



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISE BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE UMA
ENDOXILANASE RECOMBINANTE DE *Humicola
grisea* var. *thermoidea* EM COMPLEXO COM ÁCIDO
FERÚLICO**

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia Maria de Freitas

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabrícia Paula de Faria

Brasília,

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE UMA
ENDOXILANASE RECOMBINANTE DE *Humicola
grisea* var. *thermoidea* EM COMPLEXO COM ÁCIDO
FERÚLICO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília,
2023

Dedico esta tese a minha minha mãe Rosângela, que é tudo pra mim, meu amado irmão, Edmilson Júnior (Você é o cara!!), e em especial aos meus avós, Geraldo e Marlene, que não estão mais entre nós. Sei que estão orgulhosos, e sei também que estão comigo, a todo instante, de todas as formas possíveis, cuidando de mim e dos meus caminhos.

*“A estrada da vida pode ser longa e áspera. Faça-a mais longa e suave.
Caminhando e cantando com as mãos cheias de sementes. ”*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Começar a escrever em uma página em branco é considerado um ato difícil, e quando essa escrita se refere a sentimentos, putz, a dificuldade aumenta. Quando se sente intensamente, é difícil traduzir em palavras, e como boa pisciana, a intensidade aqui vai ao infinito e além!!! Mas vamos lá...

Essa história começa com minha ida a Brasília com a prof Fabrícia para oficializar o processo da seleção do doutorado, após algumas trocas de email. Neste dia, conheci minha futura orientadora, prof Sonia Freitas e a proposta de me ensinar Biofísica Molecular de Proteínas foi firmada. Pois bem, mal sabia eu que não seria “apenas” isso, e chego ao fim deste ciclo com a bagagem lotada de conhecimento sobre esse mundo fantástico da biologia estrutural que eu não imaginava que conseguiria aprender, graças a você, prof Sonia. Agradeço profundamente por ter aceito essa missão de ensinar uma goiana que nunca tinha saído da sua zona de conforto, mas que estava disposta a encarar esse desafio, por amor ao conhecimento e ao que ele é capaz de proporcionar na vida das pessoas. Apesar da fama de brava “lá pras banda do Goiás”, eu sabia que essa palavra representava competência, coragem, disciplina, profissionalismo, dedicação e muito amor pelo que faz. Lembro perfeitamente do dia que a senhora desenhou uma densidade eletrônica no papel com uma molécula “dentro” e me explicava, na mesa da sua sala, como era obtido e o que representava, antes de ingressar no doutorado. Quando aprendi de fato o que era aquilo na disciplina com o prof João, ficava pensando: Como ela fez aquilo???? Hoje parece fácil explicar, mas nunca me esquecerei desse dia, e isso representa muito. Muito obrigada é pouquíssimo para agradecer o que representa a sua orientação na minha vida acadêmica/profissional, e saiba que para mim foi uma honra ter sido orientada pela prof Sonia Maria de Freitas (aquela que todos do corredor conhecem o som dos seus passos, kkk), respeitada por seu profissionalismo e por sua trajetória impecável como pesquisadora. A senhora é um exemplo para mim.

A você, prof Fabrícia, agradeço por esse dia tão importante, que foi o começo de tudo. Por ter me levado até o Laboratório de Biofísica Molecular coordenado pela prof Sonia, por ter confiado a mim a HXYN2, fruto do seu doutorado, e que foi o meu amuleto para que eu pudesse aprender TUDO o que está descrito nesta tese. Poderia ter sido outra proteína? Poderia. Seria mais difícil? Com certeza. Mas não seria tão lindo

como foi trabalhar com a HXYN2. Obrigada por esta oportunidade, e por ter viabilizado, juntamente com a prof Sonia, este período de aprendizagem e desenvolvimento profissional e pessoal tão intenso.

Durante esses anos, outros professores colaboraram muito na minha formação. Um deles foi o prof João Alexandre. Desde o início, disposto a me ajudar na dura missão da cristalização, e parei por aqui porque a Cristalografia era uma realidade muuuuito distante, que poderia não ser alcançada, mas precisava ser iniciada, pelo menos. Sempre muito tranquilo, fala serena, dono de looongos papos que faziam perder o experimento, porque eram difíceis de interceptar devido toda construção de um raciocínio sobre o assunto. Eram longos, mas eram bons de ouvir. O professor de Cristalografia que prendia minha atenção ao explicar cálculos matemáticos e me fazia ver algum sentido naquele mundo de expressões, enquanto o restante da turma estava rezando para a aula acabar. Cuidadoso, e com seu jeito de pai querendo arrancar informação do filho, foi destravando minha timidez aos poucos, sempre que perguntava pela minha família. Em um momento tumultuado nessa reta final, assim como um pai, pontuou o que estava certo e errado, e me ensinou lições valiosas que vou levar para toda vida. Prof João, como já te disse recentemente, admiro muito o senhor e o respeito profundamente. Sou muito feliz por tê-lo no meu processo de amadurecimento profissional e pessoal. No fim, conseguimos difratar o cristal da proteína HXYN2. Obrigada por não ter desistido dessa missão. Obrigada pela parceria e companheirismo.

Prof Aisel. O desafio já começou aí, ao ter que aprender noções básicas de Fluorescência, Dicroísmo circular e DLS com aquele portunhol rápido que eu nunca tinha ouvido. Mas como um excelente professor e pesquisador, me ensinou na prática o que se entende por “rigor do método científico”. E eu tenho muito orgulho disso. A fala que me dava arrepios era: *saca la cuenta*, mas por trás disso eu sabia que o que vinha pela frente não teria erro. O meu prazer ao fazer os experimentos chegava ao topo quando sentava para discutir os resultados com você e a prof Sonia. Nível máximo de conhecimento científico sendo transmitido a mim, com muita generosidade e respeito, sempre acessível a qualquer momento. Por segundos eu pensava: que privilégio minha filha!!! Faça por merecer!! Feliz será àquela instituição que terá você como professor. Quando isso acontecer e depois de algum tempo eu ver a notícia no jornal de alguma invenção sua ou de algum método criado que facilitará a vida das pessoas, eu vou dizer com orgulho: Ele foi meu professor!! Obrigada por tudo prof Aisel, desde os ensinamentos e discussões científicas aos perrengues pegando ônibus na saída da UnB,

kkk.

E para encerrar o quarteto de professores do laboratório mais lindo do IB, ninguém menos que prof Napoleão. Figuraça, sakou. O cara que trabalha na madrugada. O prof que é amigo da galera, que ta nos rolês, que compartilha experiências, que viaja junto nas discussões mais “nada haver” do café da tarde, kkk, no entanto, um cara inteligentíssimo, que contribui muito no meu aprendizado sobre resolução de estrutura, e que eu tenho um prazer enorme de receber a colaboração nos trabalhos que estão por vir. Valeu pela paciência, atenção e disposição de sempre. Parafraçando o próprio, “Fica pela sombra!!!”

A minha mãe, Rosângela, e meu irmão, Júnior, eu nem tenho como agradecer. Vocês SEMPRE me apoiaram a fazer o que eu amo. Vir pra Brasília e deixar vocês em Goiás foi muito difícil. E quando eu estava me acostumando, veio a pandemia e me vi em um dos momentos mais difíceis da minha vida: escolher entre ficar e continuar o doutorado, ou voltar e ficar com vocês em casa. Foi MUUUUITO difícil! Afinal, do que adiantaria todo esforço para terminar o doutorado, sendo que corria o risco de perder vocês, naquele momento que tudo era desconhecido sobre a doença e o pânico era geral. Ainda me pego pensando sobre isso. A escolha de ficar e continuar o doutorado foi também por vocês. Sei que ficam felizes vendo fazer o que amo, e o que esse doutorado representa na minha vida profissional vai favorecer nós três. Me perdoem se foi sofrido para vocês, saibam que também foi para mim. EU OS AMO MUITO!!

Agradeço imensamente a minha família, meus avós, tios e tias, primos, que mesmo sem entender o que eu faço na faculdade, mesmo sem saber para que eu estudo tanto, torcem muito por mim, pelo meu sucesso e minha felicidade. Ser a primeira da família a ter um curso superior e pós-graduação, é sinal que a minha família trabalhadora venceu, e que a Educação transforma vidas.

Amanda, minha eterna gratidão a você. Como boa goiana desbravadora de mundos, me recebeu de forma muito acolhedora e generosa. E olha que nem nos conhecíamos. Apenas por meio de falas de outras pessoas. Desde o início me ensinou tudo o que sabia sobre Fluorescência e Dicroísmo circular, sobre como sobreviver nessa terra. Como foi importante para mim começar ao seu lado!! Você era a minha referência em terras candangas e assim ficava mais tranquila, segura. Até que chegou o dia de você ir pra Campinas e eu fiquei sem chão. Deu ruim!! Depois do desespero, consegui me equilibrar nas próprias pernas e seguir, sabendo que mesmo longe você estaria disponível para o que eu precisasse. Eu não sei que nome dar para isso Mandinha. Uma

relação tão forte, instantânea, de muito respeito, companheirismo, amizade, carinho. Eu sei que minhas conquistas alegram você, e te agradeço muito por tudo que fez e faz por mim até hoje. Olhar para você e ver sua trajetória é inspirador!!

A Amanda era a única pessoa que eu “conhecia” no laboratório, e aquele medo bobo de não conseguir me enturmar com a galera era muito grande. Bicho do mato, quase uma Juma, kkk. Mas o pessoal da Biofísica (sim, era muita gente quando cheguei) mudou meu pensamento muito rápido. Fazer café para nossa querida Azadeh foi a prova de admissão. Paulo, Gustavo, Wallace, Gideane, Johnatas, Patrícia, Azadeh, Marisol, Júlia, Diego, João Paulo, Amanda, Diogo, Alzira: obrigada pela acolhida. Renata (que está fora do país) compartilhou os dias de pandemia trabalhando no laboratório, outra conterrânea goiana, ajudou a tornar mais leves aqueles dias pesados. Hoje, Júlia, Matheus, Daniel, Luana, Tales, Liem, Isabela, Lavínia, dividem os dias comigo no laboratório que virou minha casa. Obrigada pelas trocas de conhecimento, risadas e pela companhia.

Como em todo lugar, nós nunca trabalhamos sozinhos. A estrutura do nosso laboratório é fantástica, mas vez ou outra precisamos do apoio de outros laboratórios, que sempre estavam de portas abertas para ajudar no que fosse preciso. A começar pelo Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, do prof Fernando Araripe, prof Lídia Pepe e prof Janice. O laboratório da prof Nádia Skorupa, o LIA (que divide uma parte do laboratório com a gente), o Laboratório de Enzimologia, da prof Eliane Noronha, o laboratório do prof Bergmann. Eu me sinto muito privilegiada em ter professores tão competentes, reconhecidos em suas áreas, construindo junto comigo este trabalho. Não posso esquecer dos meus colegas que pertenciam a estes laboratórios. É muita gente, não vou citar nomes pois com certeza vou esquecer alguém. Todos muito solícitos e excelentes companhias. Uma verdadeira rede de colaborações, onde a coletividade sempre esteve presente em prol do melhor para todo mundo, e consequentemente para Ciência. Muito obrigada!

Vocês não têm um Morgan Freeman como amigo!!! Chiquinhooo, muito obrigada por tudo. Sempre disponível para o que der e vier. Atento a tudo que acontece no corredor, vigiando e cuidando de tudo. Obrigada por emprestar o micro-ondas no horário mais concorrido da copa. Dessa vez vou te perdoar pelos inúmeros sustos que me deu, kkkk.. Tamo junto meu amigo! Dona Elô, a tia da limpeza, minha companheira de papos antes do pessoal chegar para trabalhar. Maluquinha, mas um amor de pessoa. Podia me ver de longe que largava o rodo e o balde e vinha me abraçar com um sorriso

no rosto. Obrigada pelo carinho dona Elô. E termino o trio parada dura com a dona Juranir. A guardinha que descobrimos ser um anjo, cuidando do IB de uma forma muito especial. É daquelas pessoas que compartilham do mesmo pensamento, e mesmo com pouco e limitações, sempre ajuda como pode. É daquelas almas boas que estão por aí. Obrigada por tudo Dona Juranir. Conte comigo sempre!! Na pessoa desses três, agradeço imensamente todos os trabalhadores do IB, que cuidam tão bem desse lugar que é a minha casa.

Agradeço a Rosália, meu anjo, por sempre estar comigo, mesmo longe. Como foi estranho escrever meu primeiro resumo do simpósio sem o seu nome. Parecia que eu estava te esquecendo... Só que não né, kkk. Nesse dia caiu a ficha de que isso nunca vai acontecer, porque o que nos une vai muuuuito além disso. Você e Lorena foram as primeiras pessoas que receberam o link do artigo, assim que foi publicado. O sentimento era: olha onde aquela menina que entrava muda e saía calada da sala de aula conseguiu chegar, graças ao seu olhar! Obrigada por tanto. Quanto a você, Lorena, podemos ficar muito tempo sem nos falar, mas pode ter certeza que eu sempre estarei pensando em você e na sua família, porque eu quero ser igual a você, quando eu crescer. Amo essas peças raras da minha vida!!

Não posso deixar de agradecer a família que a vida me deu, que nós lá de casa ganhamos em um momento muito difícil de nossas vidas. Rosemir, Natal, Helena, Jorge, Gabriela, Leandro, Roseli, Rosimeire. Vir pra Brasília nos distanciou um pouco, não nos encontramos com tanta frequência como era, mas não diminuiu o amor e a consideração que sinto por vocês. Sei que torcem e ficam felizes com minhas conquistas. Obrigada pelo apoio, torcida e amizade de sempre. E já convoco os jogadores de canastra para montar a mesa, to chegando...

Quando se trata de família de vida, eu me sinto uma pessoa muito privilegiada. Mas muito mesmo!! Sempre encontro pessoas muito especiais no meu caminho. Desta vez foi um pouco difícil de acreditar, e só aos poucos fui entendendo. A acolhida se deu no momento mais difícil do doutorado, que já relatei aqui. O período da quarentena da pandemia da Covid-19, que se iniciou no dia do meu aniversário, e eu estava aqui em Bsb. Uma Grande Família. Não queriam saber meu caráter, só queriam saber se eu estava me sentindo bem e se minha família estava bem. Me vi mergulhada em um turbilhão de pensamentos, questionamentos e sentimentos, por um bom tempo. E eis que veio a calmaria. Os laços dos sentimentos mais puros e sinceros estavam estabelecidos. Vivemos momentos que eu nunca vou me esquecer! Celebramos a vida,

enquanto muitos choravam a ausência dela. Vivemos plenamente cada dia, de uma maneira muito peculiar. Vivemos a antítese em meio a tristeza e incertezas daquele período que vai ficar marcado. De forma que tudo que eu disser na tentativa de agradecer por tudo que essa família me fez e faz, será falho e em vão, pois não existem palavras que expressem e representam a gratidão e o amor que sinto por eles.

Ganhei uma mãe: Coração! Eu precisava te encontrar nessa vida. E foi O encontro! Uma pisciana e uma sagitariana. Com seu jeito único, me trouxe para debaixo de suas asas e me mostrou a vida de uma forma que eu ainda não conhecia. Viva o agora, e seja grato por tudo que se tem!! Observe e sinta tudo ao seu redor!! Era quase um: Acorda menina!!! Criamos uma relação muito forte de confiança, respeito, amizade, cumplicidade. A conexão da comunicação pelo olhar, de saber o pensamento antes da fala, de saber que algo de errado não está certo pela expressão facial e pelo tom de voz. Uma relação de amor pouquíssimas vezes declarada, mas sempre demonstrada, de várias formas, principalmente nos pequenos detalhes. A senhora transformou a minha vida! A senhora me transformou! Se hoje uso o meu cabelo natural, arrisco um batom e uso um vestido, é por sua causa, e sabemos que vai muuuito além de simplesmente assumir os cachos. Enfim, ficaria dias aqui falando das nossas aventuras, para não dizer ciladas, kk, das nossas expedições (a música Refazenda, de Gilberto Gil, nunca fez tanto sentido nos nossos dias, kk), da nossa parceria, do quanto a senhora é importante para mim, embora ninguém consiga dimensionar isso. Obrigada por tanta generosidade, por tanta humanidade. Obrigada por caminhar comigo nessa vida. Eu te amo muito!! Muito obrigada por simplesmente tudo!!

Ganhei um pai: Wolnin! Pisciano como eu. Cuidadoso, amigo, sábio, gentil, a pessoa mais inteligente que já conheci na vida. Um baú de histórias e conhecimento, dono dos papos mais aleatórios e ao mesmo tempo sérios e importantes de se discutir em algum momento da vida, das curiosidades mais curiosas, sempre me pegava nas piadinhas pois já começava a contar com cara séria e voz firme. Como não acreditar no Wolnin?? Impossível. Contador de histórias mais sem pé nem cabeça. Sem pé mesmo né Wolnin, kkkkk, como a estória da galinha que siscava com uma perna só. Nem queiram saber o fim da galinha, kkkkkk. Já viram que é riso certo estar ao lado dele. Wolney, eu te admiro tanto!! Você é um exemplo de homem, de marido, de pai, de amigo, de profissional. Você é daquelas relíquias valiosas que eu quero sempre ter por perto. Obrigada por todo cuidado que tem comigo desde sempre. Você também é uma referência para mim.

Mermã Elisa!!! Minha irmã mesmo. Ela cuida de mim, se preocupa, da bronca com seu jeitinho, me aconselha e ainda me ensina a mimar gatos como ninguém. Um exemplo de mulher forte e determinada. Gosto tanto de você Elisa, e gosto tanto dessa relação que construímos. É tão valiosa para mim. Obrigada por tanto, e por tudo!! Junto com você o cunhado mais especial que alguém poderia ter: Pedro Poney!!! Pedro, você é uma figura, mas uma figura de respeito. O que eu mais admiro é o pai que você é. Isso já diz tudo sobre você. Obrigada pela companhia e pelo entusiasmo de sempre. E obrigada pela princesa que você nos deu de presente. Stellinha!! A doçura em pessoa. Stella, obrigada pelas melhores festas de aniversário que já tive na vida!!! O quadro que você desenhou a nossa família inteira irá me acompanhar por toda a vida, e eu sempre me lembrarei do dia que você me deu. Sempre estarei te aplaudindo, em todas as suas conquistas.

Maurim e Ana Luisa. Quando cheguei na casa, morria de vergonha do Maurim. Mas depois conheci a pessoa doce e adorável que ele é. Você é um profissional admirável Mauro. Desenrola e faz o desenho da minha tatuagem, kkk.. Ana, gente como a gente, um amor de pessoa, muito determinada nos seus objetivos. Obrigada pela convivência, companhia agradável e incentivo de sempre.

Para completar a família, vó Mira, a plenitude em meio ao caos, kk, um exemplo para mim em várias circunstâncias. Sorriso no rosto e batom sempre!! Obrigada pelo carinho Mira. A dupla de “tios”, Aisel e Liem, obrigada pela convivência respeitosa prazerosa. Eu não sei o que seria do meu cabelo sem a Liem para ajudar a cuidar. Sempre demonstrando muito cuidado e carinho comigo. Obrigada por tudo Liem!! Principalmente pela Ana Fernanda. Essa criaturinha inteligente que eu aprendo tanto e que eu tenho um prazer enorme em ver crescendo, de acompanhar cada aprendizado, de poder fazer parte da vida dela. A tia ama muito!! Tetê e Marcinho, pessoas tão únicas e especiais que também fazem parte dessa linda família e que agradeço muito pela companhia e pelas boas risadas que damos quando nos reunimos.

E claro, as gatas mais lindas desse planeta. Roxá, porque não ousou escrever esse nome corretamente, kkk, com muita delicadeza, não demorou a pular no meu colo. Logo eu que nunca convivi com gato. Me disseram que era bom sinal. A gata maaaaais linda da casa!!! Apesar das nossas discussões e de você pregar no chão igual panqueca quando vou te colocar pra dentro de casa, eu amo muito você e sei que sabe disso. Fuli foi o presente mais lindo, mesmo muito assustada e arisca, consegui conquistar você. Tininha, a rueira que só vem em casa pra comer e dormir, sabe derreter meu coração

dando aquela cabeçada singela na mão quando vou te dar comida. Amo vocês!!

Aproveitando esse momento pet, eu não posso esquecer de agradecer a Tequila, minha labradora linda. Ela foi o motivo de muito choro meu, principalmente na pandemia, quando eu pensava que ela ia me esquecer por eu não estar indo em casa. Ou então que eu tinha enganado ela pq disse que ia voltar, e ainda não tinha voltado. Ela nunca me esqueceu, e sempre fez a maior festa, chegando a sorrir (sim, ela sorri), quando eu estava lá com ela. Eu sei que você vai sempre me esperar, e eu nunca vou te abandonar!!

Fabianaaa, mulé cearense, que mora no Goiás e que vem todo dia fazer a gente dar boas risadas com as histórias dos ônibus. Obrigada por tudo mulé!!

Agradeço as irmãs da Casa Menino Deus, que me acolheram e me hospedaram no começo do doutorado, assim que cheguei em Brasília. Irmã Dita, irmã Faustina, irmã Adélia, e tantas outras que sempre me recebiam com um olhar acolhedor após um longo dia de trabalho. Obrigada pelo carinho!!

Agradeço a Capes, pela bolsa concedida. Vivemos momentos terríveis nos últimos 4 anos, em que o meu maior medo era perder a minha bolsa. Estudante de outro estado, morando em Bsb, ajudando a família. Só nós sabemos o que foi esse período. Mas ele passou, e hoje lutamos pelo reajuste que não acontece a anos, e principalmente pelo reconhecimento da classe que produz conhecimento no Brasil, e que, portanto, pode levar esse país ao mais alto patamar de desenvolvimento tecnológico e científico. Seguimos na luta!!

Agradeço a Universidade de Brasília. Um lugar icônico. Que sofreu ataques violentos da ditadura, e que teve que se reerguer para manter o sonho de Darcy Ribeiro e Anísio Teixeira vivo. Eu nunca imaginei que um dia pisaria nesse lugar. E que honra tenho de viver nele. Um lugar lindo, mágico, transformador de vidas, que é acessível a todos, ou seja, todo brasileiro tem direito de estar um dia. Que continuou sofrendo golpes duríssimos recentemente, e continua resistindo. Como? Produzindo conhecimento de altíssimo nível, o qual eu tenho orgulho de fazer parte. Obrigada por toda estrutura, pelos excelentes e renomados professores, pelo conhecimento, pelos jardins floridos, pelas corujas buaqueiras, pela diversidade de pensamento, pelos gatos do minhocão, pelo fervilhar da juventude que circula em seus pavilhões, pelo sopro de vida e de luta que sai de suas paredes. UnB, te levarei comigo para onde eu for, e te defenderei com sangue nos olhos, onde quer que eu esteja. Porque a UNIVERSIDADE PÚBLICA é de TODOS e para TODOS!!!

Agradeço a Deus, por tudo que Ele sempre faz na minha vida. As vezes fico com medo e preocupada. Mas sempre confio e entrego a minha vida e o meu caminho em suas mãos. Obrigada por todas as oportunidades e pelos presentes maravilhosos, que são os anjos em forma de pessoas, que eu encontro pelo caminho.

Muitas pessoas, direta ou indiretamente, foram afetadas pela pandemia da Covid-19. Boa parte das consequências da pandemia poderiam ter sido amenizadas com adoção de medidas conhecidas e praticadas há anos, como a efetiva coordenação governamental das ações, as práticas comportamentais e sanitárias, o desencorajamento do uso de “soluções” falsas e ilusórias, dentre outras. A Ciência agiu de forma eficaz e eficiente – mesmo que, muitas vezes, amparada em expectativas de remuneração e lucros. As vacinas contra a Covid-19 foram desenvolvidas em prazos inimaginavelmente curtos. Felizmente a Ciência e o bom-senso venceram! Lamentavelmente, contudo, apenas depois da perda de vidas que ainda poderiam estar ativas e colaborando com todos nós. Esta tese foi desenvolvida ao mesmo tempo em que convivemos com a pandemia e seus danos. Mesmo que este trabalho não tenha relação direta com a resposta científica contra a pandemia, reconheço que parte da minha motivação e ânimo para enfrentar os desafios decorreu das reflexões sobre todas as dificuldades que, então, eram vivenciadas. Dessa forma, cabe-me solidarizar com as vítimas que foram alcançadas pelos danos da pandemia, agravados, no caso brasileiro à época, pelo desgoverno e desprezo da Ciência.

*“Mas renova-se a esperança
Nova aurora a cada dia
E há que se cuidar do broto
Pra que a vida nos dê flor
Flor e fruto*

*Coração de estudante
Há que se cuidar da vida
Há que se cuidar do mundo
Tomar conta da amizade*

*Alegria e muito sonho
Espalhados no caminho
Verdes, planta e sentimento
Folhas, coração, juventude e fé”*

Coração de Estudante - Milton Nascimento

RESUMO

Uma endo-1,4-beta-xilanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* pertencente à família GH11 foi obtida por expressão em *Pichia pastoris* e denominada HXYN2. As endoxilanases são as principais hemicelulases comercializadas por serem aplicadas em vários setores industriais. Estudos que buscam compreender a relação estrutura e função destas enzimas são fundamentais para o aumento da eficiência catalítica em diferentes condições visando aplicação biotecnológica racional. A HXYN2 apresenta 227 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 23 kDa e é termicamente estável, com maior atividade na faixa de 40-50 °C e pH 5,0-9,0, e temperatura e pH ótimos de 50 °C e 6,0, respectivamente. Nesta faixa de pH a HXYN2 apresenta estrutura estável com discretas mudanças conformacionais, indicadas pelos espectros de emissão de fluorescência com leve deslocamento das bandas de emissão, consistentes alterações nas cadeias laterais dos resíduos de triptofano e/ou de resíduos de aminoácidos que estão no microambiente do triptofano. Os espectros de dicroísmo circular (DC) da enzima em pH 4,0, 6,0, 7,0 e 9,0 apresentaram bandas típicas em comprimentos de onda que correspondem a proteínas com estruturas do tipo folhas beta. As curvas de desnaturação térmica obtidas em pH 6,0, 7,0 e 9,0 mostraram dois estados da proteína, nativa e desdobrada, com temperatura de transição (do inglês *melting temperature* - *T_m*) entre 50 e 60 °C. Em pH 4,0, esse ponto foi identificado entre 65 e 70 °C, o que sugere que HXYN2 é mais estável estruturalmente em pH ácido. O efeito de oito compostos fenólicos na atividade da HXYN2 foi avaliado e, dentre estes, o ácido ferúlico (AF) aumentou a atividade enzimática em 75%. Os parâmetros cinéticos indicaram que o AF não alterou a afinidade da enzima pelo substrato de xilana *beechwood*, mas aumentou a *V_{max}* da reação, a eficiência catalítica e o número de *turnover* da enzima. Dados de calorimetria de titulação isotérmica (CTI), atenuação de fluorescência e *docking* molecular mostraram que o AF forma um complexo com a HXYN2 na região aglicona, interagindo com resíduos de triptofano expostos ao solvente e outros resíduos nesta vizinhança, por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. Os valores das constantes de ligação para o complexo HXYN2:AF são dependentes do pH e indicaram afinidade de moderada (em pH 7,0 e 9,0) a forte (em pH 4,0). Na presença de AF, os espectros de fluorescência de HXYN2 mostraram mudanças na posição e intensidade das bandas de emissão dependentes do pH. A estrutura secundária de HXYN2 na presença de AF foi alterada com diminuição da α -hélice e aumento de β -*turn* e estruturas desordenadas. A curva de desnaturação térmica na presença do AF apresentou *T_m* de 54 °C, indicando menor estabilidade estrutural da HXYN2 na presença deste composto. Os cristais da HXYN2 foram obtidos em diferentes condições de cristalização na etapa de triagem. O refinamento destas condições resultou em cristais de diferentes formas e dimensões. Dois destes cristais foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Sirius para coleta de dados de difração de raios X. Os dados de difração foram processados, e os resultados indicaram o grupo espacial P2₁2₁2₁ (ortorrômbico), a presença de duas moléculas na unidade assimétrica e resolução de 1,6 Å. A estrutura cristalográfica da HXYN2 foi resolvida por substituição, utilizando como modelo as coordenadas atômicas da estrutura da endoxilanase de *Thermomyces lanuginosus* (PDB 1YNA), e o refinamento está em andamento.

Palavras chave: endoxilanase, ácido ferúlico, caracterização estrutural, enzimologia, estrutura de proteína, *docking* molecular

ABSTRACT

An endo-1,4-beta-xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* belonging to the GH11 family was obtained by expression in *Pichia pastoris* and named HXYN2. Endoxylanases are the main commercialized hemicellulases because they are applied in several industrial sectors. Studies that search to understand the relationship between structure and function of these enzymes are fundamental for increasing catalytic efficiency under different conditions, aiming at rational biotechnological application. HXYN2 has 227 amino acid residues, a molecular mass of 23 kDa and is thermally stable, with greater activity in the range of 40-50 °C and pH 5.0-9.0, and optimum temperature and pH of 50 °C and 6.0, respectively. In this pH range, HXYN2 presents a stable structure with discrete conformational changes, indicated by fluorescence emission spectra with slight displacement of emission bands, consistent with changes in the side chains of tryptophan residues and/or of amino acid residues that are in the tryptophan microenvironment. Circular dichroism (CD) spectra of the enzyme at pH 4.0, 6.0, 7.0 and 9.0 showed typical bands at wavelengths that correspond to proteins with β -sheet structures. The thermal denaturation curves obtained at pH 6.0, 7.0 and 9.0 showed two states of the protein, native and unfolded, with a melting temperature (T_m) between 50 and 60 °C. At pH 4.0, this point was identified between 65 and 70 °C, which suggests that HXYN2 is more structurally stable at acidic pH. The effect of eight phenolic compounds on HXYN2 activity was evaluated and, among these, ferulic acid (FA) increased enzymatic activity by 75%. Kinetic parameters indicated that FA did not alter the enzyme's affinity for the beechwood xylan substrate, but increased the V_{max} of the reaction, the catalytic efficiency and the enzyme turnover number. Data from isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence quenching and molecular docking showed that FA forms a complex with HXYN2 in the aglycone region, interacting with solvent-exposed tryptophan residues and other residues in this vicinity, through hydrogen bonds, hydrophobic and ionic interactions. Binding constant values for the HXYN2:FA complex are pH dependent and indicated moderate (at pH 7.0 and 9.0) to strong (at pH 4.0) affinity. In the presence of FA, the fluorescence spectra of HXYN2 showed pH-dependent changes in the position and intensity of the emission bands. The secondary structure of HXYN2 in the presence of FA was altered with a decrease in the α -helix and an increase in the β -turn and disordered structures. The thermal denaturation curve in the presence of AF showed a T_m of 54 °C, indicating lower structural stability of HXYN2 in the presence of this compound. HXYN2 crystals were obtained under different crystallization conditions in the screening step. The refinement of these conditions resulted in crystals of different shapes and sizes. Two of these crystals were taken to the National Laboratory of Synchrotron Light – Sirius for the collection of X-ray diffraction data. The diffraction data were processed, and the results indicated the space group $P2_12_12_1$ (orthorhombic), the presence of two molecules in the asymmetric unit and resolution of 1.6 Å. The crystallographic structure of HXYN2 was obtained by molecular replacement, using the atomic coordinates of the structure of endoxylanase from *Thermomyces lanuginosus* (PDB 1YNA) as a model, and refinement is in progress.

Keywords: endoxylanase, ferulic acid, structural characterization, enzymology, protein structure, molecular docking

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da lignocelulose de resíduos agroindustriais composta por celulose, hemicelulose e lignina.....	29
Figura 2. Modelo estrutural da 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana, tipicamente presente em gramíneas. Na cadeia central estão os resíduos de xilose em preto e as ramificações estão apresentadas em diferentes cores, onde em vermelho estão os radicais de arabinofuranose, em verde o ácido glucurônico e em azul o grupamento acetil.....	31
Figura 3. Estrutura química dos álcoois precursores da lignina.....	32
Figura 4. Esquema da composição da xilana e enzimas envolvidas na degradação da xilana.....	34
Figura 5. Estrutura da xilana e as enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação.....	35
Figura 6. Mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica com retenção anomérica. Em vermelho, Nuc representa o resíduo catalítico nucleofílico e em azul, A/B é o resíduo catalítico ácido/base.....	36
Figura 7. Representação da estrutura tridimensional das xilanases da família GH10 (PDB ID: 4XUY) destacando o do sítio catalítico. As estruturas em α -hélices estão destacadas em vermelho, as fitas- β em amarelo, as estruturas “turn” ou desordenadas em verde e os resíduos de aminoácidos aromáticos em azul.....	38
Figura 8. Representação da estrutura tridimensional das xilanases da família GH11 (PDB ID: 4HK9) destacando o sítio catalítico. Em vermelho está destacada uma estrutura α -hélice, em amarelo as fitas- β , em verde as estruturas “turn” ou desordenadas e em azul os resíduos de aminoácidos aromáticos que compõem parte do sítio catalítico.....	39
Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da endo-1,4- β -xilanase de <i>Bacillus subtilis ssp. subtilis</i> 168 (PDB ID: 1XXN).....	40
Figura 10. Representação do modelo da estrutura da HXYN2 de <i>Humicola grisea var. thermoidea</i> . A) Resíduos de ácido glutâmico (esferas azuis) E84 e E175 no sítio catalítico e B) Resíduos de aminoácidos aromáticos (rosa) que interagem com os resíduos de ácido glutâmico na fenda catalítica e que estão presentes na superfície.....	41
Figura 11. Modelo tridimensional de HXYN2 e os resíduos do sítio ativo. O modelo é formado por fitas β antiparalelas (amarelas) e uma α -hélice (vermelho). As cadeias laterais dos resíduos catalíticos e aromáticos são representadas e identificadas no sítio ativo.....	42
Figura 12. Interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico do modelo da endoxilanase HXYN2, obtido após sobreposição do sítio catalítico do modelo de 1YNA....	43
Figura 13. Distribuição de resíduos de aminoácidos carregados positivamente e negativamente (esferas azuis e vermelhas, respectivamente) na superfície da molécula de xilanases envolvidas na formação de pares iônicos. A) Xilanase de <i>T. lanuginosus</i> (PDB YNA) e B) Xilanase II de <i>T. reesei</i> (PDB XYN).....	44
Figura 14. Estrutura tridimensional do complexo substrato/sítio ativo da xilanase termofílica de <i>T. lanuginosus</i> e as interações dos resíduos de aminoácidos da fenda catalítica e os monômeros de xilose. Os três monômeros centrais do substrato xiloheptaose (subsítios +1, -1 e -2) são mostrados em amarelo. As interações dos resíduos catalíticos com o substrato são indicadas com pequenas esferas vermelhas.....	45
Figura 15. Modelo estrutural dos ácidos benzoico e ácido cinâmico e seus derivados.....	47
Figura 16. Construção do vetor de expressão pHIL-D2 contendo o gene da HXYN2. A) Plasmídeo pHIL-D2_HXYN2 e B) Cassete de expressão.....	55
Figura 17. Purificação e análise da pureza da HXYN2 recombinante. A) Perfil cromatográfico da proteína em coluna de exclusão molecular Superdex S-75. A eluição da	

HXYN2 ocorreu nas frações do pico V. B) Análise do perfil proteico e pureza da amostra em gel desnaturante (SDS-PAGE) do extrato bruto produzido pela levedura e concentrado (EB) e da amostra do pico V correspondente a HXYN2 purificada (P), na coloração por *comassie blue* e nitrato de prata.....

72

Figura 18. Determinação do coeficiente de extinção molar da HXYN2. A) Espectros de absorção da HXYN2 em diferentes concentrações. B) Correlação linear da concentração da proteína determinada pelo método de lowry e a respectiva absorbância a 280 nm.....

73

Figura 19. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da HXYN2 e demais xilanases. Os gaps foram identificados com traço. As estruturas secundárias são identificadas por um retângulo vermelho (α -hélice), setas azul-claro (seis fitas β da folha- β A) e setas azul-escuro (nove fitas β da folha- β B). As regiões com maior similaridade de sequência estão dentro de um quadrado vermelho, a sequência altamente conservada “PSIXG” destacada em amarelo e os resíduos de Glu catalíticos em vermelho. Alguns dos aminoácidos marcados com um asterisco estão envolvidos no reconhecimento do ácido ferúlico. Alguns resíduos estritamente conservados que participam da ligação de xilana estão sombreados em azul.....

75

Figura 20. Modelo da estrutura tridimensional de HXYN2 sobreposto com a estrutura molde, (do inglês *template*) da xilanase de *Talaromyces cellulolyticus* (PDB: 3WP3). A estrutura supersecundária do tipo β -*jelly-roll* é formada por duas folhas- β antiparalelas denominadas A, em azul claro (cinco ou seis fitas- β) e B em azul (nove fitas- β). A topografia em forma de mão direita parcialmente fechada se assemelha aos “dedos” com alças (do inglês *loop*) entre as folhas- β A e B, a “palma” na fenda e uma alça formando o “polegar”. A α -hélice única descrita na família GH11 está representada, mas para HXYN2 uma hélice adicional foi prevista na região N-terminal. Os dois resíduos catalíticos de Glu, E102 e E193 são representados por bastões. Regiões não estruturadas de HXYN2 e *template* são representadas em branco e cinza, respectivamente.....

76

Figura 21. Modelo tridimensional predito da HXYN2 sobreposto com a estrutura tridimensional da xilanase NpXyn11A (PDB: 2VGD_A) contendo o substrato xilooligossacarídeo e ácido ferúlico (Tabela 3). (A) Representação de superfície do modelo da HXYN2 em branco e os resíduos conservados das regiões de aglicona e glicona que estão em vermelho. Os ligantes são representados pela cadeia carbônica em formato de bastão roxo. (B) O arranjo estrutural dos resíduos conservados nas regiões aglicona e glicona é representado como linha verde para átomos de carbono e sua interação com ligantes é representada como bastões azuis. (C) As interações entre HXYN2 e Xyl3-Xyl2-Xyl1, (D) e Xyl2-Xyl3, (E) e Abf1 e AF1 estão representadas por LIGPLOT (Wallace, Laskowski & Thornton, 1995). Os resíduos de aminoácidos de HXYN2 e ligantes estão marcados; as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas estão representadas como linhas tracejadas e hemisfério listrado, respectivamente.....

78

Figura 22. Modelo tridimensional predito da HXYN2 N^o2 sobreposto com a xilanase SoXyn11B de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 em complexos com alfa-L-3-arabinofuranosil xilotetraose (PDB: 7DFN) (A, C, E) e 4-o-metil-alfa-D-3-glucuronopiranosil xilotetraose (PDB: 7DFO) (B, D, F). A representação da superfície do modelo da HXYN2 está em branco e os resíduos estritamente conservados das regiões aglicona e glicona estão em vermelho (A e B). Os ligantes estão representados pela cadeia carbônica em formato de bastão roxo. Os xilooligossacarídeos (Xil1-Xil2-Xil3) e (Xil1-Xil2-Xil3-Xil4), com os açúcares xilose 3 (Xil3) e 4 (Xil4) na extremidade redutora, estão localizados na região glicona. O arranjo estrutural dos resíduos que interagem com o xilooligossacarídeo na região glicona é mostrado em (C e D). Os resíduos estão representados em linhas e o ligante em bastão. As interações entre HXYN2 e

xilooligossacarídeos foram representadas por LIGPLOT (Wallace, Lakowski & Thornton, 1995) (E e F). Resíduos e ligantes estão identificados; as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas estão representadas como linhas tracejadas e hemisfério listrado, respectivamente.....	79
Figura 23. Efeito do tempo e da concentração de HXYN2 na reação enzimática. A) Variação da absorbância em 540 nm no tempo de 0-180 segundos e concentração entre 100 e 600 nM. B) Correlação linear entre a concentração enzimática em nM e a velocidade inicial da reação.....	83
Figura 24. Atividade relativa da HXYN2 em pH variando de 2 a 12. A determinação do pH ótimo foi realizada utilizando xilana <i>beechwood</i> 1% como substrato, a concentração de HXYN2 de 400 nM e a temperatura de 50 °C por 5 min. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100%.....	84
Figura 25. Efeito da temperatura na atividade enzimática da HXYN2. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM (pH 6,0 e 9,0) em 5 min na presença de xilana <i>beechwood</i> 1%, nas temperaturas de 20 °C, 30 a 80 °C (intervalo de 5 °C) e 90 °C. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100%.....	86
Figura 26. Ensaio de termoestabilidade da HXYN2. A enzima foi incubada nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C por duas horas. Alíquotas foram coletadas após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min de incubação para os ensaios de atividade realizados sob as condições padrão (pH 6,0, 50 °C, 5 min). As atividades enzimáticas foram apresentadas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100%.....	87
Figura 27. Desnaturação térmica da enzima HXYN2 analisada pelo gráfico de primeira ordem. A enzima foi pré-incubada a 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C na ausência de xilana <i>beechwood</i> . Após intervalos de 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min, a atividade da HXYN2, na presença de xilana <i>beechwood</i> , foi determinada usando tampão GCF (pH 6,0) a 50 °C.....	89
Figura 28. Efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática da HXYN2. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM pH 6,0 por 5 min na presença de xilana <i>beechwood</i> 1% (controle), imediatamente após a adição dos compostos fenólicos (1 mg/mL) no ensaio (0 horas) e após 24 horas de pré-incubação com a HXYN2. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100% na ausência de compostos fenólicos.....	91
Figura 29. Curva padrão para a reação de oxidoredução do reagente DNS pelo açúcar xilose, na ausência e presença de ácido ferúlico (1 mg/mL). O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM pH 6,0 e xilose na concentração variando entre 0 e 7 mg/mL, na temperatura de 100 °C por 5 min na presença de DNS.....	93
Figura 30. Efeito do ácido ferúlico no controle negativo da reação de oxidoredução do reagente DNS. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM pH 6,0, variando a concentração de ácido ferúlico entre 0 a 10 mg/mL, incubado a 100 °C por 5 min na presença de DNS.....	94
Figura 31. Cinética enzimática da HXYN2 apresentando o efeito da concentração do substrato xilana <i>beechwood</i> sob a velocidade de hidrólise da HXYN2. A concentração de substrato variou entre 0,5 a 9 mg/mL.....	95
Figura 32. Gráfico duplo-recíproco obtido a partir da curva de cinética enzimática da HXYN2.....	97
Figura 33. Cinética enzimática da HXYN2 na ausência (quadrados – 0 mg/mL AF) e presença do AF: 0,25 mg/mL (círculos), 0,5 mg/mL (triângulos) e 1 mg/mL (triângulo invertido).....	98

Figura 34. Gráfico de Lineweaver-Burk (representação de duplo-recíproco) da HXYN2 na presença do AF, obtido a partir da curva de cinética enzimática (Figura 33).....	99
Figura 35. Representação esquemática do efeito do ácido ferúlico na estrutura e função da HXYN2, destacando a cinética enzimática na ausência e na presença e a provável região que este composto se liga na estrutura tridimensional predita.....	102
Figura 36. Calorimetria de titulação isotérmica de HXYN2 com AF. O painel (A) mostra as respostas calorimétricas com injeções sucessivas de 0,1 mM de AF em 9,61 μ M de HXYN2 na célula da amostra. A titulação foi realizada em tampão glicina-citrato-fosfato 20 mM pH 6,0 e 298 °K. O painel (B) mostra a integração dos picos da curva isoterma para o cálculo de calor liberado após cada injeção. A linha sólida representa o melhor ajuste de quadrados não lineares a um modelo de ajuste de quatro sítios de ligação sequenciais.....	103
Figura 37. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,38 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo <i>SEDFIT</i> com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.....	105
Figura 38. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,19 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo <i>SEDFIT</i> com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.....	106
Figura 39. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,1 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo <i>SEDFIT</i> com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.....	106
Figura 40. Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da HXYN2 em diferentes concentrações. As curvas foram obtidas com um procedimento de normalização a partir dos dados apresentados nas Figuras 37, 38 e 39. Linha preta com círculo: coeficiente de sedimentação da amostra mais concentrada (0,38 mg/ mL); linha sólida: coeficiente de sedimentação da amostra com 0,2 mg/mL e linha preta com triângulo: coeficiente de sedimentação da amostra menos concentrada (0,1 mg/ mL).....	108
Figura 41. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,2 mg/mL em acetato de sódio 50 mM pH 4,0. O ajuste foi realizado pelo <i>SEDFIT</i> com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.....	109
Figura 42. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,2 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 9,0. O ajuste foi realizado pelo <i>SEDFIT</i> com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados.....	109
Figura 43. Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da HXYN2 em diferentes pH. As curvas foram obtidas com um procedimento de normalização a partir dos dados apresentados nas Figuras 41, 38 e 42. Linha com círculo: coeficiente de sedimentação da HXYN2 em pH 4,0; linha com quadrado: coeficiente de sedimentação da amostra em pH 7,0 e linha com triângulo: coeficiente de sedimentação da amostra em pH 9,0.....	111
Figura 44. Espectros de fluorescência da HXYN2 com variações na intensidade da banda	

em ~ 335-337 nm, nos pH 4,0-9,5. A concentração de HXYN2 foi de 0,04 mg/mL e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio 10 mM para pH 4,0-6,0, Tris-HCl 10 mM para pH 6,5-9,0 e glicina 10 mM pH 9,5.....	112
Figura 45. Variação da intensidade de fluorescência (preto) e deslocamento das bandas de emissão (vermelho) da HXYN2 nos pH 4,0 – 9,5.....	113
Figura 46. Espectros de fluorescência da HXYN2 na presença de AF com variações na intensidade da banda de emissão, nos pH 4,0-9,5. A concentração de HXYN2 foi de 0,04 mg/mL e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio 10 mM para pH 4,0-6,0, Tris-HCl 10 mM para pH 6,5-9,0 e glicina 10 mM pH 9,5.....	115
Figura 47. Análise dos dados de fluorescência da HXYN2 em pH de 4,0-9,5 na ausência e presença (curva em preto) do AF (curva em vermelho). (A) Variação da intensidade de fluorescência. (B) Deslocamento do comprimento de onda máximo das bandas de emissão.....	117
Figura 48. Espectro de fluorescência da HXYN2 na ausência (linha sólida) e na presença do AF, em pH 4,0 (linha tracejada), 7,0 (linha com traços curtos) e 9,0 (linha pontilhada)....	118
Figura 49. Gráfico de Stern-Volmer da interação entre HXYN2 e o AF em diferentes pH...	119
Figura 50. Gráfico de duplo logaritmo Log (F0-F)/F versus Log [AF] da HXYN2 na presença de AF e em diferentes pH.....	120
Figura 51. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 em diferentes pHs a 25 °C. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL, e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0, tampão bis-tris (5 mM) pH 6,0, tampão Tris-HCl (5 mM) pH 7,0 e 9,0.....	122
Figura 52. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (200 a 250 nm) da HXYN2 e os respectivos espectros ajustados, em pH 4,0 (quadrado e linha preta), 6,0 (triângulo e linha cinza escuro), 7,0 (losango e linha cinza claro) e 9,0 (círculo e linha cinza) a 25 °C.....	123
Figura 53. Alinhamento estrutural do modelo da proteína HXYN2 (azul escuro) com estruturas depositadas no banco de dados PDB: 2VUJ (verde), 2VGD (azul claro), 3WP3 (rosa) e 1YNA (laranja).....	124
Figura 54. Curvas de desnaturação térmica da HXYN2 monitoradas a 218 nm em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 4,0 (quadrado verde), tampão BIS-TRIS 5 mM, pH 6,0 (círculo vermelho), tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0 (triângulo azul) e 9,0 (triângulo invertido cinza), nas temperaturas de 25 a 95 °C. A temperatura de transição da proteína (Tm) estimada a partir das curvas ajustadas (linha preta) foram 76,2 °C (pH 4,0), 63,5 °C (pH 6,0) e 63,7 °C (pH 7,0) e 62,3 °C (pH 9,0).....	126
Figura 55. Variação da atividade relativa normalizada e da curva de desnaturação térmica monitoradas a 218 nm da HXYN2, em pH 6,0 nas temperaturas de 20 a 95 °C.....	127
Figura 56. Efeito da temperatura na estrutura secundária e na estabilidade estrutural da HXYN2 avaliado por dicroísmo circular. Espectros dicroicos da HXYN2 coletados entre 25 a 95 °C em tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0 (A), tampão BIS-TRIS (5 mM) pH 6,0 (B), tampão Tris-HCl (5 mM) pH 7,0 (C) e 9,0 (D).....	130
Figura 57. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV(195 a 260 nm) da HXYN2 em pH 4,0 a 25 °C antes (preto) e após (vermelho) a desnaturação térmica. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL em tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0.....	131
Figura 58. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 na ausência e presença de AF a 25 °C. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL, AF na concentração de 60 µM e o tampão utilizado foi BIS-TRIS (5 mM) pH	

6,0.....	132
Figura 59. Efeito da temperatura na estrutura secundária e na estabilidade estrutural da HXYN2 na presença de AF avaliado por dicroísmo circular. Espectros dicroicos registrados entre 25 e 85 °C e tampão BIS-TRIS (5 mM) pH 6,0.....	132
Figura 60. Curvas de desnaturação térmica da HXYN2 na ausência (quadrado preto) e presença (círculo verde) de AF monitoradas a 218 nm em tampão BIS-TRIS 5 mM, pH 6,0, nas temperaturas de 25 a 95 °C. A temperatura de transição da proteína (T _m) estimada a partir das curvas ajustadas (linha preta) foram 63,5 °C na ausência e 54,1 °C na presença de AF.....	133
Figura 61. Possíveis sítios de ligação de AF na estrutura da HXYN2, avaliados por <i>docking</i> molecular. (A) e (B) complexo HXYN2-AF mostrando as soluções de interação na região I envolvendo sítios aglicona e glicona. O AF é representado em formato de bastão e a proteína em superfície molecular. Resíduos que interagem com AF estão destacados em superfície laranja, resíduos Trp e Glu estão em superfícies verde e vermelha, respectivamente.....	137
Figura 62. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B2, B3, B10, D2 e D4 (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	139
Figura 63. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B1, B4, B7, B8, B11, B12, D1, D5 e D6 (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	140
Figura 64. Cristais obtidos sob a condição de cristalização B6 (PEG 6000 20%, tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, cloreto de zinco 10 mM) (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	141
Figura 65. Cristais obtidos sob as condições de cristalização A3, A5, A7 e B3 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	143
Figura 66. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B7, D1, D2 e D3 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	144
Figura 67. Cristais obtidos sob as condições de cristalização D4, G7 e G12 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	145
Figura 68. Cristais obtidos sob as condições de cristalização A9, C12, H10 e H11 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada.....	146
Figura 69. Cristal obtido na condição PEG 3350 26% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,5 por meio da técnica de gota sentada.....	147
Figura 70. Cristal obtido na condição PEG 3350 22% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,7 por meio da técnica de gota sentada.....	148
Figura 71. Cristal obtido na condição PEG 3350 28% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,5 por meio da técnica de gota sentada.....	148
Figura 72. Cristal obtido na condição PEG 6000 15% e tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,4 por meio da técnica de gota sentada.....	149
Figura 73. Cristal obtido na condição PEG 6000 18% e tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,4 por meio da técnica de gota sentada.....	150
Figura 74. Coleta de dados de difração de raios X do cristal da proteína HXYN2.....	151
Figura 75. Etapa de refino da estrutura tridimensional da proteína HXYN2.....	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de estruturas secundárias de xilanases GH11 depositadas no <i>Protein Data Bank</i> (PDB).....	39
Tabela 2. Etapas de purificação da HXYN2.....	72
Tabela 3. Modelos estruturais utilizados para modelar a estrutura HXYN2.....	74
Tabela 4. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da HXYN2.....	88
Tabela 5. Parâmetros cinéticos da HXYN2 nativa (Carvalho, 2003) e da HXYN2 recombinante na presença de xilana <i>oat-spelt</i> (OS) (Carvalho, 2008) e <i>beechwood</i> (BeW) obtidos neste trabalho.....	96
Tabela 6. Parâmetros cinéticos da HXYN2 na ausência e na presença do Ácido Ferúlico (AF).....	98
Tabela 7. Parâmetros cinéticos obtidos a partir do gráfico de duplo recíproco da HXYN2 na ausência e na presença do AF.....	100
Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da interação de HXYN2 com AF.....	103
Tabela 9. Parâmetros hidrodinâmicos obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação (UCA-VS) para amostras da proteína HXYN2 em três concentrações diferentes.....	107
Tabela 10. Parâmetros hidrodinâmicos obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação (UCA-VS) para HXYN2 em pH 4,0, 7,0 e 9,0.....	110
Tabela 11. Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e de atenuação bimolecular (K_q) da HXYN2 em complexo com o AF em diferentes pH.....	119
Tabela 12. Constante de associação/ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) da HXYN2 em complexo com o AF em diferentes pH.....	121
Tabela 13. Conteúdo de estruturas secundárias da HXYN2 em diferentes pHs, obtido por deconvolução dos espectros dicróicos utilizando o programa Bestsel, entre os comprimentos de onda 200 a 250 nm.....	123
Tabela 14. Temperatura de transição (T_m) da HXYN2 em diferentes pH e em pH 6,0 na presença de AF.....	126
Tabela 15. Condições de cristalização da HXYN2 na etapa de <i>screening</i> utilizando o kit PACT (Jena Biosciences Screen).....	139
Tabela 16. Condições de cristalização da HXYN2 na etapa de triagem utilizando o kit JCSG (Jena Biosciences Screen).....	142

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
AF	Ácido ferúlico
GCF	Glicina-Citrato-Fosfato
GH	Glicosil Hidrolase
g	Força gravitacional
g/L	Gramas por litro
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mg/mL	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
OD ₆₀₀	Densidade celular óptica medida a 600 nm
p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
U/mL	Unidade enzimática por mililitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
V ₀	Velocidade inicial
µg/mL	Microgramas por mililitro
µM	Micromolar
v/v	volume por volume

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Ácido glutâmico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	26
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	Biomassa vegetal: Lignocelulose.....	29
2.1.1	Hemicelulose.....	30
2.1.2	Lignina.....	31
2.2.	Enzimas Lignocelulolíticas produzidas por fungos.....	32
2.2.1	Hemicelulases.....	33
2.2.2	Xilanases.....	34
2.3	Estrutura tridimensional das xilanases GH11.....	40
2.4	Efeito de inibidores de enzimas hidrolíticas derivados da biomassa.....	45
2.5	Aplicações biotecnológicas de endoxilanases.....	48
2.6	Aplicação biotecnológica da HXYN2.....	50
3.	JUSTIFICATIVA.....	52
4.	OBJETIVOS.....	54
4.1	Objetivo Geral.....	54
4.2	Objetivos específicos.....	54
5.	METODOLOGIA.....	55
5.1	Produção de endoxylanase HXYN2 em frasco.....	55
5.2	Purificação da HXYN2 por cromatografia de exclusão molecular	56
5.3	Quantificação de proteínas totais.....	57
5.4	Determinação da atividade xilanolítica.....	57
5.5	Determinação do coeficiente de extinção molar.....	58
5.6	Modelagem e <i>docking</i> da estrutura HXYN2.....	59
5.7	Caracterização enzimática da HXYN2.....	60
5.7.1	Efeito da concentração da enzima HXYN2 na reação enzimática.....	60
5.7.2	Efeito do pH na atividade da enzima HXYN2.....	60
5.7.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima HXYN2.....	61
5.7.4	Determinação da estabilidade da HXYN2 em diferentes temperaturas.....	61
5.7.5	Efeito de compostos fenólicos na atividade da enzima HXYN2.....	62
5.7.6	Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima HXYN2.....	62
5.8	Determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação entre HXYN2 e AF por calorimetria de titulação isotérmica (CTI).....	63
5.9	Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos da HXYN2 por Ultracentrifugação Analítica.....	64
5.10	Caracterização estrutural da HXYN2.....	65
5.10.1	Análise do efeito do pH e do ácido ferúlico na estrutura terciária da enzima HXYN2 por espectroscopia de fluorescência.....	65
5.10.2	Análise de estrutura secundária e termoestabilidade da enzima HXYN2 por dicroísmo circular.....	66
5.11	Cristalização da proteína HXYN2.....	68
5.12	Coleta de dados de difração de raios X.....	70
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1	Produção e purificação da endoxilanase HXYN2.....	71
6.2	Determinação do coeficiente de extinção molar experimental da HXYN2.....	71
6.3	Modelagem molecular da estrutura tridimensional da HXYN2.....	74
6.4	Caracterização enzimática da HXYN2 utilizando xilana <i>beechwood</i> como substrato..	82

6.4.1	Efeito da concentração da proteína	82
6.4.2	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da HXYN2.....	84
6.4.3	Estabilidade da HXYN2 em diferentes temperaturas.....	87
6.4.4	Efeito de compostos fenólicos na atividade da enzima HXYN2.....	90
6.4.5	Determinação dos parâmetros cinéticos da HXYN2.....	94
6.4.6	Efeito do ácido ferúlico na estrutura-função da HXYN2.....	100
6.5	Análise da interação HXYN2-AF por Calorimetria de titulação isotérmica (CTI).....	102
6.6	Análise de parâmetros hidrodinâmicos da HXYN2 por Ultracentrifugação Analítica..	104
6.7	Caracterização estrutural da HXYN2.....	112
6.7.1	Variação conformacional da enzima HXYN2 avaliada por espectroscopia de fluorescência.....	112
6.7.2	Estrutura secundária e termoestabilidade da HXYN2 por Dicroísmo Circular.....	122
6.8	Análise da interação HXYN2-Ácido ferúlico: relação estrutura-função.....	133
6.9	Cristalização da proteína HXYN2.....	138
6.10	Coleta de dados de difração de raios X.....	150
7.	CONCLUSÃO.....	153
8.	PERSPECTIVAS.....	156
9.	REFERÊNCIAS.....	157
	APÊNDICES.....	172
	ANEXOS.....	181

1. INTRODUÇÃO

O domínio do uso de enzimas é uma área da biotecnologia fundamental para o desenvolvimento de produtos de qualidade de maneira sustentável, em conformidade com as necessidades tecnológicas de mercado e de preservação ambiental. As enzimas responsáveis pela degradação de carboidratos, principalmente as celulasas e hemicelulasas, como endoxilanasas, β -xilosidasas, endo e exoglucanases e β -glicosidasas, destacaram-se por serem as mais utilizadas no mercado de enzimas em 2017, com previsão de mesma tendência por mais 7 anos, conforme o relatório *Allied Market Research*, 2018. Estas enzimas são empregadas em diversos processos industriais, principalmente na indústria de alimentos, de bebidas, de tecidos, de papel, de celulose, de medicamentos, além da produção de aditivos para ração animal e de biocombustíveis a partir de resíduos agrícolas (Girio et al., 2010; Kumar & Shukla, 2016; Ryttersgaard et al., 2002; Katapodis et al., 2003; Tikhomirov et al., 2003; Kamal et al., 2004; Kumar et al., 2014; Meyer et al., 2015; Xue et al., 2019).

As celulasas atuam em substratos específicos e em sinergismo aumentando a eficiência de produção de açúcares fermentáveis. As endoglucanases catalisam ligações químicas localizadas na região amorfa da fibra celulósica; as exoglucanases catalisam ligações das extremidades redutoras e não redutoras da celulose; as β -glicosidasas hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose e as endoxilanasas hidrolisam internamente a cadeia principal de xilana entre as ligações β -1,4. As fontes destes carboidratos têm sido exploradas para fins biotecnológicos industriais (Girelli et al., 2020; Houfani et al., 2020), e são provenientes de resíduos gerados a partir da agricultura, como a cana-de-açúcar e seus resíduos agroindustriais, tais como o bagaço, a palha da cana, e menos explorada, a palha e o sabugo de milho, bem como os resíduos da indústria florestal. Esta biomassa celulósica e lignocelulósica constitui uma fonte de energia e de matéria prima inesgotável para aplicações industriais envolvendo as celulasas e hemicelulasas, e representa uma estratégia de desenvolvimento industrial sustentável e de preservação do meio ambiente (Girelli et al., 2020; Houfani et al., 2020).

As endoxilanasas formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na produção de xilose. Por apresentarem baixa massa molecular, alto valor de pI, estrutura tridimensional altamente conservada e estável, e alta especificidade ao substrato, são de interesse industrial, podendo ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos (fungos e bactérias), nos quais a xilose é utilizada como fonte de

carbono primário para o metabolismo celular. (Bastawde, 1992; Loureiro et al., 2017; Chadha et al., 2019; Collins, Gerday, Feller, 2005; Paës; Berrin; Beaugrand, 2012; Morgan et al., 2017).

Os fungos filamentosos são grandes produtores de enzimas extracelulares, sendo amplamente empregados para a produção de enzimas hidrolíticas e, normalmente, são utilizados como fontes de enzimas comerciais. O gênero *Humicola* tem sido reportado como excelente produtor de celulases e hemicelulases termoestáveis, as quais se destacam pelo seu emprego em diferentes setores industriais (Kumar & Shukla, 2016). O fungo *Humicola grisea* é aeróbico e termofílico moderado, cresce em temperaturas que variam de 20 a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 40 e 42 °C. Esta linhagem foi isolada de compostagem por Virgínia Chaves em 1982 na Universidade Federal de Viçosa e apresentou produção de celulases em alta temperatura, sendo classificado como *H. grisea* var. *thermoidea* (Araújo et al 1983; De Paula, 1999).

Este fungo, quando cultivado em BCA (Bagaço de Cana-de-açúcar), secreta uma xilanase que foi denominada como HXYN2 e classificada como membro da família GH11, de acordo com as características físico-químicas e bioquímicas. HXYN2 apresenta 227 aminoácidos com massa molecular de 23 kDa, temperatura ótima de 65 °C, pH ótimo de 5,5 e pI experimental de 6,1 (Carvalho, 2003). O gene *hxy2* foi isolado e expresso no fungo *Trichoderma reesei*, sendo a enzima ativa contra xilana *oat-spelt* (Faria et al., 2002). Esse gene também foi expresso na levedura *Pichia pastoris* e a enzima recombinante apresentou pH ótimo de 6,5, temperatura ótima de 60 °C e pI teórico de 8,6 (Carvalho, 2008; Cintra et al, 2020).

Conforme mencionado, a HXYN2 foi caracterizada anteriormente utilizando como substrato a xilana *oat-spelt* (Carvalho, 2008). No presente trabalho de tese foi proposto a otimização do processo de expressão da HXYN2 em *P. pastoris*. Esta otimização constituiu da mudança do meio de cultura e da suplementação na expressão com metanol, de acordo com a densidade celular, de alterações no processo de purificação para aumento do rendimento, bem como a utilização de diferentes substratos, como a xilana *beechwood*, nos ensaios enzimáticos. Com base nestas alterações, foi necessária a determinação de todos os parâmetros cinéticos anteriormente reportados e de outros adicionais, como: coeficiente de extinção molar experimental, variação da velocidade inicial de reação, efeito do tempo e da concentração de HXYN2 na reação enzimática, estabilidade em várias temperaturas, efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática da HXYN2 e efeito do ativador ácido ferúlico (AF) na

cinética enzimática, análise da interação do AF com a HXYN2 com resíduos aromáticos por atenuação de fluorescência e a determinação de parâmetros termodinâmicos por microcalorimetria de titulação isotérmica. Estes novos parâmetros foram fundamentais para a determinação da concentração da enzima com precisão, a ser padronizada e utilizada nos experimentos subsequentes, garantindo a reprodutibilidade e a qualidade dos dados bioquímicos e estruturais obtidos nesta tese, bem como fundamentais para análise do efeito de ativadores como o ácido ferúlico na atividade da enzima.

A estrutura tridimensional desta proteína foi predita por modelagem molecular por homologia, a qual apresenta 14 fitas- β antiparalelas e uma α -hélice, com topologia semelhante à forma de uma mão direita semiaberta. O modelo tridimensional da HXYN2 revelou que a enzima não apresenta ligação dissulfeto, como é comum entre as endoxilanasas termofílicas da família GH11, e, portanto, a estabilidade estrutural foi atribuída ao elevado número de pares iônicos. Até a presente data, a resolução da estrutura cristalográfica e a caracterização biofísica e estrutural desta enzima, ainda não haviam sido exploradas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa vegetal: Lignocelulose

A lignocelulose é constituída principalmente por celulose embebida em matriz amorfa de hemicelulose e lignina, que corresponde ao material presente na parede celular da maioria das plantas, responsável por dar suporte estrutural e mecânico, proteção contra patógenos e desidratação (McCann & Carpita, 2008; Martinez et al., 2009; Siqueira & Filho, 2010).

Estes polímeros e macromoléculas são fortemente ligados um ao outro e representam mais de 90% do peso seco da célula vegetal. A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie, época de colheita e, também, ao longo de diferentes partes da mesma planta. Em geral, as resinosas (gimnospermas como *Pinus* e *Cedrus*) apresentam maior teor de lignina do que as folhosas (angiospermas como o eucalipto e carvalho). O teor de hemicelulose, no entanto, é superior em gramíneas. Os resíduos agroindustriais provenientes da cana-de-açúcar (gramíneas), tais como o bagaço, são compostos de 32 a 48% de celulose, 19 a 24% de hemicelulose e 23 a 32% de lignina. A palha da cana tem de 40 a 44% de celulose, 30 a 32% de hemicelulose e 22 a 25% de lignina (Lagaert et al., 2009; Rezende et al., 2011; Santos et al., 2012; Rocha et al., 2015). A estrutura lignocelulósica é formada por uma parede celular constituída por microfibrilas de celulose envolvidas por uma matriz de hemicelulose e lignina (Figura 1).

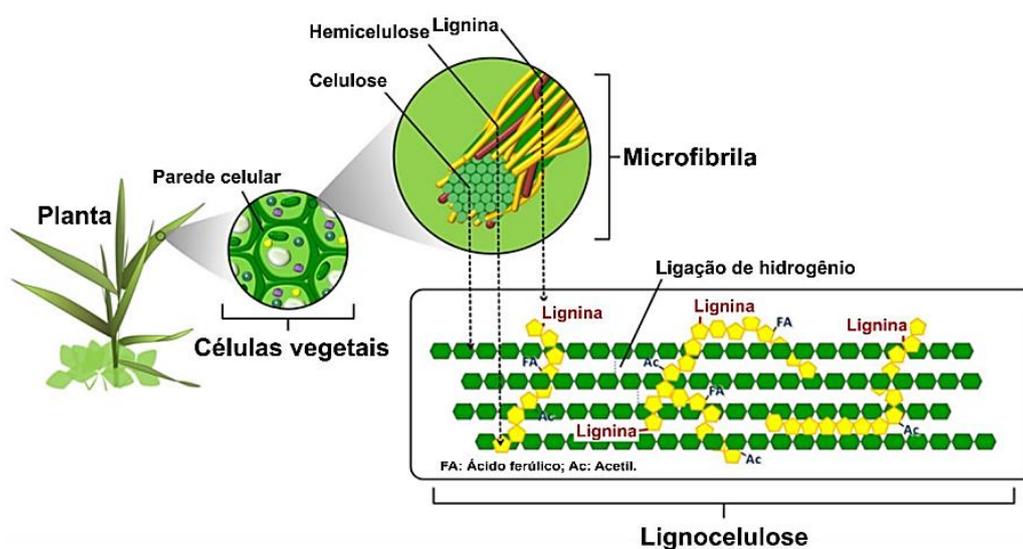


Figura 1. Representação da estrutura da lignocelulose de resíduos agroindustriais composta por celulose, hemicelulose e lignina (Fonte: adaptado de Ribeiro, 2016).

2.1.1 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo com função de envolver as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Essa macromolécula apresenta uma estrutura mais diversificada que a celulose (Karnaouri et al., 2014), contendo ramificações que variam de acordo com a matriz lignocelulósica e que interagem com a celulose por meio de interações iônicas e hidrofóbicas, dando estabilidade e flexibilidade ao polissacarídeo (Fengel & Wegener, 1989; Peng et al., 2012). Devido às ramificações presentes nesse polissacarídeo, as hemiceluloses formam arranjos estruturais com nível de organização estrutural acessível à hidrólise por agentes químicos ou enzimáticos (Hansen & Bjørkman, 1998). Na matriz formada na parede secundária, as hemiceluloses associam-se covalentemente à lignina fortalecendo a coesão entre as macromoléculas e aumentando a recalcitrância da parede celular (Harris & Stone, 2008).

A hemicelulose contém diversos resíduos de carboidratos, dentre eles: D-xilose, D-manose, D-glicose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico, D-galactose, L-arabinofuronose e L-ramnose, sendo geralmente formadas por 2 a 6 açúcares diferentes unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e, às vezes, por ligações glicosídicas do tipo β -1,3 (Janes, 1969; Sánchez, 2009). A hemicelulose pode ser caracterizada de acordo com a presença dos principais açúcares identificados, podendo receber o nome de xilana, manana, galactana ou galacturana. A xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polissacarídeo vegetal mais abundante encontrado na natureza. Ela corresponde à aproximadamente 39% do peso seco das plantas terrestres, sendo formada por uma cadeia central de monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, apresentando ramificações de arabinofuranose, ácido glucurônico e grupamento acetil, formando as arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoxilanas (Benedetti, 2009; Girio et al., 2010).

A estrutura da 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana, que é a hemicelulose mais abundante na parede celular primária e secundária de gramíneas (cana-de-açúcar), está apresentada na Figura 2 (Harris & Stone, 2008).

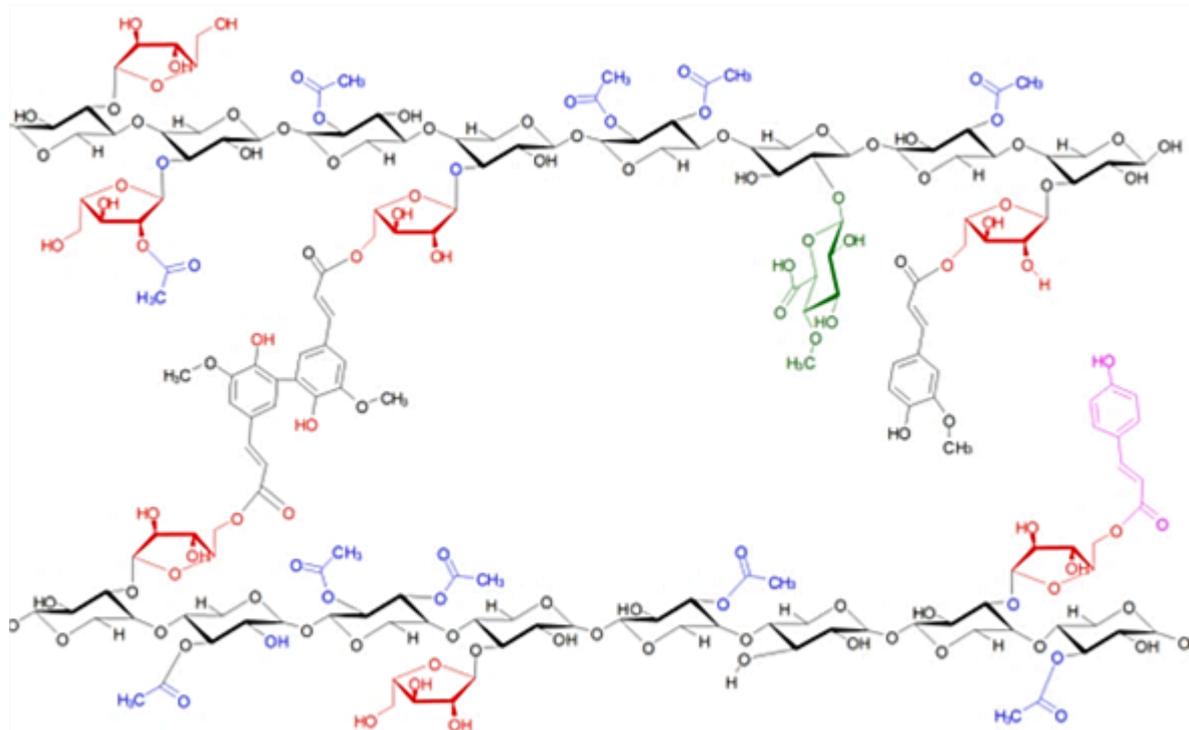


Figura 2. Modelo estrutural da 4-O-metil-glucuronarabinoxilana, tipicamente presente em gramíneas. Na cadeia central estão os resíduos de xilose em preto e as ramificações estão apresentadas em diferentes cores, onde em vermelho estão os radicais de arabinofuranose, em verde o ácido glucurônico e em azul o grupamento acetil (Fonte: adaptado de McDougall et al., 1993).

2.1.2 Lignina

A lignina é um componente polimérico amorfo presente na parede secundária das células vegetais, ligada à celulose e à hemicelulose, formando uma barreira física e impenetrável na parede celular da planta. Ela serve de suporte estrutural ao vegetal, conferindo-lhe impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (Abramson et al., 2010; Doherty et al., 2011). Esta molécula consiste em unidades resultantes da combinação de radicais oriundos da desidrogenação enzimática de moléculas derivadas do ácido p-cumárico (Figura 3), denominadas álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico (Fengel & Wegener, 1989), resultando em um biopolímero de fenilpropanóide hidrofóbico e aromático. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte de origem (Martínez et al., 2005; Sánchez, 2009).

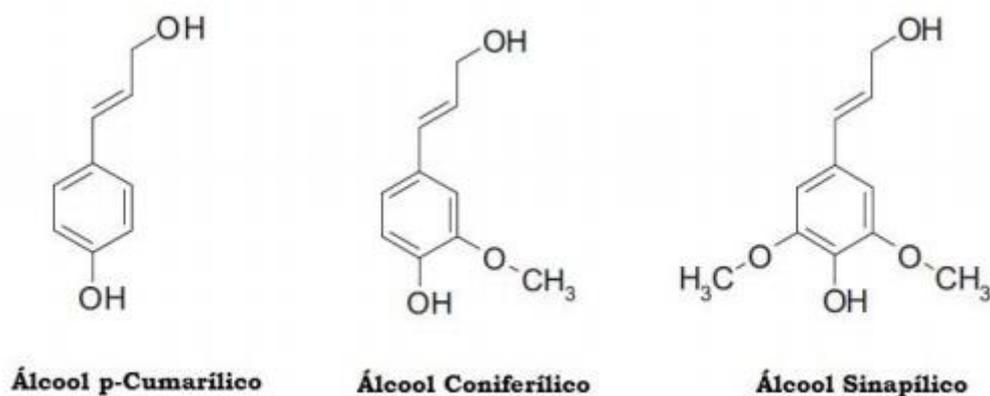


Figura 3. Estrutura química dos álcoois precursores da lignina. (Fonte: Silveira et al., 2014).

Na biomassa lignocelulósica a lignina interage com carboidratos por meio de ligações éter ou éster (Buranov & Mazza, 2008; Doherty et al., 2011). Ela pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% da sua massa seca. No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas, que podem ser irreversivelmente adsorvidas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (Santos et al., 2012).

Além disso, compostos fenólicos solúveis provenientes da lignina gerados durante o pré-tratamento da biomassa, apresentam ação inibitória (Duarte et al., 2012) e dificultam tanto a hidrólise enzimática quanto a fermentação de açúcares a etanol. A propriedade inibitória destes compostos será relatada mais à frente.

2.2 Enzimas Lignocelulolíticas produzidas por fungos

Enzimas responsáveis pela degradação da biomassa vegetal são estudadas há muitos anos, devido a sua capacidade de gerar açúcares fermentescíveis. Estes biocatalisadores têm se tornado de grande interesse para vários processos biotecnológicos, principalmente na indústria, pois apresentam alta especificidade e são capazes de gerar produtos em condições brandas de temperatura e pH (Silveira et al., 2014b).

Os fungos são muito importantes na natureza devido a principal função de decompor a matéria orgânica morta, fazendo assim a reciclagem de elementos químicos fundamentais para os demais organismos, como o carbono. Eles são capazes de

degradar a celulose e a hemicelulose da biomassa vegetal, pois sintetizam um complexo enzimático capaz de hidrolisar estes polissacarídeos. As celulases e xilanases são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática desses polissacarídeos (Lynd et al., 2002). Dentre os fungos produtores de enzimas celulolíticas estudados, destaca-se *Trichoderma reesei*, por ser um grande produtor de celulases de alta eficiência de degradação de matéria orgânica (Martinez et al., 2008).

As enzimas que degradam a lignocelulose são proteínas multidomínios e, geralmente, contém os domínios catalíticos e não catalíticos estruturalmente distintos. Dentre essas enzimas, destacam-se as que hidrolisam ligações glicosídicas e são classificadas nas famílias das glicosil hidrolases (GH), de acordo com a sequência de aminoácidos. Algumas delas são classificadas como carboidrato esterases (CEs), por hidrolisarem ligações éster de grupos substituintes ligados principalmente à cadeia central de xilana (Shallom & Shoham, 2003; Menon & Rao, 2012).

2.2.1 Hemicelulases

Assim como a celulose, a hemicelulose pode ser degradada por um complexo enzimático de hemicelulases que expõe as fibras de celulose, facilitando o acesso das celulases e aumentando a eficiência da hidrólise. Elas podem ser produzidas por diversas espécies de bactérias e fungos. Diante da complexidade estrutural da xilana, é necessária uma variedade de enzimas, denominadas enzimas do sistema xilanolítico, para completa hidrólise e liberação de unidades de xilose. As principais enzimas para a degradação da xilana a monômeros são as endoxilanases (EC 3.2.1.8), que clivam as ligações do tipo β -1,4 da cadeia principal de xilana em oligossacarídeos mais curtos, e β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que cliva xilo-oligossacarídeos em xilose.

Dependendo do tipo de xilana, podem ser também necessárias enzimas auxiliares para a clivagem das cadeias laterais a fim de facilitar o acesso às enzimas que degradam a cadeia central. Estas enzimas são: α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), que clivam as ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre o ácido glucurônico lateral e a xilose da cadeia central; acetilxilanaesterases (EC 3.1.1.72), que clivam as ligações entre o ácido acético e os C-2 e C-3 dos resíduos de xilose; ácido cumárico esterases e ácido fenólico esterases, que clivam as ligações do tipo éster entre ácido cumárico e ácido fenólico e os resíduos de arabinofuranose; arabinofuranosidases (E.C.3.2.1.55), que clivam a ligação entre o resíduo lateral de arabinofuranose e a xilose da cadeia central

(Figura 4) (Saha, 2003; Aro; Pakula; Penttila, 2005; Polizeli et al., 2005, Chávez et al., 2006; Van Dyk & Pletschke, 2012).

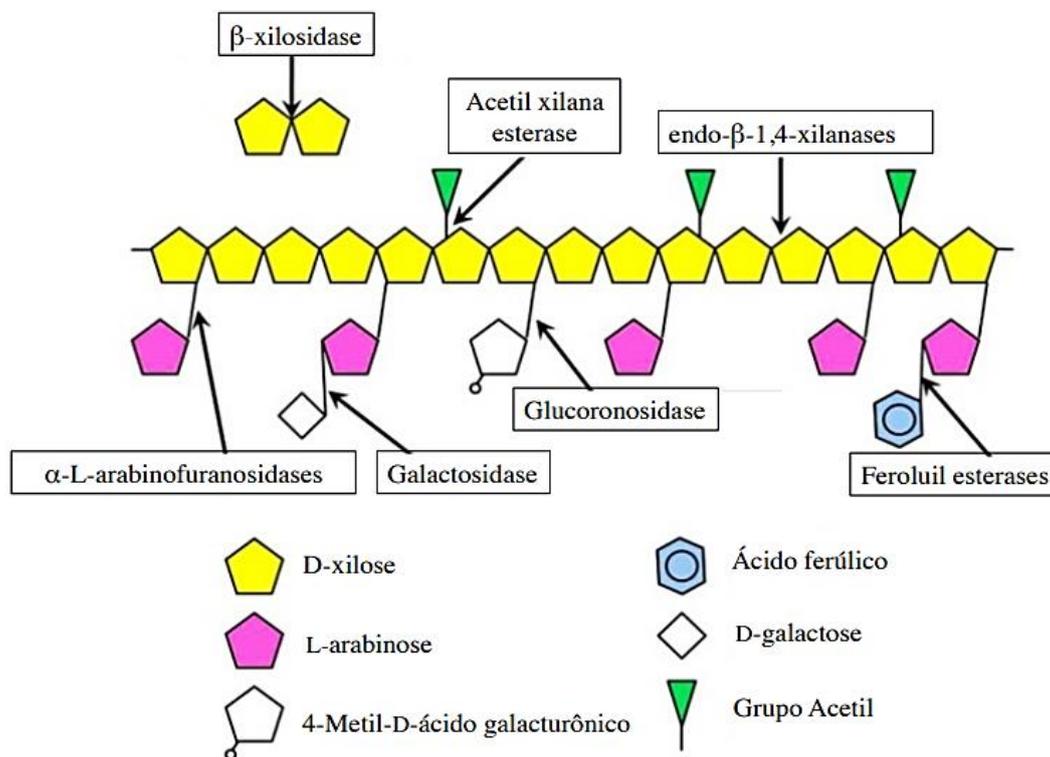


Figura 4. Esquema da composição da xilana e enzimas envolvidas na degradação da xilana (Adaptado de Ratanakhanokchai et al., 2013).

2.2.2 Xilanases

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na produção de xilose, a partir de hemicelulose. As características da enzima, modo de ação e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem. As endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (Bastawde, 1992), onde a xilose pode ser utilizada como fonte de carbono primário para o metabolismo celular dos mesmos. Estas enzimas microbianas são de grande interesse industrial, já que apresentam alta especificidade, o que resulta em melhor aproveitamento do substrato (Michelin et al., 2008).

Elas são classificadas como glicosil hidrolases (GHs) que catalisam a hidrólise de ligações xilosídicas do tipo β -1,4 da cadeia principal de xilana (Figura 5), sendo a principal e mais abundante hemicelulose encontrada na natureza (Torrönen; Rouvenen, 1997), produzindo xilo-oligômeros de tamanhos variados (Collins, Gerday, Feller, 2005).

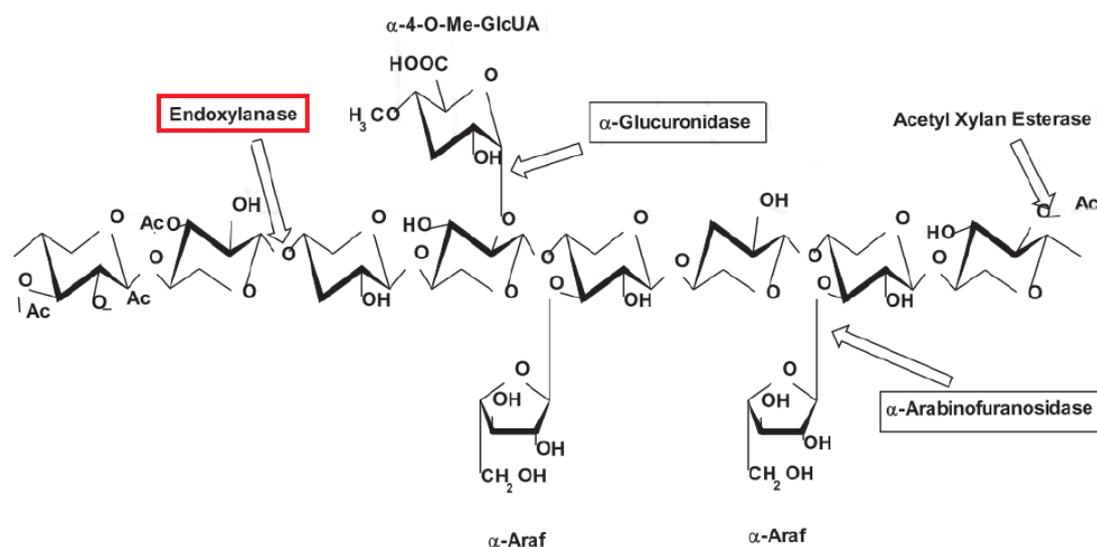


Figura 5. Estrutura da xilana e as enzimas xilanolíticas envolvidas na sua degradação. (Motta; Andrade; Santana, 2013).

As xilanases foram reconhecidas pela União de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961, e pelo código *EC* 3.2.1.8 (Collins, Gerday, Feller, 2005). A classificação das xilanases foi realizada de acordo com CAZy - Carbohydrate-Active enZymes, disponível em www.cazy.org e divididas em mais de 100 famílias, baseado na similaridade da sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional (Davies & Henrissat, 1995; Rye & Withers, 2000; Lombard et al., 2014). Considerando que a estrutura e mecanismo molecular da enzima estão relacionados com a sua estrutura primária, o sistema de classificação considera as características estruturais e o mecanismo das enzimas (Collins, Gerday, Feller, 2005).

A partir deste sistema de classificação, as xilanases (*EC* 3.2.1.8) foram agrupadas em duas famílias de glicosil hidrolases (GHs): Família 10 e Família 11 (Jeffries, 1996). No entanto, enzimas com atividade xilanolítica também são encontradas em outras famílias, como 5, 7, 8, 9, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62, indicando a existência de enzimas bifuncionais, ou enzimas que apresentam atividade xilanolítica residual (Collins, Gerday, Feller, 2005; Uday et al., 2016).

As xilanases das famílias GH10 e GH11 apresentam o mesmo mecanismo de ação: catalisam a hidrólise de xilana mantendo a configuração estereoquímica do carbono anomérico (C1 do anel de xilopiranosose), após a clivagem da ligação glicosídica. Na primeira etapa (glicosilação), o resíduo chamado ácido / base (A/B) atua como um ácido e protona o substrato, enquanto o outro resíduo catalítico, atuando como nucleófilo (Nuc), promove a separação estrutural e a formação da enzima intermediária

α -glicosil. No segundo passo (deglicosilação), o resíduo ácido / base desempenha o papel de base geral, retira um próton de uma molécula de água que ataca o carbono anomérico da enzima α -glicosil intermediária. Em seguida, ocorre uma segunda substituição, na qual o carbono anomérico dá origem a um produto com a configuração β , igual ao substrato (Figura 6) (Paës; Berrin; Beaugrand, 2012). Nas xilanases, dois resíduos conservados de ácido glutâmico são responsáveis pela catálise, estando envolvidos neste processo.

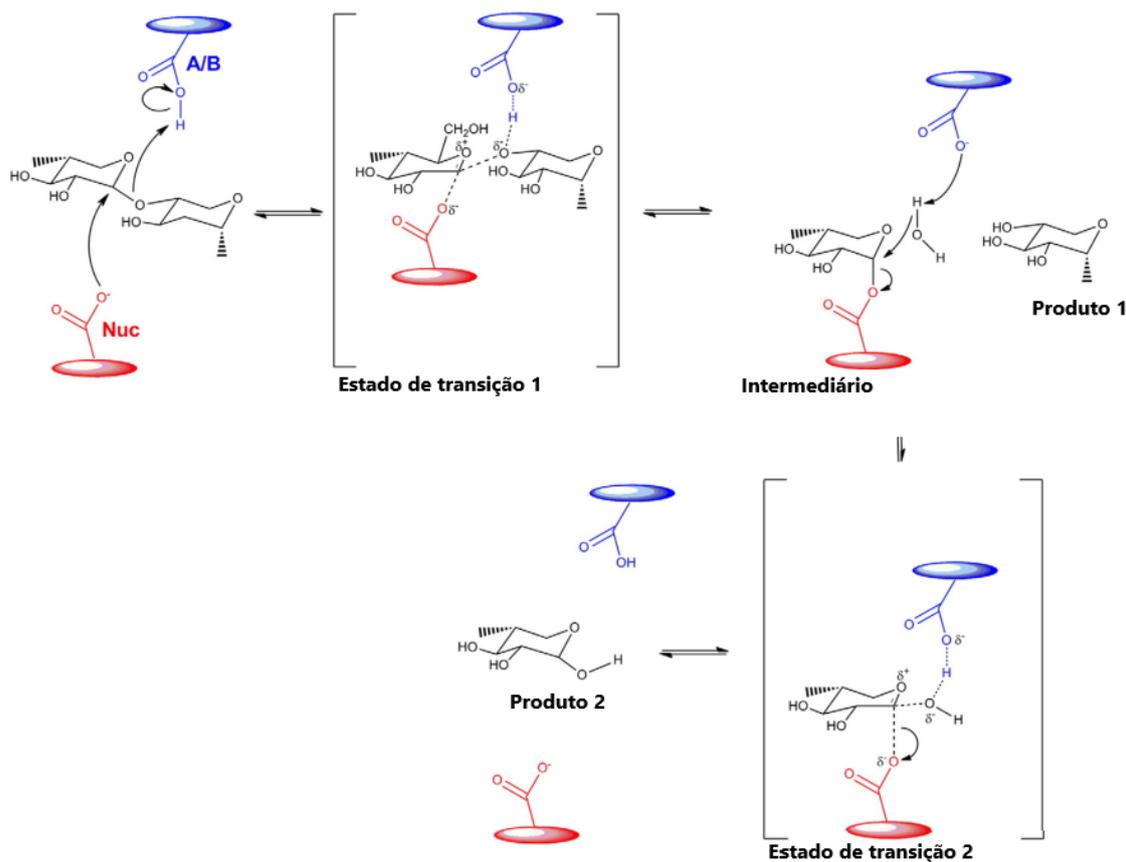


Figura 6. Mecanismo de hidrólise da ligação glicosídica com retenção anomérica (adaptado de Paës; Berrin; Beaugrand, 2012). Em vermelho, Nuc representa o resíduo catalítico nucleofílico e em azul, A/B é o resíduo catalítico ácido/base.

O mecanismo de ação de enzimas pode ser estudado por meio da estrutura tridimensional e química de proteínas, o que permite avaliação do papel de aminoácidos na estrutura e função das enzimas, bem como por meio da cinética enzimática. As duas abordagens são complementares para compreensão dos mecanismos de catálise.

Henri, em 1903, propôs que a ação da enzima no substrato ocorre em duas etapas. A primeira etapa da catálise enzimática é a formação de um complexo enzima-substrato, com a ligação do substrato em regiões específicas, como fendas ou centros ativos das enzimas, ligação essa que é acompanhada por mudanças conformacionais que

facilitam a formação do estado de transição do complexo enzima-substrato [ES]. Na segunda etapa ocorre o rompimento de ligações deste complexo com liberação da enzima [E] e produto [P] (Berg; Tymoczko; Stryer, 2006).

Tendo como base este mecanismo, a cinética enzimática pode ser representada por uma curva de comportamento hiperbólico, descrito por Michaelis-Menten, admitindo a hipótese de equilíbrio rápido, e por Briggs-Haldane, considerando a hipótese de estado estacionário. A equação que representa este comportamento hiperbólico relaciona a velocidade da reação e a concentração de substrato e foi deduzida e é conhecida como equação de Michaelis-Menten. Em geral, a maioria dos trabalhos que descrevem a cinética enzimática de xilanases, apresentam uma cinética enzimática com um comportamento hiperbólico. No entanto, algumas enzimas podem apresentar cinética enzimática com um comportamento sigmoidal, descrito para enzimas alostéricas e que refletem interações cooperativas (Cleland, W. W., 1977; Cleland, W. W., 2002). Estudos mostram que enzimas monoméricas, como as xilanases, podem apresentar um comportamento do tipo alostérico, no qual a cinética sigmoidal para estas enzimas indicam cooperatividade, mesmo havendo apenas um sítio ativo (Porter & Miller, 2012).

A Família GH10 consiste em endo-1,4- β -xilanases, endo-1,3- β -xilanases (enzimas encontradas principalmente na parede celular de algas) e celobiohidrolases. Elas são enzimas altamente ativas em degradar xilo-oligossacarídeos de cadeia curta. O domínio catalítico de xilanases da família GH10 é cilíndrico com configuração em barril formado por α/β_8 , finalizando com uma extremidade mais estreita próxima da terminação carboxil da extremidade β (Figura 7). Em geral, xilanases desta família apresenta massa molecular maior que 30 kDa, baixos valores de pI e os oligossacarídeos decorrentes das reações de hidrólise apresentam baixo grau de ramificação (Jeffries, 1996; Collins, Gerday, Feller, 2005).

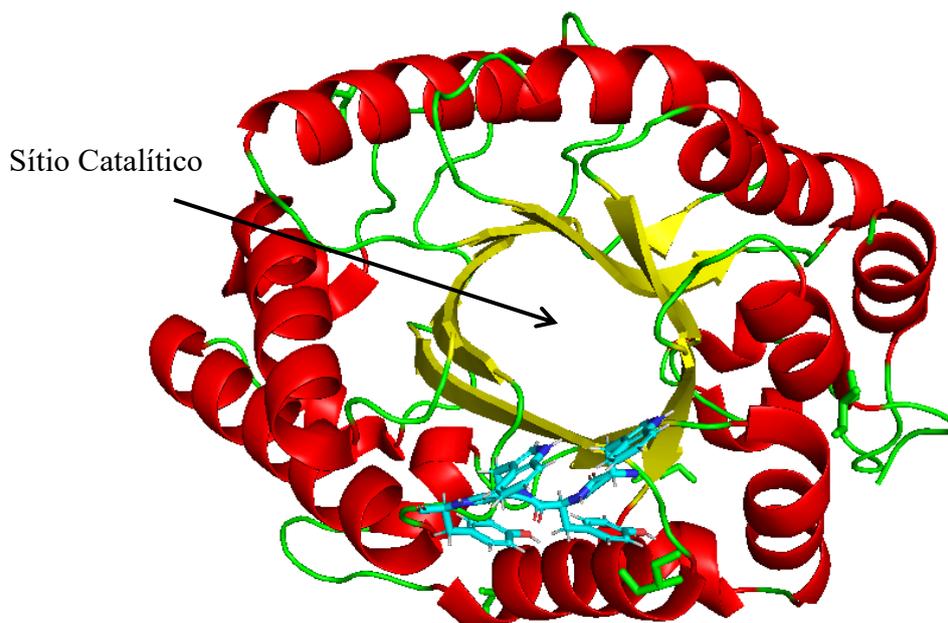


Figura 7. Representação da estrutura tridimensional das xilanases da família GH10 (PDB ID: 4XUY) destacando o do sítio catalítico. As estruturas em α -hélices estão destacadas em vermelho, as fitas- β em amarelo, as estruturas “*turn*” ou desordenadas em verde e os resíduos de aminoácidos aromáticos em azul (Fonte: de autoria própria).

Diferente de outras famílias de GHs, a família GH11 é composta apenas por xilanases. Estas enzimas são chamadas de “xilanases verdadeiras”, pois são exclusivamente ativas em substratos que contém o resíduo D-xilose. As enzimas desta família são geralmente caracterizadas por valor alto de pI, baixa massa molecular (menores que 30 kDa) e com alto teor de estrutura de folhas- β e baixo conteúdo de α -hélices (Collins, Gerday, Feller, 2005), como pode ser observado na tabela 1. Tais características se destacam, pois garantem alta aplicabilidade biotecnológica para as enzimas desta família, o que tem motivado o interesse pelo estudo destas moléculas (Du Manoir et al., 1991; Kirk & Jeffries, 1996). Os domínios catalíticos das xilanases desta família são formados principalmente de folhas- β torcidas que protegem e formam a fenda e o sítio catalíticos (Figura 8). Além dos domínios catalíticos, as xilanases também podem apresentar domínios não catalíticos, que são mais comuns em xilanases da família GH11. Esses domínios são responsáveis por modular as funções catalíticas da enzima (Jeffries, 1996).

Tabela 1. Conteúdo de estruturas secundárias de xilanases GH11 depositadas no *protein data bank* (PDB).

Microrganismo	Ident. com HXYN2	PDB	α -hélice	Folhas- β
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	59,79%	1YNA	5%	63%
<i>Thermobifida fusca</i>	58,20%	3ZSE	4%	57%
<i>Chaetomium thermophilum</i>	57,98%	1H1A	5%	64%
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	59,02%	2JIC	5%	61%
<i>Trichoderma reesei</i>	59,02%	5K7P	5%	61%
<i>Trichoderma reesei RUT C-30</i>	58,47%	5ZH9	5%	61%
<i>Trichoderma reesei</i>	58,47%	4HK9	5%	61%
<i>Thermopolyspora flexuosa</i>	58,99%	1M4W	5%	61%
<i>Trichoderma harzianum</i>	56,65%	1XND	5%	60%
<i>Bacillus subtilis</i>	56,74%	2B45	5%	64%

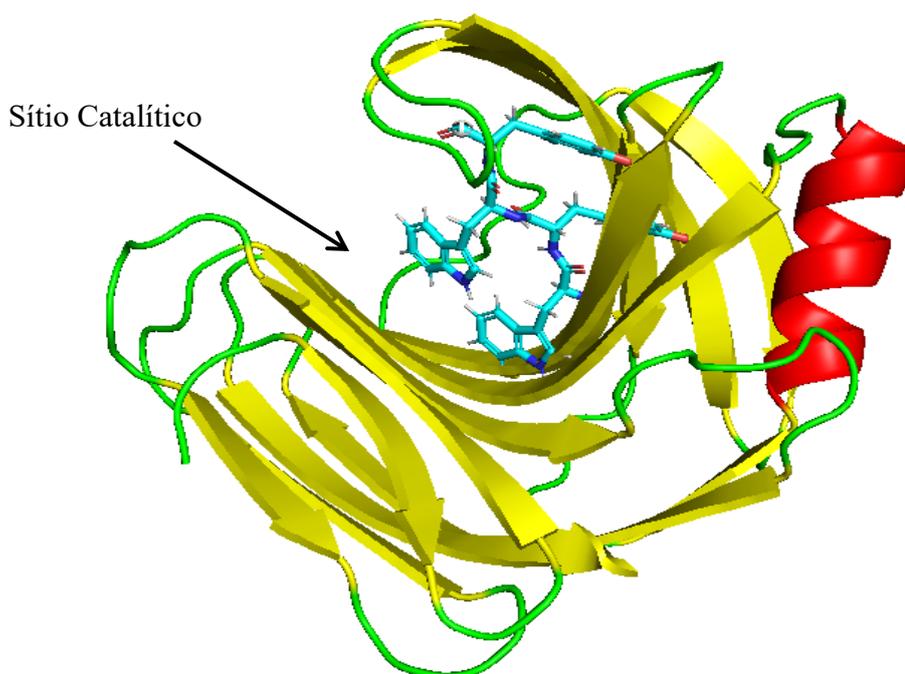


Figura 8. Representação da estrutura tridimensional das xilanases da família GH11 (PDB ID: 4HK9) destacando o sítio catalítico. Em vermelho está destacada uma estrutura α -hélice, em amarelo as fitas- β , em verde as estruturas “turn” ou desordenadas e em azul os resíduos de aminoácidos aromáticos que compõem parte do sítio catalítico (Fonte: de autoria própria).

2.3 Estrutura Tridimensional das xilanases GH11

A estrutura tridimensional das endoxilanases fúngicas da família GH11 consiste de um domínio único de folhas- β antiparalelas torcidas e organizadas de uma forma regular e uma única α -hélice, semelhante à mão direita semiaberta (“dedos”, “polegar”, uma única α -hélice e a “palma da mão” que são as fitas- β torcidas) (Figura 9). O sítio ativo de ligação ao substrato está localizado na cavidade formada entre a superfície do “polegar” e da “palma”. A única estrutura do tipo hélice (α -hélice) está localizada na parte superior da “palma” no lado oposto à cavidade do sítio catalítico (Figura 9) (Harris et al., 1997; Törrönen & Rouvinen, 1997).

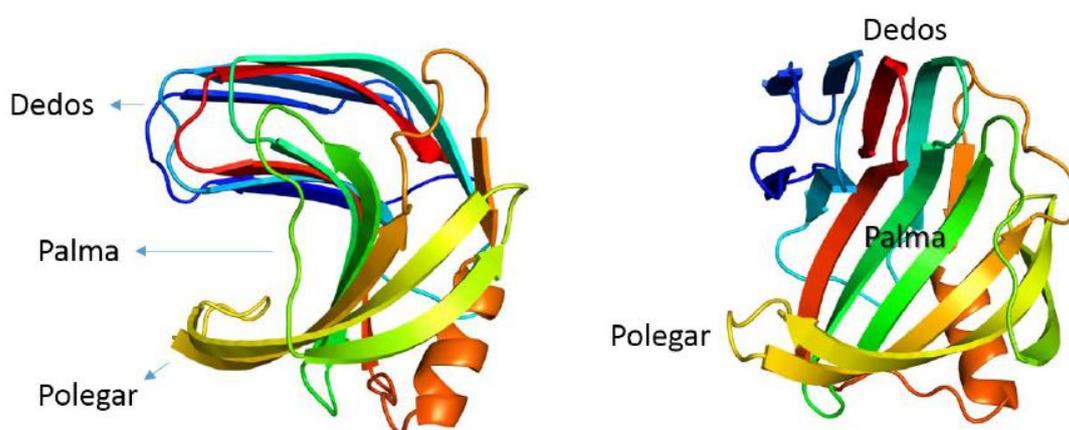


Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da endo-1,4- β -xilanase de *Bacillus subtilis ssp. subtilis* 168 (PDB ID: 1XXN) (Molina, 2016).

O sítio catalítico das xilanases GH11 é formado por um cluster de resíduos polares/anfipáticos e carregados, sendo que dois resíduos catalíticos de ácido glutâmico descritos por WarAarchuk e colaboradores (1994) estão localizados em lados opostos da cavidade da “palma”. Estes resíduos são altamente conservados nesta família e a numeração desses resíduos é específica para cada xilanase (Payan et al., 2004; Vardakou et al., 2008).

Nesta região do sítio ativo, duas folhas- β antiparalelas formam uma fenda longa e profunda, conferindo uma arquitetura de β -jelly-roll, onde ligações de hidrogênio entre as fitas- β da molécula conferem estabilidade a estrutura. Esta arquitetura chama a atenção entre as xilanases GH11 por ser conservada em todas elas, condição que pode ser observada ao sobrepor suas estruturas, o que torna esse dobramento β -jelly-roll

importantíssimo, pois faz destas enzimas, proteínas globulares densas com raio de rotação próximo de 1,7 Å (Paës; Berrin; Beaugrand, 2012).

Vardakou e colaboradores (2008) descreveram uma endoxilanase de *Neocallimastix patriciarum* pertencente à família G11 que contém um único domínio composto de 14 fitas β antiparalelas formando uma estrutura côncava, uma α -hélice unindo as fitas β -13 e β -14 e três α -hélices entre β -6 e β -7. No centro do sítio ativo estão os dois resíduos catalíticos conservados, Glu 113 (nucleófilo) e Glu 201 (ácido-base), localizados nas fitas β -9 e β -14, respectivamente.

Na estrutura tridimensional das enzimas desta família resíduos de ácido glutâmico que estão envolvidos na ligação ao substrato (Figura 10 A), estão ligados a um conjunto conservado de resíduos aromáticos (triptofano e tirosina) expostos (Figura 10 B) que se situam dentro da cavidade catalítica (Harris et al., 1997; Törrönen & Rouvinen, 1997). Além da função catalítica, os resíduos de ácido glutâmico contribuem para a estabilidade e manutenção da conformação do sítio ativo (Paës; Berrin; Beaugrand, 2012).

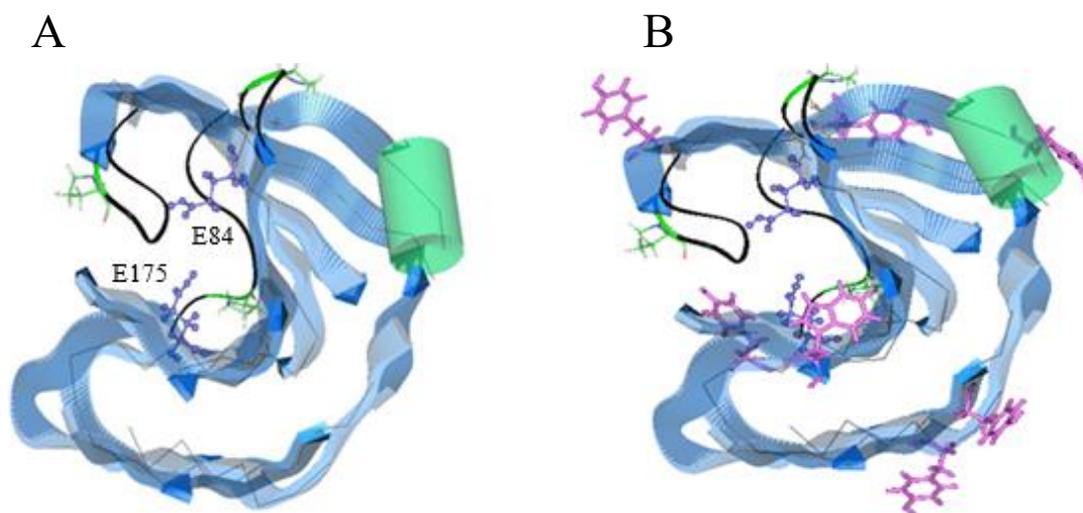


Figura 10. Representação do modelo da estrutura da HXYN2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. A) Resíduos de ácido glutâmico (esferas azuis) E84 e E175 no sítio catalítico e B) Resíduos de aminoácidos aromáticos (rosa) que interagem com os resíduos de ácido glutâmico na fenda catalítica e que estão presentes na superfície (Freitas et al., 2003 e arquivo pessoal).

O modelo da estrutura tridimensional da endoxilanase HXYN2 foi construído por modelagem molecular por homologia com endoxilanases GH11 depositadas no banco de dados (PDB) (Freitas et al., 2003). O modelo tridimensional é constituído de

14 fitas- β antiparalelas e uma α -hélice semelhante à forma de uma mão direita semiaberta (Figura 11). A conformação do sítio ativo é representada por um arcabouço contendo os resíduos catalíticos de ácido glutâmico E84 (nucleófilo) e E175 (ácido-base) (Figura 12), estabilizados por ligações de hidrogênio com resíduos aromáticos (Y75, Y86, W77 e Y169).

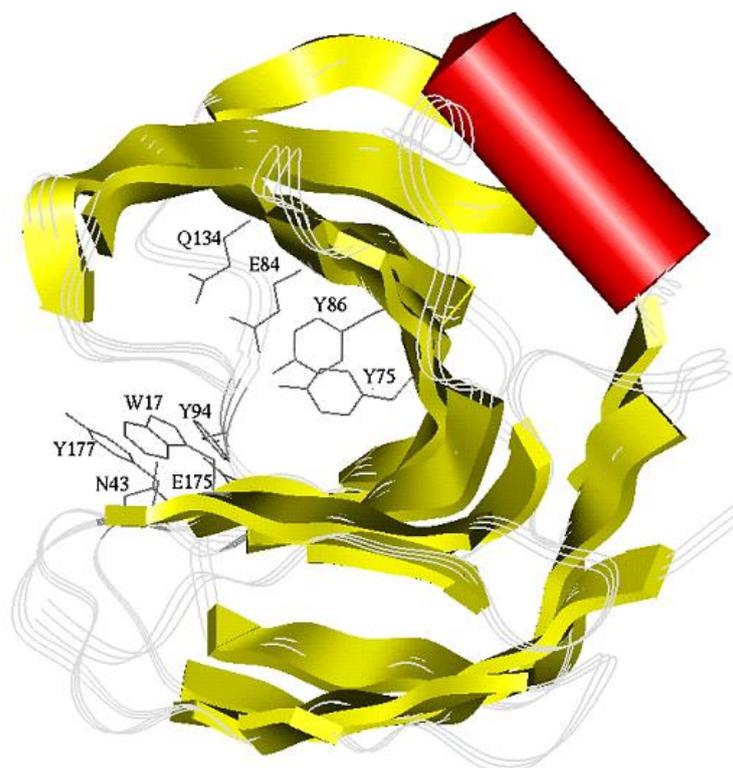


Figura 11. Modelo tridimensional de HXYN2 e os resíduos do sítio ativo. O modelo é formado por fitas β antiparalelas (amarelas) e uma α -hélice (vermelho). As cadeias laterais dos resíduos catalíticos e aromáticos são representadas e identificadas no sítio ativo (Freitas et al., 2003).

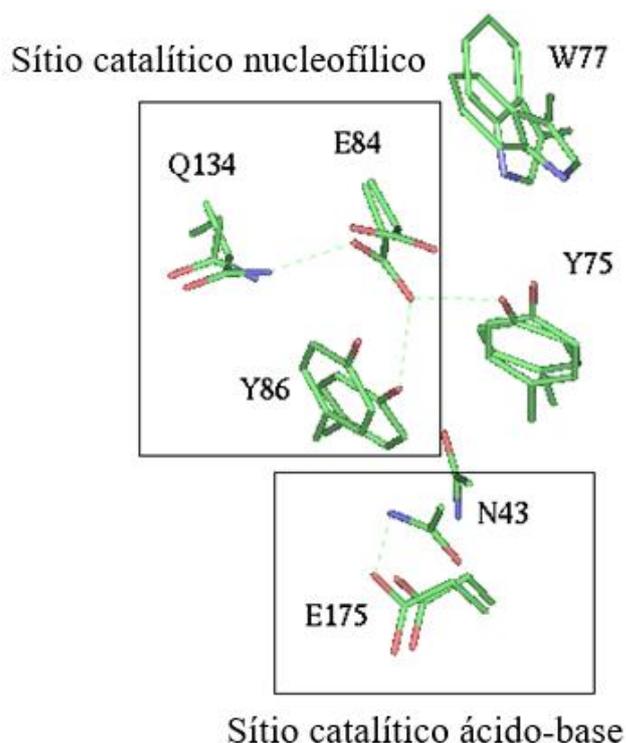


Figura 12. Interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico do modelo da endoxilanase HXYN2, obtido após sobreposição do sítio catalítico do modelo de 1YNA (Gruber et al., 1998; Freitas et al., 2003).

A sequência de aminoácidos da HXYN2 revelou que, diferente de outras endoxilanasas termofílicas da mesma família GH11, a enzima não apresenta ligação dissulfeto. Entretanto, este modelo HXYN2 mostra característica estrutural típica, que deve estar envolvida com a termoestabilidade observada, como o elevado número de pares iônicos, em comparação com outras endoxilanasas termofílicas e mesofílicas (Freitas et al., 2003). Gruber e colaboradores (1998) resolveram a estrutura da xilanase termofílica de *Thermomyces lanuginosus*. Esta xilanase apresenta uma ligação dissulfeto que liga a fita B9 (resíduo 110) com a α -hélice (resíduo 154) e elevado número de pares iônicos que contribuem para a estabilidade da proteína. A Figura 13 compara a distribuição de resíduos de aminoácidos carregados da estrutura da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* com a xilanase II de *Trichoderma reesei*.

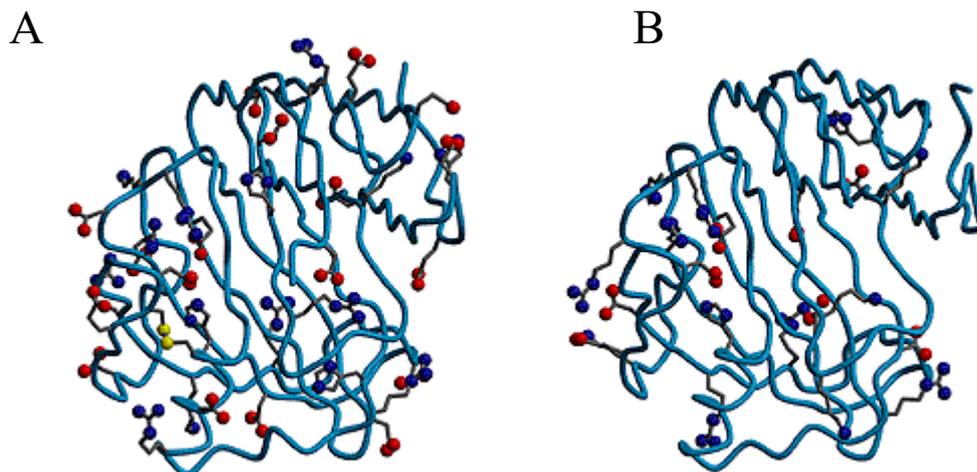


Figura 13. Distribuição de resíduos de aminoácidos carregados positivamente e negativamente (esferas azuis e vermelhas, respectivamente) na superfície da molécula de xilanases envolvidas na formação de pares iônicos. A) xilanase de *T. lanuginosus* (PDB 1YNA) e B) xilanase II de *T. reesei* (PDB XYN) (Gruber et al., 1998).

Além do sítio ativo, subsítios de ligação são identificados em xilanases GH11. Estes subsítios são definidos como regiões adjacentes da enzima compostos por resíduos que interagem de forma não covalente com os monômeros do substrato, facilitando o reconhecimento estrutural e eletrostático. A afinidade entre subsítio e açúcar é determinada por ligações de hidrogênio entre grupos polares e as interações de empilhamento entre os anéis de açúcar e dos resíduos aromáticos. No sítio ativo das glicosil hidrolases, os subsítios são nomeados como (+1), (+2), na direção da extremidade redutora (aglicona), (-1), (-2), na direção da extremidade não redutora (glicona), com a hidrólise da ligação glicosídica ocorrendo entre os sítios (-1) e (+1) (Paës; Berrin; Beaugrand, 2012). A estrutura da xilanase de *T. lanuginosus* foi resolvida (PDB YNA) com a presença de monômeros do substrato xiloheptaose ocupando o sítio ativo. Este substrato interage com a enzima por meio de interações do tipo ligações de hidrogênio entre os resíduos E86 e E178 e a ligação glicosídica nos subsítios -1 e +1, entre grupos hidroxil do substrato e resíduos de tirosina presentes na fenda catalítica (Y77, Y88 e Y172). Além disso, interação de empilhamento foi observada entre o anel de xilose do substrato e o resíduo de triptofano (W18) no subsítio -2 do sítio catalítico (Figura 14) (Gruber et al., 1998).

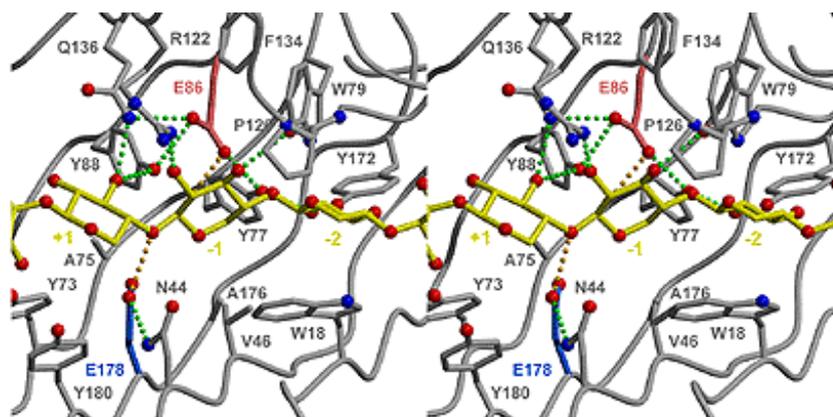


Figura 14. Estrutura tridimensional do complexo substrato/sítio ativo da xilanase termofílica de *T. lanuginosus* (PDB 1YNA) e as interações dos resíduos de aminoácidos da fenda catalítica e os monômeros de xilose. Os três monômeros centrais do substrato xiloheptaose (subsítios +1, -1 e -2) são mostrados em amarelo. As interações dos resíduos catalíticos com o substrato são indicadas com pequenas esferas vermelhas (adaptado Gruber et al., 1998).

Os resultados experimentais indicam que a maioria das xilanases GH11 possui 5 subsítios de (-2) a (+3) onde os subsítios não redutores são cruciais para a orientação correta e ligação do substrato. Uma consequência da presença desses sítios é que a afinidade das xilanases GH11 por xilo-oligossacarídeos tende a aumentar quanto maior for o número de unidades de xilose na cadeia. Mutações nos resíduos do subsítio (+3) da xilanase de *Bacillus subtilis* comprometem a especificidade ao substrato e a atividade enzimática (Paës; Berrin; Beaugrand, 2012).

2.4 Efeito de inibidores de enzimas hidrolíticas derivados da biomassa

A hidrólise enzimática da biomassa vegetal de plantas tem emergido como uma tecnologia relevante para obtenção de monômeros de açúcares. Um dos gargalos desse processo é o pré-tratamento dessa biomassa, necessário para se garantir o maior acesso das enzimas às fibras de celulose e hemicelulose. Esta etapa tem custos elevados, dificultando os processos industriais (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Os processos de pré-tratamento permitem a solubilização parcial da lignina, levando ao aumento da acessibilidade das enzimas à celulose e hemicelulose expostas, melhorando o rendimento destas enzimas. Em contrapartida, a liberação de compostos inibidores das enzimas durante esse processo pode ter efeitos negativos na ação de complexos enzimáticos. Os inibidores gerados podem ser divididos em dois grupos que

atuam diretamente nas enzimas, que são os açúcares solúveis e os compostos fenólicos provenientes da lignina (Mansfield & Mooney, 1999; Zhang & Lynd, 2004).

Os intermediários e produtos finais solúveis provenientes da hidrólise da celulose, tais como açúcares monoméricos e celobiose, são considerados como principais inibidores da atividade enzimática de celulasas (Gong et al., 1977; Hong et al., 1981). Diversos trabalhos têm relatado que a formação e o acúmulo de alguns destes produtos, incluindo, glicose, celobiose, celotriose e celotetraose, apresentaram efeitos inibitórios ou desativadores destas enzimas durante a hidrólise (Dekker, 1986; Gruno et al., 2004). Em outros estudos também foi demonstrado que produtos hemicelulósicos, como xilose, xilana e xiloligossacarídeos, podem inibir a hidrólise enzimática da celulose. Esses subprodutos ocupam sítios de ligação à celulose, levando à desativação da enzima (Quing et al., 2010; Ximenes et al., 2010; Cao et al., 2013).

Os compostos fenólicos, conhecidos como polifenóis, são metabolitos secundários encontrados em plantas e atuam como um meio de defesa contra herbívoros, como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes e também como antioxidantes (Martins et al., 2016). Esses compostos apresentam modelo estrutural composto por um grupo fenol, podendo estar associado a ele um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, apresentando uma ampla variedade estrutural. De acordo com a estrutura química, estes compostos podem ser classificados em flavonoides e ácidos fenólicos. Estes são constituídos pelo ácido hidroxibenzóico, ácido hidroxicinâmico e seus derivados (Figura 15) (Liu et al., 2015; Silva et al., 2016).

Os derivados que se destacam no grupo do ácido hidroxibenzóico são os ácidos vanílico, siríngico, salicílico, p-hidroxibenzóico e gálico. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico e sináptico, derivados do ácido cinâmico, são os mais encontrados na natureza (Heleno et al., 2015).

O ácido ferúlico, de fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, pertence a família dos ácidos hidroxicinâmicos. Isolado pela primeira vez da planta *Ferula foetida*, o ácido ferúlico apresenta uma cadeia lateral não saturada e aparece nas formas isoméricas cis e trans, devido à ligação dupla presente na cadeia lateral que é submetida à isomerização cis-trans e o grupamento fenoxi estabilizado por ressonância é responsável por sua efetiva atividade antioxidante (Hlasiwetz; Barth, 1866). A síntese de ácido ferúlico nas plantas ocorre pela via metabólica do ácido shikímico, iniciando com aminoácidos aromáticos, L-fenilalanina e L-tirosina como precursores (Graf, 1992).

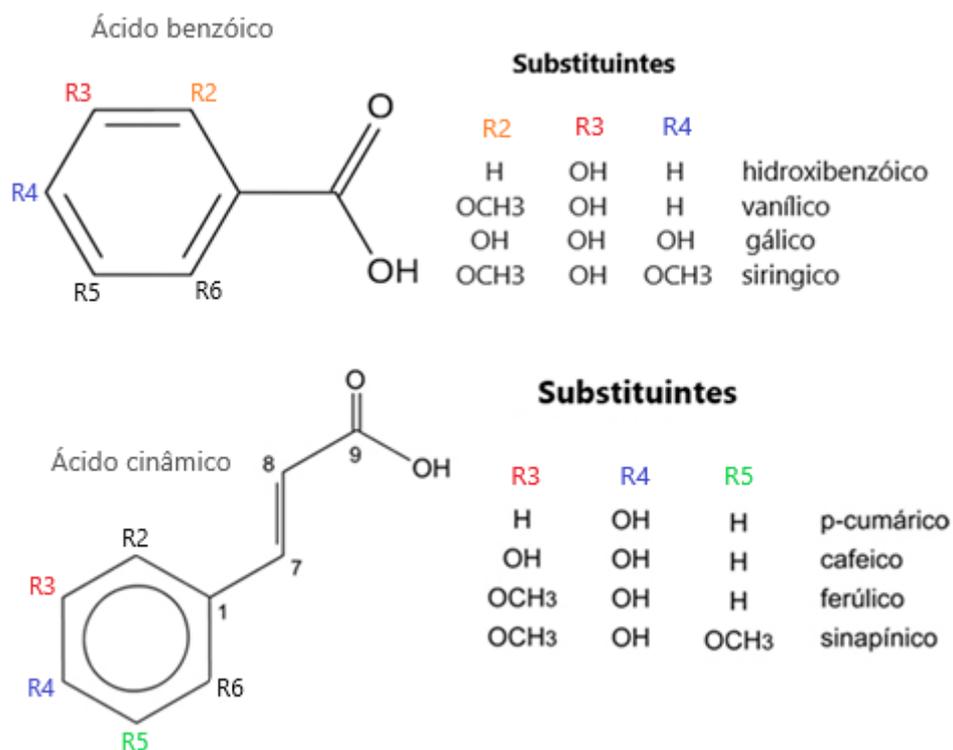


Figura 15. Modelo estrutural do ácido benzóico e do ácido cinâmico e seus derivados (Fonte: de autoria própria).

Os taninos pertencem a uma classe de flavonoides e possuem um grupo poliol central (em sua maioria é β -D-glicose, ou ácido quínico, dentre outros fenóis e outros glicosídicos), e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (Khanbabaee & Ree, 2001). O ácido tânico é um composto desse grupo e apresenta característica de se associar a proteína formando complexos, que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os complexos reversíveis formam ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, atuando como forças de atração inicial na complexação em meio aquoso entre taninos e proteínas. Os complexos irreversíveis são formados por ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, dentre eles grupo sulfídrico da cisteína e ϵ -amino da lisina (Deshpande et al., 1986; Naczki et al., 1994; Sgarbieri, 1996).

Estudos recentes relatam o efeito de compostos fenólicos derivados de lignina em xilanases fúngicas, inibindo e/ou desativando essas enzimas. O efeito de inibição enzimática é definido como a atividade medida imediatamente após a incubação das enzimas com os compostos fenólicos, enquanto que o efeito de desativação é relativo à atividade medida após um tempo de incubação previamente estabelecido dos compostos com a enzima (Ximenes et al., 2011). Outro aspecto interessante descrito nestes trabalhos é o efeito ativador de alguns destes compostos considerados inibidores, como

o ácido ferúlico, que aumenta a atividade enzimática de xilanases (Moreira et al., 2013; Monclaro et al., 2016; Monclaro et al., 2019; Ullah et al., 2019).

O mecanismo molecular de inibição e ativação de enzimas por compostos fenólicos ainda não foi completamente elucidado. Portanto, estudos que visam identificar as interações desses compostos com proteínas, bem como a determinação de parâmetros termodinâmicos que caracterizam a cinética e estrutura dos complexos, são fundamentais para o estabelecimento de condições que visam melhor eficiência das enzimas na presença desses compostos.

2.5 Aplicações biotecnológicas de endoxilanases

O domínio do uso de enzimas é fundamental para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de forma sustentável, em conformidade com as necessidades tecnológicas de mercado e de preservação ambiental. As enzimas que degradam carboidratos compreendem 40% do mercado de enzimas (*Enzymes Market*), dentre elas as que mais se destacam são as hemicelulases.

As endoxilanases são as principais hemicelulases comercializadas e podem ser aplicadas em vários setores industriais como: indústria têxtil, indústria de papel e celulose, indústria alimentícia, indústria farmacêutica (na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos para uso como agentes antimicrobianos (Ryttersgaard et al., 2002) ou antioxidantes (Katapodis et al., 2003)), no enriquecimento de ração animal e produção de biocombustíveis a partir de resíduos agrícolas (Gírio et al., 2010; Kumar & Shukla, 2016). Todas essas aplicações têm como característica principal a utilização das endoxilanases para a degradação de componentes da parede celular que dificultam algumas etapas do processo de produção de diversos produtos. Ainda que menos descritas, estas enzimas podem ser utilizadas na fermentação da cerveja (Tikhomirov et al., 2003) na extração e na preparação de café solúvel (Wong et al., 1988) e na produção de detergentes (Kamal et al., 2004).

Na produção de cerveja, sabe-se que a arabinoxilana, presente em cereais como a cevada, torna a solução viscosa por ser parcialmente solúvel, dificultando o processo de filtração e conseqüentemente escurecendo a cerveja. Ao utilizar as endoxilanases no pré-tratamento da arabinoxilana contidas no substrato, a solução fica menos viscosa, facilitando a etapa de filtração e contribuindo para a clarificação do produto (Van der Broeck et al., 1990; Subramaniyan & Prema, 2002). A etapa de clarificação também

ocorre na produção de sucos e vinhos, devido à presença de pectina, hemicelulose, amido e lignina nas frutas, que dificultam o processo de filtração aumentando a turbidez e a viscosidade. Nesta etapa pectinases, celulases e endoxilanases são utilizadas em conjunto para a degradação de polissacarídeos da parede celular, facilitando a clarificação e o processo de filtração (Biely, 1985; Wong et al., 1988; Nagar, Mittal, Gupta, 2012; Kumar et al., 2014).

Ainda neste contexto de degradação da parede celular, as endoxilanases podem ser empregadas na indústria têxtil nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal, e também no refinamento de polpas na produção de tecidos como a viscose “rayon”. Nestas etapas, estas enzimas facilitam a separação das fibras de celulose da matriz celular e a remoção de lignina (Milagres & Prade, 1994). Já na indústria alimentícia, a utilização de endoxilanases no preparo do pão foi avaliada, onde a clivagem da arabinoxilana presente na farinha de trigo por esta enzima aumenta a redistribuição de água e o volume deste produto, tornando a massa mais macia (Polizeli et al., 2005; Butt et al., 2008; Xue et al., 2019).

A produção de xilooligossacarídeos (XOS), a partir da hidrólise da hemicelulose por endoxilanases, tem se destacado, por apresentarem propriedades funcionais de interesse, tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia. Estas moléculas são oligômeros compostos de duas a seis unidades de xilose, que tem como função mais importante, o seu potencial efeito prebiótico, auxiliando na função intestinal, absorção de cálcio, metabolismo de lipídeos e minimizando doenças crônicas como diabetes e doenças cardiovasculares (Yang et al., 2011; Samanta et al., 2015). Estudos que identificam efeitos imunestimulantes, propriedades antioxidantes, antialérgicas, anti-infecciosas e anti-inflamatórias dos XOS foram reportados (Chung et al., 2007; Prashanth et al., 2007; Bruzzese et al., 2009; Candela et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Meyer et al., 2015).

Uma das principais aplicações das endoxilanases está na indústria de polpa de celulose e de papel. Nestes processos, o branqueamento desta biomassa ocorre em temperaturas elevadas (55 a 70 °C) e em pH alcalino e requerem enzimas termoestáveis e eficientes nestas condições (Viikari, 1994; Beg et al., 2001). A hemicelulose residual presente na polpa de celulose é considerada impureza pois dificulta a filtração no processo de produção da fibra, altera as propriedades dos produtos finais, como a força da fibra, além de aumentar o uso de compostos químicos no processo de branqueamento (Ibarra et al., 2010; Li et al., 2015).

As enzimas xilanolíticas também podem ser empregadas na sacarificação da hemicelulose para otimizar a utilização da biomassa vegetal, particularmente de resíduos agroindustriais. Resíduos lignocelulósicos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, bagaço de laranja, palha de cereal e serragem são utilizados para a sacarificação e fermentação industrial. Para a agroindústria é de interesse o aumento do valor nutricional desses resíduos quando utilizados como ração animal. A ação das enzimas xilanolíticas sobre a xilana, presente em extratos de celulose de ração de animais ruminantes, favorece a acessibilidade desta celulose e aumenta o valor nutritivo deste produto (Dekker & Richards, 1976; Wong et al., 1988; Dhiman, Sharma, Battan, 2008; Dillon et al., 2015). Além disso, o hidrolisado obtido pode ser fermentado por leveduras e utilizado na obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como xilitol e bioetanol. Outros produtos podem ser obtidos pela fermentação do hidrolisado hemicelulósico, como o 2,3-butanodiol, o qual é utilizado como solvente, combustível e como precursor de vários polímeros e resinas sintéticas, bem como o ácido lático, utilizado pelas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos (Saha, 2003).

2.6 Aplicação biotecnológica da HXYN2

O pré-tratamento da polpa de celulose, na produção de papel, consiste na extração da lignina por métodos químicos convencionais. O uso das endoxilanas, livres de celulasas, reduz em até 34% a quantidade de cloro utilizada nestes processos (Paice et al., 1988; Viikari, 1991; Nogueira et al., 2009; Beltramino et al., 2015), minimizando o impacto ambiental dos resíduos químicos gerados pelas indústrias papeleiras (Subramaniyan & Prema, 2002).

A HXYN2 recombinante secretada pela levedura *P. pastoris* foi empregada com sucesso em ensaios de biobranqueamento de polpa Organosolv para produção de papel. Neste trabalho, a endoxilase HXYN2 foi comparada a xilanase comercial (Novozymes) reduzindo a viscosidade da polpa, favorecendo o branqueamento de forma mais eficiente que a xilanase comercial (Moriya et al., 2005).

Adicionalmente, para o tratamento da biomassa vegetal com enzimas hemicelulolíticas, é necessário o uso sinérgico destas enzimas, visando a degradação da fração de xilana em xilose de forma eficiente nos diversos processos industriais de interesse econômico. Neste sentido, Cintra e colaboradores (2017) avaliaram a ação sinérgica entre duas enzimas do sistema xilanolítico: uma β -xilosidase (HXYLA) e a

endoxilânase HXYN2 isoladas do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e expressas pela levedura *P. pastoris*, na hidrólise de xilanas comerciais (*beechwood* e *oat spelt*). No trabalho, foi observado que a hidrólise sequencial utilizando primeiramente a HXYN2, seguida da HXYLA, promoveu maior liberação de açúcar redutor, do que quando foram utilizadas isoladas e na hidrólise simultânea. Este resultado mostra a importância da utilização de um coquetel enzimático para maior eficiência de degradação da hemicelulose. Adicionalmente, a enzima HXYN2, objeto de estudo desta tese, foi de fundamental importância para a ação da β -xilosidase, considerando-se que esta foi capaz de liberar xiloligossacarídeos, que são os substratos para a HXYLA atuar com maior eficácia na liberação de xilose.

A aplicabilidade destas enzimas, HXYN2 e HXYLA, juntamente com ABF3 (arabinofuranosidase) na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor também foi explorada. A suplementação de Accellerase 1500 com as hemicelulases aumentou o rendimento de glicose da hidrólise em 14,6%, quando comparado ao rendimento da hidrólise somente com o coquetel de hemicelulases recombinantes. No entanto, quando o coquetel contendo ABF3, HXYN2 e HXYLA foi adicionado antes da hidrólise com Accellerase 1500, houve aumento de 50% na liberação de glicose em relação à hidrólise apenas com as celulases comerciais. Este resultado demonstra a importância do uso de hemicelulases em sinergia com celulases para melhorar os rendimentos de açúcares fermentescíveis em processos de conversão de biomassa (Cintra et al., 2020). A eficiência catalítica destas enzimas na hidrólise de um substrato *in natura* (bagaço de cana pré-tratado) ilustra a versatilidade das mesmas na aplicação em diversos processos industriais. Portanto, estes dados demonstram a necessidade do desenvolvimento de estudos que explorem a relação entre quantidade ideal de enzima e a eficiência hidrolítica máxima destas moléculas, para que haja economia e alto rendimento nestes processos.

3. JUSTIFICATIVA

Aproximadamente 200 milhões de toneladas de biomassa vegetal são produzidas mundialmente, constituindo uma das principais fontes de carboidratos, potencialmente utilizadas como matérias-primas renováveis de alto valor biotecnológico. O Brasil apresenta uma diversidade de fontes renováveis abundante por ser um país agroindustrial. Conseqüentemente, resíduos nocivos ao meio ambiente são correntemente acumulados, especialmente bagaço de cana, palha de cana, fibra de coco, sabugo de milho, grãos, resíduos de café como casca, palha de arroz, farelo de soja e trigo, os quais apresentam alto teor de celulose, hemicelulose e lignina. Aplicações industriais envolvendo as celulasas e hemicelulasas para a desconstrução da biomassa celulósica e lignocelulósica representa estratégia de desenvolvimento industrial sustentável e de preservação do meio ambiente.

As principais hemicelulasas comercializadas são as endoxilanasas por serem aplicadas em vários setores industriais como: indústria têxtil, indústria de papel e celulose, indústria alimentícia, indústria farmacêutica, no enriquecimento de ração animal e na produção de biocombustíveis a partir de resíduos agrícolas. Todas essas aplicações têm como característica principal a utilização das endoxilanasas para a degradação de componentes da parede celular que dificultam algumas etapas do processo de produção de diversos produtos.

Estes processos industriais têm sido fomentados e otimizados por meio da prospecção *in silico* de sequências genômicas de várias espécies microbianas, com a finalidade de identificar genes e/ou enzimas para posteriores aplicações biotecnológicas. O baixo custo de sequenciamento favorece a geração de informações fundamentais sobre genomas completos de bactérias, fungos e arqueias, levando a um crescimento exponencial na identificação de genes de enzimas ativas em carboidratos complexos (CAZymes). No entanto, o conhecimento funcional e estrutural destas enzimas não acompanhou esse crescimento, apresentando uma lacuna cada vez mais crescente entre o número de sequências e o número de CAZymes caracterizados bioquimicamente ou estruturalmente (Lombard et al., 2014; Drula et al., 2022).

Portanto, a literatura científica carece de informações de características físico-químicas e estruturais sobre as enzimas do fungo *H. grisea* envolvidas na hidrólise da lignocelulose. O estudo proposto permitirá a avaliação da relação estrutura e função desta enzima, com base nos parâmetros cinéticos, físico-químicos e estruturais, bem

como a estabilidade estrutural, a ser investigada por métodos espectroscópicos, e a determinação da estrutura tridimensional por cristalografia de proteínas e difração de raios-X. Estes dados serão de fundamental importância para a proposição de ensaios racionais visando o potencial biotecnológico, com base nas características do meio onde a enzima endoxilânase de *H. grisea* poderá apresentar maior estabilidade estrutural e função.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Caracterização bioquímica, físico-química e estrutural da endoxilanase de *H. grisea* var. *thermoidea* HXYN2 produzida pela levedura *P. pastoris*.

4.2 Objetivos específicos

- Otimizar a expressão e a purificação da HXYN2 visando alto rendimento;
- Caracterizar a enzima purificada quanto aos parâmetros cinéticos, temperatura ótima, pH ótimo e influência de compostos fenólicos na atividade enzimática, utilizando o substrato xilana *beechwood*, bem como realizar a caracterização estrutural em condições controladas de pH, temperatura e compostos fenólicos e determinação da estrutura tridimensional, conforme as metas descritas abaixo:
 1. Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação da enzima com o substrato, por espectrofotometria e microcalorimetria de titulação isotérmica;
 2. Analisar o processo de oligomerização e de autoassociação por ultracentrifugação analítica.
 3. Analisar o padrão de dobramento estrutural e conteúdo das estruturas secundárias por dicróismo circular.
 4. Avaliar o efeito do pH e temperatura na estabilidade e na estrutura secundária da proteína por dicróismo circular e fluorescência.
 5. Avaliar o efeito ativador ou inibidor de compostos fenólicos na atividade e na estrutura, por espectroscopia de fluorescência e dicróismo circular.
 6. Comparar e analisar os modelos 3D obtidos com aqueles depositados em bancos de dados de estrutura.
 7. Obter e analisar o complexo HXYN2:Ácido ferúlico, obtido por homologia, utilizando *docking* molecular.
 8. Cristalizar a proteína em sistema robotizado.
 9. Avaliar os cristais obtidos, refinar as condições de cristalização e coletar dados de difração de raios-X.
 10. Resolver a estrutura tridimensional por substituição molecular.

5. METODOLOGIA

O transformante de *P. pastoris* expressando a endoxilânase HXYN2 foi cedido pela prof Fabrícia Paula de Faria, co-orientadora nesta tese, e colaboradores do Laboratório de Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Goiás para o desenvolvimento deste estudo. Em resumo, o cDNA do gene *xyn2* foi obtido a partir de RNA total do fungo *H. grisea* var. *thermoidea* cultivado em 1,0% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar. A clonagem do gene foi realizada usando o vetor pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI, EUA). O cDNA foi inserido no vetor pHIL-D2 (Invitrogen) (Figura 16 A) e a linhagem GS115 de *P. pastoris* foi transformada com o vetor pHILD2-xyn2 linearizado (Figura 16 B) por eletroporação, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) (Carvalho, 2008).

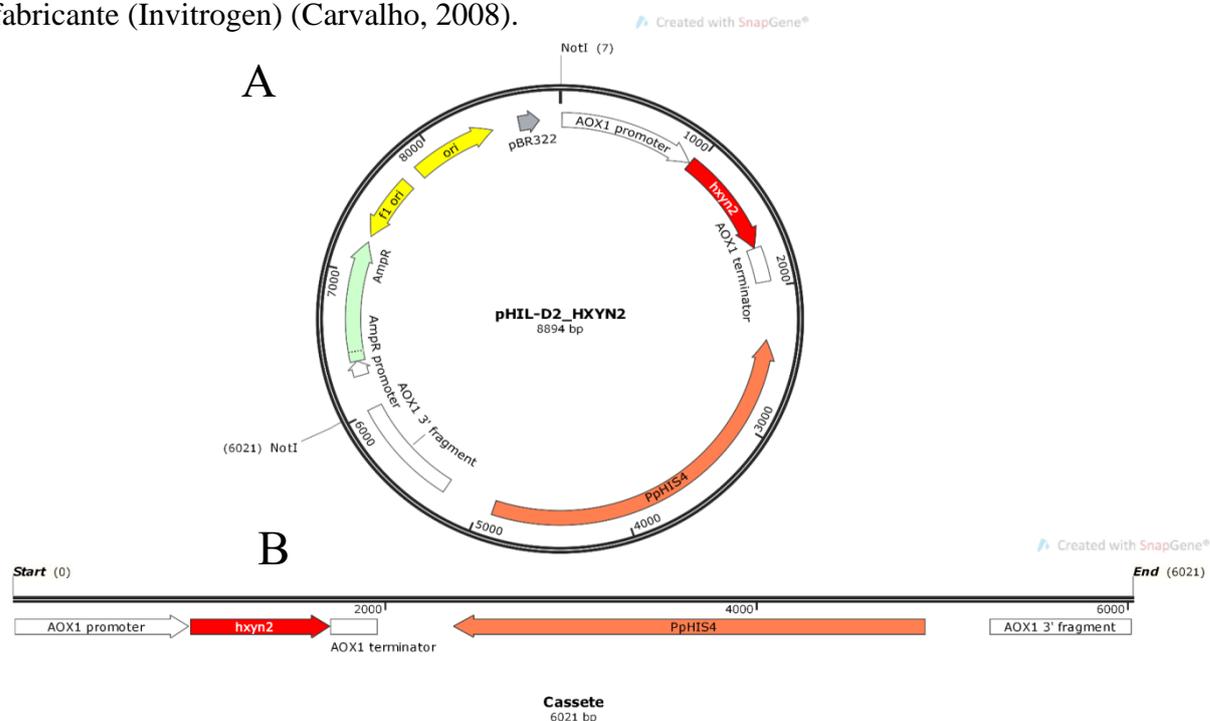


Figura 16. Construção do vetor de expressão pHIL-D2 contendo o gene da HXYN2. A) Plasmídeo pHIL-D2_HXYN2 e B) Cassete de expressão. (Fonte: próprio autor)

Nesta seção, os métodos descritos nos itens 5.1 ao 5.10 estão descritos no artigo Oliveira et al 2022.

5.1 Produção de HXYN2 em frasco

A produção de HXYN2 descrita por Carvalho et al. (2008) foi realizada seguindo as instruções fornecidas pelo kit de expressão *Pichia* (Invitrogen - Catalog Number K1710-01), utilizando o meio BMMY-U otimizado, alterando a concentração

de metanol e a fonte de nitrogênio (1,0% metanol e 2,34% de uréia como fonte de nitrogênio). No presente trabalho, foi utilizado o meio BSM (Basal Salt Medium) (Zhang, 2007) para a produção da HXYN2. Uma alíquota da solução estoque do transformante em glicerol, que expressa a enzima HXYN2, foi pré-inoculada em 200 mL de meio YPD e incubada em shaker a 28 °C com agitação constante de 200 rpm por 24 h até atingir o valor de DO_{600} de 20. O volume de um mL desta suspensão foi inoculada em frasco de 1000 mL, contendo 100 mL de meio BSM otimizado com glicerol (Anexo A), em shaker a 28 °C com agitação constante de 200 rpm por 24 h. O pré-inóculo obtido em meio BSM com glicerol foi centrifugado a 4.000 x g por 10 min a 25 °C. As células obtidas foram inoculadas em 100 mL de meio BSM (Basal Salt Medium) (Zhang, 2007) otimizado com metanol 0,5 % (Anexo A), resultando em DO_{600} final de 5, em shaker a 28 °C com agitação constante de 200 rpm por 16 h. Após esse período, a suplementação com metanol foi realizada baseando-se na medida de DO_{600} seguindo os seguintes critérios: DO_{600} entre 0,5 e 10, suplementar com 0,5% de metanol a cada 12 h; DO_{600} entre 10 e 20, suplementar com 0,5% de metanol a cada 6 h e DO_{600} maior que 20, suplementar com 1% de metanol a cada 6 h. Após 60 h, o cultivo foi centrifugado (4.000 x g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante utilizado como fonte da xilanase HXYN2.

5.2 Purificação da HXYN2 por cromatografia de exclusão molecular

A purificação da enzima HXYN2 foi realizada por cromatografia de exclusão molecular. Inicialmente, 800 mL de sobrenadante foram dialisados em água três vezes a 25 °C e concentrado aproximadamente 40 vezes por ultrafiltração, utilizando o sistema *Amicon* de 500 mL contendo membrana de polietersulfona de 5 kDa de *cut-off*. Após a diálise, o sobrenadante concentrado (20 mL) foi equilibrado em tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0 e NaCl 0,15 M. Em seguida, 5 mL desta amostra foi injetada na coluna Superdex S75 Hiloal 16/600 pré-equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0 e NaCl 0,15 M, acoplada a um FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare), com um fluxo de 1 mL/min. As frações apresentando absorvância a 280 nm foram coletadas (10 mL) e analisadas qualitativamente quanto ao grau de pureza em gel SDS-PAGE 12% (Anexo D). Os géis foram corados com solução de comassie (Laemmli, 1970) e nitrato de prata (Nesterenko, 1994). Concomitantemente, foi realizado o teste de atividade de xilanase

para cada uma das frações proteicas coletadas (item 5.4). Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

5.3 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi avaliada pelo método do ácido bicinconínico (BCA *Protein Assay Kit*), conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific®). O reagente foi preparado misturando-se 1 parte do reagente B (cobre) a 50 partes do reagente A (BCA). Para elaboração da curva padrão foi utilizada a solução estoque de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 2 mg/mL, a qual foi diluída para concentrações que variaram de 0,025 a 1,5 mg/mL. Em uma microplaca, misturou-se 25 µL de amostra e 200 µL do reagente acima mencionado. A microplaca foi incubada por 2 horas a 25 °C e, em seguida, realizada leitura da absorbância a 562 nm em leitor de placas SpectraMax (Molecular Devices, San José, CA, USA). A concentração das amostras foi estimada utilizando-se a curva padrão de BSA.

5.4 Determinação da atividade xilanolítica

A dosagem da atividade de endoxilanase foi realizada pelo método de DNS (Miller, 1959), em micro ensaio utilizando placa de 96 poços. O substrato utilizado foi a xilana *beechwood* (Sigma®) 5% preparada em água e diluída para a concentração final de 1% em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8. A curva padrão foi obtida a partir de uma solução estoque de xilose 10 mg/mL, realizando diluições em triplicata, nas concentrações de 1 a 10 mg/mL. Para o ensaio, 100 µL de solução de xilose e 150 µL de DNS foram misturados e incubados a 100 °C durante 5 min. Em seguida, a reação foi interrompida por incubação a 4 °C. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de placa (SpectraMax® M3) a 540 nm, utilizando 100 µL da mistura reacional, e os valores obtidos foram ajustados por método linear utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

Os ensaios foram realizados em triplicata, adicionando 90 µL da solução de xilana 1% e 10 µL do extrato enzimático e incubou-se a mistura a 50 °C durante 5 min. Como controle, foram feitos o branco da enzima e o branco do substrato. No branco da enzima foi adicionado 90 µL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 e 10 µL do extrato enzimático. No branco do substrato, adicionou-se 90 µL da solução de xilana

1% e 10 μL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 (Anexo B). A reação foi interrompida por choque térmico a 4 °C por 5 min. Em seguida foram adicionados 150 μL de DNS e as amostras incubadas a 100 °C por 5 min. A reação foi interrompida a 4 °C e realizada a leitura em 540 nm em leitor de placa (SpectraMax[®] M3). As absorvâncias a 540 nm foram convertidas em unidade enzimática internacional (UI), onde 1 UI corresponde a 1 μmol de açúcar redutor liberado por minuto, e normalizadas em UI por mL.

5.5 Determinação do coeficiente de extinção molar

O coeficiente de extinção molar (absortividade molar) experimental da proteína HXYN2 ($\epsilon_{280\text{nm}}\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$) foi determinado considerando-se valores de absorvância a 280 nm, de acordo com a variação da concentração da proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) determinada pelo método de Lowry (Lowry, 1951). Cinco diluições da proteína HXYN2, variando a absorvância a 280 nm entre 0,4 e 2,0, foram consideradas. Os ensaios foram realizados em tubos de 1,5 mL em triplicata, adicionando 120 μL das diluições em 80 μL de NaOH 1 M. A mistura foi agitada por 30 s e em seguida foram acrescentados 800 μL do reativo A (Anexo C) e 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu's (Merck, Darmstadt, Germany) diluído 1:2 v/v. Os tubos foram incubados por 30 min a 25 °C e a leitura da absorvância em 620 nm em leitor de placa (SpectraMax[®] M3) foi realizada, utilizando 100 μL da mistura reacional. Os valores de absorvância foram convertidos em concentração, utilizando o coeficiente de extinção molar da proteína albumina de soro bovino (BSA) obtido pela curva de calibração. A partir dos dados de absorvância a 280 nm das amostras diluídas e da concentração de cada uma delas foi construído um gráfico e a equação da reta foi obtida pelo ajuste linear utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA). O valor da inclinação da reta corresponde ao coeficiente de extinção molar experimental da proteína HXYN2, com base no método de Lowry.

O método Lowry foi ajustado usando a proteína BSA na concentração estoque de 2 mg/mL, a partir da qual diluições, em triplicatas, nas concentrações de 1 a 1,5 mg/mL foram realizadas, nas mesmas condições do ensaio anterior. Os valores obtidos foram analisados em um gráfico (absorvância x concentração de BSA) e a equação da reta foi obtida pelo ajuste linear utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA), onde o valor da inclinação da reta corresponde ao coeficiente de extinção

molar da proteína BSA pelo método de Lowry. Este valor foi utilizado para o cálculo da concentração das amostras diluídas da proteína HXYN2.

5.6 Modelagem e *docking* da estrutura HXYN2

A estrutura de HXYN2 foi modelada por homologia usando o algoritmo trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta>) (Yang et al., 2020). Cinco modelos foram construídos com base em modelos homólogos e otimizados por minimizações de energia, distância e restrições de orientação previstas por uma rede. Os alinhamentos múltiplos entre HXYN2 e *templates* foram realizados usando o programa MEGAv7 (Tamura et al., 2011). As sequências de aminoácidos das xilanases *templates* foram obtidas dos bancos de dados de proteínas não redundantes, usando o servidor NCBI BLAST, BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA e foram alinhadas com a sequência da HXYN2 usando o programa MEGAv7 (Tamura et al., 2011). Os modelos das xilanases *templates* foram obtidos do PDB (<https://www.rcsb.org/structure>) com os identificadores: 3WP3_A de XylC de *Talaromyces cellulolyticus*; 2VGD_A de NpXyn11A de *Neocallimastix patriciarum*; 2VUJ_A de EvXyn11 de *Escherichia coli*; 5HXV_E de XylC de *Talaromyces cellulolyticus*; 2DCJ_B de XynJ de *Bacillus* sp. 41M-1.

O desvio quadrático médio (*root-mean-square deviation - rmsd*) dos valores das posições atômicas entre modelos e *templates* foi calculado usando o programa PyMol *Molecular Graphics System* (<http://www.pymol.org>). As figuras contendo as estruturas foram feitas com o mesmo programa. As semelhanças estruturais da proteína foram calculadas usando o parâmetro TM-score (<https://zhanggroup.org/TM-score/>). As interações nos complexos foram calculadas usando o programa LIGPLOT+ v.2.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/references.html>) (Wallace, Laskowski & Thornton, 1995). O *docking* molecular entre o modelo N° 1 de HXYN2 e ácido ferúlico (PDB: 3NX2) (Gu et al., 2011) foi realizado usando o método automático CB-Dock com o programa AutoDock Vina (<http://cao.labshare.cn/cb-dock/>) (Cao & Li, 2014; Liu et al., 2020).

5.7 Caracterização enzimática da HXYN2

5.7.1 Efeito da concentração da enzima HXYN2 na reação enzimática

A determinação do efeito da concentração de enzima HXYN2 na presença do substrato xilana *beechwood* foi realizada em tubos de 200 μL , em triplicatas. As concentrações enzimáticas testadas foram de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 nM. A quantificação proteica foi realizada utilizando coeficiente de extinção molar experimental $\epsilon_{280\text{nm}} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ determinado conforme o item 5.3. O ensaio enzimático foi realizado como mostrado no item 5.4, no qual a etapa de incubação da enzima e do substrato foi realizada nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 segundos. Após 5 min. com DNS a 100 °C a reação foi interrompida com resfriamento a 4 °C.

A leitura de absorbância em leitor de placa (SpectraMax[®] M3) a 540 nm foi realizada utilizando 100 μL da mistura reacional. Os valores obtidos foram analisados em um gráfico (absorbância x tempo), para cada unicata, onde a equação da reta foi obtida pelo ajuste linear utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA) para cada uma delas. O valor da velocidade inicial (V_0) das reações corresponde à inclinação da reta ajustada. Posteriormente, o valor de cada V_0 foi convertido em atividade enzimática e a média e desvio padrão foram calculados. Os dados de V_0 e as concentrações enzimáticas foram analisados em um gráfico utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

5.7.2 Efeito do pH na atividade da enzima HXYN2

Com a finalidade de determinar as melhores condições de reação da enzima, foi avaliada a influência do pH na atividade enzimática da HXYN2. Para isso, a enzima purificada (400 nM) foi incubada com o substrato xilana *beechwood* (Sigma) 1% em tampões de diferentes pH de 2 a 12. Estes foram obtidos pela mistura das soluções em iguais proporções contendo glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) 20 mM, ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 20 mM, fosfato de sódio monossódico (NaH_2PO_4) 20 mM ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) 3 M, resultando no tampão Glicina-Citrato-Fosfato (GCF) 20 mM. A reação enzimática foi realizada conforme descrito no item 5.4 e a atividade relativa foi calculada considerando a maior atividade (UI/mL) como 100%. Todos os experimentos

foram realizados em triplicatas, e os dados obtidos foram tratados e analisados no programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA), bem como, a construção dos gráficos.

5.7.3 Efeito da temperatura na atividade da enzima HXYN2

O experimento de efeito da temperatura na atividade enzimática da HXYN2 foi realizado em tubos de 200 µL incubados nas temperaturas de 20 °C, 30 °C a 75 °C (com variação de 5 °C), 80 °C e 90 °C. Antes de realizar o ensaio enzimático, a enzima (400 nM) foi pré-incubada nas diferentes temperaturas por 10 min. Em seguida a dosagem da atividade da enzima foi determinada como estabelecido no item 5.4. Os ensaios foram realizados em tampão GCF 20 mM no pH ótimo da enzima, determinado conforme descrito no item 5.7.2. A atividade relativa foi calculada considerando a maior atividade como 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e os dados foram analisados no Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

5.7.4 Determinação da estabilidade da enzima HXYN2 em diferentes temperaturas

A estabilidade térmica foi investigada por meio da determinação de atividade enzimática relativa após pré-incubação a 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C, sem substrato. Os ensaios da atividade enzimática foram realizados em triplicatas, com alíquotas coletadas após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min de incubação, em pH 6,0, 50 °C, 5 min. A atividade relativa foi calculada considerando a maior atividade como 100%. Os dados foram analisados utilizando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

Para o cálculo dos parâmetros de estabilidade térmica, constante de desativação (kd) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da HXYN2, foi utilizado o modelo de ajuste linear (Toscano et al., 1994; Zanin & Moraes, 2004), a partir dos dados obtidos experimentalmente em função do tempo, utilizando a equação 1:

$$\ln A_{t0} = \ln A_t - k_d \times t \quad (1)$$

em que: A_{t0} é a atividade enzimática do estado inicial (U/mL), A_t é a atividade enzimática do estado final (U/mL), k_d é a constante de desativação térmica e t é o tempo de incubação da solução enzimática (min).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% na atividade inicial, foi calculado a partir da equação 2, utilizando o parâmetro k_d estimado na equação 1,

$$t_{1/2} = \ln 0,5/(-k_d) \quad (2)$$

em que: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida em min.

5.7.5 Efeito de compostos fenólicos na atividade da enzima HXYN2

Os efeitos dos compostos fenólicos na atividade da HXYN2 foram determinados imediatamente após a adição destes compostos na concentração 1 mg/mL (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido tânico), no tempo de 0 horas (sem incubação), e após a pré-incubação da enzima com esses mesmos compostos por 24 horas a 25 °C, de acordo com o protocolo estabelecido por Moreira e colaboradores (2013). Os controles foram feitos com a pré-incubação da enzima com água milliQ (solvente utilizado para a preparação dos compostos: ácido tânico, vanilina e siringaldeído) ou etanol 95% (solvente utilizado na preparação dos compostos: ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico e ácido 4-hidroxi-benzóico) e submetidos às mesmas condições de ensaio. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, onde a máxima atividade na ausência de compostos fenólicos foi considerada como 100%.

5.7.6 Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima HXYN2

A determinação dos parâmetros cinéticos, K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima HXYN2 foram obtidos por meio da curva Michaelis-Menten, que foi construída utilizando concentrações crescentes de xilana *beechwood* (0,5 a 9,0 mg/mL), com a concentração de enzima em 400 nM, em triplicatas, conforme descrito no tópico 5.4. Para cada concentração de xilana *beechwood*, os ensaios foram realizados nos tempos de 60, 90, 120, 150 e 180 segundos, de forma a obter a velocidade inicial para cada concentração de substrato testada. Nesse experimento os ensaios foram realizados no pH e temperatura ótimas determinados para a enzima.

Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados por meio da relação entre velocidade inicial e concentração do substrato, seguindo a equação de Michaelis-

Menten (equação 3), pelo método de regressão não linear, e por ajuste da curva hiperbólica pelo método de Hill, usando o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA):

$$V = V_{\text{máx}} [S] / K_M + [S] \quad (3)$$

onde [S] é a concentração de substrato em mg/mL, V é a velocidade de reação inicial em $(\mu\text{M}\cdot\text{min})^{-1}$, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade de reação máxima em $(\mu\text{M}\cdot\text{min})^{-1}$, e K_M é a constante de Michaelis-Menten ou a concentração de substrato para qual a enzima atinge metade de $V_{\text{máx}}$.

O k_{cat} em min^{-1} , número de renovação (*turnover number*), foi calculado a partir da equação 4:

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}} / [\text{Et}] \quad (4)$$

onde [Et] é a concentração de enzima inicial em nM.

A eficiência catalítica (EC) foi calculada de acordo com a equação 5:

$$EC = k_{\text{cat}} / K_M \quad (5)$$

Os parâmetros cinéticos (K_M e $V_{\text{máx}}$) foram determinados para HXYN2 na presença de ácido ferúlico nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL, conforme descrito anteriormente.

5.8 Determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação entre HXYN2 e AF por calorimetria de titulação isotérmica (CTI)

A interação da HXYN2 com ácido ferúlico (AF-IUPAC: 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil-prop-2-enóico) foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (CTI) usando o calorímetro MicroCal VP-ITC (GE Healthcare Corporation, Chicago, IL, EUA). Os experimentos foram realizados com 9,6 μM de HXYN2 com tampão na célula e 0,1 mM de AF na seringa. O AF foi preparado em tampão por diluição da solução estoque a 50 mg/mL em etanol 95 %. As medições foram realizadas em uma célula preenchida com 1,44 mL de proteína em tampão glicina-citrato-fosfato 20 mM pH 6,0 a 25 °C (298 °K). A titulação de HXYN2 na célula foi feita sob agitação constante (307 rpm) por meio do agitador-seringa rotativo, com um atraso inicial de 100 s, sendo 29 injeções sucessivas a 0,5 $\mu\text{L/s}$. Foi utilizado um espaçamento inicial de 500 s e uma injeção

inicial de 2 μL . As próximas 12 injeções foram de 5 μL com espaçamento de intervalo de 600 s. As últimas 16 injeções foram de 10 μL com espaçamento de 600 s.

Os experimentos de controle foram realizados injetando AF em tampão glicina-citrato-fosfato 20 mM pH 6,0. O calor liberado após cada injeção foi calculado a partir dos dados brutos por integração dos picos da curva isoterma após a subtração da linha de base. As isotermas de ligação foram ajustadas a diferentes modelos usando o software ORIGIN v7 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) fornecido pela MicroCal.

No modelo sequencial, não há distinção de quais sítios estão saturados, apenas o número total de sítios saturados. O número de sítios sequenciais deve ser exatamente integral (1,2,3,...n), que são selecionados pelo operador. Portanto, o melhor ajuste é determinado por apenas dois parâmetros, constante de ligação (K) e entalpia (H) em cada sítio, uma vez que o número total de sítios tenha sido selecionado. Os valores para a constante de ligação (K_a), entalpia de ligação (ΔH), entropia (ΔS) e o número de moléculas de AF envolvidas na ligação (N) foram obtidos a partir do ajuste. As mudanças na energia livre de Gibbs (ΔG) foram calculadas pela equação 6:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

5.9 Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos da HXYN2 por Ultracentrifugação Analítica

Os experimentos de ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação (UCA-SV) foram realizados a 42.000 rpm em uma ultracentrífuga analítica *ProteomeLab XLA/XL-I* (Beckman Coulter, EUA), equipada com um rotor de titânio An-60 Ti de quatro posições (Beckman, EUA) e um dispositivo de absorção óptica UV visível. O rotor foi equilibrado a 20 °C na câmara de vácuo e foram usadas células de alumínio padrão com uma peça central de duplo canal e janelas de quartzo. Cada conjunto de dados UCA-SV (300 varreduras) consiste na absorção de luz medida a 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) em função da distância radial (20 μm) para o eixo de rotação, e são registrados em intervalos de 5 min para cada leitura da amostra. Os ensaios foram realizados em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. As concentrações da proteína (500 μL) foram 0,1; 0,2 e 0,38 mg/mL. Adicionalmente, foram realizados ensaios em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e Tris HCl 50 mM pH 9,0, na concentração de 0,2 mg/mL de proteína.

O software *SEDENTERP* (<http://bitcwiki.sr.unh.edu/>) foi usado para estimar o volume específico parcial da proteína (v), a densidade (ρ) e a viscosidade (η) da solução. As varreduras radiais coletadas foram analisadas usando o modelo de análise de distribuição contínua do coeficiente de sedimentação ($c_{(s)}$) pelo software *SEDFIT* v14.7. Todos os parâmetros foram permitidos variar livremente. O $c_{(s)}$ foi calculado usando a correção apropriada para a viscosidade e densidade da água a 20 °C ($S_{20,w}$). A distribuição $c_{(s)}$ foi convertida em $c(S_{20,w})$ usando o software *SEDFIT*.

5.10 Caracterização estrutural da HXYN2

5.10.1 Análise do efeito do pH e do ácido ferúlico na estrutura terciária da enzima HXYN2 por espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas na ausência e na presença de AF, utilizando-se um espectrofluorímetro Jasco FP-6500 (Jasco Analytical Instruments, Japão) acoplado com sistema Peltier Jasco ETC-273T (Jasco Analytical Instruments, Japão) para controle de temperatura. As alterações conformacionais de HXYN2 foram analisadas na concentração de proteína de 0,04 mg/mL e AF 23,68 μ M, em tampão acetato de sódio 25 mM para os pH 4,0-6,0, Tris-HCl 25 mM para pH 6,5-9,0 e glicina 25 mM para o pH 9,5.

O monitoramento dos espectros de emissão de fluorescência foi realizado em temperatura de 25 °C, em um intervalo de 300 a 400 nm, utilizando um comprimento de onda de excitação do triptofano de 295 nm. A abertura das fendas de excitação e de emissão foi de 5 e 10 nm, respectivamente. Cinco leituras consecutivas foram registradas e o espectro resultante da média entre os cinco espectros foi considerado e ajustado com a subtração dos valores do espectro do tampão utilizado como branco. Os espectros foram tratados utilizando o programa o Spectra Manager II (Jasco) e Origin8 (Microcal Software Inc., USA).

A formação do complexo entre HXYN2 e AF foi investigada por atenuação de fluorescência em diferentes pH. As medições de emissão de Trp e Trp-Tyr foram realizadas a 25 °C, em triplicata, após excitação a 295 nm e 275 nm, respectivamente. A emissão de fluorescência da proteína foi registrada na faixa de 300 a 450 nm. Cubetas de quartzo com comprimento de caminho de 1 cm foram utilizadas e a largura da fenda de excitação e de emissão foi fixada em 5 nm. Intervalo de dados de 1 nm, ganho

médio, tempo de resposta de 2 s e velocidade de varredura de 50 nm/min foram usados com duas acumulações médias de espectros. A atenuação de fluorescência de Trp da HXYN2 0,43 μ M com solução de AF na faixa de concentração de 0 a 23,68 μ M em etanol 95% e tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 e pH 9,0, foi realizada usando um titulador automático Jasco ATS-443 (Jasco Analytical Instrument, Tóquio, Japão). As emissões de fluorescência atenuadas sob o efeito do ácido ferúlico foram ajustadas de acordo com a equação de Stern-Volmer (equação 7) (Lakowicz, 2006):

$$F_0/F = 1 + Kq * \tau_0(Q) = 1 + K_{SV}(Q) \quad (7)$$

onde F e F0 são as intensidades de fluorescência em 334 nm na presença e ausência de AF, respectivamente, Q é a concentração do supressor e Ksv é a constante de Stern-Volmer, que pode ser escrita como $K_{sv} = Kq \tau_0$, onde Kq é a constante de extinção bimolecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor (τ_0 é cerca de 10^{-8} s).

As constantes de ligação para a interação da HXYN2 com o ácido ferúlico nos três pH foram calculadas de acordo com a equação 8 (duplo logaritmo):

$$\text{Log} [(F_0 - F) / F] = \text{Log}[K_b] + n \text{Log} [Q] \quad (8)$$

onde Kb é a constante de ligação e n é o número de sítios de ligação na HXYN2 (Hu et al., 2004).

5.10.2 Análise da estrutura secundária e termoestabilidade da enzima HXYN2 por Dicroísmo Circular

O conteúdo de estruturas secundárias da proteína HXYN2 foi estimado por Dicroísmo Circular (DC), utilizando-se o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier, conectado a uma bomba de água (Instrumentos analíticos, Japão). Os ensaios foram realizados com a proteína na concentração de 0,15 mg/mL, nos pH 4,0; 6,0; 7,0 e 9,0 nos respectivos tampões: acetato de sódio (pH 4,0 e 6,0), Bis-Tris e Tris-HCl (pH 7,0 e 9,0), todos em concentração final de 5 mM. Os espectros dicroicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimentos de onda distantes da luz UV (190- 260 nm) com intervalos de 0,2 nm, taxa de

escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 4 segundos e largura da banda de 1,7, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II.

Os espectros de DC foram obtidos a partir da média de dez leituras consecutivas e a subtração dos valores do sinal dicróico do espectro do tampão utilizado como branco. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) baseado na massa molecular média calculada por resíduo de 115 Da, segundo a equação 9:

$$[\theta] = 115 \times \alpha / 10 \times C \times l \quad (9)$$

onde, α é o sinal dicróico em mdeg, C é a concentração da amostra ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

Os percentuais do conteúdo de estrutura secundária nos diferentes pH foram estimados a partir dos espectros ajustados utilizando o programa de deconvolução Bestsel (Micsonai et al., 2015; Micsonai et al., 2022).

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados nos pH 4,0; 6,0; 7,0 e 9,0 fixando o comprimento de onda de 218 nm, correspondente à região estruturada da proteína HXYN2 em folhas- β , com a temperatura variando de 25 a 95 °C e coleta de dados a cada 0,2 °C/min. Concomitantemente, espectros de DC na região distante do UV (190-260 nm) foram registrados com intervalos de 10 °C. As curvas de desnaturação térmica foram normalizadas e expressas como fração proteica desdobrada (F_u , sendo u do inglês *unfolded*) de acordo com a equação 10 (Pace et al., 1989):

$$F_u = S_n - \theta \text{ Mrm} / S_n - S_u \quad (10)$$

onde S_n e S_u representam a quantidade de proteína que está presente nos estados nativo e desdobrado, respectivamente e θ o valor do sinal medido.

A temperatura de fusão da proteína (T_m), na qual metade se encontra desenovelada e metade na forma nativa, foi estimada pelo ajuste sigmoideal das curvas de desnaturação utilizando a equação Boltzmann e o programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

O efeito do AF no conteúdo de estrutura secundária de HXYN2 foi investigado por DC. Os ensaios foram realizados com proteína na concentração de 0,15 mg/mL em 5 mM Bis-Tris pH 6,0 e AF na concentração de 60 μM . Uma cubeta de quartzo de 0,05 cm de comprimento de caminho foi usada para registrar os espectros de DC Far-UV na

faixa de 260 a 190 nm a 25°C. Ensaios de termoestabilidade de HXYN2 na presença de AF em pH 6,0 foram realizados, utilizando os mesmos parâmetros descritos acima.

5.11 Cristalização da proteína HXYN2

A proteína HXYN2 purificada foi dialisada em água ultrapura e concentrada a 8,3 mg/mL usando o Amicon com o *cut-off* de 3 kDa (Milipore) para a realização dos ensaios de cristalização. A etapa inicial de triagem das condições de cristalização foi realizada por meio do método de difusão de vapor em gota pendurada (*hanging drop*) (Jancarik & Kim, 1991) em microplacas (12x8cm). Os seguintes kits de cristalização comerciais foram utilizados: Jena Biosciences Screen (JCSG++ e PACT++ 1, 2, 3 e 4), Hampton Research (Crystal Screen HR2-110 e Crystal Screen HR2-112), e Molecular Dimensions (Morpheus MD1-46 Box 1 e Morpheus MD1-46 Box 2), contendo 100 µL de uma combinação de diferentes agentes precipitantes em concentrações variadas, em diferentes pH e com diferentes concentrações de aditivos, totalizando 96 soluções de cristalização para cada kit. O robô de cristalização Labtech's Mosquito® Crystal foi utilizado neste experimento, onde volumes de 100 nL e 200 nL de proteína e das soluções dos kits foram misturados automaticamente, formando gotas com três proporções: 1:2, 1:3 e 2:3, em cada poço da placa contendo uma solução do kit. As placas foram analisadas semanalmente em lupa (modelo SM DIA STAND2 Nikon®) para a verificação do surgimento de cristais.

Após a obtenção de cristais na etapa de triagem, a primeira etapa do refinamento manual foi realizada e os ensaios de cristalização foram feitos por meio do método de difusão de vapor em gota sentada (Jancarik & Kim, 1991), em placas de 24 poços, variando o pH, concentração do agente precipitante e concentração de proteína da seguinte forma:

- Concentração de PEG 6000 – 15%, 18%, 20%, 21%, 24% e 27%
- Concentração de PEG 3350 – 22%, 24%, 26%, 28%, 30% e 32%
- Tampão acetato de sódio – pH 4,5, 4,8, 5,1 e 5,4
- Tampão Bis Tris – pH 5,3, 5,5, 5,7 e 5,9
- Concentração de proteína (em água) – 4 a 7 e 9 mg/mL

O volume total de cada gota foi de 4 μL , sendo 2 μL da solução de proteína e 2 μL de solução de cristalização, na proporção de 1:1. O volume da solução de cristalização utilizado em cada poço foi de 500 μL . As placas foram inspecionadas periodicamente com o auxílio de lupa e microscópio (modelo SM DIA STAND2 Nikon® e LEICA® S8AP0).

Na segunda etapa do refinamento, os ensaios de cristalização foram feitos utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada e gota pendurada (Jancarik & Kim, 1991), em placas de 24 poços e 48 poços, respectivamente, considerando-se diferentes combinações de pH, concentração do agente precipitante, concentração de proteína e de aditivos:

- Concentração de PEG 6000 – 15% e 18%
- Concentração de PEG 3350 – 22% e 28%
- Tampão acetato de sódio – pH 5,4
- Tampão Bis Tris – pH 5,5 e 5,7
- Concentração de proteína (em água; tampão de purificação e tampão de purificação adicionado de 0,2% de glicerol) – 6 e 9 mg/mL
- Aditivo – 10% Dioxane

Adicionalmente, ensaios de cristalização utilizando a técnica de semeadura foram realizados. A semeadura trata-se da adição de pequenos cristais à gota de cristalização. Este procedimento permite obter cristais com menos impurezas, sem passar pela etapa de nucleação, aumentando o tamanho e minimizando a formação de cristais polimórficos (Myerson, 2002), como foi verificado para a HXYN2 em condições anteriores. As condições de agente precipitante, concentração de proteína e tampão foram:

- Concentração de PEG 6000 – 12%, 14%, 15%, 16%, 18% e 20%
- Concentração de PEG 3350 – 16%, 18%, 20%, 22%, 24% e 26%
- Tampão - Acetato de sódio (pH 5,4) e Bis Tris (pH 5,7)
- Concentração de proteína (em água) – 6 mg/mL

5.12 Coleta de dados de difração de raios-X

Os cristais da proteína HXYN2 foram submetidos à difração de raios X na linha Manacá - Micro Macromolecular e Nano Cristalografia - linha de luz de quarta geração do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Sirius) (Campinas - São Paulo) - dedicada à determinação de estruturas de macromoléculas biológicas utilizando cristalografia de raios X. A linha de luz tem um fluxo de elétrons de 5 - 20 quilo elétron volt (keV). Visando a proteção dos cristais no momento da difração, os cristais foram imersos em uma solução crioprotetora formulada de acordo com a solução na qual a proteína foi cristalizada, acrescida de glicerol 20% (McFerrin & Snell, 2002). Os cristais foram retirados das gotas com o auxílio de um loop, colocados em *pucks* e armazenados em nitrogênio até serem levados para a linha de difração, com um fluxo contínuo de nitrogênio a 100 K e expostos aos raios X. O fluxo contínuo de nitrogênio tem o objetivo de prolongar a vida do cristal quanto aos danos provocados pelos raios X. No experimento de difração, medimos as intensidades dos pontos de difração correspondentes aos feixes de raios X difratados. O detector Pilatus 2M (Dectris - SWI) foi utilizado na coleta de dados de intensidade e direção dos feixes difratados. A coleta foi feita com oscilação de 0,1° por imagem, sendo coletadas 3.600 imagens.

O processamento de dados, indexação, integração e escalonamento, foram feitos utilizando o programa XDS (Kabsch, 2010). Os parâmetros da célula unitária, grupo espacial e o *coefficient matthews* (número de moléculas na unidade assimétrica) foram calculados. Para buscar as fases iniciais do modelo foi utilizado o método de Substituição Molecular (MR) (Rossmann, 1990), utilizando o programa PHASER (McCoy, et. al., 2007). O modelo de busca para a HXYN2 foi o PDB 1YNA (Gruber et. al., 1998).

Após o processamento dos dados, um mapa de densidade eletrônica foi obtido e o início do processo de refinamento foi realizado utilizando o programa Crystallographic Object-Oriented Toolkit (COOT) (Emsley et. al., 2010), que exibe e manipula modelos atômicos das biomacromoléculas e faz o ajuste dos átomos na densidade eletrônica. Adicionalmente, foi utilizado o pacote computacional automatizado Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography (PHENIX) (Afonine et. al., 2012) para refino da estrutura.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Produção e purificação da endoxilanase HXYN2

O gene que codifica a endoxilanase HXYN2 foi expresso em *P. pastoris* durante o desenvolvimento da tese de Carvalho (2008). No presente trabalho, foi utilizado o transformante produtor de HXYN2 cedido por Carvalho, para a expressão da enzima recombinante (item 5.1).

A indução da expressão do gene para produção da HXYN2 recombinante por *P. pastoris* foi realizada, com algumas modificações mencionadas na seção 5.1 (métodos), sendo que o sobrenadante da cultura apresentou atividade de 354 U/mL. Esta amostra foi dialisada em água, concentrada aproximadamente 20 vezes, equilibrada com o tampão de purificação e apresentou atividade de 1060,9 U/mL. A purificação da HXYN2 foi realizada em uma única etapa a partir deste sobrenadante aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex S-75 (Figura 17), apresentando rendimento de 29,72% (Tabela 2).

As frações correspondentes ao pico V (Figura 17A) apresentaram atividade de xilanase de 415 U/mL. Esta amostra, analisada por eletroforese em condições desnaturante, apresentou uma única banda com massa molecular aproximada de 23 kDa (indicado pela seta). Este resultado está de acordo com a massa teórica predita para HXYN2 e indica que não houve adição de glicosídeos na proteína secretada. O grau de pureza da HXYN2 presente nesta amostra foi analisado em gel desnaturante corado com nitrato de prata, onde nenhuma outra banda contaminante foi observada (Figura 17B). As frações do pico V foram agrupadas e esta amostra foi utilizada para os experimentos subsequentes.

6.2 Determinação do coeficiente de extinção molar experimental da HXYN2

O coeficiente de extinção molar experimental ($\epsilon_{280\text{nm}}$) da HXYN2 foi determinado pela correlação da absorbância a 280 nm e as concentrações da proteína determinadas pelo método de Lowry usando BSA como proteína padrão. Os espectros de absorção da proteína em soluções de diferentes concentrações (mg/mL) estão apresentados na Figura 18.

Tabela 2. Etapas de purificação da HXYN2 (Arquivo suplementar - Oliveira et al, 2022)

Etapas	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Proteína total (mg)	HXYN2* (%)	HXYN2 (mg)	Atividade (U/mL)	Ativ. Esp. (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	700	0,3067	214,69	34,68	74,45	5516,3	17986,0	100	1
Ultrafiltração	15	3,4516	51,774	62,75	32,48	9247,1	2679,0	43,62	0,148
Superdex 75	75	0,2950	22,13	100	22,13	8218,1	27857,97	29,72	1,54

*Porcentagem de HXYN2 estimada por densitometria (TotalLab versão 1.10, Phoretix, EUA) a partir de gel SDS-PAGE corado com comassie blue

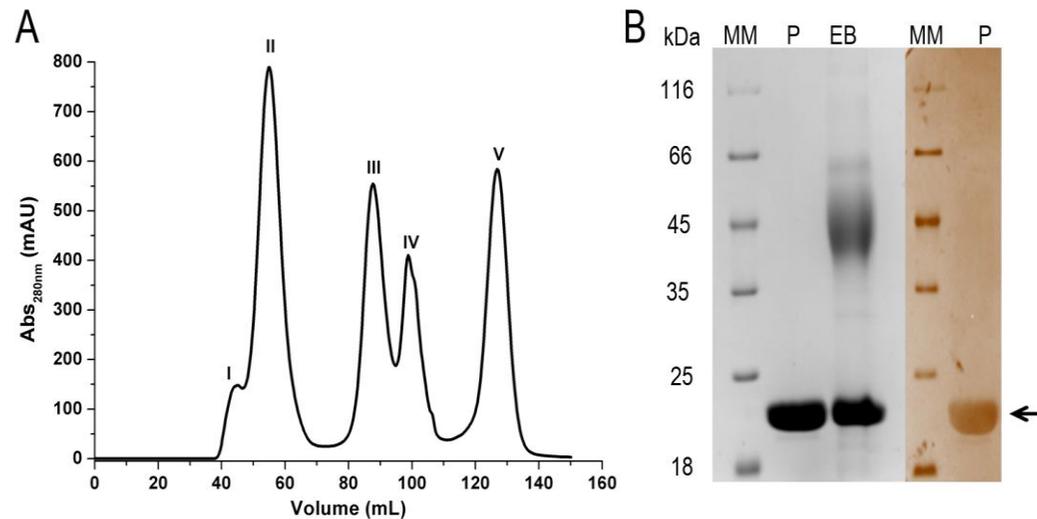


Figura 17. Perfil cromatográfico e análise da pureza da HXYN2 recombinante. A) Perfil cromatográfico da proteína em coluna de exclusão molecular Superdex S-75. A eluição da HXYN2 ocorreu nas frações do pico V. B) Análise do perfil proteico e pureza da amostra em gel desnaturante (SDS-PAGE) do extrato bruto produzido pela levedura e concentrado (EB) e da amostra do pico V correspondente a HXYN2 purificada (P), na coloração por *comassie blue* e nitrato de prata (Oliveira et al, 2022).

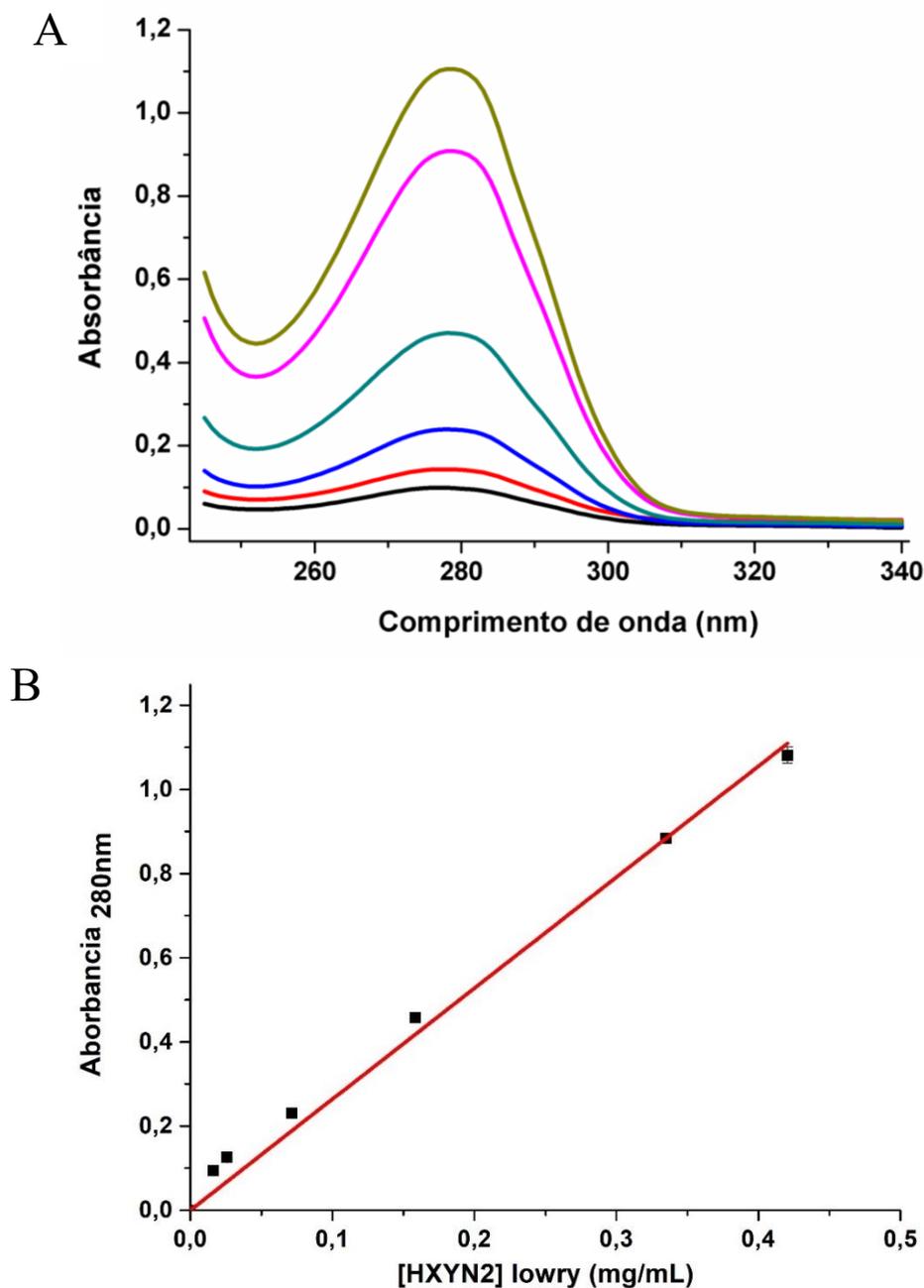


Figura 18. Determinação do coeficiente de extinção molar da HXYN2. A) Espectros de absorção da HXYN2 em diferentes concentrações. B) Correlação linear da concentração da proteína determinada pelo método de lowry e a respectiva absorbância a 280 nm (Arquivo suplementar - Oliveira et al, 2022).

O valor do coeficiente de extinção molar, determinado a partir da relação linear da absorbância a 280 nm e da concentração da proteína (Figura 18A), foi de $6.7623,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a absorvidade 0,1% foi de $2,64 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ com $R^2=0,994$, e foi considerado para a determinação da concentração da HXYN2 nos experimentos subsequentes.

6.3 Modelagem molecular da estrutura tridimensional da HXYN2

O modelo estrutural de HXYN2 (Freitas et al., 2003) relatado anteriormente foi atualizado com base nas estruturas cristalográficas atuais de xilanases e no uso de novas metodologias automatizadas para prever estruturas de proteínas. Este modelo foi posteriormente utilizado para a obtenção do complexo xilanase-AF a fim de analisar e corroborar os resultados experimentais aqui apresentados. Até o momento, 600 xilanases (359 da família GH10 e 263 da família GH11) foram caracterizadas. Dentre elas, 53 e 33 estruturas das enzimas GH10 e GH11 foram determinadas, respectivamente, e apenas seis são estruturas de ligação ao substrato com oligossacarídeo ramificado (Fujimoto et al., 2021). Além disso, apenas duas estruturas de xilanases de GH11 com oligossacarídeos ramificados foram elucidadas: o complexo NpXyn11A-arabinoxilooligossacarídeo de *Neocallimastix patriciarum* (Vardakou et al., 2008) que foi usado como um dos moldes para obter a estrutura de HXYN2, e os complexos SoXyn11B-arabino e glucuronoxilooligossacarídeo de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (Fujimoto et al., 2021). Cinco modelos estruturais HXYN2 foram construídos, de acordo com os *templates* mostrados na Figura 19 e Tabela 3.

Tabela 3. Modelos estruturais utilizados para modelar a estrutura HXYN2 (Arquivo suplementar - Oliveira et al, 2022).

Modelo	Molde (PDB)	Enzima	Família	Resl. (Å)	Conf (%)	Cov (%)	Id. seq. (%)	E-value (x10 ⁻⁷³)	Z-score
1	3WP3_A	XylC	GH11	1,98	100,0	91,3	54,2	0,78	23,238
2	2VGD_A	NpXyn11A	GH11	1,8	100,0	93,3	52,8	3,7	23,038
3	2VUJ_A	EvXyn11	GH11	1,8	100,0	92,8	52,8	3,0	23,028
4	5HXV_E	XylC	GH11	2,0	100,0	90,9	54,5	4,1	23,027
5	2DCJ_B	XynJ	GH11-XBM	2,24	100,0	91,3	42,3	2,6	3,017

Resl.: Resolução, **Conf.:** Confiança, **Cov.:** Cobertura, **Id. seq.:** identidade de sequência **XBM:** *Xylan binding domain*

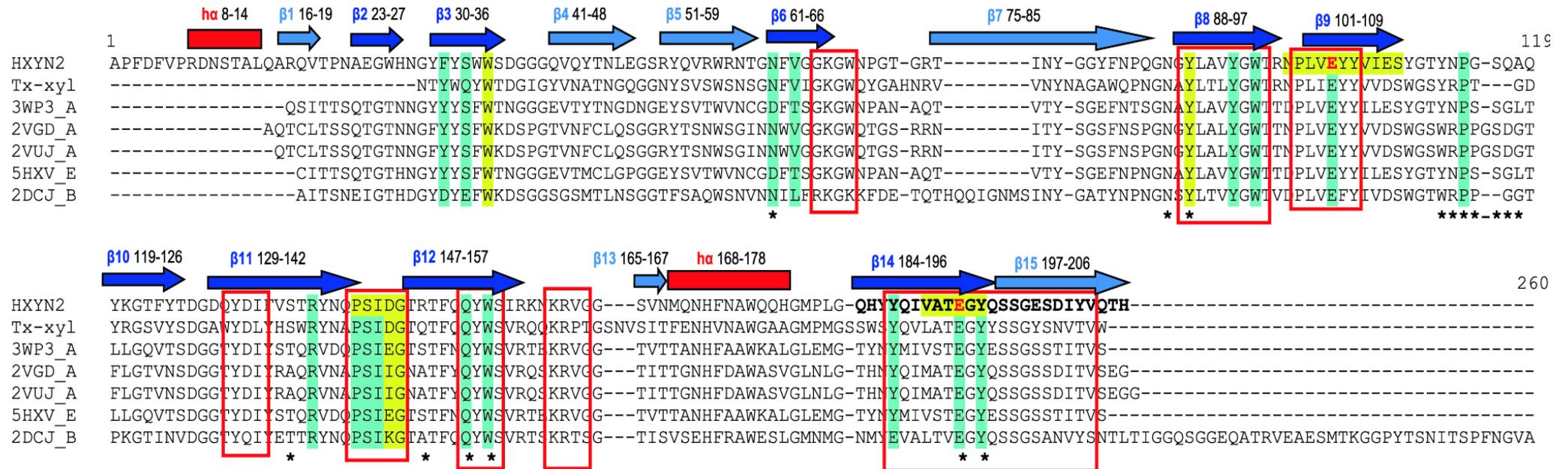


Figura 19. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da HXYN2 e demais xilanases. Os gaps foram identificados com traço. As estruturas secundárias são identificadas por um retângulo vermelho (α -hélice), setas azul-claro (seis fitas β da folha- β A) e setas azul-escuro (nove fitas β da folha- β B). As regiões com maior similaridade de seqüência estão dentro de um quadrado vermelho, a seqüência altamente conservada “PSIXG” destacada em amarelo e os resíduos de Glu catalíticos em vermelho. Alguns dos aminoácidos marcados com um asterisco estão envolvidos no reconhecimento do ácido ferúlico. Alguns resíduos estritamente conservados que participam da ligação de xilana estão sombreados em azul (Oliveira et al, 2022).

A xilanase de *Thermobacillus xylanilyticus* (Tx-xyl) GH11 foi considerada como referência para numeração de resíduos no alinhamento múltiplo de sequências (Figura 19) entre HXYN2 e os *templates* (Sapag et al., 2002; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012). As identidades de 42-53% e TM-scores superiores a 0,95 confirmam que padrão de dobramento β -*jelly-roll* de endo-1,4- β -xilanases da família GH11 é estruturalmente mais preservado do que a sequência (Orengo, Jones & Thornton, 1994; Kozak, 2006; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012). A maior semelhança de sequência ocorre nas fitas β que formam a “palma” e fenda na folha β B, como: β 8, β 9, β 11, β 12 e β 14- β 15 na extremidade C-terminal (Figura 19). O “polegar” entre as fitas β 11- β 12 corresponde a uma sequência consenso altamente conservada “PSIXG” (X corresponde a um resíduo não conservado) entre as xilanases GH11, sugerindo uma função importante (Pães et al., 2007; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012). Em contraste, as regiões mais variáveis incluem as alças que formam os “dedos” e as diferentes fitas β externas que formam a folha β A (Figura 19 e 20). Os dois resíduos de Glu catalíticos dos modelos HXYN2 (Vardakou et al., 2008; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012; Marneth et al., 2021) são representados por bastões.

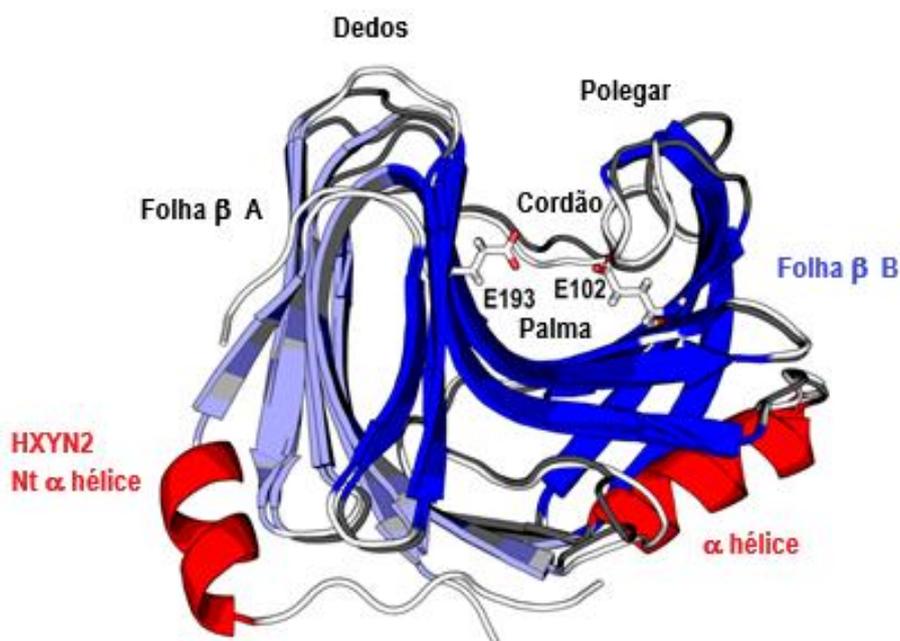


Figura 20. Modelo predito da estrutura tridimensional de HXYN2 sobreposto com a estrutura molde, (do inglês *template*) da xilanase de *Talaromyces cellulolyticus* (PDB: 3WP3). A estrutura supersecundária do tipo β -*jelly-roll* é formada por duas folhas- β antiparalelas denominadas A, em azul claro (cinco ou seis fitas- β) e B em azul (nove fitas- β). A topografia em forma de mão direita parcialmente fechada se assemelha aos “dedos” com alças (do inglês *loop*) entre as folhas- β A e B, a “palma” na fenda e uma alça formando o “polegar”. A α -hélice única descrita na família GH11 está representada,

mas para HXYN2 uma hélice adicional foi prevista na região N-terminal. Os dois resíduos catalíticos de Glu, E102 e E193 são representados por bastões. Regiões não estruturadas de HXYN2 e *template* são representadas em branco e cinza, respectivamente (Oliveira et al, 2022).

Os desvios quadráticos médios (*rmsd*) das posições atômicas para C α e o *TM-score* entre os cinco modelos foram de 0,30-0,37 Å e 0,95-0,99, respectivamente, indicando similaridade estrutural alta. Este parâmetro TM-score avalia a semelhança topológica das estruturas proteicas independentemente dos comprimentos das proteínas. O menor valor de TM-score foi de 0,863, indicando que modelos e moldes possuem a mesma estrutura tridimensional (Zhang & Skolnick, 2005). A melhor pontuação para o modelo estrutural HXYN2 (modelo 1) foi obtida usando a Xilanase GH11 XylC do fungo mesofílico *Talaromyces cellulolyticus* (conhecido como *Acremonium cellulolyticus*) como molde (PDB: 3WP3) (Anexo F) (Kataoka et al., 2014).

O sítio de ligação ao substrato e os resíduos catalíticos de HXYN2, bem como aqueles potencialmente envolvidos em interações com AF, foram identificados pela sobreposição do modelo 2 da HXYN2 com o molde NpXyn11A de *Neocallimastix patriciarum* (PDB: 2VGD_A), um complexo com xilobiose e feruloil-arabino-xilotriose (Figura 21).

Semelhante a outras xilanases de GH11, os resíduos da região "aglicona" (P114, R138, Q152, W154, E193, Y89, Y104 e Y195) e "glicona" (Y93, E102, P142, S143, I144, W39 e W95) são conservados no modelo HXYN2 (Figura 21A). De acordo com o modelo, o resíduo catalítico E102 é desprotonado (nucleófilo catalítico) e E193 protonado (ácido-base catalítico), e estão localizados nas fitas β 9 e β 14, respectivamente (Figura 20).

Além disso, para apoiar a análise da interface do substrato e resíduos catalíticos identificados, a sobreposição do modelo da HXYN2 com a xilanase GH11 SoXyn11B de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 em complexos com alfa-L-3-arabinofuranosil xilotetraose (PDB: 7DFN) e com 4-o-metil-alfa-D-3-glucuronopiranosil xilotetraose (PDB: 7DFO) foram realizados (Figura 22) (Fujimoto et al., 2021).

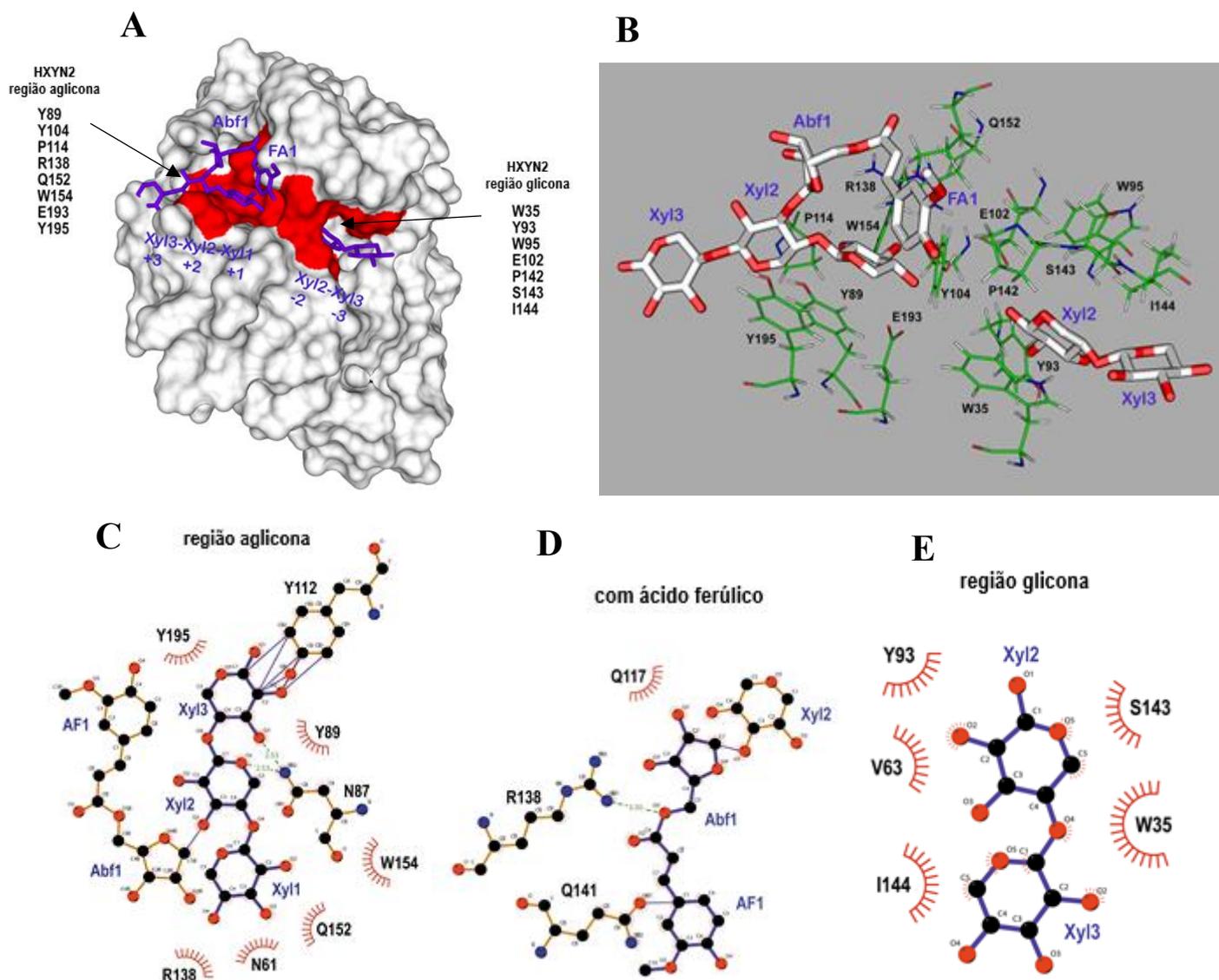


Figura 21. Modelo tridimensional predito da HXYN2 sobreposto com a estrutura tridimensional da xilanase NpXyn11A (PDB: 2VGD_A) contendo o substrato xilooligossacarídeo e ácido ferúlico (Tabela 3). (A) Representação de superfície do modelo da HXYN2 em branco e os resíduos conservados das regiões de aglicona e glicona que estão em vermelho. Os ligantes são representados pela cadeia carbônica em formato de bastão roxo. O xilooligossacarídeo (Xyl3-Xyl2-Xyl1), com os resíduos de xilose 1 (Xyl1) na extremidade redutora, está localizado na região aglicona com cada monossacarídeo localizado em seus subsítios +3, +2, +1. Arabinofuranose (Abf1) e ácido ferúlico (AF1) também são identificados na região aglicona. Os subsítios -2 e -3 da região glicona é representada pela xilobiose (Xyl2-Xyl3) com a extremidade não redutora em Xyl3. (B) O arranjo estrutural dos resíduos conservados nas regiões aglicona e glicona é representado como linha verde para átomos de carbono e sua interação com ligantes é representada como bastões azuis. (C) As interações entre HXYN2 e Xyl3-Xyl2-Xyl1, (D) e Xyl2-Xyl3, (E) e Abf1 e AF1 estão representadas por LIGPLOT (Wallace, Laskowski & Thornton, 1995). Os resíduos de aminoácidos de HXYN2 e ligantes estão marcados; as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas estão representadas como linhas tracejadas e hemisfério listrado, respectivamente (Oliveira et al, 2022).

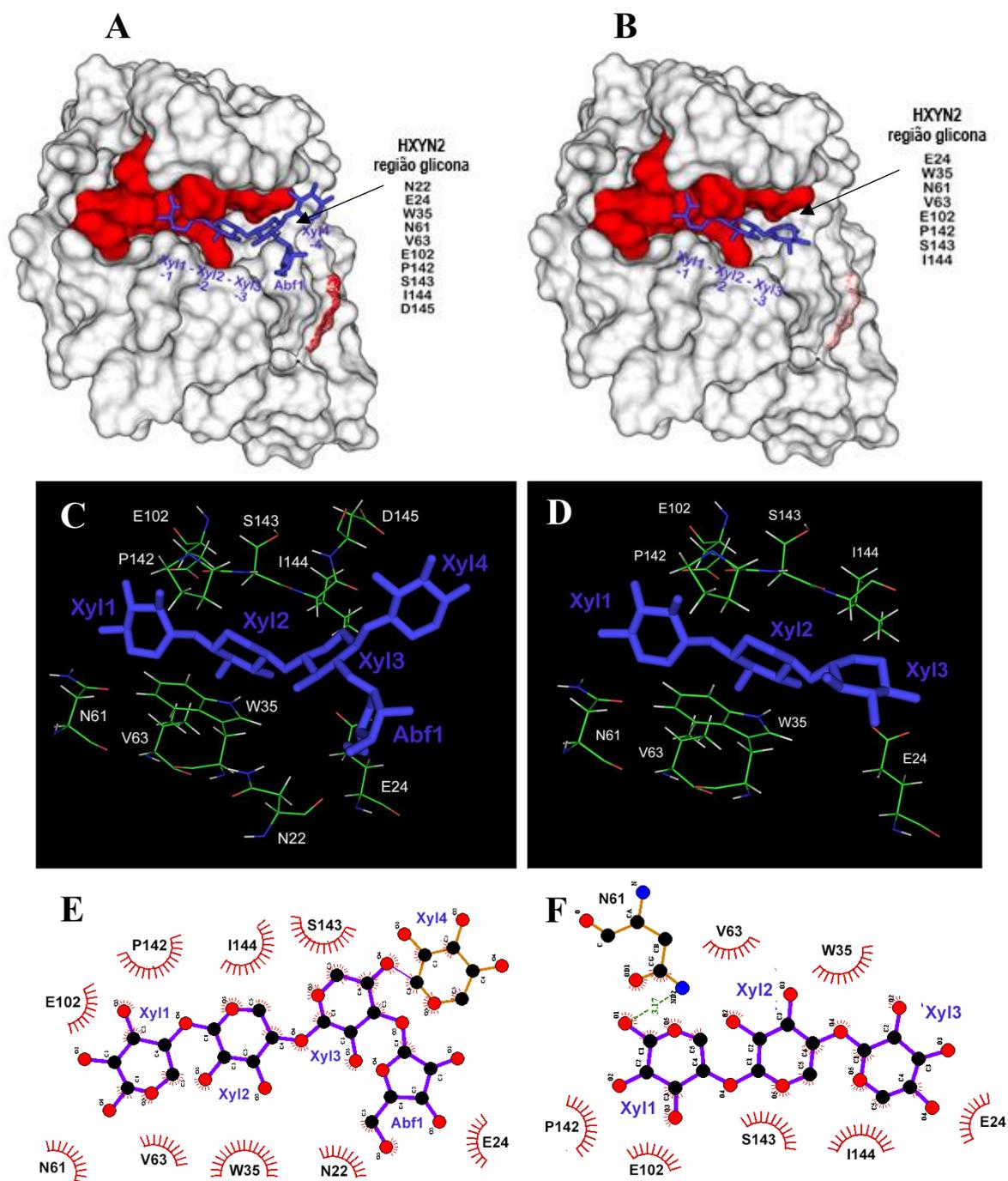


Figura 22. Modelo tridimensional predito da HXYN2 N°2 sobreposto com a xilanase SoXyn11B de *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 em complexos com alfa-L-3-arabinofuranosil xilotetraose (PDB: 7DFN) (A, C, E) e 4-o-metil-alfa-D-3-glucuronopiranosil xilotetraose (PDB: 7DFO) (B, D, F). A representação da superfície do modelo da HXYN2 está em branco e os resíduos estritamente conservados das regiões aglicona e glicona estão em vermelho (A e B). Os ligantes estão representados pela cadeia carbônica em formato de bastão roxo. Os xilooligossacarídeos (Xil1-Xil2-Xil3) e (Xil1-Xil2-Xil3-Xil4), com os açúcares xilose 3 (Xil3) e 4 (Xil4) na extremidade redutora, estão localizados na região glicona. O arranjo estrutural dos resíduos que interagem com o xilooligossacarídeo na região glicona é mostrado em (C e

D). Os resíduos estão representados em linhas e o ligante em bastão. As interações entre HXYN2 e xilooligossacarídeos foram representadas por LIGPLOT (Wallace, Lakowski & Thornton, 1995) (E e F). Resíduos e ligantes estão identificados; as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas estão representadas como linhas tracejadas e hemisfério listrado, respectivamente (Arquivo suplementar - Oliveira et al, 2022).

A xilose no subsítio -1 do molde interage com os resíduos N61, V63, R138 e P142 e o resíduo catalítico E102, de acordo com a sobreposição com os complexos enzima-substrato SoXyn11B (Figura 22). Essas interações promovem mudanças conformacionais que levam ao estado de transição tipo ${}^{2,5}B$, mantendo a configuração β (Davies & Henrissat, 1995; Sidhu et al., 1999). No subsítio -2, Xyl2 interage com os resíduos W35, V63, Y93, S143 e I144, enquanto Xyl3 no subsítio -3 interage apenas com o resíduo I144 (Figura 21B, 21D e Figura 22). Além disso, os monômeros de xilose nos subsítios +1, -1 e -2 apresentam os grupos hidroxila 2- e 3- orientados na parte inferior da fenda (Figura 21A e 21B). Por outro lado, os dois grupos 2- e 3-hidroxila da xilose nos subsítios +3, +2 e -3 estão expostos ao solvente, correspondente à posição dos ramos da arabinose ou de uma cadeia lateral do ácido glucurônico (Figura 21B). A interação com a xilotriose, ramificada com arabinofuranose e ácido ferúlico no C3 da xilose 2 (Figura 21B), ocorre com os resíduos N61, N87, Y89, Y112, Q152, R138, W154 e Y195 (Figura 21C).

O padrão de ramificação dos substratos de xilooligossacarídeos é específico para a ligação no sítio catalítico de cada xilanase da família GH10 e GH11. No caso das xilanases GH11, as cadeias laterais do ácido 4-metilglucurônico ligam-se preferencialmente nos subsítios -3 e +2, enquanto as cadeias laterais da arabinose ligadas ao O-3 ligam-se nos subsítios -2 e +2 (Fujimoto et al., 2021). No caso do substrato glucuronoxilano, a interação com as xilanases GH11 ocorre com pelo menos três resíduos de xilose não modificados consecutivos entre duas xiloses modificadas. No entanto, em enzimas GH10, apenas duas xiloses não modificadas e consecutivas, entre duas xiloses modificadas, são necessárias para a clivagem da cadeia principal de xilana do glucuronoxilano (Fujimoto et al., 2021).

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas ocorre via catálise ácida por mecanismo catalítico de duplo deslocamento, no qual é formado um intermediário covalente glicosil-enzima (McCarter & Withers, 1994; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012). Com base na semelhança estrutural de HXYN2 com xilanases de GH11 e modelos sobrepostos (Figura 21 e Figura 22), um mecanismo catalítico semelhante, em

duas etapas para a hidrólise de ligações β -1,4 xilosídeos de xilana, pode ser proposto. Primeiro, o resíduo catalítico ácido/base E193 na região aglicona atua como um ácido e protona o O-4 do D-xilopiranosil na posição +1. O outro resíduo catalítico E102 na região glicona atua como um nucleófilo que promove a liberação de um xilooligossacarídeo (xilotriose no modelo, Figura 21A), como o primeiro produto. Um intermediário de enzima α -glicosil é formado envolvendo E102 com um segundo xilooligossacarídeo (xilobiose no modelo HXYN2, Figura 21A), após a transição para um estado semelhante ao íon oxycarbênio. Para diminuir a barreira de energia da reação de hidrólise, a estrutura da xilose no subsítio -1 é distorcida em uma conformação de meia cadeira (Davies & Henrissat, 1995; Pães, Berrin & Beaugrand, 2012). Na segunda etapa de deglicosilação de HXYN2, o resíduo catalítico ácido/base E193 atua como uma base que atrai um próton da água nucleofílica próxima, que ataca o carbono anomérico do intermediário da enzima α -glicosila, permitindo a formação do xilooligossacarídeo como segundo produto (xilobiose no modelo HXYN2, Figura 21A) e a enzima livre.

A transglicosilação ou transxilosilação pode ocorrer se a água for substituída por um composto alcoólico ou fenólico, como ocorre na Xil-11 xilanase de *Bacillus* sp 41. Esse padrão é característico da maioria das xilanases GH11, em que a hidrólise das ligações glicosídicas resulta na manutenção ou inversão da configuração anomérica do carbono da ligação clivada (Davies & Henrissat, 1995). Em ambas as configurações, a posição do doador de prótons é idêntica e está de acordo com a distância de ligação de hidrogênio do oxigênio glicosídico. Na configuração de carbono anomérico retido em HXYN2, como nas xilanases de GH11, a base catalítica nucleofílica está próxima ao carbono anomérico do açúcar com uma distância média entre os dois resíduos catalíticos de $\sim 5,0$ - $8,0$ Å. No entanto, a base catalítica está mais distante no caso de configuração invertida (>10 Å), que deve acomodar uma molécula de água entre a base e o açúcar (McCarter & Withers, 1994; Davies & Henrissat, 1995). A distância média entre o oxigênio carboxílico (OE1 e OE2) das cadeias laterais catalíticas E102 e E193, nos modelos HXYN2, foi de $7,5 \pm 0,7$ Å. Este resultado confirma o “mecanismo de retenção” do HXYN2, no qual o carbono anomérico da xilose -1 dá origem a um produto com configuração β , semelhante ao substrato.

6.4 Caracterização enzimática da HXYN2 utilizando xilana *beechwood* como substrato

Em geral, as xilanas obtidas de diferentes resíduos lignocelulósicos apresentam estruturas variadas, alterando a composição de ramificações de acordo com sua origem. A xilana *oat spelt*, obtida a partir da parede celular de cereais como a aveia, apresenta 10% de arabinose, enquanto a xilana *beechwood* isolada de madeira de faia apresenta 12,8% de ácido glucurônico em suas ramificações (Puls et al., 1991; Saake et al., 2003). A diferença na composição destes substratos é de fundamental importância na determinação de parâmetros enzimáticos das xilanases, influenciando principalmente na afinidade da proteína. Portanto, os estudos de caracterização enzimática realizados neste trabalho visam explorar estes parâmetros da HXYN2 na presença da xilana *beechwood*.

6.4.1 Efeito da concentração da proteína

Ensaio enzimáticos foram realizados variando a concentração de enzima, fixando a concentração de substrato em 9 mg/mL e variando o tempo da cinética, o que permitiu o cálculo da variação da velocidade inicial (V_0) (Figura 23). A concentração ideal para os ensaios enzimáticos seguintes foi de 400 nM, de acordo com a reta obtida com o valor máximo da absorbância próximo de 1.0. Esta reta correspondeu à curva intermediária apresentada dentre outras de maior e menor concentração da enzima. Os ensaios realizados com concentrações extremas podem não representar de forma eficaz a variação na velocidade da reação, o que leva a avaliações não fidedignas, principalmente dos parâmetros cinéticos das reações enzimáticas.

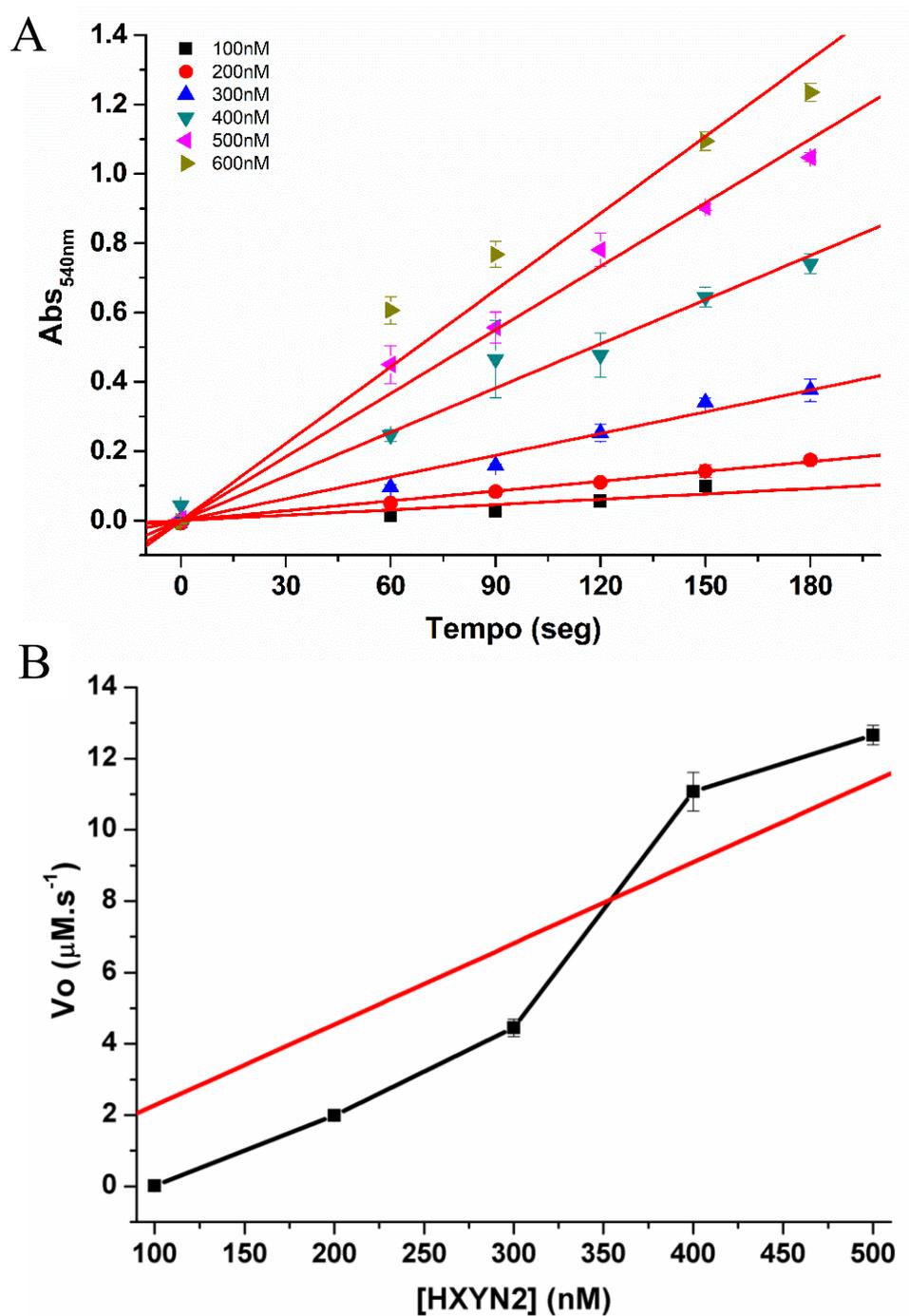


Figura 23. Efeito do tempo e da concentração de HXYN2 na reação enzimática. A) Variação da absorbância em 540 nm no tempo de 0-180 segundos e concentração entre 100 e 600 nM. B) Correlação linear entre a concentração enzimática em nM e a velocidade inicial da reação.

6.4.2 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da HXYN2

A determinação do pH ótimo para a atividade de xilanase foi realizada na escala de pH variando de 2 a 12 utilizando tampão constituído por glicina-citrato-fosfato 20 mM. A Figura 24 mostra que a enzima apresenta baixa atividade em pH mais ácidos (entre 2 e 4). No entanto, a atividade relativa na faixa de pH entre 5,0 e 9,0 variou entre de 75-100%, apresentando atividade máxima no pH 6,0. Portanto, neste pH a enzima apresenta maior eficiência, sugerindo que esta endoxilanase pode atuar de forma eficiente em processos de caráter neutro e básicos. Nos pH básicos entre 7,0 e 9,0 a HXYN2 apresentou atividade relativa de aproximadamente 80%. Estes dados são similares àqueles obtidos para uma xilanase de *Aspergillus tamaris* que apresentou maior atividade entre pH 5,5 e 6,0 (Monclaro et al., 2019) e outra xilanase da família GH11 de *Emicella nidulans* com atividade máxima entre pH 5,0 e 6,5 (Silva et al., 2015). Em contraste, a xilanase obtida do fungo *Bacillus licheniformis* apresentou maior eficiência catalítica entre pH 8,0 e 9,0 (Raj et al., 2018). Estes dados mostram que as xilanases apresentam atividade catalítica em ampla faixa de pH, podendo ser empregadas em diversos processos dependentes das condições de pH do meio.

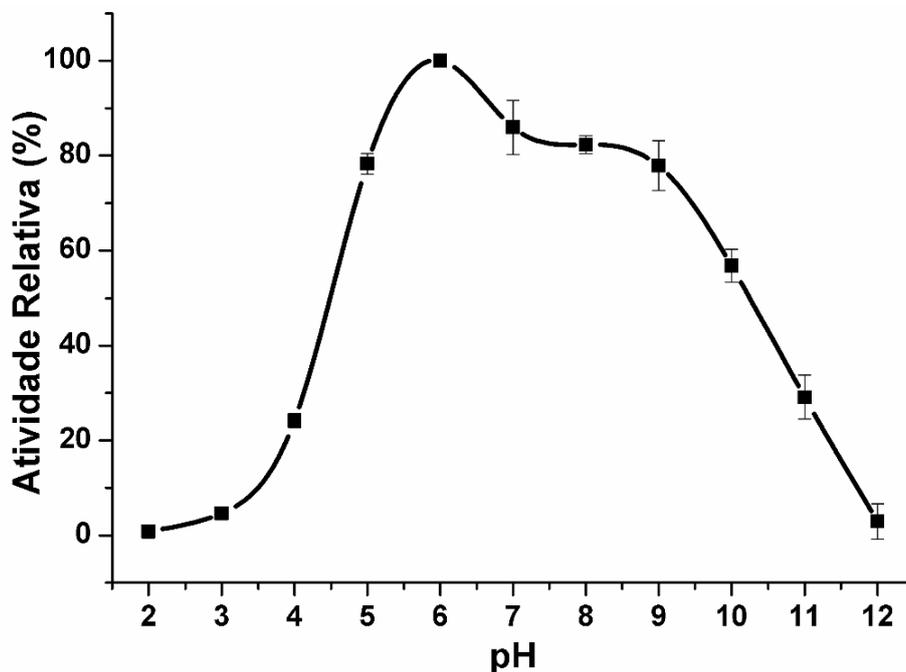


Figura 24. Atividade relativa da HXYN2 em pH variando de 2 a 12. A determinação do pH ótimo foi realizada utilizando xilana *beechwood* 1% como substrato, a concentração de HXYN2 de 400 nM e a temperatura de 50 °C por 5 min. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100% (Oliveira et al, 2022).

O efeito do pH no sítio ativo ocorre preferencialmente promovendo mudanças conformacionais de cadeias laterais de aminoácidos interferindo diretamente na atividade da enzima. A interação entre os resíduos catalíticos E84 (ácido/base) e E175 (nucleofílico) (considerando a numeração da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (YNA - Gruber et al., 1998) e o modelo tridimensional da HXYN2 (Freitas et al., 2003)) ocorre por meio de ligações de hidrogênio com o grupo hidroxílico do resíduo Y86. Este resíduo pode assumir duas conformações devido a discretos movimentos da cadeia lateral mediante diferentes pH, alterando o arranjo estrutural do sítio ativo e interferindo na atividade catalítica da HXYN2. Adicionalmente, é importante ressaltar que a partir do pH 4,0 (~pK de ionização do ácido glutâmico) estes resíduos catalíticos podem assumir cargas distintas, negativa ou nula, dependentes do padrão e número de interações no microambiente estrutural, bem como das mudanças conformacionais das cadeias laterais dependentes do pH. Nestes casos, o resíduo ácido/base (E84) pode adquirir carga negativa (desprotonado) enquanto que o resíduo nucleofílico (E175) se encontra neutro (protonado), condição semelhante descrita para XYNII de *T. reesii* (Törrönen et al., 1994). Este resíduo neutro, tanto na estrutura da XYNII e no modelo 3D da HXYN2 (Freitas et al. 2003), é estabilizado pelo resíduo N43 por meio de uma ligação de hidrogênio fraca. Para que ocorra a ionização deste resíduo com a doação concomitante de um próton, importante e fundamental para o processo de catálise, é necessário um pH maior do que o pK de ionização deste resíduo (Törrönen, A. & Rouvinen, J. 1997). Vale ressaltar que este resultado apresentado para as duas xilanases citadas, está de acordo com aquele reportado por McIntosh e colaboradores (1996), onde foi observado que o pK_i de alguns resíduos de aminoácidos podem variar dependendo da posição e do microambiente em que se encontram. Estes autores determinaram o valor do pK_i de 6,7 para o resíduo catalítico ácido/base, um glutamato presente no sítio ativo da endoxilanase XYN de *Bacillus circulans*, distante, portanto, do pK_i de aproximadamente 4,3 da cadeia lateral deste aminoácido, encontrado em ambientes estruturais mais expostos.

Em pH 6,0, a HXYN2 apresenta atividade máxima, o que é compatível com a ionização do resíduo E175, que passa a ter carga negativa (desprotonado) neste pH. Adicionalmente, o posicionamento das cadeias laterais dos resíduos catalíticos também pode ser influenciado pelas histidinas que estão ionizadas neste pH, e que mantêm distância estrutural variando em torno de 7 Å, que permite interação específica e maximizada com o substrato durante a catálise, para as xilanases da família G11

(Davies & Henrissat, 1995; Gruber et al., 1998). Interessantemente, este pH coincide com o pI experimental de 6,1 da HXYN2 nativa, obtido por Carvalho (2003), condição que determina estabilidade estrutural da proteína. A HXYN2 mantém atividade acima de 75% até o pH 9,0 (Figura 24). Neste pH, as tirosinas podem mudar o estado de ionização e a orientação das cadeias laterais, provocando alteração na distância entre os resíduos catalíticos, uma vez que o resíduo E84 é estabilizado por duas tirosinas, Y86 e Y75. Essa alteração foi relatada por Freitas e colaboradores (2003), ao detectar a distância de 10 Å entre os grupos carboxílicos dos resíduos E84 e E175 em pH 8,0 durante a simulação estrutural por dinâmica molecular, justificando a diminuição da atividade enzimática por assumir a conformação desfavorável do sítio ativo para a catálise do substrato. Espectros de emissão de fluorescência em diferentes pH, obtidos neste trabalho, corroboram com estes dados bioquímicos e são discutidos no item 6.7.1. Os resíduos E84, E175, Y86, Y75 e N43 presentes no modelo da HXYN2 proposto por Freitas e colaboradores (2003) correspondem aos resíduos E102, E193, Y104, Y93 e N61, respectivamente.

Para determinação da temperatura ótima, a HXYN2 foi incubada em diferentes temperaturas e posteriormente realizado o ensaio de atividade enzimática em pH ótimo determinado anteriormente (Figura 25).

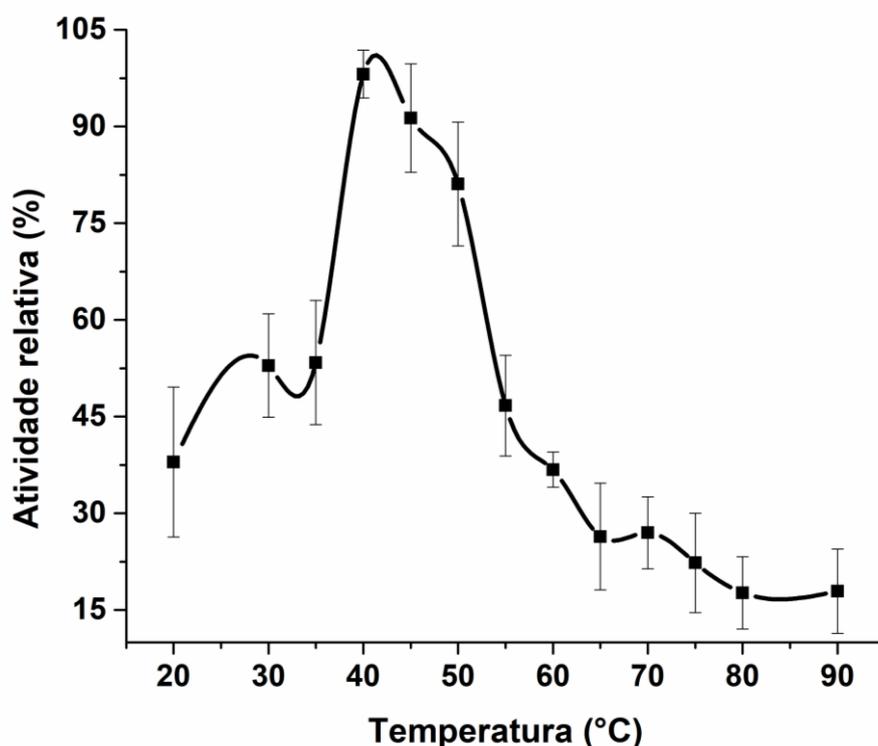


Figura 25. Efeito da temperatura na atividade enzimática da HXYN2. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM (pH 6,0) em 5 min na presença de xilana *beechwood*

1%, nas temperaturas de 20 °C a 80 °C (intervalo de 5 °C) e 90 °C. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100% (Oliveira et al, 2022).

Na Figura 25, a atividade da HXYN2 foi superior a 70% nas temperaturas entre 40 e 50 °C, apresentando eficiência catalítica nesta faixa. Após 50 °C, a enzima perde atividade, chegando a valores menores que 20% até 90 °C. Esta perda abrupta de atividade enzimática indica que neste intervalo, a proteína pode ter desnaturado, perdendo a organização estrutural e, conseqüentemente, reduzindo a atividade enzimática.

6.4.3 Estabilidade da HXYN2 em diferentes temperaturas

A estabilidade térmica da HXYN2 foi monitorada durante duas horas, nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C (Figura 26). Nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, a HXYN2 se mantém estável apresentando atividade acima de 80% após duas horas.

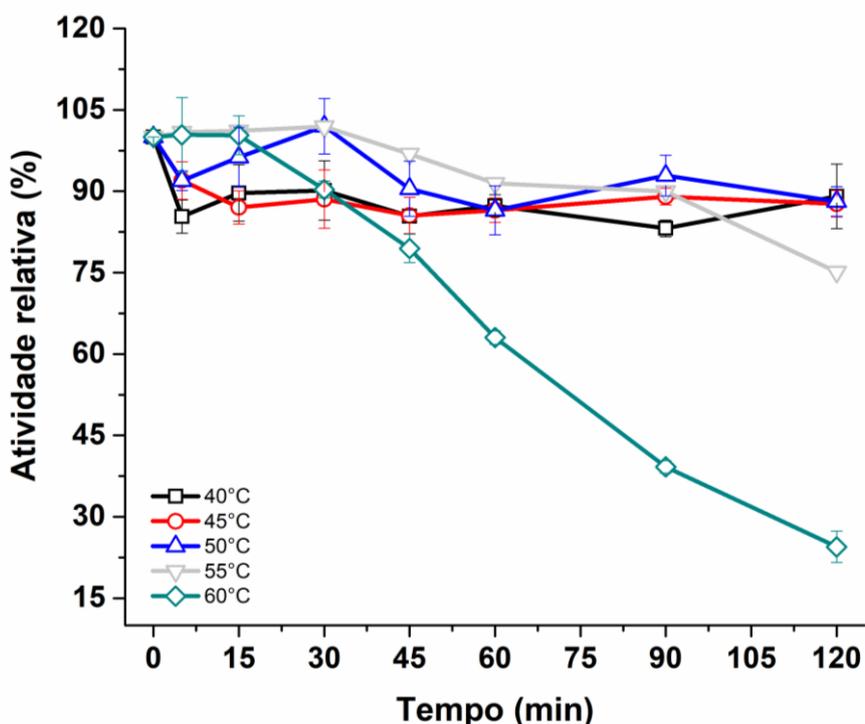


Figura 26. Ensaio de termoestabilidade da HXYN2. A enzima foi incubada nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C por duas horas. Alíquotas foram coletadas após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min de incubação para os ensaios de atividade realizados sob as condições padrão (pH 6,0, 50 °C, 5 min). As atividades enzimáticas foram apresentadas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100% (Oliveira et al, 2022).

A termoestabilidade nestas temperaturas foram confirmadas após o cálculo do tempo de meia vida, apresentado na tabela 4. A HXYN2 apresenta meia vida acima de 5 horas na faixa de temperatura entre 40 e 55 °C. Carvalho (2008) mostrou que estabilidade da HXYN2 a 50 °C ocorre com um tempo de meia-vida acima de 3 h (tempo de duração do ensaio), quando sua atividade foi determinada utilizando como substrato xilana *oat spelt*. Neste trabalho de tese, por meio do gráfico de primeira ordem para desnaturação térmica (Figura 27), foi demonstrado que a utilização da xilana *beechwood* como substrato da HXYN2 promoveu o aumento na meia vida da enzima para 11 horas, sendo termoestável a 50 °C por um longo tempo de incubação. Além disso, esta enzima nestas condições apresentou estabilidade acima de 5 horas nas temperaturas de 40, 45 e 55 °C, característica importante para a aplicação de enzimas em diversos processos industriais.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da desnaturação térmica da HXYN2 (Oliveira et al, 2022).

Temperatura (°C)	kd (min ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (min)
40	2,3 x 10 ⁻³ ± 3.9 x 10 ⁻⁴	0,904	301,2
45	1,4 x 10 ⁻³ ± 3 x 10 ⁻⁴	0,953	495
50	1 x 10 ⁻³ ± 3.7 x 10 ⁻⁴	-	693
55	1,8 x 10 ⁻³ ± 2.6 x 10 ⁻⁴	0,948	384,6
60	8,1 x 10 ⁻³ ± 1 x 10 ⁻³	0,924	85,2

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram uma relação inversamente proporcional entre a constante cinética de desnaturação térmica (Kd) e as respectivas meia-vidas. Com o aumento da temperatura de 40 para 50 °C, a meia vida da HXYN2 dobra de valor, enquanto o valor de Kd diminui, indicando que nesta temperatura, onde a enzima apresenta máxima atividade, a HXYN2 é estável por apresentar dissociação lenta do complexo enzima+substrato. A 60 °C, a enzima apresenta o maior valor de Kd, e conseqüentemente o menor valor de meia-vida em que o complexo enzima+substrato apresenta dissociação rápida. Ullah e colaboradores (2019) observaram que a endoxilanase GH10 de *Penicillium chrysogenum*, na presença do substrato xilana *oat spelt*, apresentou menor valor de Kd e maior valor para a meia-vida (19,18 horas) a 30 °C, temperatura ótima da enzima. Na temperatura de 40 °C, quando a atividade enzimática começa a diminuir, a endoxilanase apresenta meia vida de 6,8 horas.

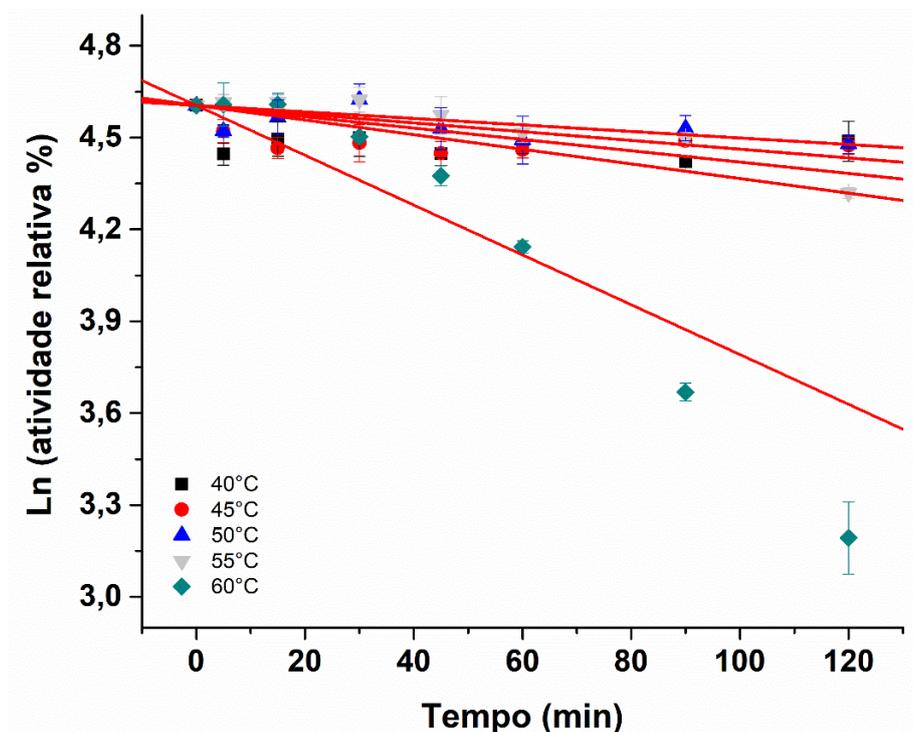


Figura 27. Desnaturação térmica da enzima HXYN2 analisada pelo gráfico de primeira ordem. A enzima foi pré-incubada a 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C na ausência de xilana *beechwood*. Após intervalos de 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min, a atividade da HXYN2, na presença de xilana *beechwood*, foi determinada usando tampão GCF (pH 6,0) a 50 °C (Oliveira et al, 2022).

Algumas características estruturais conferem às endoxilanasas termofílicas termoestabilidade, como interações hidrofóbicas, oligomerização devido à exposição dos resíduos aromáticos a solventes (Harris et al., 1997) e ligações dissulfeto (Wakarchuk et al., 1994). Embora a HXYN2 não apresente ligações dissulfeto, a presença de vários pares iônicos na superfície da molécula, bem como vários resíduos hidrofóbicos na superfície da proteína, possibilitando a formação de interações de empilhamento entre resíduos aromáticos, podem facilitar a formação de oligômeros aumentando a estabilidade desta proteína por período longo de tempo (Freitas et al., 2003).

Após 15 min de incubação a 60 °C, a HXYN2 perde atividade gradativamente apresentando 50% de atividade residual após uma hora e meia de incubação. Dados espectroscópicos de dicroísmo circular, apresentados a seguir neste trabalho, mostram que a temperatura de transição entre o estado nativo e desenovelado da HXYN2 em pH 6,0 é de 63,5 °C. Portanto, temperaturas na faixa de 60 °C causam a perda de estruturas do tipo folha- β e formação de estruturas desordenadas, e com isso a proteína perde a eficiência catalítica, compatível com menor estabilidade da HXYN2 a 60 °C.

6.4.4 Efeito de compostos fenólicos na atividade da enzima HXYN2

A determinação do efeito de compostos fenólicos sobre a atividade enzimática da HXYN2 foi realizada, utilizando oito compostos (ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido tânico) na concentração final de 1 mg/mL, nas condições ótimas de pH, temperatura e concentração enzimática determinadas anteriormente. Dentre os compostos fenólicos estudados, apenas o ácido tânico promoveu um efeito inibitório e desativador da HXYN2, reduzindo a atividade para 59% e 26%, após ser pré-incubado com a enzima por 0 e 24 horas, respectivamente (Figura 28).

O ácido tânico é um flavonoide derivado da lignina encontrado em vegetais, que apresenta a característica de se associar a proteínas formando complexos irreversíveis, ocorrendo em condições oxidativas, via ligações covalentes, ocasionando a agregação/precipitação da proteína e, conseqüentemente, a queda abrupta de atividade (Deshpande et al., 1986; Naczki et al., 1994; Sgarbieri, 1996). Sabe-se que o ácido tânico apresenta forte inibição de celulasas comerciais (Tejirian & Xu, 2011), e inibição de até 80% de celulasas e β -glicosidase, após 24 horas de incubação (Ximenes et al., 2010; Kim et al., 2011). Recentemente, Ullah e colaboradores (2019) reportaram a inibição de 17% da atividade de uma xilanase GH10 de *Penicillium chrysogenum* por este composto fenólico. Ao contrário do que foi apresentado neste trabalho, Monclaro e colaboradores (2019) verificaram um aumento de 12% na atividade de uma xilanase GH11 de *Aspergillus tamarisii*, utilizando como substrato xilana *birchwood*, na presença do ácido tânico. No caso da HXYN2, o ácido tânico inibe e desativa a enzima que perde a capacidade de hidrolisar a xilana *beechwood*, condizente com a queda imediata na atividade enzimática.

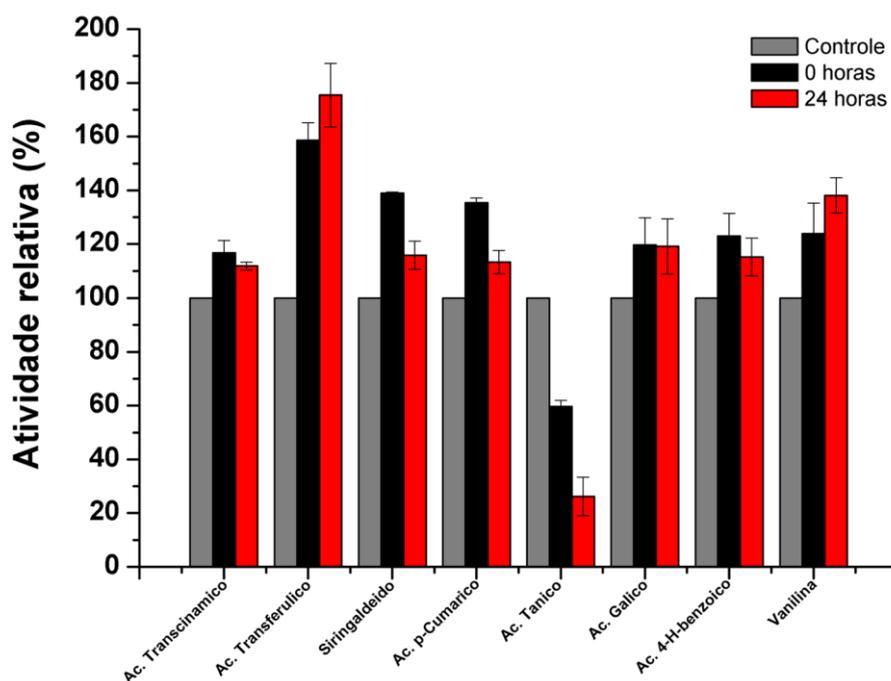


Figura 28. Efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática da HXYN2. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM pH 6,0 por 5 min na presença de xilana *beechwood* 1% (controle), imediatamente após a adição dos compostos fenólicos (1 mg/mL) no ensaio (0 horas) e após 24 horas de pré-incubação com a HXYN2. As atividades enzimáticas foram expressas em porcentagem em relação a atividade máxima considerada como 100% na ausência de compostos fenólicos (Oliveira et al, 2022).

Os demais compostos fenólicos apresentaram efeito ativador na enzima, após 24 horas de incubação. Dentre eles, se destacam a vanilina e o ácido ferúlico, no qual este último promoveu aumento de 60-75% na atividade enzimática, em relação ao controle (Figura 28). Diversos relatos na literatura descrevem enzimas tolerantes a compostos fenólicos. Xilanases de *Emericella nidulans* (Silva et al., 2015), *A. tamaritii* (Monclaro et al., 2016) e *A. terreus* (Moreira et al., 2013) não apresentaram inibição na presença de ácido ferúlico e vanilina, e o aumento da afinidade ao substrato foi indicado pelos menores valores de K_M (Moreira et al., 2013). Adicionalmente, a presença de vanilina e ácido p-cumárico promove mudanças conformacionais de β -xilanases, observadas por fluorescência (Moreira et al., 2015). Uma mistura de celulasas de *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* se mostrou tolerante a compostos fenólicos. Além disso, altas concentrações desses compostos fenólicos não influenciaram na atividade enzimática de xilanases da mistura *C. cubensis*:*P. pinophilum*, na presença de lacase (Ladeira Ázar et al., 2018).

A interação de uma xilanase GH11 de *A. tamaritii* com o ácido ferúlico foi investigada, avaliando parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação. Além disso,

a interação desta xilanase com este composto fenólico foi investigada por *docking* molecular a fim de compreender os mecanismos envolvidos na associação deste composto com a enzima (Monclaro et al., 2019). Com base nestes dados, foi demonstrado que a interação do ácido ferúlico com a enzima ocorre por meio de uma tirosina presente no subsítio -2 (Tyr164), considerado fundamental para a ligação do substrato e sua orientação correta no sítio ativo da enzima. Resultados similares foram obtidos por simulações de dinâmica molecular de uma xilanase de *T. Lanuginosus* e mostraram que o substrato permaneceu em posição quase que inalterada durante as simulações, além da orientação do átomo O3 do resíduo de xilose nesta posição (Gruber et al., 1998; Paës, Berrin, Beaugrand, 2012).

Sabe-se que resíduos aromáticos são altamente conservados na fenda catalítica de xilanases GH11. Neste estudo mudanças no ambiente da Tyr164 durante a ligação do ácido ferúlico causou deslocamento de outros resíduos aromáticos (Trp172) encontrados próximos da tirosina, influenciando na interação da enzima com o substrato, e consequentemente alterando parâmetros cinéticos e termodinâmicos (Monclaro et al., 2019). Além disso, leve mudança na orientação da cadeia lateral de um aminoácido (Ser94) presente na região da α -hélice ("polegar") da enzima, na presença do ácido ferúlico, pode desempenhar um papel fundamental na ativação dessa enzima. Esta região é flexível e pode estar associada à movimentos de abertura do sítio catalítico, dependendo da temperatura, favorecendo a ligação do substrato. As interações do ácido ferúlico com resíduos de aminoácidos da xilanase AtXyl1 de *A. tamaritii* (Tyr164, Ser94 e Tyr 89) envolvidos na hidrólise da xilana *beechwood* podem justificar o aumento de 20% na atividade desta enzima (Monclaro et al., 2019). Portanto, considerando que a HXYN2 apresenta domínios estruturais conservados e pertence à mesma família GH11 da AtXyl1, o aumento da sua atividade enzimática na presença de ácido ferúlico pode estar associado a mudanças estruturais na vizinhança do sítio ativo desta enzima.

Alguns estudos correlacionam os efeitos dos compostos fenólicos em enzimas com alterações estruturais destas proteínas. Boukari e colaboradores (2011) relataram que mudanças em parâmetros cinéticos que resultaram na inibição de uma endo- β -1,4-xilanase da família GH11 de *Thermobacillus xylanilyticus*, na presença de compostos fenólicos como ácido cinâmico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico. Estas mudanças podem ter sido provocadas por interações de empilhamento entre o anel aromático hidrofóbico dos compostos fenólicos e as cadeias laterais de triptofano e tirosina, que se encontram no sítio catalítico das enzimas desta família. Em outro estudo, ao avaliar a

interação entre ácido ferúlico e p-coumárico com celulasas comerciais, foi verificada a formação de ligações covalentes entre estes compostos e os resíduos aromáticos destas enzimas, diminuindo sua atividade (Duarte et al., 2012). Adicionalmente, foi observado que a adição de ácidos fenólicos diminuiu significativamente o conteúdo de α -hélice, e em contrapartida aumentou o conteúdo da folhas- β e β -turn destas celulasas, estimadas por dicroísmo circular, proporcionando maior flexibilidade estrutural das enzimas e aumentando a afinidade pelo substrato (Tian et al., 2013).

No presente trabalho, a influência da concentração de ácido ferúlico no ensaio de oxido-redução do DNS, conforme a curva padrão de xilose, foi analisada (controle negativo). Nenhuma alteração dos valores de absorvância em decorrência da presença do composto foi verificada, o que indica que este composto não afeta diretamente o ensaio com DNS (Figura 29). Além disso, concentrações acima de 1 mg/mL de ácido ferúlico foram testadas quanto a interferência na absorvância resultante da ação do reagente DNS e, até 10 mg/mL do composto na presença apenas deste reagente, não houve variação nos valores de absorvância a 540 nm (Figura 30). Portanto, os controles descritos não indicaram interferência do composto fenólico com o produto da reação enzimática, e nem com o reagente cromoforo DNS utilizado no ensaio. A partir destes dados conclui-se que o efeito ativador do ácido ferúlico apresentado na Figura 28, corresponde somente à interação deste composto com a enzima HXYN2.

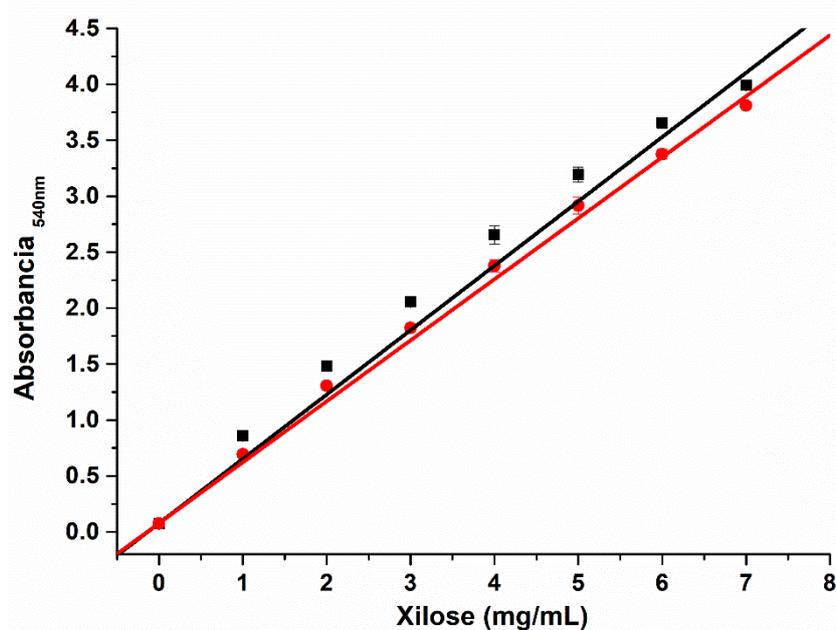


Figura 29. Curva padrão para a reação de oxidação-redução do reagente DNS pelo açúcar xilose, na ausência e presença de ácido ferúlico (1 mg/mL). O ensaio foi realizado em

tampão GCF 20 mM pH 6,0 e xilose na concentração variando entre 0 e 7 mg/mL, na temperatura de 100 °C por 5 min na presença de DNS.

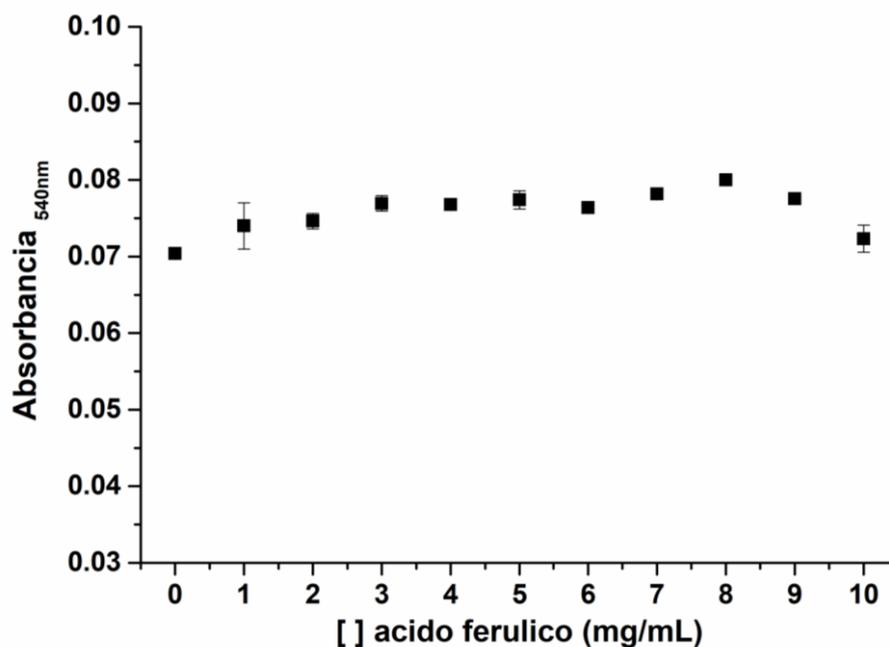


Figura 30. Efeito do ácido ferúlico no controle negativo da reação de oxidação-redução do reagente DNS. O ensaio foi realizado em tampão GCF 20 mM pH 6,0, variando a concentração de ácido ferúlico entre 0 a 10 mg/mL, incubado a 100 °C por 5 min na presença de DNS.

6.4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da HXYN2

A velocidade de hidrólise da HXYN2 foi determinada variando a concentração de substrato nas condições ótimas de temperatura e pH. Os valores de K_M e $V_{máx}$, estimados a partir da curva apresentada na Figura 31, foram 1,83 mg/mL e 72,37 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente, com $R^2 = 0,9718$, compatíveis com a alta afinidade da enzima pelo substrato. A partir destes parâmetros, a constante catalítica (k_{cat}) e a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), foram definidas, sendo 180,92 min^{-1} e 98,86 ($\text{mL}/\text{min} \cdot \text{mg}$), respectivamente.

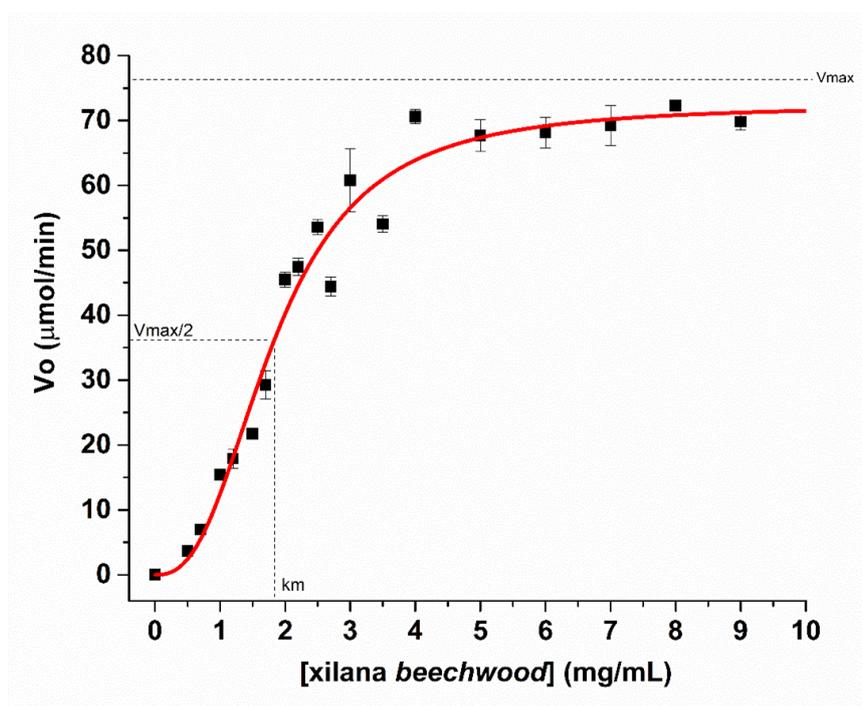


Figura 31. Cinética enzimática da HXYN2 apresentando o efeito da concentração do substrato xilana *beechwood* sobre a velocidade de hidrólise da HXYN2. A concentração de substrato variou entre 0,5 a 9 mg/mL.

A cinética enzimática da HXYN2, utilizando o substrato xilana *beechwood*, não apresentou a tendência hiperbólica típica da cinética de Michaelis-Menten, mas sim uma curva sigmoide. Isto sugere que esta enzima pode promover a catálise utilizando mais de um substrato. O comportamento da cinética sigmoide em geral está associado com interações cooperativas, que serão interpretadas para a HXYN2 com mais detalhes na seção 6.8.1.

Os parâmetros cinéticos da HXYN2 nativa e recombinante foram anteriormente determinados por Carvalho (2003 e 2008) utilizando o substrato xilana *oat spelt*. Neste caso os valores para o K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram 4,38 mg/mL e 3,32 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e 7,9 mg/mL e 235,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente (Tabela 5). No presente trabalho de tese, os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando um substrato diferente, a xilana *beechwood*. Comparando-se estes parâmetros para a enzima recombinante, utilizando os dois substratos diferentes, nota-se que o valor de K_{app} para a xilana *beechwood* foi aproximadamente 4,5 vezes menor do que o K_M obtido para a xilana *oat spelt*. Estes dados sugerem que a diferença na composição dos substratos é determinante para afinidade da enzima, a qual apresentou, além da característica de cinética alostérica, maior afinidade pelo substrato *beechwood*.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da HXYN2 nativa (Carvalho, 2003) e da HXYN2 recombinante na presença de xilana *oat-spelt* (OS) (Carvalho, 2008) e *beechwood* (BeW) obtidos neste trabalho.

Parâmetros cinéticos	HXYN2 nativa	HXYN2 recombinante (OS)	HXYN2 recombinante (BeW)
K _M (mg/mL)	4,38	7,9	1,83
V _{máx} (μmol/min)	3,32	235,4	72,37

Diferenças na afinidade de xilanases para esses substratos também foram relatadas por outros autores (Liao et al., 2015; Maitan-Alfenas et al., 2016). Nestes, as diferenças na composição e estrutura dos substratos xilana *beechwood* e xilana *oat spelt* foi devido principalmente à presença de ácido 4-O-metil-D-glucurônico no O2 e arabinofuranose no O2 e/ou O3 nas ramificações da xilana, respectivamente (Puls et al., 1991; Saake et al., 2003). Estas diferenças estão de acordo com o modelo estrutural de HXYN2 aqui apresentado, onde o resíduo R138 conservado (Figura 21B) está localizado próximo (menos de 3Å) à arabinofuranose da xilana *oat spelt*. Curiosamente, a presença de ácido glucurônico, um monossacarídeo carregado negativamente presente na estrutura da xilana *beechwood*, poderia explicar o aumento da afinidade de HXYN2 por este substrato, de acordo com os parâmetros cinéticos de HXYN2 mostrados na Tabela 5.

Adicionalmente, o ajuste da curva da cinética da HXYN2 resultou em um número de sítios de ligação do substrato igual a 2,58, o que não corresponde às características cinéticas das endoxilanases da família GH11, já que apresentam apenas um sítio. Considerando que a xilana é um heteropolissacarídeo com diferentes arranjos estruturais, a hidrólise por endoxilanases libera diversos xilooligossacarídeos (XOS) como xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose, dependendo do tipo de xilana (Liu et al., 2019; Velasco et al., 2019). Consequentemente, estes XOS também são considerados substratos e, por apresentarem estruturas diferentes, podem interagir com diferentes subsítios localizados no bolsão catalítico, por reconhecimento estrutural e eletrostático. Portanto, esta formação de complexos enzima-substrato com diferentes fragmentos de xilana sugere que a HXYN2 apresenta mais de um sítio responsável pelo reconhecimento e afinidade ao substrato, o que está de acordo com a cinética sigmoideal apresentada na Figura 31.

Han e colaboradores (2019) relataram características cinéticas semelhantes de uma xilanase GH10 de *Marinifilaceae bacterium*. Esta enzima, XynSPP2, apresentou

valores de K_M e k_{cat} de 0,97 mg/mL e $178,19 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, na hidrólise de xilana *beechwood*, além da capacidade de hidrolisar xilooligossacarídeos como xilopentose e xilotetraose. Esta hidrólise foi possível devido a mudanças de dois resíduos de aminoácidos que ocupam os subsítios -2 (Asn/Trp) e -3 (Gln/Ser). Estas substituições resultaram no aumento da afinidade desses subsítios à resíduos de xilose, promovendo a ligação de alta afinidade e específica entre os resíduos aromáticos e a xilose, sendo determinante para a hidrólise eficaz de xilooligossacarídeos de menor tamanho.

O gráfico de duplo recíproco (Figura 32) obtido a partir do ajuste linear da curva da cinética de HXYN2 resultaram nos parâmetros catalíticos como $K_{app}/V_{máx}$ de $0,03298 \pm 0,00373$ (inclinação da reta) e $1/V_{máx}$ de $0,01312 \pm 0,00045$ (intersecção no eixo $1/V_o$), o que correspondem aos valores de K_{app} e V_{max} de 2,51 mg/mL e 76,22 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

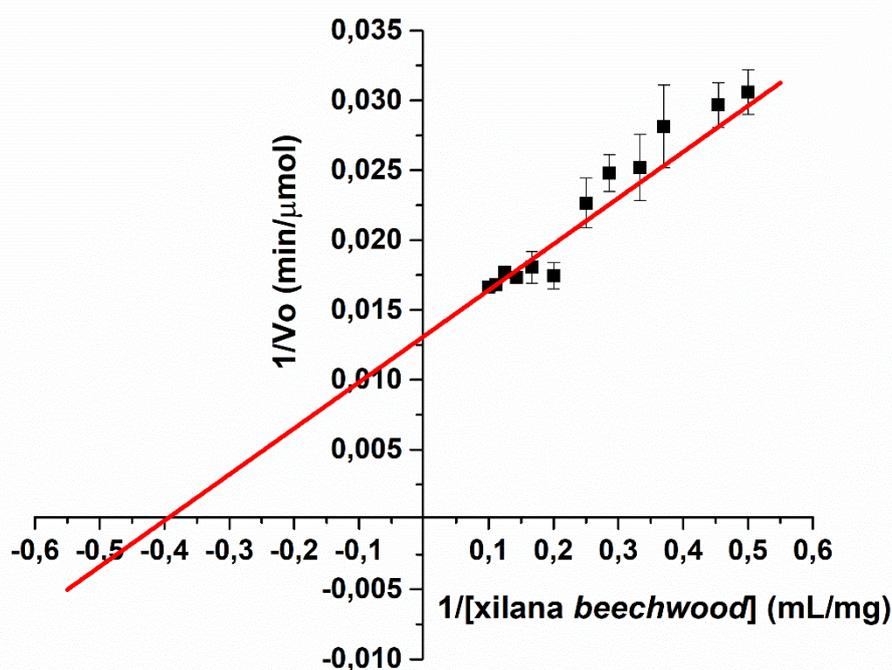


Figura 32. Gráfico duplo-recíproco obtido a partir da curva de cinética enzimática da HXYN2.

Estes parâmetros cinéticos da HXYN2 foram alterados na presença do ácido ferúlico (Figura 33), conforme apresentado na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da HXYN2 na ausência e na presença do Ácido ferúlico (AF) (Oliveira et al, 2022).

Parâmetros	K_{app} (mg/mL)	$V_{máx}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	n	kcat (min^{-1})	kcat/ K_{app} ($\text{mL}/\text{min}\cdot\text{mg}$)
HXYN2	$2,24 \pm 0,108$	$64,49 \pm 1,023$	$1,76 \pm 0,065$	161,22	71,97
HXYN2 + AF (0,25 mg/mL)	$1,75 \pm 0,05$	$56,71 \pm 1,109$	$2,38 \pm 0,206$	141,78	81,01
HXYN2 + AF (0,5 mg/mL)	$2,09 \pm 0,031$	$117,21 \pm 1,260$	$1,85 \pm 0,966$	293,02	140,20
HXYN2 + AF (1 mg/mL)	$2,38 \pm 0,144$	$167,22 \pm 8,120$	$1,93 \pm 0,051$	418,07	175,65

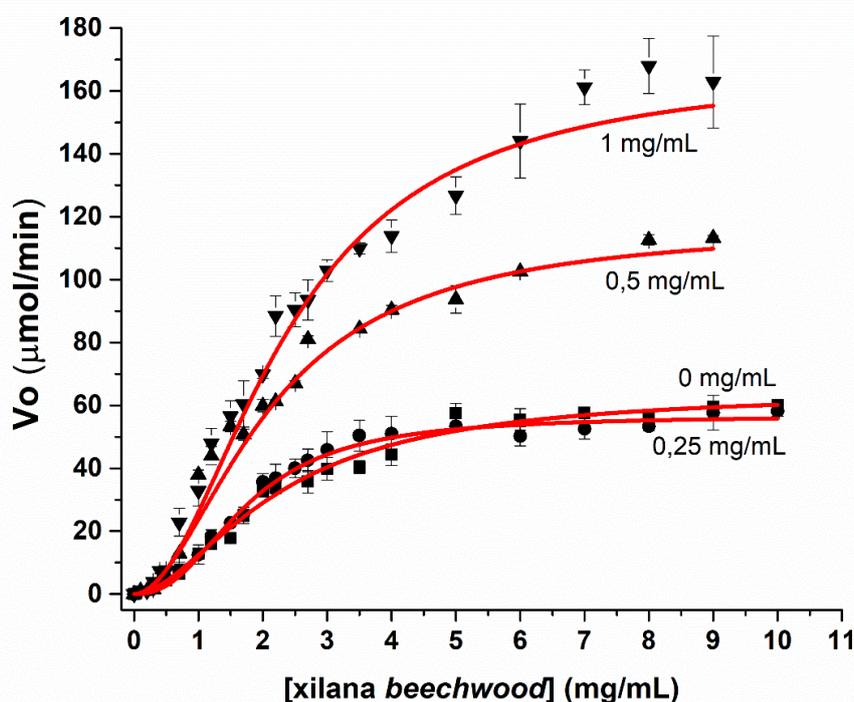


Figura 33. Cinética enzimática da HXYN2 na ausência (quadrados – 0 mg/mL AF) e presença do AF: 0,25 mg/mL (círculos), 0,5 mg/mL (triângulos) e 1 mg/mL (triângulo invertido) (Oliveira et al, 2022).

O gráfico da cinética enzimática da HXYN2 com o aumento da concentração de ácido ferúlico (Figura 33) resultou em parâmetros cinéticos diferentes (Tabela 6 e 7). Na presença de AF 0,25 mg/mL, a velocidade máxima foi mantida e o valor de K_{app} foi levemente menor, sugerindo que nessa concentração o ácido ferúlico promove leve aumento da afinidade da enzima para o substrato. Com o aumento da concentração, 0,5 e 1 mg/mL, a velocidade máxima aumentou e o K_{app} foi semelhante àquele obtido na ausência do AF. Esta cinética indica que o AF atua como um ativador da HXYN2 na hidrólise da xilana *beechwood* (Figura 28) e não compete com o substrato na região do

sítio ativo. Portanto, o AF modula positivamente a atividade enzimática, influenciando na eficiência cinética da HXYN2, com o aumento nos valores de k_{cat} e da eficiência catalítica. A constante k_{cat} equivale ao número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo por uma única molécula de enzima. O aumento dos valores de k_{cat} com o aumento da concentração de AF (tabela 6) está diretamente relacionado ao aumento da eficiência catalítica da HXYN2. A interação do AF com resíduos de aminoácidos próximos ao sítio catalítico promove mudanças conformacionais que potencializam o processo catalítico, o que corrobora os resultados obtidos por espectroscopia de fluorescência, conforme apresentados no item 6.7.1.

Estes mesmos parâmetros cinéticos obtidos a partir do gráfico duplo recíproco (Figura 34) estão apresentados na tabela 7.

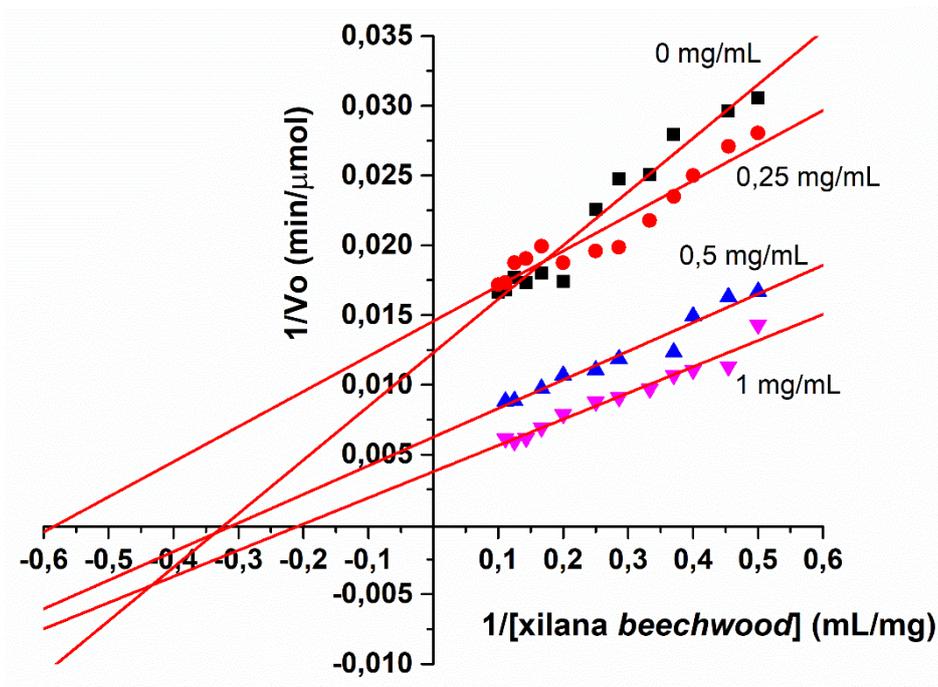


Figura 34. Gráfico de Lineweaver-Burk (representação de duplo-recíproco) da HXYN2 na presença do AF, obtido a partir da curva de cinética enzimática no estágio pré-estacionário (Figura 33).

Tabela 7. Parâmetros cinéticos obtidos a partir do gráfico de duplo recíproco da HXYN2 na ausência e na presença do AF.

Parâmetros	$1/V_{\text{máx}}$ (intercept)	$K_{\text{app}}/V_{\text{máx}}$ (slope)	K_{app} (mg/mL)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ ($\text{mL}/\text{min}\cdot\text{mg}$)
HXYN2	$0,01229 \pm 0,0007$	$0,03844 \pm 0,00257$	3,12	81,36	203,40	65,19
HXYN2 + AF (0,25 mg/mL)	$0,01456 \pm 0,0006$	$0,02518 \pm 0,00227$	1,72	68,68	171,70	99,82
HXYN2 + AF (0,5 mg/mL)	$0,00626 \pm 0,0004$	$0,02052 \pm 0,00157$	3,27	159,74	399,35	122,12
HXYN2 + AF (1 mg/mL)	$0,00378 \pm 0,0003$	$0,01879 \pm 0,00122$	4,97	264,55	661,37	133,07

Os parâmetros apresentados na tabela 7 mostram o aumento dos valores de K_{app} e $V_{\text{máx}}$ nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL de AF. Considerando a possibilidade da HXYN2 realizar a catálise enzimática com mais de um substrato, o aumento no valor de K_{app} sugere que a enzima, na presença de AF, pode assumir conformação estrutural favorável para mais de um estado de transição (complexo Enzima + Substrato). Esta mudança conformacional favorece a associação do mesmo substrato de diferentes tamanhos, sem alterar a afinidade da enzima pelo substrato, o que está de acordo com a alta eficiência catalítica indicada pelos valores de $V_{\text{máx}}$ e k_{cat} .

O aumento na afinidade de xilanases de *A. terreus* na presença de AF foi demonstrado por Moreira e colaboradores (2013), indicado pelos valores de K_M de 13 mg/mL (ausência de AF) para 0,25 mg/mL (presença de AF). Em contraste, o AF inibiu a atividade de α -amilase e α -glucosidase comerciais (Sigma-Aldrich Chemical, USA) e o mecanismo de inibição foi sugerido com base nos parâmetros cinéticos estimados a partir do gráfico de Lineweaver-Burk (Zheng et al, 2020). O valor de K_M aumentou acompanhado do aumento crescente da velocidade máxima com o aumento da concentração de AF de 0 para 0,4 mg/mL, indicando um mecanismo de inibição mista. Por outro lado, para uma α -glucosidase, os valores de K_M permaneceram os mesmos, enquanto os valores de velocidade máxima diminuíram, o que caracteriza o AF como um inibidor não competitivo da α -glucosidase (Zheng et al, 2020).

6.4.6 Efeito do ácido ferúlico na estrutura-função da HXYN2

Conforme indicado pelos modelos estruturais, o AF pode interagir com os resíduos de aminoácidos que formam a região aglicona, que desempenham um papel importante na função das xilanases GH11 (Figura 60). A maioria dos resíduos que

formam essa região (Y112, N113, P114, G115, S116, Q117, A118) está localizada no “cordão” (Figura 20). O cordão é uma longa alça que conecta os “dedos” com a base do polegar, flanqueia o subsítio da região aglicona +3 e fecha parcialmente o sítio ativo das xilanases (Pollet et al., 2010; Päes, Berrin & Beaugrand, 2012). O “cordão” é muito flexível, exceto no meio (Figura 20) devido à presença de um resíduo de prolina, que define a conformação adequada da alça (Freitas et al., 2003; Päes, Berrin & Beaugrand, 2012). Embora o “cordão” seja descrito como parte da estrutura das xilanases GH11, sua funcionalidade tem sido pouco abordada (Pollet et al., 2010).

O maior comprimento do “cordão” da BsXynA xilanase de *Bacillus subtilis* ocasionou um aumento de sua atividade e *turnover* enzimático, embora tenha causado uma redução na afinidade pelos substratos testados. Segundo os autores, o “cordão” mais longo do mutante BsXynA pode causar impedimento estérico ao substrato, dificultando a ligação adequada no subsítio +3 que flanqueia o “cordão” (Pollet et al., 2010).

A formação do complexo HXYN2-AF indicou que a ligação do AF no subsítio +3 induz mudanças conformacionais no sítio ativo sem alterar sua afinidade pelo substrato xilana. Estes dados estão de acordo com os valores de K_M que foram mantidos constantes, bem como com os dados obtidos por espectroscopia de fluorescência e cinética enzimática (Tabela 6, Figura 33, Figura 45 e Figura 46). No entanto, a presença de AF neste sítio pode induzir um aumento no número de *turnover* da enzima e, conseqüentemente, potencializar sua atividade e a liberação do primeiro produto de hidrólise associado à mudança conformacional entre as formas “B aberto” e “A fechado” (Pollet et al., 2010).

Na Figura 35 está apresentada a região provável de ligação do ácido ferúlico (AF), região aglicona, na estrutura tridimensional predita da HXYN2 e o efeito do AF nos parâmetros cinéticos, mostrando o aumento na eficiência catalítica e a afinidade da enzima inalterada.

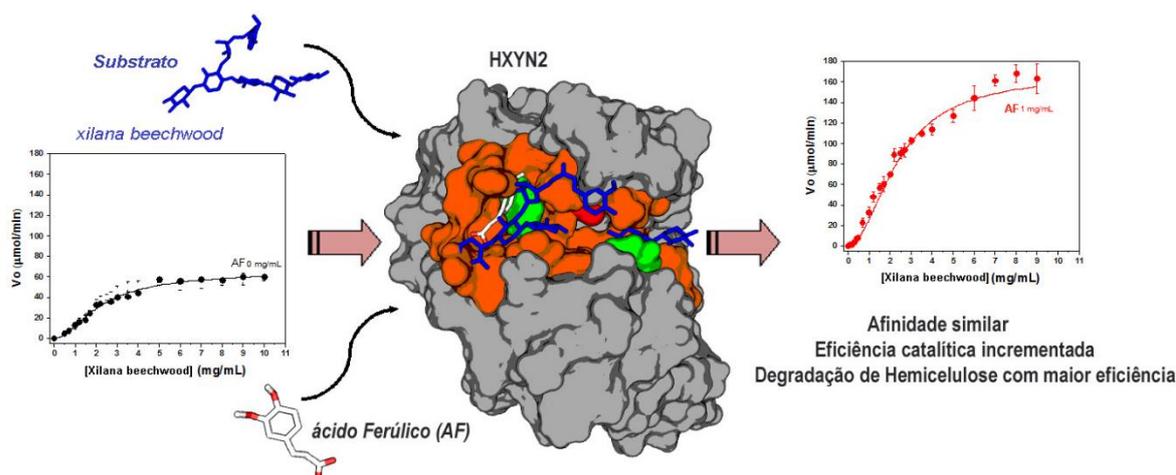


Figura 35. Representação esquemática do efeito do ácido ferúlico na estrutura e função da HXYN2, destacando a cinética enzimática na ausência e na presença e a provável região que este composto se liga na estrutura tridimensional predita.

Neste trabalho, investigamos mais detalhadamente a interação entre o AF e a HXYN2 por meio da calorimetria de titulação isotérmica e atenuação de fluorescência, cujos resultados estão apresentados nas seções 6.5 e 6.7.1.

6.5 Análise da interação HXYN2-AF por Calorimetria de titulação isotérmica (CTI)

A termodinâmica da interação de HXYN2 com AF foi analisada por calorimetria de titulação isotérmica por meio da injeção do composto fenólico na solução enzimática. Conforme mostrado no perfil de titulação (Figura 36), o processo de interação é complexo. A isoterma de ligação foi ajustada a diferentes modelos e o melhor ajuste foi com quatro sítios de interação sequenciais. Este modelo é útil para sistemas com sítios não idênticos, como a ligação de múltiplos ligantes a íons de metais de transição e associação em nanocompósitos (Gomes et al., 2018).

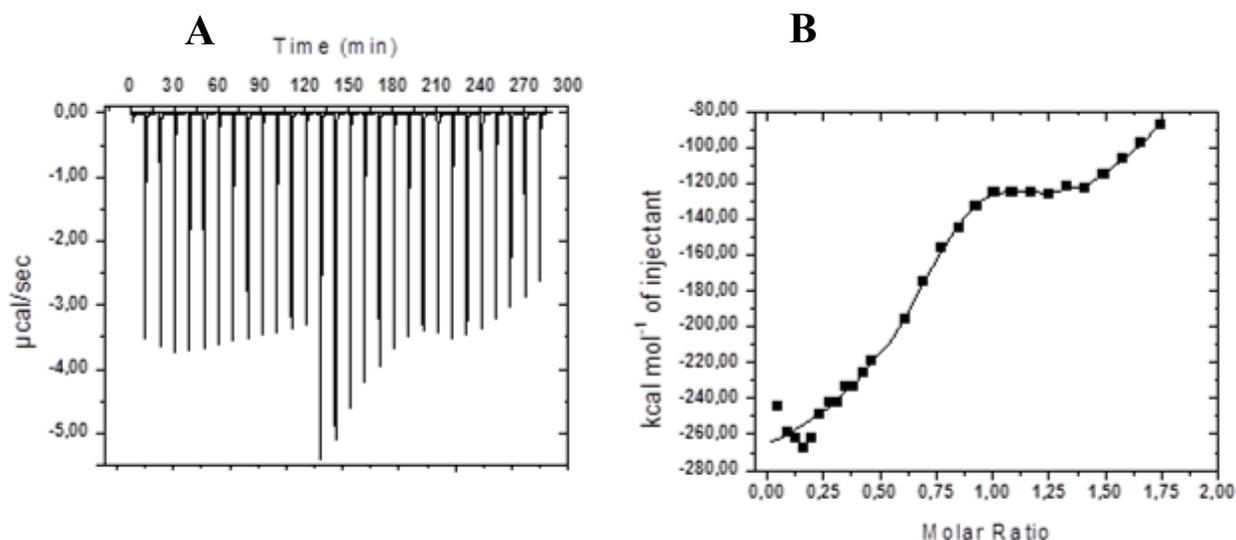


Figura 36. Calorimetria de titulação isotérmica de HXYN2 com AF. (A) Respostas calorimétricas com injeções sucessivas de 0,1 mM de AF em 9,61 μM de HXYN2 na célula da amostra. A titulação foi realizada em tampão glicina-citrato-fosfato 20 mM pH 6,0 e 298 °K. (B) Integração dos picos da curva isoterma para o cálculo de calor liberado após cada injeção. A linha sólida representa o melhor ajuste a um modelo de ajuste de quatro sítios de ligação sequenciais (Oliveira et al, 2022).

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos da interação de HXYN2 com AF (Oliveira et al, 2022).

Sítios de interação	ΔH (kcal/mol)	K (10^6 M^{-1})	K_d (μM)	ΔS (kcal/ $^\circ\text{K}\cdot\text{mol}$)	T ΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
1	$-266,3 \pm 3,1$	$14,70 \pm 22,00$	0,07	-0,86	-256,3	-10,0
2	$518,5 \pm 190,0$	$0,48 \pm 0,17$	0,08	1,77	527,5	-9,0
3	$-1741,0 \pm 330,0$	$1,18 \pm 0,78$	0,85	-5,81	1731,4	-9,6
4	$2608,0 \pm 533,0$	$0,43 \pm 0,29$	2,32	8,77	2613,5	-5,5

ΔH : entalpia de ligação, K: constante de ligação, K_d : constante de dissociação, ΔS : entropia e ΔG : energia livre de Gibbs.

A partir do ajuste da isoterma (Figura 36), quatro sítios distintos foram identificados, com constantes de ligação variando de 0,43 a $14,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 8), o que equivale a uma constante de dissociação (K_d) de 2,32 a 0,068 μM . Os processos de ligação são espontâneos, conforme indicado pelos valores de energia livre de Gibbs de -5,5 a -10,0 kcal/mol. Pelo menos dois estágios termodinâmicos independentes são identificados na isoterma (Figura 36A e 36B). Um estágio inicial fortemente exotérmico, em razões molares abaixo do equimolar entre enzima e AF, e um segundo estágio endotérmico acima da equimolaridade (Tabela 8), foram observados. O estágio inicial é um processo direcionado por entalpia associado aos sítios de ligação 1 e 3 e dependente da temperatura, conforme indicado pelos valores negativos de entalpia e entropia. Além disso, esse estágio inicial pode ser atribuído principalmente à formação

do complexo HXYN2-AF por dois sítios com afinidade diferente ($K_d \sim 0,068$ e $0,85 \mu\text{M}$, respectivamente). O sítio 1 é o melhor para a ligação de AF a HXYN2 com constante de ligação de $14,70 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_d \sim 0,068 \mu\text{M}$), seguido pelo sítio 3 com uma afinidade 10 vezes menor ($K_d \sim 0,85 \mu\text{M}$). Os parâmetros termodinâmicos dos sítios de ligação 1 e 3 estão de acordo com os resultados obtidos para a interação de AF com albumina sérica bovina, utilizando um modelo de ligação de dois sítios (Ojha et al., 2012). Considerando que o estágio inicial a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ é fortemente entálpico, mas entropicamente desfavorável, e que o AF é carregado negativamente em pH 6 ($\text{pK} = 4,58$) (Ojha et al., 2012), espera-se que as interações nos sítios 1 e 3 ocorram por meio de ligações de hidrogênio.

O segundo estágio fortemente endotérmico foi atribuído aos sítios de ligação 2 e 4 e caracterizado como ligação espontânea (ΔG de $-5,5$ e $-9,0 \text{ kcal/mol}$, respectivamente), com constante de ligação semelhante de $\sim 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_d \sim 2,5 \mu\text{M}$), inferiores aos dos sítios 1 e 3 (Tabela 8). Conforme indicado pelos parâmetros termodinâmicos, os sítios de ligação 2 e 4 são entalpicamente desfavorecidos, mas entropicamente favorecidos, o que caracteriza um processo dirigido por entropia. Esse processo termodinâmico indica uma interação hidrofóbica clássica entre AF e a enzima nos sítios 2 e 4, em que moléculas de água são liberadas da interface proteica, com redução significativa nos graus de liberdade das moléculas. Devido à complexidade dos resultados de CTI, processos termodinâmicos envolvendo os quatro sítios de interação também podem estar associados a alterações conformacionais da enzima induzidas pela ligação de AF. Os dados de CTI sugerem que a interação de AF com HXYN2 ocorre principalmente por meio de estágios iniciais e finais como processos acionados por entalpia e entropia, respectivamente, com pelo menos um ou dois sítios de ligação que envolvem mudanças conformacionais da proteína.

6.6 Análise de parâmetros hidrodinâmicos da HXYN2 por Ultracentrifugação Analítica

Experimentos de ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação (UCA-VS) foram realizados para calcular o efeito da concentração das proteínas sobre o estado de associação, a massa molecular estimada, o perfil de oligomerização das moléculas e a aproximação da forma hidrodinâmica (esférica ou alongada) da HXYN2.

As análises foram realizadas usando a proteína HXYN2 nas concentrações $0,38$; $0,2$ e $0,1 \text{ mg/mL}$ em tampão Tris HCl 50 mM pH $7,0$ e NaCl $0,15 \text{ M}$. Representações

dos dados de sedimentação com os melhores ajustes da equação de Lamm são apresentados nas Figuras 37, 38 e 39, enquanto a distribuição contínua do coeficiente de sedimentação nas três concentrações é apresentada na Figura 37. Todos os coeficientes de sedimentação exibidos foram ajustados para condições padrão, ou seja, coeficientes de sedimentação de amostras a 20 ° C em água ($S_{20, w}$).

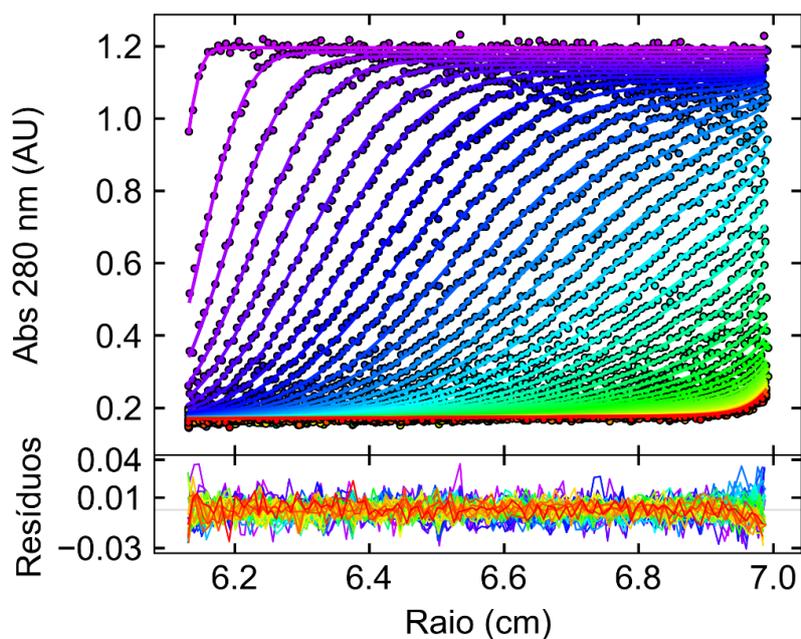


Figura 37. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,38 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo *SEDFIT* com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorbância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados (Oliveira et al, 2022).

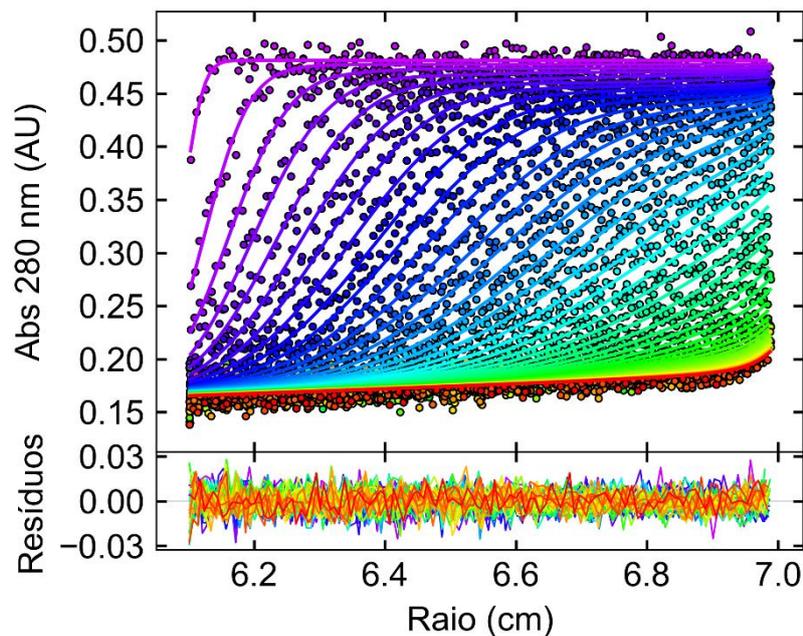


Figura 38. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,2 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo *SEDFIT* com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorvância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados (Oliveira et al, 2022).

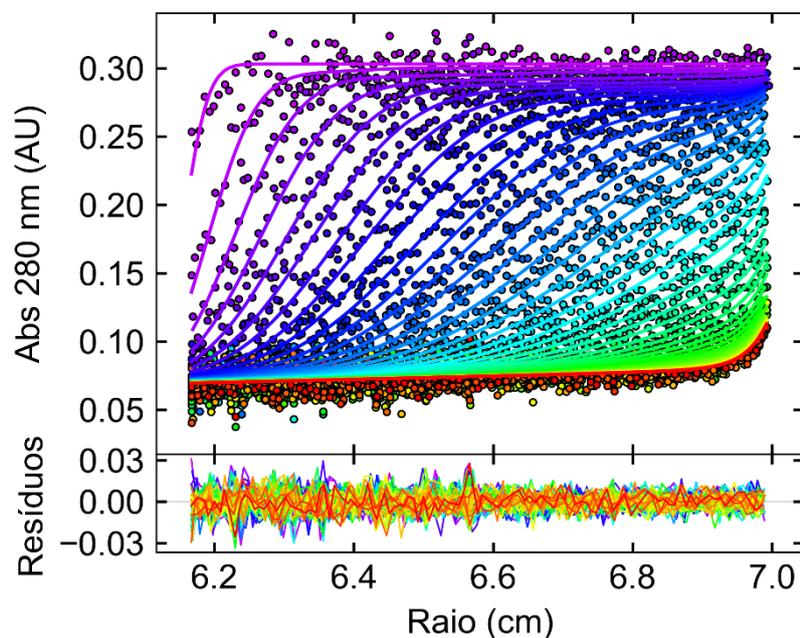


Figura 39. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,1 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 0,15 M. O ajuste foi realizado pelo *SEDFIT* com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorvância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados (Oliveira et al, 2022).

As curvas experimentais sobrepostas às ajustadas pelo software *SEDFIT* e a distribuição uniforme dos resíduos variando em torno de zero, indicam que o ajuste dos dados foi adequado (rmsd \sim 0,007). O perfil de sedimentação obtido após as análises no software *SEDFIT* permitiu determinar parâmetros hidrodinâmicos da proteína, como a razão friccional (f/f_0), o raio de Stokes (nm), o coeficiente de sedimentação ($S_{20, w}$) e a massa molecular (MM), apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros hidrodinâmicos obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação (UCA-VS) para amostras da proteína HXYN2 em três concentrações diferentes.

Parâmetros	Cel. 1	Cel. 2	Cel. 3
Concentração (mg/mL)	0,38	0,2	0,1
Rmsd	0,0074	0,0070	0,0071
f/f_0	1,18	1,16	1,19
Raio de Stokes (nm)	2,19	2,15	2,24
MM (kDa)	22,52	22,33	23,14
$S_{20, w}$ (S)	2,58	2,60	2,59

A razão friccional fornece informações sobre a simetria e a forma da proteína em solução, e o raio de Stokes corresponde ao raio hidrodinâmico da partícula. Os valores de f/f_0 obtidos nas três concentrações são semelhantes e próximos de 1, o que corresponde a proteínas globulares, considerando-se a simetria indicada pelos valores semelhantes da razão friccional e raio de Stokes (raio hidrodinâmico) (Laue & Stafford, 1999; Laue, 2001; Lebowitz et al, 2002). Estes dados sugerem que a proteína HXYN2 em pH 7,0 apresenta forma de monômero inalterada, mesmo diante do aumento da concentração, sem evidência de associação proteína-proteína.

As curvas de distribuição, $c(s)$, dos coeficientes de sedimentação para as três concentrações de HXYN2 (Figura 40) apresentaram apenas um pico, com coeficiente de sedimentação médio de 2,59 (tabela 9), o que representa a contribuição de uma população homogênea e estável. Este resultado é coerente com os dados do raio hidrodinâmico, já que este pico corresponde a moléculas com massa molecular de 23 kDa, aproximadamente. Nestas condições, portanto, a HXYN2 se encontra em forma monomérica.

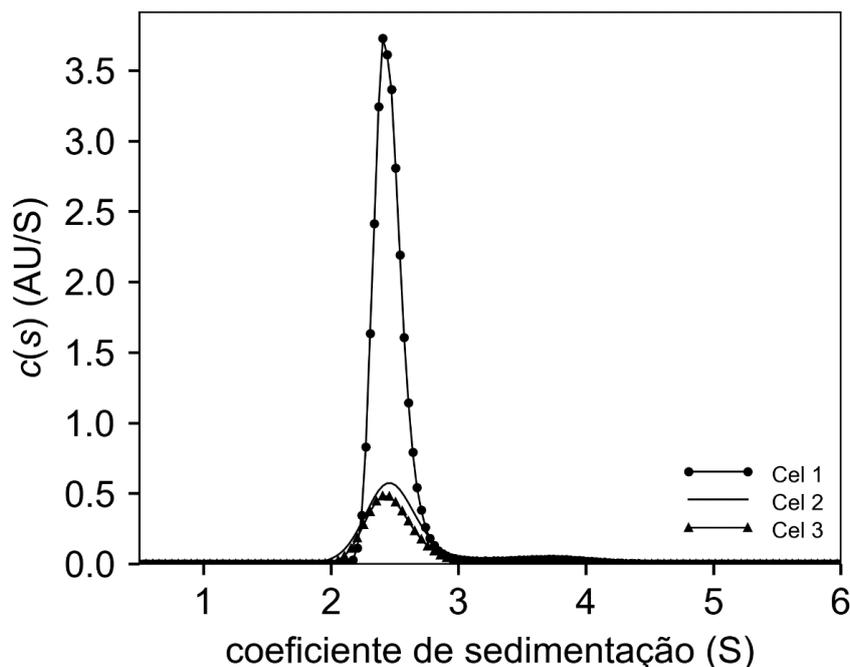


Figura 40. Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da HXYN2 em diferentes concentrações. As curvas foram obtidas com um procedimento de normalização a partir dos dados apresentados nas Figuras 37, 38 e 39. Linha preta com círculo: coeficiente de sedimentação da amostra mais concentrada (0,38 mg/ mL); linha sólida: coeficiente de sedimentação da amostra com 0,2 mg/mL e linha preta com triângulo: coeficiente de sedimentação da amostra menos concentrada (0,1 mg/ mL) (Oliveira et al, 2022).

Estes dados mostram que a HXYN2 não apresenta perfil de oligomerização em pH 7,0, mesmo com o aumento da concentração de proteína. O perfil de sedimentação da HXYN2, na concentração de 0,2 mg/mL, foi também avaliado em pH 4,0 e 9,0. As Figuras 41 e 42 apresentam os dados de sedimentação com os melhores ajustes da equação de Lamm em pH 4,0 e pH 9,0, respectivamente.

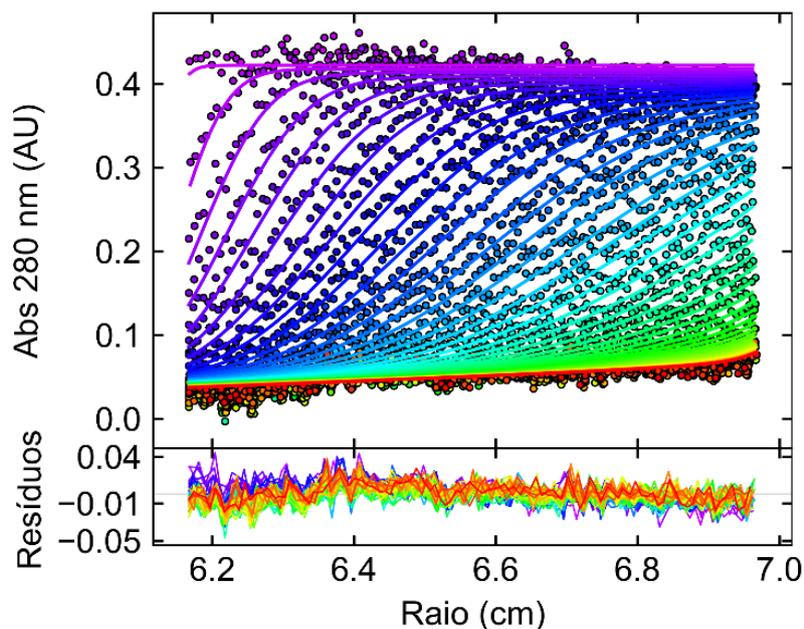


Figura 41. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,2 mg/mL em acetato de sódio 50 mM pH 4,0. O ajuste foi realizado pelo *SEDFIT* com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorvância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados (Oliveira et al, 2022).

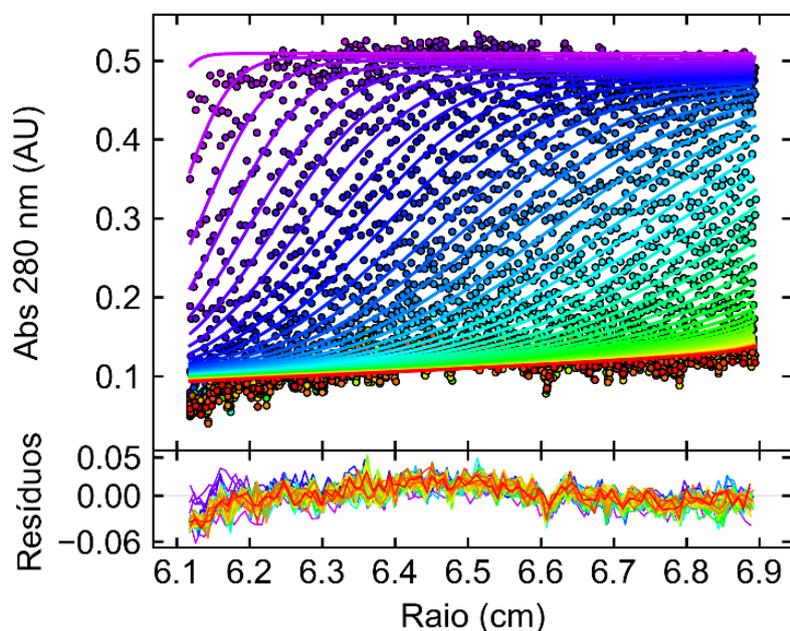


Figura 42. Perfil de sedimentação da HXYN2 na concentração 0,2 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 9,0. O ajuste foi realizado pelo *SEDFIT* com dados de UCA-VS. O gráfico acima apresenta perfis de sedimentação e de absorvância a 280 nm em relação à distância radial (raio) da célula. Na parte inferior, os valores de erro residual dos dados ajustados são apresentados (Oliveira et al, 2022).

A tabela 10 apresenta os parâmetros relacionados à simetria e ao raio hidrodinâmico das moléculas e o coeficiente de sedimentação para os três pH, obtidos a partir do perfil de sedimentação. A razão friccional (f/f_0) e o raio de Stokes são semelhantes entre os pH ácido, neutro e básico, sugerindo que a HXYN2 permanece na forma de monômero, mesmo com a variação no pH.

Tabela 10. Parâmetros hidrodinâmicos obtidos a partir do ajuste dos dados de sedimentação (UCA-VS) para HXYN2 em pH 4,0, 7,0 e 9,0 (Oliveira et al, 2022).

Parâmetros	pH 4,0	pH 7,0	pH 9,0
Concentração (mg/mL)	0,2	0,2	0,2
Rmsd	0,0104	0,0070	0,0154
f/f_0	1,2	1,16	1,2
Raio de Stokes (nm)	2,21	2,15	2,20
MM (kDa)	21,95	22,33	22,08
$S_{20,w}$ (S)	2,49	2,60	2,50

Os coeficientes de sedimentação, determinados a partir das curvas de distribuição para os pH 4,0, 7,0 e 9,0 (Figura 43), apresentam o valor médio de 2,53, representados em um pico. Estes dados são semelhantes àqueles apresentados para a variação de concentração da HXYN2 e indicam a presença de uma população monomérica homogênea e estável, considerando-se que este pico corresponde a moléculas com massa molecular de aproximadamente 22 kDa.

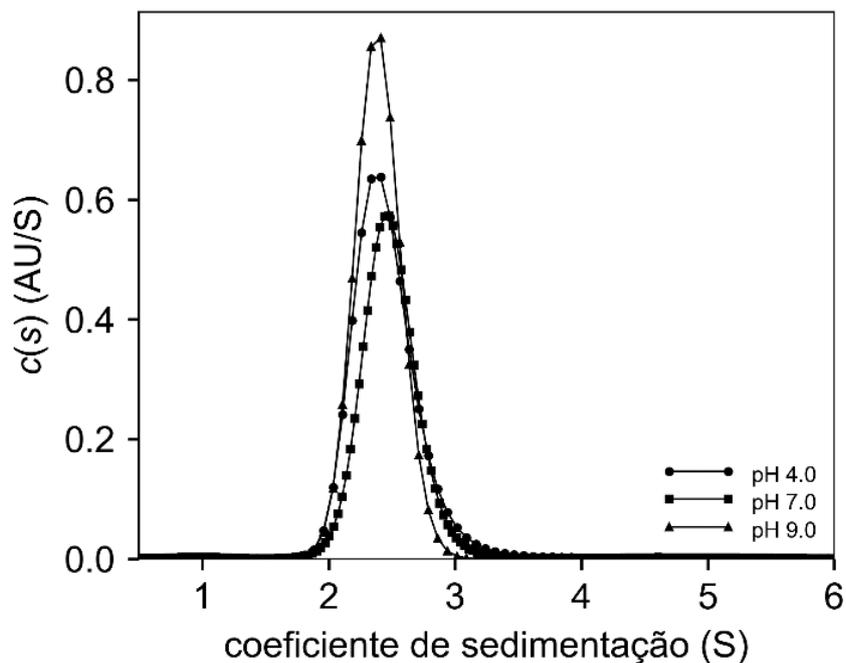


Figura 43. Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da HXYN2 em diferentes pH. As curvas foram obtidas com um procedimento de normalização a partir dos dados apresentados nas Figuras 40, 37 e 41. Linha com círculo: coeficiente de sedimentação da HXYN2 em pH 4,0; linha com quadrado: coeficiente de sedimentação da amostra em pH 7,0 e linha com triângulo: coeficiente de sedimentação da amostra em pH 9,0 (Oliveira et al, 2022).

Estes resultados indicam que a HXYN2 não apresenta a tendência de auto associação, mesmo apresentando resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente na superfície da molécula (Freitas et al., 2003), o que poderia favorecer a formação de oligômeros. O aumento da concentração de proteína e a mudança de pH do meio em que se encontra não são determinantes para o processo de oligomerização, considerando que a HXYN2 se mantém na forma monomérica, mesmo nestas condições.

6.7 Caracterização estrutural da HXYN2

6.7.1 Variação conformacional da enzima HXYN2 avaliada por espectroscopia de fluorescência

Espectros de emissão de fluorescência em diferentes pH foram obtidos para avaliar mudanças na estrutura terciária da HXYN2. Na Figura 44, as bandas de emissão apresentam variação na intensidade para cada pH estudado.

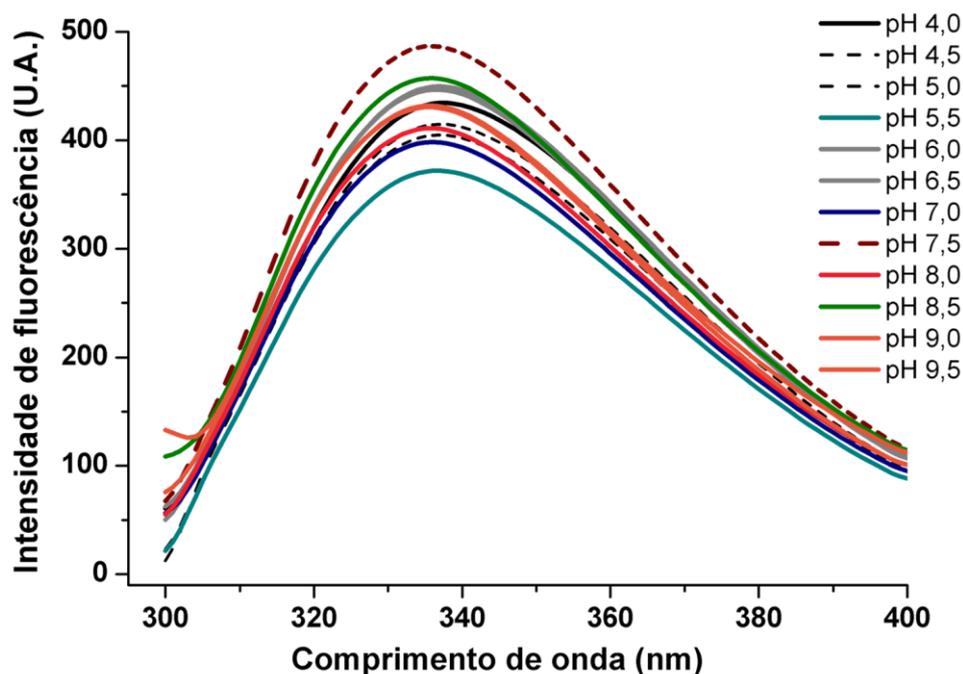


Figura 44. Espectros de fluorescência da HXYN2 com variações na intensidade da banda em ~ 335 - 337 nm, nos pH 4,0-9,5. A concentração de HXYN2 foi de 0,04 mg/mL e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio 10 mM para pH 4,0-6,0, Tris-HCl 10 mM para pH 6,5-9,0 e glicina 10 mM pH 9,5.

O espectro de emissão em pH 5,5 apresentou um pico de intensidade menor centrado no comprimento de onda de 337 nm, e o maior pico de intensidade foi obtido no pH 7,5 em 336 nm (Figura 45). As bandas de emissão apresentaram deslocamento de 337 para 335 nm da faixa de pH ácido (4,0-6,5) para neutro e básico (7,0-9,5), condizentes com resíduos de triptofano expostos ao solvente e discretas mudanças do ambiente micromolecular e do reposicionamento das cadeias laterais destes resíduos. Estes resultados sugerem que a variação de pH resultou em discretas mudanças da estrutura terciária da HXYN2 em pH 5,0-9,0 do que em pH 4,0, 4,5 e 9,5, concordando com suas atividades enzimáticas que foram mantidas na faixa de 80-100% e 25-65%

nesses pH, respectivamente. Ullah e colaboradores (2019) observaram que a partir de pH 5,0, as bandas de emissão da endoxilânase GH10 de *Penicillium chrysogenum* se mantiveram centradas no comprimento de onda de 337 nm até o pH 6,0. A partir deste pH houve um deslocamento para 336 nm, mantendo-se centrada em 335 nm em pH 9,0. Similarmente, estes dados indicam que a estrutura terciária destas proteínas são alteradas levemente com a variação de pH.

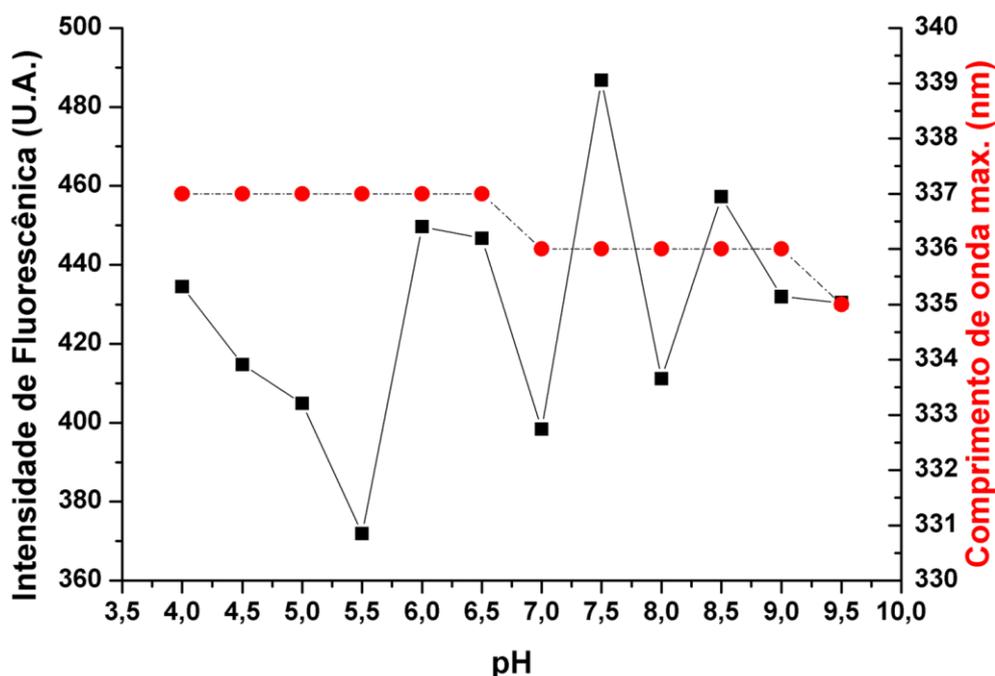


Figura 45. Variação da intensidade de fluorescência (preto) e deslocamento das bandas de emissão (vermelho) da HXYN2 nos pH 4,0 – 9,5.

As bandas de emissão no pH ótimo da enzima (pH 6,0 e 6,5) e na faixa de pH em que sua atividade se mantém superior a 80% (pH 7,0-9,5), apresentam intensidades de fluorescência nos comprimentos de onda 337 e 336 nm. Apesar da mudança do estado de ionização das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, principalmente das histidinas (pH 6,0-7,5), dos ácidos glutâmicos (pH 4,0) e das tirosinas (pH 9,0-10), que se encontram no microambiente dos resíduos de triptofano ou nas proximidades destes, esta variação de pH promove alterações conformacionais discretas na estrutura da HXYN2.

A sequência de aminoácidos da HXYN2 apresenta oito Trp, onde dois deles (W17 e W77), encontram-se próximos a triade catalítica, conforme o modelo tridimensional obtido por homologia (Freitas et al., 2003). Além disso, resíduos de glutamato (E84 e E175) fazem ligações de hidrogênio com resíduos aromáticos da fenda

catalítica, estabilizando a interação destes resíduos com o substrato. O resíduo E84, especificamente, estabiliza os resíduos Q134, Y86 e Y75 do sítio catalítico por meio de ligações de hidrogênio. A estabilidade do resíduo E175, também presente na fenda, é proveniente da interação com o resíduo N43, sendo de fundamental importância para a atividade enzimática da HXYN2, já que a cadeia lateral destes resíduos são influenciadas pelo pH (Freitas et al., 2003). Logo, em todos os pH, os resíduos de aminoácidos E84 e E175 envolvidos na catálise se encontram ionizados, formando um arcabouço catalítico que aumenta a proximidade e interação com o substrato, e consequentemente, maior eficiência catalítica da HXYN2. De acordo com o modelo tridimensional da HXYN2 descrito neste trabalho, as cadeias laterais de três His (H171, H178, H185) estão localizadas a menos de 7 Å da cadeia lateral W175. Da mesma forma, W34, W68, W95, W154 e W175 estão localizados a menos de 6 Å de Y44, Y30, Y93/Y186/Y187, Y89/Y104 e Y153, respectivamente. Estas distâncias podem variar e promover discretas mudanças nesse microambiente, de acordo com a variação de pH. Embora as bandas de emissão no pH ótimo da enzima (pH 6,0) e na faixa de pH onde sua atividade permanece acima de 80% (pH 7,0-9,0) não tenham mudado significativamente, pequenas variações na intensidade de fluorescência foram observadas. Essas variações são alterações típicas do microambiente das cadeias laterais do triptofano, que parecem ser essenciais para a atividade enzimática.

Adicionalmente, conforme indicado na Figura 45, a intensidade de fluorescência variou sob o efeito dos diferentes pHs. Em concordância com os deslocamentos das bandas máximas, estas mudanças da intensidade de fluorescência ocorreram nas faixas de pHs próximas aos valores dos pK_i dos aminoácidos referenciados (glutamato, histidina e tirosina). Estes resultados reforçam as mudanças do padrão de ionização das cadeias laterais destes resíduos, o que levou a alterações conformacionais discretas da enzima que refletem na manutenção da atividade enzimática nos pHs de 5,0-8,0 e na diminuição de praticamente 80 e 30% na atividade da enzima, nos pHs 4,0 e 9,0, respectivamente (Figura 24).

Vale ressaltar que a diferença de atividade da HXYN2 de 20% para 90% observada no pH 4,0 e pH 5,5, respectivamente (Figura 24), corrobora com este estado de ionização das cadeias laterais dos ácidos glutâmicos (neutros no pH 4,0 e carregados negativamente a partir de pH 4,0) condizente com o aumento abrupto da intensidade de fluorescência a partir do pH 5,5 (Figura 44). O reposicionamento dos triptofanos em pH 9,5, indicado pelo deslocamento da banda de 337 para 335, está associado à

modificação de cargas das cadeias laterais das tirosinas (pk de ionização de ~9,0-10,0) (Carey, 2011) e do grupo amino terminal da cadeia polipeptídica (pK de ionização de ~9,5). Portanto, as mudanças conformacionais mínimas entre os pH 6,0 e 9,0 favorecem o arranjo ideal das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos catalíticos e, principalmente, dos resíduos que estabilizam estes aminoácidos, aumentando a eficiência da HXYN2 nesta faixa de pH.

No entanto, nota-se que a leve mudança conformacional no pH 9,0 e praticamente o desaparecimento da única α -hélice da HXYN2 (Tabela 13, seção 6.7.2) foi responsável pela diminuição de 30% na atividade da enzima (Figura 24). No pH 4,0 as cargas neutras dos resíduos catalíticos E84 e E175 foram responsáveis pela diminuição drástica da atividade da enzima (80%), apesar da única α -hélice localizada fora da região do sítio catalítico ter sido preservada (Tabela 13, seção 6.7.2).

Em contraste, na presença de AF (Figura 46 e 47B), as intensidades e deslocamentos das bandas de emissão apresentaram maiores diferenças variando o pH. Uma diminuição acentuada no comprimento de onda máximo de emissão (entre 337 e 333 nm) ocorreu entre pH 6,0-7,5 e 8,5-9,5 (Figura 47B), enquanto as intensidades de fluorescência (Figura 47A), em faixa semelhante (pH 6,0-9,0), permaneceram constante.

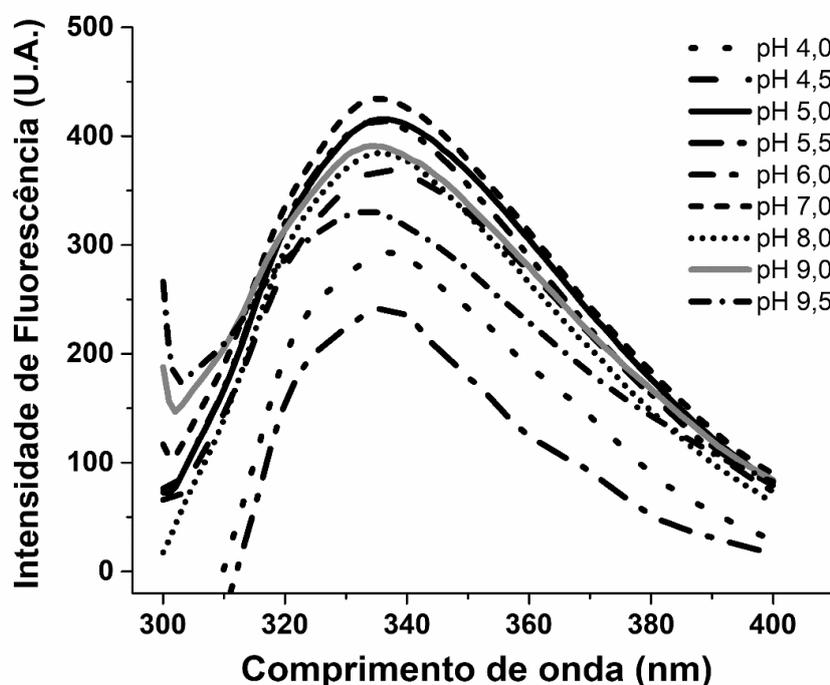


Figura 46. Espectros de fluorescência da HXYN2 na presença de AF com variações na intensidade da banda de emissão, nos pH 4,0-9,5. A concentração de HXYN2 foi de 0,04 mg/mL e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio 10 mM para pH 4,0-6,0, Tris-HCl 10 mM para pH 6,5-9,0 e glicina 10 mM pH 9,5 (Oliveira et al, 2022).

Esses dados sugerem que as cadeias laterais dos resíduos de triptofano mudam de expostas ao solvente para parcialmente enterradas. No entanto, seu ambiente micromolecular na faixa de pH mencionada não muda na presença de AF. Na faixa de pH 4,0-5,5 e 9,5 as intensidades de fluorescência foram alteradas abruptamente, enquanto os comprimentos de onda máximos de emissão foram praticamente mantidos quando comparados aos espectros de HXYN2 na ausência deste composto (Figura 47). Os resultados indicam que, nestes pH, as cadeias laterais dos resíduos de triptofanos permanecem expostas ao solvente. A presença de AF promove diferenças no ambiente micromolecular dos resíduos de triptofano próximos ao sítio ativo (W154), como também sugerido pelos resultados de *docking* molecular (seção 6.8.1). Considerando o *docking* molecular e o valor de pka do AF ($pK = 4,58$) (Ojha et al., 2012), espera-se que abaixo de pH 5,0 o AF esteja protonado, sem carga, com uma interação hidrofóbica mais favorável do tipo π - π com o W154. Porém, em pH acima 5,0, AF adquire uma carga negativa por desprotonação e interações eletrostáticas com resíduos carregados, como R138, e ligações de hidrogênio com Q117, Q152, Y89, Y112 e Y195, tornam-se predominantes. Portanto, a manutenção dos resíduos de triptofano expostos ao solvente e do estado ionizado das cadeias laterais de aminoácidos próximas ao sítio ativo de HXYN2, na presença de AF, poderia levar a uma diferença na rede de ligações de hidrogênio do sítio ativo e, conseqüentemente, em alterações conformacionais que contribuem para melhor eficiência enzimática de HXYN2, conforme mostrado na Figura 28, Figura 33 e Tabela 7.

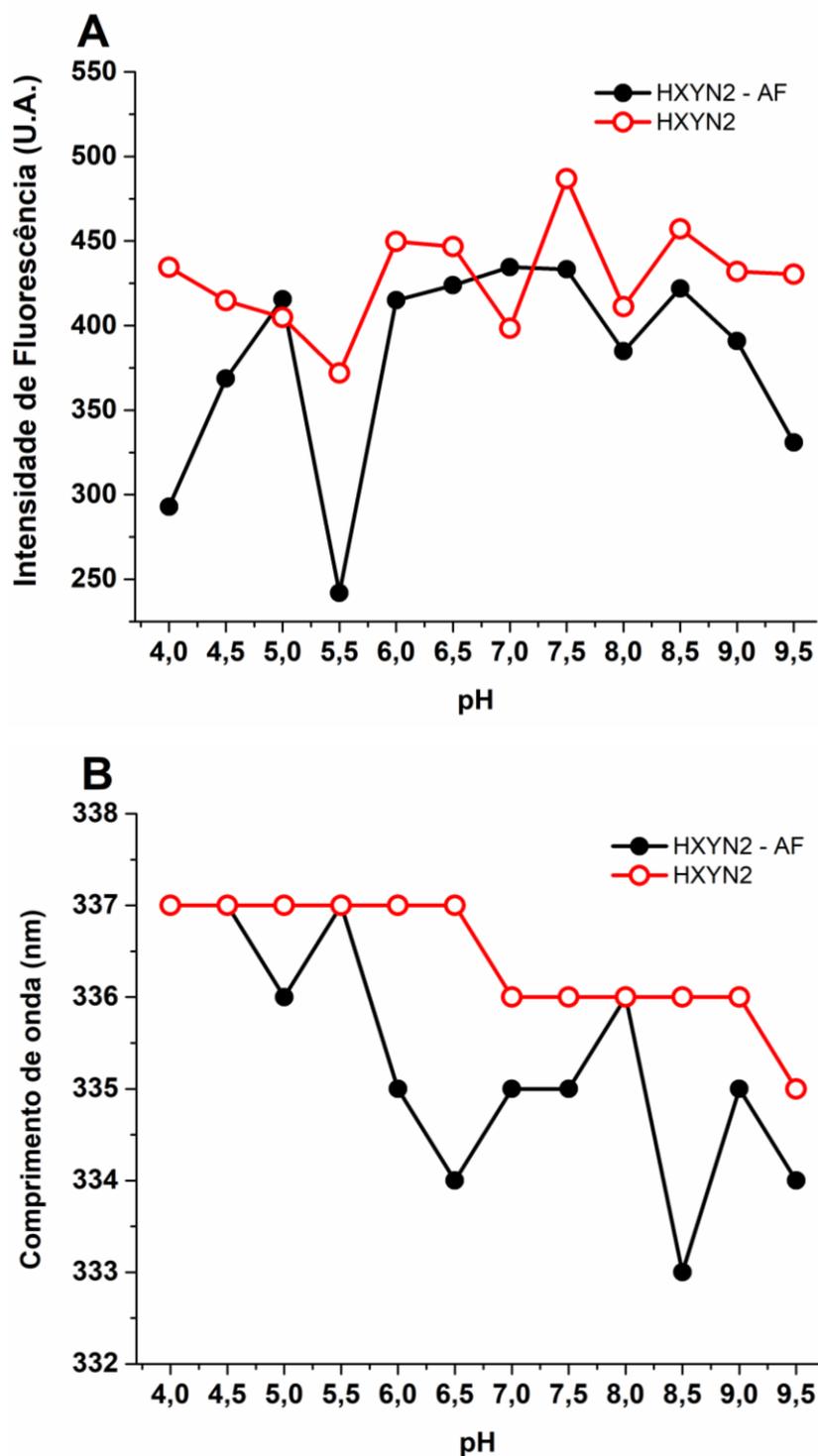


Figura 47. Análise dos dados de fluorescência da HXYN2 em pH de 4,0-9,5 na ausência (curva em vermelho) e presença (curva em preto) do AF. (A) Variação da intensidade de fluorescência. (B) Deslocamento do comprimento de onda máximo das bandas de emissão (Oliveira et al, 2022).

A interação do AF com a HXYN2 foi avaliada por meio da atenuação de fluorescência. Este procedimento é utilizado para avaliação do ambiente dos resíduos de triptofano, com ou sem cargas, a partir da acessibilidade de moléculas atenuadoras e

para avaliar a interação destas com estes resíduos de aminoácidos, bem como para determinação das constantes de ligação decorrentes da interação proteína e um ligante específico. Esta associação pode ocorrer no estado fundamental (atenuação estática) ou no estado excitado (atenuação colisional) e resulta na diminuição da emissão de fluorescência (Lakowicz, 2006). Concentrações crescentes de AF resultou na diminuição da intensidade de fluorescência da HXYN2, sem deslocamento nas bandas de emissão (Figura 48), indicando que este composto interage com os resíduos de triptofano expostos ao solvente, e que o microambiente dessa interação muda a medida que varia o pH.

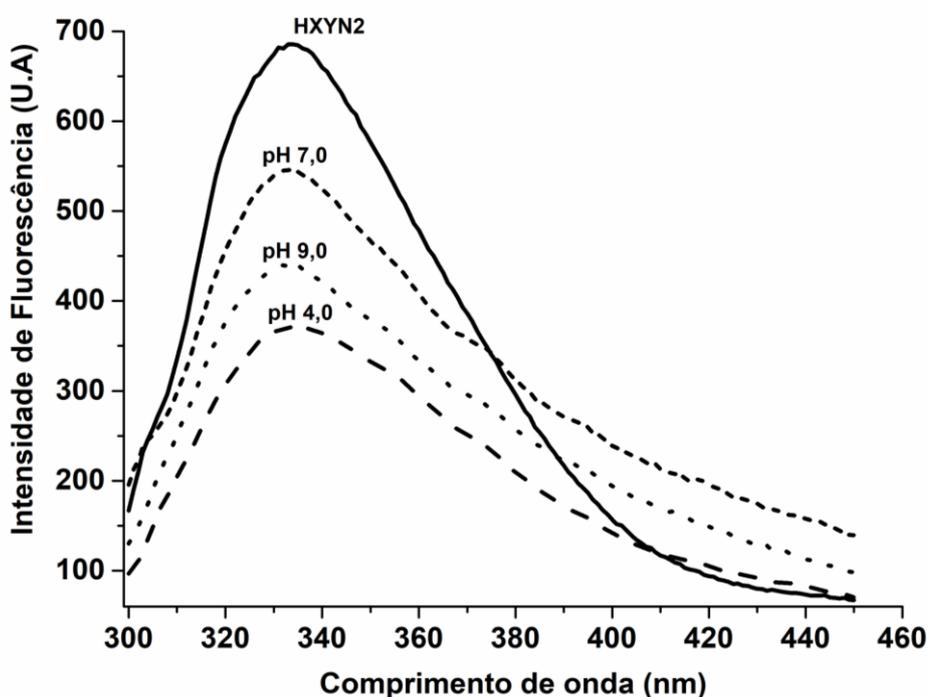


Figura 48. Espectro de fluorescência da HXYN2 na ausência (linha sólida) e na presença do AF, em pH 4,0 (linha tracejada), 7,0 (linha com traços curtos) e 9,0 (linha pontilhada).

Os dados de atenuação de fluorescência foram analisados segundo a equação de Stern-Volmer, definida pela relação entre a concentração do atenuador e a intensidade de fluorescência (Figura 49). A partir da inclinação da reta os valores da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foram estimados, conforme apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e de atenuação bimolecular (K_q) da HXYN2 em complexo com o AF em diferentes pH (Oliveira et al, 2022).

HXYN2/AF	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	R^2
pH 4,0	$3,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^{11}$	0,96
pH 7,0	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^{11}$	0,95
pH 9,0	$6,5 \times 10^3$	$6,5 \times 10^{11}$	0,96

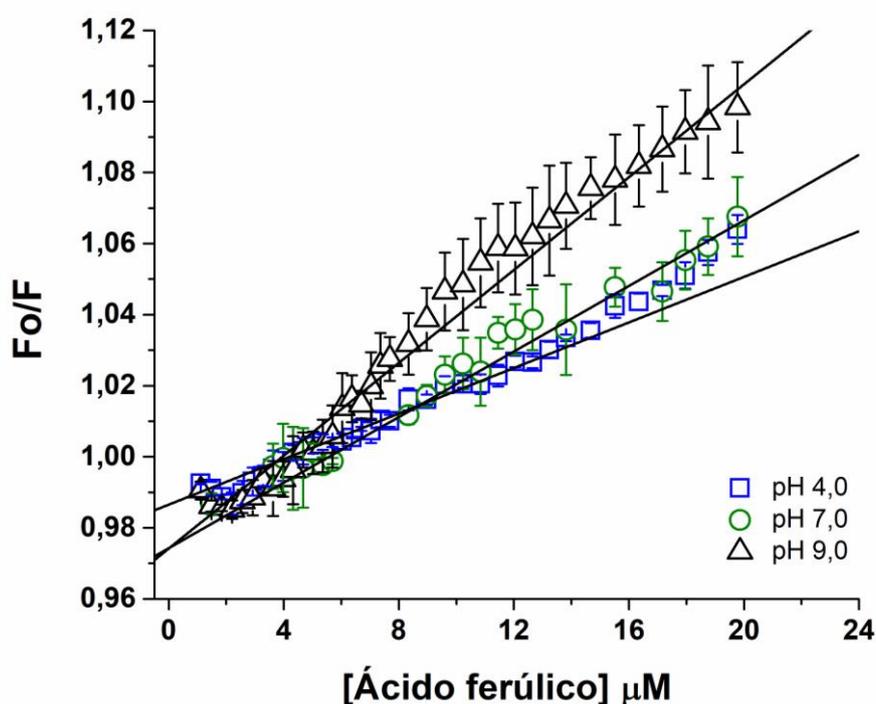


Figura 49. Gráfico de Stern-Volmer da interação entre HXYN2 e o AF em diferentes pH (Oliveira et al, 2022).

Os valores de K_{sv} obtidos para o complexo HXYN2-AF são da ordem de 10^3 indicando total acesso deste composto aos resíduos de triptofano, o qual aumenta à medida que aumenta o pH. Como mencionado acima, o deslocamento da banda de emissão (337 nm para 333 nm) em pH 4,0-9,5 ocorreu devido a mudanças nos estados de ionização das cadeias laterais dos resíduos ácido glutâmico, histidinas e tirosinas, principalmente aquelas próximas ao sítio catalítico, o que resultou em discretas mudanças no microambiente de resíduos de triptofano (Figura 45). Os valores de K_{sv} refletem estas discretas mudanças, indicando uma associação entre AF e resíduos de triptofano ou resíduos nas proximidades destes por meio de ligação de hidrogênio e

interações iônicas. O complexo HXYN2-AF em pH 9,0 apresentou maior K_{sv} comparado aos demais pH, indicando a aumento da acessibilidade deste composto aos resíduos aromáticos, devido a mudança no microambiente de interação.

A constante que diferencia a atenuação de fluorescência em dinâmica e estática (Lakowicz, 2006) é a constante de atenuação bimolecular, K_q , de aproximadamente $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A atenuação de fluorescência é considerada dinâmica e estática quando K_q está abaixo e acima deste valor, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 11, os valores de K_q variando de $3,2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $6,5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH ácido e básico, são maiores que o limite superior de K_q associado a um processo de atenuação bimolecular controlado envolvendo atenuadores dinâmicos. Portanto, os resultados indicaram que o AF é um atenuador estático, que forma um complexo com HXYN2, envolvendo interação com resíduos de triptofano (Zheng et al., 2020).

A afinidade entre o AF e a HXYN2 pôde ser inferida por meio dos valores da constante de associação/ligação (K_b) e do número de sítios ocupados pelo composto na estrutura proteica. Esses parâmetros foram obtidos a partir da equação 8, representada pelo gráfico da Figura 50, e são apresentados na tabela 12.

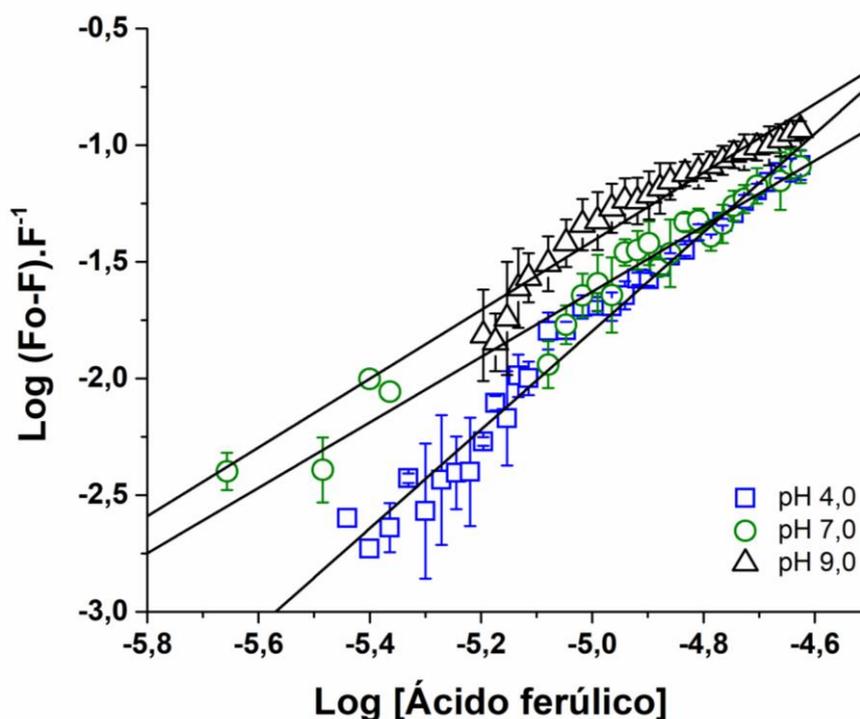


Figura 50. Gráfico de duplo logaritmo $\text{Log} (F_0-F)/F$ versus $\text{Log} [AF]$ da HXYN2 na presença de AF e em diferentes pH (Oliveira et al, 2022).

Tabela 12. Constante de associação/ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) da HXYN2 em complexo com o AF em diferentes pH (Oliveira et al, 2022).

HXYN2/AF	K_b (M^{-1})	n	R^2
pH 4,0	$5,93 \times 10^8$	2,1	0,97
pH 7,0	$2,40 \times 10^5$	1,4	0,95
pH 9,0	$8,92 \times 10^5$	1,4	0,93

O número de sítios de ligação de AF em HXYN2 é aproximadamente 1 em pH 7,0 e 9,0 e 2 em pH 4,0, indicando que em pH neutro e básico a molécula de AF está interagindo com os resíduos de triptofano em apenas um sítio, enquanto que em pH ácido, devido a ionização deste composto, essa interação ocorre em 2 sítios.

Os valores das constantes de ligação são dependentes do pH e indicam uma afinidade moderada (em pH 7,0 e 9,0) a forte (em pH 4,0) entre as duas moléculas (Tabela 12) (Xiao et al., 2007). Esses resultados estão de acordo com os tipos predominantes de interações previstas por *docking* molecular e discutidas adiante (item 6.8), que ocorrem em pHs abaixo e acima do valor de pKa do AF.

Dois estudos reportaram a interação do inibidor (XIP) obtido de arroz (riceXIP) com endoxilanases da família GH11 de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Thermomonospora fusca* (Dang et al., 2019; Liu et al., 2019). Os resultados indicaram que este inibidor é do tipo competitivo, na presença de xilana *beechwood*. Ao avaliar a interação dessas moléculas por espectroscopia de fluorescência, o aumento da concentração do inibidor levou a redução na intensidade de fluorescência em 330 nm, indicando mudanças no microambiente dos resíduos de triptofano. Os valores de K_{sv} obtidos foram da ordem de $10^6 M^{-1}$, sugerindo que o inibidor não acessa os resíduos de triptofano diretamente, estando estes expostos ao solvente. No entanto, a constante de ligação obtida para o complexo endoxilanas+riceXIP é da ordem de $10^7 M^{-1}$, indicando uma forte ligação entre as duas moléculas que mantém o complexo estável. O estudo de *docking* e dinâmica molecular indicaram que o único sítio de ligação do inibidor esta localizado no *loop* da região do polegar (Dang et al., 2019; Liu et al., 2019). Estes dados sugerem, portanto, que a interação de moléculas ligantes com resíduos de triptofano presentes na fenda catalítica das xilanas, ou no microambiente destes resíduos, influencia diretamente na atividade enzimática, podendo inibir ou ativar.

6.7.2 Estrutura secundária e termoestabilidade da HXYN2 por Dicroísmo Circular

Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) (do inglês *Far-UV CD*) a 25 °C foram obtidos para verificar mudanças no conteúdo de estruturas secundárias da HXYN2 em diferentes pH. Na Figura 51, os espectros para cada pH estudado apresentam sinal dicróico predominante em regiões que correspondem a proteínas com estruturas do tipo folha- β (banda positiva em ~ 198 nm e banda negativa em 218 nm).

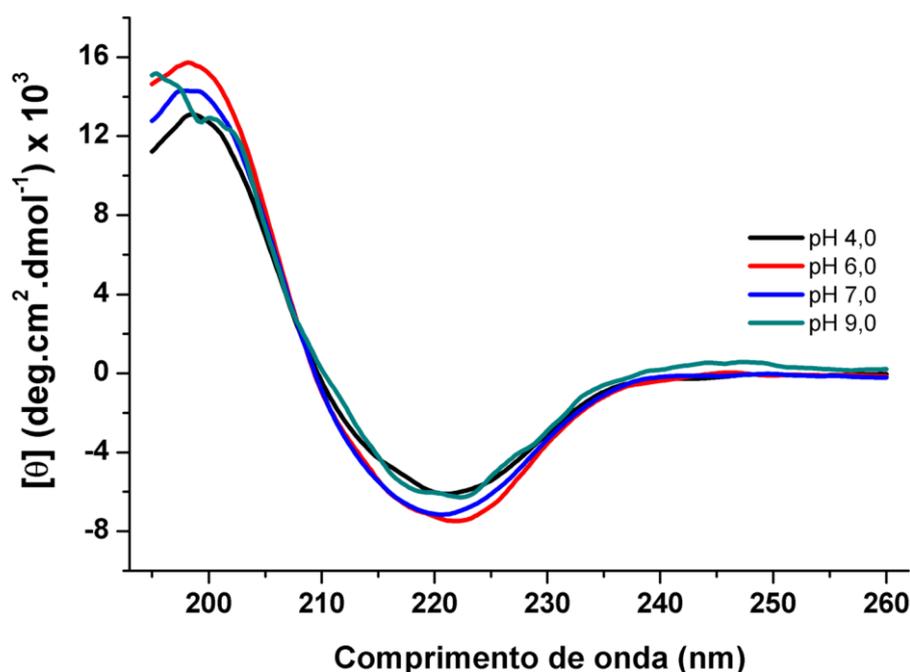


Figura 51. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 em diferentes pHs a 25 °C. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL, e os tampões utilizados foram: tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0, tampão bis-tris (5 mM) pH 6,0, tampão Tris-HCl (5 mM) pH 7,0 e 9,0 (Arquivo Suplementar - Oliveira et al, 2022).

Em pH 4,0 e 9,0 houve uma leve redução do sinal dicróico tanto na região da banda negativa quanto na região da banda positiva, quando comparado aos espectros em pH 6,0 e 7,0. Nesta faixa de pH levemente ácido e neutro os espectros dicróicos se sobrepõem sugerindo que o conteúdo de estrutura secundária seja semelhante.

Os percentuais do conteúdo de estrutura secundária nos pHs ácido, neutro e básico apresentados na tabela 13 foram estimados a partir dos espectros dicróicos

ajustados (Figura 52) utilizando o programa de deconvolução Bestsel (Micsonai et al., 2015).

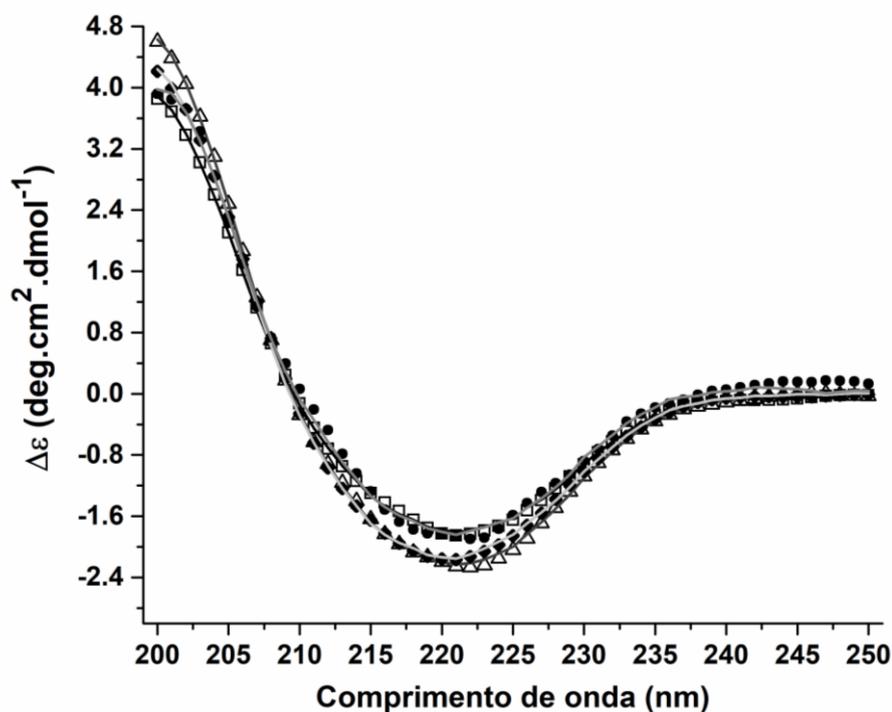


Figura 52. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (200 a 250 nm) da HXYN2 e os respectivos espectros ajustados, em pH 4,0 (quadrado e linha preta), 6,0 (triângulo e linha cinza escuro), 7,0 (losango e linha cinza claro) e 9,0 (círculo e linha cinza) a 25 °C.

Tabela 13. Conteúdo de estruturas secundárias da HXYN2 em diferentes pHs, obtido por deconvolução dos espectros dicroicos utilizando o programa Bestsel, entre os comprimentos de onda 200 a 250 nm (Arquivo suplementar - Oliveira et al, 2022).

Estrutura Secundária	pH 4,0	pH 6,0	pH 6,0_AF	pH 7,0	pH 9,0
α -Hélice	2,6%	2,4%	2,1%	1,7%	0%
β -Antiparalela	51,3%	52,1%	42,5%	51,9%	53,4%
β -Paralela	0%	2,8%	0,0%	2,3%	0%
Turn- β	10,3%	9,3%	15,8%	8,8%	12,1%
Desordenada	35,9%	33,4%	39,5%	35,3%	34,5%
Total	100,1%	100%	99,9%	100%	100%

A baixa porcentagem de estruturas em α -hélice, comparadas com as estruturas em folhas- β , que são predominantes, está de acordo com os dados de modelagem molecular da HXYN2, que indicam a presença de uma única α -hélice e 14 fitas- β

(Freitas et al., 2003). No modelo obtido neste trabalho, uma pequena região em α -hélice na porção N-terminal da proteína foi identificada, o que não aparece em outras estruturas depositadas no PDB. Estes resultados estão de acordo com as estruturas de xilanases da família GH11 depositadas no PDB (tabela 1), que apresentam maior teor de fitas- β (~65,0%) e baixo conteúdo de α -hélices (~4,0-6,0%).

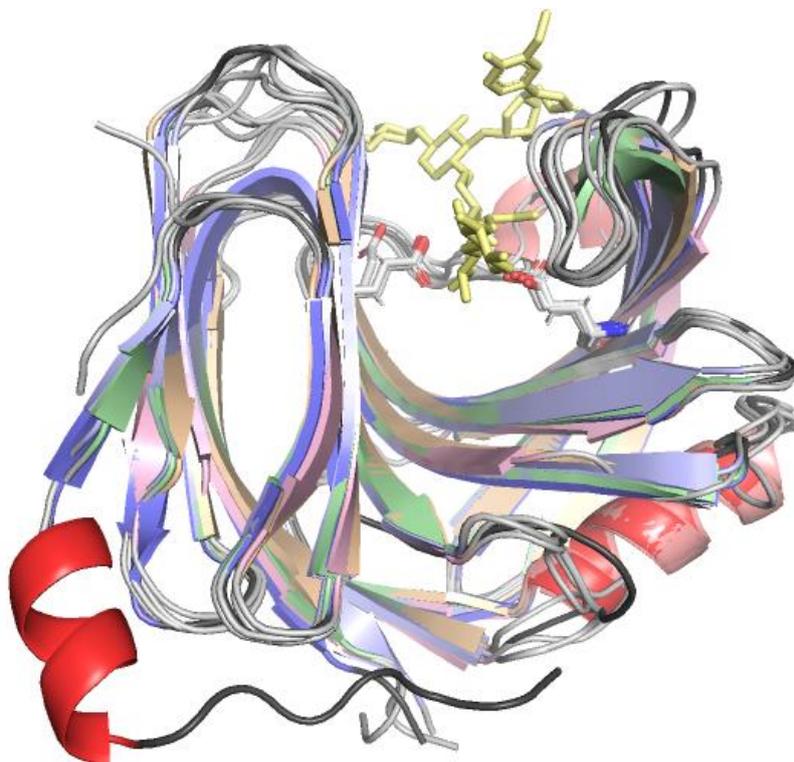


Figura 53. Alinhamento estrutural do modelo predito da proteína HXYN2 (folhas- β em azul escuro e α -hélice em vermelho) com estruturas depositadas no banco de dados PDB: 2VUJ (verde), 2VGD (azul claro), 3WP3 (rosa) e 1YNA (laranja).

Apesar da pequena variação no conteúdo de α -hélice e folhas- β , na faixa de pH entre 4,0 a 9,0, a proteína apresenta mudanças conformacionais discretas, conforme indicado pelos dados de fluorescência (Figuras 44 e 45), em decorrência das mudanças no padrão de ionização dos aminoácidos, principalmente do arcabouço do sítio ativo, como glutamato, histidina e tirosina. Estas mudanças refletem na manutenção do bolsão catalítico e na atividade enzimática, dependentes do pH. Neste contexto, vale destacar que a HXYN2 apresenta atividade diferenciada nos pHs 4,0 (~ 25%), 6,0 e 7,0 (100 e 90%) e 9,0 (70%).

A HXYN2 mantém atividade acima de 75% a partir de pH 5,0 até pH 9,0 (Figura 24 e 25). Nestes pHs, além dos glutamatos, as cadeias laterais das tirosinas podem mudar o estado de ionização e a orientação, resultando na alteração da distância

entre os resíduos catalíticos, uma vez que o resíduo E84 (correspondente ao resíduo E102 no modelo descrito neste trabalho) é estabilizado por duas tirosinas, Y86 e Y75 (correspondente aos resíduos Y93 e Y104 no modelo descrito neste trabalho) (Freitas et al, 2003). No pH 4,0 a enzima apresenta menor conteúdo de folhas- β , o que, associado com mudanças conformacionais discretas, em decorrência da ionização glutamatos, evidenciadas por fluorescência, pode ser relacionado com a baixa atividade enzimática da HXYN2 neste pH (Figura 25).

Em pH 6,0, a HXYN2 apresenta atividade máxima, o que é reforçado pela ionização do resíduo E175 (correspondente ao resíduo E193 do modelo descrito neste trabalho), que passa a ter carga negativa (desprotonado) neste pH. Adicionalmente, o posicionamento das cadeias laterais dos resíduos catalíticos também pode ser influenciado pelas histidinas que estão ionizadas neste pH (Figuras 44 e 45).

Em pH 9,0, o ganho de estrutura β -turn pode estar representando o conteúdo de estrutura em α -hélice, já que o programa BestSel estima o conteúdo de estrutura secundária considerando α -hélice distorcidas, e sabe-se que esta estrutura se encontra entre dois *loop* (estruturas do tipo β -turn) e próxima a região do “polegar” (Gruber et al., 1998; Freitas et al., 2003; Purmonem et al., 2007). Este aumento no conteúdo de estrutura β -turn sugere uma maior flexibilidade da região do “polegar”, importante no movimento de abrir e fechar da fenda catalítica, mantendo a atividade enzimática acima de 70% neste pH.

Ensaio de estabilidade térmica da HXYN2 variando a temperatura entre 25 e 95 °C em diferentes pH foram realizados para determinar a termoestabilidade e monitorar as alterações conformacionais da proteína. As curvas de desnaturação térmica obtidas em pHs 4,0, 6,0, 7,0 e 9,0 mostram dois estados, nativo e desenovelado, e o momento em que essa transição acontece, indicado pelos valores da temperatura de transição (T_m) (Tabela 14). Nos pHs 6,0, 7,0 e 9,0 as curvas apresentam inflexão entre 50 e 60 °C. Em pH ácido, o T_m foi de 76,2 °C o que indica maior estabilidade da proteína no pH 4,0. No entanto, a estabilidade estrutural de proteína é caracterizada a partir de parâmetros termodinâmicos do processo de desdobraimento, como ΔH , ΔS e ΔG , quando este é reversível, o que não ocorreu em todos os pHs analisados (Figura 54). Portanto, a relação estabilidade estrutural (Figura 54) e função enzimática (Figura 24) não pode ser correlacionada neste caso.

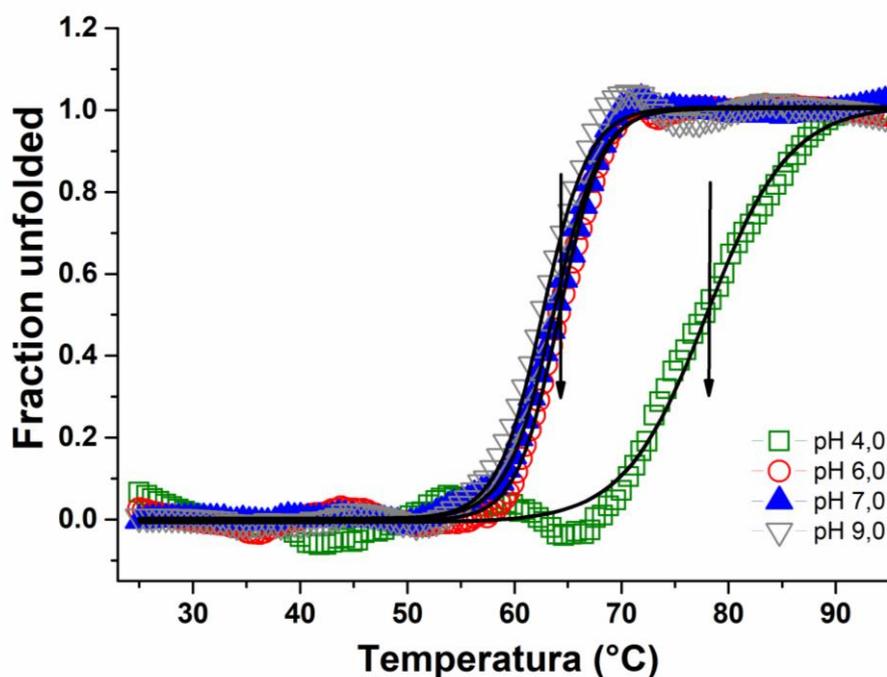


Figura 54. Curvas de desnaturalização térmica da HXYN2 monitoradas a 218 nm em tampão acetato de sódio 5mM, pH 4,0 (quadrado verde), tampão BIS-TRIS 5mM, pH 6,0 (círculo vermelho), tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0 (triângulo azul) e 9,0 (triângulo invertido cinza), nas temperaturas de 25 a 95 °C. A temperatura de transição da proteína (T_m) estimada a partir das curvas ajustadas (linha preta) foram 76,2 °C (pH 4,0), 63,5 °C (pH 6,0) e 63,7 °C (pH 7,0) e 62,3 °C (pH 9,0) (Oliveira et al, 2022).

As temperaturas que representam o ponto de transição entre o estado nativo e desenovelado (T_m) (Tabela 14) foram determinadas para os pH estudados (Figura 54) a partir da normalização dos dados.

Tabela 14. Temperatura de transição (T_m) da HXYN2 em diferentes pHs e em pH 6,0 na presença de AF.

pH	T_m (°C)
4,0	76,2
6,0	63,5
6,0_AF	54,1
7,0	63,7
9,0	62,3

Os valores de T_m calculados a partir das curvas de desnaturalização térmica foram semelhantes para os pHs 6,0, 7,0 e 9,0 (63,5 °C, 63,7 °C e 62,3 °C, respectivamente) indicando que o processo de desnaturalização térmica acarreta a perda de estrutura de forma

semelhante nos três pH, o que é confirmado pelos espectros apresentados nas Figuras 56B-D. Nestes espectros o sinal dicróico diminui drasticamente entre as temperaturas de 55 e 65 °C aproximando do valor zero, compatível com o processo de desnaturação térmica da proteína.

Estes dados corroboram aqueles apresentados para os ensaios de atividade da enzima sob efeito da temperatura (Figura 25). A atividade enzimática da HXYN2 apresenta uma queda acentuada aproximando ao valor de zero entre as temperaturas de 50 °C e 65 °C, em pH 6,0. Na Figura 54 estão apresentadas, simultaneamente, as curvas de desnaturação térmica e de atividade da HXYN2. Interessante notar que a curva da atividade relativa (preta) intercepta a curva de desnaturação (vermelha) na faixa de temperatura que a HXYN2 perde atividade e transita do estado nativo para o estado desenovelado em pH 6,0. Neste ponto em que as curvas se cruzam, a temperatura é correspondente a T_m , encontrada para a HXYN2 nos dois pH, demonstrando claramente a relação entre estrutura e função da proteína, onde a perda de estrutura leva à perda de função.

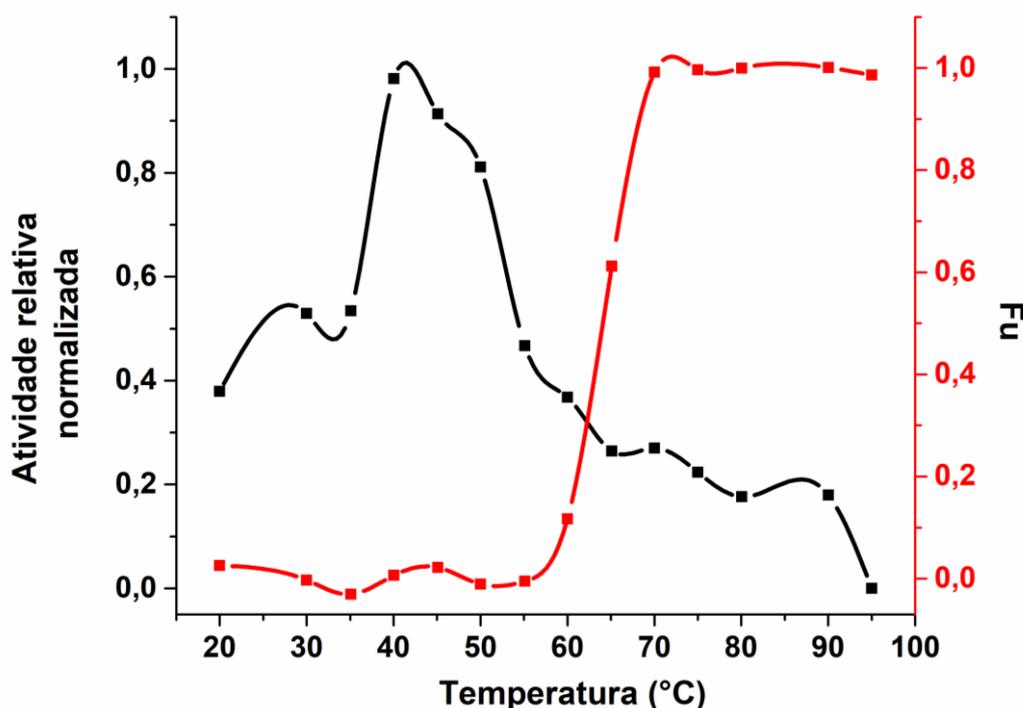


Figura 55. Variação da atividade relativa normalizada (preto) e da curva de desnaturação térmica (vermelha) monitoradas a 218 nm da HXYN2, em pH 6,0 nas temperaturas de 20 a 95 °C (Oliveira et al, 2022).

Para o pH 4,0, a curva de desnaturação apresenta T_m de 76,2 °C, indicando que em temperaturas acima de 75 °C a HXYN2 em pH ácido perde estrutura. Neste pH, a

HXYN2 apresenta maior estabilidade quando comparada aos pH neutro e básico, apesar de apresentar baixa atividade enzimática (Figura 24). Esta baixa atividade pode estar relacionada com diferenças na ionização das cadeias laterais dos resíduos de ácido glutâmico que levam a modificação conformacional da proteína, conforme os resultados de fluorescência (Figura 44 e 45), uma vez que estes resíduos estão na faixa de transição do estado neutro para carregado negativamente (pK de ionização de $\sim 4,2$). Este estado destas cadeias laterais promove mudanças estruturais que podem refletir no aumento da estabilidade estrutural e na alteração da flexibilidade da região catalítica, principalmente referente ao posicionamento da α -hélice, que está próxima da região da alça que forma o “polegar”, importante no movimento de abrir e fechar da fenda catalítica (Muilu et al., 1998; Purmonem et al., 2007; Paës, Berrin, Beaugrand, 2012). Este movimento é importante para permitir o ajuste do substrato no sítio ativo, e em pH 4,0 a proteína adquire uma conformação mais estável e menos suscetível a mudanças estruturais com o aumento da temperatura.

Os espectros obtidos nos pH 6,0, 7,0 e 9,0 (Figura 56 B a D), a HXYN2 se mantém estruturada de 25 até 55 °C, indicando estabilidade nestas temperaturas e, a partir de 55 °C, há a diminuição abrupta do sinal dicróico na banda em 218 nm, de aproximadamente $-6000 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ em 55 °C para aproximadamente $-2000 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ em 65 °C. Essa diminuição no sinal corresponde à perda de estruturas secundárias e à desnaturação da HXYN2.

Em pH 4,0 a HXYN2 apresenta-se estruturada entre 25 e 45 °C (Figura 56 A), mantendo o sinal dicróico da banda em 218 nm próximo de $-4900 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$. Aumentando a temperatura, o sinal dicróico diminui gradativamente, passando para $-4533 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$ em 55 °C, mas ainda mantém o conteúdo de estruturas em folhas- β . Entre 65 e 75 °C há uma redução do sinal (-4685 e $-3554 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$, respectivamente) e deslocamento da banda dicróica para $\sim 210 \text{ nm}$, indicando perda de estrutura secundária e aumento de estruturas desordenadas. Em 95 °C, o sinal diminui para $\sim -2000 \text{ deg.cm}^2/\text{dmol}$, compatível com a perda de folhas- β e desnaturação da proteína.

Ao final do processo de desnaturação nos pH 6,0, 7,0 e 9,0, ocorreu a formação de precipitados da proteína, visíveis na cubeta, condição esta que caracteriza o estado desnaturado irreversível, ou seja, a proteína não retorna à sua conformação nativa. No entanto, no pH 4,0, apesar da HXYN2 não apresentar agregados ao final da curva de desnaturação, o retorno da estrutura da enzima ao estado nativo não ocorreu, o que foi

indicado pelo novo espectro a 25 °C, apresentando deslocamento da banda negativa para ~210 nm e desaparecimento da banda positiva em 195 nm (Figura 57). Estas características impossibilitaram o cálculo dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural da proteína.

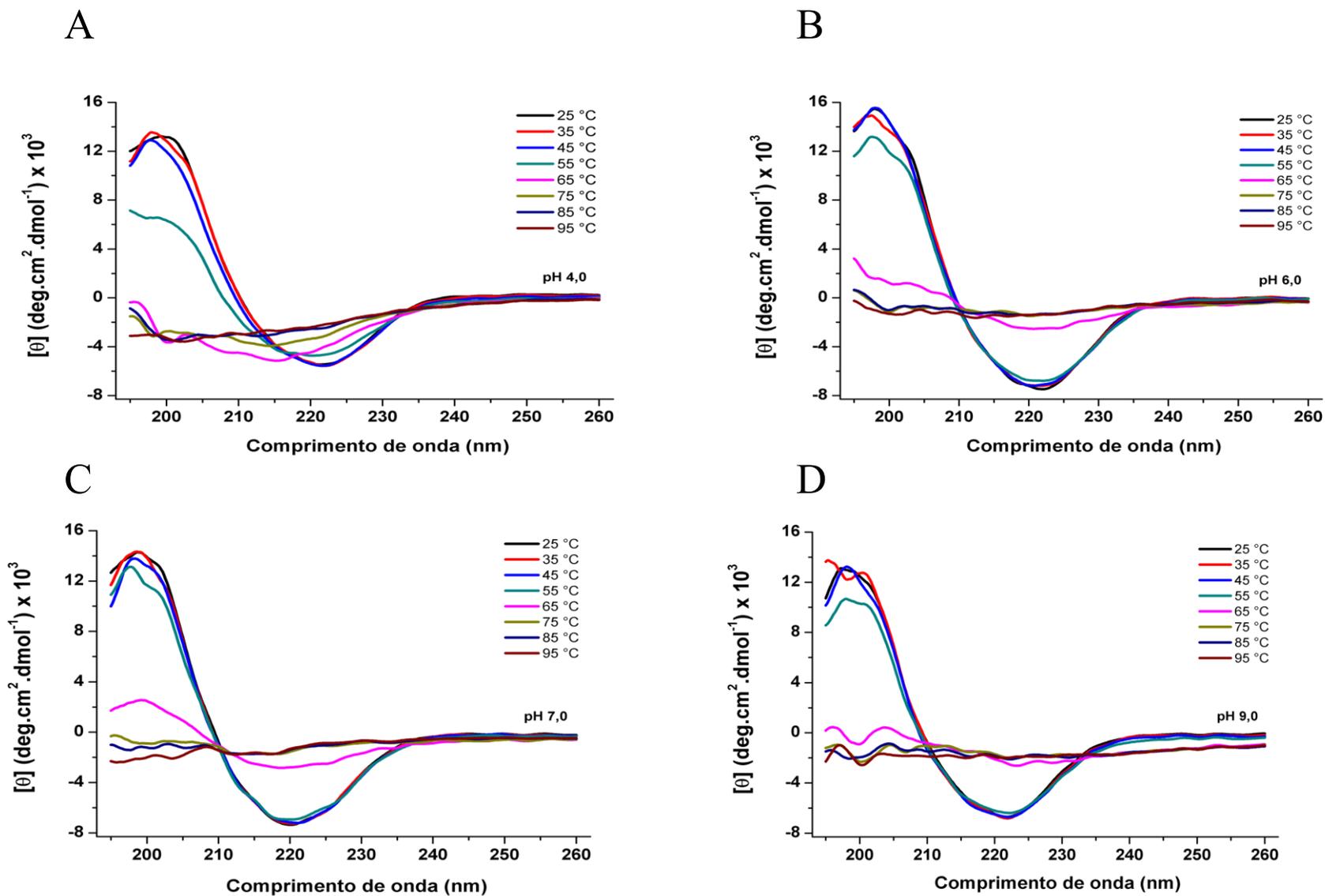


Figura 56. Efeito da temperatura na estrutura secundária e na estabilidade estrutural da HXYN2 avaliado por dicroísmo circular. Espectros dicroicos da HXYN2 coletados entre 25 a 95 °C em tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0 (A), tampão BIS-TRIS (5 mM) pH 6,0 (B), tampão Tris-HCl (5 mM) pH 7,0 (C) e 9,0 (D) (Arquivo Suplementar - Oliveira et al, 2022).

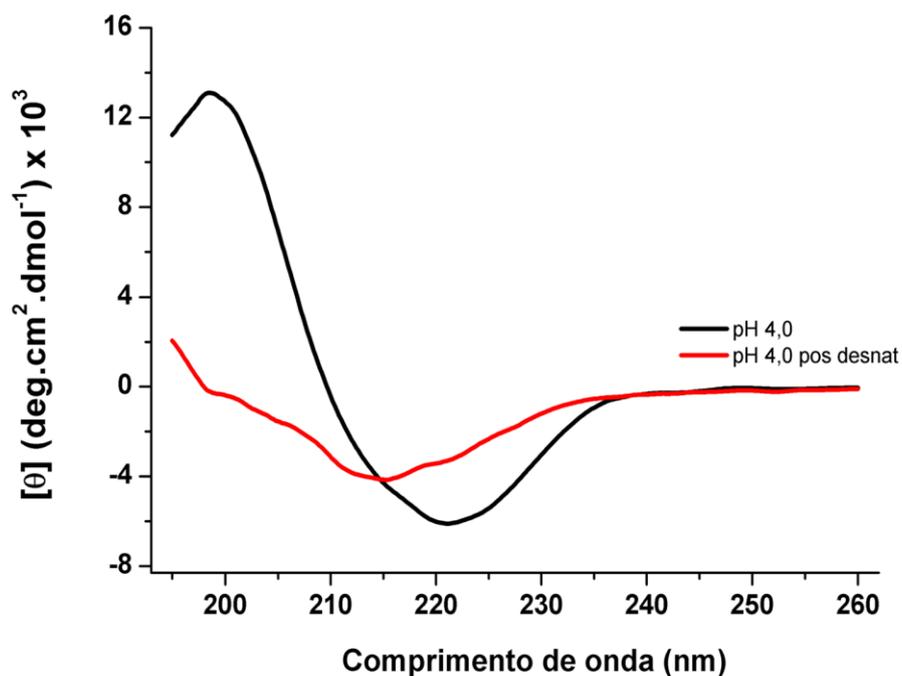


Figura 57. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 em pH 4,0 a 25 °C antes (preto) e após (vermelho) a desnaturação térmica. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL em tampão acetato de sódio (5 mM) pH 4,0.

Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 na presença de AF em pH 6,0 e 25 °C mostraram pequenas diferenças no sinal dicroico em ~ 198 nm (Figura 58). A estrutura secundária da HXYN2 na presença de AF mostrou uma ligeira diminuição do conteúdo de α -hélice e aumento do conteúdo de β -turn e de estruturas desordenadas, em comparação com os espectros na ausência de AF (Tabela 13). Além disso, o sinal dicroico da HXYN2 se mantém semelhante entre 25 e 45 °C na presença de AF (Figura 59), estando estruturada nessas temperaturas. No entanto, o aumento da temperatura de 45 °C para 85 °C resultou em uma diminuição abrupta e deslocamento das bandas dicroicas para aproximadamente 200 nm, indicando perda de estrutura secundária compatível com o estado desnaturado de HXYN2.

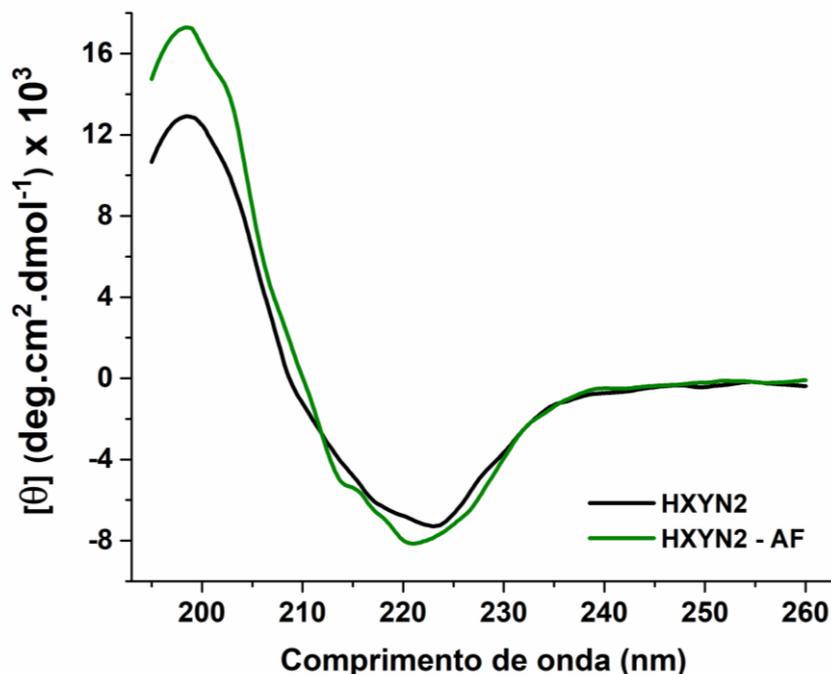


Figura 58. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (195 a 260 nm) da HXYN2 na ausência e presença de AF a 25 °C. A concentração de HXYN2 utilizada foi de 0,15 mg/mL, AF na concentração de 60 μM e o tampão utilizado foi BIS-TRIS (5 mM) pH 6,0 (Oliveira et al, 2022).

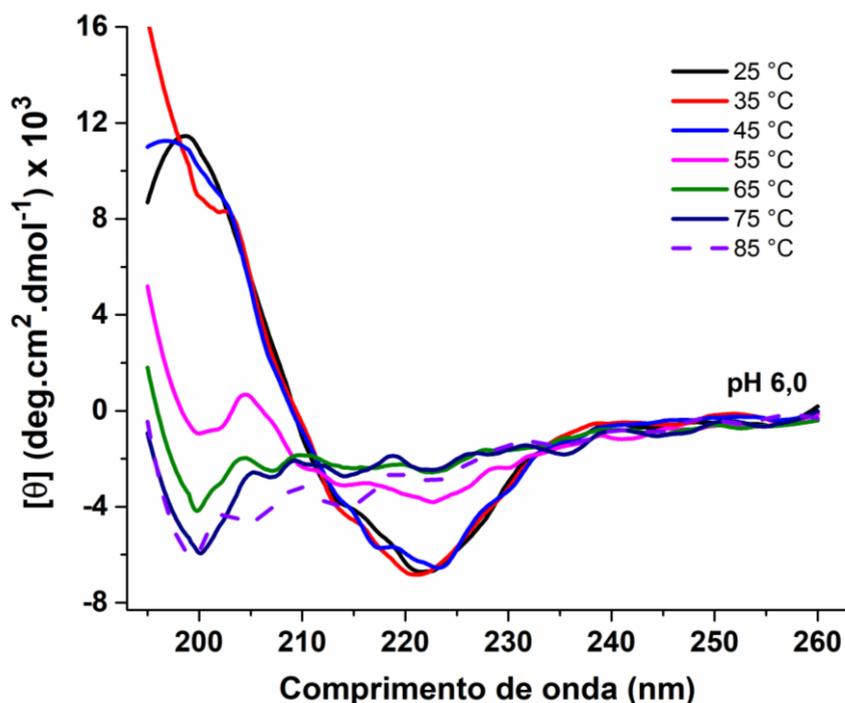


Figura 59. Efeito da temperatura na estrutura secundária e na estabilidade estrutural da HXYN2 na presença de AF avaliado por dicroísmo circular. Espectros dicroicos registrados entre 25 e 85 °C e tampão BIS-TRIS (5 mM) pH 6,0 (Oliveira et al, 2022).

As curvas de desnaturação térmica mostram uma diminuição da T_m de 63,5 para 54,1 °C, na presença de AF (Figura 60), indicando maior estabilidade da HXYN2 na ausência de AF. Este resultado é consistente com a diminuição das folhas- β e aumento do conteúdo de β -turn e estruturas desordenadas, o que pode aumentar a flexibilidade estrutural levando à diminuição da estabilidade proteica.

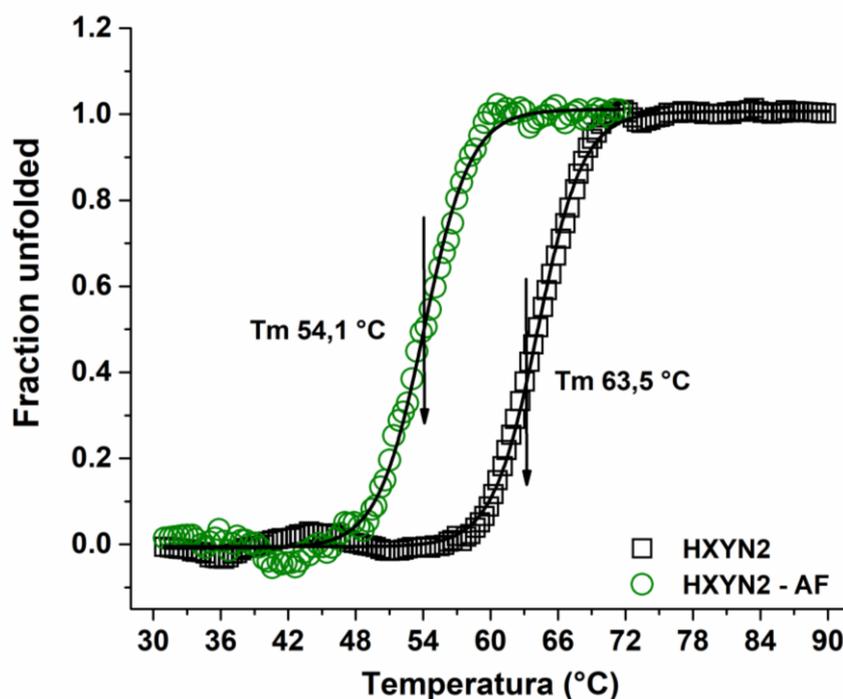


Figura 60. Curvas de desnaturação térmica da HXYN2 na ausência (quadrado preto) e presença (círculo verde) de AF monitoradas a 218 nm em tampão BIS-TRIS 5 mM, pH 6,0, nas temperaturas de 25 a 95 °C. A temperatura de transição da proteína (T_m) estimada a partir das curvas ajustadas (linha preta) foram 63,5 °C na ausência e 54,1 °C na presença de AF (Oliveira et al, 2022).

6.8 Análise da interação HXYN2-Ácido ferúlico: relação estrutura-função

No presente trabalho foram mostrados resultados que caracterizam a interação entre HXYN2 e AF, utilizando diferentes metodologias como cinética enzimática, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e modelagem molecular. A seguir, uma interpretação detalhada correlacionando estes resultados com análises de *docking* molecular será apresentada visando investigar como o AF promove a ativação enzimática da HXYN2 e como isso influencia no mecanismo de hidrólise, bem como a relação entre estrutura e função da proteína.

A estrutura da xilana possui uma cadeia principal de xilose e ramificações de arabinose e ácido 4-O-metil glucurônico, que podem ser estendidas, com substitutos adicionais, como ácido ρ -cumárico e AF (Monclaro et al., 2019). O AF é comumente encontrado na parede celular após o pré-tratamento da biomassa de lignocelulose, derivado da quebra da lignina (Jösso & Martín, 2016), ligado por ligações éster à hemicelulose e por ligações éter à lignina (Klepacka & Fornal, 2006).

Os compostos fenólicos frequentemente inibem uma variedade de enzimas que degradam a holocelulose, como celulasas e hemicelulasas, incluindo xilanases, por meio de alterações conformacionais enzimáticas com ou sem envolvimento direto com o sítio de ligação ao substrato (Tejirian & Xu, 2011). Em contrapartida, alguns estudos mostram que os compostos fenólicos não inibem a atividade das xilanases de *Emericella nidulands* (Silva et al., 2015), *Aspergillus terreus* (Moreira et al., 2013) e ainda aumentam a atividade enzimática da xilanase de *A. tamarii* (Monclaro et al., 2019), como foi descrito no presente estudo para HXYN2.

Em particular, a incubação de HXYN2 com AF resultou em um aumento na atividade da enzima, que foi atribuído a um aumento na taxa de hidrólise sem modificação da afinidade do substrato pela enzima (Figura 33), aumentando os parâmetros catalíticos como $V_{\text{máx}}$ e k_{cat} de HXYN2 sem modificar seu K_M (Tabela 6). Adicionalmente, a cinética de HXYN2 na ausência e presença de AF (Figura 33) mostra um ligeiro desvio da cinética de Michaelis-Menten em resposta ao aumento da concentração de substrato (Tabela 6). Esse comportamento cinético corresponde à cooperatividade positiva ($n > 1$) e tradicionalmente requer a participação de múltiplos sítios de ligação espacialmente distintos que são correlacionados por meio de rearranjos estruturais induzidos por ligantes entre regiões distantes ou montagens multiméricas (Porter & Miller, 2012). No entanto, a sequência de aminoácidos e a semelhança estrutural da HXYN2 com outras xilanases de GH11, bem como os resultados de ultracentrifugação analítica (Tabela 9 e 10) indicaram que HXYN2 é uma enzima monomérica com um único sítio catalítico.

A cooperatividade foi observada na cinética não-Michaelis-Menten para poucas enzimas monoméricas que possuem apenas um único sítio de ligação ao ligante (Porter & Miller, 2012). Esse comportamento também pode ser observado na cinética de enzimas alostéricas, em que a associação de um ligante em um sítio distinto do sítio ativo afeta a taxa de hidrólise do substrato. Portanto, é importante notar que a cooperatividade pode ocorrer na ausência de múltiplos sítios de ligação e sem

oligomerização macromolecular (Porter & Miller, 2012). Os parâmetros termodinâmicos de cooperatividade são estimados considerando a mudança na afinidade do ligante resultante da presença de um ligante adicional ocupando um sítio estruturalmente distinto (Porter & Miller, 2012). No entanto, no caso de cooperatividade em enzimas monoméricas com um único sítio de ligação ao ligante, a equação de Michaelis-Menten é insuficiente para descrever a cinética da enzima. Nesse contexto, o coeficiente de Hill (n) é utilizado como medida da magnitude do efeito cooperativo (Porter & Miller, 2012).

A cooperatividade em enzimas monoméricas pode ser atribuída a transições lentas entre pelo menos duas formas estruturais da enzima. Isto pode ocorrer na ligação do substrato ou na liberação do produto, levando a uma mudança dependente do tempo na atividade da enzima. Para as xilanases GH11 foi proposta uma mudança conformacional na região flexível entre duas formas estruturais: A “fechada” e B “aberta”, que acelera a reação enzimática (Pollet et al., 2009). Essa mudança conformacional é induzida pelas redes de ligações de hidrogênio entre as regiões “polegar” e “dedo”. Para formar o complexo enzima-substrato, o polegar flexível direciona o substrato para a fenda do sítio ativo, que muda da forma aberta para fechada. Portanto, a flexibilidade da fenda do sítio ativo desempenha um papel importante na ligação do substrato, bem como na atividade enzimática e no processo cooperativo. Outra interpretação tem sido relatada para enzimas monoméricas cooperativas, cuja ativação ocorre por um substrato de alta massa molecular que se liga à enzima lentamente (Solling & Esmann, 1977). No caso de HXYN2, esta hipótese também pode ser considerada devido à estrutura muito grande e ramificada da xilana. Portanto, é importante analisar a taxa de ativação desta enzima com substratos de diferentes massas moleculares.

Além disso, a formação do complexo HXYN2-AF também foi demonstrada por espectroscopia de fluorescência dependente do pH. A adição de AF à HXYN2 resultou em uma diminuição gradual na intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano de maneira dose-dependente. O gráfico de Stern-Volmer em pH 4,0, 7,0 e 9,0 (Fig. 10A e 10C), bem como os valores das constantes de atenuação (K_{sv}), indicaram que a atenuação de fluorescência da enzima foi causada por um mecanismo estático (Möller & Denicola, 2002), compatível com a formação do complexo HXYN2-AF. Esses resultados estão de acordo com os relatados para a xilanase de *A. terreus* em complexo com AF, em que a interação de AF com resíduos de triptofano afeta a ligação e/ou

hidrólise de substratos, mas mantém a integridade do domínio catalítico (Moreira et al., 2015).

Os detalhes estruturais da interface do complexo HXYN2-AF foram analisados a partir dos modelos obtidos por modelagem molecular e *docking*. De acordo com o modelo HXYN2 em complexo com feruloil-arabino-xilotriose, AF interage com resíduos R138 e Q141 (Fig. 21E). No entanto, essa interação não é estabelecida entre a enzima livre e o AF solúvel, mas sim como parte de um ramo covalente na estrutura da xilana (Fig. 21A e 21B). Nesse complexo, o sítio ativo é ocupado pelo substrato xilooligossacarídeo, o que limita a liberdade conformacional e a interação com AF nessa região. Portanto, para analisar todos os sítios de interação de AF próximos ao sítio ativo de HXYN2 foi realizado *docking* molecular.

Quarenta e cinco soluções de *docking* molecular com energias livres favoráveis (-3,4 a -6,8 kcal/mol) foram previstas e agrupadas em cinco regiões de interação potencial, cada uma com nove soluções (Anexo F). Para prever as interações mais favoráveis do AF com a enzima, foram utilizadas apenas as soluções de *docking* que estavam de acordo com as seguintes evidências experimentais:

- i) a interação do AF com HXYN2 envolve resíduos de triptofano,
- ii) as energias livres favoráveis e as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio estão de acordo com os parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria de titulação isotérmica, e
- iii) a atividade enzimática foi aumentada na presença de AF, melhorando a eficiência catalítica, que está associada à interação de AF em regiões próximas ao sítio catalítico.

As soluções na região I da estrutura do complexo (Figura 61) são as mais adequadas para explicar como o AF interage com a enzima. Essas soluções são compatíveis com as evidências experimentais mencionadas, mostrando os valores de energia livre mais favoráveis para a ligação nas regiões glicona (soluções 1, 2, 3, 4 e 6) e aglicona (soluções 5, 7, 8 e 9) do sítio catalítico (Figura 61A, Anexo F). É importante notar que algumas soluções agrupadas na região I envolvem pelo menos um resíduo de triptofano (W35 ou W154) e um ou ambos os resíduos catalíticos de Glu (E102 e E193).

Os xilooligossacarídeos como substrato das xilanases GH11 ocupam pelo menos os subsítios -2/-1 e +1. Portanto, a região glicona no sítio catalítico é crucial para a ligação do substrato e sua orientação correta (Pollet et al., 2010). Com base nessas informações, o AF não deve interagir na região glicona e, portanto, a afinidade e o

reconhecimento do substrato em HXYN2 permanecem inalterados. Em contraste, conforme relatado anteriormente, a ligação relativamente fraca da xilose aos subsítios da região aglicona facilitaria a liberação mais rápida do produto antes da deglicosilação e, conseqüentemente, aumentando o *turnover* enzimático (Hegde et al., 1998; Fujimoto et al., 2021). Além disso, em correspondência com essas análises, em duas estruturas de xilanase GH11 com oligossacarídeo ramificado (PDB: 7DFN e 7DFO) (Fujimoto et al., 2021), apenas parte do substrato aparece em complexo na região glicona, o que sugere baixa afinidade para metade do substrato e produto na região aglicona (Figura 22).

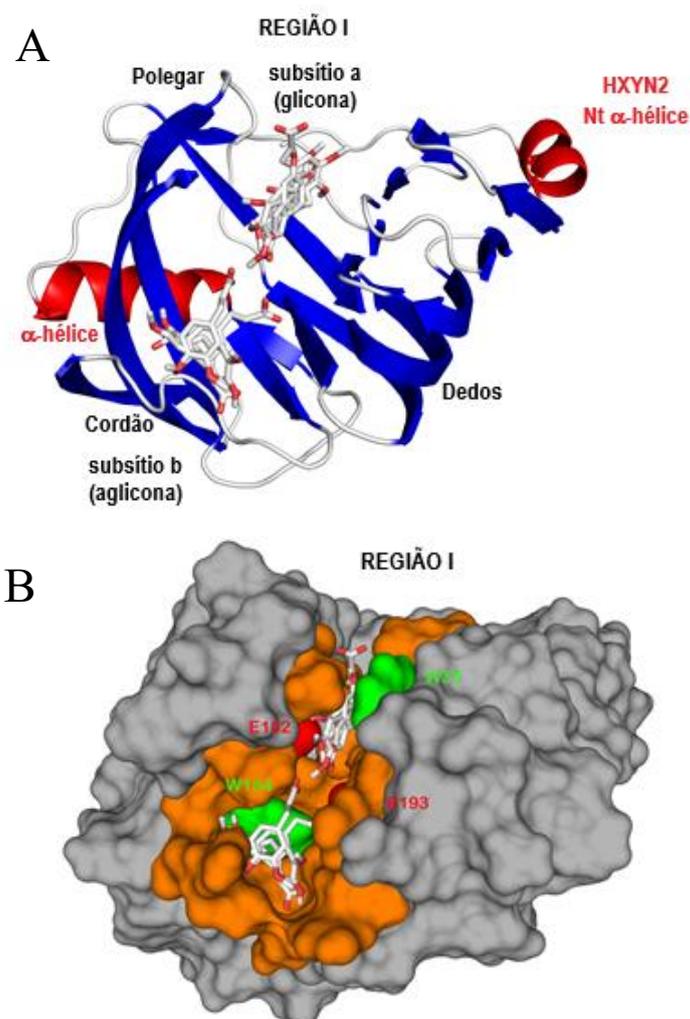


Figura 61. Possíveis sítios de ligação de AF na estrutura da HXYN2, avaliados por *docking* molecular. (A) e (B) complexo HXYN2-AF mostrando as soluções de interação na região I envolvendo sítios aglicona e glicona. O AF é representado em formato de bastão (branco e vermelho) e a proteína em superfície molecular. Resíduos que interagem com AF estão destacados em superfície laranja, resíduos Trp e Glu estão em superfícies verde e vermelha, respectivamente (Oliveira et al, 2022).

Todos estes dados sugerem que AF interage com maior probabilidade na região aglicona (subsítio b) (Figura 61A), aumentando a eficiência catalítica sem modificar a afinidade do substrato (Figura 33 e Tabela 7). Todas as soluções nos subsítios +3/+2 da região aglicona (soluções 5, 7, 8 e 9) (subsítio b, Figura 61) mostraram ligações de hidrogênio entre AF e resíduos N87, Y89, S116, Q117, S136, Q152 e W154 da HXYN2. Além disso, interações hidrofóbicas e de van der Waals com N61, Y112, N113, P114, G115, A118, R138, Y195 e o resíduo catalítico E193 são destacadas (Anexo F).

As soluções de *docking* estão de acordo com os resultados obtidos por calorimetria de titulação isotérmica, que mostrou que o passo inicial da interação entre AF e HXYN2 envolve principalmente ligações de hidrogênio e é um processo dirigido por entalpia. Com o aumento da concentração de AF, a segunda etapa da formação do complexo caracterizou-se como um processo dirigido por entropia, associado principalmente a interações hidrofóbicas, bem como ligações de hidrogênio. Além disso, as interações entre a enzima e o AF são acompanhadas pela reorganização das moléculas de água em torno de ambas as estruturas. Portanto, devido à complexidade dos resultados do ITC, foi considerada a presença de diferentes sítios de ligação de AF à enzima.

6.9 Cristalização da proteína HXYN2

A presença de cristais na etapa de triagem foi identificada após cinco dias do preparo das placas, em diversas condições dos dois kits utilizados (JCSG e PACT). Os cristais obtidos na placa em que foi utilizado o kit PACT apresentam em comum o agente precipitante, 20% de polietilenoglicol (PEG) 6000, a mesma molaridade de tampão, que variou o pH entre 5,0 e 8,0 e a presença de íons cloreto na solução de cristalização (Tabela 15).

Algumas condições apresentaram cristais em duas das três gotas presente em cada poço, a que continha a maior e a menor concentração de proteína. A gota com maior concentração de proteína apresentou cristais pequenos e abundantes, enquanto a de menor concentração apresentou cristais maiores, bem definidos e em menor quantidade (Figura 63). Além disso, houve a formação de precipitados em algumas gotas. Outras condições apresentaram cristais em apenas uma das três gotas, e estes variaram em quantidade e em forma (Figura 62).

Tabela 15. Condições de cristalização da HXYN2 na etapa de *screening* utilizando o kit PACT (Jena Biosciences Screen).

Placa	Precipitante	Tampão	Aditivo
B1	20% w/v PEG 6000	100 mM acetato de sódio pH 5,0	200 mM cloreto de sódio
B2	20% w/v PEG 6000	100 mM acetato de sódio pH 5,0	200 mM cloreto de amônio
B3	20% w/v PEG 6000	100 mM acetato de sódio pH 5,0	200 mM cloreto de lítio
B4	20% w/v PEG 6000	100 mM acetato de sódio pH 5,0	200 mM cloreto de magnésio
B6	20% w/v PEG 6000	100 mM acetato de sódio pH 5,0	10 mM cloreto de zinco
B7	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 7,0	200 mM cloreto de sódio
B8	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 7,0	200 mM cloreto de amônio
B10	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 7,0	200 mM cloreto de magnésio
B11	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 7,0	200 mM cloreto de cálcio
D1	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	200 mM cloreto de sódio
D2	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	200 mM cloreto de amônio
D3	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	200 mM cloreto de lítio
D4	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	200 mM cloreto de magnésio
D5	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	200 mM cloreto de cálcio
D6	20% w/v PEG 6000	100 mM MES pH 6,0	10 mM cloreto de zinco
D7	20% w/v PEG 6000	100 mM TRIS pH 8,0	200 mM cloreto de sódio
D12	20% w/v PEG 6000	100 mM TRIS pH 8,0	10 mM cloreto de zinco

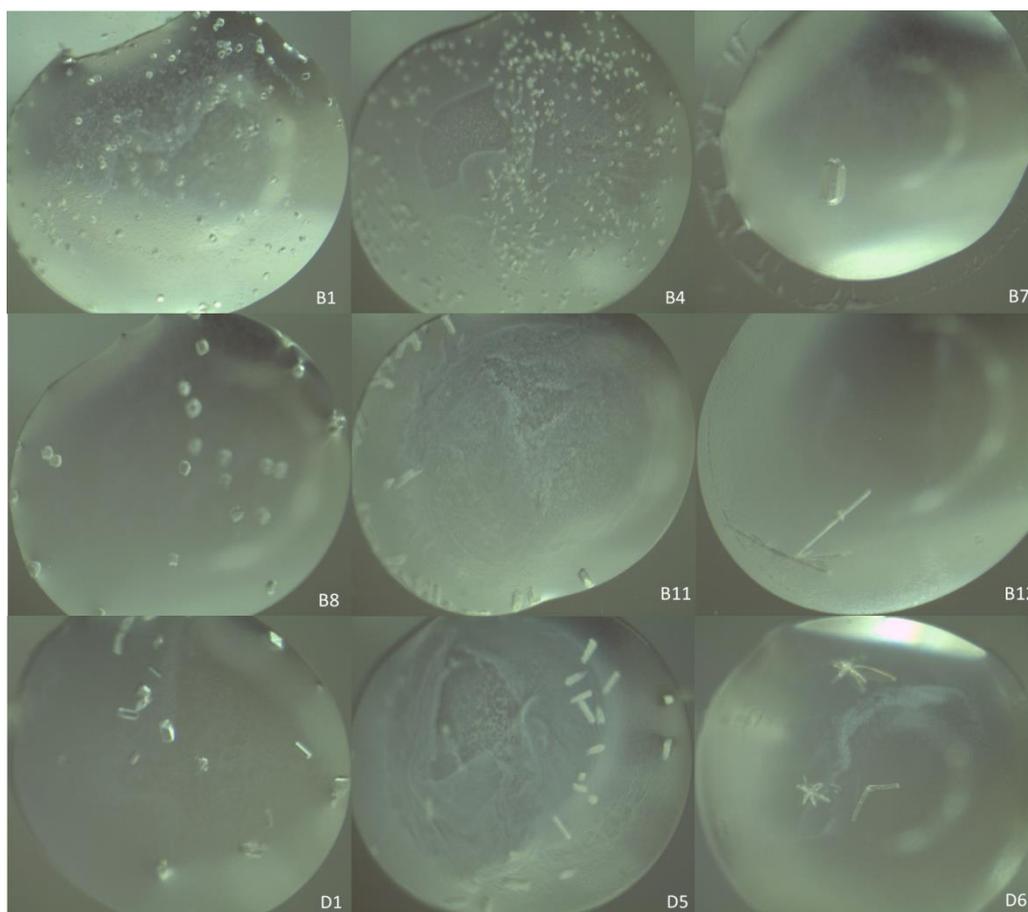


Figura 62. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B1, B4, B7, B8, B11, B12, D1, D5 e D6 (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

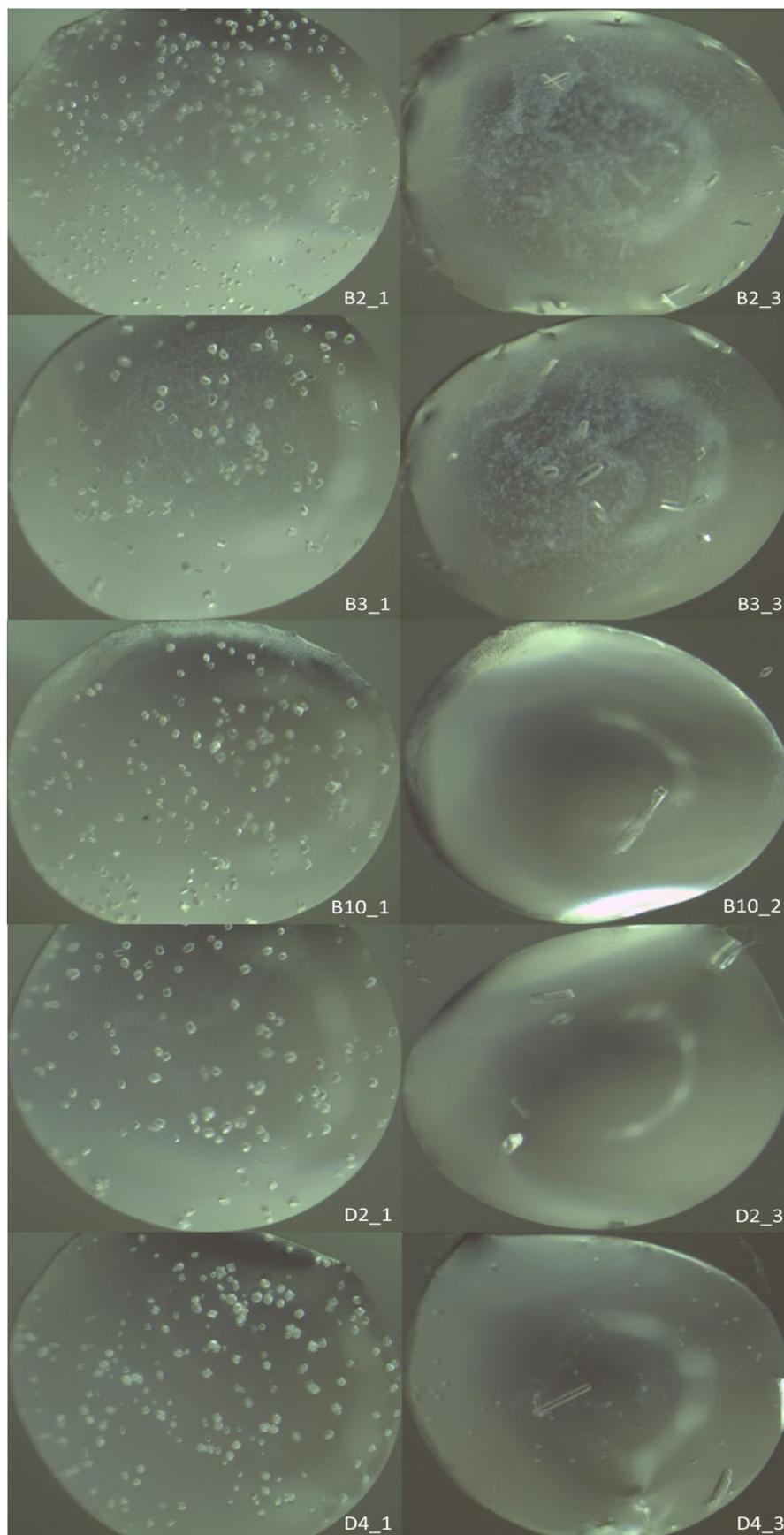


Figura 63. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B2, B3, B10, D2 e D4 (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

Um dos cristais obtidos na condição B6 (Figura 64) foi submetido ao experimento de difração de raios X para a coleta de dados de difração no Difratorômetro D8 Venture Bruker® (dados não apresentados). Devido ao tamanho dos cristais a resolução foi de 8,0 Å aproximadamente, o que impossibilitou a resolução da estrutura. Porém, foi o suficiente para confirmar que os cristais eram de proteína e não de sais utilizados no ensaio de cristalização, sendo uma condição promissora para ensaios de refinamento com o objetivo de obter cristais maiores e mais adequados para os experimentos de difração.

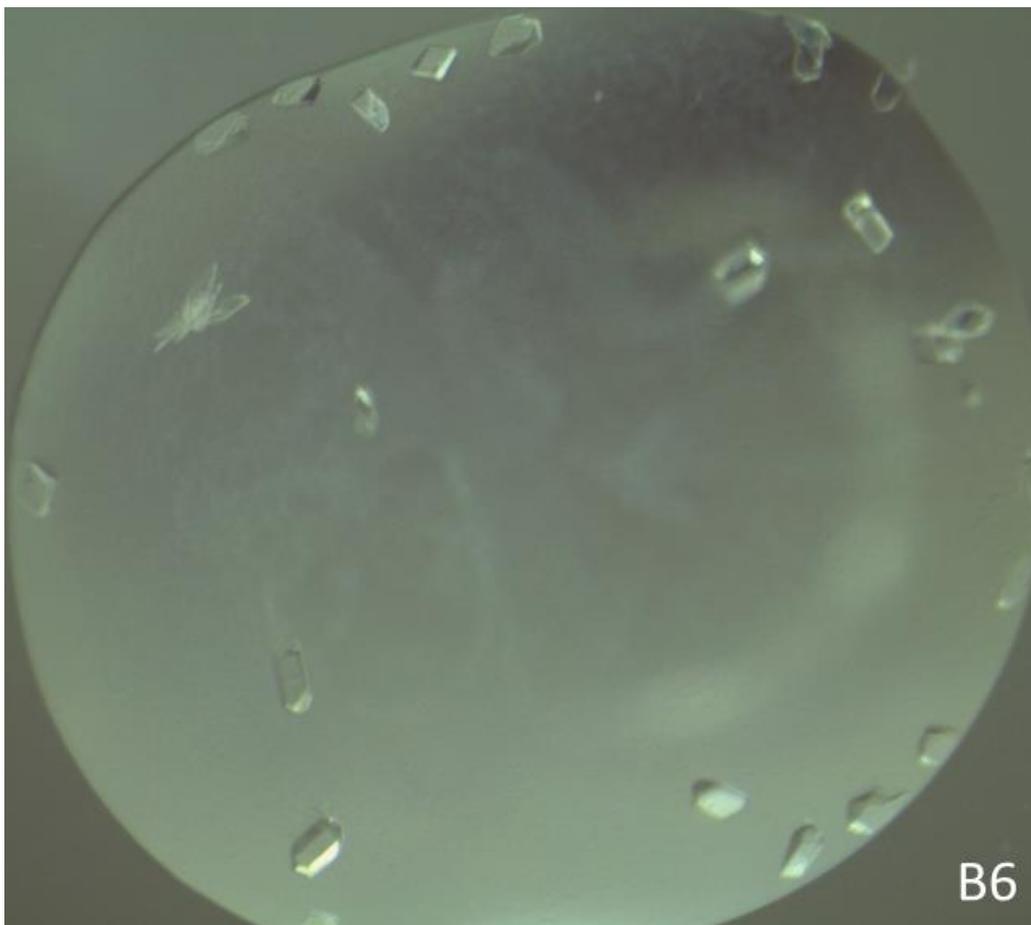


Figura 64. Cristais obtidos sob a condição de cristalização B6 (PEG 6000 20%, tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, cloreto de zinco 10 mM) (Tabela 15) do kit PACT (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

Diversas condições do kit JCSG foram testadas e promoveram o crescimento de cristais. O agente precipitante variou entre PEG 200 e 10000, em diferentes concentrações, entre pH ácido e básico e com diferentes íons (Tabela 16). Os cristais apresentaram formas variadas, estando em maior número em algumas gotas com maior concentração de proteína, e bem definidos e maiores em outras gotas com menor

concentração (Figura 65 a 66). Cristais das condições A1, D2, D4 e D11 foram submetidos à difração de raios X, no entanto, apresentaram padrão de difração semelhante a cristais de sal (dados não mostrados).

Tabela 16. Condições de cristalização da HXYN2 na etapa de triagem utilizando o kit JCSG (Jena Biosciences Screen).

Placa	Precipitante	Tampão	Aditivo
A3	20% w/v PEG 3350	-	200 mM hidrogenocitrato diamônico pH 5,0
A5	20% w/v PEG 3350	-	200 mM formato de magnésio pH 5,9
A7	20% w/v PEG 8000	100 mM potássio/fosfato/citrato pH 4,2	200 mM cloreto de sódio
A9	20% w/v PEG 3350	100 mM potássio/fosfato/citrato pH 4,2	200 mM nitrato de amônio pH 6,3
B3	20% w/v PEG 3350	-	200 mM cloreto de amônio pH 6,3
B7	10% w/v PEG 3000	100 mM acetato de sódio pH 4,5	200 mM acetato de zinco
C12	20% w/v PEG 8000	100 mM TRIS pH 8,5	200 mM cloreto de magnésio
D1	8% w/v PEG 4000	100 mM acetato de sódio pH 4,6	-
D2	10% w/v PEG 8000	100 mM TRIS pH 7,0	200 mM cloreto de magnésio
D3	20% w/v PEG 6000	100 mM citrato tri-sódio pH 5,0	-
D4	50% w/v PEG 200	100 mM MES pH 6,5	200 mM cloreto de magnésio
D7	40% w/v PEG 400	100 mM TRIS pH 8,5	200 mM sulfato de lítio
G7	-	100 mM BIS-TRIS pH 5,5	300 mM cloreto de magnésio
G10	45% v/v 2-metil-2,4-pentanodiol	100 mM BIS-TRIS pH 5,5	200 mM cloreto de cálcio
G12	17% w/v PEG 10000	100 mM BIS-TRIS pH 5,5	100 mM acetato de amônio
H10	25% w/v PEG 3350	100 mM BIS-TRIS pH 5,5	200 mM acetato de amônio
H11	25% w/v PEG 3350	100 mM BIS-TRIS pH 5,5	200 mM cloreto de magnésio

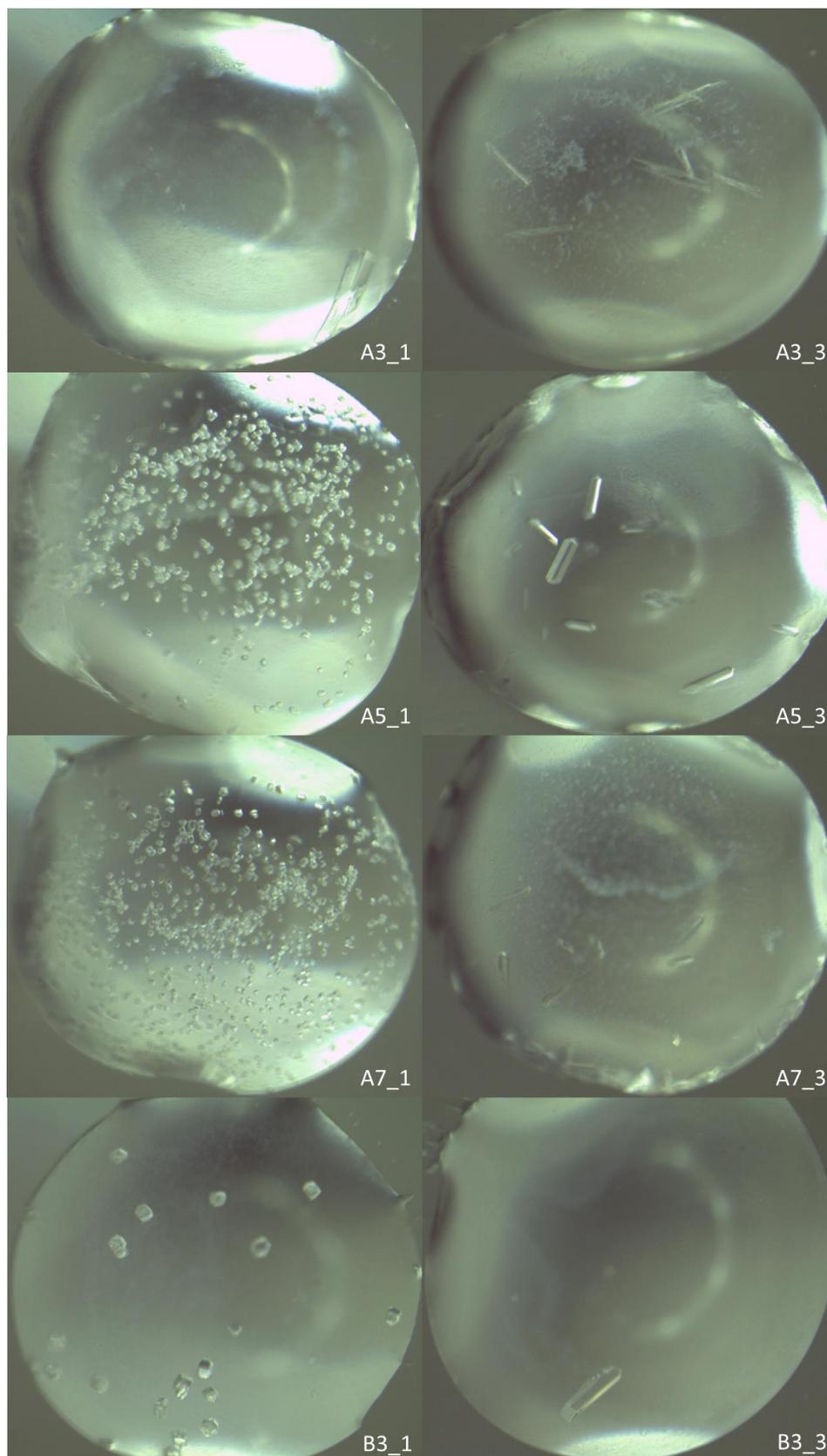


Figura 65. Cristais obtidos sob as condições de cristalização A3, A5, A7 e B3 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

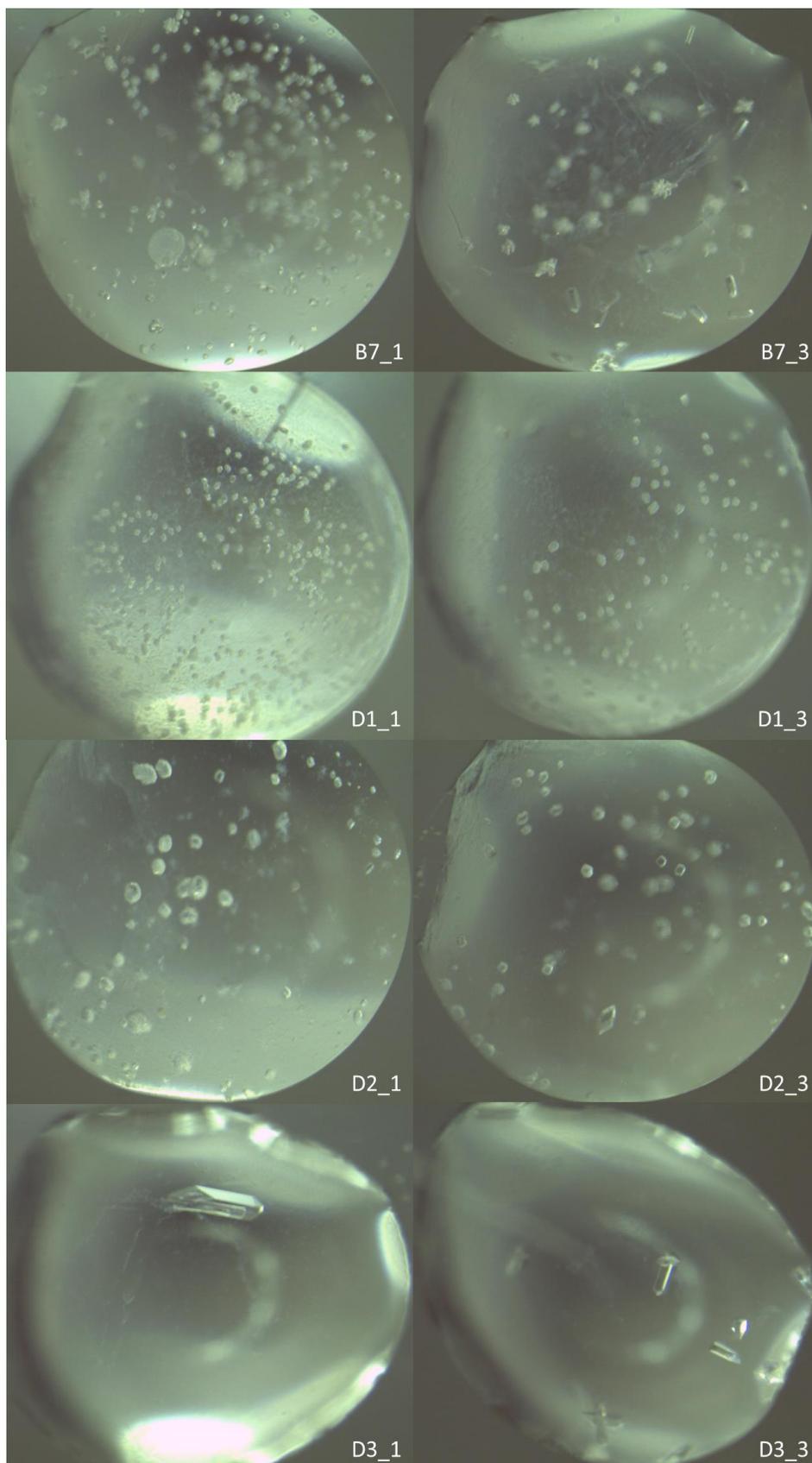


Figura 66. Cristais obtidos sob as condições de cristalização B7, D1, D2 e D3 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

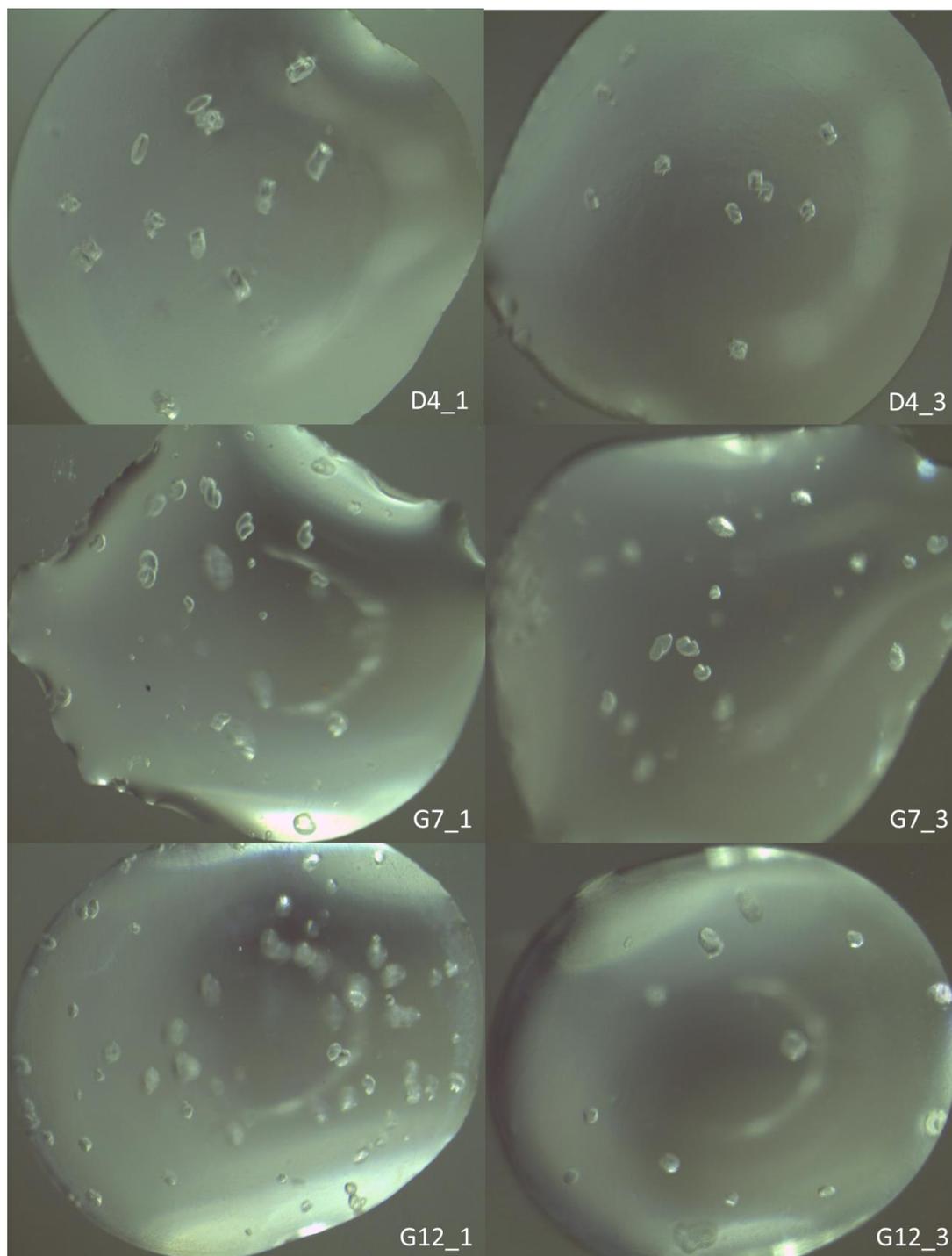


Figura 67. Cristais obtidos sob as condições de cristalização D4, G7 e G12 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

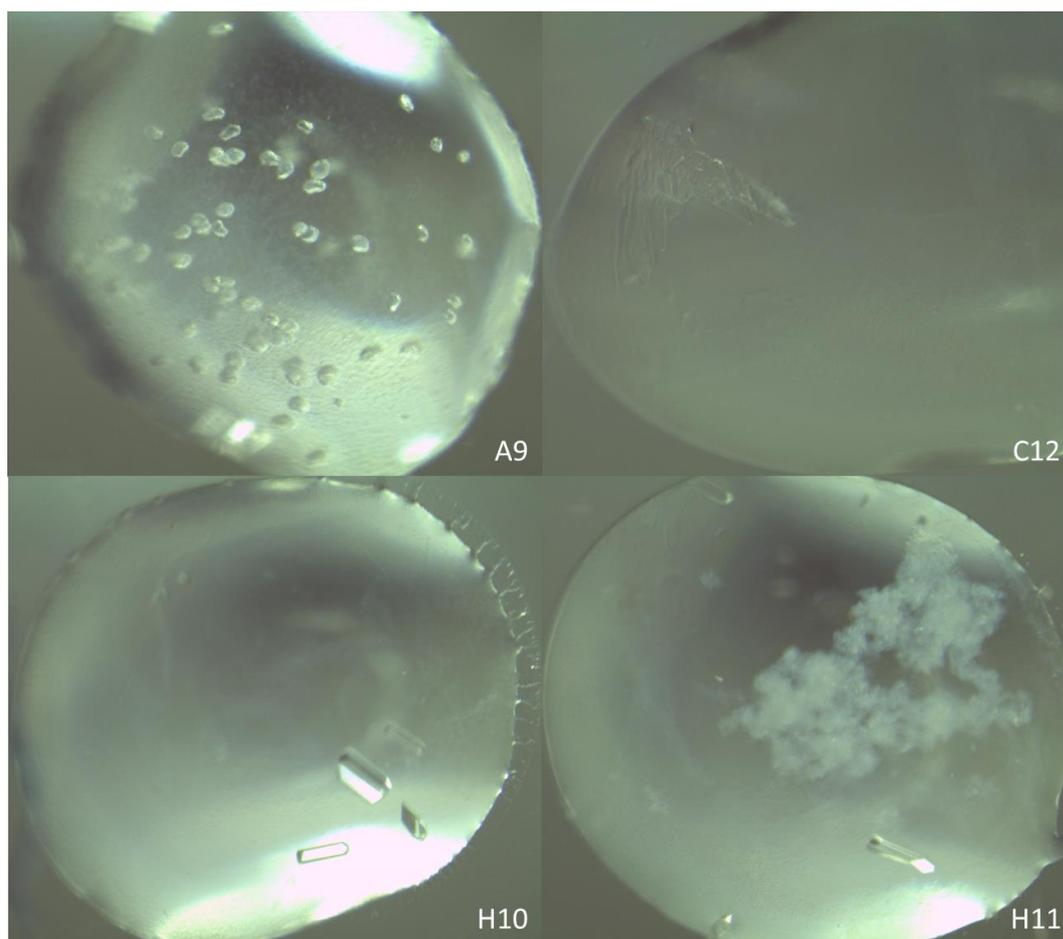


Figura 68. Cristais obtidos sob as condições de cristalização A9, C12, H10 e H11 (Tabela 16) do kit JCSG (Jena Biosciences Screen), pela técnica de gota pendurada (Aumento de 100 vezes).

Diante das condições de cristalização em que foram obtidos cristais na etapa de triagem, novas condições foram testadas na etapa de refinamento, a fim de se obter cristais apropriados para experimentos de difração de raios-X. Nesta etapa, variou-se a concentração do agente precipitante PEG 6000 entre 16 % e 26% e PEG 3350 entre 18% e 28% e os tampões utilizados foram: acetato de sódio pH 5,0 (100 mM), HEPES pH 7,0 (100 mM), TRIS pH 8,0 (100 mM) e BIS-TRIS pH 5,5 (100 mM). Nos ensaios de refinamento foram utilizadas duas concentrações de proteína, 5 e 7 mg/mL.

O cristal obtido na condição PEG 3350 26% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,5 (Figura 69) apresentou o formato de uma placa côncava que só foi assim descrita por meio da imagem da câmera ao posicionar o loop contendo o cristal na linha do feixe de raios X. Este cristal foi submetido à difração de raios-X para obtenção do padrão de difração, porém, a resolução do cristal impossibilitou a resolução da estrutura (dados

não mostrados). No entanto, os resultados indicam ser um cristal de proteína, permitindo explorar esta condição de cristalização nos próximos ensaios de refinamento.

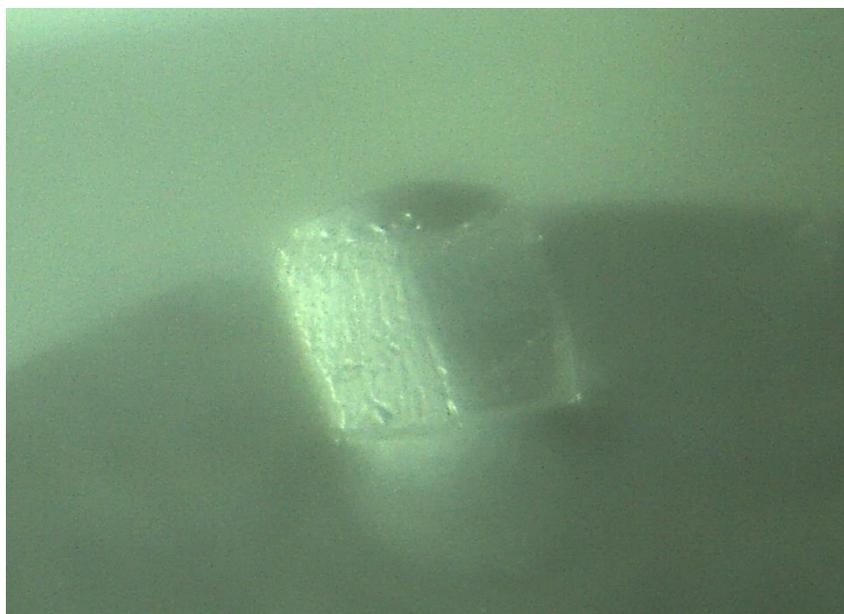


Figura 69. Cristal obtido na condição PEG 3350 26% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,5 por meio da técnica de gota sentada (Aumento de 100 vezes).

Ao ampliar as condições de refinamento a partir do ensaio anterior, os cristais foram obtidos em quatro condições:

- Placa 3C1 - 6 mg/mL proteína, 22% PEG 3350, tampão BIS-TRIS pH 5,7
- Placa 5C6 - 5 mg/mL proteína, 28% PEG 3350, tampão BIS-TRIS pH 5,5
- Placa 7D2 - 9 mg/mL proteína, 15% PEG 6000, tampão Acetato de sódio pH 5,4
- Placa 7D3 - 9 mg/mL proteína, 18% PEG 6000, tampão Acetato de sódio pH 5,4

Os cristais apresentaram formas variadas, como cilíndrica e outros em forma de ampulheta (Figuras 70 a 73). O único cristal obtido na condição contendo PEG 3350 22% e pH 5,7 é bem definido, cilíndrico e com comprimento de 0,184 μm (Figura 70). Com maior concentração de proteína (9 mg/mL), e na presença de PEG 6000 pH 5,4 (Figura 72), cinco cristais foram obtidos, apresentando formato de bastão, com comprimento de cerca de 1,6 mm, enquanto outros apresentaram formato de ampulheta, com as pontas semelhante a um leque. Estes dados indicam que placas de cristal foram

depositadas desordenadamente, o que pode dificultar os experimentos de difração. O mesmo aconteceu com os cristais apresentados na Figura 73.

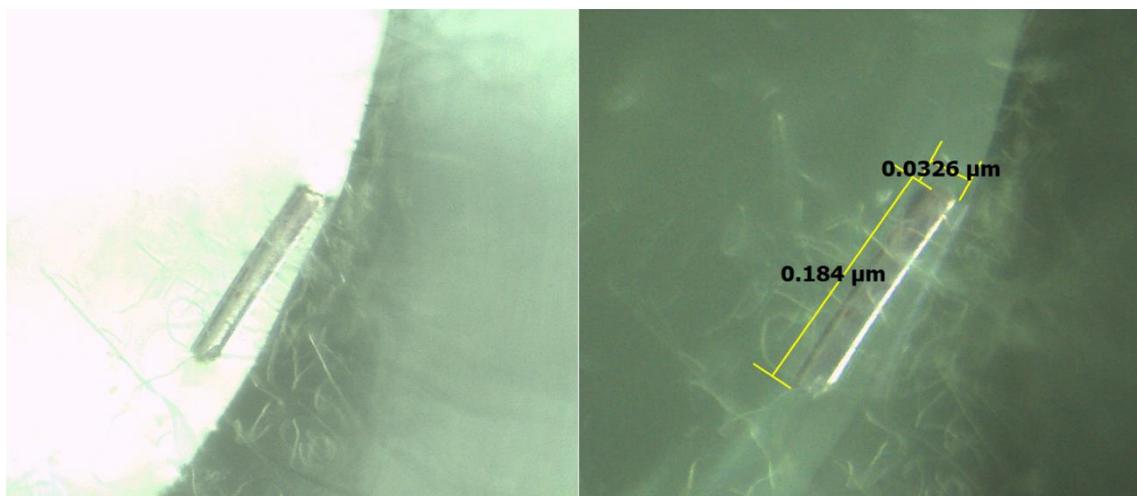


Figura 70. Cristal obtido na condição PEG 3350 22% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,7 por meio da técnica de gota sentada (Aumento de 100 vezes).

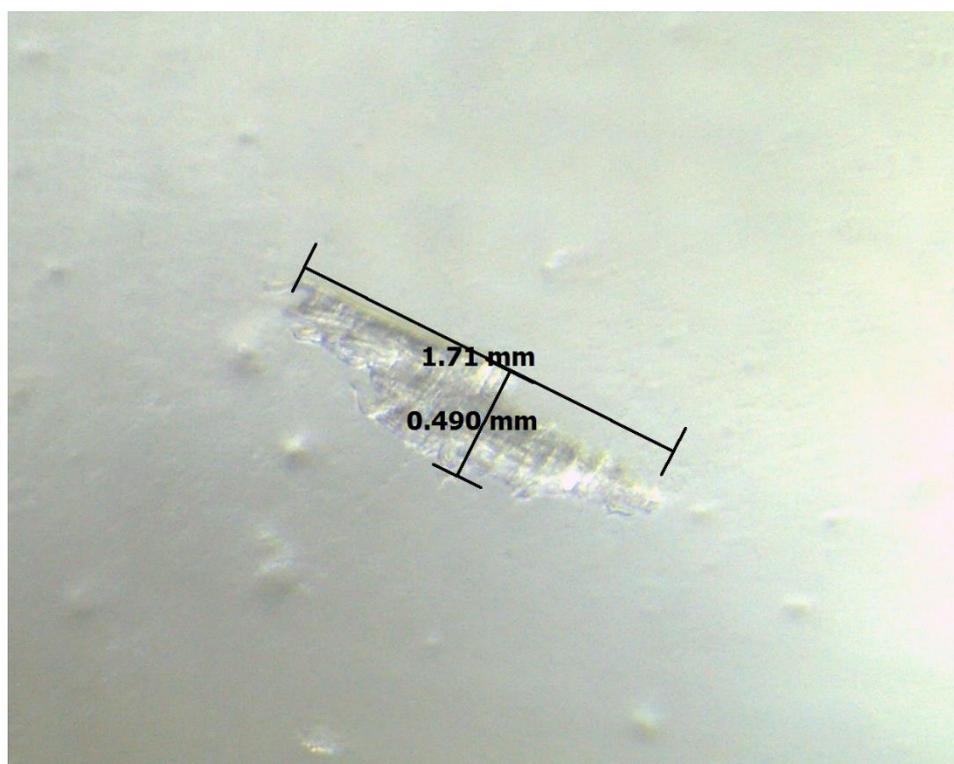


Figura 71. Cristal obtido na condição PEG 3350 28% e tampão BIS-TRIS 100 mM pH 5,5 por meio da técnica de gota sentada (Aumento de 100 vezes).

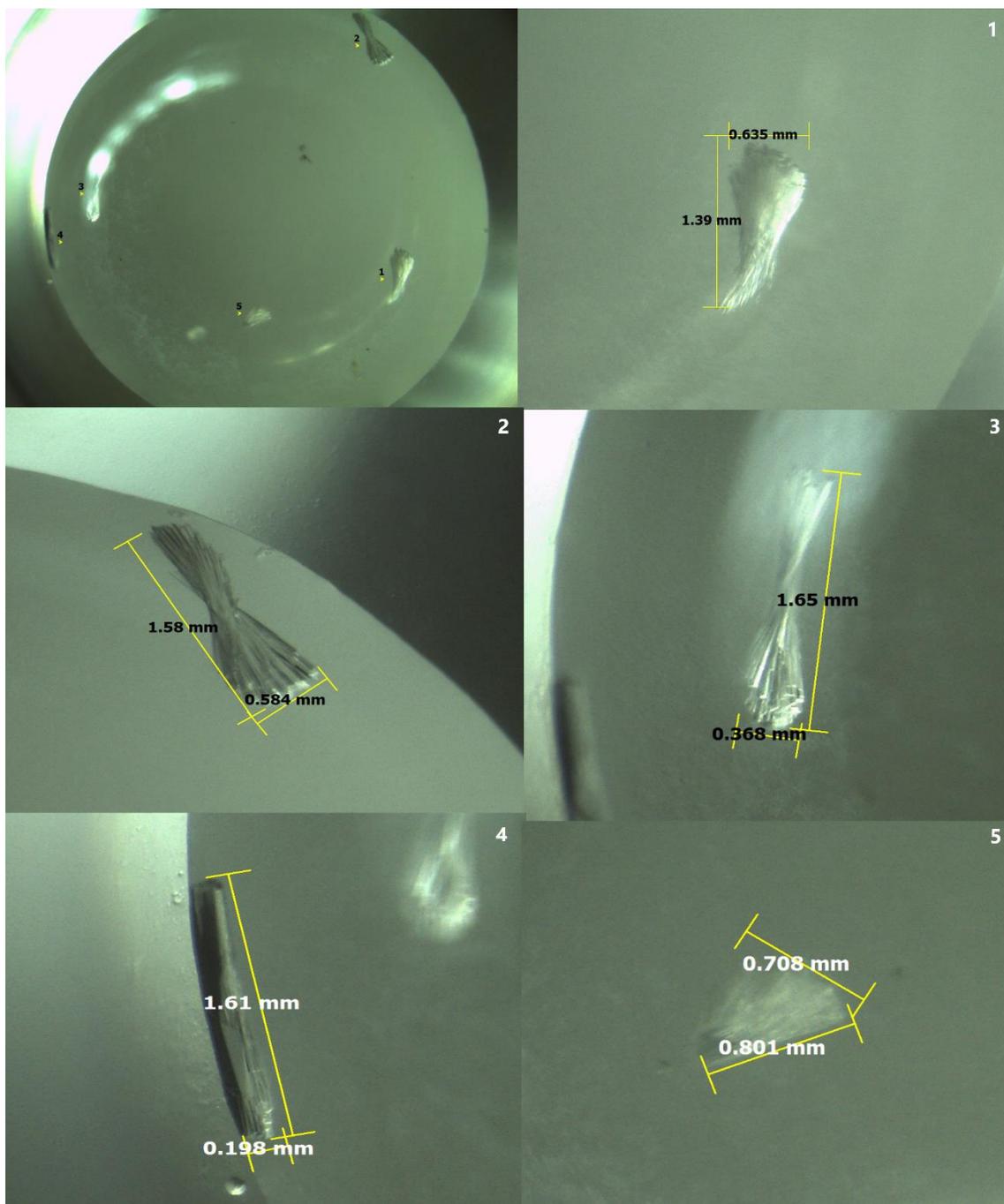


Figura 72. Cristal obtido na condição PEG 6000 15% e tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,4 por meio da técnica de gota sentada (Aumento de 100 vezes).

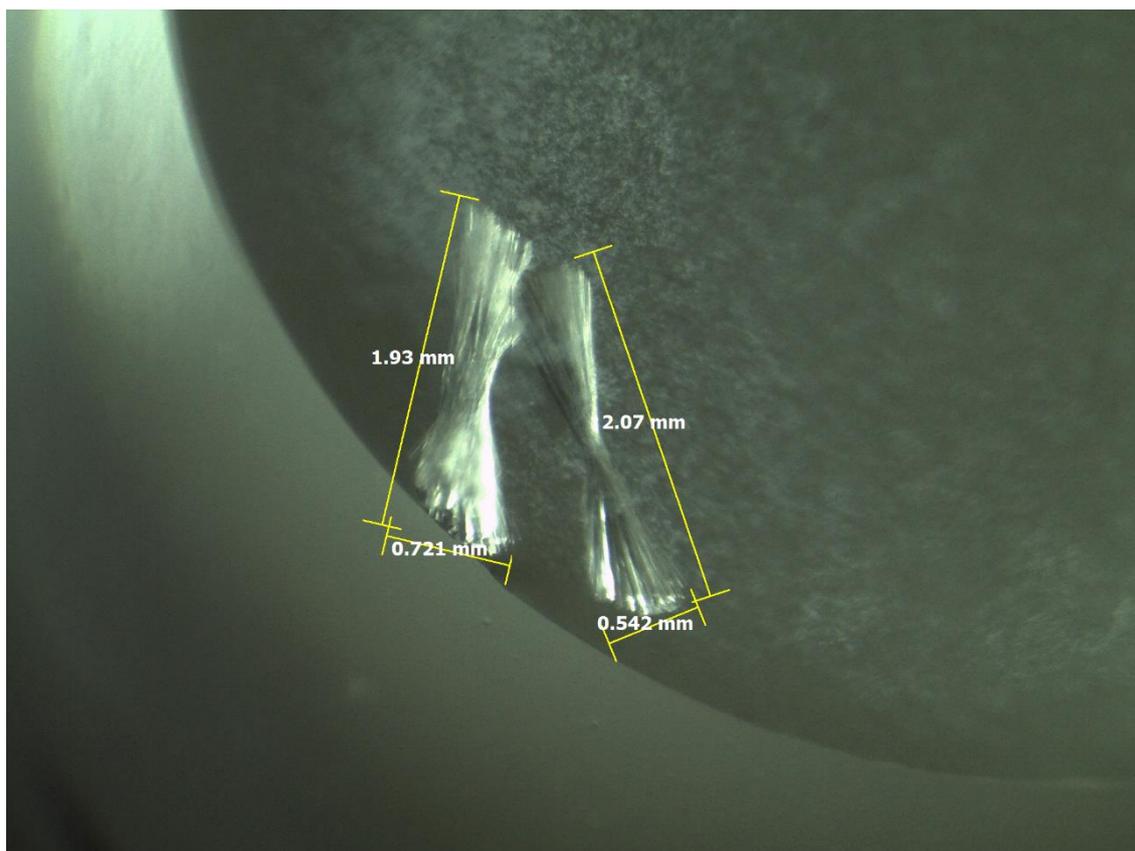


Figura 73. Cristal obtido na condição PEG 6000 18% e tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,4 por meio da técnica de gota sentada (Aumento de 100 vezes).

Diante destes resultados, novas placas com as mesmas condições foram feitas a fim de se obter um maior número de cristais apropriados para experimentos de difração de raios-X. Meses depois, dois cristais foram obtidos na condição PEG 6000 15% e tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,4 e estes foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton – Sirius em Campinas, São Paulo para coleta de dados de difração de raios X.

6.10 Coleta de dados de difração de raios X

Após congelados em solução crioprotetora (condição de cristalização com glicerol 20% v/v), os cristais de HXYN2 foram submetidos à difração de raios X e os dados coletados utilizando o detector PILATUS2M® (Dectris, Suíça) (Figura 74). Dois cristais difrataram e dois conjuntos de dados de cada cristal foram coletados, em um comprimento de onda de 0,97718 Å, sendo obtidas 3600 imagens para cada conjunto, com um ângulo de oscilação de 0,1°.

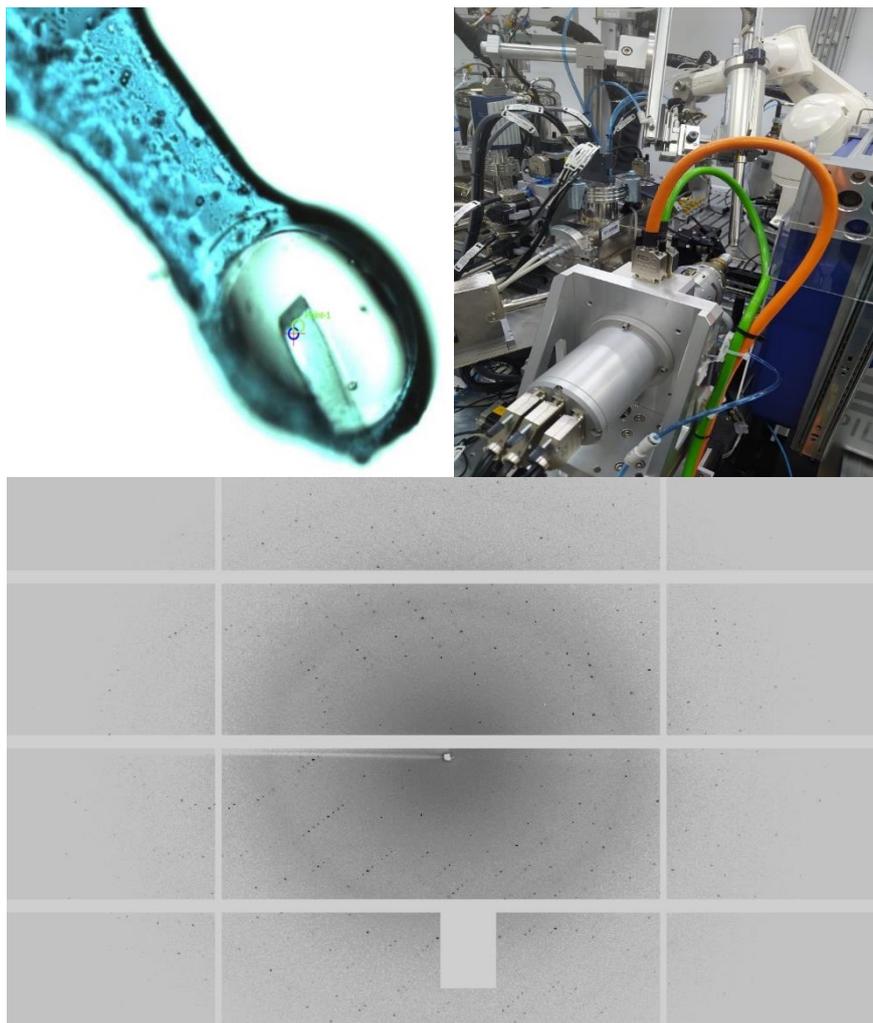


Figura 74. Coleta de dados de difração de raios X do cristal da proteína HXYN2.

Após a indexação dos dados, que apresentaram uma resolução de 1,6 Å, o grupo espacial determinado para os dois cristais difratados foi o ortorrômbico $P2_12_12_1$ ($\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$) com parâmetros de célula unitária $a = 56,03$ Å, $b = 64,17$ Å, $c = 102,30$ Å. O coeficiente de Matthew ($2,19$ Å³/Da) indicou a presença de duas moléculas na unidade assimétrica do cristal, com 43,82% de solvente.

A estrutura cristalográfica da HXYN2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi obtida por substituição molecular utilizando como modelo as coordenadas da estrutura da endoxilanasase de *Thermomyces lanuginosus* (PDB 1YNA).

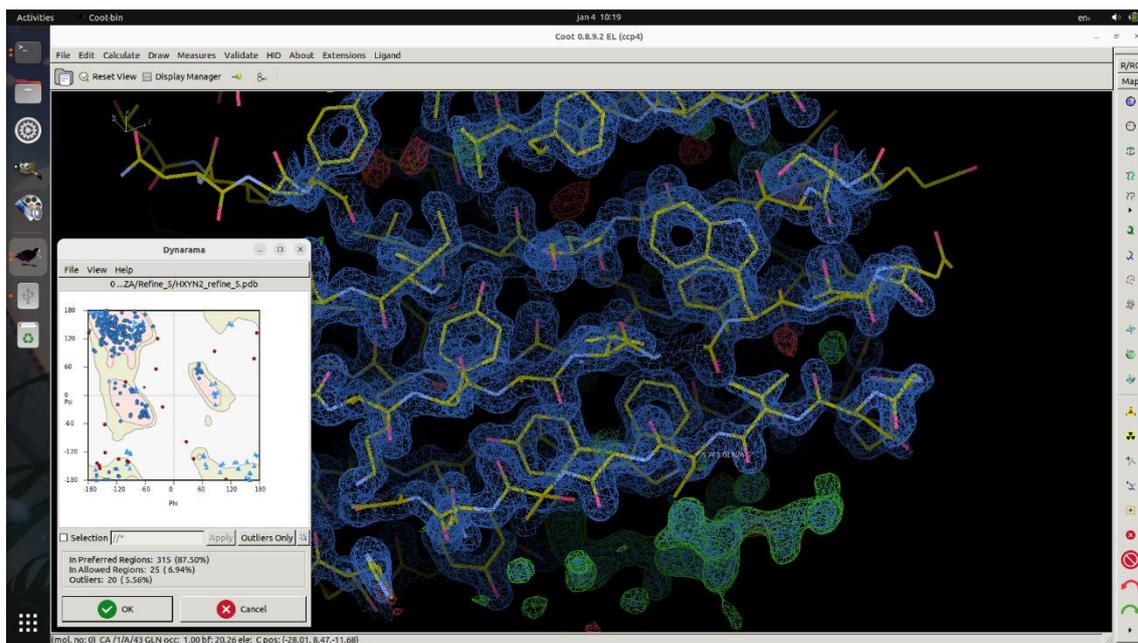


Figura 75. Etapa inicial de refinamento da estrutura tridimensional da proteína HXYN2

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a relação estrutura-função do HXYN2 recombinante foi demonstrada por meio da caracterização enzimática e estrutural. Os principais resultados obtidos foram:

- O modelo predito da estrutura da HXYN2 foi obtido por homologia
- A HXYN2 mostrou alta atividade em uma ampla faixa de pH (5,0–9,0)
- A atividade da HXYN2 foi superior a 70% nas temperaturas entre 40 e 50 °C
- Nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, a HXYN2 se mantém estável apresentando atividade acima de 80% após duas horas.
- O ácido ferúlico promoveu aumento de 60-75% na atividade enzimática
- A cinética enzimática da HXYN2, utilizando o substrato xilana *beechwood*, não apresentou a tendência hiperbólica típica da cinética de Michaelis-Menten, mas sim uma curva sigmoidal.
- O AF modula positivamente a atividade enzimática, influenciando na eficiência cinética da HXYN2, com o aumento nos valores de $V_{m\acute{a}x}$, k_{cat} e da eficiência catalítica.
- Os dados do ITC sugerem que a interação de AF com HXYN2 ocorre principalmente por meio de estágios iniciais e finais como processos acionados por entalpia e entropia, respectivamente, com pelo menos um ou dois sítios de ligação que estão associados às mudanças conformacionais da proteína
- Os resultados de ultracentrifugação analítica indicam que a HXYN2 não apresenta a tendência de auto associação. O aumento da concentração de proteína e a mudança de pH do meio em que se encontra não são determinantes para o processo de oligomerização, considerando que a HXYN2 se mantém na forma monomérica, mesmo nestas condições.
- Os espectros de emissão de fluorescência apresentaram deslocamentos discretos compatíveis com a estabilidade estrutural da HXYN2 com a variação de pH. A presença de AF promove diferenças no ambiente micromolecular dos resíduos de triptofano próximos ao sítio ativo.
- Os valores da constante de ligação da interação entre HXYN2 e AF são dependentes do pH e indicaram uma afinidade moderada (em pH 7,0 e 9,0) a forte (em pH 4,0).

- Os espectros de dicroísmo circular para cada pH estudado apresentam sinal dicróico predominante em regiões que correspondem a proteínas com estruturas do tipo folha- β (banda positiva em ~ 198 nm e banda negativa em 218 nm).
- As curvas de desnaturação térmica obtidas em pHs 4,0, 6,0, 7,0 e 9,0 mostram dois estados, nativo e desenovelado, e o momento em que essa transição acontece, indicado pelos valores da temperatura de transição (T_m)
- A estrutura secundária da HXYN2 na presença de AF mostrou uma ligeira diminuição do conteúdo de α -hélice e aumento do conteúdo de β -*turn* e de estruturas desordenadas
- As curvas de desnaturação térmica mostram uma diminuição da T_m de 63,5 para 54,1 °C, na presença de AF, indicando maior estabilidade estrutural da HXYN2 na ausência de AF.
- O *docking* molecular mostrou que AF forma um complexo com HXYN2 na região de aglicona, interagindo com resíduos de triptofano expostos ao solvente e outros resíduos nesta vizinhança por meio de pontes de hidrogênio (N87, Y89, S116, Q117, S136, Q152 e W154), interações hidrofóbicas e iônicas (N61, Y112, N113, P114, G115, A118, R138, Y195 e E193)
- Cristais da proteína HXYN2 foram obtidos em diversas condições de cristalização
- Cristais de HXYN2 foram difratados na linha de luz Manacá – LNLS/Sirius e a estrutura tridimensional está sendo resolvida e refinada.

Pelo exposto, as principais conclusões deste trabalho são apresentadas a seguir. A HXYN2 apresenta alta atividade em ampla faixa de pH e temperatura, sendo termoestável por mais de duas horas, características importantes para a aplicação biotecnológica em processos industriais. O composto fenólico AF foi caracterizado como ativador enzimático da HXYN2 e, de acordo com os estudos estruturais apresentados, a interação entre este composto e a proteína ocorre de forma moderada a forte com resíduos de triptofano expostos ao solvente e promove o aumento de estruturas do tipo β -*turn* e desordenadase, conseqüentemente, da flexibilidade estrutural da proteína. De acordo com os resultados de *docking* molecular, esta ligação do AF ocorre especificamente no subsítio +3 da região aglicona do modelo tridimensional predito da HXYN2. A interação do AF com resíduos de aminoácidos dessa região promoveu

discretas mudanças conformacionais no sítio ativo que não afetaram a afinidade da enzima pelo substrato. No entanto, a ligação do AF resultou no aumento da atividade enzimática, devido ao aumento na velocidade de liberação de produto e, conseqüentemente, do aumento na eficiência catalítica e *turn over* da HXYN2.

8. PERSPECTIVAS

As sugestões para a continuidade do trabalho são apresentadas a seguir:

- Resolver, refinar e analisar a estrutura da proteína HXYN2 e depositar no banco de dados PDB
- Realizar experimentos de cristalização do complexo HXYN2-Ácido ferúlico
- Resolver a estrutura do complexo HXYN2-Ácido ferúlico
- Realizar experimentos de Dinâmica Molecular do complexo HXYN2-Ácido ferúlico
- Realizar a cinética enzimática da HXYN2 envolvendo mais de um substrato
- Publicar artigos científicos

9. REFERÊNCIAS

Abramson, M.; Shoseyov, O.; Shani, Z. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. **Plant Science**, n. 178, p. 61-72, 2010.

Afonine, P.V.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Moriarty, N.W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T.C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P.H.; Adams, P.D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr**, v. 68, p. 352-367, 2012.

Araujo, E.F.; Barros, E.G.; Caldas, R.A.; Silva, D.O. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, n. 11, p. 781-784, 1983.

Aro, N.; Pakula, T.; Penttila, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 29, p.719, 2005.

Bastawde, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 353-368, 1992.

Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L. & Hoondal, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326–338, 2001.

Beltramino, F. et al. Exploring the effects of treatments with carbohydrases to obtain a high-cellulose content pulp from a non-wood alkaline pulp. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 302-312, 2015.

Benedetti, A.C.E.P. Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009

Biely, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

Boukari, I.; O'Donohue, M.; Rémond, C.; Chabbert, B. Probing a family GH11 endo--1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 130–138, 2011.

Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squeglia, V.; Bruzzese, D.; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Amarri, S.; Guarino, A. A formula containing galacto and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. **Clinical Nutrition**, v. 28, p. 156-161, 2009.

Buranov, A.U.; Mazza, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, n. 28, p. 237-259, 2008.

- Butt, M. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22-31, 2008.
- Candela, M.; Maccaferri, S.; Turrone, S.; Carnevali, P.; Brigidi, P. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 93-101, 2010.
- Cao, G.; Ximenes, E.; Nichols, N.N.; Zhang, L.; Ladisch, M. Biological abatement of cellulase inhibitors. **Bioresour. Technol.**, v. 146, p. 604–610, 2013.
- Cao, Y. & Li, L. Improved protein-ligand binding affinity prediction by using a curvature-dependent surface-area model. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1674-1680, 2014.
- Carey, F.A. **Química Orgânica-Vol. 2**. AMGH Editora, 2011.
- Carvalho, W.R. Produção e Purificação da Xilanase de 23 kDa do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP. 2003.
- Carvalho, W.R. Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Goiânia, Goiás: UFG, 2008.
- Carvalho, A.F.A.; Oliva Neto, P.; Silva, D.F.; Pastore, G.M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75-85, 2013.
- Chadha, B.S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A. & Pandey, A. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. **Bioresour Technol**, v. 277, p. 195-203, 2019.
- Chávez, R.; Bull, P.; Eyzaguirre, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, n. 123, p. 413-33, 2006.
- Chung, Y.C.; Hsu, C.K.; Ko, C.Y.; Chan, Y.C. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. **Nutrition Research**, v. 27, p. 756-761, 2007.
- Cintra, L.C.; Fernandes, A.G.; Oliveira, I.C.M.; Siqueira, S.J.L.; Costa, I.G.O.; Colussi, F.; Jesuíno, R.S.A.; Ulhoa, C.J.; Faria, F.P. Characterization of a recombinant xylose tolerant β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.105, p.262-271, 2017.
- Cintra, L.C.; Costa, I.C.; Oliveira, I.C.M.; Fernandes, A.G.; Faria, S.P.; Jesuíno, R.S.A.; Ravanal, M. C.; Eyzaguirre, J.; Ramos, L. P.; Faria, F. P.; Ulhoa, C. J. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, 109447, 2020.

Cleland, W. W. Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. **Adv. Enzymol.**, v. 45, p. 273-387, 1977.

Cleland, W.W. Enzyme kinetics: steady state. In *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley & Sons, Inc./Wiley Interscience, www.els.net. 2002.

Collins, T.; Gerday, C. & Feller, G. Xylanases, Xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 5-23, 2005.

Coughlan, M.P.; Hazlewood, G. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, n. 17, p.259-289, 1993.

Davies, G. & Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853–859, 1995.

Dang, Y.; Liu, M. & Wu, X. Recombinant rice xylanase-inhibiting protein inhibits GH11 endo-xylanases through competitive inhibition. **Protein Expression and Purification**, v. 156, p. 17-24, 2019.

De-Paula, E.H.; Ramos, L.P.; Azevedo, M.O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 35-41, 1999.

Dekker, R.F.H. & Richards, G.N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 277-352, 1976.

Dekker, R.F.H. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocelluloses. **Biotechnol Bioeng**, v.28, p.1438–1442, 1986.

Deshpande, S.S.; Cheryan, M.; Salunkhe, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.24, p. 401-449, 1986.

Dhiman, S.; Sharma, J.; Battan, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources**, v. 3, p. 1377-1402, 2008.

Dillon, G. et al. Validation of an Analytical Method for the Determination of the Activity of Xylanase in Animal Feed Additives and in Animal Feeding stuffs. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, p. 1-11, 2015.

Doherty, W.O.S.; Mousavioun, P.; Fellows, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, n. 33, p. 259-276, 2011.

Drula, E.; Garron, M.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature, **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. D571–D577, 2022.

Duarte, G.C.; Moreira, L.R.S.; Jaramillo, P.M.D.; Filho, E.X.F. Biomass-Derived

Inhibitors of Holocellulases. **Bioenerg. Res.**, v. 5, p. 768–777, 2012.

Du Manoir, J.R.; Hamilton, J.; Senior, D.J.; Bernier, R.L.; Grant, J.E.; Mooser, L.E. **Proc. Int. Pulp Bleaching Conf.**, n. 123, 1991.

P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of coot, **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 486-501, 2010.

ENZYMES MARKET - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2012 – 2018. <https://www.transparencymarketresearch.com/enzymes-market.html>.

Faria, F.P. et al. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Hemicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 119–123, 2002.

Fengel, D.; Wegener, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. **Walter de Gruyter**. Germany, p.613, 1989.

Freitas, S.M.; Treptow, W.L.; Faria, F.P.; Azevedo, M.O. & Maigret, B. Structural contributions for thermostability of a new endo-1,4- β -xylanase from the fungus *Hemicola grisea*. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 2, p. 835-851, 2003.

Fujimoto, Z.; Kishine, N.; Teramoto, K.; Tsutsui, S.; Kaneko, S. Structure-based substrate specificity analysis of GH11 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, p. 1943-1952, 2021.

Girelli, A.M.; Astolfi, M.L.; Scuto, F.R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review, **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020.

Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775– 4800, 2010.

Gomes, D.S.B., *et al.* New insights on the formation of gold nanoparticles and Pluronic nanocomposites: Kinetics and thermodynamics parameters. **Journal of Molecular Liquids**, v. 268, p. 181-189, 2018.

Gong, C.S.; Ladisch, M.R.; Tsao, G.T. Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification, Properties, Kinetics, and Mechanism. **Biotechnol. Bioeng.**, v.19, p.959–981, 1977.

Graf, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 435–448, 1992.

Gruber, K.; Klintschar, G.; Hayn, M.; Schlacher, A.; Steiner, W.; Kratky, C. Thermophilic Xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: High-Resolution X-ray Structure and Modeling Studies. **Biochemistry**, v. 37, p. 13475-13485, 1998.

Gruno, M.; Våljamä, P.; Petterson, G.; Johansson, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnol Bioeng**, v.86, p.503–511, 2004.

Gu, W., *et al.* Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. **PLoS One**, v. 6, e16262, 2011.

Han, Z.; Shang-guan, F.; Yang, J. Molecular and Biochemical Characterization of a Bimodular Xylanase from *Marinifilaceae Bacterium* Strain SPP2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

Hansen, C.M.; Björkmann, A. The Ultrastructure of Wood from a Solubility Parameter Point of View. **Holzforschung**, v. 52, n. 4, p.335-344, 1998.

Harris, G.W.; Picckersgill, R.W.; Connerton, I.; Debeire, P.; Touzel, J.; Breton, C. & Pérez, S. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 29, p. 77-86, 1997.

Harris, P.J.; Stone, B.A. Chemistry and Molecular Organization of Plant Cell Walls. In: HIMMEL, M. E. (Ed). Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. **Blackwell Publishing Ltd.**, Oxford, UK.doi: 10.1002/9781444305418.ch4, 2008.

Hegde, S.S.; Kumar, A.R.; Ganesh, K.N.; Swaminathan, C.P.; Khan, M.I. Thermodynamics of ligand (substrate/end product) binding to endoxylanase from *Chainia* sp. (NCL-82-5-1): isothermal calorimetry and fluorescence titration studies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1388, p. 93-100, 1998.

Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v.173, p.501-513, 2015.

Hlasiwetz, H.; Barth, L. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck I) Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 138, p. 61–76, 1866.

Hong, J.; Ladisch, M.R.; Gong, C.S.; Wankat, P.C.; Tsao, G.T. Combined product and substrate inhibition equation for cellobiase. **Biotechnol. Bioeng.**, v.23, p.2779–2788, 1981.

Houfani, A.A.; Anders, N.; Spiess, A.C.; Baldrian, P.; Benallaoua, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. **Biomass and Bioenergy**, v.134, p.105481, 2020.

Hu, Y.J.; Liu, Y.; Hou, A.X.; Zhao, R.M.; Qu, X.S.; Qu, S.S. Studies on the interaction between rare-earth salts of heteropoly EuHSiMo₁₀-W₂O₄₀-25H₂O and bovine serum albumin. **Acta Chim. Sin.**, v. 62, p. 1519–1523, 2004. (In Chinese)

Ibarra, D. *et al.* Combination of alkaline and enzymatic treatments as a process for upgrading sisal paper-grade pulp to dissolving-grade pulp. **Bioresource technology**, v. 101, p. 7416-7423, 2010.

- Jancarik, J. & Kim, S.H. Method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.
- Janes, R.L. The Chemistry of Wood and Fibers. In: Pulp and Paper Manufacture. **The Pulping of Wood**, v. 1, p. 33-72, 1969.
- Jönsson, L.J. & Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour Technol**, v. 199, p. 103-112, 2016.
- Jeffries, T. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. **Current opinion in Biotechnology**, v.7, n.3, p. 337-342, 1996.
- W. Kabsch, XDS, Acta Cryst. D66 125 e 132, 2010.
- Kumar, B.K.; Balakrishnan, H. & Rele, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Epub ahead of print, 2004.
- Karnaouri, A.; Topakas, E.; Antonopoulou, I.; Christakopoulos, P. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Front. Microbiol**, n. 5, p. 281, 2014.
- Kataoka, M., *et al.* Crystal structure of Talaromyces cellulolyticus (formerly known as Acremonium cellulolyticus) GH family 11 xylanase. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 1599-1612, 2014.
- Katapodis, P.; Vrsanska, M.; Kekos, D.; Nerinckx, W.; Biely, P.; Claeysens, M.; Macris, B. S. & Christakopoulos, P. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*, **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1881-1890, 2003.
- Khanbabaee, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v.18, n.6, p.641-649, 2001.
- Kozak, M. Solution scattering studies of conformation stability of xylanase XYNII from *Trichoderma longibrachiatum*, **Biopolymers**, v. 83, p. 95-102, 2006.
- Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N.S.; Ladisch, M.R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass, **Enzyme Microb. Technol.**, v.48, p.408-415, 2011.
- Kirk, O.; Borchert, T.; Fulgsang, C. Industrial enzymes applications. **Current opinion in Biotechnology**, v. 13, p.345-351, 2002.
- Klepacka, J. & Fornal, Ł. Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 46, p. 639-647, 2006.
- Kumar, L. *et al.* Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and

its application in enrichment of orange and grape juices. **Journal of food science and technology**, v. 51, p. 1737-1749, 2014.

Kumar, V.; Shukla, P. Functional Aspects of Xylanases toward Industrial Applications. In: **Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology**. Springer, p. 157–165, 2016.

Ladeira Ázar, R.I.S.; Morgan, T.; dos Santos, A.C.F.; de Aquino Ximenes, E.; Ladisch, M.R.; Guimarães, V.M. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase, **Enzyme Microb. Technol.**, v.109, p.25–30, 2018.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

Lagaert, S.; Belien, T.; Volckaert, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 1064–1073, 2009.

Lakowicz, J.R. Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence. **Plasmonics**, v. 1, p. 5-33, 2006.

Laue, T.M.; Stafford, W.F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 75-100, 1999.
LAUE, T. Biophysical studies by ultracentrifugation. **Biophysical Methods**, v. 11, p. 579–583, 2001.

Lebowitz, J.; Lewis, M.S.; Schuck, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, p. 2067-2079, 2002.

Li, J. et al. Enhancing hemicelluloses removal from a softwood sulfite pulp. **Bioresource technology**, v. 192, p. 11-16, 2015.

Liu, Y.; Wang, P.; Chen, F.; Yuan, Y.; Zhu, Y.; Yan, H.; Hu, X. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. **Food Chemistry**, v.186, p.46-53, 2015.

Liu, M.Q.; Li, J.Y.; Rehman, A.U.; Xu, X.; Gu, Z.J.; Wu, R.C. Laboratory Evolution of GH11 Endoxylanase Through DNA Shuffling: Effects of Distal Residue Substitution on Catalytic Activity and Active Site Architecture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019.

Liu, M.; Wu, X.; Huo, W.; Li, J.; Weng, X.; Liu, J.; Fang, Z. Differential inhibition of GH family 11 endo-xylanase by rice xylanase inhibitor and verification by a modified yeast two-hybrid system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 514-523, 2019.

Liu, Y., *et al.* CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. **Acta Pharmacol Sin**, v. 41, p. 138-144, 2020.

Lombard, V.; Ramulu, H.G.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 490-495, 2014.

- Loureiro, D.B.; Braia, M.; Romanini, D.; Tubio, G. Partitioning of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in PEG/NaCit aqueous two-phase systems: Structural and functional approach. **Protein Expr Purif.**, v. 129, p. 25-30, 2017.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Molecular Biology Review**, v. 66, p. 506-577, 2002.
- Marneth, K., *et al.* Tuning the Transglycosylation Reaction of a GH11 Xylanase by a Delicate Enhancement of its Thumb Flexibility. **Chembiochem**, n. 22, p. 1743-1749, 2021.
- Mansfield, S.D.; Mooney, C.; Saddler, J.N. Substrate and enzymatic characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.**, v.15, p.804–816, 1999.
- Martínez, A.T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F. Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195–204, 2005.
- Martinez, D.; Berka, R.M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S.E.; et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.**, n.26, p. 553-560, 2008.
- Martinez, A., Ruiz-Dueñas, F., Martinez, M., Del Rio, J., & Gutiérrez, A. Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 348-357, 2009.
- Martins, N.; Petrapoulos, S.; Ferreira, I.C.F.R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post- harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v.211, p41-50, 2016.
- McCann, M.C. & Carpita, N.C. Designing the deconstruction of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 11, p. 314-320, 2008.
- McCarter, J.D. & Withers, S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Curr Opin Struct Biol**, v. 4, p. 885-892, 1994.
- McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser crystallographic software, Pt 4, **J. Appl. Crystallogr**, v. 40, p. 658-674, 2007.
- McDougall, G.J. Isolation and partial characterization of the non-cellulosic polysaccharides of flax fibre. **Carbohydrate Research**, v. 241, p.227-236, 1993.
- McFerrin, M.B.; Snell, E.H. The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images, **J. Appl. Cryst.**, v. 35, p. 538-545, 2002.

McIntosh, L.P.; Hand, G.; Johnson, P.E.; Joshi, M.D.; Körner, M.; Plesniak, L.A.; Ziser, L.; Wakarchuk, W.W.; Withers S.G. The pKa of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A ^{13}C -NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase. **Biochemistry**, v. 31, p. 9958–9966, 1996.

Menon, V. & Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, n. 38, p. 522-550, 2012.

Meyer, T. *et al.* Biotechnological Production of Oligosaccharides—Applications in the Food Industry. In: EISSA, P. A. A. (Ed.). Agricultural and Biological Sciences - Food Production and Industry. **Food Production and Industry**, 2015.

Michelin, M.; Polizeli, M.L.T.M.; Ruzene, D.S.; Silva, D.P.; Vicente, A.A.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Teixeira, J. A. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. In: Ferreira, E.C. & Mota, M. (eds.) **Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR**, p. 9, 2008.

Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015.

Micsonai, A.; Moussong, É.; Wien, F.; Boros, E.; Vadászi, H.; Murvai, N.; Lee, Y.; Molnár, T.; Réfrégiers, M.; Goto, Y.; Tantos, Á.; Kardos, J.; BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy, **Nucleic Acids Research**, v. 50, p. W90–W98, 2022.

Milagres, A.M.F. & Prade, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p. 627-632, 1994.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426–428, 1959.

Molina, G.A. Caracterização biofísica da dinâmica catalítica de uma xilanase GH11. Dissertação (Mestrado em Química), Ribeirão Preto, São Paulo: USP, 2016.

Möller, M. & Denicola, A. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. v. 30, p. 175–178, 2002.

Monclaro, A.V.; Aquino, E.N.; Faria, R.F.; Ricart, C.A.O.; Freitas, S.M.; Midorikawa, G.E.O.; Miller, R.N.G.; Michelin, M.; Polizeli, M.L.T.M.; Filho, E.X.F. Characterization of multiple xylanase forms from *Aspergillus tamaris* resistant to phenolic compounds. **Mycosphere** (special issue). Doi 10.5943/mycosphere/si/3b/7, 2016.

Monclaro, A.V.; Recalde, G.L.; Silva Jr., F.G.; Freitas, S.M.; Filho, E.X.F. Xylanase

from *Aspergillus tamarii* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.120, p.16-22, 2019.

Moreira, L.R.S.; Campos, M.C.; Siqueira, P.H.V.M.; Silva, L.P.; Ricart, C.A.O.; Martins, P.A.; Queiroz, R.M.L.; Filho, E.X.F. Two b-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p.46-52, 2013.

Moreira, L.R.S.; Álvares, A.C.M.; Silva, F.G.; Freitas, S.M.; Filho, E.X.F. Xylan-degrading enzymes from *Aspergillus terreus*: physicochemical features and functional studies on hydrolysis of cellulose pulp, **Carbohydr. Polym.**, v.134, p.700–708, 2015.

Morgan, N.K.; Wallace, A.; Bedford, M.R.; Choct, M. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans, **Carbohydr. Polym.**, v.167, p.290-296, 2017.

Moriya, R.Y.; Gonçalves A.R. & Faria, F.P. Enzymatic Bleaching of Organosolv Sugarcane Bagasse Pulps with Recombinant Xylanase of the Fungus *Humicola grisea* and with Commercial Cartazyme HS Xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p.195-203, 2005.

Myerson, A. **Handbook of industrial crystallization**. 2nd. ed. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann, 2002.

Muilu, J.; Törrönen, A.; Peräkylä, M.; Rouvinen, J. Functional Conformational Changes of Endo-1,4-xylanase II From *Trichoderma reesei*: A Molecular Dynamics Study. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics.**, v. 31, p. 434–444, 1998.

Naczka, M.; Nichols, T.; Pink, D.; Sosulski, F. Condensed tannins in canola hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p. 2196-2200, 1994.

Nagar, S.; Mittal, A.; Gupta, V. Enzymatic clarification of fruit juices (Apple, Pineapple, and Tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess engineering**, v. 17, p. 1165-1175, 2012.

Nesterenko, M.V.; Tilley, M.; Upton, S.J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 28, p. 239-242, 1994.

Nogueira, S. et al. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, p. 149-155, 2009.

Ojha, H.; Mishra, K.; Hassan, M.I.; Chaudhury, N.K. Spectroscopic and isothermal titration calorimetry studies of binding interaction of ferulic acid with bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 56-64, 2012.

Oliveira, I.C.M.; Garay, A.V.; Souza, A.A. et al. Structural and biochemical analysis reveals how ferulic acid improves catalytic efficiency of *Humicola grisea* xylanase. **Scientific Reports**, v. 12, p. 11409, 2022.

- Orengo, C.A.; Jones, D.T. & Thornton, J.M. Protein superfamilies and domain superfolds, **Nature**. v. 372, p. 631-4, 1994.
- Pace, C.N. & Scholtz, J.M., Chapter 12, Measuring the conformational stability of a protein, T. E. Creighton, (2nd), Protein structure: A practical approach, Oxford ; IRL Press at Oxford University Press, New York, 383, 1997.
- Pace, C.N.; Shirley, B.A.; Thomsom, J.A. In Protein structure a practical approach (Creighton, T. E.): Measuring the conformational stability of a protein. **Chapter 13**, p. 311-330, 1989.
- Paës, G.; Tran, V.; Takahashi, M.; Boukari, I. & O'Donohue, M.J. New insights into the role of the thumb-like loop in GH-11 xylanases. **Protein Eng Des Sel.**, v. 20, p. 15-23, 2007.
- Paës, G.; Berrin, J.; Beaugrand, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 564–92, 2012.
- Paice, M.G.; Bernier, R. & Jurasek, L. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 235-239, 1988.
- Payan, F.; Leone, P.; Porciero, S.; Furniss, C.; Tahir, T.; Williamson, G. et al. The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I: structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 36029–36037, 2004.
- Peng, F.; Peng, P; Xu, F.; Sun, R. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, n. 30, p. 879-903, 2012.
- Polizeli, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- Porter, C.M. & Miller, B.G. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites. **Bioorg Chem.**, v. 43, p. 44-50, 2012.
- Pollet, A.; Lagaert, S.; Eneyskaya, E.; Kulminskaya, A.; Delcour, J.A.; Courtin, C.M. Mutagenesis and subsite mapping underpin the importance for substrate specificity of the aglycon subsites of glycoside hydrolase family 11 xylanases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1804, p. 977-85, 2010.
- Pollet, A., *et al.* Crystallographic and activity-based evidence for thumb flexibility and its relevance in glycoside hydrolase family 11 xylanases. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, p. 395-403, 2009.
- Prashanth, K.V.H.; Tharanathan, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.
- Puls, J.; Tenkanen, M.; Korte, H.E. & Poutanen, K. Products of hydrolysis of

- beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and an acetyl xylan esterase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 483-486, 1991.
- Purmonen, M.; Valjakka, J.; Takkinen, K.; Laitinen, T.; Rouvinen, J. Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 20, p. 551–559, 2007.
- Qing, Q.; Yang, B.; Wyman, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresour. Technol.**, v.101, p.9624–9630, 2010.
- Raj, A.; Kumar, S.; Singh, S. K.; Prakash, J. Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.15, p.199-209, 2018.
- Ratanakhanokchai, K. et al. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. **Biomass Now Cultivation and Utilization**, 2013.
- Rezende, C.A.; De-Lima, M.A.; Maziero, P.; Azevedo, E.R.; Gargia, W.; Polikarpov, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, n. 4, p. 1-18, 2011.
- Rocha, G.J. De M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.
- Rossmann, M.G. The molecular replacement method. **Acta Cryst. A**, v. 46, p. 73-82, 1990.
- Rye, C.; Withers, S. Glycosidase mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, v.4, n. 5, p.573-580, 2000.
- Ryttersgaard, C.; Lo Leggio, L.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. & Larsen, S. *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A, **Biochemistry**, v. 41, p. 15135–15143, 2002.
- Saake, B., Erasmy, N., Kruse, T., Schmekal, E. & Puls, J. Isolation and Characterization of Arabinoxylan from Oat Spelts. **Hemicelluloses: Science and Technology**, v. 864, p. 52-65, 2003.
- Saha, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279–291, 2003.
- Samanta, A. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural byproducts: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 62-71, 2015.

Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

Santos, D.E.; Queiróz, J.H.; Colodette, J.L.; Fernandes, A.S.; Guimarães, V. M.; Rezende, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, n. 35, p. 1004-1010, 2012.

Sapag, A., *et al.* The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. **J Biotechnol.**, v. 95, p. 109-131, 2002.

Sgarbieri, V.C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades – degradações – modificações. São Paulo: Varela. Cap. 5: **Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas**, 1996.

Shallom, D. & Shoham, Y. Microbial Hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, n. 6, p. 219-228, 2003.

Sidhu, G.; Withers, S.G.; Nguyen, N.T.; McIntosh, L.P.; Ziser, L. & Brayer, G.D. Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. **Biochemistry**, 38, 5346-54, 1999.

Silva, C.O.G.; Aquino, E.N.; Ricart, C.A.O.; Midorikawa, G.E.O.; Miller, R.N.G.; Filho, E.X.F. GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, 2015.

Silva, P.M.; Gauche, C.; Gonzaga, L.V.; Costa, A.C.O.; Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v.196, p.309-323, 2016.

Silveira, M.H.L.; Siika-Aho, M.; Krauus, K.; Gavriga, L.M.; Ramos, L.P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. In: Da Silva, S. S.; Chandel, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**. Gewerbestrasse: Springer International, p.151-172, 2014.

Silveira, M.H.L.; Aguiar, R.S.; Siika-Aho, M.; Ramos, L.P. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. **Bioresour. Technol.**, n. 151, p. 392-396, 2014b.

Siqueira, F.G.; Filho, E.X.F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 54 – 60, 2010.

Solling, H. & Esmann, V. The hysteretic properties of glycogen synthase I, **Eur. J. Biochem.**, v. 81, p. 129-39, 1977.

- Subramaniyan, S. & Prema, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p.33-64, 2002.
- Tamura, K., *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol.**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- Tejirian, A. & Xu, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds, **Enzyme Microb. Technol.**, v.48, p.239–247, 2011.
- Tian, Y.; Jiang, Y. & Ou, S. Interaction of cellulase with three phenolic acids. **Food Chemistry**, v.138, p.1022–1027, 2013.
- Tikhomirov, D.F., Sinitsyn, A.P., Zorov, I.N. & Williams, C. Non-starch polysaccharide hydrolysing microbial enzymes in grain processing In: **Recent Advances in Enzymes in Grain Processing** (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A., Eds.), p. 413–418, 2003.
- Törrönen, A., Harkki, A. & Rouvinen, J. Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. **Embo j.**, v. 13, p. 2493-2501, 1994.
- Törrönen, A. & Rouvinen, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1, 4- β -xylanases. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 137-149, 1997.
- Uday, U. et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International journal and biological macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.
- Ullah, S.F.; Souza, A.A.; Hamann, P. R.V.; Ticona, A.R.P.; Oliveira, G.M.; Barbosa, J. A.R.G.; Freitas, S.M.; Noronha, E.F. Structural and functional characterization of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.127, p.385-395, 2019.
- Van Der Broeck, H.C.; De Graaf, L.L.; Hille J.D.R.; Van Ooyen, A.J.J.; Vesser, J. & Harder, A. A cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. **European Patent Ap.**, v. 20, p. 90-202, 1990.
- Van Dyk, J.S. & Pletschke, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1458–1480, 2012.
- Vardakou, M.; Dumon, C.; Murray, J.W.; Christakopoulos, P.; Weiner, D.P.; Juge, N.; Lewis, R.J.; Gilbert, H.J.; Flint, J.E. Understanding the structural basic for substrate and

inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanase. **J. Mol. Biol.**, v. 375, p. 1293-1305, 2008.

Velasco, J.; Oliva, B.; Mulinari, E.J.; Quintero, L.P.; Lima, A.S.; Gonçalves, A.L.; Gonçalves, T.A.; Damasio, A.; Squina, F.M.; Milagres, A.M.F.; Abdella, A.; Wilkins, M. R.; Segato, F. Heterologous expression and functional characterization of a GH10 endoxylanase from *Aspergillus fumigatus* var. *niveus* with potential biotechnological application. **Biotechnology Reports**, v. 24, 2019.

Viikari, L. Pulp and the environment. **PaperijaPuu- Paper and Timber**, v. 73, p. 384-389, 1991.

Viikari, L.; Kantelinem, A.; Sundquist, J. & Linko, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 335-350, 1994.

Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, v. 8, p. 127-134, 1995.

Wararchuk, W.W.; Campbel, R.L.; Sung, W.L.; Davoodi, J. & Yaguchi, M. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. **Protein Science**, v. 3, p. 467-475, 1994.

Wong, K.K.Y.; Tan, L.U.L. & Saddler, J.N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

Xiao, J., *et al.* Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 45, p. 609-615, 2007.

Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzym. Microb. Technol.**, v.46, p.170–176, 2010.

Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzym. Microb. Technol.**, v.48, p.54–60, 2011.

Xue, Y.; Cui, X.; Zhang, Z.; Zhou, T.; Gao, R.; LI, Y.; DING, X. Effect of β -endoxylanase and α -arabinofuranosidase enzymatic hydrolysis on nutritional and technological properties of wheat brans. **Food Chemistry**, 125332, 2019.

Yang, H. *et al.* Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populastomentosa*. **Bioresource technology**, v. 102, p. 7171-7176, 2011.

Yang, J., *et al.* Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 117, 1496-1503 (2020).

Zhang, Y.H. P.; Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng**, v. 88, p.797–824, 2004.

Zhang, Y. & Skolnick, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. 2302-9, 2005.

Zhang, W.; Inan, M.; Meagher, M.M. Rational design and optimization of fed batch and continuous fermentations. **Methods in molecular biology**, v. 389, p. 43–64, 2007.

Zheng, Y., *et al.* Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase. **Food Chemistry**, v.317, p. 126346, 2020.

APÊNDICE

Apêndice A. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados para cultivo de microrganismos foram esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm, por 20 min (Sambrook & Russell, 2001).

Meios para cultivo da levedura *P. pastoris* e soluções estoque

Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)

Extrato de Levedura	1,0% (p/v)
Peptona de Caseína	2,0% (p/v)
Glicose.....	2,0% (p/v)

A glicose foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore®).

Meio de crescimento - Meio BSM-Glicerol otimizado

Ácido Cítrico	0,18 % (p/v)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,002 % (p/v)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,34 % (p/v)
KCl.....	0,09 % (p/v)
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 % (p/v)
Fosfato de Potássio (pH 6,0)	100 mM
Solução de Sais PMT1	4,35 mL/L
Biotina	4x10 ⁻⁵ (v/v)
Ampicilina.....	100 µg/mL
Glicerol.....	1% (v/v)

Meio de indução - Meio BSM-Metanol otimizado

Ácido Cítrico	0,18 % (p/v)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,002 % (p/v)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,34 % (p/v)
KCl.....	0,09 % (p/v)
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 % (p/v)

Fosfato de Potássio (pH 6,0)	100 mM
Solução de Sais PMT1	4,35mL/L
Biotina	4×10^{-5} (v/v)
Ampicilina.....	100 μ g/mL
Metanol	0,5% (v/v)

Os meios BSM-Glicerol e BSM-Metanol foram preparados a partir de uma solução contendo ácido cítrico, cloreto de cálcio, fosfato de amônia, cloreto de potássio e sulfato de magnésio foi autoclavada separadamente. Em seguida, os demais reagentes previamente esterilizados por filtração foram adicionados (biotina, solução de sais, metanol, ampicilina e glicerol) ou por autoclavagem (tampão fosfato de potássio).

Meio MD (*Minimal Dextrose*)

YNB	1,34% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} (v/v)
Ágar bacteriológico	1,5% (p/v)

YNB (*Yeast Nitrogen Base*) (estoque 10X)

YNB* (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) (Difco®)	3,4% (p/v)
Sulfato de amônio (NH ₄ SO ₄)	10% (p/v)

A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m (Millipore®) e estocada a 4 °C.

* Sem aminoácidos e sulfato de amônio.

Tampão Fosfato de Potássio (1 M, pH 6,0)

K ₂ HPO ₄	132 mM
KH ₂ PO ₄	686 mM

A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada à 25 °C.

Biotina (4×10^{-5} v/v)

Biotina 0,02% (p/v)

A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore[®]) e estocada a 4 °C.

Solução de Sais PMT1

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 % (p/v)

NaI 0,008 % (p/v)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3 % (p/v)

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02% (p/v)

H_3BO_3 0,002 % (p/v)

CoCl_2 0,05 % (p/v)

ZnCl_2 2 % (p/v)

FeCl_3 1,43 % (p/v)

H_2SO_4 0,5 % (v/v)

A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore[®]) e estocada a 4 °C.

Glicerol (10%)

Glicerol 10% (v/v)

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

Apêndice B. Soluções do ensaio de atividade xilanolítica**Xilana *beechwood* 5%**

Xilana *beechwood* 5 g

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

A xilana foi dissolvida em água sob agitação constante em manta aquecedora a 50 °C por uma hora. Após esse tempo o volume final foi corrigido e a xilana estocada a -20 °C.

Tampão Citrato de Sódio (50 mM, pH 4,8)

Ácido Cítrico 0,1 M	23 mL
Solução de Citrato de Sódio 0,1 M	27 mL
Água destilada (q.s.p.).....	50 mL

O pH deve ser ajustado com solução de NaOH ou HCl 1M.

Tampão GCF (Glicina/Ácido Cítrico/Fosfato de Sódio Dibásico)

Para o preparo desse tampão são utilizadas soluções estoque de glicina, ácido cítrico e fosfato de sódio dibásico na concentração de 500 mM. As três soluções são misturadas para a concentração desejada, todas no mesmo volume. O ajuste do pH foi feito com NaOH na concentração de 5 M.

DNS (Ácido Dinitrosalicílico)

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.....	2,65 g
NaOH	4,95 g
Tartarato de Sódio e Potássio	76,5 g
Metabissulfito de Sódio.....	2,075 g
Água destilada (q.s.p.).....	500 mL

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água destilada. Posteriormente adicionou-se o tartarato de sódio e potássio e o metabissulfito de sódio. A solução foi deixada sob agitação até ser observada a completa dissolução dos reagentes quando o volume de água foi completado para 1000 mL. A solução final foi titulada com HCl 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador (Miller, 1959).

Apêndice C. Solução para determinação do coeficiente de extinção molar**Reativo A**

CuSO ₄	1% (v/v)
Tartarato de sódio e potássio.....	2% (v/v)
Na ₂ CO ₃ (q.s.p.).....	20 mL

Apêndice D. Soluções para análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Ácido Tricloroacético (TCA)

Um volume de 1 mL de água destilada foi adicionado a 50 g de ácido tricloroacético. Após todo o ácido ser dissolvido, adicionou-se água destilada suficiente para um volume final de 50 mL e a solução obtida foi estocada a 4 °C.

Persulfato de Amônio 10% (p/v)

Persulfato de Amônio..... 1 g
Água destilada (q.s.p.)..... 10 mL

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS 10,0 g
Água destilada..... 100 mL

Tampão de amostra para proteína (2X)

Tris-HCl 1M pH 6,8200 mM
SDS 4,0% (p/v)
 β -Mercaptoetanol 4,0% (v/v)
Glicerol..... 20,0% (v/v)
Azul de bromofenol..... 0,1% (p/v)

Acrilamida:Bis-acrilamida (29:1)

Acrilamida.....29% (p/v)
Bis-acrilamida 1% (p/v)

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4 °C.

Tampão de corrida – Tris-glicina (estoque10X)

Tris base 30,28 g
Glicina 144,13 g

SDS 10 g
Água destilada (q.s.p)..... 1000 mL

Tris-HCl (1 M, pH 6,8)

Tris base 12,1 g
Água destilada (q.s.p)..... 100 mL
O pH foi ajustado com HCl fumegante.

Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)

Tris base 18,2 g
Água destilada 100 mL
O pH foi ajustado com HCl fumegante.

Apêndice E. Revelação de proteínas em gel SDS-PAGE por coloração com Azul de Comassie**Solução corante para gel corado com Azul de Comassie**

Comassie Blue R-250..... 0,2% (p/v)
Metanol 40% (v/v)
Ácido Acético Glacial 10% (v/v)
Água destilada (q.s.p.)..... 1000 mL

Solução descorante para gel corado com Azul de Comassie

Ácido Acético Glacial 20%

Apêndice F. Parâmetros da interação de HXYN2 com AF estimados por *Docking* Molecular.

		Modelos	Ligação-H (resíduos)	Interações Hidrofóbicas (resíduos)	Afinidade (kcal/mol)	rmsd l.i.* (Å)	rmsd l.s.** (Å)
Regiões	I	1	P142	S33, W35, V63, Y93, E102, Y104, E193, Y187,	-6,8	0	0
		2	Y93	E24, W35, V63, E102, Y187	-6,6	1,230	6,011
		3		W35, N61, V63, P142, S143, E193	-6,4	1,835	5,887
		4	Y187	W35, N61, V63, Y93, E102, Y104, P142, E193	-6,0	1,943	2,407
		5	Y89, S136, W154	Y112, N113, P114, G115, S116, Q117	-5,9	13,368	14,672
		6	S33, W35, Y93	E24, W34, P142, S143	-5,7	3,473	6,324
		7	N87, Q117	Y89, Y112, P114, G115, S116, A118, S136, Y195, W154	-5,7	12,873	14,222
		8	S116, Q117	N61, N87, Y89, G115, W154, E193, Y195	-5,3	9,844	12,319
		9	S116, Q117, Q152	N87, Y89, G115, R138, W154	-5,1	8,473	12,046
	II	1	Q53, N83, E200	Y81, E202	-4,4	0	0
		2	N83, E200	Y81, S201, D202	-4,3	2,766	4,062
		3	N53, N83	Y81, E200, S201, D202	-4,3	1,726	5,505
		4	-	R55, W56, R57, N83, S198, G199, E200	-4,2	7,794	8,969
		5	N53, N83	Y81, E200, S201, D202	-4,2	1,324	2,726
		6	N83	N85, G199, E200	-4,1	6,000	7,266
		7	-	R55, R57, N83, N85, S198, G199, E200	-4,0	10,528	12,533
		8	T45, N53	N18, N43, R55, E200	-4,0	6,603	8,443
		9	N83	Y81, D202	-3,9	2,454	5,301
	III	1	S198	R55, W56, R57, N58, N85, G199, E200	-4,3	0	0
		2	S198, E200	R55, W56, R57, N85, G199	-4,2	1,534	2,197
		3	N18	A16, N43, T45, N53, V54, R55, E200	-4,1	10,378	13,571
		4	R57	N41, N43, R55	-4,0	6,508	8,090
		5	T45	N18, N43, N53, V54, R55	-3,8	11,268	13,320
		6	T45	A16, N18, N43, N53, V54, R55	-3,7	11,126	13,004
		7	N18, E200	N43, T45, N53, V54, R55	-3,6	10,498	11,221
		8	-	A16, N18, N43, T45, L47, R55, E200	-3,6	10,300	13,399

	IV	9	T45, N53, R55	N43	-3,4	10,523	12,057
		1	N113, Y120	P114, G115, S116, D132, F134	-4,4	0	0
		2	N113, G115, A118	S116, Y120, D132, F134	-4,3	1,400	5,521
		3	G115, A118	S116, Y120, D132, F134	-4,2	2,964	4,377
		4	Y120	D132, F134	-4,2	4,293	5,340
		5	Y120, D132	N119, F134	-4,1	3,047	4,297
		6	Y120, D132	A118, N119, F134	-4,1	1,935	2,913
		7	Y120	D132, F134	-4,1	4,022	5,158
		8	Y120, K158	T123, D132, F134	-4,0	5,240	6,592
	9	A118	G115, S116, Y120, D132, F134	-4,0	2,757	5,123	
	V	1	V6, N28	F3, S11	-5,4	0	0
		2	V6, N28, Y30, S50	F3, D4, F5, S11	-5,3	1,675	2,997
		3	V6, S50, Y204	F3, G11, N28	-5,2	1,803	2,524
		4	V6, Y30	F3, F5, N28	-4,9	1,640	2,957
		5	V6	F3, F5, S11, N28	-4,7	2,650	5,279
		6	-	F3, F5, V6, S11, N28	-4,5	1,490	5,782
		7	V6	F5, R8, S11, N28	-4,5	3,819	6,091
		8	V6, Y204	F3, F5, S11, N28	-4,4	2,524	3,721
9		N28	F5, V6, P7, R8	-4,2	3,834	5,873	

*rmsd/li (limite inferior do RMSD) e rmsd/lis (limite superior do RMSD), diferindo em como os átomos são combinados no cálculo da distância.

**rmsd/lis combina cada átomo em uma conformação consigo mesmo na outra conformação, ignorando qualquer simetria. rmsd' combina cada átomo em uma conformação com o átomo mais próximo do mesmo tipo de elemento na outra conformação (rmsd' não pode ser usado diretamente, porque não é simétrico). rmsd/li é definido como segue: $\text{rmsd/li}(c1, c2) = \max(\text{rmsd}'(c1, c2), \text{rmsd}'(c2, c1))$. Então: se seu ligante não tem simetria interna, rmsd/lis é o valor a ser usado. No entanto, se você estiver ancorando, por exemplo, benzeno, isso lhe daria valores diferentes dependendo do seu ligante é girado e qual dos seis pontos CH equivalentes em seu bolso de ligação, portanto, rmsd/li fornece uma melhor classificação de soluções de encaixe. Veja também: <http://mgldev.scripps.edu/pipermail/autodock/2009-March/005265.html>



OPEN

Structural and biochemical analysis reveals how ferulic acid improves catalytic efficiency of *Humicola grisea* xylanase

Izadora Cristina Moreira Oliveira^{1,4}, Aisel Valle Garay^{1,4}, Amanda Araújo Souza², Napoleão Fonseca Valadares³, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa¹, Fabrícia Paula Faria³ & Sonia Maria Freitas¹✉

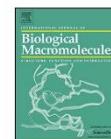
Humicola grisea var. *thermoidea* is an aerobic and thermophilic fungus that secretes the GH11 xylanase HXYN2 in the presence of sugarcane bagasse. In this study, HXYN2 was expressed in *Pichia pastoris* and characterized biochemically and structurally in the presence of beechwood xylan substrate and ferulic acid (FA). HXYN2 is a thermally stable protein, as indicated by circular dichroism, with greater activity in the range of 40–50 °C and pH 5.0–9.0, with optimal temperature and pH of 50 °C and 6.0, respectively. FA resulted in a 75% increase in enzyme activity and a 2.5-fold increase in catalytic velocity, catalytic efficiency, and catalytic rate constant (k_{cat}), with no alteration in enzyme affinity for the substrate. Fluorescence quenching indicated that FA forms a complex with HXYN2 interacting with solvent-exposed tryptophan residues. The binding constants ranged from moderate (pH 7.0 and 9.0) to strong (pH 4.0) affinity. Isothermal titration calorimetry, structural models and molecular docking suggested that hydrogen bonds and hydrophobic interactions occur in the aglycone region inducing conformational changes in the active site driven by initial and final enthalpy- and entropy processes, respectively. These results indicate a potential for biotechnological application for HXYN2, such as in the bioconversion of plant residues rich in ferulic acid.

Cellulose and hemicellulose residues from plant biomass are most commonly degraded in industrial applications by enzymes derived from filamentous fungi. Thermophilic fungi stand out as major producers of hemicellulases that exhibit high degradation efficiency at different pHs and temperatures¹. Hemicellulose is a branched heteropolysaccharide that interacts with the lignocellulosic matrix through covalent interactions². Xylan is the main hemicellulose present in plant cell walls with a varied structure consisting of a linear D-xylopyranose backbone linked by β -1,4 glycosidic bond. This backbone possesses branches in its 2- and/or 3-hydroxy groups, with side chain substituents, such as α -L-arabinofuranosyl, O-acetyl, α -1,2-linked glucuronic acid and 4-O-methyl-D-glucuronic acid groups³.

The principal enzymes for xylan degradation comprise endoxylanases (EC 3.2.1.8), which are produced by fungi and bacteria, cleaving internal β -1,4-xylosidic bonds in the main xylan chain, and β -xylosidases (EC 3.2.1.37), in turn cleaving β -1,4-xylo-oligosaccharides into xylose⁴. Endoxylanases have been classified according to the CAZy database into several families, including the GH10 and GH11^{5,6}. Members of the GH11 family are characterized by high pI value (8.0–9.0), low molecular mass (≤ 30 kDa) and high β -sheet (~65%), and low α -helix content^{7,8}. The three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanases of the GH11 family consists of a single domain of β -jelly-roll structure, composed of two twisted anti-parallel β -sheets forming a long and deep cleft. The unique α -helix is packed under the β -sheet B^{9–10}.

The active site of GH11 xylanases consists of an open cleft that extends along the length of the protein where four or more xylose residues can bind¹¹. The substrate binding site is divided into contiguous binding subsites

¹Department of Cell Biology, Laboratory of Biophysics, Biology Institute, University of Brasília (UnB), Quadra 604, Asa Norte, Bloco J 1º andar, Brasília, DF 70910-900, Brazil. ²Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP 13083-970, Brazil. ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás 74690-900, Brazil. ⁴These authors contributed equally: Izadora Cristina Moreira Oliveira and Aisel Valle Garay. ✉email: nina@unb.br



Characterization of a recombinant xylose tolerant β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis



Lorena Cardoso Cintra^{a,c}, Amanda Gregorim Fernandes^a,
Izadora Cristina Moreira de Oliveira^b, Saulo J. Linhares Siqueira^{b,d},
Ilítia Ganaê Oliveira Costa^b, Francieli Colussi^b, Rosália Santos Amorim Jesuino^b,
Cirano José Ulhoa^{a,b,*}, Fabrícia Paula de Faria^b

^a Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^c Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary and Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^d State University of Goiás, Palmas de Goiás, Goiás, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2016

Received in revised form 7 April 2017

Accepted 6 July 2017

Available online 8 July 2017

Keywords:

Humicola grisea var. *thermoidea*

β -xylosidase

Xylose tolerant

Sinergism

Sugarcane bagasse

ABSTRACT

One full-length β -xylosidase gene (*hxyLA*) was identified from the *Humicola grisea* var. *thermoidea* genome and the cDNA was successfully expressed by *Pichia pastoris* SMD1168. An optimization of enzyme production was carried out, and methanol was found to be the most important parameter. The purified enzyme was characterized and showed the optimal conditions for the highest activity at pH 7.0 and 50 °C, being thermostable by maintaining 41% of its activity after 12 h incubated at 50 °C. HXYLA is a bifunctional enzyme; it showed both β -xylosidase and α -arabinofuranosidase activities. The K_m and V_{max} values were 1.3 mM and 39.1 U/mg, respectively, against 4-nitrophenyl β -xylopyranoside. HXYLA showed a relatively strong tolerance to xylose with high K_i value of 603 mM, with the xylose being a non-competitive inhibitor. HXYLA was successfully used simultaneously and sequentially with an endoxylanase for analysis of synergism in the degradation of commercial xylans. Furthermore, commercial cellulases supplementation with HXYLA during sugarcane bagasse hydrolysis increased hydrolysis in 29%. HXYLA is distinguished from other β -xylosidases by the attractive characteristics for industrial applications such as thermostability, high tolerance xylose and saccharification of biomass by convert xylan into fermentable monosaccharides and improve cellulose hydrolysis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plant biomass represents the most abundant renewable energy source found in nature and it is mainly composed by lignocellulosic materials. Lignocellulose is composed of cellulose, hemicellulose, pectin, proteins and lignin. Xylan is the main component of hemicellulose and is the second most abundant biomass resource in nature after cellulose [1]. Xylan is composed of a backbone of β -(1,4)-linked d-xylopyranose residues with the presence of various substitutions in the side chains such as l-arabinofuranose, 4-O-methyl-glucuronic acids and acetyl groups. Xylan-rich agricul-

turals waste can be converted into xylose by enzymatic hydrolysis and xylose has been used for bioethanol and xylitol production. Additionally, xylan can be converted into food additives and other economically important products [2].

Due its heterogeneity and complexity, the complete degradation of xylan requires the synergistic action of several enzymes termed the xylanolytic system [3]. The xylanolytic system consist of: endoxylanases (*endo*-1,4- β -xylanases), that release *xylo*-oligosaccharides since catalyze random cleavage of internal bonds of the xylan chain; and β -xylosidases, that release xylose monomers from these *xylo*-oligosaccharides and xylobiose. β -xylosidases and endoxylanases act in synergy, since endoxylanases generate more reducing ends for β -xylosidases to act upon. Also, β -xylosidases play an important role in the degradation of xylan by removing the final product that can inhibit xylanases, thereby limiting the hydrolysis of xylan [3]. Moreover, other accessory

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Go, Brazil.
E-mail address: ulhoa@ufg.br (C.J. Ulhoa).



Contents lists available at ScienceDirect

Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/enzmictec

The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse



Lorena Cardoso Cintra^{a,c}, Isabelle Cristine da Costa^b, Izadora Cristina Moreira de Oliveira^{a,b}, Amanda Gregorim Fernandes^{a,b}, Syd Pereira Faria^b, Rosália Santos Amorim Jesuino^b, Maria Cristina Ravanal^{d,e}, Jaime Eyzaguirre^d, Luiz Pereira Ramos^f, Fabrícia Paula de Faria^b, Cirano José Ulhoa^{a,b,g}

^a Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^c School of Veterinary and Animal Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Department of Biological Sciences, Andrés Bello University, Santiago, Chile

^e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

^f Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Recombinant hemicellulases
Enzymatic hydrolysis
Sugarcane bagasse

ABSTRACT

To increase the efficiency of enzyme cocktails in deconstructing cellulose and hemicelluloses present in the plant cell wall, a combination of enzymes with complementary activities is required. Xylan is the main hemicellulose component of energy crops and for its complete hydrolysis a system consisting of several enzymes acting cooperatively, including endoxylanases (XYN), β -xylosidases (XYL) and α -L-arabinofuranosidases (ABF) is necessary. The current work aimed at evaluating the effect of recombinant hemicellulolytic enzymes on the enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse (SEB). One recombinant endoxylanase (HXYN2) and one recombinant β -xylosidase (HXyla) from *Hemicicola grisea* var *thermoidea*, together with an α -L-arabinofuranosidase (ABF3) from *Penicillium pupurogenum*, all produced in *Pichia pastoris*, were used to formulate an efficient enzyme mixture for SEB hydrolysis using a 2³ Central Composite Rotatable Design (CCRD). The most potent enzyme for SEB hydrolysis was ABF3. Subsequently, the optimal enzyme mixture was used in combination with commercial cellulases (Accellerase 1500), either simultaneously or in sequential experiments. The supplementation of Accellerase 1500 with hemicellulases enhanced the glucose yield from SEB hydrolysis by 14.6%, but this effect could be raised to 50% when hemicellulases were added prior to hydrolysis with commercial cellulases. These results were supported by scanning electron microscopy, which revealed the effect of enzymatic hydrolysis on SEB fibers. Our results show the potential of complementary enzyme activities to improve enzymatic hydrolysis of SEB, thus improving the efficiency of the hydrolytic process.

1. Introduction

Brazil is the largest producer of sugarcane bagasse (SCB) in the world. This agro-industrial residue is receiving significant attention as a promising resource for the production of second-generation bioethanol [1]. SCB is also an important substrate for the generation of hemicellulose-based materials due to its high xylan content [2]. Cellulose, hemicelluloses and lignin are present in the plant cell wall in close association with each other [3]. In general, conversion of the hemicellulose fraction present in lignocellulose is essential to increase the production yield of fermentable sugars from lignocellulosic residues

such as SCB, and its degradation requires a series of coordinated biochemical steps [4].

Lignocellulosic residues can be converted into biofuels by three steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. Different pretreatment strategies have been developed for lignocellulose including physical, biological, chemical, and physicochemical processes [23,24]. Steam explosion is a pretreatment technique that is based on the deconstruction of the lignocellulosic matrix through the action of temperature and pressure, in conjunction with hemicellulose removal by auto-hydrolysis or by the addition of exogenous acid catalysts such as H₂SO₄ or SO₂ [25,26]. SCB contains arabinoxylans as the main

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil
E-mail address: cjulhoa@gmail.com (C.J. Ulhoa).

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109447>

Received 5 July 2019; Received in revised form 17 September 2019; Accepted 10 October 2019

Available online 19 October 2019

0141-0229/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Participação na orientação de trabalho de iniciação científica (PIBIC)

Anna Lívia Ramos Gouveia de Medeiros: Expressão e caracterização estrutural de uma endoxilânase do fungo *Humicola grisea* produzida em *Pichia pastoris*. Aluna de graduação em Biotecnologia. Iniciação Científica (2020-2021).

Anna Lívia Ramos Gouveia de Medeiros: Caracterização estrutural *in silico* de uma endoxilânase do fungo *Humicola grisea*. Aluna de graduação em Biotecnologia. Iniciação Científica (2021-2022).

Representação Discente junto ao Colegiado e Comissão do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular de 2020 a 2023.**Patente**

FREITAS, S. M. ; ALVARES, A. C. M. ; FREITAS, M. A. G. ; GARAY, A. V. ; HONDA, D. E. ; OLIVEIRA, I. C. M. ; PEDRINO, G. R. ; CASTRO, C. H. ; AMARAL, N. O. ; PONTES, C. N. R. ; NAVES, L. M. ; RAMADA, M. H. S. .
COMPOSIÇÕES COMPREENDEDENDO PROTEÍNA E PEPTÍDEOS CÍCLICOS DERIVADOS DE VIGNA UNGUICULATA, VARIEDADE SERIDÓ, E SEU USO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS ANTIHIPERTENSIVOS. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202100346, título: "COMPOSIÇÕES COMPREENDEDENDO PROTEÍNA E PEPTÍDEOS CÍCLICOS DERIVADOS DE VIGNA UNGUICULATA, VARIEDADE SERIDÓ, E SEU USO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS ANTIHIPERTENSIVOS" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/02/2021

Cursos



Certificado

A aluna **Izadora Cristina Moreira de Oliveira** participou do curso online oferecida pela ABCr – Associação Brasileira de Cristalografia – intitulado “*Tópicos em difração e espalhamento: foco em biomacromoléculas – 2021*” entre 06/08/2021 e 12/11/2021 correspondendo a 60 horas, conforme ementa em anexo. Após avaliação oral a estudante foi considerada APROVADA no curso.

Prof. Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira

Secretário da ABCr para assuntos de Ensino / Organizador do Curso

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Conselheiro da ABCr / Co-Organizador do Curso

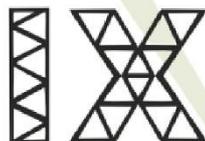
Prof. Dr. Eduardo Granado Monteiro da Silva

Presidente da Associação Brasileira de Cristalografia



Participação no Simpósio PPG-Biomol





**IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular**

Brasília - DF 27 a 29 Novembro 2019

CERTIFICADO

Certificamos que Izadora Cristina Moreira de Oliveira apresentou o trabalho intitulado “Caracterização enzimática, estrutural e termoestabilidade de uma endoxilânase recombinante de *Humicola grisea* var. *thermoidea*” no IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 27 a 29 de Novembro de 2019.


Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB



**X Simpósio do Programa
de Pós-graduação em
Biologia Molecular**  **IB UnB**

23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

Certifico que o trabalho dos autores

Izadora Cristina Moreira de Oliveira, Aisel Valle Garay, Fabrícia Paula de Faria, Sonia Maria de Freitas,
intitulado

***Kinetic and structural study of the interaction between ferulic acid and HXYN2 endoxylanase from
Humicola grisea var. thermoidea***

foi apresentado em **formato de resumo em vídeo** no X Simpósio do Programa de Pós-graduação em
Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



CERTIFICADO

15 e 16 DEZEMBRO
50 XI SIMPÓSIO
 Instituto de Ciências Biológicas - IB UnB
 Biologia Molecular

Certifico que

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

participou como ouvinte no XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, realizado dias 15 e 16 de novembro na Universidade de Brasília, com carga horária de 16 horas.

Brasília, 16 de dezembro de 2022



Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
 Coordenadora PPGBioMol - IB - UnB



Participação no Simpósio PPG-Biomol – Comissão Organizadora



**IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação
 em Biologia Molecular**
 Brasília - DF 27 a 29 Novembro 2019

CERTIFICADO

Certificamos que Izadora Cristina Moreira de Oliveira participou da Comissão organizadora do IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 27 a 29 de Novembro de 2019.



Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
 Coordenador do PPG-BioMol-UnB

CERTIFICADO

Certifico que

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

foi membro da comissão organizadora do

X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


 Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
 Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



X Simpósio do Programa
 de Pós-graduação em 
Biologia Molecular IB UnB
 23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

CERTIFICADO

Certifico que

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

participou como avaliador científico no

X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


 Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
 Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



X Simpósio do Programa
 de Pós-graduação em 
Biologia Molecular IB UnB
 23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

CERTIFICADO



Certifico que

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

foi membro da comissão organizadora do XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, 16 de dezembro de 2022

Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol - IB - UnB



CERTIFICADO



Certifico que

Izadora Cristina Moreira de Oliveira

participou como avaliador científico do XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, 16 de dezembro de 2022

Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol - IB - UnB



Prêmio

CERTIFICADO 

 X Simpósio do Programa de Pós-graduação em  **Biologia Molecular** IB UnB
23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

Certifico que o reconhecimento de **melhor trabalho** na grande área *Bioquímica, Biofísica e Biologia Estrutural*, foi concedido a **Izadora Cristina Moreira de Oliveira** pelo trabalho intitulado ***Kinetic and structural study of the interaction between ferulic acid and HXYN2 endoxylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea**** no X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB

CERTIFICADO 

 50th XI SIMPÓSIO 15 e 16 DEZEMBRO
Instituto de Ciências Biológicas - IB UnB 

Certifico que o reconhecimento de melhor trabalho na grande área *Bioquímica, Biofísica e Biologia Estrutural* foi concedido a **Izadora Cristina Moreira de Oliveira** pelo trabalho intitulado ***Molecular docking approaches of the interaction between ferulic acid and endoxylanase HXYN2 from *Humicola grisea* var. *thermoidea**** no XI Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, 16 de dezembro de 2022


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol - IB - UnB