

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 06/06/2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do
Rio Preto

MOISÉS MARTINS CHAGAS

Arabinofuranosidases: Caracterização de β -L-Arabinofuranosidase de
Chitinophaga* sp. e α -L-Arabinofuranosidase de *Pycnopus sanguineus

São José do Rio Preto - SP

2025



MOISÉS MARTINS CHAGAS

Arabinofuranosidases: Caracterização de β -L-Arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp. e α -L-Arabinofuranosidase de *Pycnoporus sanguineus*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez

Coorientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes
Coorientadora: Profa. Dra. Tatiane Iembo

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do Governo do Estado do Amazonas por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, com a concessão de bolsa de estudo.

São José do Rio Preto

2025

C433a Chagas, Moisés Martins
Arabinofuranosidas: Caracterização de β -L-Arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp. e α -L-Arabinofuranosidase de *Pycnoporus sanguineus* / Moisés Martins Chagas. -- São José do Rio Preto, 2025
130 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
Coorientadora: Eleni Gomes
Coorientadora: Tatiane Iembo

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Arabinofuranosidas. 4. *Komagataella phaffii*. 5. *Pycnoporus sanguineus*. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ARABINOFURANOSIDASES: Caracterização de β -L-Arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp. e α -L-arabinofuranosidase de *Pycnopus sanguineus*

AUTOR: MOISÉS MARTINS CHAGAS

ORIENTADOR: GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

COORIENTADORA: ELENI GOMES

COORIENTADORA: TATIANE IEMBO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ**
Data: 02/07/2025 19:22:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / UNESP/Câmpus de Jaboticabal

Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP/Câmpus de Rio Claro

Prof. Dr. GABRIEL ZAZERI (Participação Virtual)
Departamento de Física - Campus Paricarana / Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. HAMILTON CABRAL (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

São José do Rio Preto, 06 de junho de 2025

 Assinado de forma digital
por Elisandra Ramos Murgia
de Lima:41330945816
Dados: 2025.06.10 08:49:15
-03'00'

Assistente Administrativo II
Seção Técnica de Pós-Graduação

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta investigação contribui para o entendimento das propriedades e aplicações de duas L-arabinofuranosidases, uma bacteriana e outra fúngica, com capacidade hidrolítica de ligações nas quais participem beta e alfa-L-arabinofuranoses, respectivamente. O trabalho também destaca a importância de desenvolver métodos sustentáveis para a produção de enzimas que atendam às demandas da indústria moderna e permitam aproveitar de forma apropriada resíduos vegetais, dentro do conceito de biorrefinaria. O conjunto dos resultados mostra a relevância dessas enzimas na promoção de tecnologias limpas e sustentáveis.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study contributes to the understanding of the properties and applications of two L-arabinofuranosidases—one bacterial and the other fungal—capable of hydrolyzing linkages involving β - and α -L-arabinofuranose residues, respectively. The work also highlights the importance of developing sustainable methods for enzyme production that meet the demands of modern industry and enable the appropriate utilization of plant biomass residues, in alignment with the biorefinery concept. Overall, the results underscore the relevance of these enzymes in advancing clean and sustainable technologies.

Dedico este trabalho a meu pai "*In Memoriam*"

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o professor Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela oportunidade, paciência e orientação ao longo do desenvolvimento deste projeto, sendo de grande contribuição para o meu crescimento acadêmico e profissional.

As minhas coorientadoras, professoras Dra. Eleni Gomes e Dra. Tatiane lembo pela disponibilidade e auxílio durante a execução do projeto.

As professoras colaboradoras Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli e Dra. Marcela Marques de Freitas Lima, pela imensa contribuição nas análises de docking e dinâmica molecular.

Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática da USP, em especial o professor Dr. Hamilton Cabral, Nathália Garzon, Flávio Simões, Camila Langer, Isabela Amatto e Murilo Rosa pela estadia, receptividade e compartilhamento de conhecimento auxiliando nas primeiras etapas do projeto.

Aos meus colegas do programa de pós graduação, em especial a Lara Biancheti, Camila Furbino, Cintia Lionela, Dayla Bott, Carolina Gismene, Isabelle Lima, Vitória Navarrete, Vinicius Vidotto, Rafael Barreto, Emanuella Ribeiro, Isabella Bortolato, Erick Cancelli, Guilherme Sacco e Larissa Oliveira pela disponibilidade, convivência, ensinamento e amizade aos longos desses quatro anos de doutorado.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Jéssica Zanoni, Matheus Toneti, Guilherme de Paula Pretto, Izabela Karolina Costa Zilli, Pedro Henrique Gomes, Giulia Dinis, Maria Julia Corrêa e Marina Denois, por todo conhecimento compartilhado, amizade, disponibilidade e contribuição de forma direta e indireta durante todo o período deste projeto.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, que colaboraram pela disseminação de conhecimento e apoio em diversas etapas deste pós-graduando, contribuindo de maneira indireta na execução deste projeto.

A professora Dra. Angela Lehmkuhl pelo encorajamento ao mundo da microbiologia durante a graduação, aceitado me orientar na iniciação científica. E ao Professor Dr. Alexandre Tonin pela contribuição durante o Mestrado.

A minha família, meus irmãos, mas principalmente aos meus pais Reinaldo (*in memoriam*) e Izabel, pela compreensão, apoio e incentivo a minha jornada acadêmica.

Aos amigos Roberto Fernandes Costa e Silva, José Alberto de Almeida Junior, Vivianne Leal, Daniellen Carneiro, Manoel Pantoja, Armanda Pessoa pela amizade, rede de apoio e carinho ao longo da vida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - nº 012/2021 (período de maio de 2022 a fevereiro de 2025).

“Quando um microbiologista morre, seus microrganismos pessoais perdem o único universo que os observava – e ganham liberdade”

(Autor desconhecido).

RESUMO

O presente trabalho destaca a relevância das arabinofuranosidases, que são enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas de arabinofuranos, contribuindo para o aproveitamento eficiente da biomassa vegetal, sendo dividido em três partes: uma Introdução geral e dois capítulos. A introdução faz um levantamento bibliográfico sobre alfa e beta-L-arabinofuranosidases, as famílias GH às quais elas pertencem, aspectos estruturais e o mecanismo de ação, servindo como material inicial para a exploração da β -L-arabinofuranosidase da bactéria *Chitinophaga* sp. descrita no Capítulo 1, e da α -L-arabinofuranosidase do fungo *Pycnoporus sanguineus* abordada no Capítulo 2. No primeiro Capítulo, é apresentado um conjunto de dados sobre a estrutura e a função da β -L-arabinofuranosidase pertencente à família GH127, incluindo a descrição da sua mecânica de ação e a importância da atividade enzimática para processos industriais. São discutidos métodos de clonagem e expressão heteróloga de uma enzima de *Chitinophaga* sp. em *Komagataella phaffii*, e análises preliminares *in silico* que incluem a predição computacional da sua estrutura tridimensional por AlphaFold, em comparação com uma enzima da mesma família, porém descoberta em *Bifidobacterium longum*, e dinâmica molecular. No Capítulo 2, a investigação se refere a uma α -L-arabinofuranosidase fúngica, onde são relatados os métodos utilizados para o cultivo de diversas espécies de fungos (*Myceliophthora heterothallica*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Phebia* sp, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medula-panis*), o ensaio de atividade usando substrato sintético pNPAf, a purificação da enzima de *Pycnoporus sanguineus* por cromatografias de exclusão molecular e troca iônica. A produção da enzima mostrou estabilização após o quarto dia de cultivo, pH ótimo na faixa ácida, de 3,0 a 5,0. A temperatura ótima foi de 50 °C, mantendo a atividade até 60 minutos quando incubada a 60 °C, porém mostrando queda acima dessa temperatura. O efeito de cátions não mostrou nenhum capaz de aumentar a atividade, porém na presença de manganês houve uma diminuição significativa da atividade, superior a 50%. Diversas substâncias químicas foram testadas em 10 e 50 mmol L⁻¹, mostrando efeitos inibitórios particularmente SDS nas duas concentrações, e DTT na maior concentração. Compostos fenólicos não induziram inibição significativa, e chama a atenção o aumento da atividade na presença de ácido ferúlico. Foi também feita a análise cinética da enzima, mostrando que o comportamento não é compatível com o de uma enzima michaeliana, e sim alostérica, cooperativa. O melhor ajuste para os parâmetros de V_{max} e K_m mostrou 0,33 μ mol min⁻¹ e 1,32 mmol L⁻¹ respectivamente, com uma cooperatividade de 1,65. Esse valor de cooperatividade é semelhante ao reportado para a glicocinase (1,7). Ambas as enzimas, β -L-arabinofuranosidase e α -L-arabinofuranosidase, apresentam potencial significativo para aplicações biotecnológicas, especialmente em processos de bioconversão de resíduos vegetais em produtos de valor agregado.

Palavras-chave: Arabinofuranosidases; α -L-arabinofuranosidase; β -L-arabinofuranosidase; GH127

ABSTRACT

This work highlights the relevance of arabinofuranosidases, enzymes capable of hydrolyzing glycosidic bonds in arabinofuranose residues, thereby contributing to the efficient utilization of plant biomass. It is divided into three parts: a general introduction and two chapters. The introduction presents a literature review on α - and β -L-arabinofuranosidases, the glycoside hydrolase (GH) families to which they belong, their structural features, and mechanisms of action. This section serves as a foundation for the exploration of the β -L-arabinofuranosidase from the bacterium *Chitinophaga* sp., described in Chapter 1, and the α -L-arabinofuranosidase from the fungus *Pycnoporus sanguineus*, addressed in Chapter 2. Chapter 1 presents a set of data on the structure and function of the β -L-arabinofuranosidase belonging to GH family 127, including its mechanism of action and the industrial relevance of its enzymatic activity. It discusses cloning and heterologous expression methods of a *Chitinophaga* sp. enzyme in *Komagataella phaffii*, as well as preliminary *in silico* analyses. These include computational prediction of its three-dimensional structure using AlphaFold, in comparison to a homologous enzyme from *Bifidobacterium longum*, and molecular dynamics simulations. Chapter 2 investigates a fungal α -L-arabinofuranosidase, detailing the cultivation methods for several fungal species (*Myceliophthora heterothallica*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Phebia* sp., *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune*, and *Perenniporia medullaripanis*), the enzymatic activity assay using the synthetic substrate pNPAf, and the purification of the enzyme from *Pycnoporus sanguineus* by size-exclusion and ion-exchange chromatography. The enzyme production stabilized after the fourth day of cultivation. The optimum pH was in the acidic range, between 3.0 and 5.0. The optimum temperature was 50 °C, with activity maintained for up to 60 minutes at 60 °C, but decreasing at higher temperatures. Cation analysis revealed no enhancement in activity by any tested ions; however, manganese caused a significant decrease, reducing activity by over 50%. Various chemical substances were tested at concentrations of 10 and 50 mmol L⁻¹, revealing inhibitory effects—particularly SDS at both concentrations, and DTT at the higher concentration. Phenolic compounds did not significantly inhibit the enzyme, and an increase in activity was observed in the presence of ferulic acid. Kinetic analysis indicated that the enzyme does not follow classic Michaelis-Menten behavior but rather exhibits allosteric cooperative kinetics. The best-fit parameters for $V_{\max}$ and K_m were 0.33 $\mu\text{mol min}^{-1}$ and 1.32 mmol L⁻¹, respectively, with a Hill coefficient of 1.65, comparable to that of glucokinase (1.7). Both enzymes, β -L-arabinofuranosidase and α -L-arabinofuranosidase, demonstrate significant potential for biotechnological applications, particularly in the bioconversion of plant residues into value-added products.

Keywords: Arabinofuranosidases; α -L-arabinofuranosidase; β -L-arabinofuranosidase; GH127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos componentes da lignocelulose.	19
Figura 2 - Estruturas da L-arabinose.....	21
Figura 3 - Variantes de arabinogalactanas (AG).	23
Figura 4 - Mecanismos de glicosil hidrolases.....	26
Figura 5 - Mecanismo catalítico de duplo deslocamento das GH de retenção. O monossacarídeo à esquerda representa o resíduo -1, e o representado pela letra R, o resíduo +1, tendo como referência a ligação a ser hidrolisada.....	27
Figura 6 - Substratos naturais sobre os quais tem ação hidrolítica <i>in vitro</i> a β -L-Arafase de <i>B. longum</i>	28
Figura 7 - Estrutura da matriz lignocelulósica.	17
Figura 8 - Alterações para desenho do gene sintético.	26
Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pGAPZ α A_CB10_2.116.....	28
Figura 10 - Comparação da sequência de aminoácidos obtida com sequências disponíveis no banco de dados GenBank NCBI, indicando que a proteína pertence à família GH127.....	32
Figura 11 - Análise dos sítios de restrição encontrados na sequência de nucleotídeos isolada (Nebcutter V.3).	33
Figura 12 - Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido no presente estudo (Signal P 5.0).	34
Figura 13 - Estrutura terciária da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp. CB10_2.116, modelada pela IA RoseTTaFold (Washington University), representada pelo programa VMD (University of Illinois at Urbana Champaign) em duas diferentes perspectivas.	35
Figura 14 - Estrutura tridimensional (3D) prevista da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp. A estrutura apresenta His-tag (em vermelho) e o sítio ativo (em verde) foram modelados usando o software de IA RoseTTaFold (Universidade de Washington), representados sobrepostos no programa VMD (Universidade de Illinois).	35
Figura 15 - Proteína com cauda (em amarelo) e sem cauda His (em azul) modelada pelo software de IA RoseTTaFold (Washington University), representada pelo programa VMD (University of Illinois at Urbana Champaign).	36
Figura 16 - Raio de giro (hidrodinâmico) da proteína com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.....	37

Figura 17 - RMSD da β -L-Arafase com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.....	38
Figura 18 - RMSF da β -L-Arafase com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.....	38
Figura 19 - Análise da estrutura secundária da β -L-Arafase com e sem His-tag ao longo de 180 ns nas temperaturas a) 30 °C, b) 50 °C, c) 70 °C, d) 90 °C.	39
Figura 20 - Colônias de <i>E. coli</i> e <i>K. phaffi</i> em meio seletivo após transformação. ...	40
Figura 21 - Produto de amplificação obtido após PCR de colônias: Marcador Molecular (MM) Gene Ruler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific.	40
Figura 22 - Resíduos do sítio ativo da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp. Os resíduos C313, C379 e C380 (amarelo), E292 e E311 (vermelho), e H243 (azul). A esfera cinza representa o átomo de zinco.....	42
Figura 23 - Dímero previsto por análise <i>in silico</i> para a β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp.	43
Figura 24. Docagem do substrato Ara ₃ -Hyp no sítio ativo da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp., analisado desde duas perspectivas.	44
Figura 25. Análise de deformação do dímero da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp. analisada pela ferramenta DynaMut.....	46
Figura 26. Análise de flutuação atômica do dímero da β -L-Arafase de <i>Chitinophaga</i> sp. analisada pela ferramenta DynaMut.	46
Figura 27 - Atividades enzimáticas associadas à hidrólise do arabinano. As endoarabinonanases clivam as ligações α -1,5 entre os resíduos de arabinose da cadeia principal. As α -L-Arafases liberam monômeros de arabinose pela clivagem de resíduos ligados α -1,2, α -1,3, ou α -1,5 da extremidade não redutora.....	61
Figura 28 - Fungo <i>P. sanguineus</i> na natureza.....	63
Figura 29 - Curva de produção da enzima α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> em farelo de trigo.	73
Figura 30 – Perfil de proteínas da produção da enzima α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> analisado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).	74
Figura 31 - Perfil de proteínas e atividade da cromatografia de exclusão molecular do extrato de <i>P. sanguineus</i> em resina Sephadex G-75.	75
Figura 32 - Perfil de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) do material proveniente da cromatografia de exclusão molecular.	76

Figura 33 - Efeito do pH na α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	77
Figura 34 - Estabilidade da atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> em relação ao pH. Comparação no tempo inicial e após 24 horas em cada pH.....	78
Figura 35 - Efeito da temperatura na α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> , em incubação de 10 minutos.....	79
Figura 36 - Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	80
Figura 37 - gráfico de Arrhenius de primeira ordem para cálculo da energia de ativação da desnaturação, $E_{a(D)}$ da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	81
Figura 38 - Gráfico de Arrhenius.	83
Figura 39 - Estabilidade térmica da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	84
Figura 40 - Efeito de cátions sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> ...	85
Figura 41 - Efeito de diversas substâncias químicas (concentração final de 10 mmol L ⁻¹) sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	86
Figura 42 - Efeito de diversas substâncias químicas (concentração final de 50 mmol L ⁻¹) sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	87
Figura 43 - Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> , concentração final de 10 mmol L ⁻¹	88
Figura 44 - Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i>	89
Figura 45 - Gráfico de Michaelis-Menten da α -L-Arafase de <i>P. sanguineus</i> . São mostrados os valores médios e D.P. de três réplicas, e os ajustes às equações de Michaelis-Menten (curva vermelha) e de Hill (curva azul.)	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de composição percentual de lignocelulose em algumas fontes de biomassa.....	19
Tabela 3 - Classificação Internacional de enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).	60
Tabela 4 - Parâmetros para cultivo e produção de α -L-Arafase de fungos.....	66
Tabela 5 – Testes de atividade de α -L-Arafases secretadas de diversas espécies de fungos cultivadas em meios contendo farelo de trigo, farelo de laranja e combinação com bagaço de cana-de-açúcar.....	72
Tabela 6 - Cinética e parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica da α -L-arabinofuranosidase de <i>P. sanguineus</i>	81
Tabela 7 - Energia de ativação da enzima e o coeficiente térmico Q_{10}	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGs	Arabinogalactanas tipo I
AGPs	Arabinogalactanas tipo II
AI	Inteligência artificial (<i>Artificial Intelligence</i>)
Arafase	Arabinofuranosidase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada (<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>)
BLAST	Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
C(número)	Resíduo de Cisteína e o número na sequência polipeptídica
CAZy	Enzimas ativas em carboidratos (<i>Carbohydrate Active Enzymes</i>)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.P.	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
E(número)	Resíduo de glutamato e o número na sequência polipeptídica
<i>Ensemble</i> NVT	Conjunto canônico (Partículas, Volume e Temperatura)
GH	Glicosil Hidrolase
H(número)	Resíduo de Histidina e o número na sequência polipeptídica
HRGPs	Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina
Hyp	Hidroxiprolina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactanopiranosídeo
LB	Meio de cultura Luria Bertani
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
nm	nanômetros
O.D.	Densidade ótica (<i>Optical Density</i>)
pNP Af	p-nitrofenil-furanosídeo (substrato sintético)
R _g	Raio de giro de uma molécula

RG-I	Ramnogalacturonana I
RG-II	Ramnogalacturonana II
RMSF	Flutuação Quadrática Média (<i>Root Mean Square Fluctuation</i>)
RMSD	Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPC	Carga pontual simples (<i>Simple Point Charge</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
YPD	Meio de cultura Dextrose de Peptonas de Levedura (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO GERAL	18
I. 1	ESTRUTURA DA PAREDE VEGETAL	18
I. 2	DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL E SUBPRODUTOS QUÍMICOS	20
I. 3	ALFA E BETA ARABINOFURANOSÍDEOS	21
A.	B-L-ARABINOFURANOSIDASES	22
B.	MECANISMO E FUNÇÃO DAS ENZIMAS B-ARAFASES	25
C.	AS B-ARAFASES DE <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i>	27
D.	A-L-ARABINOFURANOSIDASES	29
II	DESCRIÇÃO GERAL DO TRABALHO DESENVOLVIDO	35
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	36
	SEÇÃO I	41
	Análises <i>in silico</i> , clonagem e expressão de beta-L-arabinofuranosidase de <i>Chitinophaga</i> sp.	41
1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL ...	17
1.2	O GÊNERO <i>CHITINOPHAGA</i> SP	18
1.3	DETERMINAÇÃO E PREDIÇÃO DAS ESTRUTURAS	19
1.4	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	20
1.5	<i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i>	21
1.6	VETORES DE EXPRESSÃO	23
1.7	PRODUÇÃO DE ARABINOFURANOSIDASES RECOMBINANTES	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	GERAL	25
2.2	ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DE β -L-ARAFASE	26
3.2	PREDIÇÃO DA ESTRUTURA POR ANÁLISES COMPUTACIONAIS ..	27
3.3	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE β -L-ARAFASE EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> (DH10 β) E <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i> (X33)	27
3.3.1	VETOR DE EXPRESSÃO	27
3.3.2	TRANSFORMAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> COM O PLASMÍDEO ..	28
3.3.3	PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	29

3.3.4	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	29
3.3.5	TRANSFORMAÇÃO DE <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i> COM O PLASMÍDEO.....	30
3.3.6	ENSAIOS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	31
3.3.7	ANÁLISE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA β -L-ARAFASE HETERÓLOGA DA BACTÉRIA <i>CHITINOPHAGA</i> SP. CB10_2.116. PARA PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA ARAFASE RECOMBINANTE.....	32
4.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	34
4.3	PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	34
4.4	PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA.....	36
4.5	OBTENÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFORMAÇÃO.....	39
4.6	COMPARAÇÃO PRELIMINAR COM A β -L-ARAFASE DE <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i>	41
5	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	SEÇÃO II.....	56
	Triagem de alfa-L-arabinofuranosidase em fungos filamentosos e caracterização bioquímica da enzima do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	56
1	INTRODUÇÃO	57
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	59
2.1	GLICOSÍDEO HIDROLASES.....	59
2.2	α -L-ARABINOFURANOSIDASES.....	60
2.3	<i>PYCNOPORUS SANGUINEUS</i>	62
3	OBJETIVOS	65
3.1	GERAL.....	65
3.2	ESPECÍFICO	65
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1	PARÂMETROS DE CULTIVO DE FUNGOS	66
4.2	PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	66
4.3	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	67
4.4	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA.....	67

4.5	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	68
4.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA A-L-ARAFASE.....	68
4.6.1	Determinação de pH ótimo.....	68
4.6.2	Determinação de temperatura ótima	69
4.6.3	Cinética enzimática.....	69
4.6.4	Análise de estabilidade em relação ao pH.....	69
4.6.5	Análise de estabilidade térmica	69
4.6.6	Análise de desnaturação térmica irreversível	69
4.6.7	Efeito de íons metálicos.....	71
4.6.8	Efeito de substâncias químicas	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	PRODUÇÃO DE A-L-ARAFASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SEMI-SÓLIDO	72
5.2	TEMPO DE CULTIVO	73
5.3	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA SECRETADA POR <i>P. SANGUINEUS</i>	74
5.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL	76
5.4.1	Efeito de pH na atividade.....	76
5.4.2	Efeito de estabilidade de pH na atividade.....	77
5.4.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima.....	78
5.4.4	Efeito da desnaturação irreversível.....	83
5.4.5	Efeito de íons na atividade da α -l-arafase	84
5.4.6	Efeito de solventes na atividade.....	85
5.4.7	Efeito de fenólicos na atividade.....	88
5.4.8	Efeito da concentração de NaCl na atividade	89
5.4.9	Cinética enzimática.....	89
6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

I INTRODUÇÃO GERAL

I.1 ESTRUTURA DA PAREDE VEGETAL

Desenvolvida ao longo de milhões de anos de evolução, a parede celular vegetal, uma estrutura complexa e dinâmica, facilita as conexões entre células, controla o formato celular, oferece suporte mecânico para o crescimento, e atua como uma barreira contra patógenos. Os elementos principais da parede vegetal são a celulose, a hemicelulose, a pectina e a lignina, sendo os carboidratos mais de 90% dos componentes. O caráter dinâmico necessário para compatibilizar as necessidades do vegetal é garantido por poros, canais e receptores, que permitem a movimentação iônica e molecular e respostas fisiológicas (HOUSTON et al., 2016; ZHANG et al., 2021).

O componente que em muitas fontes é o mais prevalente, a celulose, é um polímero linear de unidades de β -glicopirranose ligadas por ligações 1 $\rightarrow$ 4, formando longas microfibrilas estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e interfibrilas, proporcionando resistência à tração (SOMERVILLE et al., 2004).

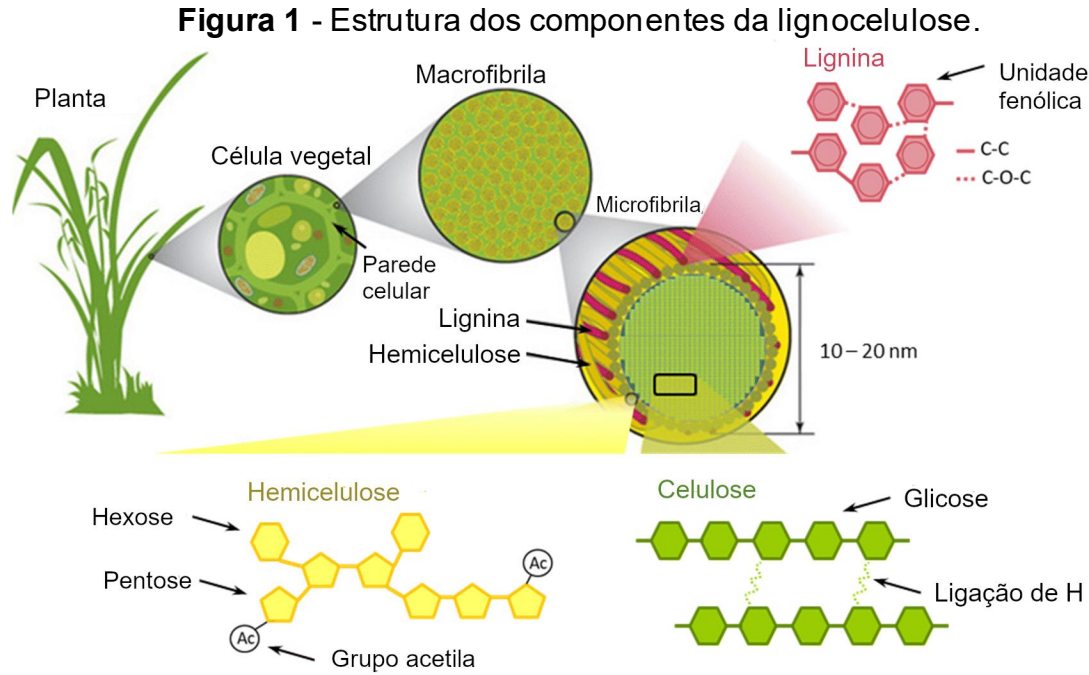
Esta fração tem sido objeto de estudos há décadas no sentido de possibilitar a produção do denominado etanol de segunda geração (E2G) para uso como combustível automotivo, o que permitiria aumentar a sua produção sem incrementar a área cultivada (MEDEIROS et al., 2023).

A lignina está predominantemente presente nas paredes celulares secundárias, e é um polímero aromático complexo que confere rigidez e hidrofobicidade à parede, aumentando sua resistência ao estresse mecânico e ao ataque microbiano (BOERJAN et al., 2003).

A pectina é um componente essencial na adesão celular e na porosidade da parede, sendo uma matriz em forma de gel composta por polissacarídeos ricos em ácido galacturônico. Embora represente uma parcela menor da biomassa lignocelulósica em relação à celulose e à hemicelulose, a pectina tem uma função crucial na ligação celular, na porosidade e na hidratação das membranas celulares (WILLATS et al., 2001).

Por último, a hemicelulose possui uma composição específica que varia conforme a espécie vegetal e o tipo de tecido. No entanto, os monossacarídeos predominantes nas hemiceluloses são: D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose e ácidos urônicos (como ácido glucurônico e 4-O-metilglucurônico). Tais

resíduos participam de diversos polissacarídeos que constituem a hemicelulose, tais como xilanas, mananas, galactanas, glucanas e arabinoxilanas. Neste último caso temos cadeias de xilose e ramificações com arabinose (EBRINGEROVÁ et al., 2005; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; CANILHA et al., 2013). A figura 1 mostra os seus componentes.



Fonte: Modificado de Brienza et al., 2024.

A composição dos elementos estruturais varia conforme a espécie da planta (monocotiledônea ou dicotiledônea), o tipo celular (primário ou secundário) e a fase de desenvolvimento. Os valores médios para exemplos de biomassa são mostrados na tabela 1, na qual não são mostrados os valores para a pectina, por serem muito variáveis e minoritários.

Tabela 1 - Exemplos de composição percentual de lignocelulose em algumas fontes de biomassa

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Gramma	5-20	30-50	10-40
Espiga de milho	42-45	35-39	14-15
Palha de milho	38-40	24-26	7-19
Bagaço de cana	42-48	19-25	20-42
Palha de arroz	28-36	23-28	12-14
Palha de trigo	33-38	26-32	17-19
Casca de arroz	25-35	18-21	26-31

Fonte: adaptado de Rajendran et al., 2018.

I.2 DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL E SUBPRODUTOS QUÍMICOS

Diversas substâncias químicas benéficas, algumas de elevado valor agregado, podem ser liberadas quando os componentes da parede celular vegetal se degradam quimicamente, enzimaticamente ou microbiologicamente. Essas aplicações sustentam o conceito de biorrefinaria, que busca transformar biomassa em uma variedade de produtos comerciais e fontes de energia, promovendo assim o desenvolvimento sustentável e iniciativas de economia circular (CHERUBINI, 2010). Por exemplo, a celulose libera unidades de glicose que podem ser utilizadas como substrato para a obtenção de bioplásticos por processos fermentativos (PALANISAMY et al., 2024), como adoçante e para a produção de bioetanol (SARKAR et al., 2012), oligossacarídeos, entre eles a celobiose, podem agir como prebióticos (Da SILVA et al., 2025), e a glicose também pode ser utilizada para a obtenção de ácido levulínico e hidroximetilfurfural (HMF), utilizáveis pelas indústria química e farmacêutica (BOZELL; PETERSEN, 2010).

A pectina libera o seu constituinte principal, galacturonato, bem como oligogalacturonídeos (OGs), arabinose, galactose e ramnose. O galacturonato tem aplicações na produção de bioplásticos, na indústria de alimentos como gelificante, estabilizante, quelante e regulador de pH (VORAGEN et al., 2009; SUROLIA; SINGH, 2024). Oligogalacturonídeos desempenham várias ações relevantes em vegetais, tais como proteção contra patógenos, cicatrização, estímulo do crescimento e da germinação (RIDLEY et al., 2001; SILVA-SANZANA et al., 2022), e ainda agem como prebióticos (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2023). Já os monossacarídeos liberados e antes citados têm diversas aplicações na indústria de alimentos, biotecnologia, aplicações biomédicas etc.

A lignina tem sido convertida em diversos bioprodutos úteis com o uso de microrganismos. Por exemplo, certos microrganismos podem produzir lipídios, compostos aromáticos como a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), ácidos dicarboxílicos como o ácido cis-mucônico e polihidroxialcanoatos (PHAs) (ZHAO et al., 2022). Compostos fenólicos derivados da lignina podem ser usados como precursores de aromatizantes, fragrâncias e bioplásticos, incluindo guaiacol, siringaldeído e vanilina, e monômeros aromáticos podem ser usados na produção de polímeros, resinas e combustíveis (RAGAUSKAS et al., 2014).

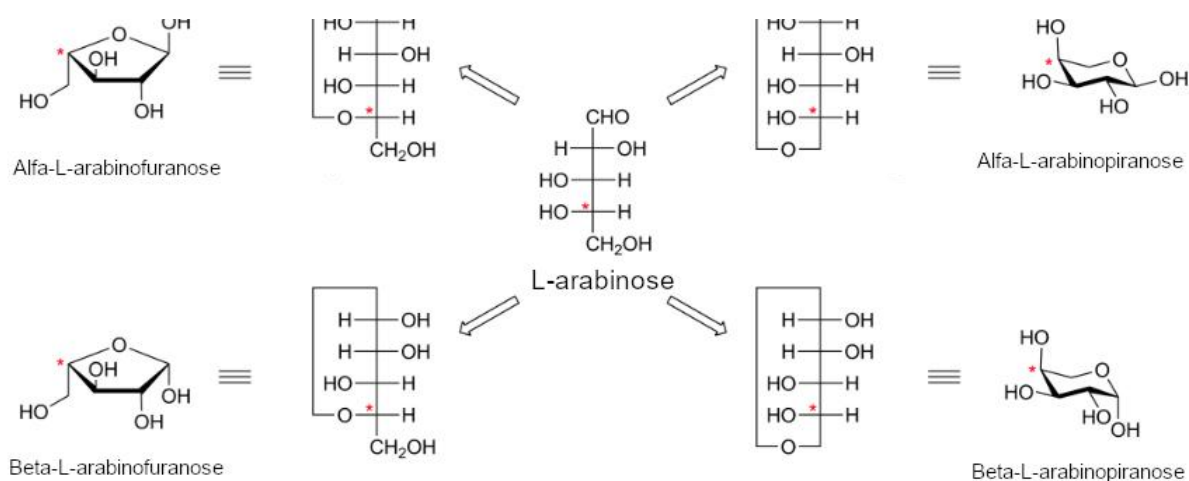
No caso dos produtos da degradação da hemicelulose, são liberados furfural, xilose e arabinose (pentoses), xilo-oligossacarídeos (XOS) (PARVULESCU et al., 2018), e esses derivados permitem a produção ou obtenção de resinas, solventes, fibras sintéticas, probióticos, xilitol, ácido ferúlico etc. (OU; KWOK, 2004; DELBECQ et al., 2018).

I. 3 ALFA E BETA ARABINOFURANOSÍDEOS

A L-arabinose (L-Ara) é uma aldopentose vegetal presente na parede celular, constituindo até 5-10% dos carboidratos em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e arroz (*Oryza sativa*). Embora a forma de anel hexagonal ou piranósica (L-Arap) seja mais estável em solução, a forma pentagonal ou furanósica (L-Araf) predomina amplamente na parede vegetal. A L-Ara é sintetizada no aparelho de Golgi como UDP-L-Arap a partir de UDP-Xilose por UDP-Xilose 4-epimerases (UXEs) por epimerização no C-4 do UDP-Xilose (Kotake et al., 2016).

A figura 2 mostra as estruturas furanósica e piranósica da L-arabinose, nas projeções de Fischer e de Haworth. Nesta última, as formas alfa e beta, com a hidroxila heterosídica respectivamente acima e abaixo do plano do anel no carbono do hemiacetal ou anomérico (C1).

Figura 2 - Estruturas da L-arabinose



Fonte: Adaptado de Withers, 2014

α - e β -L-arabinofuranosídeos são blocos de construção essenciais de diferentes glicoproteínas e polissacarídeos da parede celular em plantas, contribuindo para a complexidade estrutural e a funcionalidade da parede celular.

Em relação aos alfa-arabinofuranosídeos, o tipo mais comum, temos sua ocorrência em quatro grupos principais:

a) O arabinano péctico, uma cadeia lateral da ramnogalacturonana I (RG-I) presente na pectina, é composto principalmente por resíduos de α -L-arabinofuranosídeos ligados por ligações α -1,5. Esta é a principal fonte de α -L-arabinofuranosídeos.

b) Arabinogalactanas tipo I (AGs), que também estão ligadas à RG-I, apresentam unidades terminais não redutoras com resíduos de α -L-arabinofuranose.

c) Arabinoxilanos: resíduos de α -L-arabinofuranose estão ligados à cadeia principal de β -1,4-xilana em gramíneas e cereais por ligações α -1,2 e/ou α -1,3.

d) A matriz extracelular das plantas contém proteoglicanos chamados proteínas arabinogalactanas tipo II (AGPs), que possuem porções de carboidratos ricas em resíduos de α -L-arabinofuranosídeo.

Por outro lado, os β -L-Arabinofuranosídeos são encontrados em:

a) Ramnogalacturonana II (RG-II), um polissacarídeo péctico complexo que contém resíduos de β -L-arabinofuranosil entre outros açúcares, embora sejam menos frequentes.

b) Extensinas: Glicoproteínas da parede celular ricas em hidroxiprolina que contêm resíduos de β -L-arabinofuranosídeo em suas cadeias de glicanos (KOTAKE et al., 2016).

Em relação às enzimas que degradam polímeros contendo alfa e beta-arabinofuranos, nos capítulos 1 e 2 serão analisadas uma β -L-arabinofuranosidase bacteriana de *Chitinophaga* sp. E uma α -L-arabinofuranosidase fúngica, de *Pycnoporus sanguineus*.

A. β -L-ARABINOFURANOSIDASES

As enzimas chamadas β -L-Arabinofuranosidases, ou abreviadamente β -Arafases, são essenciais para a degradação de polissacarídeos vegetais, especialmente aqueles que incluem β -L-arabinofuranosídeos, presentes em uma variedade de polissacarídeos vegetais, como proteínas AGPs, extensinas, lectinas de solanáceas, arabinanas e ramnogalacturonano-II. Essas substâncias são essenciais

Cadeias complexas de açúcares do ramnagalacturonano-II (RG-II) na pectina de uvas vermelhas contém resíduos terminais de Arabinofuranose ligados por β 1,2 e β 1,5 (PELLERIN et al., 1996). Além disso, em sementes de quinoa, na beterraba açucareira, em batatas etc., diferentes polissacarídeos vegetais contém estruturas terminais de Araf- β 1,3-Araf- α 1 (WEFERS et al., 2017). As cadeias laterais de arabinofuranose ligadas por β 1,2 e β 1,3, encontradas no arabinano ramificado da beterraba açucareira, são degradadas pelo gene BT0349 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (LUIS et al., 2018).

O microbioma intestinal humano depende dessas enzimas, que pertencem às famílias de hidrolases de glicosídeos (GH) GH127 e GH146, para decompor carboidratos complexos provenientes das fibras alimentares. Essas enzimas facilitam a degradação de carboidratos complexos em açúcares mais simples, favorecendo o crescimento da microbiota intestinal benéfica. Por exemplo, *Bifidobacterium longum* utiliza β -L-Arafases para degradar arabinooligossacarídeos, promovendo a saúde intestinal (FUJITA et al., 2014). Compreender esse mecanismo pode auxiliar no desenvolvimento de prebióticos direcionados para manter um microbioma saudável na ecologia microbiana.

A variedade de enzimas degradadoras de carboidratos do microbioma intestinal, como as β -L-Arafases, destaca a capacidade dessas comunidades microbianas de se adaptarem a diferentes dietas. Investigações metagenômicas identificaram inúmeras dessas enzimas, permitindo a degradação de uma ampla variedade de polissacarídeos. Esse repertório enzimático é essencial para a fermentação de carboidratos complexos em ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), que fornecem energia para as células do cólon e trazem benefícios para a saúde sistêmica (GONG et al., 2020).

Além disso, a homeostase intestinal é significativamente mantida pelas interações cooperativas entre diferentes espécies microbianas, possibilitadas por enzimas como as β -L-Arafases. Para que as bactérias intestinais decomponham eficientemente as fibras alimentares, a capacidade das β -L-Arafases de eliminar açúcares terminais modificados mostrou ser crucial (FUJITA et al., 2024b). Uma ecologia microbiana equilibrada depende dos mecanismos de alimentação cruzada, nos quais os produtos metabólicos de uma espécie servem como substratos para outra (XIAO et al., 2024).

B. MECANISMO E FUNÇÃO DAS ENZIMAS β -ARAFASES

As β -Arafases auxiliam os microrganismos intestinais na degradação das fibras alimentares, hidrolisando β -L-arabinofuranosídeos de polissacarídeos de origem vegetal (FUJITA et al., 2024a). Essas enzimas são altamente específicas; por exemplo, a BII3HypBA1 de *B. longum* é classificada como β 1,3-específica, demonstrando a diversidade no reconhecimento de substratos entre as β -Arafases (FUJITA et al., 2024b).

Têm sido descritas também enzimas bimodulares com atividade β -Arafase/ β -glucuronidase (cliva L-Araf- β -1,2-L-Rha) na família GH137 (*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482), Hidrolase bimodular de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-lixo-heptulosárico (Dha) / β -L-Arafase (cliva L-Araf- β -1,5-D-Dha) nas GH142 e 143, também de *bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, e as restantes na família GH146, por exemplo em *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217, *Caldanaerobius polysaccharolyticus* ATCC BAA-17, *Fusarium oxysporum* 12S e *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (CAZY, 2025). Na GH146 tem β -Arafases caracterizadas como capazes de clivar ligações β -1,3 ou β -1,2.

Elas diferem de outras hidrolases de glicosídeos por possuírem mecanismos catalíticos distintos que utilizam resíduos de cisteína coordenados por zinco (BORLANDELLI et al., 2023).

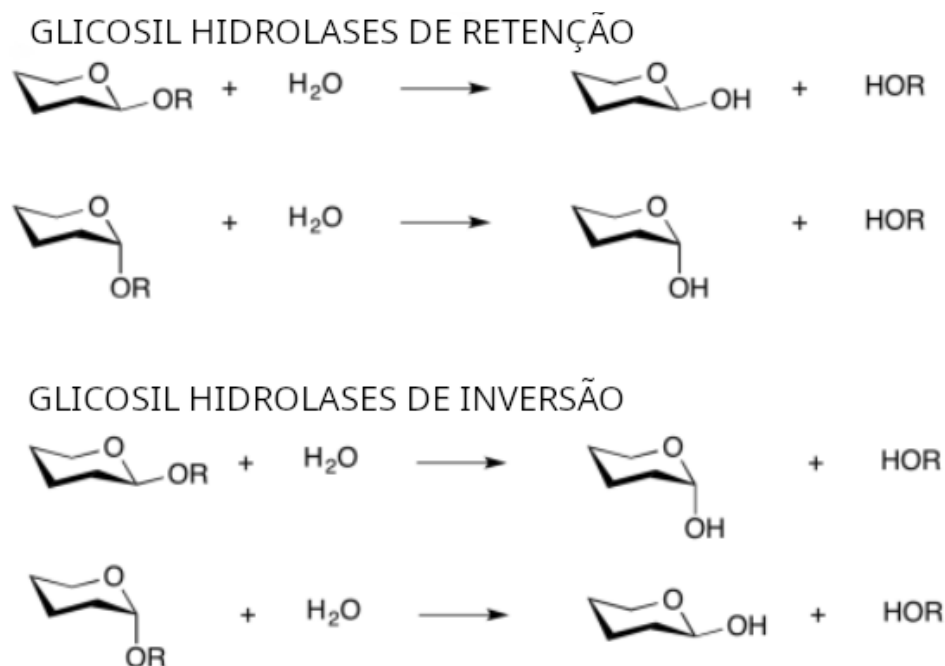
Investigações estruturais indicam que as β -Arafases da GH 127 e 146 possuem uma estrutura única em barril (α/α)₆, essencial para sua atividade enzimática, e, como veremos, os mesmos resíduos catalíticos (CAZY, 2025). A primeira enzima classificada nessa família foi a HypBA1 de *B. longum* JCM 1217 (FUJITA et al., 2011), capaz de liberar L-arabinose de dissacarídeos L-arabinofuranose (Araf)- β 1,2-Araf, expressa a partir de um gene da família de proteínas Pfam DUF1680.

Na família GH146 foi proposto que o nucleófilo catalítico e os resíduos de ácido/base geral da BT0349 de *Bacteroides thetaiotaomicron* sejam compostos por Cys414 e Glu318, respectivamente (CAZY, 2025), enquanto na β -L-Arafase HypBA1 de *B. longum* são a Cys 417 e Glu322, nos mesmos papéis (ITO et al., 2014).

O mecanismo de hidrólise para as duas famílias é idêntico, sendo ácido/básico e de retenção, ou seja, a configuração original do carbono anomérico da ligação glicosídica é mantido, neste caso, como o anômero beta (ARDÈVOL; ROVIRA, 2015).

A Figura 4 mostra a diferença entre GH de retenção e de inversão. As primeiras mantêm a configuração da hidroxila no carbono 1 (anomérico) após a hidrólise da ligação glicosídica, enquanto as segundas a invertem.

Figura 4 - Mecanismos de glicosil hidrolases.

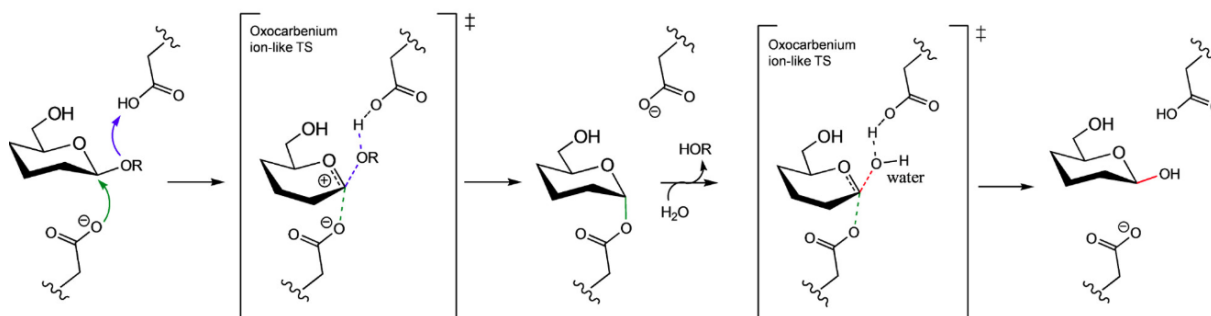


Fonte: Adaptado de Withers; Williams, 2025.

Na estrutura cristalizada da β -L-Araf de *B. longum*, o sítio ativo da HypBA1 é parcialmente coberto por uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*), sugerindo que a atividade da enzima é regulada de maneira complexa (FUJITA et al., 2024a).

O mecanismo de retenção (Figura 5) envolve a base (parte inferior da figura, seria a Cisteína) fornecendo ajuda nucleofílica para a saída da aglicona, enquanto o catalisador ácido (parte superior da figura, o Glutamato) protona o oxigênio glicosídico. Uma molécula de água hidrolisa a glicosil enzima resultante, e o produto dessa segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico mantém a estereoquímica do substrato. Os estados de transição envolvem um oxocarbênio (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

Figura 5 - Mecanismo catalítico de duplo deslocamento das GH de retenção. O monossacarídeo à esquerda representa o resíduo -1, e o representado pela letra R, o resíduo +1, tendo como referência a ligação a ser hidrolisada.



Fonte: Adaptado de Ardèvol; Rovira, 2015.

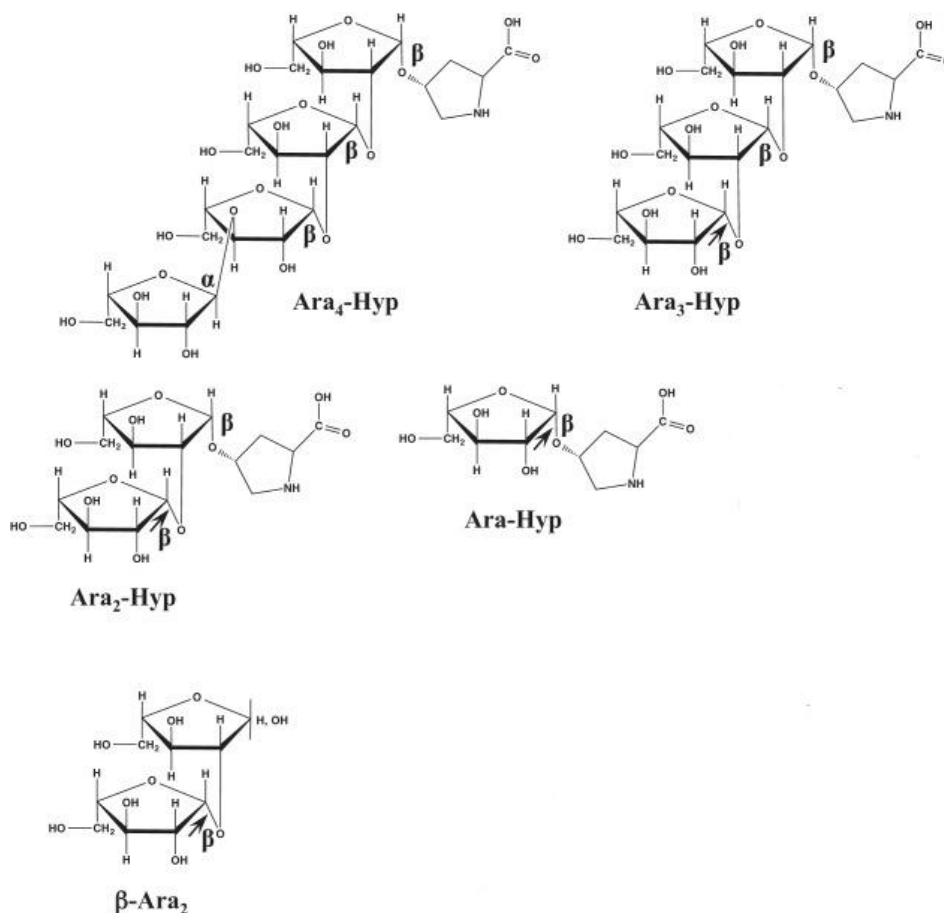
Além de serem fundamentais para a saúde intestinal, as β -Arafases podem ser utilizadas na valorização da biomassa, especialmente no processo de conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol. Sua utilidade em aplicações industriais é evidenciada pela capacidade de aprimorar o processo de sacarificação quando combinadas com outras enzimas, como as endoxilanases (MÉNDEZ-LÍTER et al., 2023).

C. AS β -ARAFASES DE *BIFIDOBACTERIUM LONGUM*

Em 2011 Fujita e colaboradores (FUJITA et al., 2011) fizeram a descrição de uma β -Arafase (denominada HypBA1) que deu origem à família GH127, descoberta em *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217.

Os resíduos de L-arabinose são liberados mais facilmente quando as conexões β -L-arabinofuranosídicas em diferentes polissacarídeos vegetais são hidrolisadas por β -L-arafases. Essas enzimas desempenham um papel crucial no metabolismo das fibras alimentares de *B. longum*, permitindo que a bactéria utilize carboidratos complexos como fonte de energia. Essa enzima descrita por Fujita e colaboradores hidrolisa especificamente dissacarídeos β -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-L-arabinose, que são produzidos a partir de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) presentes em algumas plantas. No processo de degradação, a β -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-L-arabinose é inicialmente liberada das HRGPs por outra enzima, HypBA2 (GH121 β -L-arabinobiosidase), e a HypBA1 então cliva esse dissacarídeo em duas unidades de L-arabinose, pois seria uma enzima intracelular (FUJITA et al., 2024a).

Figura 6 - Substratos naturais sobre os quais tem ação hidrolítica *in vitro* a β -L-Arafase de *B. longum*



Fonte: Adaptado de Fujita et al., 2024a. Ara: Arabinofuranose; Hyp: Hidroxiprolina

As β -L-arafases GH127 apresentam um mecanismo catalítico distinto em comparação com outras glicosídeo hidrolases, tanto em termos de resíduos catalíticos quanto de mecanismo de ação. A utilização de um resíduo de cisteína como nucleófilo catalítico é essencial para esse mecanismo, enquanto glicosídeo hidrolases geralmente utilizam resíduos ácidos, como glutamato ou aspartato, para a catálise. Para facilitar a quebra da ligação glicosídica, forma-se um intermediário covalente glicosil-enzima durante a catálise mediada por cisteína. A importância fundamental da cisteína no sítio ativo para o processo catalítico da enzima foi confirmada por investigações mecanísticas, incluindo aquelas que utilizaram inibidores baseados em mecanismo, como L-Araf-haloacetamidas e L-arabinofuranosídeos funcionalizados (ISHIWATA et al., 2022; FUJITA et al., 2024b).

Por meio de estudos cristalográficos, a arquitetura estrutural das β -L-arafases GH127 foi elucidada. Por exemplo, a estrutura cristalina da HypBA1 de *B. longum* revela uma estrutura modular composta por dois domínios β -sanduíche e um domínio

barril catalítico. Muitas glicosídeo hidrolases possuem um arranjo estrutural (β/α) 8-barrel em seu domínio catalítico, que atua como um suporte para o reconhecimento do substrato e a catálise. Os domínios β -sanduíche contribuem para o reconhecimento e a ligação do substrato, aumentando a seletividade da enzima para substratos β -L-arabinofuranosídicos. Essas características estruturais permitem que a enzima aceite e degrade eficientemente carboidratos complexos (ITO et al., 2014).

A especificidade dos substratos das β -L-arabinofuranosidases GH127 está adaptada às ligações β -L-arabinofuranosídicas presentes em oligossacarídeos derivados de plantas. A HypBA1 demonstra seletividade para β -L-arabinofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-L-arabinose, uma ligação comum nas cadeias laterais de HRGPs. Essa seletividade destaca o papel da enzima na degradação sequencial de carboidratos complexos, permitindo que *B. longum* utilize eficientemente glicoproteínas vegetais (FUJITA et al., 2024b).

Diversas enzimas de *B. longum* atuam em diferentes ligações dentro de polissacarídeos contendo arabinose, como parte de um sistema cooperativo de degradação. Por exemplo, foi determinado que enzimas da família GH43, incluindo BIArafC e BIArafB, atuam nas ligações α -L-arabinofuranosídicas do arabinano. Para a degradação completa de substratos complexos, essas enzimas cooperam com as β -L-arabinofuranosidases GH127 (KOMENO et al., 2019).

D. α -L-ARABINOFURANOSIDASES

As α -L-arabinofuranosidases (α -L-Arafases) fúngicas são enzimas essenciais para a degradação da hemicelulose, um carboidrato complexo presente na parede celular das plantas. Elas hidrolisam as ligações α -L-arabinofuranose em arabinoxilanos, arabinanas e outros polissacarídeos relacionados. As α -L-Arafases são classificadas em várias famílias de GH com base em sua sequência de aminoácidos e mecanismo de ação, principalmente GH3, GH43, GH51, GH54 e GH62. Enquanto algumas famílias exibem ampla especificidade de substrato, outras são altamente seletivas para ligações arabinosil específicas.

As GH hidrolisam ligações O-glicosídicas utilizando um mecanismo de catálise ácida geral. A estrutura do carbono anomérico do glicosídeo em hidrólise é retida ou invertida como resultado das reações de deslocamento único ou duplo entre dois aminoácidos (HENRISSAT, 1991). O mecanismo foi originalmente proposto por Koshland (KOSHLAND, 1953).

Para as GH de retenção, em geral um processo de dupla substituição em duas etapas, envolvendo um intermediário covalente enzima-glicosila, é utilizado para produzir a hidrólise com retenção da configuração do carbono anomérico. Cada etapa passa por um estado de transição que se assemelha a um íon oxocarbônio. Duas cadeias laterais de aminoácidos, geralmente glutamato ou aspartato, espaçadas a 5,5 Å, auxiliam na reação, agindo como ácido/base e nucleofílico. Um dos resíduos atua como nucleófilo na fase de glicosilação. Ele ataca o centro anomérico para deslocar o aglicano e formar um intermediário enzima-glicosila. À medida que a ligação se rompe, o outro resíduo atua como catalisador ácido, protonando o oxigênio glicosídico. Na etapa de desglicosilação, a água hidrolisa o intermediário enzima-glicosila. O resíduo remanescente então atua como catalisador básico, desprotonando a molécula de água à medida que esta ataca (MCINTOSH et al., 1996).

As α -L-Afases, catalisam a remoção de resíduos terminais de arabinofuranose (Araf) das extremidades não redutoras de polissacarídeos vegetais, como arabinoxilano, arabinana e arabinogalactana, bem como de seus oligossacarídeos correspondentes. Essas enzimas atuam clivando como exo-hidrolases as ligações α -1,5-, α -1,2- ou α -1,3-arabinofuranosídicas (TAYLOR et al., 2006).

A continuação segue uma lista das famílias de GH com atividade de α -L-Arafase em pesquisa efetuada no cazy.org e alguns microrganismos representativos.

GH2: Tem um único registro de α -L-Arafase, sem detalhamento da fonte.

Famílias de **GH3, 5 e 10:** Estas famílias incluem uma variedade de enzimas bifuncionais α -L-Arafase e β -D-xylosidase de diversas fontes. Como exemplos na GH3, temos *Thermoanaerobacter ethanolicus* e *Xylanibacter ruminicola*; da GH5, *Niabella aurantiaca* e *Pseudomonas oryzae*, e da GH10, *bacteroides intestinalis* e *Streptomyces chattanoogensis*.

GH43: Predominantemente contendo enzimas envolvidas na degradação de pectina e hemicelulose, as α -L-Arafases fúngicas GH43 são bem representadas e frequentemente exibem atividades específicas, como exo- α -L-arabinofuranosidase, clivando resíduos terminais de arabinose, e essas enzimas são encontradas em uma variedade de organismos, incluindo fungos, bactérias e plantas (GUNATA et al., 1990; BRINK; VRIES, 2011).

A família GH43 é uma das maiores e mais diversificadas no banco de dados CAZy, atualmente dividida em 38 subfamílias. As α -L-Arafases dessa família exibem uma ampla gama de especificidades e atividades enzimáticas, incluindo atividades de

β -D-xilosidase e endo- α -L-arabinanase (FATHALLAH; PUCHART, 2024). Como exemplos de microrganismos no cazy.org nos quais têm sido descritas enzimas desta família temos *Acetivibrio mesophilus*, *thermocellus* e *clariflavus*, *Aspergillus awamori*, *nidulans* e *niger*, *Bifidobacterium longum* subsp. *Suis* e *Penicillium chrysogenum*.

O mecanismo de hidrólise envolve inversão (WITHERS; WILLIAMS, 2025), e em termos estruturais, exibem uma hélice β de cinco lâminas 'não velcro'. A hélice é baseada em uma repetição quádrupla de lâminas compostas de folhas β de quatro fios. A superfície de ligação ao substrato de Arb43A está em uma longa depressão de superfície, com a constelação catalítica de carboxilatos em seu centro. A base geral catalítica (nucleófilo), é um aspartato, e o doador de próton no mecanismo ácido geral catalítico é um glutamato (NURIZZO et al., 2002).

GH51: As Arabinofuranosidas (Arafases) da família GH51 geralmente consistem em dois domínios: um domínio catalítico com uma estrutura de barril (β/α) 8 e um domínio C-terminal tipo β -sanduíche com topologia jelly-roll (dobra em rolo)². Essa configuração é observada em enzimas de vários organismos, incluindo *Geobacillus stearothermophilus* (Shulami et al., 2011) e *Thermotoga petrophila* (SOUZA et al., 2011), além de *Aspergillus awamori*, *A. nidulans* FGSC A4, *A. niger* ATCC 120120 e *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* DSM 20211 (CAZY, 2025).

O sítio ativo está localizado dentro do domínio de barril e contém uma díade catalítica, geralmente composta por dois resíduos de glutamato. Esses resíduos facilitam um mecanismo de dupla substituição, resultando na retenção da configuração anomérica durante a hidrólise do substrato. Estudos estruturais forneceram *insights* sobre esse mecanismo, destacando o papel desses resíduos catalíticos na ligação ao substrato e na estabilização do estado de transição (MCGREGOR et al., 2020).

Algumas L-Arafases da GH51 formam estruturas oligoméricas. Por exemplo, a enzima de *Thermotoga petrophila* se organiza em um hexâmero, o que se acredita contribuir para sua alta termoestabilidade (SOUZA et al., 2011).

As α -L-Arafases da GH51 hidrolisam ligações α -L-arabinofuranosídicas em diversos substratos. A enzima de *Gloeophyllum trabeum* degrada eficientemente arabinoxilooligossacarídeos, especialmente aqueles produzidos pela atividade da β -

² Essa estrutura se caracteriza por folhas β dobradas com oito segmentos que se organizam de forma compacta, lembrando um rocambole, que estabiliza a proteína e é encontrado em diversas enzimas e proteínas estruturais (RICHARDSON, 1981).

xilanase da GH10, sugerindo um papel cooperativo na degradação da xilana (TSUKIDA et al., 2023).

Diversos microrganismos apresentam valores ótimos de pH variados para as α -L-Arafases da família 51 de GH. Por exemplo, o pH ideal para a de *Pleurotus ostreatus* é 5,0 (Amore et al., 2012). Por outro lado, a L-Arafase GH51 de *Talaromyces leycettanus* apresenta atividade máxima em uma faixa de pH mais ácida, entre 3,5 e 4,0 (TU et al., 2019).

Além disso, a L-Arafase GH51 multifuncional de *Paenibacillus* sp. THS1 apresenta valores ótimos de pH dependentes do substrato, ou seja, o pH ideal varia de acordo com o substrato específico utilizado, entre 5,0 e 6,5. Essa enzima também tem atividade xilosidase e eventualmente de endo-arabinanase (BOURAOUI et al., 2016).

GH54: Esta família é composta exclusivamente por α -L-Arafases, as enzimas fúngicas GH54 contribuem para a desramificação da arabinoxilana e são frequentemente estudadas por sua ação sinérgica com outras hemicelulases na degradação da biomassa (FLIPPHI et al., 1993).

Essas enzimas geralmente possuem dois domínios distintos em sua estrutura: um domínio de ligação à arabinose (ABD) na extremidade C-terminal e um domínio catalítico na extremidade N-terminal. O ABD apresenta um formato de trevo β (*beta trefoil fold*), semelhante ao da família 13 do módulo de ligação a carboidratos (CBM), enquanto o domínio catalítico possui um enovelamento tipo β -sanduíche, característico das glicosídeo hidrolases do clã B. No entanto, o ABD das enzimas GH54 apresenta características distintas que podem classificá-lo em uma nova família de CBM (MIYANAGA et al., 2004).

Como enzimas de ação exo, as α -L-Arafases da GH54 atuam liberando resíduos de α -L-arabinofuranosila de uma variedade de substratos, como xilana, pectina e xiloglucana. Elas apresentam atividade ótima em ambientes ácidos, com pH ideal entre 2,6 e 3,5 e temperatura ótima entre 50 e 60°C. Por exemplo, uma α -L-Arafase de *Aureobasidium pullulans* demonstrou atividade ótima em pH 3,5 e 55°C (de WET et al., 2008), enquanto outra de *Penicillium funiculosum* apresentou atividade ideal em pH 2,6 e 50°C (GUAIS et al., 2010).

Investigações estruturais revelaram resíduos importantes envolvidos no mecanismo catalítico das α -L-Arafases da GH54. Na enzima de *Aspergillus kawachii*, o resíduo Glu221 atua como nucleófilo, enquanto Asp297 funciona como catalisador

ácido/base durante o processo de hidrólise. Além disso, descobriu-se que certas enzimas GH54 são dependentes de metais, ou seja, necessitam de íons metálicos divalentes, como Mn^{2+} , para desempenhar sua função (MOTTA et al., 2021).

GH62: Esta família compreende apenas α -L-Arafases altamente específicas para arabinoxilanos e vitais para sua hidrólise completa. As enzimas fúngicas GH62 são de particular interesse para aplicações biotecnológicas devido à sua atividade específica (WILKENS et al., 2017).

Estruturalmente, estas enzimas são caracterizadas por um enovelamento em forma de β -propeller de cinco lâminas, uma característica confirmada por estudos cristalográficos de enzimas de diversos microrganismos (CONTESINI et al., 2017).

Funcionalmente, as α -L-Arafases GH62 são enzimas que atuam especificamente nas extremidades não redutoras dos polissacarídeos contendo arabinose, liberando resíduos de α -L-arabinofuranose. Elas apresentam especificidade de substrato para arabinoxilanos e arabinanos, desempenhando um papel crucial na degradação da biomassa vegetal complexa. Essas enzimas frequentemente atuam de forma sinérgica com outras enzimas que degradam a parede celular, como xilanases e β -xilosidases, aumentando a eficiência geral da degradação da biomassa lignocelulósica. Essa ação sinérgica é especialmente valiosa em aplicações industriais, como a produção de biocombustíveis, onde a quebra completa dos materiais vegetais é essencial (WILKENS et al., 2017).

As α -L-Arafases GH62 são predominantemente encontradas em fungos e bactérias, com perfis de atividade que variam entre as espécies (CONTESINI et al., 2017).

Estudos recentes ampliaram o entendimento sobre a diversidade funcional e estrutural dentro das L-Arafases GH62. Pesquisas sobre enzimas de fungos termofílicos, como *Scytalidium thermophilum*, destacaram variações na termoestabilidade e afinidade pelo substrato, evidenciando a adaptabilidade dessas enzimas a diferentes condições ambientais (KAUR et al., 2014).

Algumas das enzimas mostradas acima são bifuncionais; ao hidrolisar as ligações α -L-arabinofuranosídicas e β -D-xilosídicas, as enzimas funcionais com atividades tanto de α -L-Arafase quanto de β -xilosidase são essenciais para a degradação dos polissacarídeos da parede celular das plantas. Essas enzimas apresentam diferentes organizações de domínios e características estruturais e pertencem a diferentes famílias de GH, como GH3, GH43 e GH54.

Família GH3: Normalmente, essas enzimas possuem um único domínio catalítico com um dobramento em barril (β/α) 8, responsável por ambas as funções. A organização estrutural dessas enzimas facilita a adaptação de diferentes substratos ao sítio ativo, permitindo sua atividade dual (LEE et al., 2003).

Família GH43: Essa família inclui enzimas bifuncionais que apresentam tanto atividade β -xilosidase quanto α -L-Arafase, como aquelas encontradas em *Bacteroides ovatus* (SHRIVASTAVA; GOYAL, 2025). Essas enzimas frequentemente exibem um dobramento em hélice β -propeller de cinco lâminas, característico das GH43. O sítio ativo, geralmente localizado no centro da estrutura propeller, permite o acesso a uma variedade de substratos.

Família GH54: O exemplo dessa família é a enzima de *Trichoderma koningii*, que possui ambas as funções de α -L-Arafase e β -xilosidase. Estudos estruturais revelaram que essas enzimas possuem um design de dois domínios: um domínio catalítico N-terminal com um dobramento β -sanduíche e um domínio de ligação à arabinose C-terminal com um dobramento β -trevo. Essa organização de domínios é essencial para o reconhecimento do substrato e para a catálise (ROHMAN et al., 2019).

Essas enzimas bifuncionais possuem sítios ativos precisamente ajustados para acomodar múltiplos substratos. A organização estrutural do sítio ativo permite a ligação tanto de resíduos arabinofuranosil quanto xilopiranosil, possibilitando a realização de duas funções catalíticas (LEE et al., 2003).

Em resumo, as arquiteturas estruturais das enzimas bifuncionais α -L-arafase/ β -xilosidase variam entre as famílias GH. Seu papel crucial na degradação da biomassa vegetal se deve à complexa interação entre a organização dos domínios e a configuração do sítio ativo, permitindo a hidrólise de diferentes polissacarídeos vegetais.

6 CONCLUSÕES

Neste capítulo, foi abordado a produção e análise da enzima α -L-arabinofuranosidase dos fungos *Myceliophthora heterothallica*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Phebia sp*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medula-panis* por fermentação em estado sólido e semi-sólido utilizando farelo de laranja, farelo de trigo, espiga de milho e bagaço de cana-de-açúcar como substratos. Dentre as espécies, o fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou maior produção sendo purificado e analisado, cuja massa molecular foi estimada entre 50 e 60 kDa, com ótima atividade e estabilidade a pH 3,0 a 5,0 e temperatura ótima de 50 °C se mantendo estável até 60 °C. A enzima não necessita de íons para exercer sua atividade, porém foi considerada sensível aos solventes SDS e Triton. As características dessa enzima favorecem na continuidade de pesquisas enfatizando sua capacidade de degradar resíduos lignocelulósicos de origem agroindustrial. Em estudos futuros, pode-se considerar eventualmente a clonagem e expressão heteróloga justificada pela otimização da produção.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, Constantine John; SUN, Sung Huang. **Introductory Mycology**. 2. ed. New Delhi: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- ALIAS, Noor Izawati *et al.* Expression optimisation of recombinant -L- arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 120120 in *Pichia pastoris* and its biochemical characterisation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 35, p. 6700–6710, 2011.
- AMORE, Antonella *et al.* A family GH51 α -l-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 995–1006, 2012.
- ANTONELLI, Alexan *et al.* State of the World's Plants and Fungi 2020. 2020.
- ARRUDA, Luiz Vinícius De Souza *et al.* *Talaromyces pinophilus* exoproteome reveals high GH54 α -arabinofuranosidase production induced by soybean hulls. **Biochemical Engineering Journal**, v. 215, p. 109626, 2025.
- ÁVILA, Patrícia Félix. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais lignocelulósicos para produção enzimática de oligossacarídeos visando a obtenção de agente de prebiótico para saúde humana**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2022.
- BAJPAI, Pratima. Sources, Production, and Classification of Xylanases. *In: Xylanolytic Enzymes*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 43–52.
- BAUMER, Janaina Duarte. **Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- BEAUGRAND, Johnny *et al.* Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2529–2540, 2004.
- BEILEN, Jan B. Van; LI, Zhi. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338–344, 2002.
- BELDA, Ignacio *et al.* Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 189, 2017.
- BERLIN, Alex *et al.* Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 2007.
- BHADRA, Sudipa *et al.* Simultaneous organic wastewater treatment and bioelectricity production in a dual chamber microbial fuel cell with *Scenedesmus obliquus* biocathode. **Energy Conversion and Management**, v. 316, p. 118849, 2024.
- BUCKERIDGE, Marcos Silveira. **Rotas para o etanol celulósico em um cenário de mudanças climáticas**. Disponível em: <https://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/pt-br/revista/detalhes/26-rotas-para-o-etanol-celulosico-em-um-cenario-de/>. Acesso em: 18 maio. 2025.

- BUENO, Danilo; BRIENZO, Michel. Production of bioplastics with chemical and enzymatic modified xylan (lignin- and arabinose-free) from sugarcane bagasse. **Biotechnology for Sustainable Materials**, v. 2, n. 2, p. 1–10, 2025.
- BUZZO, Bárbara Bonfá *et al.* Lignin degradation by a novel thermophilic and alkaline yellow laccase from *Chitinophaga* sp. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 6, p. e04013-23, 2024.
- CAMARGO, Suelen. **Caracterização funcional e estrutural da primeira arabinofuranosidase da família 62 de *Thielavia terrestris* dimerizada através de domain swapping**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
- CARVALHO, Cecília Fonseca. **Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na biblioteca metagenômica de solo de Terra Preta de Índio**. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- CASTILLO, G.; DEMOULIN, V. NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. **Mycological Research**, v. 101, n. 3, p. 341–344, 1997.
- CHACÓN-MARTÍNEZ, Carlos A. *et al.* Identification and characterization of the α -l-arabinofuranosidase B of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 201–208, 2004.
- CHEN, Jia *et al.* The bifunctional enzymatic catalysis of maize waste for simultaneous production of arabinose and xylose. **Process Biochemistry**, v. 150, p. 161–167, 2025.
- CULLETON, Helena *et al.* Overexpression, purification and characterisation of homologous α -L-arabinofuranosidase and endo-1,4- β -D-glucanase in *Aspergillus vadensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 11, p. 1697–1708, 2014.
- DAMAYANTI, Mamik *et al.* Utilization agricultural by-product as inducers and carbon sources for hemicellulolytic enzyme cocktails production. In: THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEUROSCIENCE AND LEARNING TECHNOLOGY (ICONSATIN 2021). **Anais...** Jember, Indonesia: 2023. Disponível em: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2868378>. Acesso em: 14 maio. 2025
- DANIEL, Dalila Esteves. **Biodegradação Anaeróbia de Compostos Derivados de Lignina e Xenobióticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2014.
- DE ALBUQUERQUE, Mariana Furtado Granato *et al.* Two α -Arabinofuranosidases from *Chrysosporthe cubensis* and Their Effects on Sugarcane Bagasse Saccharification. **BioEnergy Research**, v. 17, n. 3, p. 1584–1597, 2024.
- DE ALMEIDA SIQUEIRA, E. M *et al.* *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of α -amylase. **Mycological Research**, v. 101, n. 2, p. 188–190, 1997.
- DE AMO, Gabriela Salvador *et al.* Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 798–805, 2019.
- DEMIREL, Yasar. Characteristics and Applications of Protein Folding Thermodynamics.

Journal of Thermodynamics and Catalysis, v. 14, n. 1, p. 1–2, 2023.

EICHHÖFER, Hendrik *et al.* Influence of Arabinan Fine Structure, Galacturonan Backbone Length, and Degree of Esterification on the Emulsifying Properties of Acid-Extracted Sugar Beet Pectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 2105–2112, 2023.

EL-GENDI, Hamada *et al.* A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 23, 2021.

EUGENIO, María Eugenia *et al.* Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 433–440, 2009.

FALKOSKI, Daniel Luciano *et al.* Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

FARIA, Syd Pereira *et al.* Production of cellulases and xylanases by *Humicola grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112968, 2020.

FIGUEIREDO, Ádria; SILVA, Ademir Castro E. Atividade “in vitro” de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 2014.

FRANCO DENTI, Andressa *et al.* Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. **Revista Perspectiva**, v. 46, n. 175, p. 51–68, 2022.

GARCIA, Telma Alves *et al.* Properties of Laccases Produced by *Pycnoporus sanguineus* Induced by 2,5-xylidine. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 9, p. 633–636, 2006.

GONÇALVES, Fabiano Avelino. **BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES E HEMICELULASES E SUA AVALIAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados 2011.

GRAÇA, V. C. *et al.* Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 543–552, 2017.

GUERFALI, Mohamed *et al.* Catalytic properties of *Talaromyces thermophilus* α -1-arabinofuranosidase and its synergistic action with immobilized endo- β -1,4-xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 192–199, 2011.

GURGEL, Rafaela Araújo Ferreira. ***Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril: Um Complexo de Espécies Existentes no Neotrópico?** Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2022.

HÖVEL, Klaus *et al.* Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 -L-arabinofuranosidase. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 19, p. 4922–4932, 2003.

HUY, Nguyen Duc *et al.* Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 152–159, 2013.

İLGÜ, Hüseyin *et al.* A thermophilic α -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus vulcani* GS90: heterologous expression, biochemical characterization, and its synergistic action in fruit juice enrichment. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 9, p. 1627–1636, 2018.

KOMAROVA, Maria I. *et al.* Efficient Hydrolysis of Sugar Beet Pulp Using Novel Enzyme Complexes. **Agronomy**, v. 15, n. 1, p. 101, 2025.

KOSEKI, Takuya *et al.* Role of Two α -L-Arabinofuranosidases in Arabinoxylan Degradation and Characteristics of the Encoding Genes from Shochu Koji Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 96, n. 3, p. 232–241, 2003.

KURNIATI, Anita; DARMOKOESOEMO, Handoko; PUSPANINGSIH, Ni Nyoman Tri. Scanning Electron Microscope Analysis of Rice Straw Degradation by a Treatment with α -L-arabinofuranosidase. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 63–68, 2016.

LAM, Ming Quan *et al.* Genomic Analysis to Elucidate the Lignocellulose Degrading Capability of a New Halophile *Robertkochia solimangrovi*. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 2135, 2022.

LAMBRÉ, Claude *et al.* Safety evaluation of the food enzyme non-reducing end α -l-arabinofuranosidase from the genetically modified *Trichoderma reesei* strain NZYM-GV. **EFSA Journal**, v. 20, n. 3, p. 7173, 2022.

LAURUENG TANA, Vichuta; PINPHANICHAKARN, Pairoh. Optimization of Culture Medium and Conditions for α -L-Arabinofuranosidase Production by *Streptomyces* sp. PC22. **Journal of Scientific Research Chulalongkorn University**, v. 31, n. 1, p. 57–66, 2006.

LE, Ngoc Giang *et al.* A Functional Carbohydrate Degrading Enzyme Potentially Acquired by Horizontal Gene Transfer in the Genome of the Soil Invertebrate *Folsomia candida*. **Genes**, v. 13, n. 8, p. 1402, 2022.

LI, Chunyue *et al.* Expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase derived from *Aspergillus awamori* and its enzymatic degradation of corn byproducts with xylanase. **Bioresource Technology**, v. 384, p. 129278, 2023.

LI, Xiaomin *et al.* Characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and its potential use in beer production. **Food Chemistry**, v. 305, p. 125382, 2020.

LIN, Weiping *et al.* Genome sequence of the fungus *Pycnoporus sanguineus*, which produces cinnabarinic acid and pH- and thermo- stable laccases. **Gene**, v. 742, p. 144586, 2020.

LIU, Lei; YANG, Chao; GUO, Qing-Xiang. A study on the enthalpy–entropy compensation in protein unfolding. **Biophysical Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 239–251, 2000.

LIU, Liang *et al.* Characterization of a multifunctional enzyme from *Trichoderma harzianum*

and its application in enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 415, p. 131701, 2025.

LIU, Xiaoqing *et al.* Characterization of a novel thermostable α -l-arabinofuranosidase for improved synergistic effect with xylanase on lignocellulosic biomass hydrolysis without prior pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 394, p. 130177, 2024.

LIU, Yajing *et al.* Arabinan saccharification by biogas reactor metagenome-derived arabinosyl hydrolases. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 121, 2022.

LONG, Liangkun *et al.* Insights into the capability of the lignocellulolytic enzymes of *Penicillium parvum* 4-14 to saccharify corn bran after alkaline hydrogen peroxide pretreatment. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 79, 2023.

LU, Mei-Kuang *et al.* ANTI-INFLAMMATORY PRINCIPLES OF. **Journal of Chinese Medicine**, v. 3, n. 4, p. 75–83, 2010.

LU, Yao *et al.* Characterization of a GH43 Bifunctional Glycosidase from Endophytic *Chaetomium globosum* and Its Potential Application in the Biotransformation of Ginsenosides. **BioTech**, v. 14, n. 1, p. 18, 2025a.

LU, Yao *et al.* Characterization of a rare trifunctional xylanase from endophytic fungus *Chaetomium globosum* and its synergistic effect with cellulase cocktail. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 309, p. 143065, 2025b.

MA, Yubin *et al.* Metagenomics-Based Analysis of the Effect of Rice Straw Substitution for a Proportion of Whole-Plant Corn Silage on the Rumen Flora Structure and Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes). **Fermentation**, v. 9, n. 11, p. 954, 7 nov. 2023.

MANNS, Joanne M. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *In: Current Protocols in Microbiology*. Pennsylvania: Wiley Online Library, 2011. v. 22 p. 13.

MARCOLONGO, Loredana *et al.* The effect of *Pleurotus ostreatus* arabinofuranosidase and its evolved variant in lignocellulosic biomasses conversion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 162–167, nov. 2014.

MARTINS, Manoela *et al.* Synergism for xylo-oligosaccharides, *p*-coumaric and ferulic acid production, and thermostability modulation of GH 62 α -l-arabinofuranosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, p. 102469, set. 2022.

MENDEZ-ENCINAS, Mayra A. *et al.* Arabinoxylans and cross-linked arabinoxylans: Fermentation and potential application as matrices for probiotic bacterial encapsulation. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, p. 100085, 2022.

MÉNDEZ-LÍTER, Juan A. *et al.* Expression and Characterization of Two α -l-Arabinofuranosidases from *Talaromyces amestolkiae*: Role of These Enzymes in Biomass Valorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 11997, 2023.

MICHIELS, Pieter *et al.* Filtration enzymes applied during mashing affect beer composition and viscosity. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 129, n. 3, p. 176–191, 5 out. 2023.

MONTEIRO, Valdirene Neves; SILVA, Roberto Do Nascimento. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MOTTA, Maria Lorenza Leal *et al.* A novel fungal metal-dependent α -l-arabinofuranosidase of family 54 glycoside hydrolase shows expanded substrate specificity. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10961, 2021.

NASCIMENTO, Carlos Eduardo *et al.* Functional characteristics of an α -L-arabinofuranosidase secreted by the *Basidiomycete Corioloropsis byrsina*. **Biologia**, v. 78, n. 7, p. 1919–1928, 2023.

NAZIPOVA, Alsu *et al.* The In Silico Characterization of Monocotyledonous α -l-Arabinofuranosidases on the Example of Maize. **Life**, v. 13, n. 2, p. 266, 2023.

NC-IUBMB. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>. Acesso em: 18 maio. 2025.

OTZEN, Daniel E. *et al.* How do surfactants unfold and refold proteins? **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 308, p. 102754, out. 2022.

PEREIRA, Pâmela Aparecida Maldaner. **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM BIORREFINARIA**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2020.

RESEARCH AND MARKETS. **Enzymes Market Report 2025**. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5733852/enzymes-market-report>. Acesso em: 18 maio. 2025.

RODRÍGUEZ, María Daniela *et al.* KH₂PO₄ improves cellulase production of *Irpex lacteus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 434–444, 2019.

ROJAS-PÉREZ, Lilia C. *et al.* Production of xylose through enzymatic hydrolysis of glucuronoarabinoxylan from brewers' spent grain. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, p. 105, 2022.

ROSLI, Hernán G *et al.* α -l-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 272–281, 2009.

Ryvarden, L. (1991) Gêneros de Políporos. **Nomenclatura e Taxonomia**. Fungiflora, 363 p.

SAHA, Badal C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1279–1284, 2002.

SAHA, Badal C.; BOTHAST, Rodney J. Purification and Characterization of a Novel Thermostable α -L-Arabinofuranosidase from a Color-Variant strain of *Aerobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 2016–220, 1998.

SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, H. Purification and properties of two type-B α -l-

arabinofuranosidases produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1621, n. 2, p. 204–210, 2003.

SANTOS, Camila R. *et al.* Mechanistic Strategies for Catalysis Adopted by Evolutionary Distinct Family 43 Arabinanases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7362–7373, 2014.

SAQIB, A. A. N. *et al.* Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SAQIB, A. A. N. *et al.* A Thermostable Crude Endoglucanase Produced by *Aspergillus fumigatus* in a Novel Solid State Fermentation Process Using Isolated Free Water. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

SHRIVASTAVA, Smriti (ORG.). **Industrial Applications of Glycoside Hydrolases**. [S.l.]: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2020.

SI, Zhenyuan *et al.* Structure and function characterization of the α -L-arabinofuranosidase from the white-rot fungus *Trametes hirsuta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 12, p. 3967–3981, 2023.

SIMÕES, André Luis Gomes *et al.* PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS. **IBEAS - Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais**, n. 3, p. 1–6, 2020.

SINGH CHADHA, Bhupinder *et al.* α -L-ARABINOFURANOSIDASE FROM AN EFFICIENT HEMICELLULOLYTIC FUNGUS *Penicillium janthinellum* CAPABLE OF HYDROLYZING WHEAT AND RYE ARABINOXYLAN TO ARABINOSE. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 6, n. 5, p. 1132–1139, 2017.

SINGH, Garima *et al.* Melioration of Paddy Straw to produce cellulase-free xylanase and bioactives under Solid State Fermentation and deciphering its impact by Life Cycle Assessment. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127493, 2022.

SMÂNIA, A. *et al.* Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 3, p. 177–181, 1995.

SPECIESLINK NETWORK. Disponível em: <https://specieslink.net/>. Acesso em: 25 abr. 2025.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M. Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. **Mycosphere**, v. 7, n. 10, p. 1500–1525, 2016.

TEMPORITI, Marta Elisabetta Eleonora *et al.* Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1180, 2022.

TERRASAN, César Rafael Fanchini *et al.* Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139–4143, 2010.

TERRONE, Cárol Cabral *et al.* 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**, v. 23, p. 101460, 2020.

THE BRAZIL FLORA GROUP. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 1513–1527, 2018.

TÖLGO, Monika *et al.* Enzymatic debranching is a key determinant of the xylan-degrading activity of family AA9 lytic polysaccharide monooxygenases. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 2, 2023.

TSUKIDA, Rikako *et al.* Characterization of an α -L-Arabinofuranosidase GH51 from the Brown-rot Fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 70, n. 1, p. 9–14, 2022.

UZAN, E. *et al.* High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 2199–2213, 2010.

WANG, Pin-Mei *et al.* Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 371–376, 2014.

WEBSTER, John; WEBER, Roland. **Introduction to Fungi**. [S.l.]: Cambridge University Press, 2007.

WONG, Dominic W. S.; BATT, Sarah. Release of Arabinose from Wheat Insoluble Arabinoxylan by the Action of α -L-Arabinofuranosidase in Synergism with Endo-Xylanases. **Advances in Enzyme Research**, v. 11, n. 04, p. 147–153, 2023.

WU, Wei *et al.* **Debranching enzymes decomposed corn arabinoxylan into xylooligosaccharides and achieved a prebiotic regulation of gut microbiota in broilers**. 2022a. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1991906/v1>. Acesso em: 14 maio. 2025

WU, Xiuyun *et al.* Functional Specificity of Three α -Arabinofuranosidases from Different Glycoside Hydrolase Families in *Aspergillus niger* An76. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 16, p. 5039–5048, 2022b.

XIAO, Yunning *et al.* Melatonin maintains the quality and cell wall structure of plum fruits under low temperature storage. **Scientia Horticulturae**, v. 338, p. 113745, 2024.

YAHAYA, Yus Azila; DON, Mashitah Mat. *Pycnoporus sanguineus* as Potential Biosorbent for Heavy Metal Removal from Aqueous Solution: A Review. **Journal of Physical Science**, v. 25, n. 1, p. 1–32, 2014.

YANG, Lei *et al.* Achieving efficient co-expression of endo- β -1,4-xylanase and α -arabinofuranosidase in *Trichoderma reesei* and application in the production of arabino-xylo-oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 306, p. 141599, 2025.

YANG, Ying *et al.* Novel α -L-Arabinofuranosidase from *Cellulomonas fimi* ATCC 484 and Its Substrate-Specificity Analysis with the Aid of Computer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 3725–3733, 2015.

YEOMAN, Carl J. *et al.* Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. *In: Advances in Applied Microbiology*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2010. v. 70 p. 1–55.

ZANONI, Jéssica De Araujo. **Avaliação de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e caracterização estrutural in silico de uma endoxilanase homóloga do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *Pichia pastoris***. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2021.

ZANONI, Jéssica De Araujo *et al.* Production and biochemical characterization of xylanases synthesized by the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* S10 by solid-state cultivation. **Eclética Química Journal**, v. 46, n. 1, p. 53–67, 2021.

ZHENG, Fengzhen *et al.* Expression and characterization of a novel halophilic GH10 β -1,4-xylanase from *Trichoderma asperellum* ND-1 and its synergism with a commercial α -L-arabinofuranosidase on arabinoxylan degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 282, p. 136885, 2024.

ZHU, Fengmei *et al.* The glycosidic aroma precursors in wine: occurrence, characterization and potential biological applications. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 3, p. 565–571, 2017.

ZILLI, Izabela Karolina Costa. **Cultivo e avaliação da degradação de lignina por *Pycnoporus sanguineus* e *Phlebia* sp. e caracterização de lacases para descoloração de corantes sintéticos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2023.

ZORN, Holger *et al.* Safety evaluation of an extension of use of a food enzyme containing endo-polygalacturonase, pectinesterase, pectin lyase and non-reducing end α -l-arabinofuranosidase activities from the non-genetically modified *Aspergillus niger* strain PEC. **EFSA Journal**, v. 22, n. 10, 2024.