lignocelulosicos como substrato em bioprocessos é uma alternativa altamente promissora, propiciando economia circular e redução de custos dos processos industriais. Nesse sentido, o presente trabalho

foi desenvolvido com o objetivo de obter um composto aromatizante, o 4-vinilguaiacol, a partir de ácido ferúlico obtido de hidrólise de bagaço de cana de açúcar como substrato, por catalise enzimática utilizando a ácido ferúlico descarboxilase de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 em sua forma nativa e posteriormente clonada em *Escherichia coli*. Com o andamento das atividades desenvolvidas neste estudo foi verificada a presença de ácido *p*-cumárico, o qual foi convertido pela mesma via enzimática em 4-vinilfenol.

O texto aqui apresentado, foi organizado em capítulos:

- Capítulo I corresponde à revisão bibliográfica referente ao tema em estudo.
- Capítulos II e III contêm os dados sobre a produção e caracterização bioquímica da ácido ferúlico descarboxilase nativa de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7, clonagem e expressão da enzima em *E. coli* e caracterização da enzima recombinante.
- Capítulo IV adaptação de metodologias para fracionamento da lignina proveniente de biomassa renovável e obtenção de ácido ferúlico.

As pesquisas referentes aos capítulos II e III, bem como as conversões enzimáticas do capítulo IV, foram executadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, na Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE), sob a orientação da Professora Eleni Gomes.

A parte de tratamento e extrações da biomassa lignocelulósica, referente ao capítulo IV, foi executada na Faculdade de Ciencias y Tecnologias Químicas, Universidade Castilla-La Mancha (IRICA), durante o estágio de co-tutela, no período de setembro/2021 a fevereiro 2022, sob a orientação do Professor Sergio Gómez Alonso.

REFERENCIAS

- ABADÍA RETUERTA SA. **¿Qué es el raspón y para qué lo utilizamos? - Abadía Retuerta**. Disponível em: <https://www.abadia-retuerta.com/blog/que-es-el-raspon-y-para-que-lo-utilizamos/>. Acesso em: 5 out. 2021.
- ABBAS, S. R. et al. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food Chemistry**, v. 147, p. 10–16, 15 mar. 2014.
- AHMAD, B. et al. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives. *Science of The Total Environment*, v. 719, p. 137315, 1 jun. 2020.
- ASGHER, M. et al. A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1571–1578, ago. 2014.
- ATATOPRAK, T. et al. Grape stalk valorization for fermentation purposes. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, p. 100067, 30 jul. 2022.
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.
- BILAL, M. et al. Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers – A drive towards greener and eco-friendlier biocatalytic systems *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., , 20 jun. 2020.
- BRASILIA. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. **CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**, v. 8, n. 1, 2021.
- CAO, L. et al. Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.
- CARVALHO, M. J. et al. Potential of sugarcane extracts as cosmetic and skincare ingredients. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113625, 1 out. 2021.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of the lignin from jute (*corchorus capsularis*) fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10271–10281, 11 nov. 2009.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of the lignin in the cortex and pith of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3619–3634, 11 abr. 2012a.
- DEL RÍO, J. C. et al. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5922–5935, 13 jun. 2012b.
- DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, v. 101, n. 5, p. 913–925, 1 dez. 2008.

ENGEL, J. B.; AMBROSI, A.; TESSARO, I. C. Development of biodegradable starch-based foams incorporated with grape stalks for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 115234, 1 dez. 2019.

ENGEL, J. B.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C. Insights on the properties of physically and chemically treated grape stalks. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 34, p. e00506, 1 dez. 2022.

ESCOBAR-AVELLO, D. et al. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from grape canes: Comprehensive characterization by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Research International**, v. 143, p. 110265, 1 maio 2021.

EUGENIO, M. E. et al. Properties versus application requirements of solubilized lignins from an elm clone during different pre-treatments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 99–111, 30 jun. 2021.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 28 jul. 2010.

FAO. **FAO grapes - Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <https://mediabase.fao.org/search/grapes.html>. Acesso em: 14 jan. 2023.

FIDDLER, W. et al. Thermal decomposition of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 757–761, maio 1967.

FILIPPI, K. et al. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113578, 15 set. 2021.

NANNI, A. et al. Functionalization and use of grape stalks as poly(butylene succinate) (PBS) reinforcing fillers. **Waste Management**, v. 126, p. 538–548, 1 maio 2021.

OIV. **OIV - The distribution of the world's grapevine varieties**. Disponível em: <https://www.oiv.int/en/oiv-life/the-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties-new-oiv-study-available>. Acesso em: 2 fev. 2022.

OLADI, S.; AITA, G. M. Optimization of liquid ammonia pretreatment variables for maximum enzymatic hydrolysis yield of energy cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 122–132, 1 set. 2017.

PANG, T. et al. Lignin fractionation: Effective strategy to reduce molecule weight dependent heterogeneity for upgraded lignin valorization. **Industrial Crops and Products** Elsevier B.V., , 1 jul. 2021.

PARISI, M.; NANNI, A.; COLONNA, M. Recycling of Chrome-Tanned Leather and Its Utilization as Polymeric Materials and in Polymer-Based Composites: A Review. **Polymers 2021, Vol. 13, Page 429**, v. 13, n. 3, p. 429, 29 jan. 2021.

PAZ, A. et al. *Bacillus aryabhattai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 10, 1 out. 2016.

PEREIRA, B. et al. High yield biorefinery products from sugarcane bagasse:

Prebiotic xylooligosaccharides, cellulosic ethanol, cellulose nanofibrils and lignin nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125970, 1 dez. 2021.

PEREIRA SCARPA, J. DE C. et al. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnopus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111795, 1 dez. 2019.

PING, L. et al. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 1, p. 200–204, 1 jan. 2011.

PONNUCHAMY, V. Multiscale modeling studies for exploring lignocellulosic biomass structure. **Advanced Catalysis for Drop-in Chemicals**, p. 257–289, 1 jan. 2022.

REN, N.-Q. et al. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 92–99, 2016.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, R. et al. Vine-Shoot Waste Aqueous Extracts for Re-use in Agriculture Obtained by Different Extraction Techniques: Phenolic, Volatile, and Mineral Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 45, p. 10861–10872, 12 nov. 2014.

TEIXEIRA, A. et al. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 9, p. 15638–15678, 4 set. 2014.

THAMMASITTIRONG, S. N. R. et al. Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial Crops and Products*, v. 108, p. 598–603, 1 dez. 2017.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

YU, Q. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 210–215, 1 set. 2013.

CONCLUSÕES FINAIS

A partir da cepa de *K pneumoniae* TD 4.7 uma enzima descarboxilase de ácido ferúlico foi identificada, esta enzima foi clonada e expressa heterológamente em *E. coli*, uma vez que foi detectada sua atividade durante o crescimento bacteriano em meio contendo hidrolisado alcalino de bagaço de cana-de-açúcar indicando potenciais de aplicação biotecnológica.

Esta enzima possui pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 40°C para descarboxilação de ácido ferúlico, e sua expressão heteróloga não promoveu alterações em suas características. Observou-se baixa perda de atividade nos testes de estabilidade em diferentes faixas de pH, onde após 24 horas sob temperatura de 25°C e faixa de pH de 4 a 9, manteve aproximadamente 99%; bem como após 720 minutos de incubação a 40°C e pH 5,5, mantendo aproximadamente 80% de sua capacidade catalítica. As análises *in silico* da sequência do gene da ácido ferúlico descarboxilase demonstram um alto grau de conservação para as bactérias do gênero *Klebsiella* (identidade de sequência de 98%).

Os estudos computacionais sobre a estrutura da enzima mostraram ausência de cisteína e pontes dissulfeto, e grandes quantidades de lisina que foram observadas no homodímero a partir dos modelos gerados, o que é favorável ao uso do glutaraldeído como reticulante em futuros processos de imobilização.

Os resíduos envolvidos no ciclo catalítico são os aminoácidos Trp25 e Tyr27 necessários para a entrada e orientação adequada do substrato, e Glu134 e Asn22 participam da transferência de prótons. Ainda com ensaios computacionais verificou-se que a presença de íons Hg^{+2} interagem direta e continuamente com E134 e D22, inviabilizando a atividade enzimática.

Durante os processos extrativos com bagaço de cana de açúcar o teor de açúcares totais moveu-se na faixa de 53,8-118,5 mg L⁻¹, com os tratamentos com autoclave dando origem a extratos com teor de açúcares redutores superior ao dos extratos obtidos por aplicação ultrassônica. O conteúdo de polifenóis totais indicou maior liberação com o método de extração solido-liquido com autoclave (BCA9), liberando um total de 1225,53 mg L⁻¹, este tratamento apresentou diferença estatística significativa dos demais métodos extrativos.

Os maiores níveis de liberação de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico foram obtidos nos tratamentos convencionais em temperatura de 70°C, seguido pelo método extrativo convencional a 90°C mostrando que tratamentos extrativos mais agressivos não propiciam maior obtenção dos compostos de interesse.

Para as extrações realizadas com talo de uva a maior concentração de açúcares redutores foi de 136,54 mg L⁻¹ obtidos no tratamento com autoclave TU9, este tratamento não apresentou diferença estatísticas com relação aos tratamentos TU6 e TU8. Com relação ao teor de compostos fenólicos, maiores concentrações estão relacionadas com maiores temperaturas de extração (90 e 120 °C), não apresentando diferença significativa entre os diferentes tempos de extração (15, 30 e 60 minutos). Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico não foram obtidos nas extrações realizadas com talos de uva.

Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, provenientes de bagaço de cana de açúcar foram convertidos enzimaticamente em 4-vinilguaiaicol e 4-vinilfenol, com rendimentos de aproximadamente 43% e 55% respectivamente; com ênfase para a maior atividade enzimática sobre ácido *p*-cumárico, enfatizando a necessidade de continuidade dos estudos relacionados à atividade desta promissora enzima.

Este estudo demonstrou a possibilidade de aproveitamento da biomassa lignocelulósica como fonte de compostos com aplicação nobre nas indústrias alimentícia e cosméticas.

CONCLUSIONES FINALES

A partir de la cepa de *K. pneumoniae* TD 4.7 se identificó una enzima descarboxilasa del ácido ferúlico, esta enzima fue clonada y expresada heterológamente en *E. coli*, ya que se detectó su actividad durante el crecimiento bacteriano en medio que contenía hidrolizado alcalino de bagazo de caña de azúcar indicando posibles aplicaciones biotecnológicas.

Esta enzima tiene un pH óptimo de 5.5 y una temperatura óptima de 40 °C para la descarboxilación del ácido ferúlico, y su expresión heteróloga no promovió cambios en sus características. Se observó una baja pérdida de actividad en las pruebas de estabilidad a diferentes rangos de pH, donde luego de 24 horas a una temperatura de 25 °C y un rango de pH de 4 a 9, se mantuvo aproximadamente en un 99%; así como tras 720 minutos de incubación a 40 °C y pH 5,5, manteniendo aproximadamente el 80% de su capacidad catalítica. Los análisis *in silico* de la secuencia del gen de la descarboxilasa del ácido ferúlico demuestran un alto grado de conservación para las bacterias del género *Klebsiella* (98% de identidad de secuencia).

Los estudios computacionales sobre la estructura de la enzima mostraron la ausencia de puentes de cisteína y disulfuro, y grandes cantidades de lisina que se observaron en el homodímero de los modelos generados, lo que favorece el uso del glutaraldehído como reticulante en futuros procesos de inmovilización.

Los residuos involucrados en el ciclo catalítico son los aminoácidos Trp25 y Tyr27 necesarios para la correcta entrada y orientación del sustrato, y Glu134 y Asn22 participan en la transferencia de protones. Aún con pruebas computacionales se comprobó que la presencia de iones Hg^{+2} interactúan directa y continuamente con E134 y D22, haciendo inviable la actividad enzimática.

Durante los procesos extractivos con bagazo de caña de azúcar, el contenido de azúcares totales se movió en el rango de 53,8-118,5 mg L⁻¹, originándose los tratamientos en autoclave extractos con un contenido de azúcares reductores superior al de los extractos obtenidos por aplicación de ultrasonidos. El contenido de polifenoles totales indicó mayor liberación con el método de extracción sólido-líquido con autoclave (BCA9), liberando un total de 1225.53 mg L⁻¹, este tratamiento mostró una diferencia estadísticamente significativa con los demás métodos extractivos.

Los mayores niveles de liberación de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico se obtuvieron en los tratamientos convencionales a una temperatura de 70 °C, seguido del método extractivo convencional a 90 °C, demostrando que los tratamientos extractivos más agresivos no proporcionan una mayor obtención de los compuestos de interés.

Para las extracciones realizadas con raspón de uva, la mayor concentración de azúcares reductores fue de 136,54 mg L⁻¹ obtenida en el tratamiento autoclave TU9, este tratamiento no presentó diferencia estadística con relación a los tratamientos TU6 y TU8. En cuanto al contenido de compuestos fenólicos, mayores concentraciones se relacionan con mayores temperaturas de extracción (90 y 120 °C), sin diferencia significativa entre los diferentes tiempos de extracción (15, 30 y 60 minutos). Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico no se obtuvieron en las extracciones realizadas con raspón de uva.

Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico del bagazo de caña de azúcar se convirtieron enzimáticamente en 4-vinilguayacol y 4-vinilfenol, con rendimientos de aproximadamente 43% y 55% respectivamente; con énfasis en la mayor actividad enzimática sobre el ácido *p*-cumárico, destacando la necesidad de continuidad de estudios relacionados con la actividad de esta prometedora enzima.

Este estudio demostró la posibilidad de utilizar biomasa lignocelulósica como fuente de compuestos con noble aplicación en la industria alimentaria y cosmética.