

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
Arabinofuranosidases: 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. Arabinofuranosidases. 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 Murgía
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 -glicopiranosose 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).

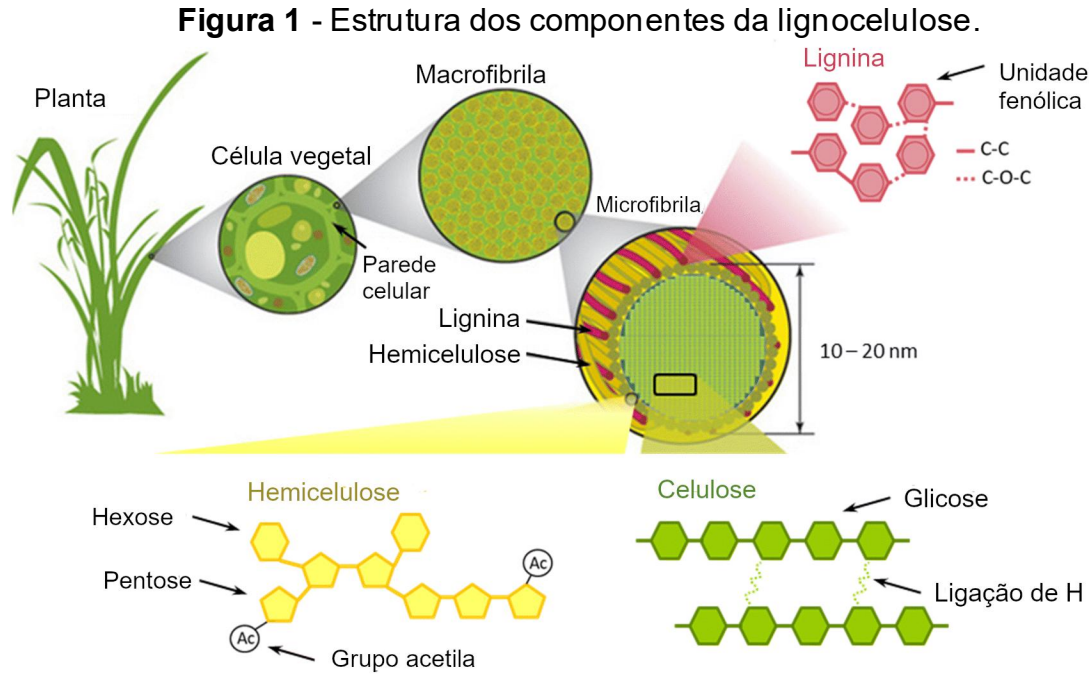
Esta fração tem sido objeto de estudos há décadas no sentido de possibilitar a produção do denominado etanol de segunda geração (E2G) para uso como combustível automotivo, o que permitiria aumentar a sua produção sem incrementar a área cultivada (MEDEIROS et al., 2023).

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 (%)
Grama	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 polihidroxicanoatos (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).

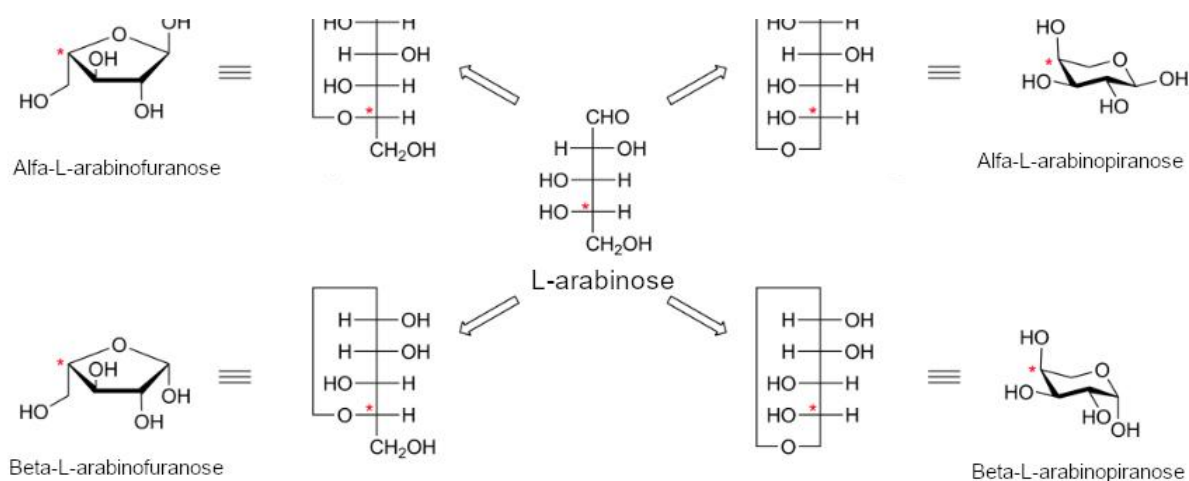
No caso dos produtos da degradação da hemicelulose, são liberados furfural, xilose e arabinose (pentoses), xilo-oligossacarídeos (XOS) (PARVULESCU et al., 2018), e esses derivados permitem a produção ou obtenção de resinas, solventes, fibras sintéticas, probióticos, xilitol, ácido ferúlico etc. (OU;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

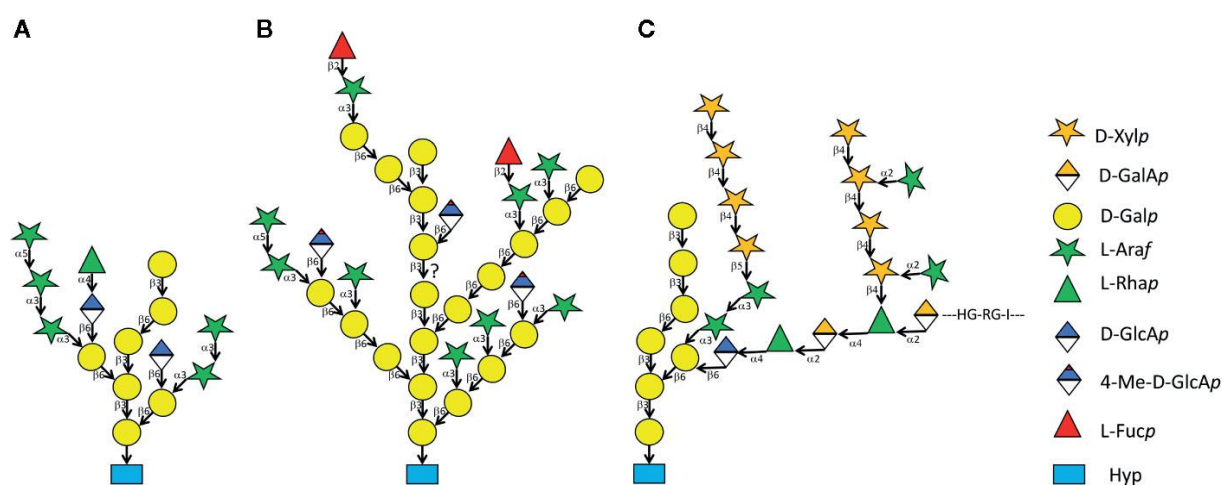
As enzimas chamadas β -L-Arabinofuranosidases, ou abreviadamente β -Arafases, são essenciais para a degradação de polissacarídeos vegetais, especialmente aqueles que incluem β -L-arabinofuranosídeos, presentes em uma variedade de polissacarídeos vegetais, como proteínas AGPs, extensinas, lectinas de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

para a estrutura e funcionalidade das paredes celulares das plantas; pertencem às glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, HRGPs¹.

Por exemplo, as AGPs estão presentes em muitas espécies vegetais e desempenham um papel no desenvolvimento, sinalização e proliferação celular, formando uma ampla variedade de moléculas de proteínas glicosiladas, tendo todas elas cadeias substanciais de glicanos arabinogalactanos (AG) do tipo II que estão ligadas por oxigênio (glicosilação tipo O) a uma hidroxiprolina (Hyp) na espinha dorsal (*backbone*) da proteína, formando proteoglicanas. A cadeia principal dos glicanos AG é composta por galactose (Gal) ligada por β -(1,3) e galactose (Gal) ligada por β -(1,6) como cadeias laterais.

Os açúcares terminais podem ser ramnose (Rha), Fucose (Fuc), arabinose (Ara) ou ácido glicurônico (GlcA) (Figura 3). As estruturas individuais de AG do tipo II variam entre espécies e dentro dos tecidos da mesma espécie (SEIFERT, 2020; MA; JOHNSON, 2023).

Figura 3 - Variantes de arabinogalactanas (AG).



Fonte: Seifert, 2020.

Outra classe de HRGPs, as extensinas, contribuem para a defesa e o fortalecimento da parede celular; elas têm cadeias de β -L-arabinooligossacarídeos (β -AOS), por exemplo Araf- β 1,2-Araf- β 1,2-Araf- β 1-hidroxiprolina (Hyp); -Araf3-Hyp (FUJITA et al., 2024a). Os polissacarídeos pécticos chamados arabinanas e ramnogalacturonano-II conferem integridade estrutural e porosidade à parede celular, garantindo a flexibilidade e funcionalidade da parede celular.

¹ Do inglês *hydroxyproline-rich glycoproteins*.

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).

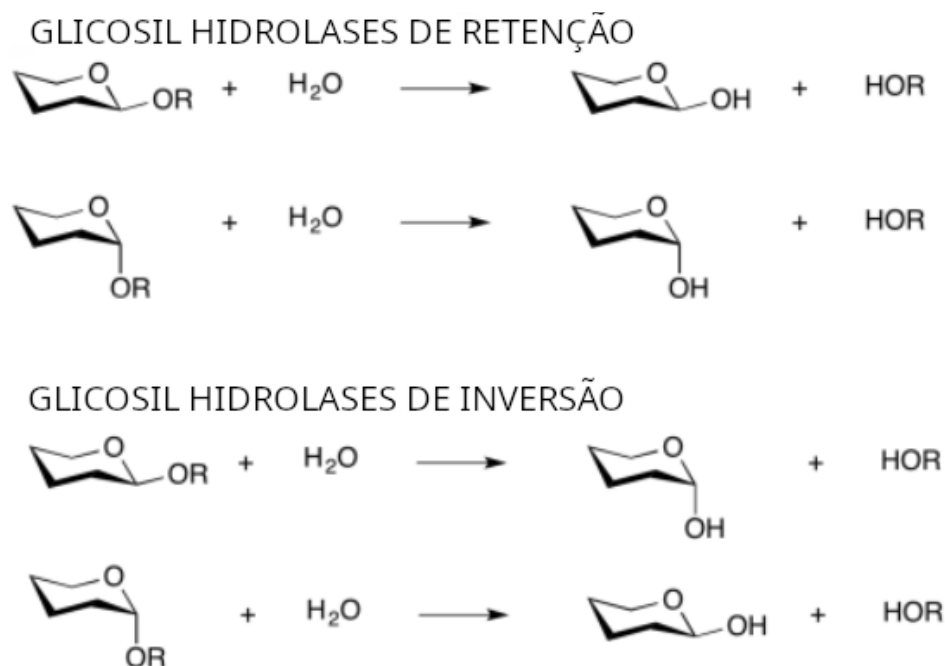
Investigações estruturais indicam que as β -Arafases da GH 127 e 146 possuem uma estrutura única em barril (α/α)₆, essencial para sua atividade enzimática, e, como veremos, os mesmos resíduos catalíticos (CAZY, 2025). A primeira enzima classificada nessa família foi a HypBA1 de *B. longum* JCM 1217 (FUJITA 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.

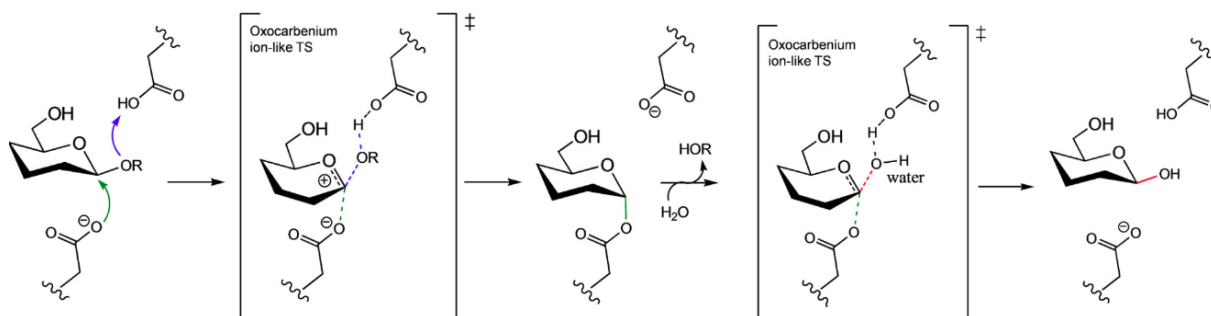


Fonte: Adaptado de Withers; Williams, 2025.

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.

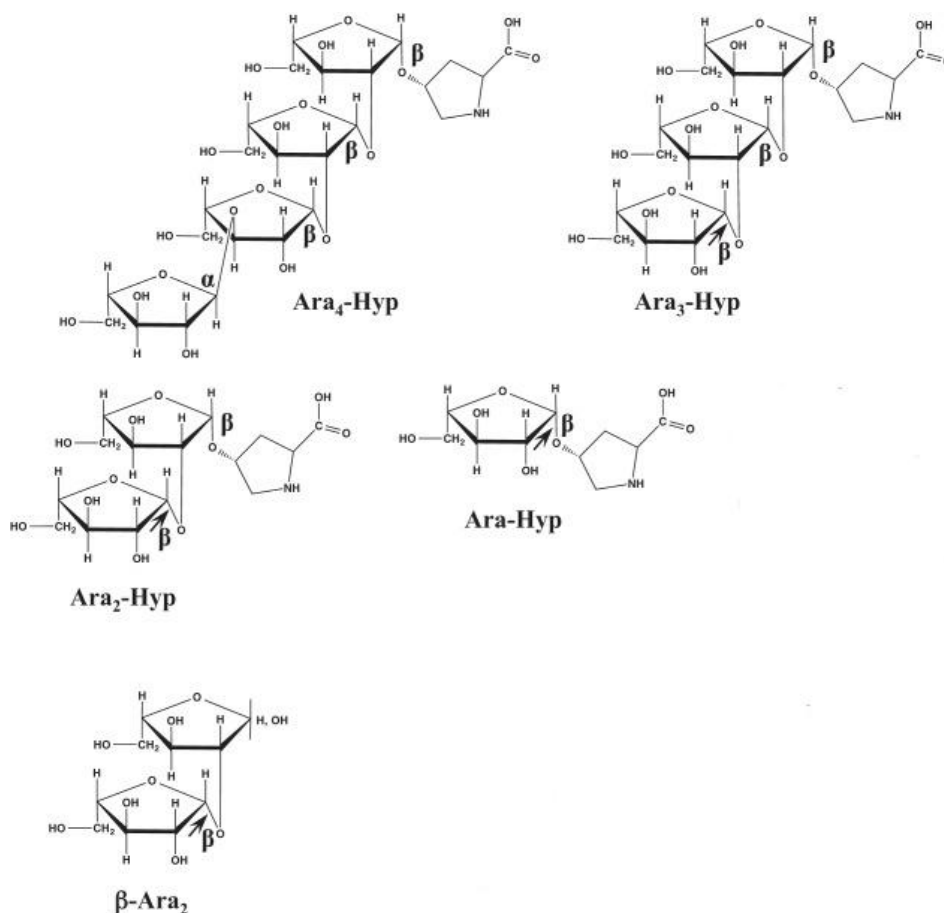
Além de serem fundamentais para a saúde intestinal, as β -Arafases podem ser utilizadas na valorização da biomassa, especialmente no processo de conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol. Sua utilidade em aplicações industriais é evidenciada pela capacidade 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.

II DESCRIÇÃO GERAL DO TRABALHO DESENVOLVIDO

Inicialmente concebido como um projeto de expressão e caracterização de uma alfa-L-arabinofuranosidase bacteriana de *Chitinophaga* sp. a partir de uma sequência obtida em análise metagenômica na FCAV/UNESP de Jaboticabal, SP, o desenvolvimento teve atrasos iniciais em virtude da pandemia da Covid-19, das restrições à pesquisa presencial e das importações de reagentes para procedimentos de Biologia Molecular, afetadas na sua produção pela mesma razão.

No segundo semestre de 2024 fomos notificados que a enzima, inicialmente catalogada como alfa-L-arabinofuranosidase, na verdade correspondia a uma beta-L-arabinofuranosidase, em virtude do qual, não tendo substratos adequados para caracterizá-la, optamos por desenvolver um plano exequível para o tempo restante. O mesmo desenvolveu tentativas de expressão da beta-L-arabinofuranosidase, análises *in silico* em colaboração com docentes do Instituto, e caracterização bioquímica de enzimas alfa-L-arabinofuranosidases de fungos da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da Profa. Dra. Eleni Gomes. Os dois capítulos da tese que seguem esta introdução se referem a esse trabalho desenvolvido, e os objetivos serão neles descritos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- 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.
- ARDÈVOL, Albert; ROVIRA, Carme. Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 24, p. 7528–7547, 2015.
- BOERJAN, Wout *et al.* Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519–546, 2003.
- BORLANDELLI, Valentina *et al.* β -l-Arabinofurano-cyclitol Aziridines Are Covalent Broad-Spectrum Inhibitors and Activity-Based Probes for Retaining β -l-Arabinofuranosidases. **ACS Chemical Biology**, v. 18, n. 12, p. 2564–2573, 2023.
- BOURAOUI, Hanen *et al.* The GH51 α -l-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- BOZELL, Joseph J.; PETERSEN, Gene R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 539–554, 2010.
- BRIENZA, Filippo *et al.* A guide to lignin valorization in biorefineries: traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals. **RSC Sustainability**, v. 2, n. 1, p. 37–90, 2024.
- BRINK, Joost Van Den; VRIES, Ronald P. De. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.
- CANILHA, Larissa *et al.* Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-Techniques, applications and commercialization**, p. 15–45, 2013.
- CAZY. **Glycoside Hydrolase Family 127**. Disponível em: <https://www.cazy.org/GH127.html>. Acesso em: 22 maio. 2024.
- CHERUBINI, Francesco. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.
- DA SILVA, Marcos F *et al.* Challenges and trends in the industrial production and application of cellooligosaccharides. **Current Opinion in Food Science**, v. 63, p. 101308, 2025.
- DAVIES, Gideon; HENRISSAT, Bernard. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853–859, 1995.
- DE WET, Barend J. M. *et al.* Characterization of a family 54 α -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 5, p.

975–983, 2008.

DELBECQ, Frederic *et al.* Hydrolysis of hemicellulose and derivatives-a review of recent advances in the production of furfural. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 357117, 2018.

EBRINGEROVÁ, Anna *et al.* Hemicellulose. In: **Advances in Polymer Science**. [S.l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. v. 186 p. 1–67.

FATHALLAH, Walid; PUCHART, Vladimír. α -L-Arabinofuranosidases of Glycoside Hydrolase Families 43, 51 and 62: Differences in Enzyme Substrate and Positional Specificity between and within the GH Families. **Catalysts**, v. 14, n. 8, p. 536, 2024.

FLIPPIN, Michel J. A. *et al.* Cloning of the *Aspergillus niger* gene encoding alpha-L-arabinofuranosidase A. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 335–340, 1993.

FUJITA, Kiyotaka *et al.* Characterization of a Novel β -l-Arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: FUNCTIONAL ELUCIDATION OF A DUF1680 FAMILY MEMBER. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38079, 2011.

FUJITA, Kiyotaka *et al.* Characterization of a novel β -l-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a duf1680 protein family member. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 8, p. 5240–5249, 2014.

FUJITA, Kiyotaka *et al.* Role of β -L-Arabinofuranosidases in Intestinal Bacteria. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 36, n. 210, p. 2306.1E, 2024a.

FUJITA, Kiyotaka *et al.* Bifidobacterial GH146 β -l-arabinofuranosidase for the removal of β 1,3-l-arabinofuranosides on plant glycans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, 2024b.

GILBERT, Harry; WILKENS, Casper. **Glycoside Hydrolase Family 62**. Disponível em: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_62. Acesso em: 22 maio. 2024.

GONG, Ga *et al.* Metagenomic insights into the diversity of carbohydrate-degrading enzymes in the yak fecal microbial community. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2020.

GUAIS, Olivier *et al.* Characterization of the family GH54 alpha-L-arabinofuranosidases in *Penicillium funiculosum*, including a novel protein bearing a cellulose-binding domain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1007–1021, 2010.

GUNATA, Ziya *et al.* Purification and Some Properties of an α -L-Arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on Grape Monoterpenyl Arabinofuranosylglucosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 772–776, 1990.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309–316, 1991.

HOUSTON, Kelly *et al.* The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 984, p. 205693–205693, 2016.

- ISHIWATA, Akihiro *et al.* Mechanism-based inhibition of GH127/146 cysteine glycosidases by stereospecifically functionalized L-arabinofuranosides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 117054, 2022.
- ITO, Tasuku *et al.* Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 β -l-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 1, p. 32–37, 2014.
- KAUR, Amrit Pal *et al.* Functional and structural diversity in GH62 α -L-arabinofuranosidases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 419–433, 2014.
- KOMENO, Masahiro *et al.* Two Novel α -l-Arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Belonging to Glycoside Hydrolase Family 43 Cooperatively Degrade Arabinan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, p. 02582–18, 2019.
- KOSHLAND, D. E. STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. **Biological Reviews**, v. 28, n. 4, p. 416–436, 1953.
- KOTAKE, Toshihisa *et al.* Metabolism of l-arabinose in plants. **Journal of Plant Research** **2018 129:5**, v. 129, n. 5, p. 781–792, 2016.
- LUIS, Ana S. *et al.* Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. **Nature microbiology**, v. 3, n. 2, p. 210–219, 2018.
- MA, Yingxuan; JOHNSON, Kim. Arabinogalactan proteins – Multifunctional glycoproteins of the plant cell wall. **The Cell Surface**, v. 9, p. 100102, 2023.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, Sergio *et al.* Recent advances in the production of oligogalacturonides and their biological properties. **Food & Function**, v. 14, n. 10, p. 4507–4521, 2023.
- MCGREGOR, Nicholas G. S. *et al.* Structure of a GH51 α -L -arabinofuranosidase from *Meripilus giganteus*: Conserved substrate recognition from bacteria to fungi. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 76, n. 11, p. 1124–1133, 2020.
- MCINTOSH, Lawrence P. *et al.* The pK_a of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A 13 C-NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase †. **Biochemistry**, v. 35, p. 9958–9966, 1996.
- MEDEIROS, Pedro Vinícius Costa *et al.* Second-generation ethanol: concept, production and challenges. **Eclética Química**, v. 48, n. 2, p. 22–34, 2023.
- 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, 2023.
- MIYANAGA, Akimasa *et al.* Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44907–44914, 2004.
- NURIZZO, Didier *et al.* *Cellvibrio japonicus* α -L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold. <https://eprints.ncl.ac.uk>, v. 9, n. 9, p. 665–668, 2002.

OU, Shiyi; KWOK, Kin Chor. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 11, p. 1261–1269, 2004.

PALANISAMY, Ravishankar *et al.* Tapping into bioplastic potential with glucose isomerase from *Priestia megaterium* for enhanced degradation and mechanical strength. **Chemical Engineering Journal**, v. 496, p. 153679, 2024.

PARVULESCU, Vasile I. *et al.* Hydrolysis of Hemicellulose and Derivatives—A Review of Recent Advances in the Production of Furfural. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 146, 2018.

PELLERIN, Patrice *et al.* Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Research**, v. 290, n. 2, p. 183–197, 1996.

RAGAUSKAS, Arthur J. *et al.* Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, 2014.

RAJENDRAN, Karthik *et al.* Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 471–483, 2018.

RIDLEY, Brent L *et al.* Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929–967, 2001.

ROHMAN, Ali *et al.* β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5524, 2019.

SARKAR, Nibedita *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, 2012.

SHELLER, Henrik Vibe; ULVSKOV, Peter. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SEIFERT, Georg J. On the Potential Function of Type II Arabinogalactan O-Glycosylation in Regulating the Fate of Plant Secretory Proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 563735, 2020.

SHULAMI, Smadar *et al.* The l-Arabinan Utilization System of *Geobacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 11, p. 2838, 2011.

SILVA-SANZANA, Christian *et al.* Oligogalacturonides Enhance Resistance against Aphids through Pattern-Triggered Immunity and Activation of Salicylic Acid Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9753, 2022.

SOMERVILLE, Chris *et al.* Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004.

SOUZA, Tatiana A. C. B. *et al.* Structure of a novel thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 20, n. 9, p. 1632, 2011.

SUROLIA, Ragini; SINGH, Anuradha. Pectin Structure, Specification, Production, Applications and various Emerging Sources: A Review. **World Sustainability Series**, v. Part F1813, p. 267–282, 2024.

TAYLOR, Edward J. *et al.* Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*. **Biochemical Journal**, v. 395, n. Pt 1, p. 31, 2006.

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, 2023.

TU, Tao *et al.* A GH51 α -l-arabinofuranosidase from *Talaromyces leycettanus* strain JCM12802 that selectively drives synergistic lignocellulose hydrolysis. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

VAN DEN BRINK, Joost *et al.* Efficient plant biomass degradation by thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1316–24, 2013.

VORAGEN, Alphons G. J. *et al.* Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009.

WEFERS, Daniel *et al.* Enzymatic mechanism for arabinan degradation and transport in the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 18, 2017.

WILLATS, William G. T. *et al.* Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1–2, p. 9–27, 2001.

WITHERS, Stephen. **Centro anomérico (alfa e beta) - CAZypedia**. Disponível em: [https://www.cazypedia.org/index.php/Anomeric_centre_\(alpha_and_beta\)](https://www.cazypedia.org/index.php/Anomeric_centre_(alpha_and_beta)). Acesso em: 25 jun. 2024.

WITHERS, Steve; WILLIAMS, Spencer. **Glycoside Hydrolases**. Disponível em: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Classical_Koshland_retaining_mechanism. Acesso em: 22 maio. 2024.

XIAO, Meifang *et al.* Cross-feeding of bifidobacteria promotes intestinal homeostasis: a lifelong perspective on the host health. **npj Biofilms and Microbiomes** **2024 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2024.

ZHANG, Baocai *et al.* The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. **Journal of integrative plant biology**, v. 63, n. 1, p. 251–272, 2021.

ZHAO, Lei *et al.* Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115715, 2022.

SEÇÃO I

Análises *in silico*, clonagem e expressão de beta-L-arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp.

1 INTRODUÇÃO

Desde 1995 ocorre a COP, cuja abreviação representa '*Conference of the Parties*' (Conferência das Partes). É um termo utilizado para se referir às reuniões anuais das Nações Unidas que envolvem representantes de países que assinaram a Convenção das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (UNFCCC). Seu foco principal é o consenso de todos os países participantes em se tomar ações mais enérgicas quanto às mudanças globais provenientes do chamado "efeito estufa". Em 2024 a COP, na sua 29ª edição, lançou o '*Pacto Energético da ONU*' que visa aumentar a segurança energética e acelerar transições energéticas limpas, sustentáveis, justas, acessíveis e inclusivas (BRASIL, 2024). Dentre os pontos, está a necessidade da substituição do petróleo e dos combustíveis fósseis por fontes renováveis como energia eólica, solar, hidrelétrica e os biocombustíveis; tal medida favoreceria na diminuição do impacto ambiental, além de proporcionar um menor custo.

O Brasil, embora sendo um dos países membros, continua a ser considerado um país emergente, o que significa que sua economia oferece oportunidades de exploração em diversos setores, incluindo a agroindústria. Nos últimos anos, o país tem melhorado sua produtividade por meio de uma matriz mais sustentável, aproveitando suas áreas para o cultivo de culturas tradicionais, como feijão, arroz, milho, soja e cana-de-açúcar com o emprego de alta tecnologia. Estas últimas também são utilizadas em processos industriais para a produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (OLIVEIRA et al., 2020; VIDAL, 2021; CONAB, 2025), além de fornecer resíduos do processamento destes produtos, como a biomassa residual de forma abundante e renovável ao mesmo passo em que essa biomassa atrai novas pesquisas para o uso industrial (BHATIA et al., 2020; RAZA; ABU-JDAYIL, 2022).

A biomassa residual composta por uma estrutura complexa e semirrígida, constituída por hemicelulose, celulose e lignina, onde a proporção dos três componentes variam dependendo da espécie, idade, ambiente e tecido da planta (PAES, 2021). Esse conjunto desenvolvido ao longo dos anos possibilitou a evolução das plantas, através da distribuição e excreção de substâncias necessárias, manutenção e proteção celular, conferindo-lhe resistência aos ataques de patógenos, pragas e a degradação enzimática. Assim, existe uma necessidade de aprofundar as investigações, uma vez em que a hidrólise de biomassa residual em monômeros

fermentescíveis em escala industrial possui algumas limitações relacionadas principalmente ao preço e as características do substrato e ao mecanismo de ação das enzimas hidrolíticas a partir de resíduos agrícolas na degradação do material lignocelulósico, gerando um fator limitante à produção de biocombustíveis (RAMOS et al., 2020; SCARCELLA et al., 2021).

Neste contexto, a biologia estrutural e a engenharia de proteínas juntamente com a clonagem e a expressão de genes que codificam enzimas em um sistema heterólogo tornam-se potencialmente promissoras. A compreensão da estrutura molecular e a dinâmica das macromoléculas biológicas bem como o entendimento de interações e relações de estrutura-função a nível molecular possibilitam o entendimento dos mecanismos moleculares de enzimas que atuam na desconstrução da biomassa residual (PEREIRA, 2020), auxiliadas pelo uso da tecnologia do DNA recombinante para produzir proteínas de interesse. Essas tecnologias forneceram uma ferramenta econômica para a produção de proteínas, que são produzidas comercialmente na indústria usando engenharia de proteínas e engenharia genética. A capacidade de expressar e purificar proteínas recombinantes de interesse em grandes quantidades permite o estudo de suas propriedades bioquímicas, aplicações em processos industriais e produção comercial (MOHAMMADZADEH et al., 2022).

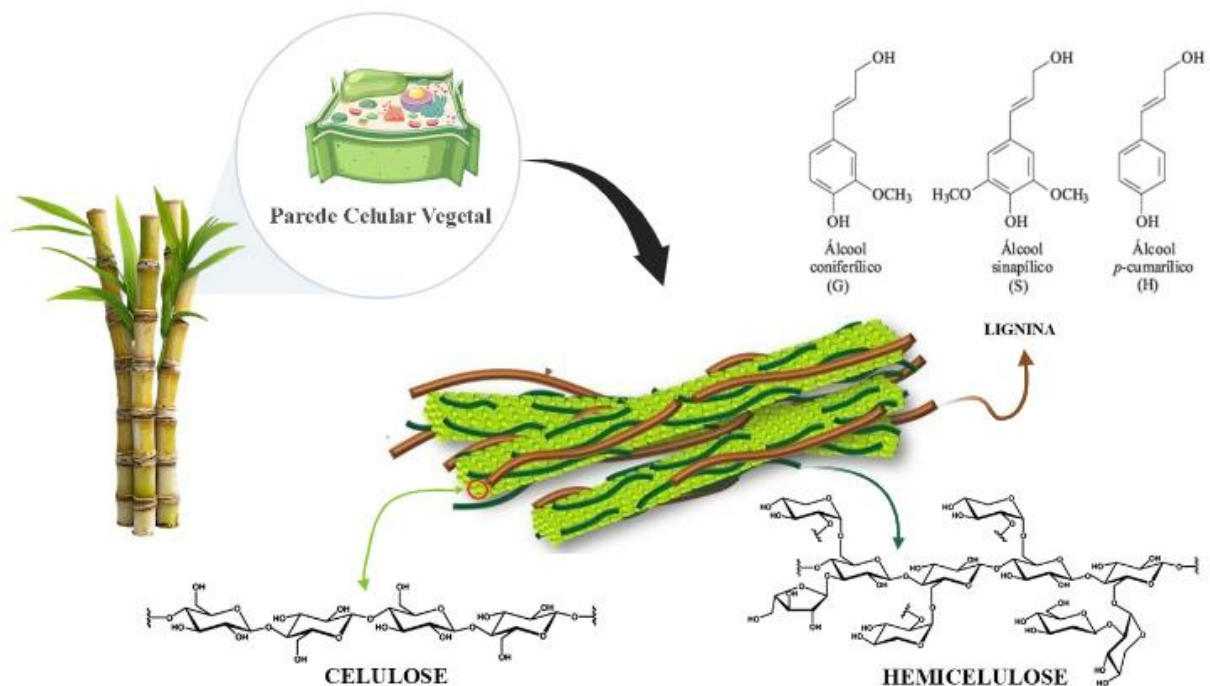
Na biotecnologia e na microbiologia, microrganismos como a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Komagataella phaffii* (antigamente denominada *Pichia pastoris*) são provavelmente os mais amplamente estudados e compreendidos geneticamente e bioquimicamente (CREGG et al., 2000; AHMAD et al., 2014; FISCHER; GLIEDER, 2019; BERNAUER et al., 2021; BASAVARAJU; GUNASHREE, 2022). De fácil cultivo e manipulação, crescimento rápido de forma fácil e barata em um ambiente controlado de laboratório sob condições adequadas, as tornaram atraentes servindo como hospedeiros para a tecnologia do DNA recombinante, assim como uma ferramenta experimental para manipulação de DNA e produção de proteínas através da expressão heteróloga para a produção de grandes quantidades de proteínas, sendo já descritos na literatura atual (BHAIYYA et al., 2023; DAI et al., 2023; BUZZO et al., 2024; CHEN et al., 2025). Neste trabalho, um gene de interesse de β -L-Arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp., foi clonado e expresso em *Escherichia coli* e *Komagataella phaffii*, e foram conduzidos processos de purificação e análise eletroforética das enzimas recombinantes, porém sem a sua caracterização bioquímica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal e/ou biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agrícolas e resíduos florestais é o recurso renovável mais abundante do mundo e é composta principalmente por celulose (35-50%), hemicelulose (20-50%) e lignina (10-35%), assim como proteínas e água (BRETHAUER; STUDER, 2015; RAZA; ABU-JDAYIL, 2022) (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura da matriz lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Brethauer; Studer, 2015; Raza; Abu-Jdayil, 2022.

A celulose é um longo polímero linear estável, composto de resíduos de D-glicopiranoose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 enquanto a hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por um conjunto de diversos polissacarídeos, que são sintetizados por meio de uma via biossintética distinta da celulose. O papel biológico desempenhado pelas hemiceluloses é fortalecer a parede celular por meio da interação com a celulose e lignina (ALCALDE et al., 2006; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; GREEN; BEEZHOLD, 2011; EL-GENDI et al., 2021) e embora tenha ligações glicosídicas β -1,4 semelhantes à celulose, se diferencia nos seus resíduos D-xilose ligadas a cadeias laterais compostas por diferentes tipos de açúcares (SCHÄDEL et al., 2010; GUERRIERO et al., 2016).

Essa arquitetura complexa e recalcitrante da lignocelulose é o fator chave que limita seu uso em larga escala (SHARMA, 2016). O direcionamento da degradação da xilana pode, até certo ponto, superar a recalcitrância da lignocelulose e, portanto, é significativo para a ampla utilização da biomassa lignocelulósica na indústria. A popularidade das enzimas levou a uma demanda crescente por coquetéis enzimáticos na indústria (LI, 2022).

1.2 O GÊNERO *CHITINOPHAGA* SP.

O gênero bacteriano *Chitinophaga* está majoritariamente presente em comunidades microbianas provenientes no solo. Pertencentes ao Filo Bacteroides, no Brasil, essas bactérias são encontradas em áreas destinadas às culturas agrícolas, dentre elas a cana-de-açúcar. A denominação de seu gênero provém da sua característica de degradação de quitina, sendo um aspecto de interesse quanto à degradação da biomassa (LARSBRINK et al., 2017; FUNNICELLI, 2018; BUZZO et al., 2024).

A família Chitinophagaceae é formada por bactérias do tipo Gram-negativas, não patogênicas, mesófilas e podem apresentar forma filamentosa ou esférica, assim como a formação de mixósporos, um agregado com uma parede celular sólida, resultando em uma maior taxa de sobrevivência por longos períodos, e germinando quando o ambiente proporciona alta disponibilidade de nutrientes (BUZZO et al., 2024). A bactéria tem um genoma comparativamente grande, que inclui muitas enzimas ativas de carboidratos não caracterizados. Larsbrink et al., 2017 apresentou a primeira avaliação proteômica da maquinaria de degradação de biomassa dessa espécie, tanto seu foco na manana, uma das hemiceluloses abundantes na parede celular vegetal e consequentemente descobriram novas enzimas promissoras para caracterizações bioquímicas. Funnicelli, 2018 por meio da análise de similaridade, obteve dados com 95% de confiança de isolados CB10. Menezes, 2019 obteve três ORF correspondentes a arabinofuranosidases a partir do sequenciamento, tendo como critério, a presença de domínios conservados, pois são fundamentais para o funcionamento adequado da enzima.

Atualmente, a família Chitinophagaceae já é bastante reconhecida e usada na indústria, seja para degradação de biomassa (YASIR et al., 2011) e aroma de alimentos (NAWRATH et al., 2010).

1.3 DETERMINAÇÃO E PREDIÇÃO DAS ESTRUTURAS

As proteínas são macromoléculas mais abundantes das células, sendo constituída por uma sequência de aminoácidos, comumente denominada estrutura primária, que forma uma cadeia polipeptídica por meio da polimerização representada por uma reação de condensação e suas funções estão diretamente relacionadas com a sua estrutura nativa (DORN, 2008; MORAIS, 2010).

As proteínas acompanharam o avanço de pesquisas voltadas às áreas biológicas, que consequentemente acarretou num grande volume de dados sendo analisados, armazenados e disponibilizados para demais pesquisadores, cujo crescimento e atualização é exponencial (BALDI; BRUNAK, 2001). Para que as proteínas possam exercer suas funções, é necessário o seu enovelamento em uma forma tridimensional muito específica, podendo esta ser prevista através de ferramentas de inteligência artificial (IA) como AlphaFold, AlphaFold2 e RoseTTAFold, através do dogma de Anfinsen e baseadas em redes neurais profundas, sendo o tamanho do espaço conformacional, um dos principais desafios para estes métodos (AGARD et al., 2022; LEE et al., 2022; HUANG et al., 2023; PAIXÃO et al., 2023; WANG et al., 2024).

Dentre os avanços tecnológicos esta as simulações de dinâmica molecular (DM) que consiste numa metodologia *in silico* computacional de alta relevância na caracterização detalhada de sistemas biomoleculares. Tal metodologia é baseada na resolução de equações de movimento de Newton, ou seja, como cada átomo interage teoricamente com todos os outros átomos em um determinado sistema dentro de um período específico. Sua aplicação é ampla, e podem ser utilizadas nas interações de lipídio-proteína, lipídeo-fármaco, proteína-ligante e estrutura e dinâmica de proteína através de programas computacionais como CHARMM, NAMD, Amber, GROMOS e GROMACS, sendo este o software ajustado para hardware comum, cujos resultados podem ser interpretados através dos programas “*Visual Molecular Dynamics*” (VMD) e “*MDplot*”, cujo objetivo consiste em visualizar e destacar os sítios de ligação e características estruturais importantes da molécula exibida, assim como integração termodinâmica e monitoramento de ligações de hidrogênio ao longo do tempo (FILIPE; LOURA, 2022; KNAPP et al., 2010).

As medidas de mobilidade mais comuns calculadas a partir de simulações são o desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF) e raio de

hidrodinâmico (R_g), seu cálculo ocorre após o alinhamento das coordenadas atômicas em cada etapa da trajetória a uma estrutura de referência, sendo considerados indicadores chave amplamente utilizados (MARTÍNEZ, 2015; SARGSYAN et al., 2017; COUTSIAS; WESTER, 2019).

1.4 *ESCHERICHIA COLI*

Embora descoberta pelo pediatra alemão Theodor Escherich (1857-1911) em 1884, a *Escherichia coli* (*E. coli*) foi inicialmente considerada como *Bacillus* até 1895, sendo então renomeada em homenagem ao seu descobridor em 1919 e só sendo reconhecida oficialmente após revisão de nomenclatura em 1958. A *E. coli* é uma bactéria em formato de bastonete, com 0,35 μm de largura e 1 μm de comprimento, entretanto seu diâmetro varia a partir da cepa ou do ambiente. Gram-negativa, não esporulada, anaeróbica facultativa, e móvel devido ao arranjo flagelar peritricoso, pertence ao gênero *Escherichia*, família *Enterobacteriaceae* (ALLOCATI et al., 2013; FENG et al., 2020; YU et al., 2021).

Com a sequência completa do genoma, facilidade de obtenção, meios de cultura relativamente baratos, manuseio e crescimento tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas em laboratório, ferramentas moleculares para manipulação e escalabilidade industrial à tornaram um organismo procarioto mais amplamente estudado nos domínios da biotecnologia e microbiologia. O genoma da *E. coli* sofre constantes mudanças devido ao fluxo contínuo de inserções e deleções genéticas, e seu tamanho pode variar em até 1,9 Mb, codificando aproximadamente 4.000 a 6.500 proteínas, com regiões de suscetibilidade a antibióticos por exemplo, além plasmídeos e elementos de sequência de inserção, sendo de grande interesse para a indústria e a medicina através da tecnologia do DNA recombinante, ferramenta para manipulação de DNA e produção de proteínas (IDALIA; BERNARDO, 2017; POOLMAN, 2017).

Algumas estratégias para alcançar altos níveis de expressão gênica em *E. coli* foram revisadas por Makrides, 1996 e Baneyx, 1999. E uma vez desenvolvido e otimizado um sistema de expressão adequado envolvendo *E. coli*, a produção em larga escala de proteínas recombinantes gera grandes quantidades de material de cultura a partir do qual a proteína de interesse pode ser purificada (PALMER; WINGFIELD, 2004).

1.5 KOMAGATAELLA PHAFFII

A *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica de formato oval, com 1 a 5µm de largura e 5 a 30µm de comprimento. Sua parede celular é composta de polissacarídeos (30 a 60%), proteínas (15 a 30%), lipídeos (5 a 20%) e uma pequena quantidade de quitina (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

O sistema de expressão com *Pichia pastoris* possui uma variedade de ferramentas para produção de proteínas recombinantes. Dentre elas estão, o seu fácil manuseio, promotores fortes e cultivo de alta densidade celular associados a via secretora clássica, ou seja, seus peptídeos são direcionados para a via secretora por fusão à sinais de secreção homólogos ou heterólogos. Isso permite a produção de proteínas complexas que requerem modificações pós-traducionais, como formação de ligações dissulfeto ou N- e O- glicosilação, resultando em proteínas recombinantes relativamente puras. As cepas também podem ser usadas com antibióticos (Zeocina ou Canamicina), e diferentes fenótipos de utilização de metanol (Mut+, MutS, Mut-), influenciando no tipo de proteína bem como no seu desenvolvimento de bioprocessos. Tais características à tornam mais do que uma alternativa à *Escherichia coli* e outras linhagens de células de mamífero para produção de proteínas recombinantes (FELBER et al., 2014; HEISTINGER et al., 2020). Durante décadas, a levedura metilotrófica *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) era considerada como pertencente ao gênero *Pichia* e, portanto, chamada de *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). Em 1919, Alexandre Guilliernond atribuiu a primeira cepa isolada a partir do exsudato de uma castanheira francesa, sendo originalmente denominada de *Zygosaccharomyces pastoris* (GUILLIERMOND, 1940). Nos anos 50 Herman Phaff isolou outras linhagens em carvalhos negros na Califórnia-Estados Unidos, e renomeou a espécie como *P. pastoris* (PHAFF et al., 1956).

No entanto, em 1995, devido às comparações de sequências parciais de rRNAs e 26S mostrando diferenças entre a *P. pastoris* das demais leveduras assimiladoras de metanol, fizeram com que todas as cepas de *P. pastoris* fossem movidas para um novo gênero, *Komagataella* (KURTZMAN, 1984; YAMADA et al., 1995) e posteriormente separadas em duas espécies (KURTZMAN, 2005): *K. pastoris* (que inclui a linhagem francesa) e *K. phaffii* (que inclui os isolados americanos), sendo esta última assumindo então sua classificação até os dias atuais, e consequentemente comercializada mundialmente através de empresas como a Phillips Petroleum

Company em 1970 (desenvolvedora do sistema de cultura), e a Invitrogen (San Diego, USA) voltadas para a venda de componentes do sistema de expressão em pesquisas aplicadas para a indústria farmacêutica e biotecnológica (DLAUCHY et al., 2003; KURTZMAN, 2005, 2008, 2009; AIZEMBERG, 2011; ATA, 2017; BERNAUER et al., 2021). Bernauer et al., 2021 ressalva que as ciências aplicadas ainda usam preferencialmente o nome *P. pastoris*, muitas vezes como sinônimos de todas as espécies de *Komagataella*, enquanto os estudos fundamentais passaram a usar o nome correto, *K. phaffii*. Tal levedura possui características importantes e de interesse do ponto de vista biotecnológico (ARRUDA, 2008; FELIX, 2008; AIZEMBERG, 2011; LINHARES, 2021), médico (COIMBRA, 2007; SILVA, 2010; BALBINO, 2011) e industrial (CARNEIRO, 2018). Uma vez em que é uma levedura aeróbica e metilotrófica obrigatória, ou seja, pode metabolizar o metanol como única fonte de carbono e energia. Ainda assim, análises mais detalhadas do alinhamento de sequências e previsões de domínios proteicos foram feitas para estender a anotação funcional do genoma a todas as sequências (VALLI et al., 2016).

A *K. phaffii*, é um dos mais importantes sistemas de produção de proteínas heterólogas, devido a sua capacidade de crescer em uma densidade celular muito alta em meios simples, assimilando metanol através do seu sistema, que está ligado a álcool oxidase (AOX) como primeira enzima de assimilação do metanol, esse AOX é codificado por dois genes, AOX1 e AOX2 (CREGG et al., 1989; ROMANOS, 1995; ZAHRL et al., 2017). Uma das características mais comuns para a expressão gênica (induzida por metanol) é integrar um gene recombinante na região AOX1 (INVITROGEN, 2014). Embora tenha sido aprovado ser um *locus* de fácil localização para inserção de genes, o AOX também cria uma cepa com fenótipo *Methanol utilising minus* (MutS). Tais cepas MutS ainda crescem lentamente em metanol devido a expressão de AOX2, mas direcionam a força do promotor AOX1 principalmente para a produção de proteínas RECOMBINANTES (KURTZMAN, 2009; BERNAUER et al., 2021). Esses mecanismos levam a *K. phaffii* ser mais vantajosa que a *Saccharomyces cerevisiae*, por um microrganismo unicelular de fácil manipulação e cultivo, com melhor tolerância térmica e osmótica, crescimento que atinge densidades celulares extremamente altas, secreção de proteína eficaz e a capacidade de expressar proteínas recombinantes em altos níveis promotores constitutivos e induzíveis. No entanto, sua secreção ainda é complexa e não depende de fatores como dosagem de genes e fenótipos Mut, mas também de outros fatores que afetam o rendimento e a

qualidade do produto, como o processamento proteolítico, dobramento, formação de ligações dissulfeto e glicosilação (ROMANOS, 1995; CREGG et al., 2000; KARBALAEI et al., 2020).

1.6 VETORES DE EXPRESSÃO

Estão atualmente disponíveis no mercado diversos sistemas que permitem a expressão heteróloga de proteínas. Onde cada vetor deve ser analisado para criação de um sistema de expressão que atenda às necessidades da pesquisa (SILVA, 2010).

A configuração padrão dos vetores é sistema bifuncional que permite a replicação em *E. coli* e a manutenção em *P. pastoris*, possuindo algumas características como: cassete de expressão (promotor que pode ser induzido ou constitutivo); sequência de replicação autônoma ou por integração (expressão intracelular); marcador de seleção conferindo resistência a antibiótico (Zeocina™, geneticina (G418) e blasticina S.) ou marcadores de auxotrofia (HIS4, MET2, ADE1, ARG4, URA3, URA5, GUT1) e sítios de restrição únicos facilitando a aderência do inserto com a sequência do DNA pretendida. Outra característica que pode ser encontrada em vetores de expressão são sequências utilizadas para facilitar a detecção ou purificação da proteína expressa, como as sequências His₆ e myc. Estas duas “etiquetas” (*tags*) permitem a detecção da proteína expressa usando anticorpos específicos para estas duas sequências e, no caso do His₆, a cromatografia por afinidade em resinas Ni-NTA (ARRUDA, 2008; FELIX, 2008; AHMAD et al., 2014).

Alguns vetores de expressão para *P. pastoris* possuem, ainda, características especiais para funções especializadas, como a secreção de proteínas heterólogas. Neste caso, após a região promotora existe uma sequência sinal responsável pela internalização da proteína expressa no retículo endoplasmático onde a mesma é direcionada para a via de secreção (ARRUDA, 2008). Dentre a variedade de vetores, o uso dos vetores pGAPZα A, B e C, se tornam vantajosos, pois apresentam 3,3 kb, estrutura composta de promotor pAOX1 para expressão, sendo fortemente regulada e induzida por metanol, do gene de interesse, gene de resistência a Zeocina™, peptídeo C-terminal contendo as regiões codificadoras do epítipo c-myc e uma poli-histidina tag (6xHis) para detecção e purificação de proteína de fusão recombinante (INVITROGEN, 2010).

1.7 PRODUÇÃO DE ARABINOFURANOSIDASES RECOMBINANTES

A produção de proteínas recombinantes já é uma técnica muito utilizada em pesquisas acadêmicas, sendo levada para diversos campos da indústria, principalmente farmacêutica e agricultura. Estima-se que a América do Norte lidere o mercado de proteínas recombinantes, devido ao aumento de gastos em pesquisas, aliados a presença de infraestrutura. A produção atualmente envolve cinco principais líderes de mercado global, estimado em 2024 em US\$ 2,69 bilhões e devendo atingir US\$ 3,94 bilhões até 2029, com crescimento anual de 7,91% (MORDOR INTELLIGENCE, 2023). Seu processo envolve a clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão sob controle de um promotor induzível, após expressa e purificada se obtém a molécula biologicamente ativa (MAKRIDES, 1996; FILHO, 2010).

Dentre os vários sistemas de expressão heteróloga, a bactéria *E. coli* ainda se mantém como a principal opção. Entretanto, ainda apresenta algumas desvantagens como baixa concentração, formação de corpos de inclusão, toxicidade, resistência a antibióticos e incapacidade de realizar as modificações pós-traducionais, principalmente na acetilação não enzimática, pois embora a *E. coli* possua milhares de sítios de fosforilação e acetilação, sua complexidade em distinguir acetilação enzimática e não enzimática afetam diretamente na modificação química dos resíduos de lisina (ROSANO; CECCARELLI, 2014; SCHASTNAYA et al., 2023; ARAÚJO et al., 2024).

Outro sistema de expressão heteróloga acabou se desenvolvendo ao longo dos anos, e com o seu sequenciamento promoveu um conjunto de ferramentas tornando a *K. phaffii* (*P. pastoris*) um sistema facilmente comercializado para a comunidade científica. Diferente da *S. cerevisiae* o sistema que utiliza a *K. phaffii* possui a capacidade de controle de expressão, sendo esta induzida ou regulada. O crescimento aeróbico ainda proporciona altas concentrações celulares, realização de modificações pós-traducionais, processamento proteolítico, formação de pontes dissulfeto. Ainda possibilita a expressão extracelular, cuja presença da proteína livre no sobrenadante facilita e agiliza a obtenção da mesma (GASSER ET AL., 2013).

Embora os estudos sobre a produção de Arabinofuranosidases recombinantes já serem recorrentes, ainda são escassos na literatura trabalhos que englobam a β -L-Arafase (FUJITA et al., 2014; ITO et al., 2014; TAO et al., 2023).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar estrutural e funcionalmente uma beta-L-Arafase de *Chitinophaga* sp. codificada por um ORF proveniente da prospecção de dados metagenômicos. Neste contexto, os seguintes objetivos foram definidos:

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar análise *in silico* de uma sequência codificadora de Arafases a partir do banco de dados, construído a partir de um consórcio microbiano;
- Expressar o gene codificador da enzima em *Komagataella phaffii*;
- Efetuar a extração e purificação da enzima por meio de cromatografia de afinidade com metal imobilizado e exclusão molecular;
- Construir modelo da estrutura tridimensional da proteína através da análise de bioinformática para a caracterização do bolsão de cada enzima, além dos resíduos envolvidos na ligação ao substrato;
- Fazer simulações de dinâmica molecular da enzima em diversos pH, temperatura e solventes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA SEQUÊNCIA DE β -L-ARAFASE

A sequência codificadora da enzima β -L-Arafase foi selecionada a partir do banco de dados (CB10), construído a partir do sequenciamento de um consórcio microbiano efetuado na UNESP de Jaboticabal e gentilmente concedido pelo prof. Dr. Luciano Kishi. Essa sequência foi prospectada por sua similaridade e analisada *in silico*, sendo ela a CB10_2.116.

No entanto, foram realizadas alterações estruturais necessárias na sequência (Figura 8), a fim de evitar problemas no processamento da proteína heteróloga na *E. coli* e *K. phaffii*. Essas modificações incluíram a eliminação do peptídeo sinal na porção 5' do gene e a substituição pelos sítios de processamento para Kex2 e Ste13 (verde) que possuem sítio de XhoI (CTCGAG) na sua extremidade (azul). Além disso, um sítio para Sall foi adicionado na região 3' em fase com os códons das 6 histidinas já presentes no vetor. Por fim, um sítio interno para BspHI foi eliminado (amarelo) sem alterar o aminoácido (fenilalanina), sendo útil para a integração do vetor.

Figura 8 - Alterações para desenho do gene sintético.

```

CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAAGCAGCCGCCCTTCCCTTGAGCGCTGTACATATAAACG
CGGGGCCCTTCTGGAGGCGCGCCGACGGATGAAAAGTACATCCTTCCCTTGACGCGGACAG
GCTACTGGCCCCCTTCTGGAAGGAGCGGCCCTGCAGCCTGTAAAAGATAGTTACGGCAACTGG
GAAAAGACGGGCTGAACGGCCACATCGGGGCCATTATTTATCCGCGCTTGCGCTGATGTATG
CCAGCACCAGGCAATGAAAGTGTACCATCAACGACTGCAATACATGCTGGACCAGCTGGAACGTTG
CCAGCAGGCCAACAAAAACGGCTATATCGCGGCTGTCCAAACGGCAAGCCGTTTGGGACGAA
GTGGCTGCGCGCAATGTACAGCGGCTGAAAAAGCGCTGGGTGCCCTGGTACAACTGCATATAAA
CCTACAACGGGCTGCTGGACGCTATCGCATGACCGGCTCCGCGCAGGCGCTGCGCATGCTCAC
CGGTATGTGCAACTGGGCGCTGCAACTGACGGCCATCTAACCGACGCGCAATCGAGGAATG
CTGCAGGAAGAATCGGGGCGATGAACGAAGTATTTGCCGCGCTGGCGGAGATCACCGGCAACC
AGCAATACATGCAGCTGGCAGGCGCTTTTACACCGGGCGCTTTATGAACCGCTGCATAGCCA
TACGATAAACTCACTGGCCTGCATGCCAACACGCAATACCGAAAGTAGTCGGGTTTCATGGAG
ATAGGTACCGTTGCCAGGGACAGCGCCATGTCCGATGCGGCGCGCTTCTTCTGGCAACCGGTGG
TGAAACCGCGCGAGCGTGGCCTTTGGGGGCAACAGCGTGGGGAAACCTTTAACCCGCTGGATAA
CTTTATGACTGTGCTGGAAAGCCGGGAAGGGCTGAAACCTGCAACAGCTACAATATGCTGAAG
CTCACAAAACCTCCTGTCTGCAACATCCGAAAAGCAGCTACCTGGATTATTTATGAACGCACCC
TCTACAATCATATTTCTCGCTTCCAGCATCCGGACCGCGGCTTCGTGTATTTTACGCCCATCCG
CCCGATGCATTACCGCGTGTATTTCCCGCAGCCAGGACTGCTTCTGGTGTGCTAGGTACGGGG
CTGGAAAACACGCCAAATACGGAGAGCTGGTATATGCGCATGATAGCAGCAGCCTGTATGTAA
ACCTGTTTATCGACTCGGATGTGCGCTGGAAAGAAAAGGCATTAAAGCTTATTCAGCACAGGAA
TTTTCCCTTTGAACCCAGGACGCGAGCTCACCGTATCAGTAGCCAGCCCTCAGGCATTTCACGCTG
CGGGTAAGGAAACCGCGTGGCTATCGGAACGACCCGCTCGTGAGATAAACAAACCGGACGATAC
CACTGGCTGTAGGTGAAGATGGTTTTTCTCCATCACCAGAAATTTGGAAAAATAATGATAAAGT
GACCATGACCCCTCCCATGCAAAACCGCCTGGAACCTTTACCGGACGCGCAGCCGCTGGGCAGCC
CTGGTACATGGCCCGATTGTGCTCGTGGCAACGGATTCCGCGAAGCTCAATACCATCGCGGATG
GGAGCCGCTGGGGCCACATTGCCAACGCGCCGCTCAAAACCCCTGGAAGATGCGCCCATGCTGAT
GACGGACAGCACGCGAGTAACGCTGCAGCCACCCCGCGCCCATGGAGTTTACCGCTGCGCGC
CTCATCTGGCAGCAGCCGTATAAGCAACTGGTGTGTAACCTTTCTTCCAGGCGCATGACGCC
GCTATGTGATGACTGGCCGTACGGCAACAGCAGGAGATCAACGCCATGCAGCAGCGCTGGC
CGCGAAAAATGCCGCCAGGGAAGCGATCGAAGCCGCCACGCTGGAGCTGGTGCACCTGGGCGAG
CAACAACCGGAATCAGACACCGGCTGCAATCGGACAATACGGCCACCGGCTTGTACGAATGGC
AACACTTCCGCCAGGGCAAGGATGGTTTAGCGTGGTGTGCAAAAATAAAACAGCAGGGCAA
AATGCTGCTGGTGAATATTTGAGCGATGATAAGAAAACTCTTCACTATTTCCGTGCAACGGG
AAAGTACTCCGGGAAGTGACGACGGAGAAGGAAGGACGCCGCGATACGCCAGGTGCAGGTGG
CCTTGCCGGAAGGCGCTGCAACAGCCGAGCTAACGCTGACCATCAGCGCTACCCGCAACCG
CGATATGGGCGGATAGGAGAAATCCGTTGCTGGGCGATATCAGCAACCGCTAAACGAGTC
GAC

```

Fonte: Autoria Própria

3.2 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA POR ANÁLISES COMPUTACIONAIS

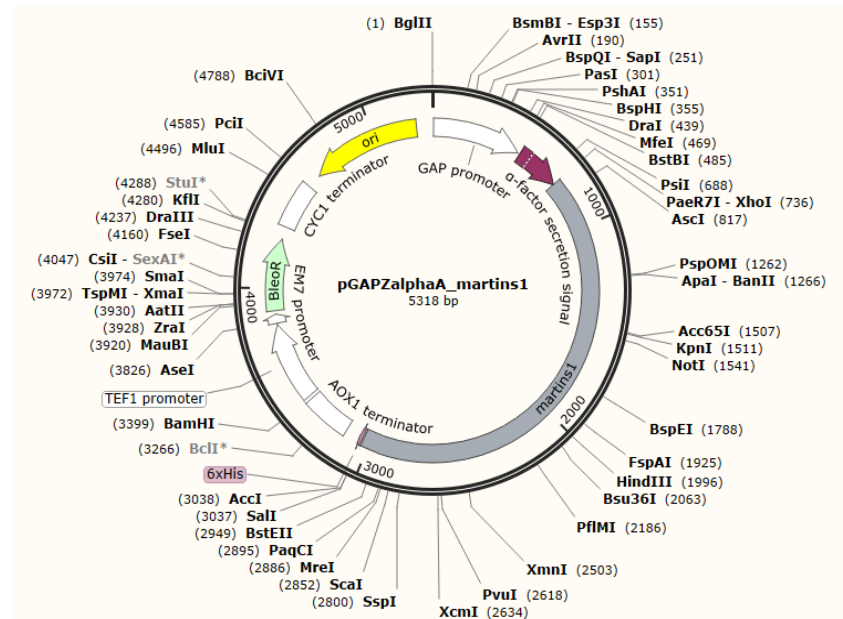
As coordenadas iniciais da proteína com e sem a cauda de histidina (His-tag) submetidas à dinâmica molecular foram obtidas por modelagem estrutural, usando o programa AI (RoseTTafold) (BAEK et al., 2021). Simulações de dinâmica molecular foram realizadas usando o GROMACS/5.1.4 (VAN DER SPOEL et al., 2005), com campo de força GROMOS54a6 (OOSTENBRINK et al., 2004). O sistema foi solvatado com o modelo de água SPC em uma caixa cúbica, onde a proteína estava centralizada a pelo menos 1 nm da borda. O sistema foi neutralizado com Na^+ e Cl^- . A minimização de energia foi realizada com o algoritmo de *steepest descent* com 5.000 passos e uma tolerância de 10 KJ/mol.

A primeira etapa do equilíbrio, realizada no *ensemble* NVT, levou 100 ps de simulação a temperaturas constantes de 30, 50, 70 e 90 °C (acoplado a termostato de Barendsen modificado). As velocidades aleatórias foram geradas pela distribuição de Maxwell-Boltzmann. O segundo estágio de equilíbrio, realizado no *ensemble* NPT, levou 100 ps de simulação a temperaturas constantes de 30, 50, 70 e 90 °C e pressão de 1 atm (acoplado ao barostato Parrinello-Rahman). As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com passos de 2 fs usando o algoritmo Leap-Frog para integrar as equações de movimento. Os resultados são expressos como a média das três simulações.

3.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE B-L-ARAFASE EM *ESCHERICHIA COLI* (DH10 β) E *KOMAGATAELLA PHAFFII* (X33)

3.3.1 Vetor de expressão

O plasmídeo de expressão (CB10_2.116) (Figura 9) foi desenvolvido pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, RJ), utilizando as enzimas de restrição AvrII e BspHI para digestão previa do vetor pGAPZ α A para expressão em *K. phaffii*.

Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pGAPZαA_CB10_2.116.

Fonte: Imagem fornecida pela empresa GenOne®

3.3.2 Transformação de *Escherichia coli* com o plasmídeo

Foi realizada por método do choque térmico, seguindo o protocolo Invitrogen (versão F, 2002), onde 100 µL de bactérias competentes foram misturadas a 400 ng do plasmídeo de expressão pGAPZαA_CB10_2.116. Em um eppendorf de 2 mL, a mistura foi mantida em gelo por 10 minutos, seguido por 40 segundos em banho maria a 42 °C, gelo por mais 10 minutos. Após, adicionou-se 1 mL de meio LB (10% Triptona; 10 % NaCl; 5% Extrato de levedura) sem antibiótico, e as células transformadas foram incubadas a 37 °C, com agitação de 200 rpm, por 1 hora para regeneração. A mistura foi então centrifugada por 1 minuto a 12.000 ×g³ para sedimentar as bactérias. Posteriormente, retirou-se 800 µL do sobrenadante, e ressuspendeu o *pellet* no restante do meio, sendo então o conteúdo plaqueado em diferentes volumes (10, 20, 50, 100) de forma duplicada em placas de ágar LB Low Salt (10% Triptona; 5% NaCl; 5% Extrato de levedura - pH 7,5) com antibiótico (Zeocina 50 µg/mL), e incubado a 37 °C overnight. O conteúdo restante da cultura foi estocado em microtubos de glicerol (20% v/v), submetidas a congelamento e armazenamento a -80 °C.

³ A rotação na centrifuga foi transformada em Força Relativa pela equação $RCF = 11.2 \times \text{raio do rotor} \times (\text{RPM}/1,000)^2$, onde o raio é medido em cm (HETTICH, 1937).

3.3.3 Purificação e quantificação do DNA plasmidial

A purificação e quantificação do DNA plasmidial foi realizada com a finalidade de confirmar a transformação das células realizadas na seção (4.3.2). Seguindo o protocolo do “kit easypure® plasmid miniprep (Trans Gen Biotech)”, que usa um método de lise celular alcalina modificado para isolar DNA plasmidial de alta qualidade. As colônias que cresceram no processo de transformação foram colocadas em frasco Erlenmeyer (50 mL) com 20 ml de meio LB de baixo sal (*low salt LB medium* - pH 7,5) com o antibiótico (Zeocina 50 µg/mL), e colocados para crescer na estufa a 37 °C, 180 rpm, até o dia seguinte. Os crescimentos foram redistribuídos em microtubo Eppendorf de 2 mL e seguiram para a centrifuga por 1 minuto a 10.000 ×g, descartou-se o sobrenadante, sendo o *pellet* ressuspensionado em 250 µL de tampão de ressuspensão (RNase A) e agitado em vórtex até que as bactérias fossem redistribuídas no líquido, foi então adicionado 250 µL de tampão de lise (LB) em seguida 350 µL de tampão de neutralização (NB), seguiu para a centrifuga por 5 minutos a 12.000 ×g, sendo feita a transferência do sobrenadante para uma coluna de rotação e novamente centrifugado por 1 minuto a 12.000 ×g nas mesmas condições, descartando-se o sobrenadante. Na sequência, foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem (WB com etanol) e centrifugado por 1 minuto a 12.000 ×g descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se por fim, 50 µL de tampão de eluição (EB) pré-aquecido a 65 °C em banho maria (recomendado para maior rendimento), então seguindo para centrifugação por 1 minuto a 10.000 ×g. O DNA plasmidial puro seguiu para as etapas de quantificação em aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) e eletroforese desnaturante.

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

A análise em gel de agarose foi utilizada para análise dos fragmentos de DNA extraídos na seção 4.3.3. A agarose foi preparada na concentração 1,5% (p/v) em tampão de corrida TAE 1X suplementado com brometo de etídio para uma concentração final de 25 µg/mL. O tampão de carregamento DNA gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific®) foi diluído nas amostras de DNA para concentração final de 1X. As amostras e o marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®) foram aplicados no gel e submetidos a eletroforese com voltagem ajustada em 100 V por 1 hora em equipamento Hoefer Scientific Mighty Slim SX250 DC Power Supply®.

Para visualização das bandas de DNA, o gel foi exposto à luz ultravioleta através de um Transiluminador.

3.3.5 Transformação de *Komagataella phaffii* com o plasmídeo

Primeiramente foram preparadas células competentes de levedura *K. phaffii* crescidas em placas YPD (1% Extrato de levedura; 2% Peptona; 2% Dextrose; 2% Agar) até o aparecimento de colônias. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias isoladas frescas para um pré-inóculo com 10 mL de YPD em Erlenmeyer (50 mL), sendo incubadas a 30 °C overnight. Posteriormente, foi medido sua O.D.₆₀₀ e calculado o volume utilizado para o inóculo levando em consideração o tempo de geração de 2 horas, sendo assim, o volume programado foi de 200 mL de YPD em Erlenmeyer (500 mL). Quando o inóculo atingiu a O.D.₆₀₀ esperada (0,4-0,6), foi feita uma imersão no recipiente no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células foram centrifugadas a 1.500 ×g por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 200 mL de água gelada e centrifugado nas mesmas condições anteriores, ou seja, o *pellet* foi ressuscitado em 100 mL de água estéril gelada por 2 vezes. Após a centrifugação nas mesmas condições as células foram ressuscitadas em 10 mL de sorbitol 1 mol L⁻¹ mantido no gelo. Sendo então distribuídas em alíquotas em microtubos Eppendorf e mantidas no gelo até sua utilização.

Subsequentemente foram misturados 80 µL de células competentes com aproximadamente 10 µg de DNA linearizado. A mistura foi colocada em cubetas de 0,2 cm e incubadas por 5 minutos no gelo. A eletroporação foi realizada de acordo com o Protocolo Invitrogen (versão F, 2002), com os seguintes parâmetros: 1.500 V, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado na cubeta e o conteúdo transferido para tubo estéril de 1,5 mL. Na sequência foi feita incubação a 30 °C sem agitação por 1 hora e, adicionado 1 mL de YPD e incubado a 30 °C sob agitação de 200 rpm por mais uma hora para permitir a expressão do gene que confere resistência a Zeocina. Foram plaqueadas de 50 a 200 µL do sistema de transformação em placas de YPD enriquecido com 1M de sorbitol e antibiótico (Zeocina 100 µg/mL) e incubadas até o aparecimento das colônias (entre 5 a 7 dias). O conteúdo restante seguiu para estoque seguindo o mesmo protocolo adotado para *E. coli*.

3.3.6 Ensaios de expressão da proteína recombinante

Para os ensaios de expressão, foram retiradas colônias do estoque em glicerol e estriados em meio YPD, enriquecido com Zeocina (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 28 °C durante 72 horas a 30 °C sob agitação a 200 rpm por até 120 horas. A cada 24 horas, alíquotas de 2 mL foram retiradas da cultura e estocadas em microtubos Eppendorf (2 mL). Após a contagem celular (O.D.₆₀₀), as amostras foram centrifugadas a 17.800 ×g por 5 minutos, sendo o “*pellet*” descartado.

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% para avaliação da expressão da enzima. Após os ensaios serem analisados, a melhor condição determinada foi adotada em maior escala, sendo feita em 1 litro, e todo o conteúdo centrifugado para etapa de purificação.

3.3.7 Análise de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante segundo Laemmli, (1970) no sistema de eletroforese da GE Healthcare. A preparação das amostras foi realizada com uma diluição em tampão de amostra (Biorad) na proporção 1:1. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em banho de ebulição e aplicadas (20 µl) no gel de poliacrilamida 12%. A corrida para separação das proteínas foi realizada a 90 volts nos primeiros 30 minutos e depois 110 volts até a descida completa das proteínas no gel.

Após a eletroforese, o gel foi corado com a solução de *Coomassie blue* durante a noite sob agitação e, posteriormente, descorado com a solução descorante (*solução de ácido acético 10%*), também sob agitação.

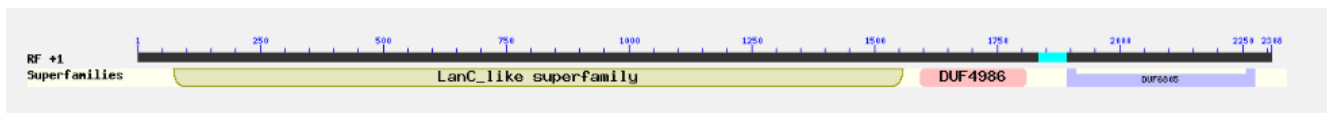
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA β -L-ARAFASE HETERÓLOGA DA BACTÉRIA *CHITINOPHAGA* SP. CB10_2.116. PARA PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA ARAFASE RECOMBINANTE

Após sequenciamento e comparação da sequência obtida com as disponíveis no bando de dados GenBank (Figura 10), constatou-se que o inserto apresenta 2301 nucleotídeos em sua composição e elevada similaridade com sequência codificadora de uma glicosil hidrolase pertencente à família 127, do microrganismo *Chitinophaga* sp, (número de acesso: WP_291911533.1, E-value: 0.0, identidade: 100 %). A sequência inicia com um códon AAG e possui o códon CAA em sua porção final.

De acordo com o banco de dados CAZy, que reúne enzimas envolvidas na quebra, modificação ou criação de ligações glicosídicas, agrupando-as em diversas famílias (LOMBARD et al., 2014), enzimas classificadas na família 127 são β -L-Arafases.

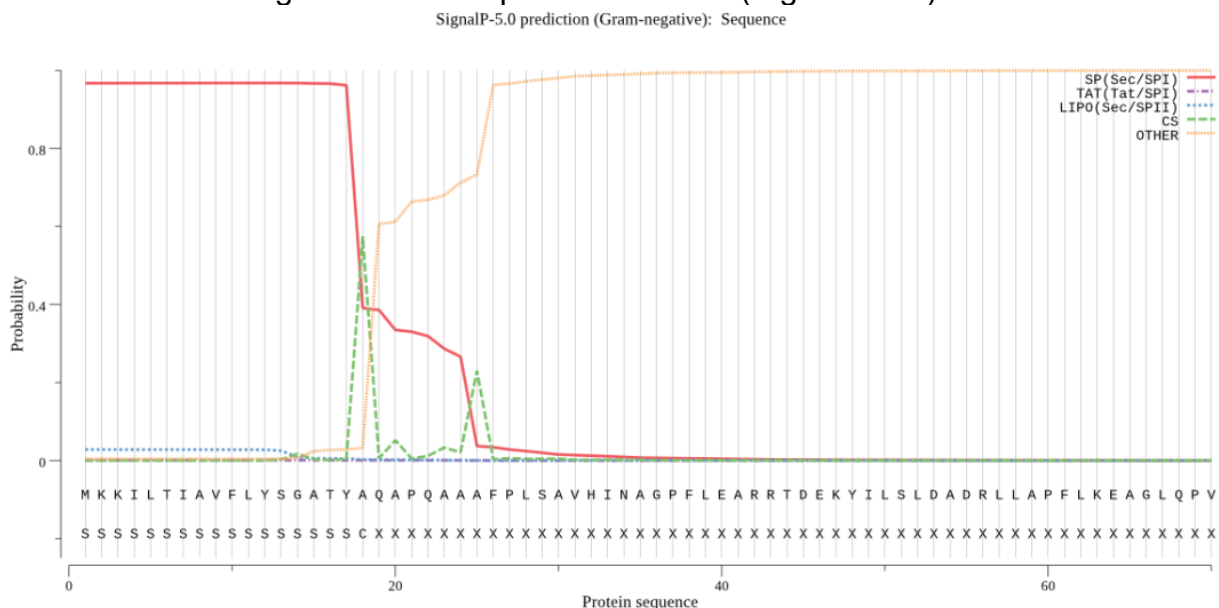
Figura 10 - Comparação da sequência de aminoácidos obtida com sequências disponíveis no banco de dados GenBank NCBI, indicando que a proteína pertence à família GH127.



Fonte: Autoria Própria

Sítios de restrição presentes na sequência de nucleotídeos também foram identificados através do Nebcutter (Figura 11). Esta etapa foi essencial para a seleção das enzimas de restrição a serem utilizadas para digestão do inserto e posterior ligação dele ao vetor de expressão.

Figura 12 - Predição de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos codificada pelo gene obtido no presente estudo (Signal P 5.0).



Fonte: Autoria Própria

4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

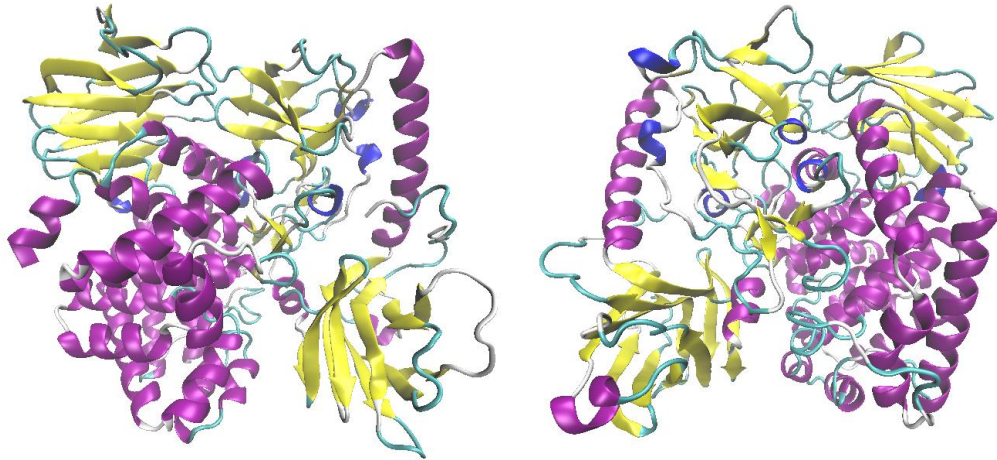
Em análise feita com a ferramenta ProtParam (servidor web.expasy.org), a β -L-Arabinofuranosidase apresentou um total de 780 aminoácidos em sua sequência primária e sem a presença da cauda de histidina, com uma massa molecular de 87.998 kDa. O pH ou ponto isoelétrico da enzima foi estimado como sendo em 8,58, sendo que este o valor de pH onde a carga líquida da proteína se encontra nula.

O coeficiente de extinção molar calculado foi de $19875 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esse valor indica a absorção de luz realizada pela proteína em 280 nanômetros, e a mensuração é feita em água. Seu cálculo é feito com base no coeficiente de extinção molar de tirosina, triptofano e cistina, multiplicado pela quantidade dos aminoácidos presentes na sequência proteica, que neste caso assumindo que todos os resíduos de cistina são reduzidos.

4.3 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

A estrutura da β -L-Arabinofuranosidase foi desenhada por AI e resultou em uma estrutura complexa composta de alfa-hélices correspondendo a 24% da estrutura total (em roxo), 22% de folhas betas (em amarelo), enquanto os 54% restantes corresponderam ao enovelamento aleatório (*random coil*) (em ciano e branco) (Figura 13).

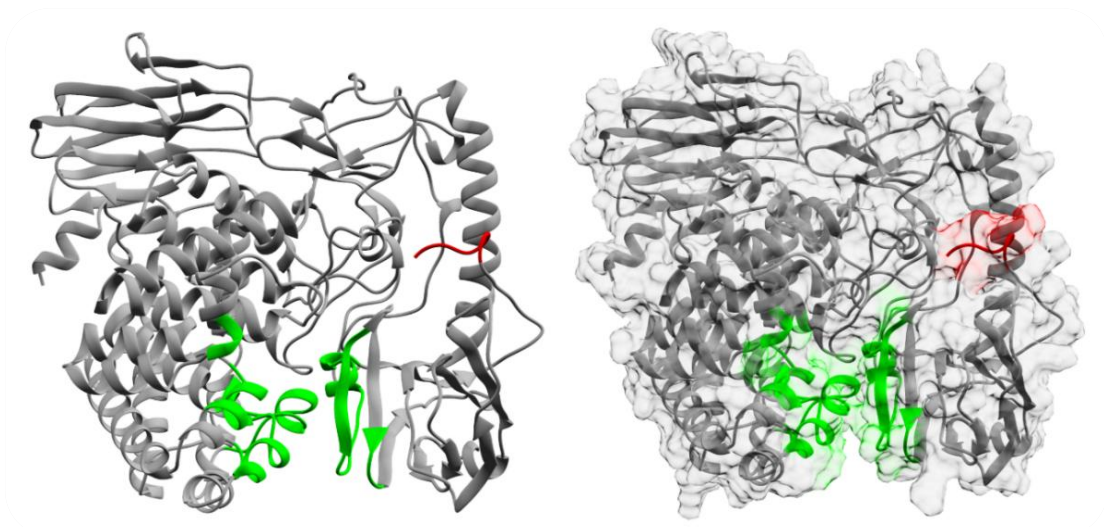
Figura 13 - Estrutura terciária da β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp. CB10_2.116, modelada pela IA RoseTTaFold (Washington University), representada pelo programa VMD (University of Illinois at Urbana Champaign) em duas diferentes perspectivas.



Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

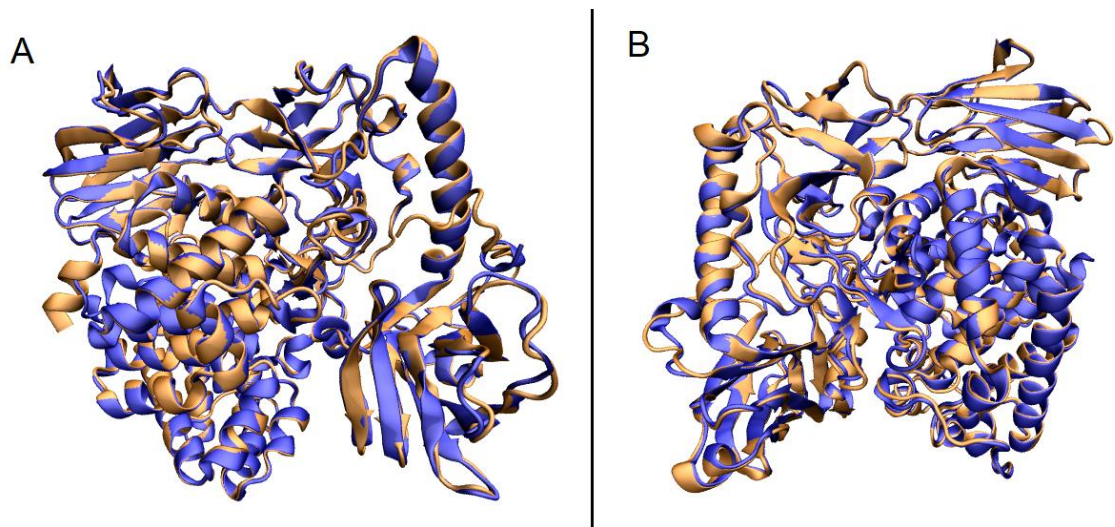
A proteína β -L-Arafase de acordo com a figura 14, apresentou sítio de ligação mostrado na região inferior (verde), assim como a cauda de histidina His-tag (vermelho), sendo também modelada com e sem a cauda de histidina, ambas sobrepostas (Figura 15). Tal análise verificou que a presença da cauda não alterou significativamente a estrutura da proteína.

Figura 14 - Estrutura tridimensional (3D) prevista da β -L-Arafase de *Chitinophaga* 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).



Fonte: Autoria Própria

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).

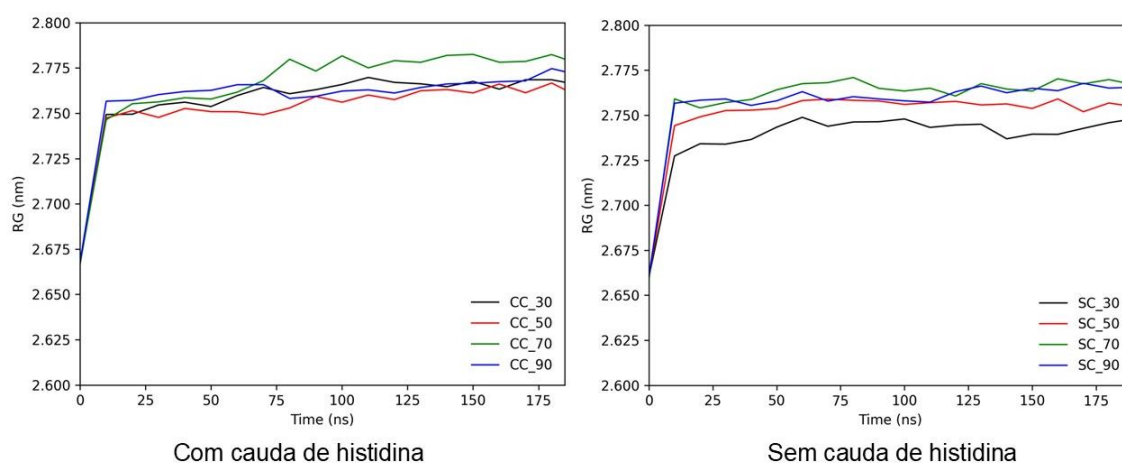


Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

4.4 PREDIÇÃO DA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA

O Rg ou raio hidrodinâmico, foi usado para verificar a estabilidade da enzima com a His-tag em diferentes temperaturas (Figura 16). Cada linha representa o raio monitorado na simulação durante os 180 nanossegundos (ns), e ao comparar todas as temperaturas, com a cauda verificou-se uma estabilidade do raio, em mais ou menos 2,75 nm de raio da proteína, mostrando que o raio não flutuou significativamente, ou seja, a proteína se manteve estável ao longo do tempo em relação às temperaturas simuladas. Contudo, sem a presença da cauda, mostrou que na faixa de temperatura em 30 °C (cor preta) a proteína apresentou um perfil levemente inferior às demais temperaturas durante todo o tempo de simulação, ficando em valor abaixo de 2.750 nm. Entretanto, a proteína se manteve estável durante os 180 ns.

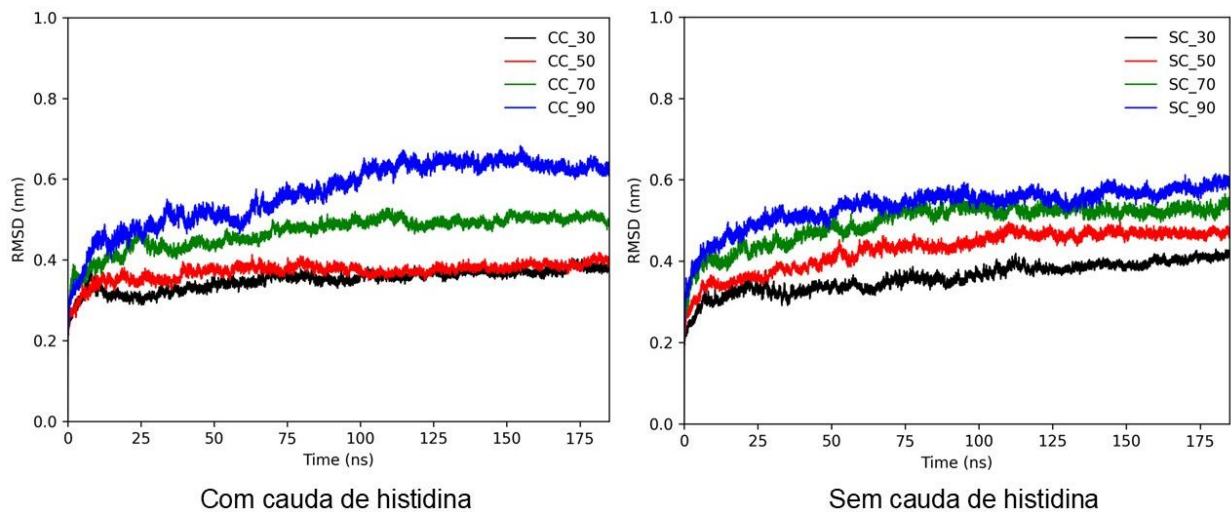
Figura 16 - Raio de giro (hidrodinâmico) da proteína com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.



Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

Por outro lado, a análise do Desvio Quadrático Médio (RMSD), que mede a similaridade entre estruturas, mostrou a estabilidade da estrutura da proteína ao longo de 180 ns de dinâmica molecular (Figura 17). É notório que em temperaturas de 30 °C (preto) e 50 °C (vermelho) não houve flutuação, ou seja, a estrutura não foi alterada e se manteve estável. Entretanto, ao aumentar a temperatura para 70 °C (verde), o RMSD demonstrou que a proteína sofreu pequenas flutuações, já na faixa de 90 °C (azul), entre 60 ns a 180 ns a proteína flutuou, indo de valores de 0,35 nm para 0,6 nm, dobrando o seu tamanho, mostrando que a proteína é sensível em temperaturas elevadas, o que se traduziria na perda da atividade enzimática. Já sem a cauda, o RMSD mostrou que a proteína na faixa de temperatura de 90 °C, esteve abaixo de 0,6 nm, sendo esta, a mais estável até mesmo em temperaturas elevadas.

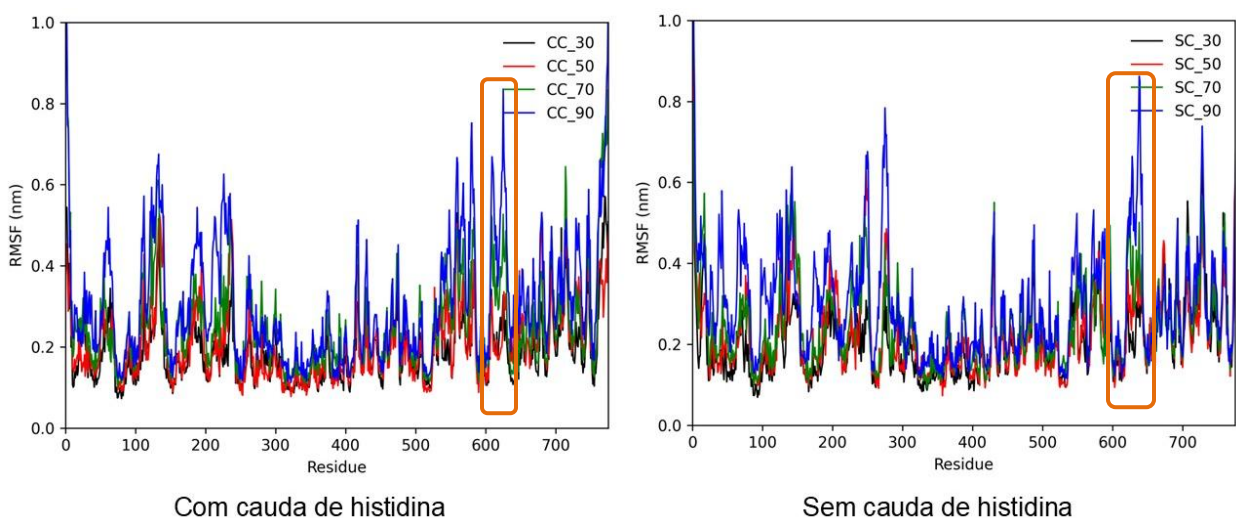
Figura 17 - RMSD da β -L-Arafase com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.



Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

A Flutuação Quadrática Média (RMSF) verificou as flutuações da proteína de cada um dos 780 aminoácidos, e como cada um flutuou em diferentes temperaturas. De acordo com a figura 18, tanto com e/ou sem a presença da cauda notou-se que na faixa de 520 a 630 resíduos de aminoácido (laranja), os aminoácidos flutuaram mais na faixa de temperatura a 90 °C, com pico de até acima de 0,8 nm, mostrando que essa região da proteína em ambos os casos é mais flexível e sensível a mudança de temperatura em relação às demais.

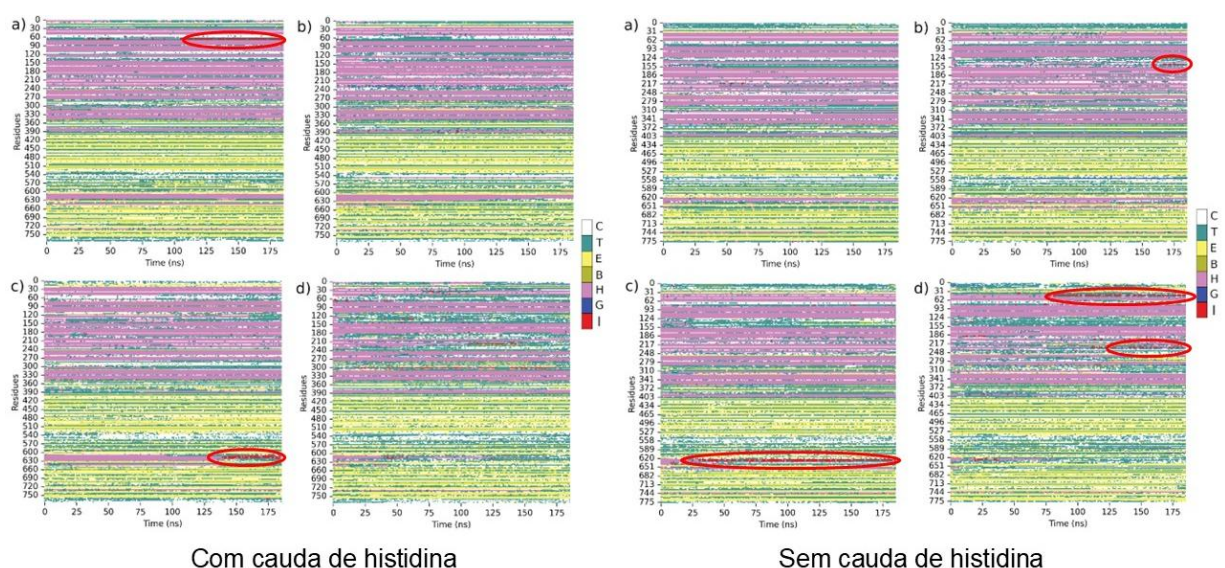
Figura 18 - RMSF da β -L-Arafase com e sem His-tag nas temperaturas de 30, 50, 70 e 90 °C.



Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

A figura 19, mostra a análise de estrutura secundária, apresentada nos padrões secundários de α -hélice (cor rosa), folha β (cor amarela), alças (cor verde) e estrutura randômica (cor branco). Com a cauda flutuções isoladas foram observadas em duas faixas de temperaturas (a, c) onde em 30 °C é visível no aminoácido Serina (Ser) enquanto em 70 °C é visível no aminoácido Alanina (Ala) representados na cor vermelha. Já sem a cauda, mostrou flutuações isoladas em três faixas de temperaturas (b, c, d), onde em 50 e 70 °C é visível no aminoácido Arginina (Arg), porém em regiões diferentes, enquanto em 90 °C é visível nos aminoácidos aspartato (Asp) e alanina (Ala).

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.



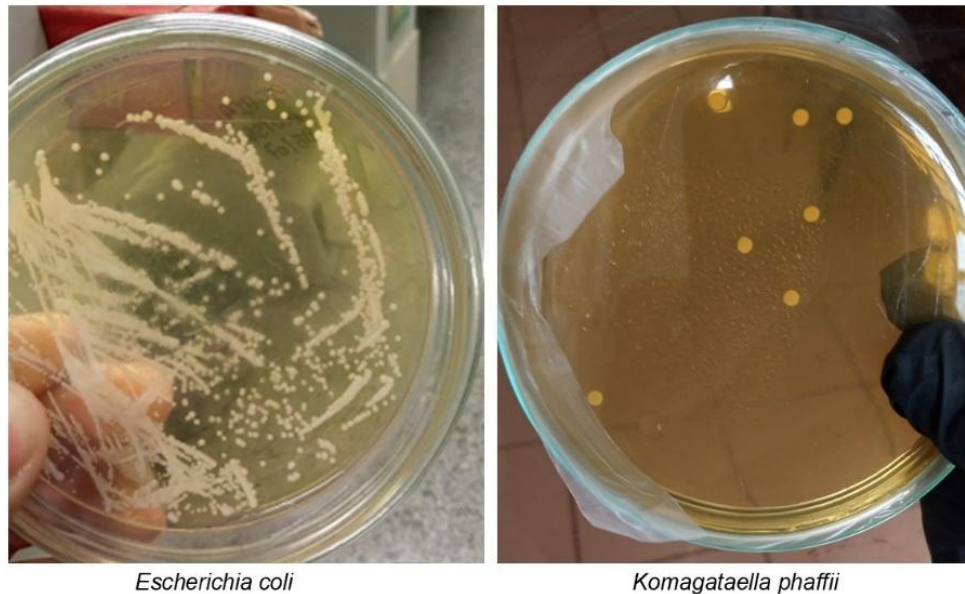
Fonte: Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli

4.5 OBTENÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFORMAÇÃO

Inicialmente foram desenvolvidos dois vetores de expressão, um pET28(+) com sítios de restrição BamHI e PspXI para *E. coli* e pGAPZ α A com sítios de restrição AvrII e BspHI para *K. phaffii*. Devido ao limite financeiro, optamos por seguir com o vetor para *K. phaffii*, para ambas as transformações, sendo assim, esta etapa foi realizada pela empresa GenOne®.

Após as etapas do processo de transformação, observou-se o crescimento de colônias resistentes de *E. coli* em 1 dia e *K. phaffii* entre 3 a 5 dias, em placas de petri com os respectivos meios de cultura enriquecidos com o antibiótico Zeocina (Figura 20).

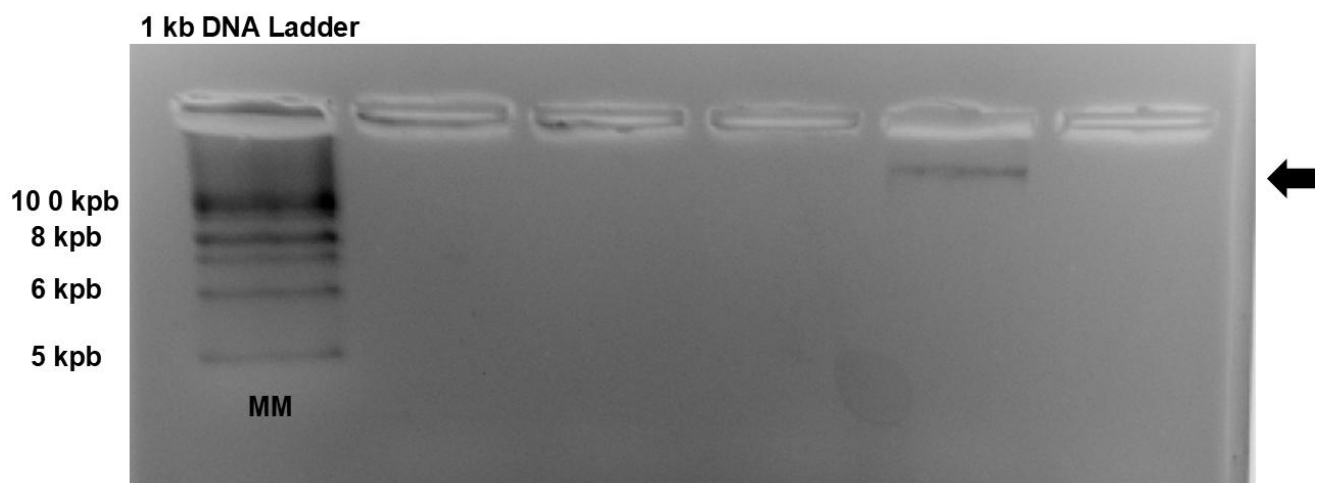
Figura 20 - Colônias de *E. coli* e *K. phaffii* em meio seletivo após transformação.



Fonte: Autoria Própria

Além da seleção de placa, também foi feito um *colony screening*, com a enzima AvrII, das colônias que cresceram na placa, para verificar quais colônias foram positivamente transformadas através da ligação do inserto de interesse. Na figura 21 foram observados fragmentos amplificados na altura esperada relativos ao fragmento inserido na bactéria *E. coli*, uma vez que, após a digestão o inserto foi liberado resultando em bandas visíveis no gel de agarose.

Figura 21 - Produto de amplificação obtido após PCR de colônias: Marcador Molecular (MM) Gene Ruler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific.



Fonte: Autoria Própria. Kpb =kilobase.

Foi feita a extração de DNA plasmidial através do Miniprep das colônias, seguindo da quantificação que foram posteriormente usadas para os ensaios de transformação em *K. phaffii*. Embora tenham sido realizados, os ensaios de expressão não conseguiram identificar a proteína.

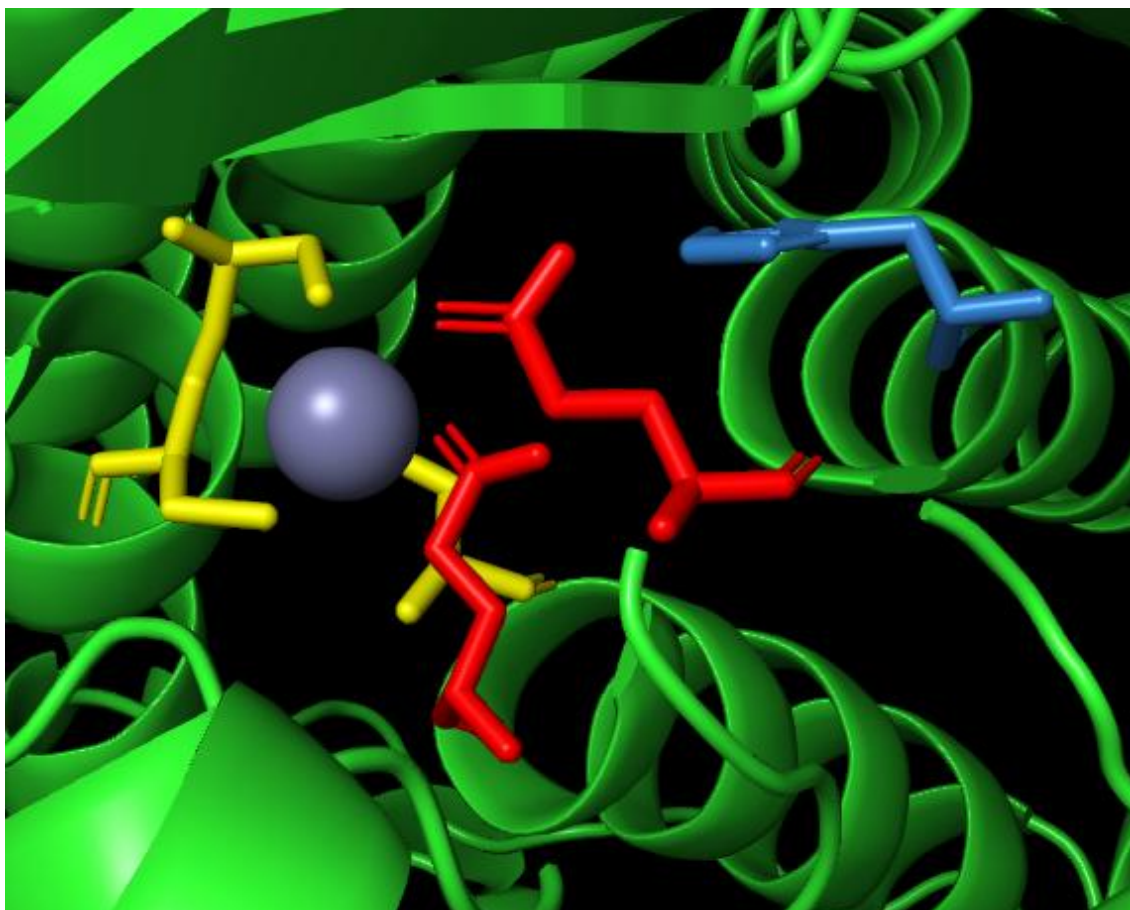
4.6 COMPARAÇÃO PRELIMINAR COM A β -L-ARAFASE DE *BIFIDOBACTERIUM LONGUM*

As análises mostradas a seguir são preliminares, uma vez que devido a problemas com a rede computacional da UNESP atrasaram os procedimentos *in silico* previstos, tanto no que se refere a dinâmica molecular quanto ao *docking* de substratos, sendo essas análises interligadas. Para a escrita do manuscrito relativo a esta parte, essas análises serão incluídas.

A comparação de sequências da enzima de *Chitinophaga* e *B. longum* apontou em torno de 22% de identidade (resultados não mostrados), permitindo identificar no CLUSTAL os resíduos que interagiriam com o zinco e com o substrato no sítio ativo da enzima de *Chitinophaga*, tomando como base a estrutura cristalográfica da enzima de *B. longum* (ITO et al., 2014). Os resíduos identificados foram: E292, E311, C313, C379 e C380 (E322, E338, C340, C417 e C418 na sequência de *B. longum*, respectivamente). Entre os resíduos que participariam do reconhecimento do substrato com o substrato arabinofuranose apenas a H243 foi identificada, que corresponderia à H194 de *B. longum*.

A figura 22 mostra o sítio ativo da estrutura modelada com AlphaFold (JUMPER et al., 2021) com os resíduos identificados.

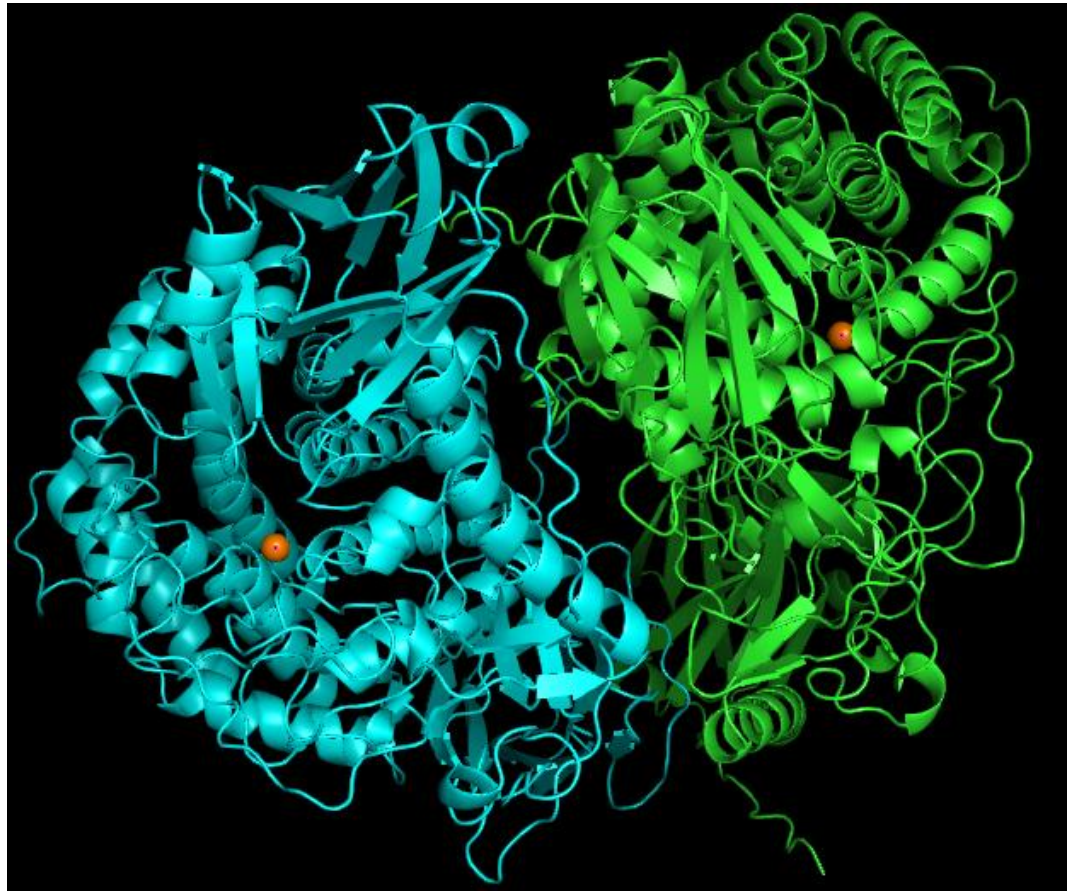
Figura 22 - Resíduos do sítio ativo da β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp. Os resíduos C313, C379 e C380 (amarelo), E292 e E311 (vermelho), e H243 (azul). A esfera cinza representa o átomo de zinco.



Fonte: Autoria Própria, usando o programa Pymol (v.3.13).

Dos resíduos citados, participariam do reconhecimento do substrato os glutamatos E292 e E311, e a histidina H243, enquanto as cisteínas C313, C379 e C380 da coordenação do zinco, por analogia com a proposta para a enzima de *B. longum*. A estrutura cristalizada da enzima de *B. longum* foi a de um dímero que interage através de um domínio beta-sandwich 2. No caso da enzima de *Chitinophaga* também é possível prever, nas análises, a formação de um dímero quando a enzima não possui a cauda de histidina (Figura 23).

Figura 23 - Dímero previsto por análise *in silico* para a β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp.

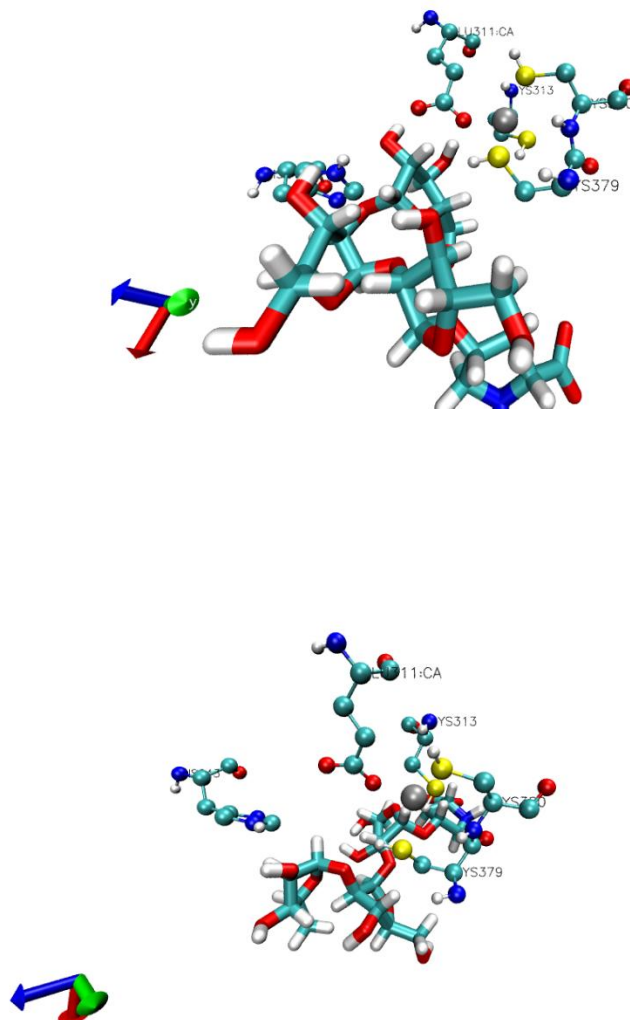


Fonte: Autoria Própria, usando o programa Pymol (v.3.13).

Na forma monomérica uma parte da estrutura oclui parcialmente o acesso ao sítio ativo, enquanto na forma dimérica o mesmo é liberado.

Foram realizadas análises preliminares de docking com eventuais substratos da enzima. A figura 24 mostra a análise realizada do potencial substrato Ara₃-Hyp (3 arabinofuranoses ligadas à hidroxiprolina). Não sabemos se em *Chitinophaga* sp. este seria de fato, *in vivo*, o substrato da enzima, conforme apontado anteriormente em relação à enzima GH127 de *Bifidobacterium longum*, embora essa mesma enzima seja capaz de efetuar sua hidrólise *in vitro*.

Figura 24. Docagem do substrato Ara3-Hyp no sítio ativo da β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp., analisado desde duas perspectivas.



Fonte: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Povinelli.

As análises de dinâmica molecular com a estrutura contendo o zinco e na ausência e presença dos substratos não puderam ser concluídas a tempo por imprevistos na rede computacional da Unesp.

Uma análise preliminar foi feita usando o site DynaMut (<https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/analysis>) para avaliar dois parâmetros da mobilidade da cadeia polipeptídica do dímero: a energia de deformação e a flutuação atômica. A primeira se refere à flexibilidade local da cadeia, enquanto a segunda à amplitude do movimento dos átomos que compõem a cadeia polipeptídica.

A figura 25 mostra a análise da energia de deformação, que aponta a porção carboxila terminal (círculos vermelhos) e a faixa de resíduos 233 a 236 (círculos

verdes) de cada cadeia como aquelas com maior flexibilidade local, mostrada em termos da espessura da cadeia.

A energia de deformação indica o gasto energético requerido para que uma área específica da proteína se desvie de sua configuração de equilíbrio durante um movimento específico. Ela indica o esforço necessário para que a estrutura de deformar localmente. Áreas com elevada energia de deformação costumam ser mais rígidas, enquanto as áreas com menor energia de deformação, costumam ser mais maleáveis e adaptáveis a alterações conformacionais (TAMA; SANEJOUAND, 2001).

Esta avaliação é eficaz para reconhecer áreas funcionais flexíveis, tais como loops de atividade, áreas de conexão com ligantes ou áreas de interação com outras proteínas. Normalmente, os primeiros modos de vibração (não triviais) são os que mais contribuem para grandes alterações conformacionais.

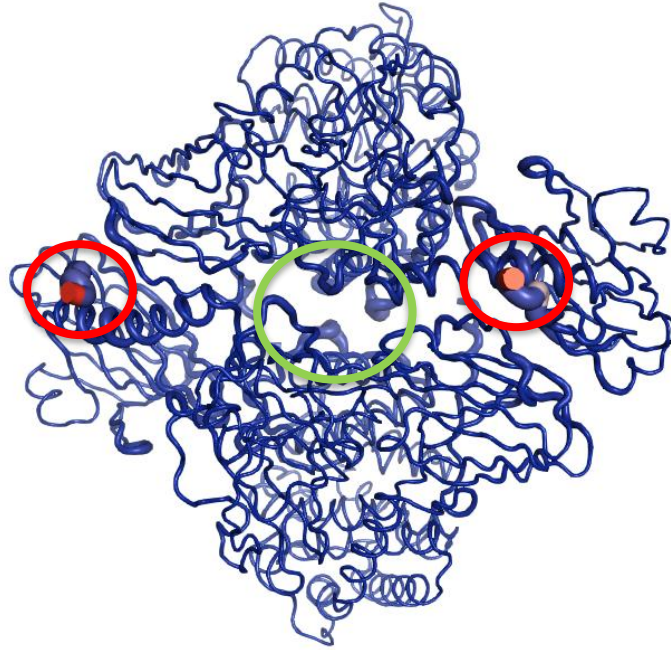
Já a figura 26 mostra a flutuação atômica, onde apenas sobressaem as regiões C-terminais como regiões mais flexíveis.

A flutuação atômica representa a amplitude média do deslocamento absoluto de cada átomo durante os diferentes modos de movimento, espelhando a mobilidade global da proteína em diversas áreas. Ela é normalmente descrita como uma média quadrática do deslocamento dos átomos em direção à posição de equilíbrio, isto é, um tipo de desvio padrão do movimento atômico (YANG et al., 2009).

Obviamente, esta análise superficial precisaria ser confrontada com uma análise mais robusta, como a pretendida originalmente.

Figura 25. Análise de deformação do dímero da β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp. analisada pela ferramenta DynaMut.

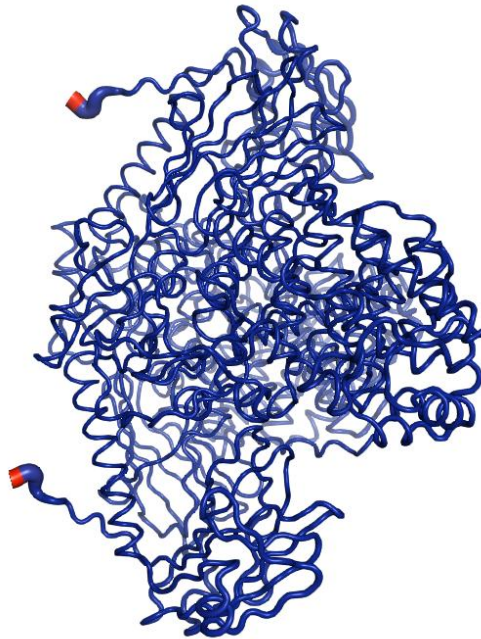
For Educational Use Only



Fonte: Autoria própria, utilizando o programa Pymol.

Figura 26. Análise de flutuação atômica do dímero da β -L-Arafase de *Chitinophaga* sp. analisada pela ferramenta DynaMut.

For Educational Use Only



Fonte: Autoria própria, utilizando o programa Pymol.

5 CONCLUSÕES

Neste capítulo, as análises *in silico*, a clonagem e a expressão heteróloga (embora não tenhamos condições de avaliar se foram bem-sucedidas) foram realizadas com o intuito de contribuir com o entendimento da estrutura, função e potencial aplicação da β -L-arabinofuranosidase de *Chitinophaga* sp. Os resultados *in silico* mostraram que a sequência obtida possui 2301 nucleotídeos, 780 aminoácidos, sendo seu tamanho em torno de 87 kDa, sendo altamente similar com *Chitinophaga* sp., com peptídeos sinal tipo Sec/SPI, padrão bactérias. Sua estrutura é composta de α -hélice e folhas β , e a presença da cauda de histidina aparentemente não influencia na estrutura e na função da proteína. Análises de raio de giro, desvio quadrático médio e flutuação quadrática média e estrutura secundária mostraram que ela se mantém estável entre 30 e 70 °C, ao passo que é sensível a altas temperaturas como 90 °C. Os resultados encontrados podem contribuir para o avanço da biotecnologia no setor energético e na gestão de resíduos, com potencial de impactar positivamente a sustentabilidade ambiental e econômica.

REFERÊNCIAS

- AGARD, David A. *et al.* Solution of the protein structure prediction problem at last: crucial innovations and next frontiers. **Faculty Reviews Landmark: Fac Rev**, v. 11, n. 38, p. 1–5, 2022.
- AHMAD, Mudassar *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- AIZEMBERG, Raquel. **Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- ALCALDE, Miguel *et al.* Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281–287, 2006.
- ALLOCATI, Nerino *et al.* *Escherichia coli* in Europe: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, 2013.
- ARAÚJO, Isaac Moura *et al.* Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana em *Escherichia coli* e Implicações Terapêuticas. **Perspectivas integradas em saúde, bem estar e qualidade de vida**, v. 3, n. 10, p. 97–106, 2024.
- ARAÚJO, Joabe Lima *et al.* Estudo in silico da atividade biológica por docagem molecular da desloratadina contra esquistossomose. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 28, p. e993, 2019.
- ARRUDA, Andreilisse. **Utilização do promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- ATA, Özge. **TRANSCRIPTIONAL ENGINEERING OF GAP PROMOTER FOR IMPROVED RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY *PICHIA PASTORIS***. Middle East: THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES OF MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY, 2017.
- BAEK, Minkyung *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871–876, 2021.
- BALBINO, Bianca. **EXPRESSÃO DE SmNPP5a DE *Schistosoma mansoni* EM *Pichia pastoris***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- BALDI, Pierre; BRUNAK, Søren. **Bioinformatics: the machine learning approach**. 2nd ed. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, 2001.
- BANEYX, François. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411–421, 1999.
- BASAVARAJU, M.; GUNASHREE, B. S. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. In: **Escherichia coli - Old and New Insights**. [S.l.]: IntechOpen, 2022. p. 1–21.

BERNAUER, Lukas *et al.* *Komagataella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 607028, 2021.

BHAIYYA, Raja *et al.* Biochemical characterization of bifunctional enzymatic activity of a recombinant protein (Bp0469) from *Blautia producta* ATCC 27340 and its role in the utilization of arabinogalactan oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 126736, 2023.

BHATIA, Shashi Kant *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122724, 2020.

BRASIL. **COP 29: MME lança pacto global para transição energética justa e inclusiva**. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/cop-29-mme-lanca-pacto-global-para-transicao-energetica-justa-e-inclusiva>. Acesso em: 15 maio. 2025.

BRETHAUER, Simone; STUDER, Michael H. Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals – A Review. **CHIMIA**, v. 69, n. 10, p. 572, 2015.

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.

CARNEIRO, Fábio Correia. **Otimização de Técnicas de Cultivo em Biorreator Aplicado à Produção do Inibidor de Tripsina Iti em *Komagataella phaffii***. Dissertação (Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2018.

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.

COIMBRA, Eliane Campos. **Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do Papilomavírus Humano tipo 16**. Dissertação (Mestre em Genética) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-graos/boletim-da-safra-de-graos/8o-levantamento-safra-2024-25/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 5 maio. 2025.

COUTSIAS, Evangelos A.; WESTER, Michael J. RMSD and Symmetry. **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 15, p. 1496–1508, 5 jun. 2019.

CREGG, James M. *et al.* Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 3, p. 1316–1323, 1989.

CREGG, James M. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

DAI, Wuling *et al.* Enhancing the Heterologous Expression of a Thermophilic Endoglucanase and Its Cost-Effective Production in *Pichia pastoris* Using Multiple Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 15017, 2023.

DLAUCHY, Denes *et al.* *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. **Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.**, v. 83, p. 327–332, 2003.

DORN, Márcio. **Uma proposta para a produção computacional da estrutura 3D aproximada de polipeptídeos com redução do espaço conformacional utilizando análise de intervalos.** Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DRIESSEN, Arnold J. M.; NOUWEN, Nico. Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 643–667, 2008.

FELBER, Michael *et al.* Strains and Molecular Tools for Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris*. In: MAPELLI, Valeria (Org.). **Yeast Metabolic Engineering.** Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 1152 p. 87–111.

FELIX, Wagner Pereira. **Produção Heteróloga de Frutalina em *Pichia pastoris*.** Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

FENG, Peter *et al.* **Bacteriological Analytical Manual Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria.** [S.l.]: Food and Drug Administration, 2020.

FILHO, Ivan Cunha Bustamante. **CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL BOVINO RELACIONADAS À ALTA CONGELABILIDADE DO SÊMEN.** Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FILIPE, Hugo A. L.; LOURA, Luís M. S. Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2105, 2022.

FISCHER, Jasmin E.; GLIEDER, Anton. Current advances in engineering tools for *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 175–181, 2019.

FUJITA, Kiyotaka *et al.* Characterization of a Novel β -L-Arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 8, p. 5240–5249, 2014.

FUNNICELLI, Michelli Inácio Gonçalves. **EXPLORANDO UMA COMUNIDADE BACTERIANA ISOLADA DE UMA PILHA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEU POTENCIAL FUNCIONAL NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.** Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.

GASSER, Brigitte *et al.* Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 2, p. 353–361, 2006.

GASSER, Brigitte *et al.* Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 179, 2007.

GASSER, Brigitte *et al.* *Pichia Pastoris*: Protein Production Host and Model Organism for Biomedical Research. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 191–208, 2013.

GONÇALVES, M. C. M. *et al.* CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA GLICOPROTEÍNA S1 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS EM *PICHLIA PASTORIS*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 609–615, 2010.

GREEN, Brett J.; BEEZHOLD, Donald H. Industrial Fungal Enzymes: An Occupational Allergen Perspective. **Journal of Allergy**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

GUERRIERO, Gea *et al.* Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2016.

GUILLIERMOND, A. Sexuality, developmental cycle and phylogeny of yeasts. **The Botanical Review**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 1940.

HEISTINGER, Lina *et al.* Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*: This article is part of the Microbe Profiles collection. **Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 614–616, 2020.

HUANG, Bin *et al.* Protein Structure Prediction: Challenges, Advances, and the Shift of Research Paradigms. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 913–925, 2023.

IDALIA, Vargas-Maya Naurú; BERNARDO, Franco. *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. In: SAMIE, Amidou (Org.). ***Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications**. [S.l.]: InTech, 2017.

INVITROGEN. **pGAPZ A, B and C, pGAPZα A, B and C. Pichia expresison vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins**. Life Technologies Corporation, Manual part no.25-0174, 2010.

INVITROGEN. ***Pichia* Expression Kit. For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris***. Life Technologies Corporation. Catalog no. K1710-01, 2014.

ITO, Tasuku *et al.* Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 β-l-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 1, p. 32–37, 2014.

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

KARBALAEI, Mohsen *et al.* *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 2020.

KISHI, Luciano T. *et al.* Draft Genome Sequence of a *Chitinophaga* Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. **Genome Announcements**, v. 5, n. 3, p. 01056–16, 2017.

KNAPP, Bernhard *et al.* vmdICE: A plug-in for rapid evaluation of molecular dynamics simulations using VMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 16, p. 2868–2873, 2010.

KURTZMAN, C. P. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 3, p. 209–217, 1984.

KURTZMAN, Cletus P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 973–976, 2005.

KURTZMAN, Cletus Paul. *et al.* Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 939–954, 2008.

KURTZMAN, Cletus Paul. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARSBRINK, Johan *et al.* Proteomic insights into mannan degradation and protein secretion by the forest floor bacterium *Chitinophaga pinensis*. **Journal of Proteomics**, v. 156, p. 63–74, 2017.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LEE, Chien *et al.* Comparative studies of AlphaFold, RoseTTAFold and Modeller: a case study involving the use of G-protein-coupled receptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. bbac308, 2022.

LI, Xinxin. **Unraveling the diversity within CAZy families related to hemicellulose degradation**: Tese—Utrecht: Utrecht University, 2022.

LINHARES, Regiane Monteiro. **EXPRESSÃO ENDÓGENA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO DE TAMBAQUI (COLOSSOMA MACROPOMUM) EM PICHIA PASTORIS**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021.

LOMBARD, Vincent *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

MACAULEY-PATRICK, Sue *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MAKRIDES, Savvas C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–558, 1996.

MARGREITTER, Christian; OOSTENBRINK, Chris. MDplot: Visualise Molecular Dynamics. **The R Journal**, v. 9, n. 1, p. 164, 2017.

MARTÍNEZ, Leandro. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in

Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119264, 2015.

MENEZES, Cintia Lionela Ambrósio de. **caracterização estrutural e funcional de uma alfa-N-arabinofuranosidase recombinante expressa em *Escherichia coli***. Dissertação (Mestre em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2019.

MIRANDA, Luiz Renato Lima Silva *et al.* POTENCIAL ENZIMÁTICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS. **Uningá Review**, v. 36, n. 1, p. eURJ3534, 2021.

MOHAMMADZADEH, Sedigheh *et al.* Applications of recombinant proteins in aquaculture. **Aquaculture**, v. 561, p. 738701, 2022.

MORAIS, Emerson Cordeiro. **Reconhecimento de padrões e redes neurais artificiais em predição de estruturas secundárias de proteínas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Sistemas de Computação) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MORDOR INTELLIGENCE. **Proteína Recombinante Tamanho do Mercado | Mordor Intelligence**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/recombinant-protein-market>. Acesso em: 16 maio. 2025.

NAWRATH, Thorben *et al.* The Biosynthesis of the Aroma Volatile 2-Methyltetrahydrothiophen-3-one in the Bacterium *Chitinophaga* Fx7914. **ChemBioChem**, v. 11, n. 13, p. 1914–1919, 2010.

OLIVEIRA, Dyoni M. *et al.* Modulation of cellulase activity by lignin-related compounds. **Bioresource Technology Reports**, v. 10, p. 100390, 2020.

OOSTENBRINK, Chris *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

PAES, Bárbara Gomes. **MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Pichia pastoris* TO LIGNOCELLULOSIC HYDROLYSATE COMPONENTS**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

PAIXÃO, Vivian Moraes *et al.* AlphaFold 2: revolucionando a modelagem de estruturas 3D de macromoléculas. **BIOINFO**, v. 3, n. 1, p. 23, 2023.

PALMER, Ira; WINGFIELD, Paul T. Preparation and Extration of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins *Escherichia coli*. In: **Current Protocols in Protein Science**. 38. [S.l.: S.n.]. p. 6.3-6.3.18.

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.

PHAFF, H. J. *et al.* The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 22, n. 1, p. 145–161, 1956.

POOLMAN, Jan T. *Escherichia coli*. In: **International Encyclopedia of Public Health**. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 585–593.

RAMOS, Luiz P. *et al.* Enzymes and biomass pretreatment. In: **Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value-Added Chemicals within the Biorefinery Concept**. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 61–100.

RAZA, Mohsin; ABU-JDAYIL, Basim. Cellulose nanocrystals from lignocellulosic feedstock: a review of production technology and surface chemistry modification. **Cellulose**, v. 29, n. 2, p. 685–722, 2022.

ROMANOS, Mike. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 527–533, 1995.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, p. 1–17, 2014.

SARGSYAN, Karen *et al.* How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 4, p. 1518–1524, 2017.

SCARCELLA, Ana Sílvia De Almeida *et al.* Saccharification of different sugarcane bagasse varieties by enzymatic cocktails produced by *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 cultures in agro-industrial residues. **Energy**, v. 226, p. 120360, 2021.

SCHÄDEL, Christina *et al.* Hemicellulose concentration and composition in plant cell walls under extreme carbon source-sink imbalances. **Physiologia Plantarum**, v. 139, p. 241–255, 2010.

SCHASTNAYA, Evgeniya *et al.* Non-enzymatic acetylation inhibits glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. **Cell Reports**, v. 42, n. 1, p. 111950, 2023.

SHARMA, Krishna Kant. Fungal genome sequencing: basic biology to biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 743–759, 2016.

SILVA, João Renato Souza Negrão E. **Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

TAMA, F.; SANEJOUAND, Y. H. Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2001.

TAO, Feng *et al.* Neofunctionalization of tandem duplicate genes encoding putative β -L-arabinofuranosidases in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 192, n. 4, p. 2855–2870, 2023.

VALLI, Minoska *et al.* Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 6, p. 051, 2016.

VAN DER SPOEL, David *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VIDAL, Maria De Fátima. PRODUÇÃO E USO DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL. **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE**, v. 6, n. 184, p. 1–15, 2021.

WANG, Jue *et al.* Protein Design Using Structure-Prediction Networks: AlphaFold and RoseTTAFold as Protein Structure Foundation Models. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 16, n. 7, p. a041472, 2024.

YAMADA, Yuzo *et al.* The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1995.

YANG, Lei *et al.* Protein elastic network models and the ranges of cooperativity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 30, p. 12347–12352, 2009.

YASIR, Muhammad *et al.* *Chitinophaga eiseniae* sp. nov., isolated from vermicompost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2373–2378, 2011.

YU, Daniel; BANTING, Graham; NEUMANN, Norman F. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 553–571, 2021.

ZAHRL, Richard J. *et al.* Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 7, 2017.

SEÇÃO II

Triagem de alfa-L-arabinofuranosidase em fungos filamentosos e caracterização bioquímica da enzima do fungo *Pycnoporus sanguineus*

1 INTRODUÇÃO

As plantas capturam energia solar na forma de carboidratos, principalmente, mas os mesmos estão presentes integrando a parede celular em uma forma insolúvel, ao invés de serem solúveis, como a sacarose. Devido à resistência da lignocelulose, é necessário realizar um processo de pré-tratamento (físico, físico-químico, químico ou biológico) para tornar as frações celulósicas acessíveis às enzimas. Esse processo envolve a identificação dos polissacarídeos presentes na parede celular e a hidrólise das mesmas (GONÇALVES, 2011).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é considerado um método eficiente para a produção de açúcares, por ser um processo que pode ser facilmente controlado, além de ser seletivo e exigir condições amenas de pH e temperatura (ÁVILA, 2022). No entanto, a produção de álcool a partir do bagaço ainda é um desafio, uma vez que enfrenta obstáculos como a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias capazes de extrair energia do material lignocelulósico. Segundo Buckeridge, (2013), existem quatro fases para a produção de etanol, sendo a primeira, o sistema de produção a partir da fermentação de açúcares solúveis; a segunda na produção por meio da hidrólise ácida; a terceira com o envolvimento de enzimas produzidas por microrganismos e a quarta a chamada “maturação” ou “autodestruição”, isso porque as enzimas responsáveis pela destruição da parede celular seriam provenientes da própria planta. Dentre estas, as pesquisas brasileiras se concentram na terceira fase, com a utilização de enzimas.

As enzimas são majoritariamente proteínas, especializadas na catálise de reações biológicas que conseguem aumentar a velocidade das reações químicas, reduzindo a energia necessária para a ativação. Consideradas catalisadoras naturais, são obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, possuindo propriedades únicas que as tornam altamente desejáveis para aplicações em processos industriais. Isso ocorre devido à sua alta especificidade, ausência de produtos indesejáveis e biodegradabilidade, além do menor consumo de água e redução da produção de resíduos tóxicos liberados pelo pré-tratamento ácido (ou outro) que ocorre nas reações químicas, sendo então altamente vantajosa, sustentável e ecológica despertando o interesse de grandes indústrias farmacêuticas, químicas, têxtil e alimentícia humana e animal (MONTEIRO; SILVA, 2009; CARVALHO, 2015; FRANCO DENTI et al., 2022; BUZZO et al., 2024).

O mercado de enzimas é atualmente um dos mais lucrativos. O valor global do mercado de enzimas foi de US\$ 13,38 bilhões em 2024 para estimados US\$ 15,33 bilhões em 2025 e deverá ultrapassar cerca de US\$ 25,88 bilhões até 2029, com uma taxa de crescimento anual de 14% de 2024 a 2029 (RESEARCH AND MARKETS, 2025).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo a hemicelulose o segundo maior componente da parede celular vegetal e a xilana seu principal constituinte. A estrutura de sua cadeia principal é composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos por ligação glicosídica do tipo β (1-4), podendo apresentar substituições nas cadeias laterais entre diferentes espécies de plantas (WANG et al., 2014).

Devido à sua complexidade estrutural, uma hidrólise eficiente de arabinoxilano com liberação da xilose do xilano requer a suplementação de xilanases com outras enzimas, tais como as α -L-Arabinofuranosidases (α -L-Arafases) e outras enzimas acessórias (YANG et al., 2015). Kurniati et al., (2016) relatam que as arabinofuranosidases são enzimas acessórias podem remover polissacarídeos não celulósicos ao clivarem ligações α -L-arabinofuranosídicas que revestem as fibras de celulose, melhorando a ação das celulasas durante o processo de sacarificação da biomassa, agindo sinergicamente com outras hemicelulasas para hidrólise completa (BERLIN et al., 2007). Assim a ação da α -L-Arafase e a associação com outras enzimas degradadoras da lignocelulose representa uma ferramenta biotecnológica promissora como alternativa para algumas tecnologias químicas existentes.

Nesse contexto, existe a crescente necessidade de se estudar enzimas como as α -L-Arafases de microrganismos, principalmente de amostras obtidas no Brasil, uma vez em que o país é essencialmente dependente da importação de enzimas, que além de sofrer com as oscilações do mercado, enfrenta constantemente o aprimoramento das formulações, tornando-as mais estáveis perante as condições do processo, conseqüentemente tornando limitante o seu uso em processos industriais quando comparado com outros países, como os Estados Unidos e Canadá, assim como os países membros da União Europeia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GLICOSÍDEO HIDROLASES

Presentes em quase todos os domínios da vida, as glicosídeo hidrolases (glicosidases ou glicosil hidrolases) são catalizadores específicos que quebram ligações glicosídicas de polissacarídeos complexos, como celulose, hemicelulose, amido etc. Essas enzimas, com suas funções específicas, geralmente recebem seus nomes de acordo com os substratos sobre os quais atuam, sendo assim chamadas de celulasas, amilases, xilanases, arabinases, entre outras, e são encontradas intracelulares e extracelulares em procariontes estando principalmente envolvidas na hidrólise de moléculas de glicosídeo, aquisição de nutrientes, regulação da expressão de operons, modificação pós-traducional, armazenamento lisossomal em organismos superiores, biossíntese e degradação de glicogênio (SHRIVASTAVA, 2020).

De acordo com a nomenclatura enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), os glicosídeos hidrolases são classificadas em EC 3.2.1 como enzimas que catalisam a hidrólise O- ou S-glicosídeos. Elas também são classificadas com base no resultado estereoquímico da reação de hidrólise (retendo ou invertendo a configuração do carbono anomérico); na ação exo (extremidade não redutora) e endo (meio da molécula), e na classificação baseada em sequência e estrutura (SHRIVASTAVA, 2020). Atualmente foram catalogadas mais de 7.000 enzimas até abril de 2025 (tabela 3), estando divididas em cinco classes, e classificadas de acordo a reação de catálise específica e com o substrato (NC-IUBMB, 2025).

Tabela 2 - Classificação Internacional de enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

Grupo de Enzimas	Tipo de Reação	Nº de Enzimas Listadas no NC-IUBMB*
Transferases	Catalisam a transferência de grupos acila, açúcares, fosforila e aldeído ou porções de cetonas de uma molécula para outra.	~1.300 a 1500
Hidrolases	Promovem hidrólise e formação de ésteres, glicosídeos, amidas, éteres, peptídeos e outros grupos que contenham C-N.	~1.200 a 1.400
Liases	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, as duplas ligações como C=C, C=N e C=O, e os processos reversos.	~400 a 500
Isomerases	Efetuem várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização	~300 a 400
Translocases	Catalisam o movimento de íons ou moléculas através de membranas,	~100 a 150

Fonte: Adaptado de Carvalho, (2015); NC-IUBMB, (2025).

As hidrolases, são os grupos de enzimas mais extensivamente estudados e recebem esse nome pois catalisam a clivagem de ligações numa reação de incorporação de uma molécula de água. Embora sejam as enzimas mais comercializadas devido à sua ampla aplicação em diferentes setores industriais, constantemente novas buscas são realizadas em relação à melhoria de produção com menores custos. Compreendem grandes grupos de enzimas, que engloba por exemplo as proteases, amilases, endoglucanases, β -glicosidases, xilanases, esterases e lipases (CARVALHO, 2015; EL-GENDi et al., 2021).

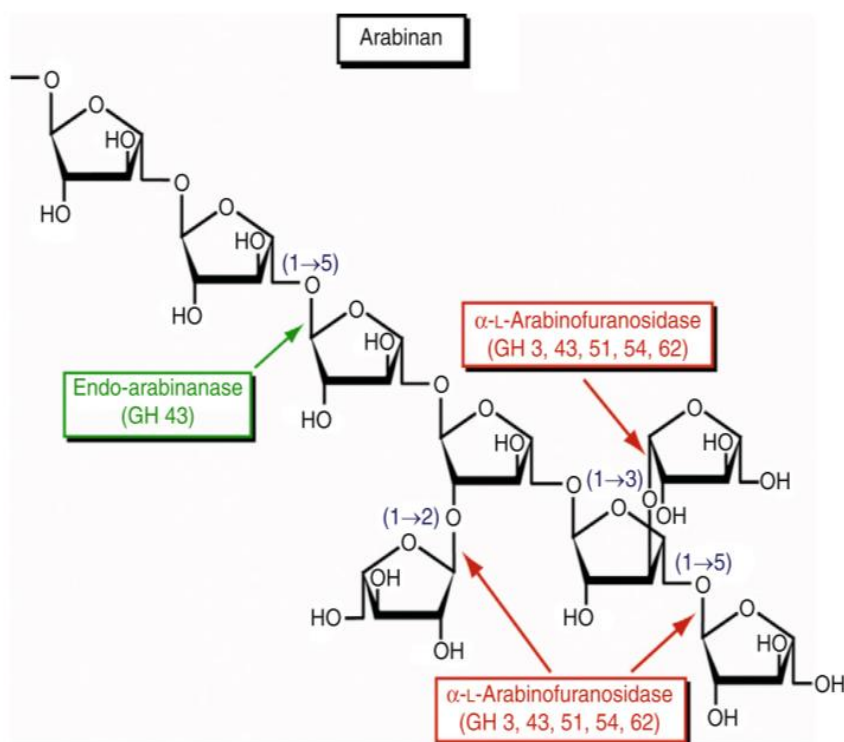
2.2 α -L-ARABINOFURANOSIDASES

Estas enzimas são hemicelulases que hidrolisam as ligações glicosídicas de arabinofuranoses na hemicelulose. Algumas dessas enzimas exibem ampla especificidade de substrato, atuando nas porções de arabinofuranosídeos em O-2 e O-3 como único substituinte, sendo amplamente distribuídas em plantas, fungos, arqueas, bactérias e estômago de ruminantes (HÖVEL et al., 2003; SHI et al., 2022).

A ação hidrolítica das enzimas arabinofuranosidases se aplica para produção de bioetanol e para diversos outros produtos de interesse industrial. A indústria de papel e celulose utiliza compostos como o cloro durante o processo de branqueamento de papel, tal processo pode ser substituído a partir da utilização de coquetéis enzimáticos, devido ao fato destes processarem grande quantidade de biomassa lignocelulósica.

As arabinofuranosidases são usadas juntamente com as pectinases, mananases e xilanases para a degradação de polissacarídeos ligados à lignina. Tal processo de deslignificação ocorre pela quebra de uma ligação α -1,3 glicosídica entre arabinose e xilose (Figura 27) resultando na liberação de uma lignina ligada a um resíduo de arabinose (BAJPAI, 2016; CAMARGO, 2018).

Figura 27 - Atividades enzimáticas associadas à hidrólise do arabinano. As endoarabinanases 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.



Fonte: Yeoman et al., (2010)

Nos últimos anos, a enzima α -L-Arafase têm recebido muita atenção devido às suas aplicações desde a produção de bioplásticos (BUENO; BRIENZO, 2025), substâncias químicas de alto valor agregado (CHEN et al., 2025), aprimoramento da digestibilidade da ração animal (WU et al., 2022; MA et al., 2023; KOMAROVA et al.,

2025), produtos farmacêuticos (MENDEZ-ENCINAS et al., 2022), alimentos (EICHHÖFER et al., 2023; XIAO et al., 2024b; ZORN et al., 2024), bebidas (BELDA et al., 2017; ZHU et al., 2017; İLGÜ et al., 2018; MICHIELS et al., 2023), tratamento de águas residuais (BHADRA et al., 2024) e a produção de biocombustíveis (PEREIRA, 2020; SIMÕES et al., 2020; SINGH et al., 2021; LAM et al., 2022; LE et al., 2022; LIU et al., 2022; MARTINS et al., 2022; ROJAS-PÉREZ et al., 2022; DAMAYANTI et al., 2023; NAZIPOVA et al., 2023; TÖLGO et al., 2023), com o intuito de serem usadas para hidrolisar os compostos da hemicelulose, presentes em diversos resíduos agroindustriais, pois catalisam a hidrólise das ligações α -arabinose que ligam os resíduos da estrutura da hemicelulose, possibilitando assim a ação mais eficiente de outras enzimas presentes no coquetel enzimático (SANTOS et al., 2014; FARIA et al., 2020). Tal processo abre um leque de possibilidades reais do uso desses subprodutos, evitando o seu desperdício em larga escala mundial.

2.3 *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

Atualmente, são descritas aproximadamente 148.000 espécies de fungos (ANTONELLI et al., 2020), e mesmo assim possivelmente não correspondem à amostra real de diversidade do Reino Fungi. Consequentemente, existem muitos sistemas de classificações propostos para os fungos, embora estes sofram com as constantes adições e alterações devido ao uso de ferramentas moleculares cada vez mais modernas (GURGEL, 2022).

De acordo com materiais depositados em herbários, existem atualmente 2.114 registros de exsicatas do gênero *Pycnoporus* no Brasil. Destas, 1.972 correspondem a espécie *P. sanguineus*, pois a mesma ocorre em regiões tropicais e subtropicais (BAUMER, 2009; SPECIESLINK, 2025), sendo atualmente a única espécie reportada em território nacional (GURGEL, 2022). Embora ainda existam as espécies *P. cinnabarinus*, *P. coccineus* e *P. puniceus*, estas ocorrem em regiões temperadas. Contudo, todas as espécies pertencentes ao gênero *Pycnoporus* são os principais degradadores de madeira, devido à capacidade de produzirem um complexo enzimático capaz de degradar a lignina e/ou celulose e hemicelulose (RYVARDEN, 1991; WEBSTER; WEBER, 2007).

Segundo Alexopoulos; Sun, (1996) a classificação taxonômica completa do *Pycnoporus sanguineus* é: Reino Myceteae; Divisão: Amastigomycotina; Filo:

Basidiomycota; Classe: Basidiomycetes; Ordem: Aphyllophorales; Família: Polyporaceae; Gênero: *Pycnoporus*; Espécie: *Pycnoporus sanguineus*.

Popularmente conhecida como “orelha-de-pau”, o *P. sanguineus* é facilmente encontrado em florestas, principalmente em troncos caídos e locais abertos e ensolarados, dentro dos diferentes domínios fitogeográficos brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal), durante todas as estações do ano, pois é uma espécie eutérmica, tolerando temperaturas acima de 50 °C, e tanto na natureza como em meios de cultivo, é facilmente reconhecida por sua intensa coloração laranja avermelhada (Figura 28) (UZAN ET AL., 2010; TÉLLEZ-TÉLLEZ, 2016; THE BRAZIL FLORA GROUP, 2018).

Figura 28 - Fungo *P. sanguineus* na natureza.



Fonte: <https://www.fungicultura.com.br/produto/pycnoporus-sanguineus-cultura-liquida/>

Como tantas outras espécies de fungos, o *P. sanguineus* é pesquisado para diversos fins científicos como produção de lacase (GARCIA et al., 2006; EUGENIO et al., 2009; ZILLI, 2023), produção de fármacos (BAUMER, 2009; LU et al., 2010), produção de substâncias de atividade antibacteriana (SMÂNIA et al., 1995; LIN et al., 2020), biossorvente para remoção de metais pesados (YAHAYA; DON, 2014), controle alternativo de doenças em plantas (FIGUEIREDO; SILVA, 2014) e

possibilidade de fonte de α -amilase (DE ALMEIDA SIQUEIRA et al., 1997). Entretanto, ainda são limitadas, as pesquisas direcionadas a α -L-Arafases do gênero *Pycnopus*, sendo o mais atual a caracterização dessas enzimas juntamente com outras do extrato enzimático deste fungo e sua aplicação em biorrefinaria (FALKOSKI et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar uma prospecção em diversas espécies fúngicas em diferentes espécies fúngicas cultivadas em meio sólido e semi-sólido para produzir, purificar e caracterizar a α -L-Arafase com maior atividade.

3.2 ESPECÍFICO

- Avaliar a produção de α -L-Arafase por espécies de fungos filamentosos disponíveis da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LMBA) do IBILCE/UNESP em farelo de trigo, farelo de laranja e bagaço de cana;
- Selecionar a espécie fúngica e condição de maior produção de α -L-Arafase e cultivar o fungo para acompanhar a atividade enzimática ao longo do cultivo;
- Realizar uma purificação parcial com cromatografias de exclusão molecular e troca iônica;
- Caracterizar a enzima por meio de ensaios dos parâmetros cinéticos, análise do efeito de diferentes pH, temperatura, estudo da estabilidade, efeito de íons e de diversas substâncias químicas na atividade enzimática;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARÂMETROS DE CULTIVO DE FUNGOS

Os fungos utilizados no desenvolvimento desse trabalho foram: *Myceliophthora heterothallica*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Phebia sp*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medula-panis*. A reativação dos fungos seguiu em placas de petri contendo meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*), com exceção da espécie *Pycnoporus sanguineus*, que foi reativada em meio extrato de malte e ágar. Foram incubadas a 37 °C em incubadora B.O.D, durante duas semanas.

4.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A produção de enzimas foi avaliada por cultivo em dois estados: sólido e semi-sólido conforme adaptado de Carvalho (2018), utilizando farelo de laranja e farelo de trigo de forma isolada e combinados com bagaço de cana-de-açúcar como substratos. Tais substratos foram previamente lavados com água e secos em estufa a 60 °C até o peso constante.

Para as fermentações, foi utilizado um composto, variando suas constituições, conforme a tabela 4:

Tabela 3 - Parâmetros para cultivo e produção de α -L-Arafase de fungos.

	Semi-sólida			Sólida			
	F 1	F 2	F3	F 3	F 4	F 5	F 6
Farelo de laranja (g)	5	-	-	5	-	5	-
Farelo de trigo (g)	-	5	-	-	5	-	5
Bagaço de cana (g)	3	3		3	3	-	-
Espiga de milho (g)	-	-	5				
1 % sulfato de amônia (mL)	10	10	10	-	-	-	-
0,1 % sulfato de magnésio (mL)	10	10	10	-	-	-	-

Fonte: Autoria Própria. F = fermentação; g = gramas. mL = Mililitros.

Para fermentação do *P. sanguineus*, houve a substituição de 1 % e 0,1 % para 10 mL de meio mineral pH 6,5 (CaCl_2 ; KCl; NH_4Cl ; MgCl_2 ; NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ;

Ca(OH)₂; CuSO₄; (NH₄)₂SO₄; MgSO₄; Glicose) Adaptado de Daniel, (2014); Rodríguez et al., (2019).

Para o cultivo dos fungos, foram inoculados 3 discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro coletados da reativação do tópico 4.1. O cultivo dos fungos foi acompanhado por 504 horas. Ao fim da fermentação, para obtenção do extrato enzimático bruto, foram adicionados 40 mL de água ultrapura (*ELGA Scientific®*) em cada frasco Erlenmeyer. Estes foram então mantidos sob agitação em “*shaker*” a 180 rpm por 1 hora para homogeneização, seguido de filtração em tecido sintético musseline. O filtrado foi centrifugado a 17.800 $\times g$ por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática. Para obtenção do extrato enzimático de *P. sanguineus*, um Erlenmeyer de cultivo foi retirado a cada 2 dias para quantificação e atividade das enzimas hemicelulolíticas secretadas.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Inicialmente a atividade α -L-Arafase foi quantificada na seguinte mistura de reação: 20 μ L de extrato enzimático bruto combinados a 80 μ L de substrato *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (pNPAf) 0,5 mmol L⁻¹, diluído primeiramente em etanol 100% e posteriormente em tampão fosfato de potássio pH 6,0, seguindo as instruções do fornecedor, Sigma-Aldrich. As misturas foram feitas em microplacas de polipropileno de 96 poços de 250 μ L e incubadas em Termociclador (Veriti Thermal Cycler, Thermo Scientific®) a 50 °C por 10 minutos. Após isso, 100 μ L de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 mol L⁻¹ foi adicionado para parar a reação, seguindo para a mensuração de absorbância por espectrofotometria a 420 nm em leitor de microplaca. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por mL min⁻¹. Uma curva de calibração com *p*-nitrofenol foi utilizada para determinar a unidade da enzima. Eventualmente alguns ensaios foram realizados em tubos, com incubação em banho-maria e leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific®).

4.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

A cromatografia de exclusão molecular foi feita em coluna *Pharmacia* de 1,6 x 60 cm preenchida com resina Sephadex G-75 e equilibrada em tampão acetato pH 4,0 contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaCl em cromatógrafo *Biologic Duo-Flow* (Bio-Rad), com

monitoramento da absorbância em 280 nm e coleta automática das frações após um terço do volume da resina. Foi feito o ensaio enzimático antes descrito para detecção das frações com a enzima α -L-Arafase, e os tubos com maior atividade foram juntados para o próximo passo de purificação. Antes da aplicação na resina de troca iônica, a amostra foi dessalinizada e teve troca do tampão usando uma coluna de Sephadex G-25. Também foi feita uma análise do efeito de NaCl sobre a atividade da enzima, na faixa entre 0,010 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ do sal, para testar eventual inibição pela força iônica usada nos procedimentos de cromatografia. A cromatografia de troca iônica foi feita em sistema Akta Purifier 10 (GE Healthcare) com coluna HisTrap HP, 1 mL, em resina Q-Sepharose utilizando Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹, pH 8,0 como tampão inicial (o mesmo usado para equilibrar a resina), e o mesmo tampão, contendo 0,4 mol L⁻¹ de NaCl, como final. As frações foram coletadas ao longo da aplicação da amostra e até o final do gradiente, monitorando a condutividade e a absorbância em 280 nm. O teste enzimático permitiu detectar as frações com atividade de α -L-Arafase, que foram juntadas, divididas em alíquotas, e congeladas para os demais experimentos.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As análises de eletroforese tanto do extrato enzimático puro como das frações oriundas das cromatografias foram realizadas conforme proposto por Laemmli (1970) utilizando SDS-PAGE com gel separador de 12 % e gel concentrador de 5 % de poliacrilamida e coloração com *Coomassie Blue*, conforme descrito no item 4.3.8.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA α -L-ARAFASE

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados em triplicata, permitindo o cálculo da média aritmética e desvio padrão.

4.6.1 Determinação de pH ótimo

Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática, foram usadas soluções tamponantes 0,1 mol L⁻¹ na faixa de pH de 3,0 a 10,0, sendo eles: citrato de sódio (pH 3,0, 3,5), acetato de sódio (pH 4,0 a 5,5), MES (pH 6,0, 6,5), HEPES (7,0, 7,5), Bicina (pH 8) e CAPS (pH 9,0; 10,0). A reação enzimática com o substrato pNPAf seguiram o padrão descrito no item 4.3.

4.6.2 Determinação de temperatura ótima

Para avaliar o efeito de temperatura na atividade da enzima, foi utilizado o pH de maior atividade enzimática identificado no experimento anterior. Assim, avaliamos o efeito de temperatura na faixa de 30 a 85 °C.

4.6.3 Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos da enzima α -L-Arafase frente ao substrato pNPAf foram determinados utilizando as concentrações finais de 0,5 a 8 mmol L⁻¹ de substrato. As reações enzimáticas foram conduzidas nas melhores condições pré-determinadas de pH e temperatura para a atividade da enzima. Os valores da constante ou concentração de Michaelis K_M e da velocidade máxima ou taxa máxima de reação V_{max} foram obtidos a partir de ajuste não linear dos dados seguindo a equação de Michaelis-Menten ($V_o = (V_{max} * [S]) / (K_m + [S])$) no software QtiPlot versão 1.2.4 para Linux (IONDEV SRL, 2024).

4.6.4 Análise de estabilidade em relação ao pH

Para análise da estabilidade da α -L-Arafase em relação ao pH, a enzima, na ausência do substrato, foi pré-incubada nos diferentes valores de pH 3,0 a 10,0, por 24 horas a 4 °C. Após a etapa de pré-incubação, a reação enzimática foi conduzida nas melhores condições de pH e temperatura pré-determinados.

4.6.5 Análise de estabilidade térmica

Para análise da estabilidade da α -L-Arafase em reação à temperatura, foi seguido um tempo de incubação de 1 hora em temperaturas de 30 a 85 °C.

4.6.6 Análise de desnaturação térmica irreversível

Para a análise da termodinâmica do efeito de desnaturação térmica irreversível, foi realizada a partir dos dados obtidos nos ensaios de termoestabilidade conduzidos no tópico anterior, utilizando cálculos propostos por Siddiqui et al., 1997, Sabiq et al., 2010; 2012.

Foi confeccionado um gráfico de Arrhenius, representando o logaritmo natural (ln) da atividade enzimática versus $1000/T$, em que T corresponde à temperatura

absoluta em Kelvin (temperatura em graus Celsius + 273,15). Deste, foram calculados a temperatura ótima, a energia de ativação da enzima (E_a) e os coeficientes de temperatura (Q_{10}).

A temperatura ótima foi calculada a partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as retas, obtidas por regressão, das porções ascendente e descendente do gráfico anteriormente mencionado. Já a energia de ativação (E_a) foi calculada pela regressão linear da porção descendente do gráfico de Arrhenius (correspondente a faixas de temperaturas na qual a estrutura não é sensivelmente afetada), utilizando-se o valor de inclinação da reta multiplicado pela constante universal dos gases ($R = 8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), como mostrado na equação:

$$E_a = -(\text{inclinação} * R)$$

Os coeficientes de temperatura (Q_{10}) foram calculados pela segunda equação e correspondem ao aumento da taxa de reação ou velocidade a cada dez graus Celsius de elevação da temperatura:

$$\ln Q_{10} = E_a * 10 / (R * T^2)$$

Outro gráfico foi confeccionado com o logaritmo natural da atividade residual em função do tempo de incubação térmica, em minutos. Aplicando-se a regressão linear sobre os resultados obtidos para cada temperatura, foram obtidos os valores das inclinações, que correspondem à taxa de primeira ordem da inativação térmica, - k_D (min^{-1}). A partir deste segundo gráfico, obteve-se o tempo de meia vida da enzima ($T_{1/2}$). Esse valor corresponde ao tempo no qual, em cada temperatura, a atividade cai à metade da original, e foi calculado a partir da seguinte equação:

$$T_{1/2} = \ln 2 / k_D$$

Para calcular a energia de ativação da desnaturação térmica, $E_{a(D)}$ (K J mol^{-1}), foi construído um gráfico do logaritmo natural da taxa de primeira ordem da inativação térmica k_D obtida anteriormente versus $1000/T$. Aplicou-se a regressão linear, sendo a inclinação da reta multiplicada pela constante universal dos gases ($R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), como na equação:

$$E_{a(D)} = -(\text{inclinação} * R)$$

Por fim, foram calculados a entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_D), a energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica (ΔG_D) e a entropia de ativação da desnaturação térmica (ΔS_D), com uso das equações a seguir, onde k_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), e h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$):

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

$$\Delta G_D = -(R \cdot T) \cdot \ln[(k_D \cdot h) / (k_B \cdot T)]$$

$$\Delta S_D = (\Delta H_D - \Delta G_D) / T$$

4.6.7 Efeito de íons metálicos

Foi avaliado o efeito de íons na atividade da enzima ao incubá-la individualmente com CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 , KCl , RbCl e ZnCl_2 na concentração final de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A enzima foi pré-incubada com os diferentes sais por 10 minutos à temperatura de reação. Em seguida, a reação foi conduzida nas condições ótimas de atividade enzimática pré-determinadas.

4.6.8 Efeito de substâncias químicas

Para a análise do efeito de surfactantes (SDS e Triton), solventes (etanol, isopropanol, DMSO e acetona), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e um redutor tiólico (DTT), procedimentos semelhantes foram seguidos. Foram testadas duas concentrações finais (10 e 50 mmol L^{-1}) contra um controle na ausência dessas substâncias.

4.6.9. Efeito de compostos fenólicos

Para esta análise, a solução enzimática foi exposta aos seguintes compostos químicos na concentração final de 10 mmol L^{-1} : ácido p-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e ácido vinílico. Uma mistura composta pela solução enzimática e a solução dos compostos mencionados foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, a atividade enzimática foi determinada nas condições ótimas de atividade enzimática pré-determinadas. Para as representações gráficas foi usado o programa QtiPlot (Ion Vasilief, 2025).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE α -L-ARAFASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SEMI-SÓLIDO

Os resultados obtidos sobre a produção de α -L-arabinofuranosidase por diferentes espécies de fungos em dois sistemas de fermentação podem ser visualizados na Tabela 5. Dentre as espécies testadas, o fungo *Pycnoporus sanguineus* mostrou a maior produção de enzima.

Tabela 4 – 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.

Fermentação	Meio de Cultura	Espécie	U/mL	± D.P.
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Schizophyllum commune</i>	0,004	0,0003
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Schizophyllum commune</i>	0,021	0,0006
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	0,023	0,0007
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	0,002	0,0001
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Myceliophthora heterothallica</i>	0,003	0,0002
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Myceliophthora heterothallica</i>	0,016	0,0001
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Trichoderma reesei</i>	0,030	0,0017
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Trichoderma reesei</i>	0,032	0,0016
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,027	0,0015
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,012	0,0040
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Phlebia sp</i>	0,003	0,0001
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Phlebia sp</i>	0,018	0,0145
Semi-sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,004	0,0006
Semi-sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,010	0,0008
Semi-sólida	F. Trigo	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,044	0,0022
Semi-sólida	E. Minho	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,041	0,0013
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Schizophyllum commune</i>	0,003	0,0000
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Schizophyllum commune</i>	0,021	0,0180
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	0,023	0,0012
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	0,003	0,0002
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Myceliophthora heterothallica</i>	0,003	0,0005
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Myceliophthora heterothallica</i>	0,016	0,0023
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Trichoderma reesei</i>	0,033	0,0006
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Trichoderma reesei</i>	0,031	0,0010
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,039	0,0016
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,013	0,0015
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Phlebia sp</i>	0,003	0,0001
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Phlebia sp</i>	0,012	0,0022
Sólida	F. Laranja + B. cana	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,011	0,0026
Sólida	F. Trigo + B. cana	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,014	0,0010

Fonte: Autoria Própria

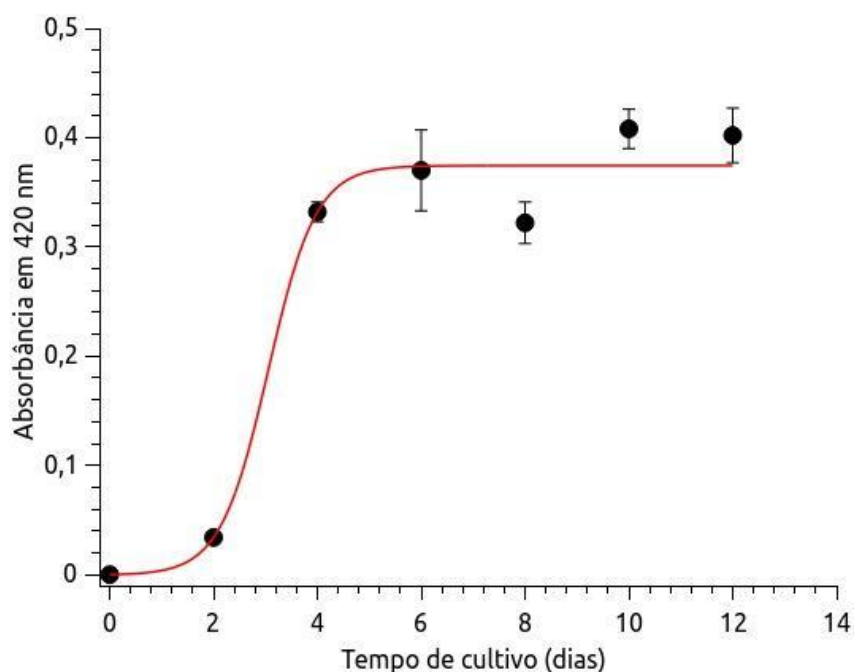
Em relação aos subprodutos e resíduos da agroindústria, o farelo de trigo apresentou os maiores valores de produção, uma vez em que contém arabinoxilanas em maior nível que os demais resíduos, sendo mencionado como um forte indutor na

produção de arabinofuranosidase (BEAUGRAND et al., 2004; LAURUENG TANA; PINPHANICHAKARN, 2006; GUERFALI et al., 2011; WONG; BATT, 2023). Embora a laranja e outras fontes de pectina sejam conhecidas como indutores da produção de arabinofuranosidase e alguns dos seus polissacarídeos apresentem cadeias laterais com resíduos de α -L-arabinose, individuais, lineares ou ramificados (TERRASAN et al., 2010; TERRONE et al., 2020).

5.2 TEMPO DE CULTIVO

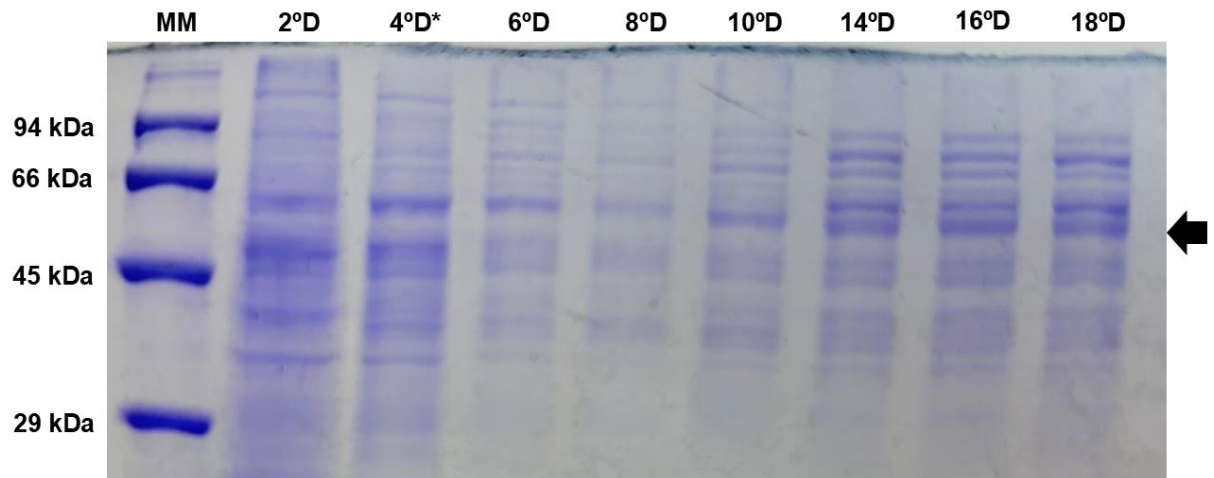
A análise da atividade em função do tempo de cultivo aponta uma rápida elevação entre o segundo e quarto dia, estabilizando-se acima do sexto dia (Figura 29), sendo ideal para as análises posteriores a partir do oitavo dia (Figura 30), observa-se também um declínio a partir do vigésimo dia.

Figura 29 - Curva de produção da enzima α -L-Arafase de *P. sanguineus* em farelo de trigo.



Fonte: Autoria Própria

Figura 30 – Perfil de proteínas da produção da enzima α -L-Arafase de *P. sanguineus* analisado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

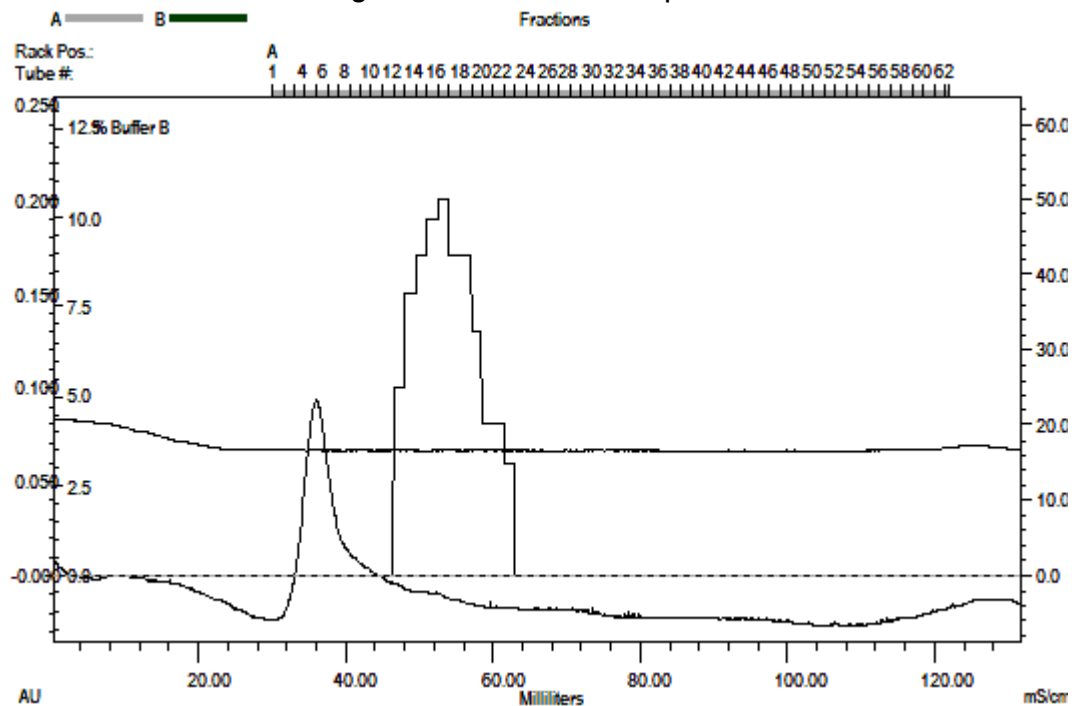


Fonte: Autoria Própria. kDa = quiloDalton; MM = Marcador Molecular; D = dia. * = concentrado com TCA.

5.3 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA SECRETADA POR *P. SANGUINEUS*

A figura 31 mostra o perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular com o perfil de proteína avaliado em 280 nm (curva contínua) e a atividade de α -L-Arafase (histograma entre as frações 10-22), eluindo após um pico de proteínas contaminantes do extrato de *P. sanguineus*. Como a resina tem uma faixa de separação entre 3 e 80 kDa, e o formato da curva de proteína tem o aspecto de ter eluído no 'volume morto' (*void volume*), a enzima teria, provavelmente, massa molecular menor, entre 60 e 50 kDa.

Figura 31 - Perfil de proteínas e atividade da cromatografia de exclusão molecular do extrato de *P. sanguineus* em resina Sephadex G-75.

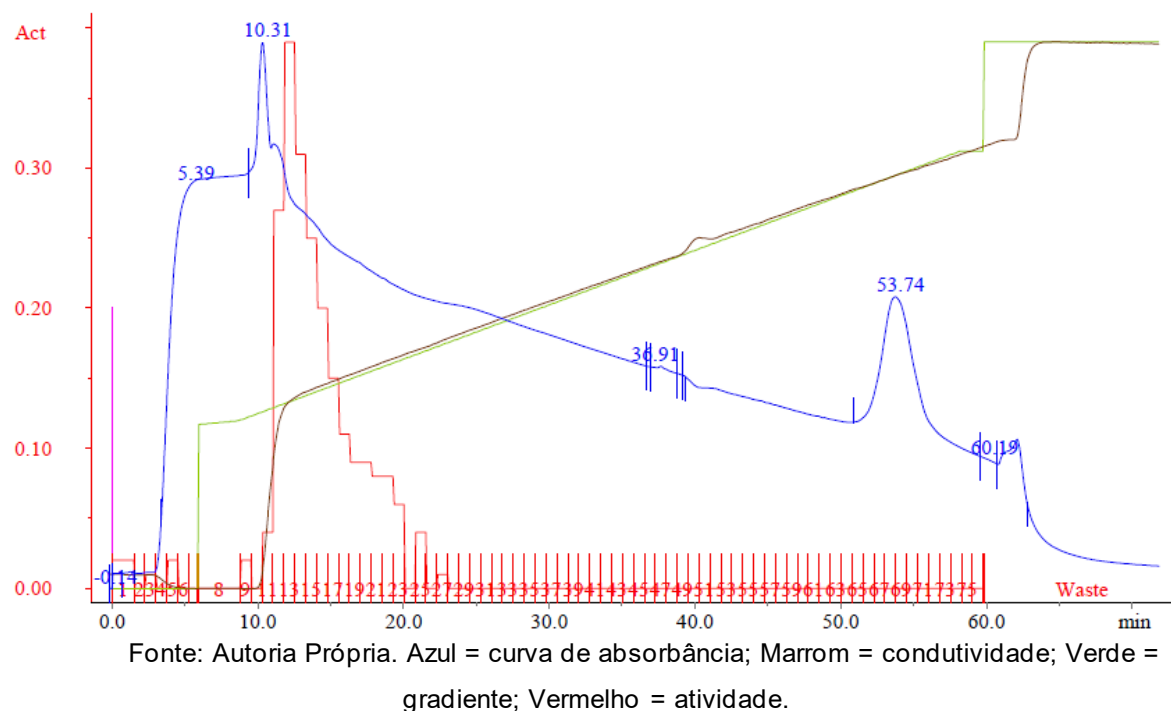


Fonte: Autoria Própria

A figura 32 mostra o perfil de eluição da cromatografia de troca iônica. A curva azul representa o perfil de absorbância em 280 nm, o marrom a condutividade, o verde o gradiente (mistura percentual entre os tampões inicial e final) e o histograma vermelho a atividade de α -L-Arafase. Observa-se a eluição da enzima em região do perfil no qual eluem conjuntamente outras proteínas.

Uma análise de eletroforese em SDS-PAGE (resultados não mostrados) mostrou a presença de pelo menos outras cinco bandas proteicas, o que condiz com essa observação.

Figura 32 - Perfil de cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) do material proveniente da cromatografia de exclusão molecular.



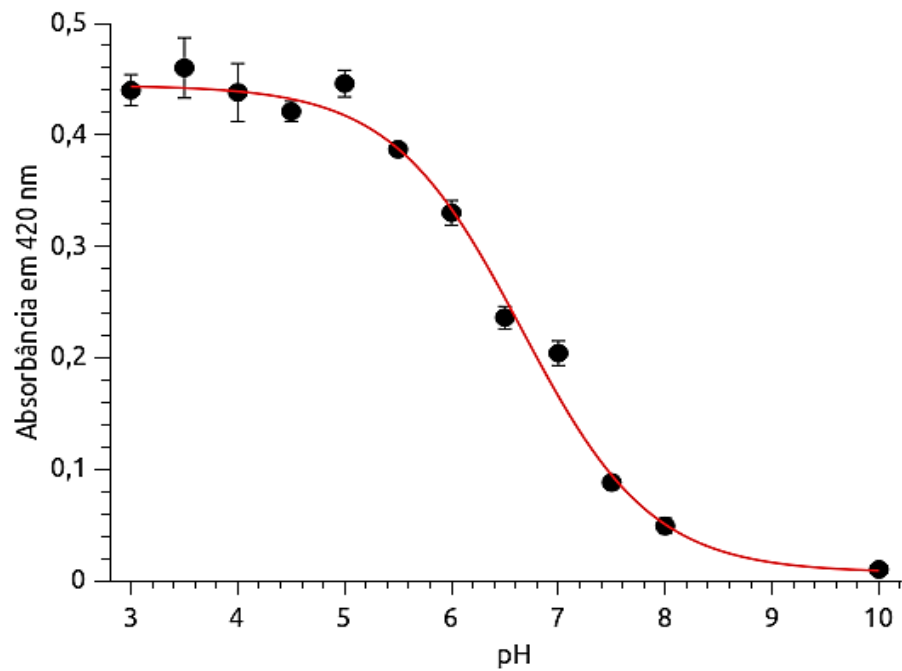
5.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL

5.4.1 Efeito de pH na atividade

Um dos ensaios foi feito para avaliar a atividade enzimática em função de diferentes pH, para definir o pH ótimo da proteína. De acordo com os dados apresentados na figura 33, a enzima possui atividade ótima na faixa de 3,0 a 5,0, sendo uma característica típica de α -L-Arafases degradadora de biomassa, diminuindo acentuadamente acima dele, e praticamente inativa em pH 10.

Este resultado se assemelha a alguns dados na literatura que indicam que a α -L-Arafase produzida por fungos apresentam pH ótimos ácidos na faixa de pH 4 (KOSEKI et al., 2003; CHACÓN-MARTÍNEZ et al., 2004; ALIAS et al., 2011; TERRONE et al., 2020; LAMBRÉ et al., 2022; LONG et al., 2023; MÉNDEZ-LÍTER et al., 2023; SAKAMOTO; KAWASAKI, 2003; DE ALBUQUERQUE et al., 2024). Embora alguns fungos endofíticos, degradadores de bioplásticos e um do gênero *Trichoderma* possam apresentar pH ótimos neutros a básicos, entre pH 6 a 9 com uma notória diminuição de atividade quando analisada em pH 4,0, estando ligada provavelmente pela ionização dos grupos, resultando em alterações na configuração da enzima. (MOTTA ET AL., 2021; TEMPORITI et al., 2022).

Figura 33 - Efeito do pH na α -L-Arafase de *P. sanguineus*.

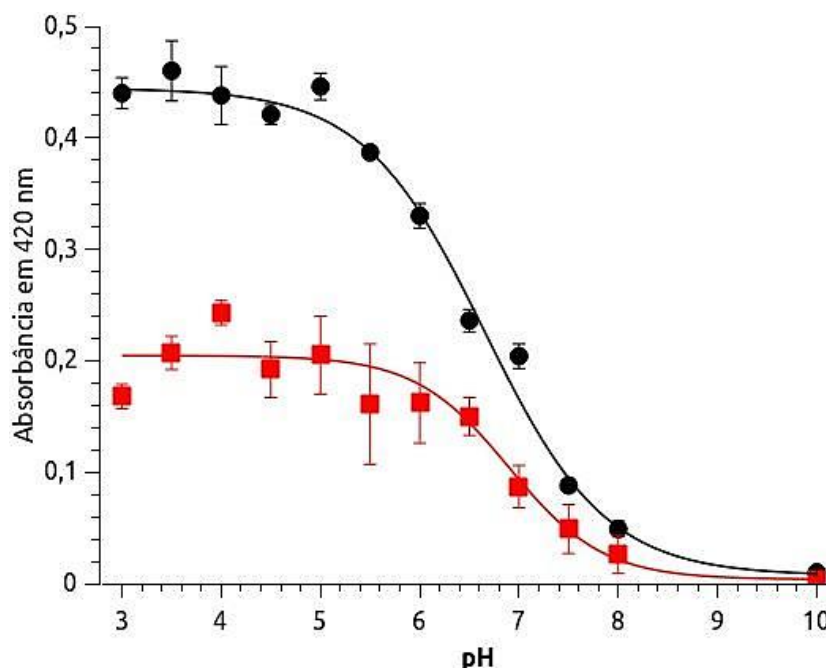


Fonte: Autoria Própria

5.4.2 Efeito de estabilidade de pH na atividade

Após incubação por 24 horas a 4 °C em diferentes pH (Figura 34), a atividade (quadrados vermelhos) foi determinada e comparada com a atividade inicial em cada pH (círculos pretos), que correspondeu ao item 5.5. A α -L-Arafase manteve o perfil no seu desempenho catalítico, embora comprometido, com redução de 50% de sua atividade inicial, independente do pH.

Figura 34 - Estabilidade da atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus* em relação ao pH. Comparação no tempo inicial e após 24 horas em cada pH



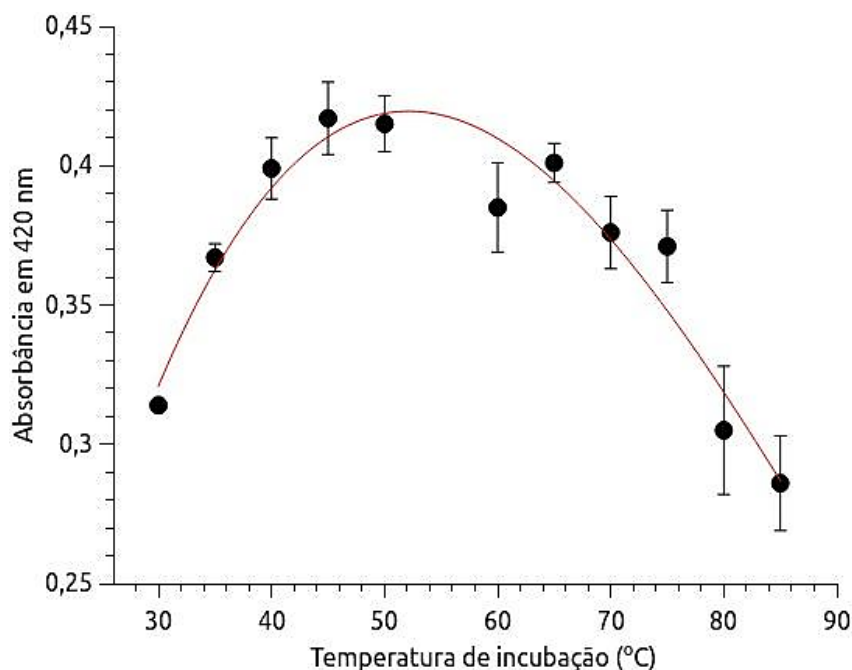
Fonte: Autoria Própria

Os resultados se assemelham a outros encontrados na literatura, cujas α -L-Arafases de fontes fúngicas são consideradas ácidas, mantendo sua estabilidade na faixa de pH ideal entre 3,0 e 5,0 (CULLETON et al., 2014; MARTINS et al., 2022; LI et al., 2023; SI et al., 2023; ARRUDA et al., 2025), além de se manterem estáveis em uma faixa de temperatura entre 30 e 60 °C (Liu et al., 2022b, 2025). Enquanto a enzima descrita por Saha, (2002) manteve estabilidade em pH 3 a 8 após 1 hora em 40 °C, e a relatada por Lu et al., (2025a) excedeu 40% de sua atividade residual relativa, após incubação de 24 horas em faixa de pH de 6 a 8.

5.4.3 Efeito da temperatura na atividade da enzima

Outro ensaio teve por objetivo analisar a atividade da α -L-Arafase em relação à temperatura. Para isso, temperaturas entre 30 e 85 °C foram avaliadas em tampão acetato de sódio pH 4,0 em período de 10 minutos. Na figura 35, é possível verificar o comportamento da atividade da α -L-Arafase nas diferentes faixas de temperatura avaliadas, onde pode-se considerar que a temperatura ótima é de 50 °C. Tal resultado é acompanhado por trabalhos recentes, em que a determinação da temperatura ótima de reação para α -L-Arafase indica que no geral elas ocorrem entre 50 e 55 °C (WU et al., 2022; NASCIMENTO et al., 2023; SI et al., 2023; TSUKIDA et al., 2023).

Figura 35 - Efeito da temperatura na α -L-Arafase de *P. sanguineus*, em incubação de 10 minutos.

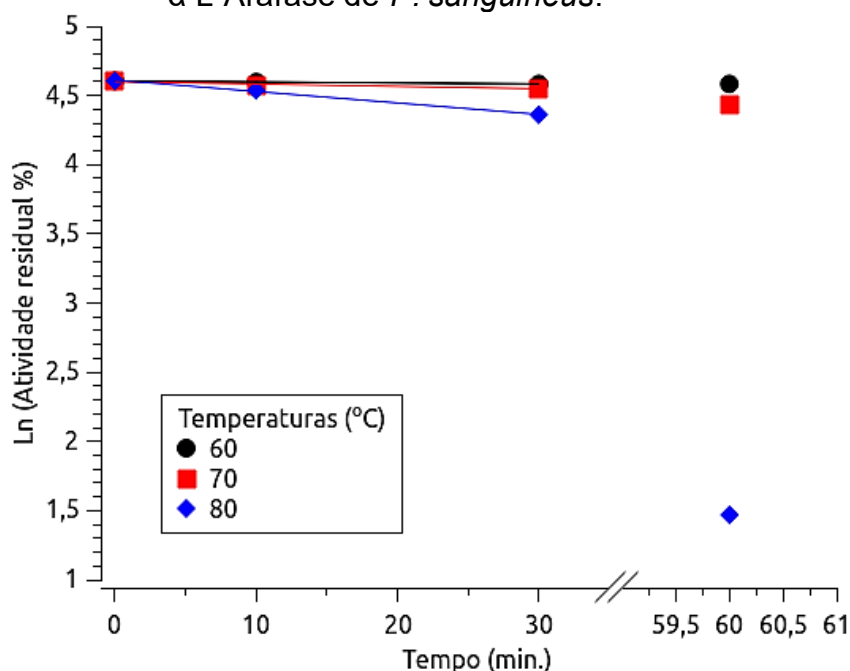


Fonte: Autoria Própria

Quando analisado o perfil de atividade, verificou-se que a faixa ótima de temperatura foi no intervalo entre 45 e 50 °C, mostrando uma diminuição acima desses valores, em decorrência da desnaturação térmica. Tal resultado está dentro dos valores de temperatura ótima encontrados na literatura quando submetidos ao mesmo substrato usado neste trabalho (HUY et al., 2013; CULLETON et al., 2014; WANG et al., 2014; SINGH CHADHA et al., 2017; MARTINS et al., 2022; WU et al., 2022; YANG et al., 2025). Diferentemente de Camargo, (2018) que ao caracterizar uma α -L-Arafase de *Thielavia terrestris* mostrou que essa possui uma temperatura ótima bastante baixa, de 25 °C, enquanto Michiels et al., (2023) e Liu et al., (2024) ao utilizarem enzimas termoestáveis em processo de conversão de biomassa e enzimas de filtração que visam a degradação do arabinoxilano identificaram temperaturas ótimas para α -L-Arafase a 80 °C.

A figura 36 mostra o efeito da temperatura sobre a atividade da α -L-Arafase. Com os valores da inclinação obtidos foi feito o cálculo da taxa de desnaturação térmica k_d (min^{-1}). Os valores do Logaritmo natural ($\ln$) da atividade residual (%) vs. o tempo para a regressão linear foram considerados até 30 minutos, pois a 80°C ocorreu uma brusca diminuição da atividade após esse período, conforme pode ser observado na figura 35.

Figura 36 - Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*.

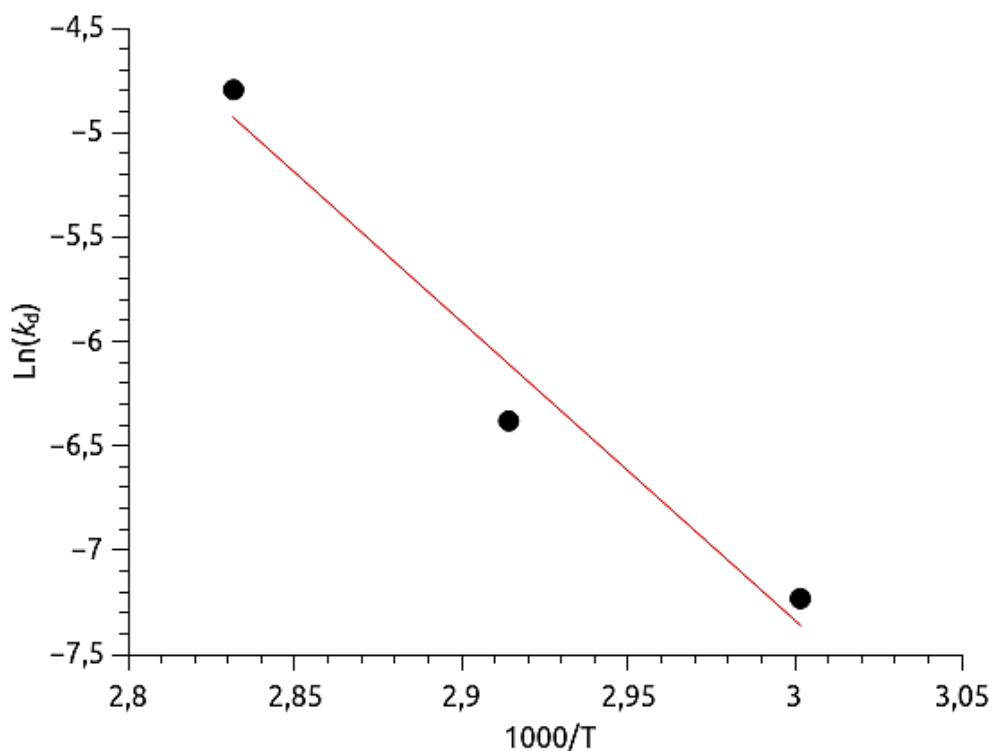


Fonte: Autoria própria

De posse dos valores de k_D foi construído um outro gráfico de Arrhenius de primeira ordem para cálculo da energia de ativação da desnaturação, $E_{a(D)}$, mostrado na figura 37. Foi obtido o valor de $118,85 \text{ kJ mol}^{-1}$, a partir do qual, aplicando as equações descritas na metodologia, foram obtidos os valores de $\Delta H_{(D)}$, $\Delta G_{(D)}$ e $\Delta S_{(D)}$ mostrados na tabela 6, que são estimativas para os parâmetros que descrevem a desnaturação térmica da α -L-Arafase.

Proteínas com maior $E_{a(D)}$ são mais estáveis em relação à desnaturação térmica (SAQIB et al., 2012). O valor obtido foi maior do que o relatado para uma xilanase recombinante ($99,58 \text{ kJ mol}^{-1}$) em trabalho anterior do grupo (ZANONI et al., 2021).

Figura 37 - gráfico de Arrhenius de primeira ordem para cálculo da energia de ativação da desnaturação, $E_{a(D)}$ da α -L-Arafase de *P. sanguineus*.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Cinética e parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica da α -L-arabinofuranosidase de *P. sanguineus*.

Temperatura		k_d (min^{-1})	$T_{1/2}$ (h)	ΔH_D (kJ mol^{-1})	ΔG_D (kJ mol^{-1})	ΔS_D ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
$^{\circ}\text{C}$	K					
60	333,15	-0,00072	16,0	116,08	90,59	77
70	343,15	-0,00169	6,8	116,00	90,97	73
80	353,15	-0,00827	1,4	115,92	89,05	76

Fonte: Autoria própria.

A meia-vida da enzima decai rapidamente a cada aumento de 10°C , sugerindo que sua utilização à temperatura ótima de 50°C (não incluída na análise) seria a melhor opção. Enzimas com termoestabilidade acima de 50°C são em geral as mais procuradas, porém uma enzima com as propriedades da estudada neste projeto pode apresentar, por outro lado, a possibilidade de ser utilizada por longos períodos, conforme apontado por Saqib et al., (2012) em uma análise de estabilidade térmica de endoglucanase de *Aspergillus fumigatus*.

Os valores estimados para o processo de desnaturação apontam que a mesma tem caráter endotérmico ($\Delta H_{(D)} > 0$) e aumento da entropia $\Delta S_{(D)}$. A variação da entalpia

(H) parece mostrar um pequeno decréscimo conforme aumenta a temperatura, porém as variações da energia livre de Gibbs (G) e entropia (S) não têm tendência clara que permita uma análise mais aprofundada.

Durante a desnaturação de proteínas, a variação endotérmica da entalpia é um fenômeno termodinâmico relevante que ilustra a absorção de calor necessária para desfazer as interações que mantêm a estrutura original da proteína, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, salinas e de Van der Waals (DEMIREL, 2023).

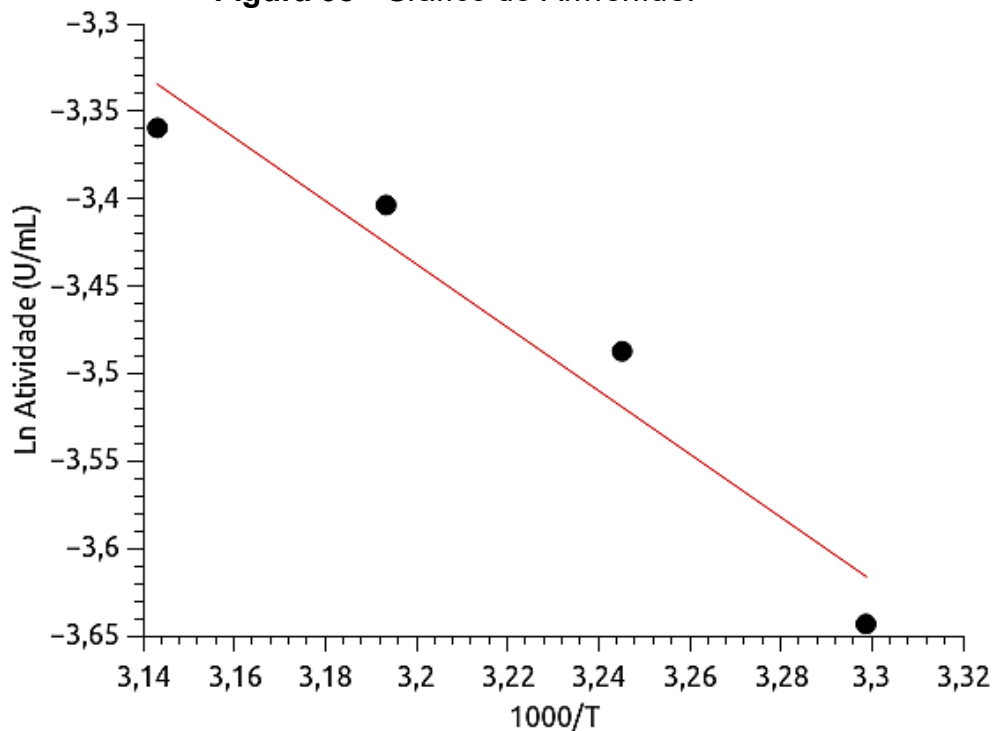
A pouca variação da energia livre de Gibbs durante a desnaturação proteica, ocorreria por uma compensação entre a entalpia e a entropia. Conforme a entalpia cresce por causa do rompimento de interações estabilizadoras, a entropia também se eleva devido à maior desordem conformacional da proteína desnaturada. Este equilíbrio leva a uma variação mínima na energia livre de Gibbs (ΔG), mantendo o processo de desnaturação próximo ao equilíbrio termodinâmico (LIU et al., 2000).

A partir dos resultados obtidos na faixa ascendente de atividade, foi possível calcular a energia de ativação da enzima e o coeficiente térmico Q_{10} (Tabela 6) (Figura 38), de acordo com Saqib et al., (2010, 2012), obtendo o valor de $15,05 \text{ kJ mol}^{-1}$. De posse desse valor foi possível calcularmos o Q_{10} .

Tabela 6 - Energia de ativação da enzima e o coeficiente térmico Q_{10} .

Tempo (°C)	T (K)	Ln Q_{10}	Q_{10}
30	303,15	0,197	1,22
35	308,15	0,191	1,21
40	313,15	0,185	1,20
45	318,15	0,179	1,20

Fonte: Autoria própria

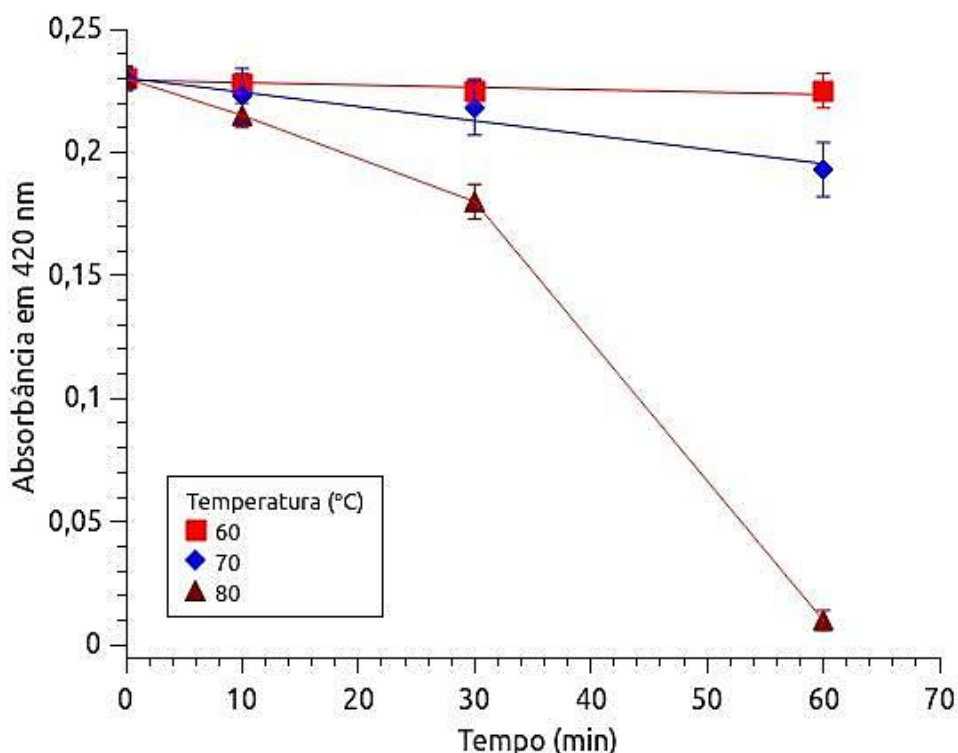
Figura 38 - Gráfico de Arrhenius.

Fonte: Autoria própria.

5.4.4 Efeito da desnaturação irreversível

A enzima foi incubada em três temperaturas acima da ótima em diferentes tempos (até 1 hora) para observar o decréscimo da atividade (Figura 39). Observa-se que a 60 °C não houve diminuição significativa da atividade até 1 h, enquanto a 70 esse comportamento esperado se torna mais evidente após 10 minutos, porém mantém atividade elevada ainda após 1 h. Já a 80 °C é perceptível a queda progressiva da atividade no primeiro tempo analisado, acentuando-se depois. a α -Arafase de *Chrysosporthe cubensis* mostrou-se mais estável à desnaturação, uma vez que manteve mais de 80% de sua atividade máxima após 1 h de pré-incubação em uma ampla faixa de pH (de 3 a 9) (DE ALBUQUERQUE et al., 2024). Os valores demonstram uma considerável termoestabilidade da enzima, mesmo sem a presença de cofatores. Diferente do relatado por Martins et al., (2022) que para aumentar a atividade enzimática residual, foi necessário a presença de cofatores como cálcio e manganês.

Figura 39 - Estabilidade térmica da α -L-Arafase de *P. sanguineus*



Fonte: Autoria Própria

5.4.5 Efeito de íons na atividade da α -l-arafase

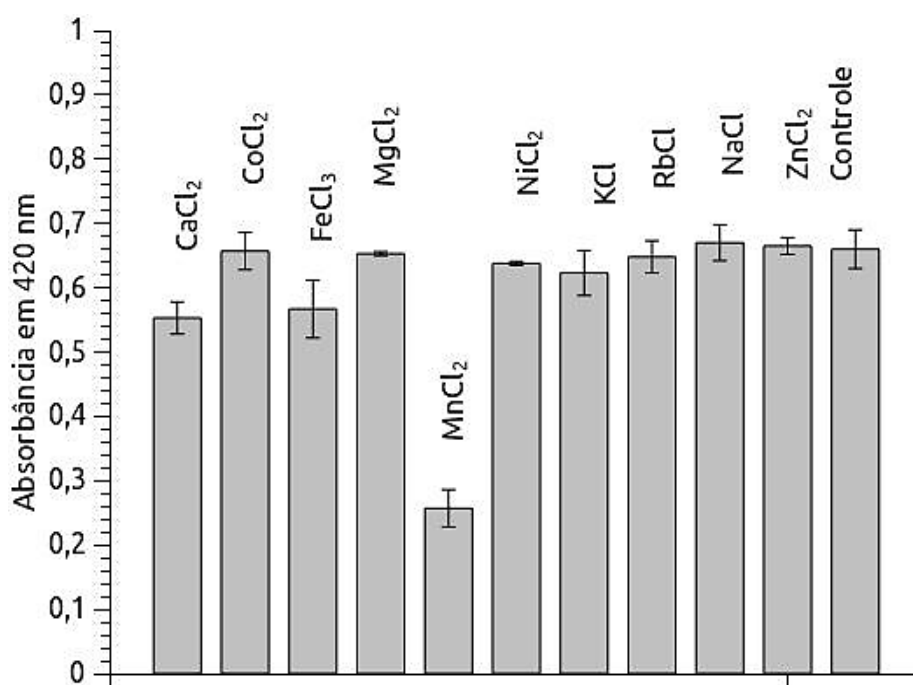
Dentre os íons na forma de sais de cloro testados na atividade da enzima, nenhum resultou positivamente na atividade da α -L-Arafase (Figura 40), oito se mantiveram estáveis quando comparados ao controle. Enquanto dois destacaram-se por induzir decréscimo da atividade. O CaCl_2 , ocasionou um leve decréscimo, enquanto o manganês exerceu maior inibição enzimática, levando a uma queda de mais de 50% da atividade, resultado divergente de Motta et al., (2021) que constatou que justamente na presença desse cátion apresentou maior atividade a α -L-Arafase de *Trichoderma harzianum*, porém Si et al., (2023) observou inibição total da atividade da enzima em *Trametes hirsuta*.

A atividade da α -L-Arafase produzida por fungos da espécie *Aspergillus niger* e *Coriolopsis byrsina* tiveram suas atividades reduzidas quando expostas a reações com Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} (LI et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2023). Tais resultados divergem de outras α -L-Arafases produzidas por fungos, como para α -L-Arafase produzida em fungo de podridão parda, que obteve um aumento da atividade em vários íons exceto Fe^{2+} . Enquanto Li et al., (2023) obteve aumento significativo da

atividade na presença de 10 mmol L⁻¹ de Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e K⁺ ao analisar tais íons com a espécie *Aspergillus awamori*.

Os cátions podem interagir com aminoácidos em diferentes porções da proteína, de modo a provocar redução ou aumento da atividade enzimática, assim como influenciar diretamente no sítio ativo, por exemplo, os grupos tiólicos, levando à inativação devido a mudanças conformacionais (BEILEN; LI, 2002; LI et al., 2023; NASCIMENTO et al., 2023). Neste caso, a ausência de estímulo ou inibição por oito íons metálicos analisados, sugere que a α -L-Arafase estudada não necessita destes íons para exercer sua atividade catalítica.

Figura 40 - Efeito de cátions sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*



Fonte: Autoria Própria

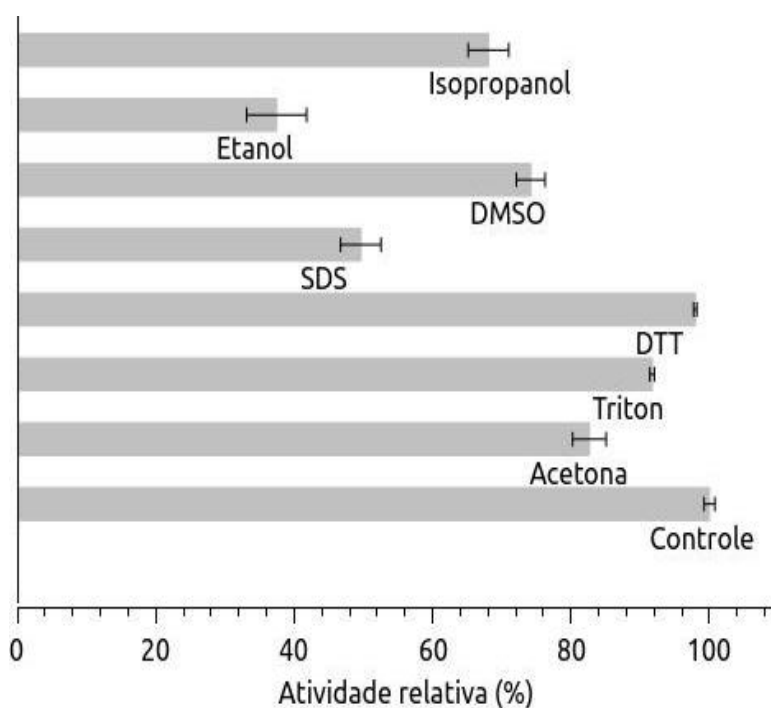
5.4.6 Efeito de solventes na atividade

Da mesma forma como observada no item anterior, algumas substâncias podem afetar a ação catalítica. Dentre as diversas substâncias químicas, foram testados os solventes (etanol, isopropanol, DMSO e acetona), tensoativos (SDS e

Triton), e um redutor tiólico (DTT) nas concentrações de 10 mmol L⁻¹ (Figura 41) e 50 mmol L⁻¹ (Figura 42).

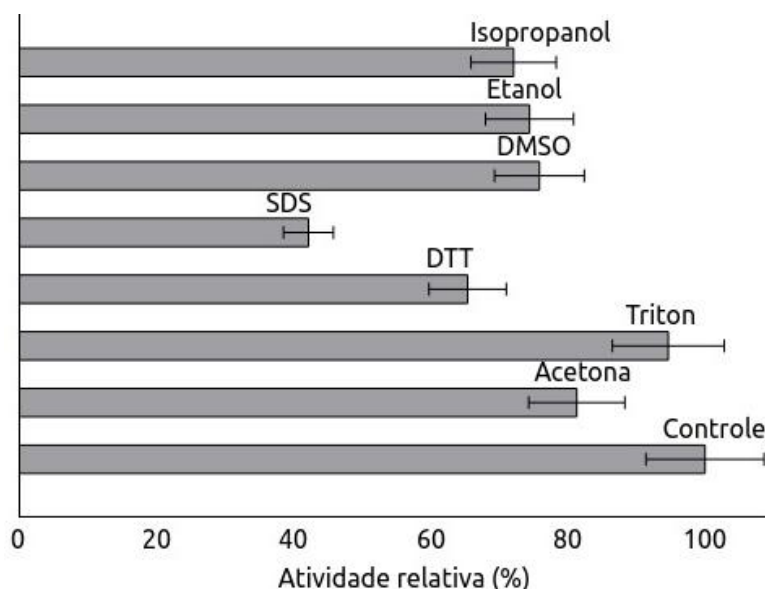
Dentre os compostos analisados na menor concentração (Figura 38), a maioria, com exceção do DTT, induziu a inibição da atividade da enzima em diversos graus, destacando-se como esperado o composto SDS, sendo sua influência maior do que o composto Triton X-100. O SDS é um tensoativo aniônico que desnatura efetivamente proteínas devido à repulsão eletrostática da sua porção hidrofílica, sendo usado para eletroforese desnaturante (MANNS, 2011; OTZEN et al., 2022). Já o Triton não é iônico e inclusive é usado para extração de enzimas, assim como para remoção do SDS após eletroforeses, para fazer zimogramas (ROSLI et al., 2009).

Figura 41 - Efeito de diversas substâncias químicas (concentração final de 10 mmol L⁻¹) sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*



Fonte: Autoria Própria

Figura 42 - Efeito de diversas substâncias químicas (concentração final de 50 mmol L⁻¹) sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*.



Fonte: Autoria Própria

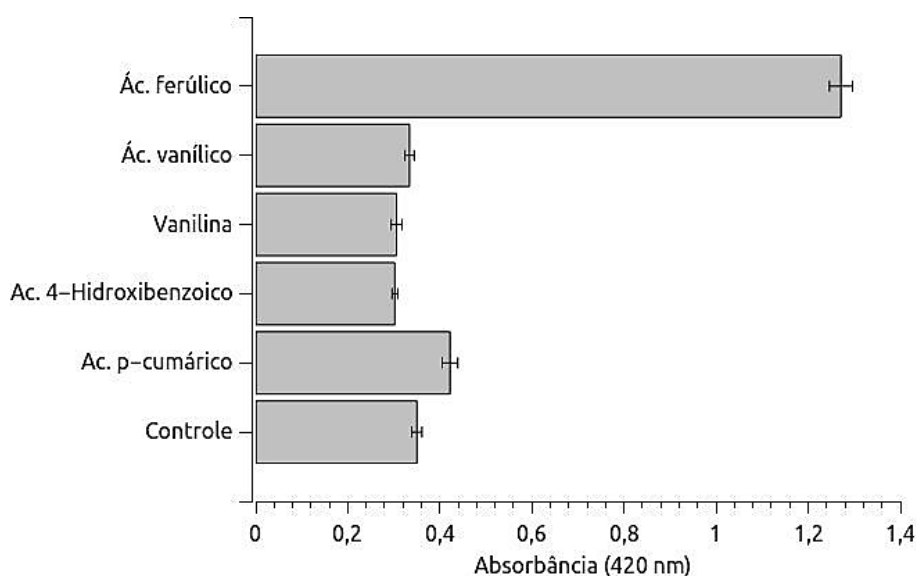
Ao testar o efeito das mesmas substâncias, porém em maior concentração, (50 mmol L⁻¹), foi observado (Figura 42) uma alteração no comportamento de alguns compostos. Para o etanol, houve uma leve diminuição na atividade, enquanto o composto DTT apresentou maior grau de inibição apontando para a provável existência de ligações dissulfeto na estrutura da enzima. A α -L-Arafase não foi afetada de modo significativo quando submetidas aos compostos DMSO, Triton e acetona quando comparadas nas duas concentrações. Diferente de Alias et al., (2011) que ao adicionar o reagente químico Triton X-100 estimulou fortemente a atividade em cerca de 1,50 vezes (49,58%). Já LU et al., (2025b) encontrou uma α -L-Arafase fúngica que exibiu considerável tolerância ao metanol, Triton X 100 e glicerol, enquanto mostrou maior sensibilidade ao β -mercaptoetanol, EDTA e SDS. Assim como Si et al., (2023) cujos compostos conseguiram manter a atividade da α -L-Arafase de *Trametes hirsuta*, enquanto 5% de SDS e acetona a 10% inativaram completamente a enzima.

Os resultados demonstram que a enzima manteve a atividade relativa acima de 60% quando submetidas a maiores concentrações (50 mmol L⁻¹), sendo assim a α -L-Arafase de *P. sanguineus* pode tolerar certos compostos, mesmo estes apresentando maiores concentrações.

5.4.7 Efeito de fenólicos na atividade

Foi testado o efeito de compostos fenólicos sobre a atividade da enzima (Figura 43), pois pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica destinados à desconstrução da lignina, em especial, podem liberar essas moléculas, frequentemente inibitórias sobre diversas enzimas (AMO et al., 2019).

Figura 43 - Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*, concentração final de 10 mmol L⁻¹



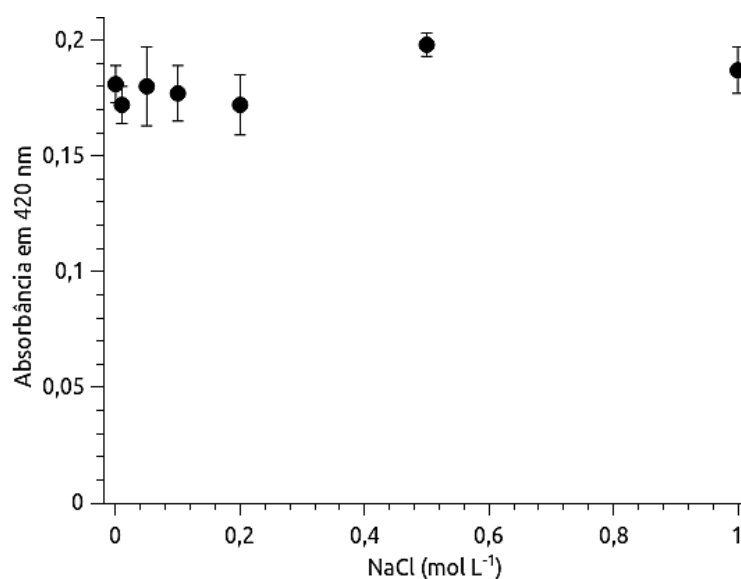
Fonte: Autoria Própria

Na concentração testada não foi observado efeitos inibitórios; na verdade, dois fenólicos, o ácido p-cumárico e especialmente o ác. ferúlico, aumentaram a atividade, o que merece atenção. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al., (2022) ao analisar uma α -L-Arafase GH 62, assim como pesquisas anteriores deste grupo de pesquisa apontaram efeitos semelhantes do ácido ferúlico, embora em menor grau, sobre uma xilanase recombinante de *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4 expressa em *K. phaffi* (ZANONI et al., 2021). Tais resultados podem estar possivelmente relacionados a uma ligação éster com hemiceluloses de arabinoxilanas, pois alguns grupos laterais com grupos carboxílicos, como o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, estabelecem tal ligação (GRAÇA et al., 2017). O ácido ferúlico ainda pode formar dímeros de ésteres de hidroxicinamatos, ou oligômeros de maior complexidade, reforçando a ligação cruzada dentro da fração de carboidrato da parede celular.

5.4.8 Efeito da concentração de NaCl na atividade

Foram determinados o efeito de NaCl em diferentes concentrações, até o limite de 1 mol L^{-1} , pois nas cromatografias de exclusão molecular e de troca iônica é usada uma concentração de NaCl. O experimento permitiu constatar que o aumento da concentração de NaCl não afetou a atividade da α -L-Arafase até o limite testado (Figura 44). Castillo e Demoulin, (1997) analisaram o efeito do NaCl em diferentes concentrações em *P. sanguineus* e constataram uma diminuição no seu crescimento em função da salinidade. Os resultados também se assemelham a Martins et al., (2022) que obteve ativação da enzima purificada a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo esta retida a concentrações maiores de 1 mol L^{-1} .

Figura 44 - Efeito da concentração de NaCl sobre a atividade da α -L-Arafase de *P. sanguineus*



Fonte: Autoria Própria

5.4.9 Cinética enzimática

Experimentos de cinética enzimática (Figura 45) conduzidos com a enzima no pH e temperatura ótimos permitiram calcular a V_{max} e K_M usando como substrato o pNPAf. Os valores estimados usando a equação clássica de Michaelis-Menten (curva vermelha do gráfico) foram de:

$$V_{max} = 0,41 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1}$$

$$K_M = 2,05 \pm 0,41 \text{ mmol L}^{-1}$$

$$\text{Chi}^2 = 0,001412$$

$$R^2 = 0,995864$$

Analisando o primeiro ajuste ficou evidente que os resultados não foram bem representados no ajuste à equação de Michaelis-Menten, e sugerem uma curva sigmoideal, com comportamento cooperativo positivo ($h > 1$). Quando aplicamos um segundo ajuste, desta vez usando a equação de Hill ($V_{\max} \times [S]^h / (K_m^h + [S]^h)$) (Marangoni, 2003), baseada na equação anterior, obtivemos um melhor ajuste, evidente na curva azul, tendo obtido os seguintes valores, incluindo o da cooperatividade 'h':

$$V_{\max} = 0,33 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1}$$

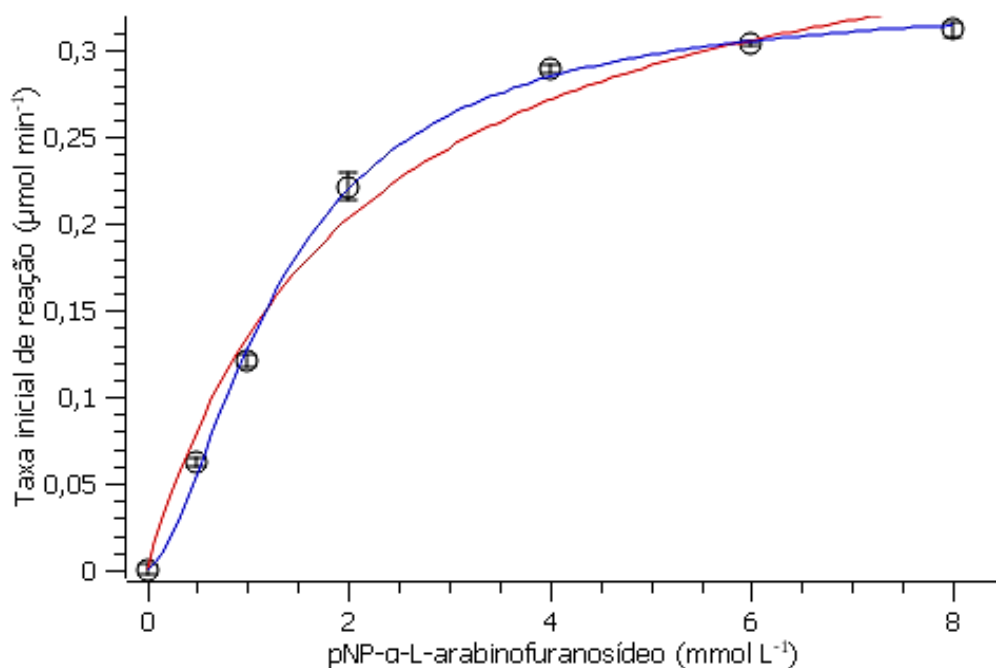
$$K_M = 1,32 \pm 0,06 \text{ mmol L}^{-1}$$

$$h = 1,65 \pm 0,11$$

$$\text{Chi}^2 = 0,000124$$

$$R^2 = 0,999635$$

Figura 45 - Gráfico de Michaelis-Menten da α -L-Arafase de *P. sanguineus*. 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.)



Fonte: Autoria Própria

Uma análise comparativa com a literatura de trabalhos que usaram o mesmo substrato, aponta que a enzima α -Ara1 parcialmente purificada de *Chrysosporthe cubensis* apresentou V_{max} igual a $1,56 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e um valor de K_{Mapp} de $3,34 \text{ mmol/L}$ para o mesmo substrato pNP- α -L-arabinofuranosídeo (DE ALBUQUERQUE et al., 2024).

Por outro lado, a enzima de *Aureobasidium pullulans* apresentou um valor de K_M para o mesmo substrato de $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e um V_{max} de $34,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (DE WET et al., 2008), e os parâmetros cinéticos K_M ($2,5 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$), V_{max} ($157,8 \pm 7,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) e k_{cat} ($210 \pm 10,3 \text{ s}^{-1}$) foram determinados para a Abf4980 de *Bispora* sp. MEY-1 em relação ao substrato pNPaf (LIU et al., 2024).

A enzima designada Xyaf313, de *Chaetomium globosum*, exibe um K_M de $5,65 \text{ mmol L}^{-1}$, um V_{max} de $486,47 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e um k_{cat} de $64,53 \text{ s}^{-1}$. (LU et al., 2025a).

Os parâmetros cinéticos das enzimas purificadas em relação ao p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo apresentaram valores de K_M e k_{cat} das enzimas AFQ1 e AFS1 de *Penicillium chrysogenum* foram determinados como sendo $0,86$ e $1,32 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (SAKAMOTO; KAWASAKI, 2003).

Na comparação, analisando o K_M , apenas a enzima AFQ1 do último trabalho citado apresentou valor menor, sendo o da outra enzima exatamente igual, o que coloca o parâmetro estimado da α -L-Arafase de *P. sanguineus* como tendo um valor interessante se analisarmos como indicador de maior afinidade pelo substrato. Não comparamos o valor da V_{max} por ela ser dependente da concentração da enzima: $V_{max} = k_{cat} * [E_T]$, onde $[E_T]$ é a concentração de enzima, porém na maioria dos trabalhos a expressão é feita por mg de proteína, o que inclui contaminantes. O grau de purificação varia significativamente entre eles.

Obviamente, temos a limitação, nesta avaliação, de que os testes foram feitos com substrato sintético, e não com os naturais, mas a maioria absoluta das fontes na literatura utilizam a mesma abordagem.

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, Yunying *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.