

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CÊNCIIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA EVOLUÇÃO**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE MANANASES DA  
FAMÍLIA GH5**

**Guilherme Romualdo Silva**

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Genética e Evolução da  
Universidade Federal de São Carlos

Orientador: Igor Polikarpov

Coorientadora: Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos – SP

2024

## **BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de Graduação apresentado no dia 02 de Fevereiro de 2024 perante a seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov – Instituto de Física de São Carlos/USP

Professor convidado: Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto – Instituto de biociências/UNESP

Professor convidado: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge – Instituto de biociências/USP

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Primeiramente, minha profunda gratidão à minha família, cujo apoio incondicional foi essencial ao longo dessa jornada acadêmica. Obrigado por serem minha fonte constante de motivação e encorajamento.

Quero estender meus agradecimentos ao meu orientador, professor Igor Polikarpov, cuja confiança e orientação sábia e insights valiosos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Caio Capetti, que compartilhou generosamente seu conhecimento e experiência, desempenhando um papel fundamental no meu aprendizado e no sucesso deste projeto.

Por fim, agradeço à Vanessa por sua colaboração e apoio ao longo deste processo. Sua contribuição foi inestimável para a realização deste trabalho.

Aos amigos da faculdade, meu sincero agradecimento. Sua amizade foi crucial e tornou esta jornada acadêmica única. Cada momento compartilhado contribuiu para o nosso crescimento mútuo. Obrigado pelo apoio constante e pelas memórias inesquecíveis. Vocês fizeram toda a diferença.

A todos, meu muito obrigado por fazerem parte dessa conquista. Vocês foram peças fundamentais neste caminho, e estou profundamente grato por cada um de vocês ter compartilhado essa jornada comigo.

## RESUMO

Polissacarídeos da parede celular de plantas são constituídos principalmente por celulose, um homopolímero de glicose, e hemicelulose, um complexo grupo de polímeros heterogêneos e uma das maiores fontes de matéria orgânica renovável, sendo o manano um dos principais constituintes da hemicelulose. As mananases são enzimas capazes de realizar a hidrólise de mananos, clivando ligações glicosídicas no interior da cadeia principal e liberando mananoligômeros curtos, sendo as principais famílias que contemplam essa atividade as famílias GH5, GH26 e GH113. Elas podem ser empregadas tanto na etapa de pré-tratamento da biomassa quanto na obtenção de açúcares para a produção de biocombustíveis. Além disso, a degradação de manano pode gerar mananoligossacarídeos (MOS), que podem ser utilizados como prebióticos por estimular o crescimento de microrganismos benéficos para a flora intestinal. Neste projeto, conduzimos com sucesso a expressão heteróloga e purificação de duas mananases da família GH5. Além disso, fomos capazes de definir as principais características bioquímicas das enzimas utilizando o método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como cinética enzimática, afinidade de substrato, estabilidade térmica e condições ótimas. Também avaliamos seu emprego na degradação de manano e na produção de MOS a partir da biomassa lignocelulósica. Por fim, as principais características estruturais foram estudadas com base em modelos estruturais tridimensionais das proteínas gerados com base na sequência de aminoácidos usando o sistema de predição de conformação de proteínas. Os resultados obtidos contribuem significativamente para o entendimento das propriedades catalíticas dessas enzimas e suas potenciais aplicações biotecnológicas.

## ABSTRACT

Polysaccharides in plant cell walls are mainly composed of cellulose, a glucose homopolymer, and hemicellulose, a complex group of heterogeneous polymers and one of the largest sources of renewable organic matter, with mannan being one of the main constituents of hemicellulose. Mannanases are enzymes capable of hydrolyzing mannan, cleaving glycosidic bonds within the main chain and releasing short manno-oligomers. The main enzyme families that exhibit this activity are GH5, GH26, and GH113. They can be employed in both biomass pretreatment and the production of sugars for biofuel production. Additionally, mannan degradation can generate manno-oligosaccharides (MOS), which can be used as prebiotics by stimulating the growth of beneficial microorganisms in the intestinal flora. In this project, we successfully conducted the heterologous expression and purification of two mannanases from the GH5 family. Furthermore, we were able to define the main biochemical characteristics of the enzymes using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, such as enzymatic kinetics, substrate affinity, thermal stability, and optimal conditions. We also evaluated their application in mannan degradation and MOS production from lignocellulosic biomass. Finally, the main structural characteristics were studied based on three-dimensional structural models of the proteins generated from the amino acid sequence using the protein conformation prediction system. The obtained results significantly contribute to understanding the catalytic properties of these enzymes and their potential biotechnological applications.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Biomassa lignocelulósica .....	1
1.2. Mecanismos de ação de MOS .....	4
1.3. Pré-tratamento .....	5
1.4. Mananases .....	6
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>8</b>
2.1. Objetivo geral .....	8
2.2. Objetivos específicos .....	8
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>8</b>
3.1. Produção das mananases da família GH5.....	8
3.2. Caracterização bioquímica das manases.....	9
3.2.1. Fluorimetria diferencial de varredura - <i>ThermoFluor</i> <sup>®</sup> .....	9
3.2.2. Ensaio enzimáticos .....	10
3.2.2.1. Painel de substratos .....	10
3.2.2.2. Ensaio de concentração enzimática .....	11
3.2.2.3. Ensaio de tempo de reação .....	11
3.2.2.4. Determinação de pH e temperatura ótima .....	11
3.2.2.5. Atividade residual.....	12
3.2.2.6. Cinética enzimática.....	12
3.2.3. Perfil de produto .....	13
3.3. Ensaio <i>in silico</i> .....	14
3.3.1. Análise filogenética .....	14
3.3.2. Determinação estrutural das enzimas .....	14
3.4. Pré-tratamento da biomassa .....	14
3.5. Hidrólise da biomassa utilizando mananase .....	15
<b>4. Resultados</b> .....	<b>15</b>
4.1. Expressão e purificação das proteínas .....	15
4.2. Fluorimetria diferencial de varredura - <i>ThermoFluor</i> <sup>®</sup> .....	16

4.3.Ensaios enzimáticos.....	17
4.3.1. Painel de substratos .....	17
4.3.2. Ensaios de concentrações enzimáticas e tempos de reação.....	18
4.3.3. Perfis de pH e temperatura .....	19
4.3.4. Atividade residual.....	20
4.3.5. Cinética enzimática.....	21
4.3.6. Padrão de clivagem.....	22
4.4.Análises <i>in silico</i> .....	24
4.4.1. Análise filogenética .....	24
4.4.2. Análise estrutural das enzimas .....	25
4.5.Hidrólise borra de café .....	28
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>30</b>
<b>Referências .....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação de uma molécula de celulose.	1
<b>Figura 2</b>	Unidades estruturais e as ligações na estrutura da lignina.	2
<b>Figura 3</b>	Estrutura geral de mananos e heteromananos.	3
<b>Figura 4</b>	Mecanismo de ação de mananoligossacarídeos como prebióticos.	5
<b>Figura 5</b>	Mecanismo geral de ação de glicosil hidrolases	7
<b>Figura 6</b>	Resultado da purificação de ambas enzimas da família GH5	16
<b>Figura 7</b>	Resultado do ensaio de <i>Thermofluor</i> .	17
<b>Figura 8</b>	Painel de substratos	18
<b>Figura 9</b>	Resultados dos ensaios de concentrações enzimáticas e tempos de reação.	19
<b>Figura 10</b>	Resultados dos ensaios de determinação das condições ótimas.	20
<b>Figura 11</b>	Resultados do ensaio de atividade residual.	21
<b>Figura 12</b>	Resultado do perfil de produto das mananases.	23
<b>Figura 13</b>	<i>Neighbor-joining trees</i> mostrando a relação filogenética entre a sequência de HcGH5	24
<b>Figura 14</b>	<i>Neighbor-joining trees</i> mostrando a relação filogenética entre a sequência de CbGH5	25
<b>Figura 15</b>	Estrutura tridimensionais da HcGH5 e CbGH5	26
<b>Figura 16</b>	Manoheptose nos Sítios Ativos de HcGH5 e CbGH5	27
<b>Figura 17</b>	Aminoácidos conservados no sítio ativo das enzimas	28
<b>Figura 18</b>	Avaliação da produção enzimática de manooligossacarídeos a partir de borra de café pré-tratada	30



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Atividade catalítica das mananases agindo sob polissacarídeos

22

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é um material derivado de resíduos agrícolas e florestais. Ela é composta, principalmente, por três diferentes polímeros associados entre si: celulose, lignina e hemicelulose (YOGALAKSHMI et al., 2022). A celulose, o polímero natural mais abundante na terra, é um componente essencial encontrado em animais, fungos, algas e plantas, sendo as fibras vegetais a principal fonte desse polissacarídeo (HEINZE, 2016). Independentemente da sua origem, a celulose possui uma composição consistente de anéis de  $\beta$ -D-glicopiranosose ligados por ligações 1  $\rightarrow$  4 (figura 1) (GARDNER; BLACKWELL, 1974).

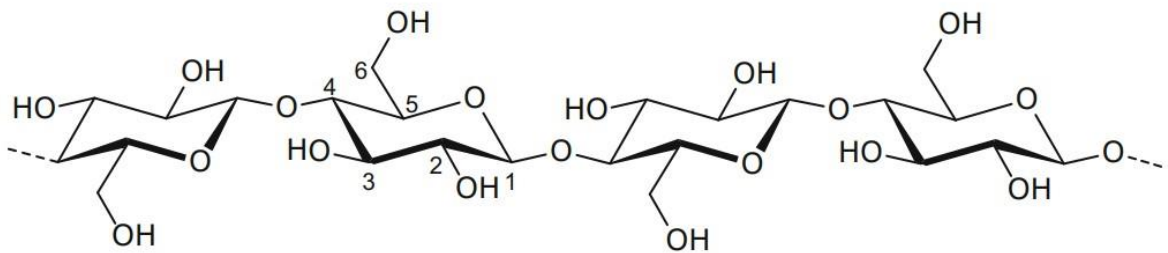


Figura 1 – Representação de uma molécula de celulose. Fonte: (HEINZE, 2016)

Atrás apenas da celulose, a lignina se classifica como o segundo biopolímero mais abundante do planeta (ARGYROPOULOS; MENACHEM, 1997). A lignificação é um processo vinculado ao desenvolvimento dos sistemas vasculares em plantas, conferindo resistência à biodegradação, estresses ambientais, além de contribuir para modulações no equilíbrio hídrico e da umidade (FALKEHAG, 1975). A lignina é formada por três unidades básicas principais: álcool  $p$ -cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, as quais estão interconectadas por meio de ligações éter e C-C (figura 2) (KANG et al., 2013).

A hemicelulose compreende os polissacarídeos não celulósicos da parede celular dos tecidos vegetais de plantas. Ela é formada por hexoses (galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose), e ácidos urônicos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011). Ela ocorre em uma grande variedade de tipos estruturais podendo ser classificada em grupos distintos, de acordo com o principal resíduo de açúcar que compõe o seu esqueleto,

como por exemplo xilanas, compostas por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose, mananas, compostas por unidades de  $\beta$ -D-manose e galactanas, compostas por unidades

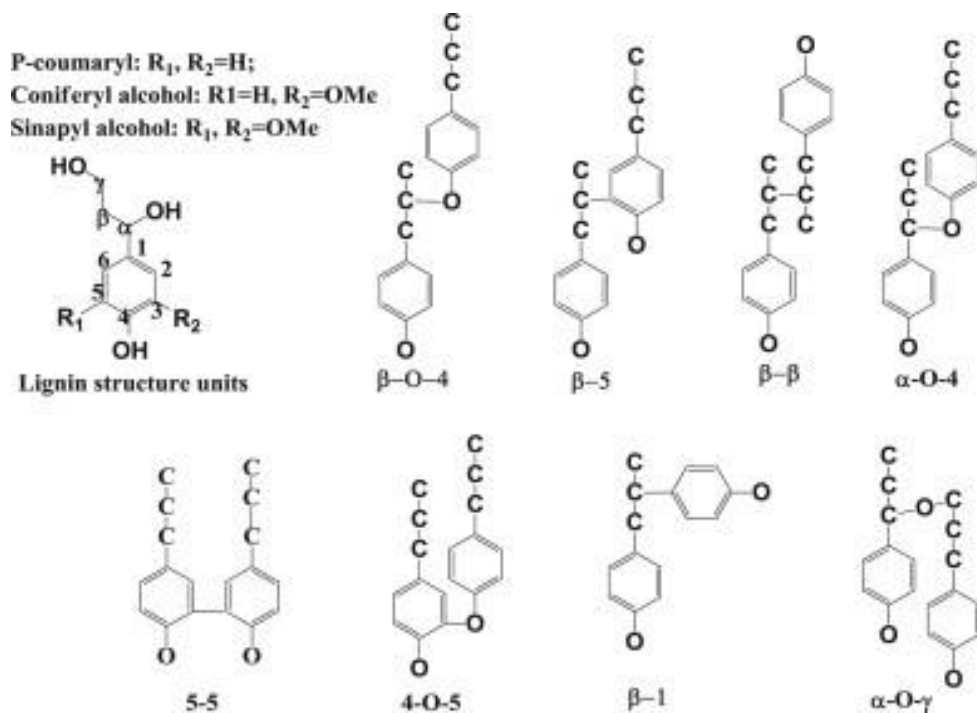


Figura 2 – Unidades estruturais e as ligações na estrutura da lignina. Fonte: (KANG et al., 2013)

de  $\beta$ -D-galactose. Dependendo da espécie vegetal, estágio de desenvolvimento e tecido, vasta diversidade estrutural pode ser encontrada, como arabinoxilanas, mananas lineares, glicomananas, galactomananas, galactoglicomananas, etc (OGEDA; PETRI, 2010).

Manano é um dos principais constituintes da hemicelulose, ele compreende cadeias lineares e ramificadas composta por açúcares como D-manose, D-glicose e D-galactose (MOREIRA et al., 2008).

Os glucomananos são polissacarídeos que exibem cadeias compostas por resíduos de D-manose arranjados aleatoriamente através de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). Além disso, contêm resíduos de D-glicose ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) numa proporção de 3:1 (MOREIRA et al., 2008). Galactomananos, por sua vez, consistem em resíduos de  $\beta$ -D-manopiranosil unidos por interações glicosídicas 1,4, e suas cadeias principais incluem ramificações de grupos  $\alpha$ -D-galactopiranosil ligados por interações glicosídicas 1,6 (MOREIRA et al., 2008). Mananos lineares são homopolissacarídeos que se caracterizam por cadeias principais lineares de resíduos de  $\beta$ -D-manopiranosil ligados por interações glicosídicas 1,4 (MOREIRA et al., 2008). Finalmente, os galactoglucomananos são polissacarídeos que incorporam resíduos de D-galactose ligados a unidades D-glicosil e D-

manosil como ramos terminais, organizados por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,6) (MOREIRA et al., 2008).

Existem rejeitos agroindustriais que são sabidamente ricos em mananos, como borra de café (SACHSLEHNER et al., 2000), semente de dendê (DAUD; JARVIS, 1992), farinha de copra (MERYANDINI et al., 2015), e *Pinus* (FREIESLEBEN et al., 2018).

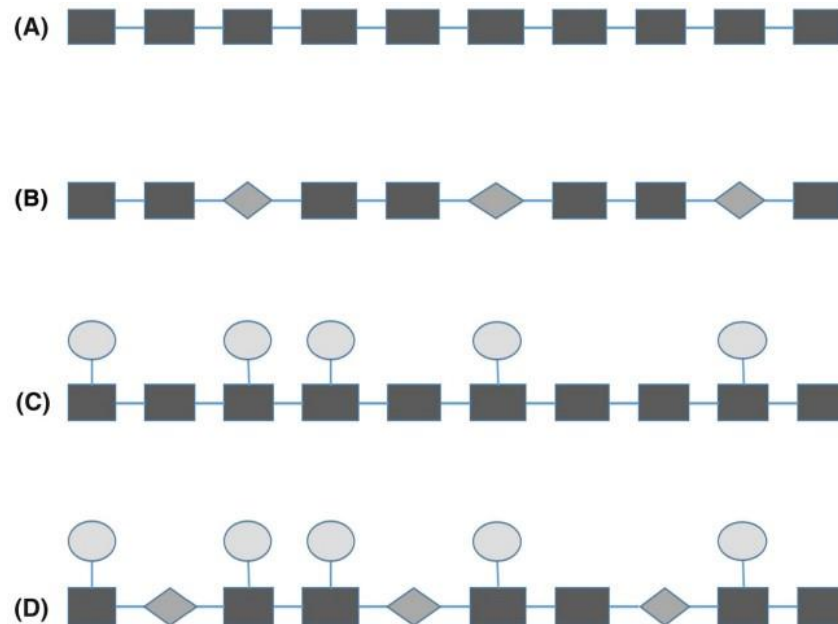


Figura 3 – Estrutura geral de mananos e heteromananos. (A) Estrutura típica de um manano linear. (B) Estrutura típica de um glucomanano. (C) Estrutura típica de um galactomanano. (D) Estrutura típica de um galactoglucomanano. As linhas representam a ligação glicosídica entre os respectivos resíduos, os quadrados representam resíduos de manose, os círculos representam resíduos de galactose e os losangos representam resíduos de glicose. Fonte: (MALGAS; DYK; PLETSCHE, 2015)

Mananoligossacarídeos (MOS) são oligossacarídeos caracterizados por sua estrutura a base de manose. Eles são produtos da hidrólise de mananos e podem ser classificados em  $\alpha$  e  $\beta$ -MOS, sendo a diferença entre os dois grupos o tipo de ligação glicosídica presente no polímero parental. Sendo assim,  $\alpha$ -MOS é derivado de  $\alpha$ -1,6-mananos, mananos comumente encontrados em fungos e leveduros, e  $\beta$ -MOS é derivado de  $\beta$ -1,4-mananos, mananos comumente encontrado em plantas (JANA et al., 2021). Prebióticos são definidos como componentes alimentícios não digestíveis que têm a capacidade de estimular seletivamente o crescimento ou atividade de bactérias benéficas da flora intestinal (HLALUKANA et al., 2021). MOS possuem valor agregado devido a sua capacidade de

serem utilizados como prebióticos, sendo assim, eles representam um excelente ingrediente prebiótico para a indústria alimentícia sendo aplicados em dieta animal. Dentre os benefícios pode-se citar a redução de bactérias patogênicas, crescimento de bactérias benéficas e modulação da resposta imune (CHACHER et al., 2017).

Além dos benefícios relacionados aos efeitos prebióticos, mananos são importantes fontes de manose que pode ser aproveitada para produção de biocombustíveis. A bioconversão de biomassa em açúcares monoméricos para subsequente fermentação em produtos como etanol pode ser eficientemente conduzida utilizando múltiplas enzimas (YAMABHAI et al., 2016).

## 1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DE MOS

Uma flora intestinal bem balanceada é de suma importância para a manutenção da saúde, e MOS tem a capacidade de manter o equilíbrio reduzindo a carga de bactérias patogênicas na flora intestinal enquanto estimula o crescimento de bactérias benéficas.

O emprego de MOS por bactérias benéficas do intestino conduz à produção de produtos, como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Essa atividade metabólica resulta na redução do pH na flora intestinal, criando um ambiente menos propício para o crescimento de bactérias prejudiciais, como o *Clostridium perfringens*. Essa modulação do ambiente intestinal destaca a capacidade dos MOS em contribuir para a promoção de uma microbiota equilibrada e benéfica à saúde digestiva (ASANO et al., 2004).

O estudo conduzido por Chacher et al. (CHACHER et al., 2017) destaca a capacidade dos mananoligossacarídeos de se associarem às fímbrias tipo-1 de bactérias gram-negativas, como *Salmonella* e *E. coli*. Essas fímbrias, que contêm lectina manose-específica (FimH), desempenham um papel crucial na fixação dessas bactérias à mucosa intestinal. Assim, os MOS apresentam a capacidade de reduzir a ligação de bactérias gram-negativas à mucosa intestinal, agindo como ligantes para a FimH bacteriana presente nas fímbrias tipo-1. MOS também estimulam a produção de células caliciformes, responsáveis pela secreção de muco que protege a membrana mucosa (HLALUKANA et al., 2021). Ademais, as células caliciformes também estão associadas a produção de mucinas, glicoproteínas capazes de interagir com

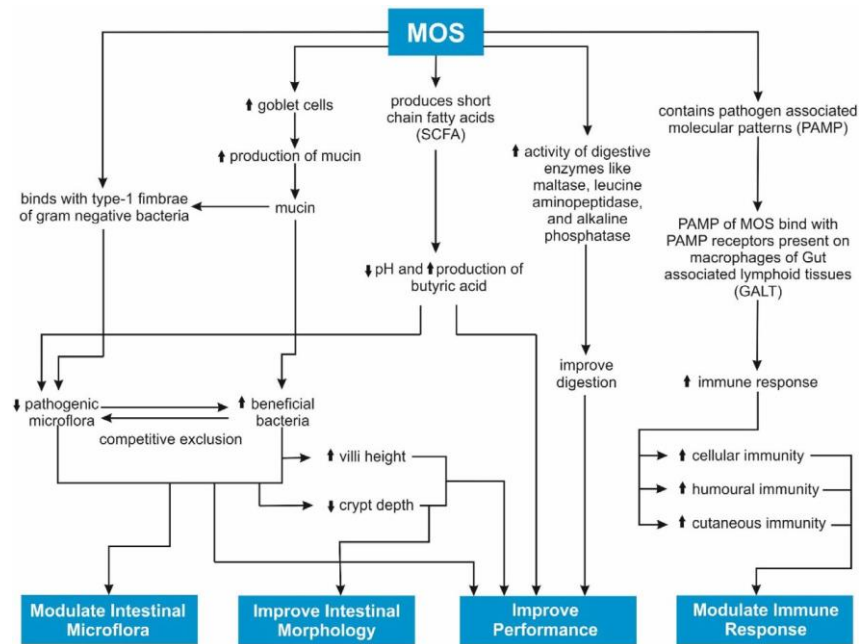


Figura 4 – Mecanismo de ação de mananoligossacarídeos como prebióticos. Fonte: (CHACHER et al., 2017)

fímbrias tipo-1 de bactérias gram-negativas, auxiliando na diminuição dessas bactérias no trato digestivo (CHACHER et al., 2017; BAURHOO et al., 2007).

Por fim, a ingestão de mananoligossacarídeos desencadeia uma resposta imune por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), ligando-se aos receptores PAMP presentes nos macrófagos do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Oligossacarídeos com grau de polimerização superior a seis mostraram eficácia na influência sobre a resposta imunológica. Em aves, a ingestão de MOS resulta no aumento dos níveis plasmáticos de IgG e IgA (HLALUKANA et al., 2021).

### 1.3 PRÉ-TRATAMENTO

O ponto inicial na obtenção de MOS consiste no pré-tratamento da biomassa de interesse. Esse processo primário visa preparar a matéria prima para a extração eficiente dos MOS por meio de hidrólise enzimática. O pré-tratamento geralmente envolve processos que visam quebrar as barreiras físicas e químicas presentes na biomassa, tornando-a mais acessível para a ação de enzimas, como mananases. Essas etapas podem incluir tratamentos físicos, como exposição a altas pressões e/ou temperaturas e tratamentos químicos, como tratamento ácido ou alcalino (OTIENO; AHRING, 2012). O objetivo é tornar a hidrólise enzimática mais eficaz, uma vez que a recalcitrância da biomassa lignocelulósica é reduzida (LYND et al., 2002).

Pré-tratamento alcalino causa a hidrólise das ligações éster entre a lignina e hemicelulose, liberando assim a hemicelulose da matriz e permitindo sua extração. Produtos químicos como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e hidróxido de potássio são comumente empregados. Em comparação com outros métodos, a extração alcalina requer condições de temperatura e pressão menos intensas, entretanto seu emprego pode levar a formação de compostos indesejados, como sais que são recuperáveis ou incorporados a biomassa (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018).

Pré-tratamento ácido, no geral, permite a extração da hemicelulose, entretanto, devido a sua agressividade, uma fração celulósica pode ser degradada no processo, gerando produtos indesejados como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (NETO et al., 2020).

O pré-tratamento hidrotérmico faz uso de água quente pressurizada para aumentar a solubilização do material. Ele é uma alternativa barata e ecologicamente limpa, pois não necessita de aditivos, como catalisadores ácidos. Ele provoca a auto-ionização da água em  $H_3O^+$  e  $OH^-$ , que por sua vez faz com que a água atue como um catalisador que induz a liberação de acetato, dessa forma a diminuição do pH do meio atua como um catalisador para as reações de hidrólise. Esses eventos combinados estimulam a despolimerização da hemicelulose (SANTO et al., 2015; RUIZ et al., 2020). Uma vez pré-tratada, a biomassa pode seguir para a etapa de hidrólise enzimática para a obtenção de manose e MOS de forma eficiente.

#### 1.4 MANANASES

Enzimas especializadas na hidrólise do manano fazem parte do conjunto de glicosil hidrolases produzidas por fungos e bactérias voltados para a decomposição da biomassa (ZYL et al., 2010). As principais enzimas envolvidas na hidrólise de mananos são: 1,4- $\beta$ -D-manano manohidrolases ( $\beta$ -mananases, EC 3.2.1.78), hidrolases capazes de atacar as ligações glicosídicas internas da cadeia principal de manano, liberando curtos  $\beta$ -1,4-manano oligossacarídeos (ZYL et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012), 1,4- $\beta$ -D-manopiranosídeo hidrolases ( $\beta$ -manosidases, EC 3.2.1.25), enzimas exoativas que agem em extremidades terminais não redutoras liberando manose de oligossacarídeos (CHAUHAN et al., 2012), e 1,4- $\beta$ -d-glicosídeo glicohidrolases ( $\beta$ -glicosidases, EC 3.2.1.21), hidrolases que tem como produto de sua ação em extremidades não redutoras dos oligômeros derivados da degradação do glucomanano e galactoglucomanano, unidades de 1,4-glicopiranosose (CHAUHAN et al., 2012).

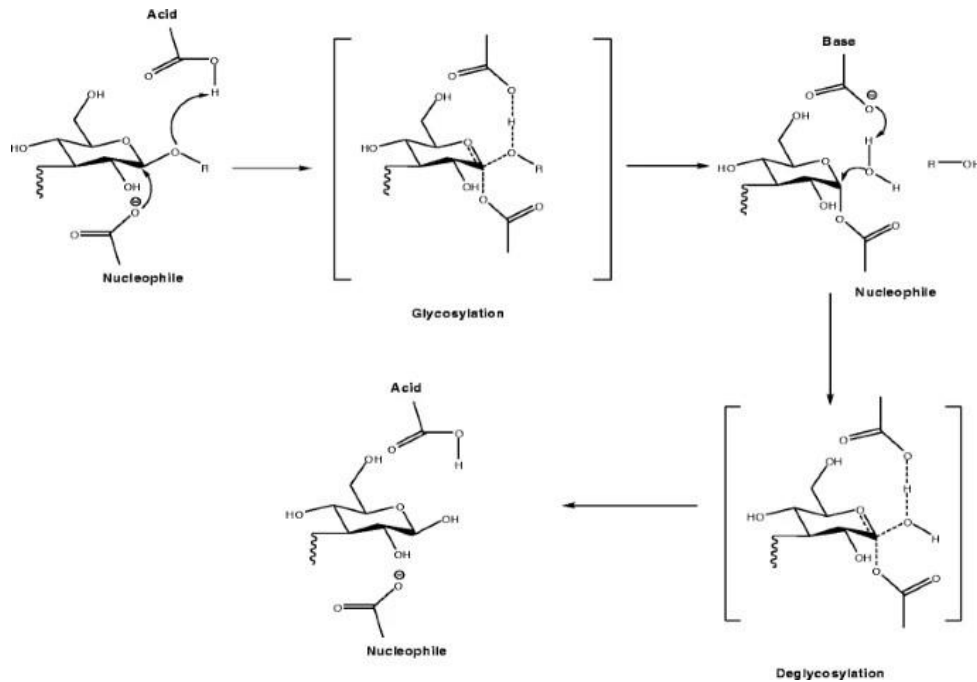


Figura 5 – Mecanismo geral de ação de glicosil hidrolases. Fonte: (WITHERS, 2001)

Endo- $\beta$ -mananases são classificadas nas glicosídeo hidrolases (GH) de famílias 5, 26, 113 e 134 com base na similaridade de sequência de aminoácidos, semelhança estrutural e mecanística (MALGAS; DYK; PLETSCHKE, 2015).

A endo- $\beta$ -mananase catalisa a hidrólise de seus substratos por meio de um mecanismo de retenção (figura 5), envolvendo uma reação de dupla substituição. A quebra da ligação glicosídica ocorre por meio de uma catálise ácido/base geral, com dois carboxilatos (glutamatos ou aspartatos) estrategicamente posicionados nos sítios ativos. Na primeira etapa um carboxilato nucleofílico ataca o carbono anomérico, levando à liberação simultânea do aglicona e à formação de um intermediário covalente enzimático. Na segunda etapa, esse intermediário covalente sofre ataque por uma molécula de água nucleofílica, resultando na liberação do glicosídeo da enzima (CHAUHAN et al., 2012).

Endo- $\beta$ -mananases de diferentes famílias GH apresentam padrão de enovelamento, tendo uma estrutura  $(\beta/\alpha)_8$ -barril (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2017). GHs são comumente produzidas por organismos eucariotos como fungos, plantas e animais (ZYL et al., 2010; LARSSON et al., 2006), entretanto algumas bactérias como *Thermotoga petrophila* (SANTOS et al., 2012) e *Bacillus licheniformis* (ETHIER; TALBOT; SYGUSCH, 1998), também têm sido relatadas como capazes de produzir essas enzimas.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é produzir de maneira heteróloga, purificar e caracterizar enzimas da família GH5 envolvidas na degradação de manano e utilizá-las para produção de mananoligossacarídeos (MOS), a partir de substratos ricos em manano, caracterizando seus respectivos produtos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção, através da expressão heteróloga em *E.coli*, e purificação de duas mananases da família GH5, *HcGH5* e *CbGH5*, dos organismos *Hungateiclostridium cellulolyticum* e *Caldicellulosiruptor bescii*, respectivamente;
- Caracterização bioquímica das enzimas produzidas;
- Análise e comparação estrutural das enzimas em estudo;
- Aplicação em biomassa das mananases para obtenção de MOS;
- Avaliação de oligossacarídeos solúveis gerados (MOS) pela ação das mananases;

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Produção das mananases da família GH5

Para realizar a expressão heteróloga dos alvos a serem empregadas foram utilizados clones previamente obtidos via plataformas *High-throughput* disponível em nosso laboratório (CAMILO; POLIKARPOV, 2014). Foram utilizadas bactérias *E. coli* pertencentes às cepas DH5- $\alpha$  para replicação do plasmídeo e *Arctic express* para expressão. A expressão das mananases oriundas de *Hungateiclostridium cellulolyticum* e *Caldicellulosiruptor bescii* foi conduzida em meio Luria Bertani (LB), contendo antibióticos apropriados (kanamicina e gentamicina).

Foram preparados 15mL de pré-inóculo para cada uma das enzimas. Esses pré-inóculos foram incubados em um agitador a 37°C e 150 rpm *overnight*. Após o crescimento, foram transferidos para frascos contendo 2 litros de meio LB e incubados nas mesmas condições. O cultivo prosseguiu até que a cultura atingisse uma densidade óptica (DO) de 0,5 a 600 nm, seguido de indução da expressão das enzimas mediante a adição de 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma temperatura de 15°C, mantendo-se por 24 horas. O nível de expressão e solubilidade das proteínas de interesse foram confirmados através processo de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes.

Após a conclusão da expressão, as culturas foram centrifugadas a 6000 rpm por 30 minutos a 4°C, e os pellets resultantes foram separados para o processo de lise. As reações de lise foram conduzidas com uma incubação de 40 minutos em tampão de lise (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF, e 0,25 µg/mL de lisozima). Em seguida, cada reação de lise foi submetida a oito ciclos de sonicação, cada um com duração de 30 segundos, operando a 30% de amplitude.

Seguiu-se com a purificação por matriz de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) Ni-NTA Agarose (MC LAB). As colunas de purificação foram preparadas com 3mL de resina e pré equilibradas com tampão de lavagem (Tris 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM; pH 8.0). Os lisados foram aplicados na coluna e os tampões de lavagem e eluição (Eluição 1: Tris 50 mM; NaCl 300mM; Imidazol 250 mM; pH 8.0; Eluição 2: Tris 50 mM; NaCl 300mM; Imidazol 500 mM; pH 8.0) foram passados. O sucesso desta etapa também foi através de eletroforese em gel SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes. As concentrações das proteínas foram medidas por método espectrofotométrico a 280 nm, utilizando o equipamento Nanodrop.

## 3.2 Caracterização bioquímica das mananases

### 3.2.1 Fluorimetria diferencial de varredura - *ThermoFluor*®

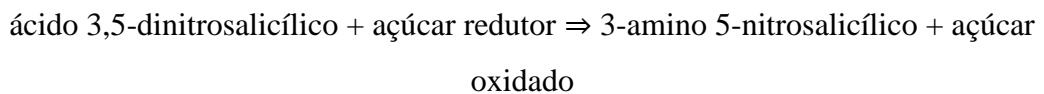
O método de fluorimetria diferencial de varredura (*ThermoFluor*), tem como objetivo determinar as condições ideais para a estabilidade das proteínas, por meio da triagem de diferentes tampões. A técnica consiste no emprego da sonda SYPRO®Orange (Invitrogen), capaz de se ligar a porções hidrofóbicas de proteínas, que são expostas após a desnaturação, e emitir sinais de fluorescência. A temperatura é gradativamente aumentada (variada entre 25°C e 90°C a uma taxa de 1°C a cada 30 segundos) de modo que ocorra a desnaturação da proteína. Dessa forma, é possível a determinação da temperatura de *melting*, temperatura na qual 50% das enzimas atingem o estado desnaturado.

Os impactos do pH e da temperatura na estabilidade estrutural de *HcGH5* e *CbGH5* foram examinados por meio da técnica de fluorimetria diferencial de varredura (*ThermoFluor*) (PANTOLIANO et al., 2001; LO et al., 2004). Foram testados 48 tampões distintos numa faixa de pH de 1,2 a 10,0, tanto com a adição de 300 mM de NaCl quanto sem a adição de 300 mM de NaCl. A avaliação foi conduzida utilizando uma placa de PCR de 96 poços de parede fina (Bio-Rad, Hercules, EUA). Cada medição consistiu em 5 µL da enzima a 1,5 mg/mL, 10 µL de tampão e 5 µL de corante SYPRO Orange (Invitrogen,

Carlsbad, EUA), diluído 300 vezes em água ultrapura. A vedação da placa foi realizada utilizando um selo adesivo óptico Microseal®'B' (Bio-Rad, Hercules, EUA). As amostras foram incubadas em um termociclador (Bio-rad, Hercules, EUA), e a temperatura foi variada de 25 a 90 °C com um aumento de 1 °C a cada 30 segundos. A sonda fluorescente foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 490/530 nm, possibilitando a determinação da temperatura de fusão (T<sub>m</sub>).

### 3.2.2 Ensaio enzimáticos

Os ensaios de atividade enzimática das mananases foram realizados utilizando o método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), para detecção de grupos terminais redutores de sacarídeos (MILLER, 1959). O método DNS é comumente utilizado para avaliar atividade enzimática por meio da quantificação de açúcares redutores. O ácido 3,5-dinitrosalicílico é um composto aromático capaz de reagir com agentes redutores, formando ácido 3-amino 5-nitrosalicílico, que tem um pico de absorvância em 540nm. A reação é catalisada em altas temperaturas (WOOD et al., 2012)



Todos os ensaios foram conduzidos em sete réplicas com um branco para controle (reação sem enzima) em placas de 96 poços e volume final de 100µL. As reações enzimáticas foram interrompidas com a adição DNS e aquecimento a 95°C por 5 minutos. A absorvância foi medida no espectrofotômetro Multiskan® Spectrum (Thermo Scientific) sob o comprimento de onda de 540 nm.

#### 3.2.2.1 Painel de substratos

A afinidade das enzimas pelos substratos foi determinada testando diferentes substratos. Foram utilizados os mananos lineares: *Ivory Nut* (Megazyme); *1,4-β-mannan* 97:3 (manano:galactose = 97:3; Megazyme); *1,4-β-mannan* 98:1:1 (manano:galactose:outros açúcares = 98:1:1; Megazyme). Galactomanaos: *Carob galactomannan* (baixa viscosidade; Megazyme); *Guar Gum* comercialmente disponível; *Locust Bean Gum* de *Ceratonia siliqua seed* (SIGMA). Glucomanano: *Konjac glucomannan* (baixa viscosidade; Megazyme). Os ensaios foram conduzidos com uma

duração de 15 minutos em pH 7,0 e a uma temperatura de 50°C para *HcGH5* e 80°C para *CbGH5* em tampão fosfato de sódio 50mM, e concentração dos substratos a 0,1% (m/v). Esses valores foram previamente determinados com base nos resultados obtidos no teste de *ThermoFluor*.

#### 3.2.2.2 Ensaio de concentração enzimática

O ensaio bioquímico para a determinação das concentrações enzimáticas a serem utilizadas nos experimentos foi conduzido com as enzimas de interesse, utilizando Konjac Glucomanano 0,1% (m/v), substrato definido com base na melhor atividade enzimática medida no teste de painel de substratos. Os ensaios foram conduzidos com uma duração de 15 minutos em pH 7,0 e a uma temperatura de 50°C para *HcGH5* e 80°C para *CbGH5* em tampão fosfato de sódio 50mM. A concentração enzimática foi variada entre 25µg/mL e 0,01µg/mL para ambas enzimas. A região linear foi determinada e a concentração enzimática utilizada nos próximos experimentos foi definida a partir dela.

#### 3.2.2.3 Ensaio de tempo de reação

O ensaio bioquímico para a determinação dos tempos de reação a serem utilizados nos experimentos foi conduzido com as enzimas de interesse, utilizando Konjac Glucomanano 0,1% (m/v). Os testes foram realizados em pH 7,0, temperatura de 50°C para *HcGH5* e 80°C para *CbGH5* em tampão fosfato de sódio 50mM, e concentração enzimática de 0,25µg/mL para *HcGH5* e 0,1µg/mL para *CbGH5*. Foram realizadas 12 reações com tempos distintos (1 a 20 minutos), e a atividade enzimática foi medida para cada tempo determinado. A região linear foi determinada e o tempo de reação utilizado nos próximos experimentos foi definido a partir dela.

#### 3.2.2.4 Determinação de pH e temperatura ótima

Os ensaios bioquímicos para determinação das temperaturas ótimas foram conduzidos em tampão fosfato de sódio 50mM, concentração enzimática de 0,25µg/mL para *HcGH5* e 0,1µg/mL para *CbGH5*, pH 7,0 e 5 minutos de reação utilizando Konjac Glucomanano 0,1% (m/v) como substrato. A temperatura foi variada em uma faixa entre 30 °C a 100 °C em equipamento termociclador, Bio-Rad, com controle de temperatura das linhas individuais.

Para determinar o pH ótimo das enzimas, foram conduzidas reações de 5 minutos. No caso da *HcGH5*, foram realizadas reações a 50°C, com uma concentração enzimática de 0,25 µg/mL. O substrato utilizado foi Konjac Glucomanano em uma concentração de 0,1%, em tampões acetato/borato/fosfato (ABF) com pH variando dentro do intervalo entre 2 e 10. Já para a *CbGH5*, as reações foram realizadas a 90°C, com uma concentração enzimática de 0,1 µg/mL, utilizando Konjac Glucomanano a 0,1% (m/v), em tampões McIlvaine com pH variando dentro do intervalo entre 2 e 8.

#### 3.2.2.5 Atividade residual

A análise da atividade residual tem como objetivo nos orientar a respeito da estabilidade térmica da enzima em condições específicas. As enzimas foram submetidas à incubação, e amostras foram regularmente retiradas para testes que avaliaram a atividade enzimática. O experimento prosseguiu até que as enzimas não apresentassem mais atividade.

No caso da *HcGH5*, a incubação ocorreu a 50°C e a 40°C em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0. A atividade da enzima foi avaliada por meio de reações de 5 minutos em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 e 50°C, utilizando Konjac Glucomano a 0,1% (m/v) como substrato.

Para a *CbGH5*, a incubação foi realizada a 90°C e a 75°C em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0. A atividade da enzima foi avaliada por meio de reações de 5 minutos em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 e 90°C, também utilizando Konjac Glucomano a 0,1% (m/v) como substrato.

#### 3.2.2.6 Cinética enzimática

Para avaliar os parâmetros cinéticos da enzima *HcGH5*, foi conduzida reações de 5 minutos com concentrações variadas de Konjac Glucomanano (0,48 g/L a 5 g/L). Esses experimentos foram feitos em condições ideais de temperatura e pH (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 a 50°C) e com uma concentração enzimática de 0,25 µg/mL.

Já para a *CbGH5*, os parâmetros cinéticos foram determinados utilizando Carob Galactomanano como substrato. A concentração deste substrato foi variada de 1 a 16 g/mL sob condições ideais, ou seja, em tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 e a uma temperatura de 90 °C, com reações de 5 minutos e uma concentração enzimática de 0,1 µg/mL.

A análise dos dados foi realizada por meio de um ajuste de Michaelis-Menten utilizando o software Origin®2018, desenvolvido pela Originlab®.

### 3.2.3 Perfil de produto

A liberação de manose e MOS pela ação enzimática da *HcGH5* e *CbGH5* será avaliada em função do tempo. Será utilizada cromatografia de troca iônica de alta performance (HPAEC) no aparelho Dionex ICS-5000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) acoplado com uma coluna de troca iônica CarboPACI (2x250 mm) (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Com condições de corrida: fluxo de 0,5 mL/min a 30 °C, volume de injeção igual a 1  $\mu$ L, 100mM de NaOH (tampão A) e 500mM de acetato de sódio com 100mM de NaOH (tampão B) como tampões empregados na eluição.

Para analisar o padrão de clivagem das enzimas, preparou-se 1 mL da reação utilizando como substratos: manooligossacarídeos (MOS) com grau de polimerização de três (M3) a cinco (M5), Konjac Glucomanano 0,1 % (m/v) (baixa viscosidade; Megazyme), Carob galactomanano 0,1 % (m/v) (baixa viscosidade; Megazyme), 1,4- $\beta$ -manano 0,1 % (m/v) (manose:galactose = 97 :3; Megazyme) para *HcGH5* e *Ivory Nut* para *CbGH5*. Uma reação de controle (ausência de enzima) foi preparada para cada substrato. As reações da *HcGH5* foram mantidas a 50 °C por 30 min em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, enquanto que as reações da *CbGH5* foram mantidas a 75 °C, em três tempos distintos (5, 30 e 60 min), em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.

Os produtos da reação foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho acoplada ao sistema de detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) Dionex ICS-5000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA), equipado com uma coluna CarboPAC PA 1 (250 mm  $\times$  2 mm) (Thermo Scientific, Waltham, EUA). As condições de corrida foram como as descritas no trabalho (VACILOTTO et al., 2022). Manose e MOS com grau de polimerização de 2 (M2) a 6 (M6) (todos da Megazyme, Wicklow, República da Irlanda) foram usados como padrões para identificação do produto.

A técnica de HPAEC-PAD fundamenta-se na ionização de carboidratos em oxianions em pH elevado (>11), caracterizando-se como uma cromatografia com uma fase móvel alcalina. Nesse processo, os elétrons provenientes da oxidação dos carboidratos fluem em direção ao eletrodo de trabalho, e esse fluxo é integrado ao longo do tempo para gerar uma carga. Essa carga é então representada em função do tempo para produzir o cromatograma, fornecendo informações valiosas sobre a composição e a quantidade de carboidratos presentes na amostra (ROHRER, 2021).

### 3.3 Ensaio *in silico*

#### 3.3.1 Análise filogenética

Para a realização da filogenia, foi identificado no banco de dados CAZy (<https://www.cazy.org>) todas as subfamílias GH5 que compreendem a atividade de endo- $\beta$ -1,4-mananase (EC 3.2.1.78), ou seja, as subfamílias 4, 7, 8, 10, 17, 25, 36, 40, 41 e 55. De cada família, foram selecionadas três sequências, quando disponíveis, para realizar a análise filogenética. As sequências, incluindo a de *HcGH5* e *CbGH5*, foram alinhadas com o algoritmo ClustalW e uma árvore de vizinhança foi elaborada usando o software MEGA11 com as configurações padrão (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021). O método de bootstrap foi usado como teste de filogenia com 1000 iterações. Em seguida, com base nos resultados, mais sequências da mesma subfamília de *HcGH5* e *CbGH5* foram recuperadas do CAZy e uma nova árvore foi feita apenas com representantes GH5 \_8, conforme descrito anteriormente.

#### 3.3.2 Determinação estrutural das enzimas

Foram gerados modelos estruturais tridimensionais das proteínas *HcGH5* e *CbGH5* com base em suas sequências de aminoácidos utilizando o sistema de predição de conformação de proteínas AlphaFold, um método de *Deep Learning* desenvolvido pela DeepMind, sediada em Londres, Reino Unido. Este procedimento foi realizado por meio da plataforma ColabFold (MIRDITA et al., 2022; JUMPER et al., 2021).

Posteriormente, foram escolhidos modelos cristalográficos homólogos próximos, identificados por alinhamento local de sequências disponíveis no Protein Data Bank (PDB), os quais continham ligantes relevantes. Realizou-se uma sobreposição entre os modelos preditivos e os modelos cristalográficos das enzimas homólogas utilizando o software PyMOL. Esse processo permitiu a identificação e o estudo de subsítios de interação nas proteínas analisadas.

### 3.4 Pré-tratamento da biomassa

Para aumentar a eficácia da hidrólise enzimática pré-tratamento hidrotérmico foi aplicado na borra de café. Para isso, os resíduos de café obtidos localmente foram secos a 40 °C, por uma semana, antes de serem utilizados. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em um reator Parr de 100 mL, com uma relação sólido-líquido de 1g para 10 mL. Foram testados cinco tempos de pré-tratamento diferentes (30, 60, 90, 120 e 150 minutos), combinados com três temperaturas diferentes (140, 160 e 180 °C), em um banho

de glicerina. Em seguida, os sólidos e o licor foram separados por filtração a vácuo. Os sólidos foram secos a 40 °C antes da hidrólise enzimática.

### 3.5 Hidrólise da biomassa utilizando mananases

Para avaliar a produção de MOS a partir do SCG pré-tratado, foram preparadas reações de 1,5 mL (SCG 10% (m/v), enzima 10 µg/mL) e uma reação de controle (ausência de enzima) para cada condição de tempo e temperatura do pré-tratamento dos resíduos de café. A hidrólise foi realizada apenas utilizando *HcGH5*. As reações foram mantidas a 40 °C por 2 horas em tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7.0, em ThermoShaker sob agitação de 1000 rpm. A formação dos produtos foi analisada com HPAEC, onde a análise qualitativa e quantitativa de MOS pôde ser realizada. Manose e MOS com grau de polimerização de 2 (M2) a 6 (M6) foram utilizados como padrões para identificação e quantificação dos produtos. As reações foram realizadas em duplicata. A manose não pôde ser quantificada devido à sobreposição na leitura cromatográfica com outros componentes da reação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Expressão e purificação das proteínas

A expressão em sistema heterólogo das mananases da família GH5 provenientes dos organismos *Hungateiclostridium cellulolyticum*, denominada *HcGH5*, e *Caldicellulosiruptor bescii*, denominada *CbGH5* ocorreu com sucesso, sendo obtido ao final do segundo processos de eluição 48 mg de *HcGH5* e 14 mg de *CbGH5* com grau de pureza adequado.

O processo de expressão e purificação foi realizado com sucesso, resultando no isolamento de 48 mg de proteína purificada de *HcGH5* e 14 mg de *CbGH5* a partir de uma cultura de *E. coli* de 2 L. Após duas etapas de purificação por IMAC, as enzimas apresentaram-se como uma banda única no gel de SDS-PAGE (figura 6), e sua massa observada correspondeu ao peso molecular teórico previsto com base na sequência de aminoácidos (*HcGH5*: 40,45 kDa; *CbGH5*: 30,07 kDa).



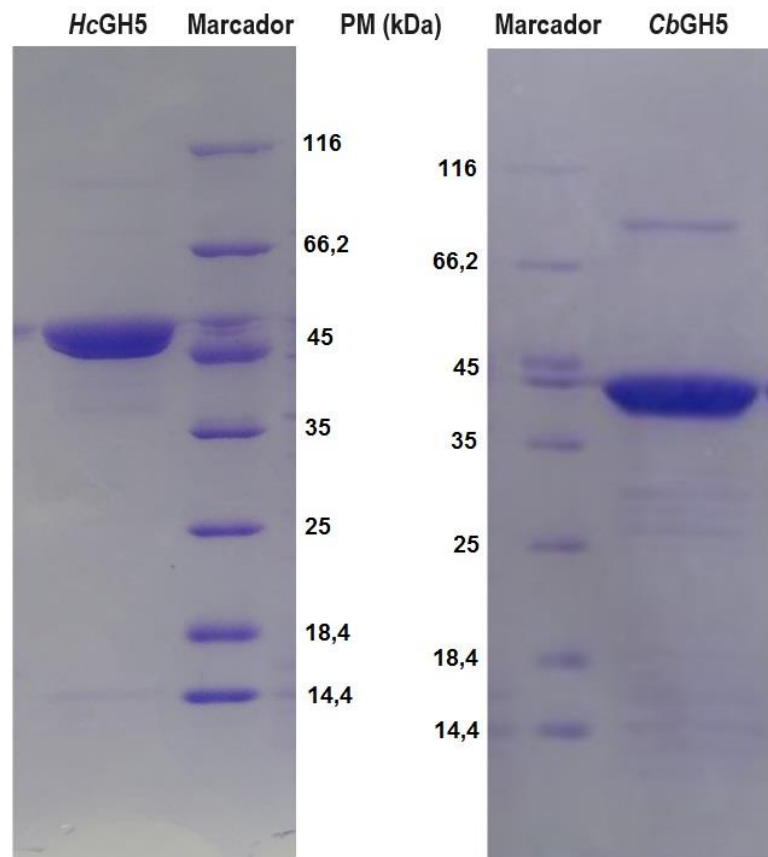


Figura 6 – Resultado da purificação de ambas as enzimas da família GH5. Na primeira imagem, a coluna da esquerda corresponde a uma solução de *HcGH5* após a purificação, a coluna da direita corresponde ao marcador de baixa massa molecular. Na segunda imagem, a coluna da esquerda corresponde ao marcador de baixa massa molecular e a coluna da direita a uma solução de *CbGH5* após a purificação. As amostras apresentadas foram utilizadas subsequentemente para os testes bioquímicos.

#### 4.2 Fluorimetria diferencial de varredura - *ThermoFluor*®

Os efeitos do pH e da temperatura na estabilidade estrutural da *HcGH5* e *CbGH5* foram avaliados pela técnica de fluorimetria diferencial de varredura. Os ensaios de *ThermoFluor* revelaram que na faixa de pH de 6,5 a 7,5, a *HcGH5* e a *CbGH5* apresentaram as maiores temperaturas de *melting* ( 58 °C - 60 °C e 85 °C - 91 °C, respectivamente)(figura 7). O pH em torno de 7,0 imprimiu maior estabilidade estrutural frente à temperatura para ambas enzimas, sugerindo que ambas são otimizadas em ambientes neutros.

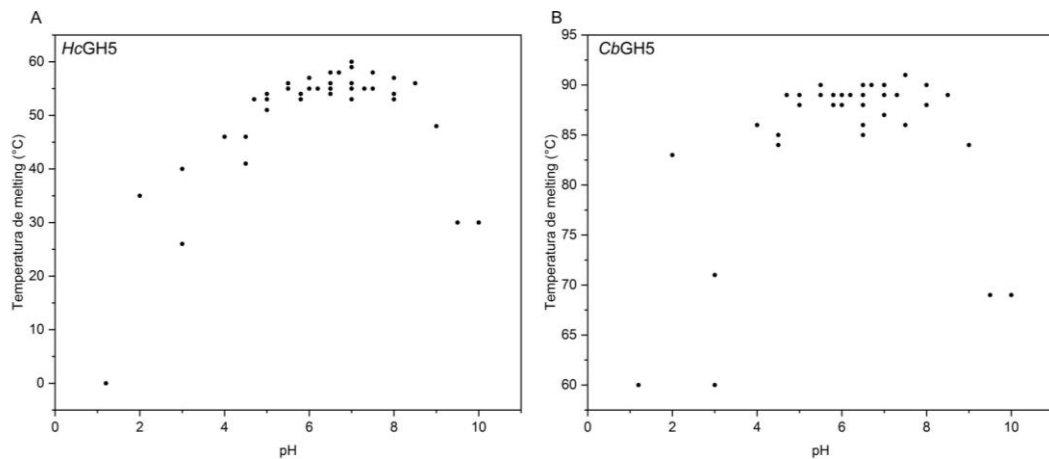


Figura 7 – (A) Resultado do ensaio de *Thermofluor* da enzima *HcGH5*. (B) Resultado do ensaio de *Thermofluor* da enzima *CbGH5*.

### 4.3 Ensaios enzimáticos

Os ensaios de atividade enzimática das endo- $\beta$ -mananases foram realizados usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para a detecção de grupos terminais redutores de sacarídeos (MILLER, 1959). Todos os ensaios foram conduzidos com sete réplicas e uma reação controle (ausência de enzima) com 0,1 % (m/v, concentração final) de substrato (diversos tipos de mananos foram testados como substrato) e enzima na concentração de 0,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 a 50 °C para a *HcGH5* e 90° para a *CbGH5*, exceto quando indicado de outra forma. Após 5 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de DNS e aquecimento a 95 °C por 5 min. A absorbância foi então medida a 540 nm em espectrofotômetro.

#### 4.3.1 Painel de substratos

A atividade das enzimas foi testada contra uma variedade de substratos. As condições de pH, temperatura e concentrações enzimáticas utilizadas foram as determinadas nos experimentos anteriores.

A atividade enzimática máxima da *HcGH5* foi detectada contra Konjac glucomanano e Carob galactomanano (figura 8A), com atividades específicas de  $687,43 \pm 52,77$  U/mg e  $332,3 \pm 42,24$  U/mg, respectivamente. A mananase *CbGH5* também apresentou atividade enzimática máxima contra Konjac glucomanano e Carob galactomanano (figura 8B), com atividades específicas de  $2066,34 \pm 87,09$  U/mg e  $1286,93 \pm 45,28$  U/mg, respectivamente.

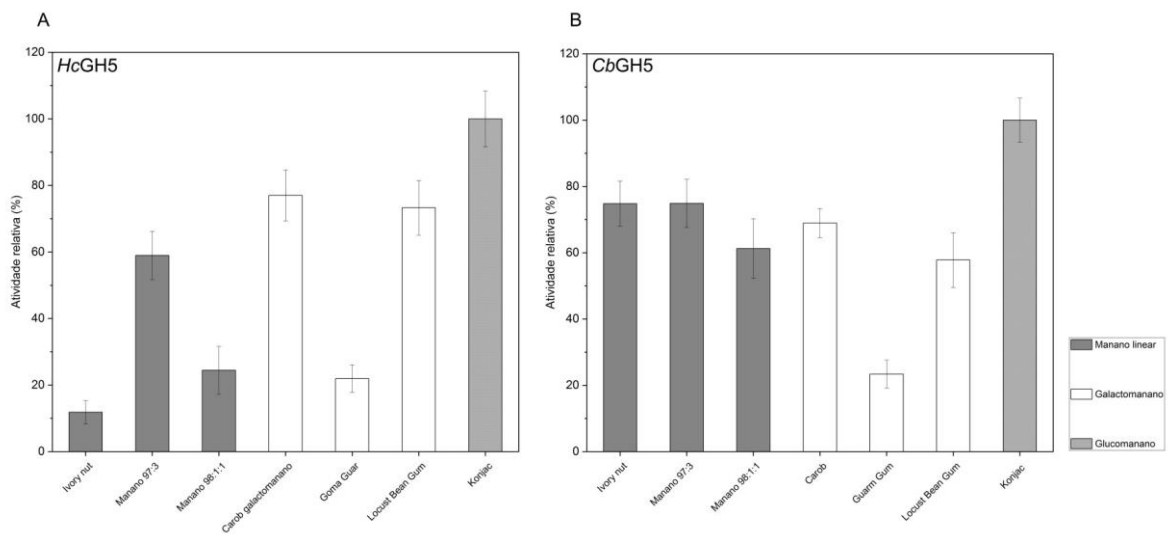


Figura 8 – Painele de substratos. (A) O ensaio mostrou que a enzima *HcGH5* tem a maior atividade enzimática agindo sobre o substrato Konjac glucomanano. (B) O ensaio mostrou que a enzima *CbGH5* também apresenta maior atividade enzimática agindo sobre o substrato Konjac glucomanano.

#### 4.3.2 Ensaio de concentrações enzimáticas e tempo de reação

O teste para a determinação das concentrações enzimáticas e tempo de reação a serem utilizadas nos experimentos foram conduzidos com as enzimas de interesse utilizando Konjac Glucomanano 0,1 % (m/v) como substrato. A concentração enzimática da *HcGH5* foi variada entre 25  $\mu\text{g/mL}$  e 0,1  $\mu\text{g/mL}$  enquanto a de *CbGH5* foi variada entre 1  $\mu\text{g/mL}$  e 0,015  $\mu\text{g/mL}$ . A região linear de atividade para ambas mananases foi determinada e a concentração enzimática a ser utilizada nos próximos experimentos foi definida como 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para a *HcGH5* e 0,1  $\mu\text{g/mL}$  para a *CbGH5*.

O ensaio para a determinação dos tempos de reação a serem utilizados nos experimentos foi conduzido nas mesmas condições do teste de concentração com as concentrações determinadas. Foram realizadas 12 reações, para cada enzima, com tempos distintos (1 a 20 minutos), e a atividade enzimática foi medida para cada tempo determinado. A região linear de atividade para ambas mananases foi determinada e o tempo de reação a ser utilizada nos próximos experimentos foi definida como 5 minutos para ambas.

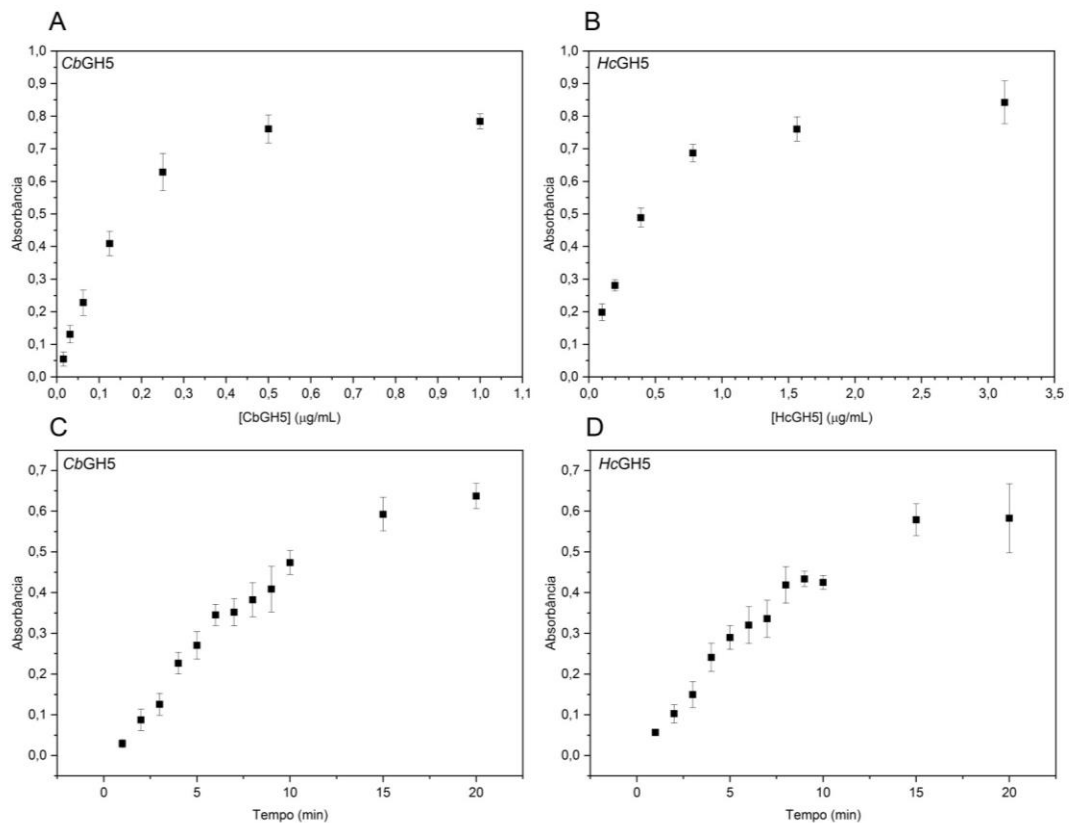


Figura 9 – Resultados dos ensaios de concentrações enzimáticas e tempos de reação. (A) Ensaio de concentração enzimática da *CbGH5*. (B) Ensaio de concentração enzimática *HcGH5*. (C) Ensaio de tempo da enzima *CbGH5*. (D) Ensaio de tempo da enzima *HcGH5*.

#### 4.3.3 Perfis de pH e temperatura

O pH ideal para a *HcGH5* foi identificado ao incubar a enzima em tampão acetato/borato/fosfato (ABF) na faixa de pH de 2,0 a 10,0 a 50 °C, enquanto a *CbGH5* foi avaliada em tampão McIlvaine com pH variando de 2,2 a 8,0 a 80 °C. A temperatura ótima foi determinada incubando as enzimas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, com variação de temperatura de 30 °C a 100 °C.

Quanto ao pH ótimo, ambas as mananases apresentaram maior atividade em pH 7,0, evidenciando um perfil neutro (Figura 10A e B). A *HcGH5* mostrou uma temperatura ótima em torno de 50 °C, mantendo pelo menos 80% de sua atividade na faixa de 45 a 55 °C (Figura 10D), enquanto a *CbGH5* atingiu sua temperatura ótima a 90 °C (Figura 10C).

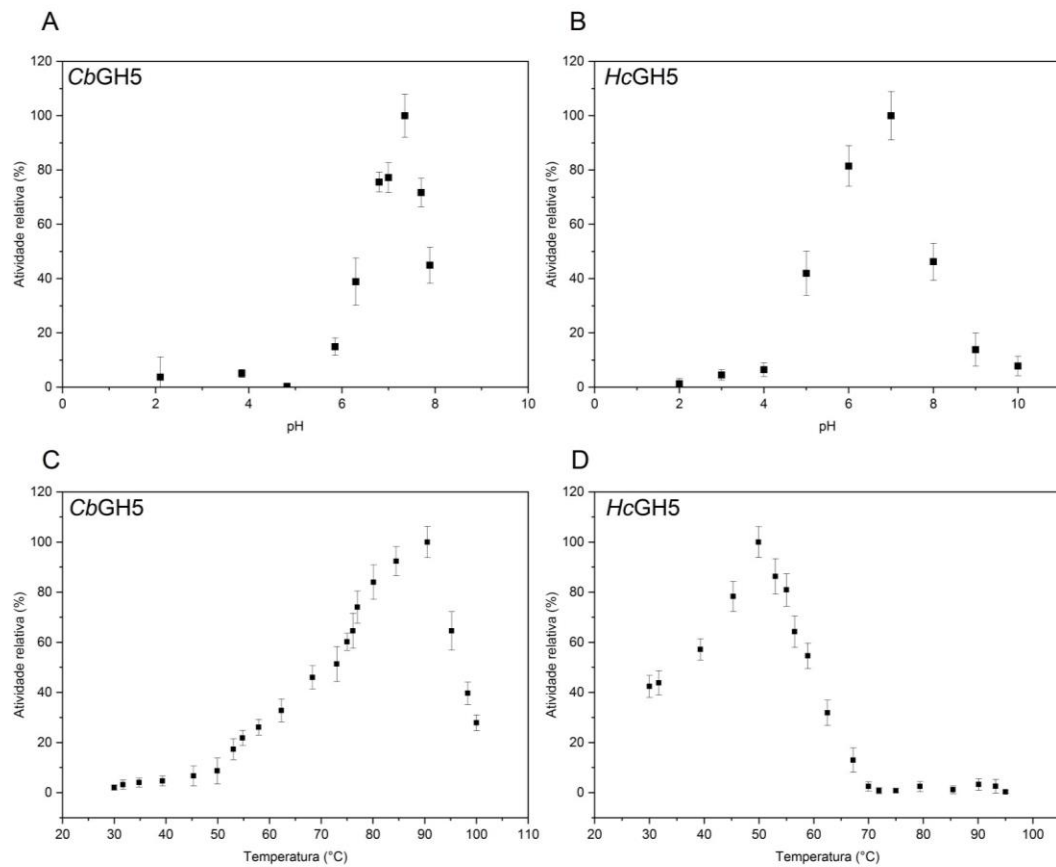


Figura 10 – Resultados dos ensaios de determinação das condições ótimas. (A) O teste de pH de *CbGH5* demonstrou que o pH ótimo da enzima é cerca de 7,0. (B) O teste de pH de *HcGH5* demonstrou que o pH ótimo da enzima também é cerca de 7,0. (C) O ensaio de temperatura da *CbGH5* demonstrou que a enzima tem atividade máxima a 90 °C. (D) O teste de temperatura da *HcGH5* demonstrou a enzima tem temperatura ótima em cerca de 50 °C.

#### 4.3.4 Atividade residual

A estabilidade térmica foi avaliada em função do tempo pré-incubando as enzimas em diferentes condições de temperatura. Alíquotas foram removidas após determinados tempos e a atividade da enzima foi medida usando o ensaio de DNS.

A 50 °C a atividade enzimática de *HcGH5* caiu para menos de 60 %, após 30 minutos e para menos de 20 % de seu valor inicial após 2 h (figura 11A). A 90 °C *CbGH5* perdeu quase toda sua atividade após 20 minutos de incubação, dessa forma um novo ensaio foi realizado a 75 °C para essa enzima. Com 1h30min de incubação a 75 °C, a atividade da

enzima diminuiu para cerca de 50 %, e após 5 h de incubação a enzima apresentou 20 % de atividade (figura 11B).

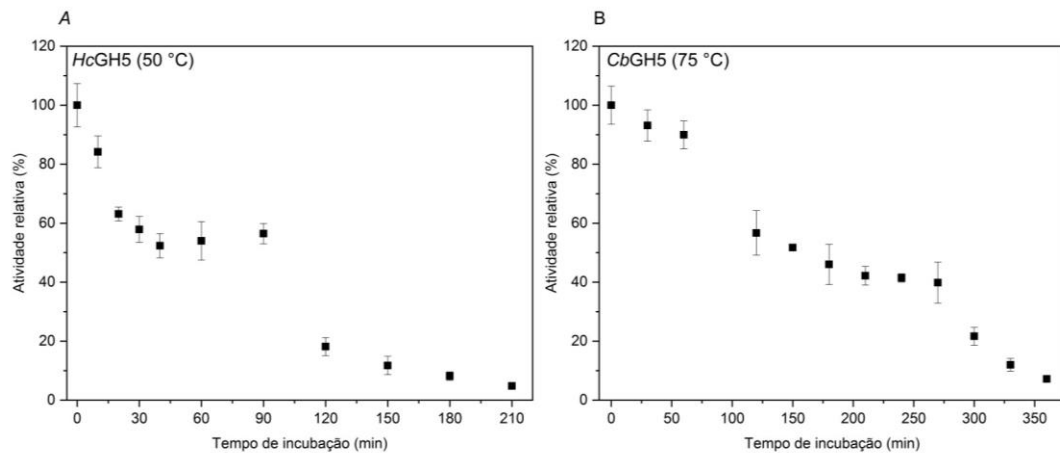


Figura 11 – Resultados do ensaio de atividade residual. (A) O ensaio mostrou que a enzima *HcGH5* perde quase toda sua atividade após 3h incubada em temperatura ótima. (B) O teste de estabilidade térmica com *CbGH5* mostrou que a enzima perde quase toda a sua atividade após 5h da incubação a 75 °C

#### 4.3.5 Cinética enzimática

Para *HcGH5* os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando konjac glucomanano como substrato. A concentração deste substrato foi variada de 0,48 a 5 g/L sob condições ideais. Em termos de parâmetros cinéticos, a enzima apresenta  $K_M = 2,83$  mg/mL,  $K_{cat} = 1365,59$  s<sup>-1</sup> e eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) de 482,54 mL.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>.

Para *CbGH5* os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando carob galactomanano como substrato. A concentração deste substrato foi variada de 1 a 16 mg/mL sob condições ideais. Em termos de parâmetros cinéticos, a enzima apresenta  $K_M = 11,29$  mg/mL,  $K_{cat} = 3591,84$  s<sup>-1</sup> e eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) de 318,14 mL.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. Na tabela 1 os parâmetros cinéticos das enzimas são comparados com de outras mananases previamente caracterizadas do organismos *Cellvibrio japonicus* (Man5B, (HOGG et al., 2003)) *Bacillus agaradhaerens* (BaMan5A, (TAILFORD et al., 2009)).

A análise dos dados e o ajuste de Michaelis-Menten foram realizados com o software OriginLab, versão 2018.

Enzima	Substrato	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mg/mL)	$K_{cat}/K_M$ (mL.s <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	$V_{m\acute{a}x}$ (mM/s)
CbGH5	Carob	3591.84 ±	11.29 ± 1.0	318.14 ± 28.18	1.12 x 10 <sup>-1</sup> ± 6.04 x
	galactomanano	193.86			10 <sup>-4</sup>
HcGH5	Konjac	1365.59 ±	2.83 ± 0.49	482.54 ± 83.55	8.44 x 10 <sup>-3</sup> ± 5.95 x
	glucomanano	96.22			10 <sup>-4</sup>
Man5B	Konjac	951 ± 32	1.4 ± 0.12	750	N. A
	glucomanano				
BaMan5A	Glucomanano	750	2,6	433	N. A

Tabela 1 – Atividade catalítica das mananases agindo sob polissacarídeos

Os resultados obtidos revelam que as enzimas *HcGH5* e *CbGH5* demonstraram uma notável eficiência catalítica em comparação com as mananases previamente caracterizadas de outros organismos. Em relação aos parâmetros cinéticos  $K_M$ ,  $K_{cat}$  e eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ), as enzimas estudadas exibiram valores favoráveis, indicando sua alta capacidade de catalisar as reações com os respectivos substratos, konjac glucomanano e carob galactomanano. Essa eficiência reforça o potencial das enzimas *HcGH5* e *CbGH5* para aplicações biotecnológicas e industriais que requerem degradação eficaz de polissacarídeos.

#### 4.3.6 Padrão de clivagem

Para analisar o padrão de clivagem, as enzimas foram submetidas a reações com diferentes substratos. As reações da *HcGH5* ocorreram a 50 °C por 30 min, enquanto as da *CbGH5* foram realizadas a 75 °C em três tempos distintos (5, 30 e 60 min). Os produtos da reação foram analisados por HPAEC-PAD, identificando padrões de clivagem.

Em relação a *CbGH5*, a clivagem de mananoligossacarídeos resulta principalmente na formação de M2 e M3 a partir de M5. A enzima não exibiu atividade contra M3 e M4, indicando que é necessária a ocupação de, pelo menos, cinco sítios para a ocorrência da hidrólise (imagem 12B). Para polissacarídeos de manano, é possível observar a formação de manose além de M2, M3 e M4 a partir de *Ivory Nut*. A enzima apresentou formação de manooligossacarídeos com graus de polimerização de 2 a 5 frente ao Konjac glucomanano. Já atuando em Carob galactomanano, os produtos foram manose, M2, M3 e M4 (imagem 12A).

A enzima *HcGH5* apresentou formação de manooligossacarídeos com graus de polimerização de 2 a 5 frente ao Konjac glucomanano e Carob galactomanano. A enzima teve uma considerável produção de MOS agindo em manano linear, tendo como principais

produtos M4, M3, M2 e manose. Tal resultado pode indicar uma preferência dos sítios por substratos não ramificados (imagem 12C). Assim como a *CbGH5*, a *HcGH5* não exibiu atividade contra M3 e M4 e, ao agir em M5, foi capaz de produzir M2 e M3 como produtos principais, além de uma quantidade residual de M1 e M4 (imagem 12D).

Produtos não identificados estão presentes no perfil hidrólise de polissacarídeos de ambas mananases. Provavelmente, esses correspondem a oligossacarídeos ramificados no caso de galactomanano e manano linear, que apresentam uma razão manose para galactose de 100:22 e 97:3, respectivamente. Para o glucomanano, tais produtos podem compreender glucomanooligossacarídeos.

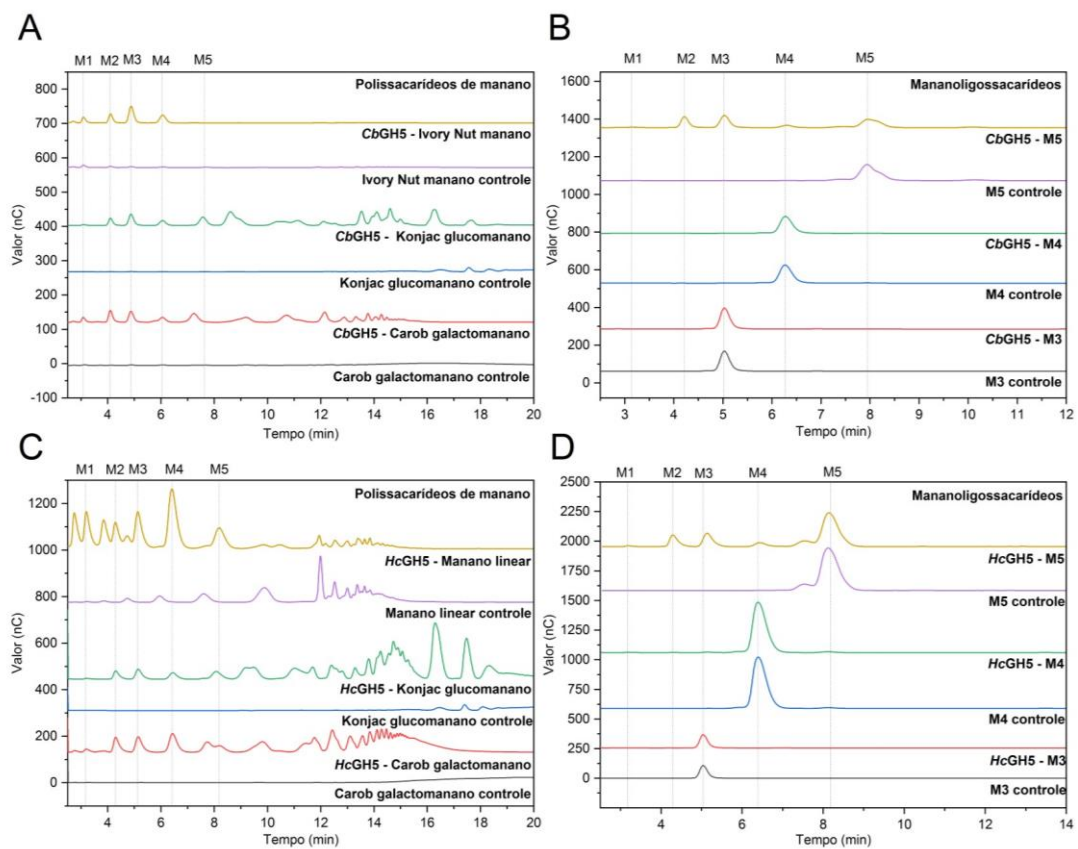


Figura 12 – Resultado do perfil de produto das mananases. (A) Perfil HPAEC-PAD de hidrólise de polissacarídeos de manano pela enzima *CbGH5*.(B) Perfil HPAEC-PAD de hidrólise de mananoligossacarídeos pela enzima *CbGH5*. (C) Perfil HPAEC-PAD de hidrólise de polissacarídeos de manano pela enzima *HcGH5*.(D) Perfil HPAEC-PAD de hidrólise de mananoligossacarídeos pela enzima *HcGH5*.



#### 4.4 Análises *in silico*

##### 4.4.1 Análise filogenética

Para análise filogenética uma árvore de vizinhança foi elaborada usando o software MEGA11, com sequências de enzimas obtidas no banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org>).

A análise da sequência de *HcGH5* mostrou que, além do domínio catalítico, há um segundo domínio conservado na região C-terminal chamado *dockerin*. Isso geralmente está relacionado a outro domínio proteico chamado domínio coesina, que atua como uma proteína estrutural para reunir as subunidades individuais do celulosoma em bactérias anaeróbicas. Para a análise filogenética, considerou-se apenas o domínio catalítico.

A árvore filogenética correlacionando as subfamílias GH5 pode ser encontrada nas figuras 13A e 14A e claramente mostra que as sequências de *HcGH5* e *CbGH5* estão mais intimamente relacionadas a membros da subfamília GH5\_8, indicando que nossas enzimas pertencem a essa subfamília. Entre os membros da GH5\_8 com estrutura cristalográfica determinada, a sequência de *HcGH5* está evolutivamente mais próxima daquelas do gênero *Bacillus* (figura 13B), enquanto que a *CbGH5* está mais próxima evolutivamente daquelas do gênero *Streptomyces* (figura 14B).

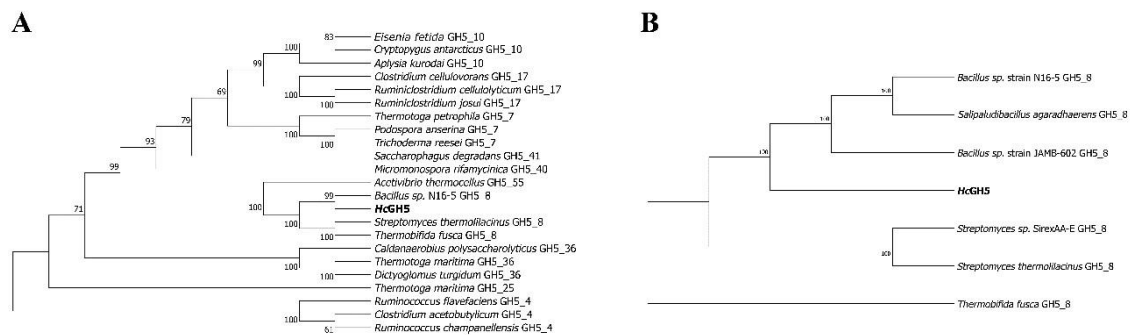


Figura 13 – *Neighbor-joining trees* mostrando a relação filogenética entre a sequência de *HcGH5* e (A) sequências GH5 pertencentes a várias subfamílias que contêm endo- $\beta$ -mananases e (B) sequências GH5\_8.

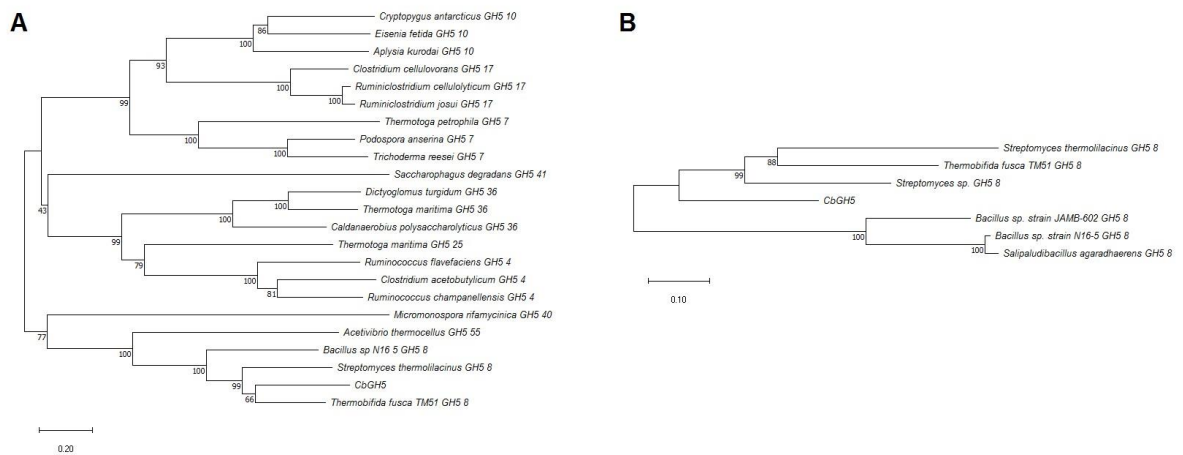


Figura 14 – *Neighbor-joining trees* mostrando a relação filogenética entre a sequência de *CbGH5* e (A) sequências GH5 pertencentes a várias subfamílias que contêm endo- $\beta$ -mananases e (B) sequências GH5 \_8.

#### 4.4.2 Análise estrutural das enzimas

Modelos estruturais tridimensionais das proteínas foram gerados com base na sequência de aminoácidos de *HcGH5* e *CbGH5* usando o sistema de predição de conformação de proteínas baseado em *Deep Learning AlphaFold* (DeepMind, Londres, Reino Unido), por meio do ColabFold.

Consistente com suas localizações na família GH5 \_8, as enzimas exibiram uma estrutura canônica de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> (figura 15) (TAILFORD et al., 2009; TAKASUKA et al., 2014; KUMAGAI et al., 2012; HILGE et al., 1998). O barril canônico ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> é composto por oito componentes, cada um compreendendo uma fita  $\beta$  e uma hélice  $\alpha$  que são unidas por um laço  $\beta\alpha$ . Conectando essas unidades individuais estão laços  $\alpha\beta$ . As oito fitas  $\beta$  formam coletivamente uma folha  $\beta$  paralela central suavemente curvada, formando a forma de barril, circundada pelas hélices  $\alpha$ .

Para compreender o reconhecimento do substrato e o padrão de clivagem da enzima *HcGH5*, a estrutura predita foi sobreposta às estruturas disponíveis no PDB que continham um modelo cristalográfico (*BaMan5A* - PDB: 2WHJ (TAILFORD et al., 2009); *StMandC* - PDB: 4Y7E (KUMAGAI et al., 2015)). O software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8, Schrödinger, LLC, Nova York, NY, EUA) foi usado para comparações estruturais e preparação de figuras para análises estruturais.

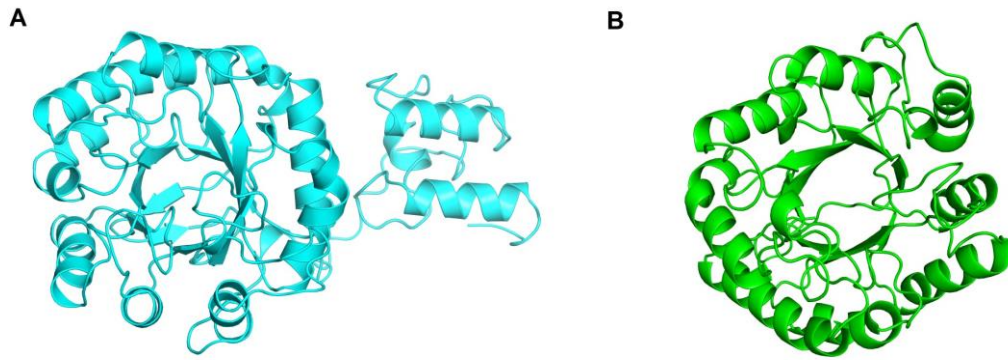


Figura 15 – Estrutura tridimensionais da HcGH5 e CbGH5 (A) Estrutura tridimensional em *cartoon* da enzima HcGH5 mostrando o arranjo em barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. (B) Estrutura tridimensional em *cartoon* da enzima CbGH5 mostrando o arranjo em barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>.

O doador de prótons (Glu 125) em HcGH5 está localizado no C-terminus da  $\beta$ 4 e o nucleófilo (Glu 220) está localizado no C-terminal da  $\beta$ 7. Outros nove aminoácidos (Trp29, Trp59, His86, Asn124, Trp162, Gln164, Tyr192, Trp249 e Asn254), localizados no sítio ativo, são altamente conservados nas três mananases da família 5–8 (figura 17A).

A análise dos subsítios negativos do sítio ativo de HcGH5 torna claro que os possíveis produtos hidrolíticos são M2 e M3, que ocupam os subsítios +1, +2, -1, -2 e -3, respectivamente. Os MOS mais longos se projetam da fenda do sítio ativo para o solvente. Os grupos O6 da manose foram encontrados impedidos nos subsítios +3, +1 e -2, dificultando a tolerância a decorações nessas regiões (figura 16A), o que pode explicar uma maior afinidade por glucomanos, que têm uma cadeia linear. Para compreender o reconhecimento do substrato e o padrão de clivagem da enzima CbGH5, a estrutura predita também foi sobreposta às estruturas disponíveis no PDB que continham um modelo cristalográfico (*T. fusca*  $\beta$ -mannanase - PDB: 1BQC (HILGE et al., 1998); *StManC* - PDB: 4Y7E (KUMAGAI et al., 2015)). Utilizou-se o software PyMOL para realizar comparações estruturais e preparar figuras destinadas às análises estruturais.

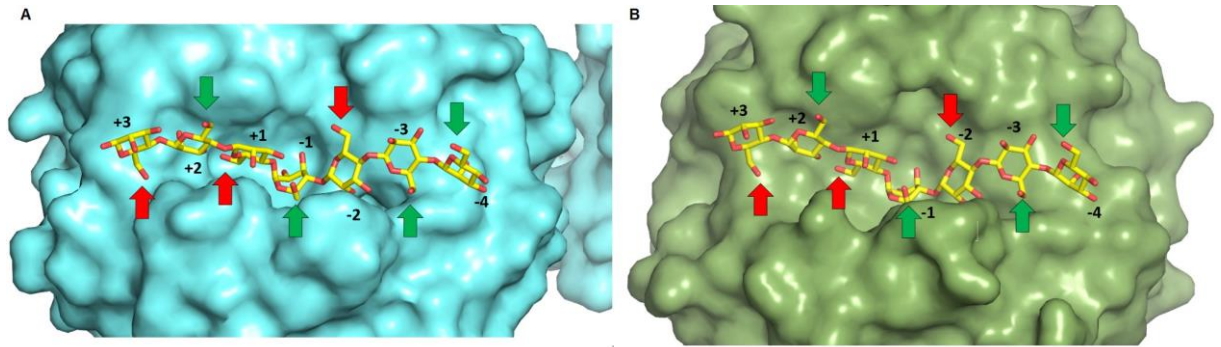


Figura 16 – Manohexose nos Sítios Ativos de HcGH5 e CbGH5 (A) Manohexose (amarelo) no sítio ativo da *HcGH5*, as setas em vermelho indicas os O6s impedidos, enquanto que as setas em verde indicam os O6s livres, em ciano está representado a superfície da enzima (B) Manohexose (amarelo) no sítio ativo da *CbGH5*, as setas em vermelho indicam os O6s impedidos, enquanto que as setas em verde indicam os O6s livres, em verde está representado a superfície da enzima.

Na *CbGH5*, o doador de prótons (Glu 124) está localizado no C-terminus da  $\beta 4$ , e o nucleófilo (Glu 219) encontra-se no C-terminal da  $\beta 7$ , assim como ocorre na *HcGH5*. Outros 10 aminoácidos (Trp24, Try25, Trp54, His82, Asn123, Trp161, Gln163, Trp248, Gly252 e Asn253), todos situados no sítio ativo, se mostraram altamente conservados nas três mananases da família 5–8 (figura 17B).

Uma análise dos subsítios, leva a crer que os possíveis produtos hidrolíticos são M2 e M3, ocupando os subsítios +1, +2, -1, -2 e -3, respectivamente, assim como ocorre na *HcGH5*. Os MOS mais longos se estendem da fenda do sítio ativo em direção ao solvente. Os grupos O6 das manohexoses encontram-se impedidos nos subsítios +3, +1 e -2, dificultando a tolerância a modificações nessas regiões (figura 16B). Esse fato pode explicar uma maior afinidade por glucomananos, os quais possuem uma cadeia linear

Os resultados obtidos sobre o método de ligação e identificação de substratos das enzimas *HcGH5* e *CbGH5* fornecem informações importantes sobre as preferências de substrato da enzima e os produtos gerados. As notáveis similaridades catalíticas observadas entre as enzimas sugerem fortemente que elas estão filogeneticamente próximas, o

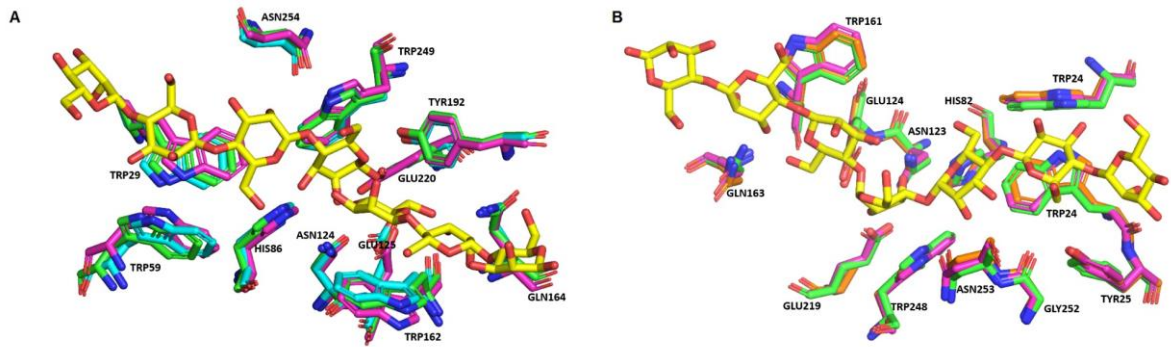


Figura 17 – Aminoácidos conservados no sítio ativo das enzimas (A) Em ciano está indicado os resíduos da *HcGH5*, em verde os resíduos da estrutura 4Y7E, em rosa os resíduos da estruturas 2WHJ e em amarelo está indicado o substrato mannoheptose (B) Em verde está indicado os resíduos da *CbGH5*, em laranja os resíduos da estrutura 4Y7E, em rosa os resíduos da estruturas 1BQC e em amarelo está indicado o substrato mannoheptose.

que reforça a hipótese de que ambas pertencem à mesma subfamília GH5<sub>8</sub>. Essa proximidade filogenética sugere que essas enzimas compartilham características estruturais e funcionais essenciais. Ademais, as análises detalhadas dos subsítios catalíticos negativos das enzimas proporcionam uma visão coerente com o perfil de produtos observado para as enzimas. A correlação entre a estrutura dos subsítios catalíticos negativos e a natureza dos produtos resultantes reforça a ideia de que essas regiões ativas são cruciais na determinação das preferências de substrato e no direcionamento das reações catalisadas pelas enzimas. Portanto, essas análises não apenas contribuem para a compreensão das propriedades catalíticas das enzimas *HcGH5* e *CbGH5*, mas também fornecem *insights* valiosos para aplicações futuras. Essas descobertas podem ser aplicadas no desenvolvimento de métodos de otimização da hidrólise de biomassa, proporcionando avanços na produção de manooligossacarídeos

#### 4.5 Hidrólise da borra de café

Para avaliar a produção de MOS a partir do SCG pré-tratado, foram preparadas reações utilizando borra de café pré-tratado hidrotermicamente em diferentes condições como substrato e a enzima *HcGH5*. As reações foram realizadas a 40 °C por 2 horas. A formação dos produtos foi analisada com HPAEC. A manose não pôde ser quantificada devido à sobreposição na leitura cromatográfica com outros componentes da reação

Primeiramente, utilizando SCG pré-tratado a 140 °C como substrato, observamos que o rendimento de MOS aumentou com o tempo de pré-tratamento. Além disso, o perfil do

hidrolisado apresentou oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 4, sendo a manotriose o produto mais abundante e a manopentaose observada apenas na amostra de 140 °C/150' (figura 18).

Para o SCG pré-tratado a 160 °C, observamos que os rendimentos de MOS aumentaram com o tempo de pré-tratamento até 60 minutos, que correspondia ao nível mais alto de MOS. Após esse ponto, a formação de MOS diminuiu à medida que o tempo de pré-tratamento aumentou. O perfil do hidrolisado consistia principalmente de MOS com grau de polimerização entre 2 e 4, sendo a manobiose e a manotriose os mais abundantes (figura 18). Em contraste, o SCG pré-tratado a 180 °C apresentou uma diminuição significativa na produção de MOS com o aumento do tempo de pré-tratamento durante a hidrólise por HcGH5. Consistente com os outros resultados, o perfil do produto consistia principalmente de MOS com grau de polimerização entre 2 e 4, sendo a manotriose a mais abundante (figura 18).

A abordagem que combina a temperatura mais baixa (140°C) com o tempo de pré-tratamento mais longo (150 minutos) e a alternativa de maior temperatura (180°C) com o período mais curto (30 minutos) se mostraram as condições mais promissoras para alcançar maiores produções de MOS, sendo que a condição com temperatura mais baixa resulta não apenas em rendimentos aprimorados, mas também em uma diversidade maior de produtos, incluindo a produção de M5. Portanto, a produção de MOS por hidrólise de SCG tratada sob a condição de temperatura mais baixa poderia oferecer novas oportunidades para a exploração de suas características benéficas e aplicações potenciais, uma vez que a otimização das condições de pré-tratamento pode levar a rendimentos aprimorados de MOS e perfis de produto desejados.

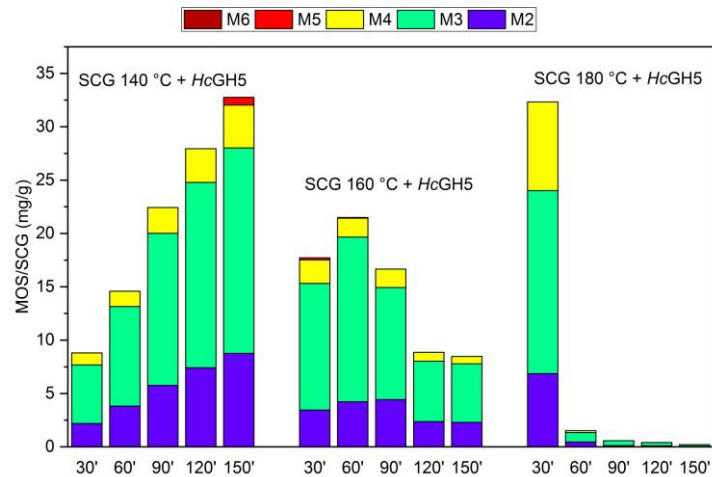


Figura 18 – Avaliação da produção enzimática de manooligossacarídeos a partir de borra de café pré-tratada.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo a produção heteróloga e caracterização bioquímica e estrutural de duas mananases da família GH5, denominadas *HcGH5* e *CbGH5*, oriundas dos organismos *Hungateiclostridium cellulolyticum* e *Caldicellulosiruptor bescii*, respectivamente, bem como suas aplicações visando a obtenção de manose e mananoligossacarídeo a partir de borra de café.

O projeto obteve sucesso nas propostas de caracterização bioquímica e estrutural das enzimas *HcGH5* e *CbGH5*. Por meio de técnicas bioquímicas, moleculares e de predição de estruturas pudemos elucidar detalhes importantes sobre a estrutura e a função dessas duas mananases. Os resultados obtidos contribuem significativamente para o entendimento das propriedades catalíticas dessas enzimas e suas potenciais aplicações biotecnológicas.

Além disso, obtivemos êxito na aplicação da enzima *HcGH5* na hidrólise da borra de café, resultando na obtenção de manooligossacarídeos (MOS). Essa descoberta é de grande relevância, uma vez que a borra de café é uma fonte abundante de resíduos com potencial valor agregado. A produção de MOS a partir desse substrato pode ter aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de bioenergia, entre outras.

Estamos atualmente em fase de escrita de dois artigos científicos, sendo um deles focado na caracterização bioquímica e estrutural da mananase *HcGH5* bem como sua aplicação na hidrólise de borra de café para a obtenção de MOS, e o outro focado na caracterização

bioquímica e estrutural da mananase *CbGH5*. Pretendemos submetê-los em breve a periódicos de alto impacto, contribuindo assim para o avanço da pesquisa na área de enzimas.

Muito conhecimento foi adquirido e construído ao longo do projeto, especialmente sobre ensaios enzimáticos e técnicas de caracterização. Ademais, este projeto me ajudou a construir uma base sólida de conhecimento e experiência em bioquímica e biologia molecular. Dessa forma, considero o projeto bem-sucedido

A partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho, sugere-se as seguintes análises para trabalhos futuros:

- Aprofundamento na Aplicação da *CbGH5* em Biomassas Ricas em Manano
- Estudo da Estabilidade e Atividade Enzimática em Condições Industriais
- Investigação da Viabilidade Econômica do Processo
- Exploração de Outros Resíduos como Substratos Potenciais
- Análise dos Produtos Obtidos



## REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.
- ARGYROPOULOS, D. S.; MENACHEM, S. B. *Lignin*. [S.l.]: Springer, 1997.
- ASANO, I. et al. Effects of mannoooligosaccharides from coffee mannan on fecal microflora and defecation in healthy volunteers. *Food science and technology research*, Japanese Society for Food Science and Technology, v. 10, n. 1, p. 93–97, 2004.
- BAURHOO, B. et al. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and escherichia coli populations after in vivo escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science*, Elsevier, v. 86, n. 12, p. 2509–2516, 2007.
- CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using ligation-independent cloning (lic). *Protein expression and purification*, Elsevier, v. 99, p. 35–42, 2014.
- CHACHER, M. et al. Use of mannan oligosaccharide in broiler diets: an overview of underlying mechanisms. *World's Poultry Science Journal*, Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association, v. 73, n. 4, p. 831–844, 2017.
- CHAUHAN, P. S. et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, Springer, v. 93, p. 1817–1830, 2012.
- DAUD, M.; JARVIS, M. Mannan of oil palm kernel. *Phytochemistry*, Elsevier, v. 31, n. 2, p. 463–464, 1992.
- ETHIER, N.; TALBOT, G.; SYGUSCH, J. Gene cloning, dna sequencing, and expression of thermostable  $\beta$ -mannanase from bacillus stearothermophilus. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 64, n. 11, p. 4428–4432, 1998.
- FALKEHAG, S. I. Lignin in materials. In: *Applied Polymer Symposium*. [S.l.: s.n.], 1975. v. 28, p. 247–257.
- FREIESLEBEN, P. V. et al. Boosting of enzymatic softwood saccharification by fungal gh5 and gh26 endomannanases. *Biotechnology for biofuels*, Springer, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

- GARDNER, K.; BLACKWELL, J. The structure of native cellulose. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, Wiley Online Library, v. 13, n. 10, p. 1975–2001, 1974.
- HEINZE, T. Cellulose: structure and properties. *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials*, Springer, p. 1–52, 2016.
- HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, Elsevier, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.
- HILGE, M. et al. High-resolution native and complex structures of thermostable  $\beta$ -mannanase from thermomonospora fusca–substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure*, Elsevier, v. 6, n. 11, p. 1433–1444, 1998.
- HLALUKANA, N. et al. Enzymatic conversion of mannan-rich plant waste biomass into prebiotic manooligosaccharides. *Foods*, MDPI, v. 10, n. 9, p. 2010, 2021.
- HOGG, D. et al. The modular architecture of cellvibrio japonicus mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd., v. 371, n. 3, p. 1027–1043, 2003.
- JANA, U. K. et al. Prebiotic manooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 342, p. 128328, 2021.
- JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- KANG, S. et al. Hydrothermal conversion of lignin: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 27, p. 546–558, 2013.
- KUMAGAI, Y. et al. The structural analysis and the role of calcium binding site for thermal stability in mannanase. *Biochimie*, Elsevier, v. 94, n. 12, p. 2783–2790, 2012.
- KUMAGAI, Y. et al. The loop structure of actinomycete glycoside hydrolase family 5 mannanases governs substrate recognition. *The FEBS Journal*, Wiley Online Library, v. 282, n. 20, p. 4001–4014, 2015.
- LARSSON, A. M. et al. Three-dimensional crystal structure and enzymic characterization of  $\beta$ -mannanase man5a from blue mussel mytilus edulis. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 357, n. 5, p. 1500–1510, 2006.

LO, M.-C. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical biochemistry*, Elsevier, v. 332, n. 1, p. 153–159, 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MALGAS, S.; DYK, J. S. van; PLETSCHE, B. I. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase. *World journal of microbiology and biotechnology*, Springer, v. 31, n. 8, p. 1167–1175, 2015.

MERYANDINI, A. et al. Enzymatic hydrolysis of copra meal by mannanase from streptomyces sp. bf3. 1 for the production of mannoooligosaccharides. *HAYATI Journal of Biosciences*, Elsevier, v. 22, n. 2, p. 79–86, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIRDITA, M. et al. Colabfold: making protein folding accessible to all. *Nature methods*, Nature Publishing Group US New York, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.

MOREIRA, L. et al. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, Springer, v. 79, n. 2, p. 165–178, 2008.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 179, p. 28–41, 2018.

NETO, F. S. P. P. et al. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of eucalyptus by-product. *Industrial Crops and Products*, Elsevier, v. 154, p. 112707, 2020.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. Hidro'lise enzima'tica de biomassa. *Qu'ımica nova*, SciELO Brasil, v. 33, p. 1549–1558, 2010.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (xos), arabinooligosaccharides (aos) and mannoooligosaccharides (mos) from lignocellulosic biomasses. *Bioresource Technology*, Elsevier, v. 112, p. 285–292, 2012.

PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of biomolecular screening*, Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, v. 6, n. 6, p. 429–440, 2001.

ROHRER, J. A practical guide for carbohydrate determinations by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (hpaec-pad). In: *Separation Science and Technology*. [S.l.]: Elsevier, 2021. v. 13, p. 233–257.

RUIZ, H. A. et al. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource technology*, Elsevier, v. 299, p. 122685, 2020.

SACHSLEHNER, A. et al. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of sclerotium rolfsii. *Journal of biotechnology*, Elsevier, v. 80, n. 2, p. 127–134, 2000.

SANTO, E. et al. *Otimiza, c~ao de estrat'egias de pr'e-tratamento de baga,co de canade-a, cu'car para produ, c~ao de etanol de segunda gera, c~ao via hidr'olise enzim'atica*. Tese (Doutorado) — Universidade de Sa~o Paulo, 2015.

SANTOS, C. R. dos et al. Molecular insights into substrate specificity and thermal stability of a bacterial gh5-cbm27 endo-1, 4- $\beta$ -d-mannanase. *Journal of Structural Biology*, Elsevier, v. 177, n. 2, p. 469–476, 2012.

SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Production, properties, and applications of endo- $\beta$ -mannanases. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 35, n. 1, p. 1–19, 2017.

TAILFORD, L. E. et al. Understanding how diverse  $\beta$ -mannanases recognize heterogeneous substrates. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 48, n. 29, p. 7009–7018, 2009.

TAKASUKA, T. E. et al. Biochemical properties and atomic resolution structure of a proteolytically processed  $\beta$ -mannanase from cellulolytic streptomyces sp. sirexaa-e. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 9, n. 4, p. e94166, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. Mega11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, Oxford University Press, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

VACILOTTO, M. M. et al. Paludibacter propionicigenes gh10 xylanase as a tool for enzymatic xylooligosaccharides production from heteroxylans. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, v. 275, p. 118684, 2022.

WITHERS, S. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 44, n. 4, p. 325–337, 2001.

WOOD, I. P. et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and bioenergy*, Elsevier, v. 44, p. 117–121, 2012.

YAMABHAI, M. et al. Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Critical reviews in biotechnology*, Taylor & Francis, v. 36, n. 1, p. 32–42, 2016.

YOGALAKSHMI, K. et al. Lignocellulosic biomass-based pyrolysis: A comprehensive review. *Chemosphere*, Elsevier, v. 286, p. 131824, 2022.

ZYL, W. H. V. et al. Fungal  $\beta$ -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 45, n. 8, p. 1203–1213, 2010.