UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAIO VINICIUS DOS REIS

Estudos Biofísicos e Estruturais de Xilose Isomerases
para Produção de Etanol de Segunda Geração

São Carlos
2012

CAIO VINICIUS DOS REIS

Estudos Biofísicos e Estruturais de Xilose Isomerases Para Produção
de Etanol de Segunda Geração

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Dr. Mario de Oliveira Neto

Versão Original

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dos Reis, Caio Vinicius
Estudos Biofísicos e Estruturais de Xilose
Isomerases para Produção de Etanol de Segunda Geração
/ Caio Vinicius dos Reis; orientador Mario de
Oliveira Neto -- São Carlos, 2012.
127 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Xilose isomerase. 2. Xanthomonas campestris.
3. Bifidobacterium adolescentis. 4. Lactobacillus
crispatus. 5. SAXS. I. de Oliveira Neto, Mario ,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caio Vinicius dos Reis

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 03/08/2012

Comissão Julgadora

Dr(a). Mario de Oliveira Neto

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Rosangela Itri

Instituição: IF/USP

Prof(a). Dr(a). Alessandro Silva Nascimento

Instituição: UFABC/Santo André

Ao Caio de ontem, que não acreditava que conseguiria. Em especial à minha família e amigos, que me fizeram acreditar. Com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável (INCANSÁVEL) apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. À Jeannie.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, pela vida da minha família, pelos amigos que tenho, pela fé que mantenho, pela nossa saúde, enfim, por TUDO.

Agradeço imensamente aos meus pais, Verinha e Preto, por serem tão especiais pra mim, por estarem presentes em cada milésimo de segundo da minha vida, por me fazerem entender a importância de uma família, sem a qual nunca chegaria onde cheguei. Agradeço cada abraço e cada sermão que me deram e por me aceitarem do jeito que sou. Agradeço terem me dado irmãos tão especiais, o Bruno e o Tiago.

A toda minha família, que tenho certeza que me põe nas orações de todos os dias.

Agradeço aos meus amigos queridos, dos quais tenho muito orgulho e estima. Abstenho-me em citar nomes, pois esses sabem o bem que me fizeram e, assim como eu, sabem o que passamos juntos e o quanto valem um para o outro. Ao Bruno, por ter estado sempre ao meu lado.

Aos novos amigos queridos e especiais que fiz durante o mestrado! Aos que me deram aquele auxílio todas as vezes que precisei (foram muitas).

Ao meu orientador Mario de Oliveira Neto, pela orientação e paciência. Ao Prof. Dr Igor Polikarpov, também pelo grande apoio.

Aos colegas de trabalho e companheiros de sala e bancada, com os quais aprendi muito e me diverti mais ainda. Ao que fizeram parte direta ou indiretamente do meu aprendizado acadêmico e científico.

Aos funcionários do serviço de pós-graduação, Silvio, Ricardo e Patrícia, pelo suporte. Às funcionárias da Biblioteca do Instituto de Física de São Carlos, Neusa e Cristina, pela grande ajuda.

À CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

Oração para obter a Sabedoria

Deus dos pais e Senhor misericordioso, que fizeste o universo por tua palavra e por tua Sabedoria formaste o homem, para que dominasse as criaturas por ti chamadas à existência, para que governasse o mundo com piedade e justiça e proferisse os julgamentos com retidão de alma, dá-me a Sabedoria que partilha o teu trono e não me excluas do número de teus filhos.

Vê, eu sou teu servo e filho de tua serva, homem fraco e de vida breve, desprovido para o entendimento do direito e das leis.

De resto, por mais que alguém fosse perfeito entre os filhos dos homens, sem a Sabedoria que vem de ti, seria contado como nada.

Foste tu que me preferiste para rei do teu povo, juiz de teus filhos e de tuas filhas.

Ordenaste-me construir um Templo em tua montanha santa e um altar, na cidade onde estabeleceste a tua morada, à imitação da tenda santa que tinhas preparado desde a origem.

Junto de ti está a Sabedoria que conhece tuas obras e que estava presente quando criavas o mundo. Ela sabe o que é agradável a teus olhos e o que é reto segundo teus mandamentos.

Fá-la descer dos santos céus, do trono de tua glória digna-te enviá-la para que se afadigue a meu lado e eu conheça o que te agrada.

E ela, que sabe e compreende tudo, guiar-me-á em minha conduta com medida e me protegerá por sua glória. Assim meus atos poderão ser-te agradáveis, julgarei teu povo com equidade e serei digno do trono de meu pai.

Livro de Sabedoria de Salomão, em homenagem à Minha mãe.

RESUMO

DOS REIS, C. V. **Estudos biofísicos e estruturais de xilose isomerases para produção de etanol de segunda geração**. 2012. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A demanda por combustíveis baseados em recursos renováveis é alta nos dias de hoje e tende a aumentar bastante no futuro. No Brasil, indústrias de biocombustíveis produzem principalmente etanol a partir cana-de-açúcar. A biomassa lignocelulósica, compreendendo resíduos de culturas, resíduos florestais, sólidos urbanos, é explorada como um elevado potencial secundário na produção de biocombustíveis, mesmo na categoria de subprodutos, eliminando assim os usos competitivos. Para tornar a produção de etanol de segunda geração a partir da cana-de-açúcar economicamente sustentável, é imprescindível utilizar fração hemicelulósica da biomassa, o que corresponde de 20% a 25%, sendo a xilose seu principal componente. *Saccharomyces cerevisiae* não fermenta xilose, entretanto, xilulose pode ser fermentada. Portanto a busca e o estudo de enzimas que procedem com a conversão de xilose em xilulose (em condições sinérgicas às da fermentação alcoólica) se torna de extrema importância no que se refere ao aproveitamento da hemicelulose para a geração de etanol de segunda-geração. Xilose isomerases (XI) de três microorganismos diferentes (de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [Xyl_X_{cc}], *Bifidobacterium adolescentis* [Xyl_B_{ad}] e de *Lactobacillus crispatus* [Xyl_L_{cr}]) são o objeto de estudo deste projeto. A partir do conteúdo genômico desses três microorganismos, foi realizada a amplificação do gene *xylA* (que codifica para XI), via Clonagem Independente de Ligação/Ligase (do inglês, LIC) e clonagem em vetor de expressão pPROEX HTa adaptado para LIC, e superexpressão em *Escherichia coli* BL21 (DE3). As XIs foram então extraídas e purificadas por cromatografia de afinidade com metal quelado, seguida de cromatografia de exclusão molecular. Nessa etapa, as massas moleculares e raios hidrodinâmicos (R_H) foram estimados, tanto por cromatografia de exclusão molecular quanto em gel nativo, revelando que Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} se apresentam diméricas enquanto Xyl_L_{cr} monomérica. Subseqüentemente, foram realizados testes de atividade em diferentes condições (pHs e temperaturas), para mapear condições ótimas de reação. A atividade ótima de ambas Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} foi ao redor do pH 5,5, com temperaturas ótimas girando em torno de 60°C. Xyl_L_{cr} se mostrou sem atividade. Além disso, o monitoramento da estabilidade térmica das XIs foi realizado através de espalhamento

de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e espectroscopia de dicroísmo circular (CD). As estabilidades térmicas da estrutura secundária e da estrutura terciária como um todo parecem aumentadas com a elevação do pH. Entretanto, isso não condiz com perfil de atividade dessas enzimas, visto que a atividade ótima se apresentou deslocada para valores de pHs ácidos. Modelos de baixa resolução obtidos por SAXS foram alinhados e sobrepostos às estruturas de alta resolução de proteínas homólogas, revelando um bom ajuste da forma tetramérica para Xyl_B_{ad} e Xyl_X_{cc} e monomérica para Xyl_L_{cr}. Portanto, levanta-se a hipótese da dissociação do tetrâmero em dímeros, possivelmente causado pela interação (mecânica) com o sistema de emaranhados do gel nativo e com os poros da coluna de exclusão molecular. Foram obtidos cristais de Xyl_B_{ad} e Xyl_X_{cc}, e esses foram submetidos à difração de raios-X, revelando a presença de um domínio conservado na maioria das XIs reportadas, formado por um barril α/β (N-terminal). As estruturas estão em fase avançada de refinamento. Ao final, são propostos estudos futuros que complementem os resultados apresentados, e que poderão comprovar as hipóteses criadas a partir deste trabalho.

Palavras-chave: Xilose isomerase. *Xanthomonas campestris*. *Bifidobacterium adolescentis*. *Lactobacillus crispatus*. SAXS. Cristalografia. Dicroísmo circular.

ABSTRACT

DOS REIS, C. V. **Structural and biophysical studies of xylose isomerases for production of second generation ethanol**. 2012. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The demand for fuels based on renewable resources is high these days and tends to increase considerably in the future. In Brazil, biofuels industries mainly produce ethanol from sugarcane. The lignocellulosic biomass, including crop residues, forest residues, urban solids, is explored as a secondary high potential for biofuels production, in the same category of products, thus eliminating the competing uses. To make the production of sugarcane second-generation ethanol economically sustainable, it is essential to use the hemicellulose fraction of the biomass, which corresponds from 20% to 25%, the main component represented by xylose. *Saccharomyces cerevisiae* doesn't ferment xylose, however, xylulose may be fermented. Therefore the research and study of enzymes that carry out the conversion of xylose to xylulose (in synergistic fermentation conditions) become very important with regard to the use of hemicellulose in second-generation ethanol production. Xylose isomerases (XI) from three different microorganisms (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [Xyl_X_{cc}], *Bifidobacterium adolescentis* [Xyl_B_{ad}] and *Lactobacillus crispatus* [Xyl_L_{cr}]) are the target of this project. From the genomic content of these three organisms, gene amplification of the *xylA* gene (encoding XI) was performed, via Ligand / Ligation Independent Cloning (LIC) and cloning in *LIC* adapted pPROEX HTA expression vector, with overexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The XIs were then extracted and purified by affinity metal quelate chromatography, followed by size exclusion chromatography. At that time, the molecular weight and hydrodynamic radius (R_H) were estimated both by size exclusion chromatography and native gel, suggesting that Xyl_X_{cc} and Xyl_B_{ad} were as dimers in solution, while Xyl_L_{cr} as monomer. Subsequently, activity assays were performed in different conditions (pH and temperature), to find out the optimum reaction conditions. The optimal activity of both Xyl_X_{cc} and Xyl_B_{ad} was around pH 5.5, with optimum temperatures hovering around 60 ° C. Xyl_L_{cr} showed no activity. Furthermore, monitoring the thermal stability of XIs was performed by small angle X-ray scattering (SAXS) and circular dichroism spectroscopy (CD). The thermal stabilities of the secondary structure and tertiary structure as a whole appear increased with increasing pH. However, this does not match with the activity profiles of these enzymes, since they showed optimal activity shifted to acidic pHs. SAXS

low-resolution models were aligned and superimposed on high resolution structures of homologous proteins, revealing a concordance of the tetrameric form of Xyl_X_{cc} and Xyl_B_{ad} in solution and monomeric form of Xyl_L_{cr}. Thus arises the possibility of dissociation of tetramer into dimers, possibly caused by interaction (mechanical) system with the tangles of native gel and pores of molecular exclusion column. Crystals were obtained from Xyl_B_{ad} and Xyl_X_{cc}, and these were subjected to X-ray diffraction to generate high resolution structures, revealing the presence of a conserved domain in the most reported XIs, consisting of a α/β barrel (N-terminus). The structures are in an advanced stage of refinement. Finally, future studies are proposed to complement the results presented, which may prove the hypotheses generated from this work.

Keywords: Xylose isomerase. *Xanthomonas campestris*. *Bifidobacterium adolescentis*. *Lactobacillus crispatus*. SAXS. Crystallography. Circular dichroism

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Representação esquemática da composição e arranjo da celulose e hemicelulose na parede celular de células vegetais (versão adaptada ⁴).....	26
Figura 2 - Trecho de molécula de xilano, homopolímero formado por ligações β - (1,4). Este polímero pode ser quebrado em suas unidades formadoras (moléculas de xilose) pela atuação de enzimas do grupo das xilanases (E.C. 3.2.1.8)	26
Figura 3 - Vias de utilização de xilose em fungos e bactérias.....	28
Figura 4 - Reação de isomerização realizada pela enzima xilose isomerase. (A) com substrato D-xilose e (B) com substrato D-glicose.	29
Figura 5 - <i>Lactobacillus crispatus</i> . (Fonte: http://jb.asm.org/content/194/10/2509/F1.large.jpg)	31
Figura 6 - Micrografia eletrônica de biofilme de <i>Xanthomonas campestris</i> em uma folha vegetal (Fonte: ASM Microbelibrary.org, Fett&Cooke).....	32
Figura 7 - <i>Bifidobacterium adolescentis</i> . Photo: Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre ⁴²	33
Figura 8 - Estrutura tetramérica de XI de <i>S. rubiginosus</i> (pdb id. 4XIS).....	34
Figura 9 - Diferentes mecanismos propostos para reação de isomerização da XI. Abstração de um próton de C-2 formando um intermediário cis-enediol e subsequente transferência deste próton para C-1, auxiliado por grupo ácido capaz de protonar O-1 ⁸² , (A); transferência de prótons, gerando intermediário aniônico, (B); deslocamento do hidreto de C-2 para C-1, também gerando um intermediário portador decarga formal positiva ⁸⁵ , (C).....	37
Figura 10 - Representação da condição de reação de amplificação dos genes <i>xyIA</i> de <i>X_{cc}</i> , <i>L_{cr}</i> e <i>B_{ad}</i> . Tanto a temperatura de desnaturação inicial quanto a cíclica são de 98°C; ΔT representa $T_1=64^\circ\text{C}$, $T_2=67,3^\circ\text{C}$ e $T_3=72,4^\circ\text{C}$, que são as temperaturas de anelamento, que estão relacionadas à seqüência dos oligonucleotídeos; e 72°C para a temperatura de extensão, tanto a cíclica quanto a final.	43
Figura 11 - Esquema para teste de atividade da enzima xilose isomerase (XI). A enzima é incubada por 2 horas com a solução tampão de reação, que além de conter o sistemas tampão do pH de teste propriamente dito, contém os cofatores necessários para haver atividade xilose isomerasica, CoCl_2 e MgSO_4 , ambos a 10 mM. O teste procede com a adição de D-xilose (5 mM, concentração de reação) e com controle de temperatura (30°C a 75°C, ensaio térmico para a atividade) por 30 minutos e posterior inativação da enzima (95°C por 5 minutos).....	50
Figura 12 - Método espectrofotométrico para quantificação de D-xilulose resultante da reação de isomerização da xilose isomerase com o substrato D-xilose (Método da cisteína-carbazol). Transfere-se para a placa de 96 poços (ELISA) 20 μL de amostra do teste de atividade. Adicionam-se 4,5 μL de solução aquosa 1,5% de Cloridrato de L-Cisteína monoidratado. Em seguida, 141 μL de 71% H_2SO_4 são transferidos aos poços. Imediatamente, adicionam-se 4,5 μL de solução 0,12% (em EtOH) de carbazol. A placa é deixada em repouso (temperatura ambiente, 25°C) por 1 hora. Decorrido este tempo, prossegue-se com a leitura da absorbância a 540 nm. Os dados são transferidos e analisados, de modo a ser gerada uma curva com o perfil de atividade da enzima; para isso, a absorbância a 540 nm dos controles sem enzima foram subtraídos dos dados referentes às amostras que continham enzima.	51
Figura 13 - (A) Luz linearmente polarizada pode ser vista como a superposição de componentes circularmente polarizadas para direita e para esquerda de iguais amplitudes. (B)	

- Diferenças na absorção de uma dessas componentes dão origem a elipticidade (CD) e rotação óptica (OR). Adaptado⁹⁶ 52
- Figura 14 - Espectro de CD no UV distante está associado a diversas estruturas secundárias. O espectro de hélice- α e folhas β são os mais comuns, mas podem ser encontrados muitos outros. Adaptado⁹⁸ 53
- Figura 15 - Perfil de Kratky exemplificando relação entre este perfil e os estados de enovelamento ou desenovelamento. (A) estado enovelado, (B) parcialmente desenovelado e (C) estado totalmente desenovelado. Observa-se que à medida que se vai diminuindo o grau de enovelamento, ocorre o deslocamento do pico parabólico e inclinação da linha de base para grandes valores de q , gerando uma região com perfil hiperbólico¹⁰⁸ 57
- Figura 16 - Resultado da amplificação do gene para a enzima xilose isomerase de *B. adolescentis* (A), *L. crispatus* (B) e *X. campestris* (C) em gel de agarose 0,8% TAE 1X. A esquerda encontra-se o marcador de massa molecular *Gene Ruler 1kb Ladder Plus* (Fermentas Life Sciences) 63
- Figura 17 - Resultado do PCR de colônia para validação da transformação e propagação dos vetores recombinantes pPROEX_Hta_LICxylA_X_{cc}, pPROEX_Hta_LICxylA_L_{cr} e pPROEX_Hta_LICxylA_B_{ad} contendo os genes de interesse amplificados: *xylA_X_{cc}* (A); *xylA_B_{ad}* (B); e *xylA_L_{cr}* (C). Gel de agarose 0,8 % TAE 1X. A esquerda encontra-se o marcador de massa molecular *Gene Ruler 1kb Ladder Plus* (Fermentas Life Sciences) 64
- Figura 18 - SDS-PAGE (15% poliacrilamida) com resultado da expressão de XI de *L. crispatus* (A), *X. campestris* (B) e *B. adolescentis* (C). M- marcador de massa molecular: albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (24 kDa) e citocromo C (13 kDa). A – frações pré-indução; P – frações pós-indução com IPTG 0,5 mM 65
- Figura 19 - SDS PAGE - Cromatografia de afinidade XI de *B. adolescentis* (A), *X. campestris* (B) e *L. crispatus* (C); M - Marcador de massa molecular; 1- amostra aplicada ou extrato bruto; 2- fração não ligada, *flow through*; 3- primeira lavagem, com mesmo tampão de equilíbrio da resina (50 mM HEPES pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 5 mM imidazol); 4- segunda lavagem, mesmo tampão do equilíbrio mas com 15 mM de imidazol; 5- primeira eluição em solução tampão do equilíbrio com 200 mM de imidazol; 6 - lavagem do restante das proteínas ligadas a resina, com solução 2 M de imidazol, Os diferentes quadros destacados na figura representam as bandas de xilose isomerase nas diferentes frações. 66
- Figura 20 - Resultado da cromatografia por exclusão molecular – Cromatograma e gel desnaturante. Purificação de XI de *B. adolescentis* (A), *X. campestris* (B) e *L. crispatus* (C). M representa o marcador de massa molecular. Os primeiros poços do gel desnaturante (1, 2 e 6) representam as frações injetadas na coluna de exclusão molecular, os poços 3, 5 e 7 representam as frações eluídas (com grau de pureza maior que 90%) e correspondem aos picos maiores nos seus respectivos cromatogramas. O poço 2 representa, em (A), um “ombro” no cromatograma, fração a qual ainda apresentava um contaminante de maior massa molecular. A coluna de exclusão molecular utilizada foi a *Superdex 75 HR 16/60* (GE), e o fluxo de tampão GF (50 mM HEPES pH 7,5 e 150mM de NaCl) foi de 0,5 mL por minuto com frações coletadas de acordo com cromatograma e resultados dos géis desnaturantes, no caso, as frações para estas purificações foram de 2 mL. As bandas da XI estão destacadas nos géis desnaturantes por retângulos. 65
- Figura 21 – (A) Curva de calibração para as massas moleculares em cromatografia de exclusão molecular *Superdex 75 HR 16/60* (GE). (B) Curva de calibração para os raios hidrodinâmicos na mesma coluna de exclusão molecular. 69
- Figura 22 - Eletroforese em gel nativo. MM: amostra com proteínas do padrão de massa molecular. 1: Xyl_X_{cc} com alta concentração (em torno de 10mg/mL). 2: Xyl_X_{cc} com de baixa concentração (1mg/mL). 3: Xyl_L_{cr} a 3mg/mL. 4: Xyl_B_{ad} com alta concentração (em torno

- de 5mg/mL). 5: Xyl_B_{ad} a 0,5mg/mL. O quadriculado vermelho indica a possível forma tetramérica da Xyl_X_{cc}. Os quadriculados em azul representam as bandas de XI nas possíveis formas diméricas (tanto da Xyl_X_{cc} quanto da Xyl_B_{ad}). Já o quadriculado verde destaca a forma monomérica da Xyl_L_{cr} 71
- Figura 23 - (A) Curva de calibração para as massas moleculares em gel nativo. (B) Curva de calibração para os raios hidrodinâmicos em gel nativo 72
- Figura 24 - Curva-padrão do teste da cisteína-carbazol. Cálculo da concentração de xilulose no volume de teste, segundo a metodologia descrita na seção 3.10. A curva relaciona absorbância a 540 nm com a concentração de xilulose. 73
- Figura 25 - Perfil de atividade da enzima xilose isomerase de *B. adolescentis* sobre o substrato D-xilose. (A) para diferentes valores de pH (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,0, de acordo com legenda na própria figura) em função da temperatura, variando-se de 30 °C a 75°C, verifica-se que a atividade ótima geral para esta enzima reside no pH 5,5 e para temperatura em torno de 55,15 °C e é de (16,3±0,8) U/mg de enzima pura. Os demais valores foram normalizados a partir desse valor ótimo, tomado como 100% de atividade; além disso, foram feitos ajustes polinomiais para as diversas curvas, com *fit polinomial* no programa ORIGIN 8.0(OriginLab) (B) Atividade relativa em função do pH, para uma temperatura fixa de 60,1 °C. 75
- Figura 26 - Perfil de atividade da enzima xilose isomerase de *X. campestris* sobre o substrato D-xilose. (A) Para diferentes valores de pH (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,0, de acordo com legenda na própria figura) em função da temperatura, variando-se de 30 °C a 75°C, verifica-se que a atividade ótima geral para esta enzima reside no pH 5,5 e para temperatura em torno de 60,1 °C e é de (7,5±0,7) U/mg de enzima pura; além disso, foram feitos ajustes polinomiais para as diversas curvas, com *fit polinomial* no programa ORIGIN 8.0(OriginLab). Os demais valores foram normalizados a partir desse valor ótimo, tomado como 100% de atividade. (B) Atividade relativa em função do pH, para uma temperatura fixa de 60,1 °C.....77
- Figura 27 - Ensaio térmico para desnaturação de xilose isomerase por CD. As soluções de enzimas que fizeram parte deste experimento pertenciam às frações purificadas a partir da cromatografia por exclusão molecular. As soluções empregadas neste caso eram todas tampões GF (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 5% de glicerol em pH 7,5). Todas as curvas foram geradas e suavizadas no programa ORIGIN. (A) Perfis de dicroísmo circular de XI de *B. adolescentis* em função do comprimento de onda para, ensaio térmico de 10°C a 90°C (sendo expostos convenientemente na figura apenas os perfis de temperaturas que descreveram mudança significativa comparado ao perfil de temperatura logo abaixo). (B) Perfis de dicroísmo circular de XI de *X. campestris* e de (C) *L. crispatus*. 79
- Figura 28 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *X. campestris* para os pHs 6,5 (A) e 8,5 (B). α representa fração de estrutura secundária, sendo “1” para 100% de estrutura secundária e proteína enovelada, e “0” para proteína sem estrutura secundária ou desenovelada. Para ambos os valores de pHs, foram gerados ajustes sigmoidais no programa ORIGIN, o que permitiu calcular o valor de T_m, temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. Os valores de T_m para a Xyl_X_{cc} nos pHs 6,5 e 8,5 são, respectivamente, (51,83±0,2) °C e (60,5±0,3) °C. A perda de estrutura secundária foi irreversível para os dois valores de pH, mais pronunciada no pH 6,5 comparado ao pH 8,5, que obteve um máximo de 20% de reversibilidade. Para (C) não foi computado o perfil de resfriamento.....80
- Figura 29 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *L. crispatus* para o pH 7,5 Para o valor de pH considerado foi feito um ajuste sigmoidal no programa ORIGIN 8.0(OriginLab), permitindo obter o valor de T_m, temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. O valor encontrado foi de (57 ± 1)°C. Não foi feito o monitoramento do resfriamento para este experimento. 81
- Figura 30 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *B. adolescentis* para os pHs 2,5 (A), 6,5 (B), 7,5 (C) e 8,5 (D). O α representa fração de estrutura secundária. Para todos os valores de pHs,

foram gerados ajustes sigmoidais no programa ORIGIN, o que permitiu calcular o valor de T_m , temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. Os valores de T_m para a Xyl_B_{ad} nos pHs 2,5, 6,5 e 8,5 são, respectivamente, (58,5±0,3) °C, (59,2±0,2) °C e (63,5±0,1) °C. Para o pH 7,5, o perfil da curva não permitiu se fazer o ajuste sigmoidal, pois, por limitações experimentais, não se conseguiu coletar dados para temperaturas maiores que 80 °C (o T_m em vermelho indicado em (C) é apenas representativo e indica que o ajuste sugere seu valor em torno de 114 °C, um valor puramente especulativo, pois não há dados coletados nesta região de interesse). A perda de estrutura secundária para um pH de 2,5 (A) é reversível. Para os demais valores de pH, a perda de estrutura secundária foi irreversível, salvo pH 7,5 que ainda recupera 50% da estrutura no limite de dados considerados..... 82

Figura 31 - Curvas de espalhamento para xilose isomerase de *B. adolescentis*. (A) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Dammin*¹⁰⁵ (linha azul) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). (B) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Gasbor*¹⁰⁴ (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). Em ambas as figuras, (A) e (B), encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 4) 84

Figura 32– Janela do programa SAXS *MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do *Gnom*, e seus resultados para estimacão da massa molecular da XI de *B. adolescentis*..... 85

Figura 33 – Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_B_{ad} (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha)..... 86

Figura 34 – Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína XI de *B. adolescentis* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (pdb 1A0D) no programa *SUPCOMB*¹⁰⁵. As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior de 90° em relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior direito de 90° em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página. 87

Figura 35 - Curvas de espalhamento para xilose isomerase de *X. campestris*. (A) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Dammin* (linha azul) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0C) (linha vermelha). (B) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Gasbor* (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). Em ambas as figuras, (A) e (B), encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier(Equação 4) 90

Figura 36 – Janela do programa SAXS *MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do *Gnom*, e seus resultados para a estimacão da massa molecular da xilose isomerase de *X. campestris* 91

Figura 37 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_X_{cc} (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 1A0C) (linha vermelha)..... 92

Figura 38 - Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína XI de *X. campestris* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (pdb 1A0C) no programa *SUPCOMB*¹⁰⁵. As diferentes imagens são geradas por rotação da anterioreem relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior direito de 90° em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página..... 93

Figura 39 - Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa <i>Gasbor</i> (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 3P6L) (linha vermelha). Encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 4)), cujo valor neste caso é de $(20,1 \pm 0,1)$ Å.....	95
Figura 40 - Janela do programa SAXS <i>MoW</i> mostrando as curvas de saída (.out) do <i>Gnom</i> , e seus resultados para a estimação da massa molecular da xilose isomerase de <i>L. crispatus</i>	96
Figura 41 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_L _{cr} (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 3P6L) (linha vermelha).	96
Figura 42 - Modelo <i>ab initio</i> para o envelope molecular da proteína XI de <i>L. crispatus</i> alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (pdb 3P6L) no programa <i>SUPCOMB</i> ¹⁰⁷ . As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior esquerdo de 90° em relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página	97
Figura 43 - Experimentos de desnaturação térmica por SAXS da xilose isomerase de <i>B. adolescentis</i> . (A) Em pH 7,5; e (B) em pH 6,5. O início da desnaturação em pH 7,5 está entre 60°C e 65°C, já em pH 6,5 está entre 55°C e 60°C. O abaixamento da “barriga” das curvas indica a perda de estrutura enovelada e o levantamento da linha de base na região de Porod (final da curva) representa o aumento da flexibilidade da molécula ¹⁰¹	101
Figura 44 - Perfil de Kratky para xilose isomerase de <i>B. adolescentis</i> em pH 2,5 em 20°C	102
Figura 45 - Experimentos de desnaturação térmica por SAXS para xilose isomerase de <i>X. campestris</i> . (A) Em pH 7,5; e (B) em pH 6,5. O início da desnaturação em pH 7,5 está entre 60°C e 65°C, já em pH 6,5 está entre 40°C e 50°C. O abaixamento da “barriga” das curvas indica a perda de estrutura enovelada e o levantamento da linha de base na região de Porod (final da curva) representa o aumento da flexibilidade da molécula ¹⁰¹	103
Figura 46 - Perfil de Kratky para xilose isomerase de <i>X. campestris</i> em pH 2,5 na temperatura de 20°C	104
Figura 47 - Padrão de difração para os cristais de XIs de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (A) e <i>Xanthomonas campestris</i> (B)	106
Figura 48 - Estrutura de alta resolução da proteína xilose isomerase de <i>B. adolescentis</i> . (A) monômero de Xyl_B _{ad} . (B) o conteúdo da unidade assimétrica. (C) a superposição entre o monômero da Xyl_B _{ad} (lilás) e o monômero da XI de maior homologia (pdb 1A0D), em azul claro. (D) tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica	109
Figura 49 - Estrutura de alta resolução da proteína xilose isomerase de <i>X. campestris</i> . (A) monômero de Xyl_X _{cc} . (B) o conteúdo da unidade assimétrica. (C) a superposição entre o monômero da Xyl_X _{cc} (rosa) e o monômero da XI de maior homologia (pdb 1A0C), em azul claro. (D) tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica	110
Figura 50 - Sobreposição das estruturas do monômero de alta resolução obtida por difração de raios-X das enzimas xilose isomerases de <i>B. adolescentis</i> (rosa) e <i>X. campestris</i> (vermelho).	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da fibra seca de cana-de-açúcar ⁶	27
Tabela 2 - Oligonucleotídeos criados para amplificação do gene <i>xylA</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> e <i>Lactobacillus crispatus</i> . A cor vermelha, representa caudas que ficarão livres (fita simples) nas extremidades 5' do gene (inserto) após a amplificação, convenientemente geradas para LIC. Regiões grifadas representam <i>start</i> e <i>stop</i> códons, de acordo com o <i>frame</i> correto de leitura (5'→3') na fita codificante.....	41
Tabela 3 - Quantidades utilizadas para amplificação dos genes de interesses a partir dos oligonucleotídeos da Tabela 2, gDNAs e reagentes especificados no manual da <i>Phusion High Fidelity DNA Polimerase</i> (Finnzymes, Expoo, Finland). X na tabela representa o volume de acordo com cada gDNA, cujos estoques estavam em concentrações diferentes, portanto, o protocolo requereria volumes diferentes, de modo que se completou com água o volume total da reação de 50 µL,.....	41
Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de construção de caudas LIC, a partir dos fragmentos amplificados(*) na PCR descrita anteriormente. A atividade exonucleásica da T4 DNA Polimerase combinada à presença de dATPs(e ausência dos demais nucleotídeos) no ambiente reacional, faz com que os nucleotídeos diferentes de dATPs sejam retirados do fragmento a partir da extremidades 3', transformando as extremidades 5' em fitas simples coesivas (<i>overhangs</i>). Essa desfragmentação é continua até a T4 deflagrar com o primeiro 3' dATP.	44
Tabela 5 - Esquema de componentes que fazem parte do teste de atividade da enzima Xilose Isomerase. O volume total de reação é de 100 µL. CoCl ₂ e MgSO ₄ são cofatores e os tampões são glicina, acetato de sódio, BIS-TRIS ou HEPES, dependendo do valor de pH no qual se quer medir a atividade	49
Tabela 6 - Tampões utilizados nos ensaios de CD, para XI dos três organismos estudados.	55
Tabela 7 - Padrões para calibração da <i>Superdex 75 HL</i> (GE) e respectivos volumes de eluição experimentais	69
Tabela 8 - Resultado do cálculo estimado das massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, a partir das equações geradas pelas curvas de calibração por cromatografia de exclusão molecular	70
Tabela 9 – Padrões para determinação de massa molecular e raio hidrodinâmico por eletroforese em gel nativo. <i>D</i> é a distância de migração da proteína no gel	71
Tabela 10 - Resultado do cálculo estimado das massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, a partir das equações geradas pelas curvas de calibração por gel nativo	72
Tabela 11 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de <i>B. adolescentis</i> , obtidos por SAXS	88
Tabela 12 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de <i>X. campestris</i> , obtidos por SAXS.....	94
Tabela 13 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de <i>L. crispatus</i> , obtidos por SAXS	98
Tabela 14 - Ensaio de cristalização. Condições em que XI formaram cristais.	105
Tabela 15 - Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da proteína Xilose Isomerase de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (Xyl_B _{ad}) e <i>Xanthomonas campestris</i> (Xyl_X _{cc})	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 BIOENERGIA E CRISE ENERGÉTICA	25
1.2 VIAS DE UTILIZAÇÃO DE XILOSE E PROBLEMÁTICA BIOQUÍMICA	28
1.3 XILOSE ISOMERASE (XI) COMO ALTERNATIVA PROMISSORA NO APROVEITAMENTO E CONSUMO DE XILOSE	29
1.4 FONTES BIOLÓGICAS DE XIS	30
1.4.1 <i>Lactobacillus crispatus</i> CCT 7554	30
1.4.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913	31
1.4.3 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	33
1.5 SUBUNIDADES E DIVERSIDADE ESTRUTURAL	34
1.6 COFATORES	36
1.7 SÍTIO ATIVO E MECANISMO DE AÇÃO	36
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	41
3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>XYLA</i> E CONSTRUÇÃO DE CAUDAS <i>LIC</i>	41
3.3 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DH5 α	44
3.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE XILOSE ISOMERASE EM <i>E. COLI</i>	45
3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILOSE ISOMERASE.....	45
3.6 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	46
3.7 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR	47
3.8 ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR E RAO HIDRODINÂMICO (RAIO DE <i>STOKES</i>) POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	48
3.9 ELETROFORESE EM GEL NATIVO COMO FORMA DE DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLECULAR E RAO HIDRODINÂMICO (RAIO DE <i>STOKES</i>).....	48
3.10 TESTE ATIVIDADE	49
3.11 ESTABILIDADE TÉRMICA POR ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....	52
3.12 ESPALHAMENTO DE LUZ A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	55
3.13 EXPERIMENTO DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA POR SAXS.....	57
3.14 CRISTALOGRAFIA.....	58
3.14.1 <i>Ensaio de cristalização</i>	58
3.14.2 <i>Coleta e processamento de dados de difração de raios-X</i>	59
3.14.3 <i>Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas</i>	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63

4.1	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>XYLA</i> E CONSTRUÇÃO DE CAUDAS <i>LIC</i>	63
4.2	TRANSFORMAÇÃO EM <i>DH5α</i>	63
4.3	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE XILOSE ISOMERASE EM <i>E. COLI</i> E LISE CELULAR.....	64
4.4	PURIFICAÇÃO DE XILOSE ISOMERASES	65
4.4.1	<i>Cromatografia de Afinidade</i>	65
4.4.2	<i>Cromatografia por Exclusão Molecular</i>	67
4.5	ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR E RÁDIO HIDRODINÂMICO (RÁDIO DE <i>STOKES</i>) POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	68
4.6	ELETROFORESE EM GEL NATIVO COMO FORMA DE DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLECULAR E RÁDIO HIDRODINÂMICO (RÁDIO DE <i>STOKES</i>).....	70
4.7	TESTE ATIVIDADE	73
4.7.1	<i>Atividade: XI de B. adolescentis</i>	74
4.7.2	<i>Atividade: XI de X. campestris</i>	76
4.8	ENSAIO TÉRMICO POR DICOÍSMO CIRCULAR (CD)	78
4.9	ESPALHAMENTO DE LUZ A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	83
4.9.1	<i>Envelope Molecular da XI de B. adolescentis</i>	83
4.9.2	<i>Envelope Molecular da XI de X. campestris</i>	88
4.9.3	<i>Envelope Molecular da XI de L. crispatus</i>	94
4.10	DESNATURAÇÃO TÉRMICA POR SAXS	98
4.10.1	<i>Desnaturação térmica por SAXS: XI de B. adolescentis</i>	99
4.10.2	<i>Desnaturação térmica por SAXS: XI de X. campestris</i>	102
4.11	CRISTALOGRAFIA.....	105
4.11.1	<i>Ensaio de cristalização</i>	105
4.11.2	<i>Coleta e processamento de dados de difração de raios-X</i>	105
4.11.3	<i>Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas</i>	108
5	CONCLUSÕES	113
6	PERSPECTIVAS	115
	REFERÊNCIAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bioenergia e Crise Energética

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil logo após a chegada dos portugueses, em 1532. Ela possui bom desenvolvimento na maioria dos países tropicais e subtropicais e é usada principalmente para a obtenção de açúcar e álcool. Nestes países ela possui crescimento rápido, é resistente e pode ser colhida duas vezes ao ano por cinco anos consecutivos ¹. Estima-se que a produção nacional de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira é de 625,33 milhões de toneladas, das quais aproximadamente 46,2% são para a fabricação de açúcar e 53,8% são para a produção de álcool ². Grande parte do bagaço produzido no processamento de açúcar e álcool é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina, sendo realizada sua queima para alimentação das caldeiras. Devido à alta eficiência das caldeiras, atualmente as usinas já são auto-suficientes em vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço, e algumas já até possuem termoelétricas acopladas, gerando energia adicional para as concessionárias elétricas da região. Porém ainda assim, um excedente em torno de 50% de bagaço permanece na usina, sendo estocado em grandes galpões a céu aberto, gerando vários problemas, como utilização de espaço e risco de incêndio (IPT, 2008). Considerando que a produção primária de açúcar e álcool gera enormes quantidades de bagaço, estudos de reaproveitamento secundário desses se tornam muito importantes atualmente. O etanol de segunda geração vem sendo amplamente estudado por diversos grupos de pesquisa no país. O bagaço da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico, cuja composição química consiste basicamente de celulose, hemicelulose e lignina; além desses principais, existem os presentes em menor quantidade, como algumas proteínas, ácidos graxos, extrativos, amido e cinzas inorgânicas³. Deve-se ressaltar que a proporção de cada um desses compostos na fibra do bagaço depende de alguns parâmetros, como: espécie, disposição e sazonalidade. Como disposição geral da fibra, existe uma organização da mesma em microfibrilas de celulose (com regiões alternadas cristalinas e amorfas) em meio a uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da composição e arranjo da celulose e hemicelulose na parede celular de células vegetais (versão adaptada ⁴).

A hemicelulose compreende polioses, que são compostas por diversos açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses), e em gramíneas, como a cana-de-açúcar, ela é composta principalmente por xilanos (homopolímero de unidades de xilose interligados por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4))(Figura 2), grupos laterais de acetil, ácido glucurônico e arabinose).

Figura 2 - Trecho de molécula de xilano, homopolímero formado por ligações β - (1,4). Este polímero pode ser quebrado em suas unidades formadoras (moléculas de xilose) pela atuação de enzimas do grupo das xilanasas (E.C. 3.2.1.8)

Estruturalmente, a hemicelulose se localiza nos contornos das microfibrilas de celulose, as sobrepondo. Essa matriz confere principalmente um isolamento das microfibrilas ao ataque de biológicos (enzimas e/ou microorganismos) e de alguns agentes químicos^{3;5}. Com isso, para reaproveitar componentes do bagaço, por exemplo, seria necessária a aplicação de pré-tratamentos, facilitando a separação dos seus constituintes e a ação de agentes químicos ou mesmo enzimas, que irão atuar de acordo com o que se quer obter a partir desse bagaço.

Na Tabela 1, encontram-se faixas de proporções dos constituintes na fibra da cana-de-açúcar.

Tabela 1- Composição da fibra seca de cana-de-açúcar⁶.

Componente	Peso na fibra(%)
Celulose	54,3 – 55,2
Hemicelulose	24,3 – 25,3
Lignina	27,35
Extrativos	0,7 – 0,35
Cinzas	1,1
Açúcares Redutores Totais	<0,5%

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído 20% a 25% de hemicelulose, sendo a xilose seu principal componente⁷.

Hemicelulose é uma parte de biomassa que é relativamente fácil de despolimerizar e solubilizar no processo de pré-tratamento ácido, acompanhado ou não da ação enzimática de xilanases⁸⁻¹⁰. Entretanto, a fermentação de pentoses geradas no pré-tratamento representa sério problema. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no processo de fermentação industrial não tem capacidade de fermentar pentoses como D-xilose e L-arabinose, impossibilitando, portanto, o aproveitamento de pentoses no processo de fermentação similar ao que existe atualmente na produção de álcool¹¹⁻¹².

Uma das peças-chave no metabolismo da xilose é a enzima xilose isomerase (E.C. 5.3.1.5)¹³, que será discutida em mais detalhes a partir da Seção 1.3.

1.2 Vias de utilização de xilose e problemática bioquímica

Em bactérias que consomem xilose, uma molécula de D-xilose é transformada em D-xilulose pela xilose isomerase (XI) ¹⁴. A xilulose é então fosforilada a xilulose-5-fosfato, que já é um intermediário da via das pentoses-fosfato ¹⁵. Uma rota semelhante foi encontrada também em fungos anaeróbios ¹⁶, entretanto, nesses fungos que consomem xilose, a via é bem mais complexa, consistindo em reações de óxido-redução envolvendo cofatores como o NAD(P)H e o NAD(P)⁺ (Figura 3). A xilose é então reduzida a xilitol ¹⁷⁻¹⁹ pela enzima dependente de NAD(P)H, a xilose redutase (XR), que por sua vez é oxidado a D-xilulose por uma enzima dependente de NAD⁺, chamada xilitol desidrogenase (XDH) ¹⁸⁻²⁰.

Figura 3 - Vias de utilização de xilose em fungos e bactérias²¹⁻²².

Assim como nas bactérias, a D-xilulose é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato por uma xiluloquinase (XK) ²³⁻²⁴.

1.3 Xilose Isomerase (XI) como alternativa promissora no aproveitamento e consumo de xilose

Uma das peças-chave no metabolismo da xilose é a enzima xilose isomerase (XI, E.C. 5.3.1.5), que tem capacidade de isomerizar xilose em xilulose¹³, Figura. 4.

Figura 4 - Reação de isomerização realizada pela enzima xilose isomerase. (A) com substrato D-xilose e (B) com substrato D-glicose.

Como xilulose é consumida facilmente pelo *S. cerevisiae* no processo de fermentação comum, a XI pode ser utilizada para conversão de xilose e consumo de pentoses durante conversão de fração hemicelulósica em etanol de 2ª geração (E2G)²⁵.

No caso de procariotos, a isomerização de xilose em xilulose resulta de uma condição nutricional de bactérias saprófitas na decomposição de restos vegetais. XI tem também capacidade de isomerizar glicose em frutose (embora normalmente com menor eficiência²⁶), e por isso também é conhecida como glicose isomerase (GI). Ela é uma das enzimas amplamente utilizada na indústria²⁷ para produção de xarope de milho rico em frutose, *high-fructose corn syrup* (HFCS).

XI/GI é uma enzima muito pouco eficiente, com típico valor para k_{cat} em torno de 10 s^{-1} para xilose e cerca de 2 s^{-1} para glicose, um dos mais baixos conhecidos^{26; 28}. Esta enzima é ativada por íons de metais divalentes, Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} , seus cofatores, e é inibida pelos

íons²⁹ Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} . Além disso, a enzima é inibida por D-xilitol e D-sorbitol^{11;26;28;30}. Tanto inibição pelo Ca^{2+} como pelo xilitol, além de baixa atividade específica da enzima, representam sérios problemas na utilização XI em processos industriais.

1.4 Fontes biológicas de XIs

Xilose isomerase é uma enzima que se apresenta distribuída vastamente entre os procariotos. Após sua descoberta em *Pseudomonashydrophila*³¹, a expressão de XI foi sendo descoberta em um grande número de bactérias. Dentre os lactobacilos, *Lactobacillus brevis* é o que apresenta a maior taxa de expressão da enzima. Nele, ela se apresenta ativa num pH ácido e instável em altas temperaturas, o que a princípio poderia ser viável para exploração comercial, como já foi colocado citado anteriormente.

O interesse neste trabalho foi encontrar, partindo de uma análise inicial, considerando o ambiente físico-químico, organismos que poderiam expressar XI passíveis de apresentar atividade ótima em condições mais amenas em comparação às comumente encontradas na natureza para organismos termófilos.

1.4.1 *Lactobacillus crispatus* CCT 7554

Lactobacillus crispatus (Figura 5) vive no trato intestinal de vertebrados, e é uma das espécies mais abundantes do gênero *Lactobacillus*, que também fazem parte da microbiota vaginal, determinando pH ácido (3,8 a 4,5), que inibe o crescimento de várias outras bactérias que são nocivas à mucosa vaginal³². *L. crispatus* pertence ao chamado grupo acidófilo, o qual vem chamando atenção por muitas de suas espécies serem fatores importantes na produção de comidas fermentadas, e, além disso, algumas ainda podem infectar humanos³³.

Figura 5 - *Lactobacillus crispatus*. (Fonte: <http://jb.asm.org/content/194/10/2509/F1.large.jpg>)

O genoma de *L. crispatus* consiste em um único cromossomo circular de 2,04 Mbp³⁴ (mega pares de bases). Também pela razão *L. crispatus* possuir uma boa adaptação em ambientes ácidos e de temperaturas amenas, a xilose isomerase desse microorganismo também é foco deste trabalho. A xilose isomerase de *L. crispatus* (Xyl_{Lcr}) possui um gene que codifica apenas para um domínio dentre os dois conhecidos para esta enzima. Neste domínio, barril α/β (predição realizada no servidor *SMART*³⁵), reside parte do sítio ativo da enzima³⁶⁻³⁷.

1.4.2 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913

Xanthomonas campestris pv *campestris* faz parte de um gênero cujos microorganismos são bactérias fitopatogênicas relativamente comuns, responsáveis por causar *Black root* em crucíferas, levando normalmente a grandes perdas econômicas. Industrialmente, este microorganismo (Figura 6) é utilizado para produzir um heteropolissacarídeo extracelular de primeira geração, conhecido como goma xantana. Este composto apresenta excelentes propriedades reológicas; ele é normalmente usado como estabilizante, espessante e emulsificante.³⁸⁻⁴⁰

Figura 6 - Micrografia eletrônica de biofilme de *Xanthomonas campestris* em uma folha vegetal (Fonte: ASM MicrobeLibrary.org, Fett&Cooke)

As bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas. Após invadirem espaços intracelulares, desenvolvem micro colônias rodeadas de material fibrilar, como a goma xantana. Como o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços se tornam congestionados; este fenômeno é conhecido como *water soaking*. O tecido é continuamente desintegrado e é o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana⁴⁰. Os danos vão agravando e então a planta vai murchando devido à redução da fotossíntese e aumento da permeabilidade da membrana celular. E é neste tecido necrosado que as enzimas atuam⁴¹. A presença de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da parede celular tem sido reportada para o gênero *Xanthomonas*, sendo que a análise do genoma de *X. campestris pv. campestris* revelou a presença de vários genes que codificam enzimas envolvidas neste processo, incluindo além de pectinases, liases, xilanases e celulases, indicando, portanto, que *Xcc* é capaz de secretar diversas enzimas que agem na degradação dos constituintes da parede celular. Isso inclui a enzima xilose isomerase. Na busca de organismos que possam apresentar esta enzima atuando em condições mais amenas (condições ambientes), a XI de *Xcc* se tornou um objeto de estudo neste trabalho.

1.4.3 *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083

Bifidobacterium adolescentis (Figura 7) é um habitante comum do trato intestinal de pessoas saudáveis e do trato intestinal de diversos animais. A colonização por *B. adolescentis* no intestino ocorre imediatamente após o nascimento e sua população no intestino tende a se manter relativamente estável até a idade adulta tardia, em que fatores como dieta, estresse e antibióticos fazem com que ela caia (de acordo com projeto genoma de 2005).

Figura 7 – *Bifidobacterium adolescentis*. **Photo:** Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre⁴².

Esta espécie de bifidobactéria foi isolada pela primeira vez por Tissier em 1899 nas fezes de recém-nascidos amamentados. Ele foi o primeiro a promover a utilização terapêutica de bifidobactérias para o tratamento de diarreia infantil, dando-lhes doses elevadas desta bactéria por via oral. Desde então, sua presença no intestino tem sido associada com uma microbiota saudável⁴³. A correlação entre saúde gastrointestinal e a presença de *B. adolescentis* tem gerado diversos estudos centrados na ecologia gastrointestinal e benefícios que essas bactérias podem promover. Atualmente bifidobactérias estão sendo adicionadas em alimentos probióticos, principalmente em bebidas lácteas.

Das 29 espécies descritas de bifidobactérias, cinco, incluindo *B. adolescentis*, estão sendo alvos da indústria para produção de terapêuticos lácteos⁴⁴, isso devido a suas maiores taxas de sobrevivência em meios mais ácidos⁴⁵. Esta é uma das razões pelas quais XI de *B. adolescentis* (Xyl_B_{ad}) se tornou conveniente para este estudo. As condições de baixos

valores de pHs e temperaturas em torno de 60°C, para as reações de fermentação em processos industriais de fabricação de etanol, permitiram a busca por enzimas que possivelmente apresentem condições ótimas de reação nessa faixa de interesse.

1.5 Subunidades e diversidade estrutural

Como já dito anteriormente, XI já foi isolada de diversos organismos e muito bem estudada estruturalmente^{14; 46-54}. Os pesos moleculares e constantes de sedimentação da xilose isomerase de diversas fontes até hoje variavam de 52 kDa a 191 kDa e 7,55 a 11,45, respectivamente.

Na maioria dos organismos nos quais se observa atividade da xilose isomerase, esta enzima se apresenta na forma homotetramérica (Figura 8) e também como um homodímero, com subunidades interconectadas por ligações não covalentes e desprovidas de pontes dissulfeto entre as cadeias, com monômeros que possuem entre 30 e 60 kDa⁵⁵. Em contrapartida, alguns organismos apresentam esta enzima como um tetrâmero de unidade que diferem uma das outras⁵⁶. A grande maioria dessas enzimas se encontra em solução como tetrâmeros (dímero de dímeros).

Figura 8 - Estrutura tetramérica de XI de *S. rubiginosus*(pdb id. 4XIS)

Estudos de *folding* e *unfolding* do tetrâmero de espécies ativas revelaram que o tetrâmero e o dímero que apresentam atividade de isomerização de xilose em xilulose, enquanto o monômero não. Há relatos de XI que apresentam uma forma ativa trimérica⁵⁷.

A cadeia da grande maioria de XIs funcionais pode ser dividida em dois domínios: N-terminal, geralmente barril α/β , com considerável homologia a TIM (triose fosfato isomerase); e o C-terminal, formado principalmente por um motivo de alça, estruturalmente mais flexível que o resto da cadeia.

Até então, as XIs de organismos termófilos foram um dos principais alvos de estudos, pois são mais resistentes às altas temperaturas, o que é uma vantagem para produção industrial de frutose e HFCS, visto que numa reação em escala industrial sob alta temperatura, a atividade enzimática é aumentada, e o risco de contaminação é reduzido. Esta demanda do uso de XIs para conversão de glicose em frutose (ou seja, como GIs) induziu contínua busca, estudos e engenharia genética de XIs termoestáveis⁵⁸⁻⁵⁹. A mesma demanda pelas GIs e acesso a estas enzimas claramente influenciou disponibilidade de informações estruturais sobre XIs.

Diversos estudos apontam que a temperatura ótima para XIs reside entre 60°C e 95°C (sendo essas mais elevadas para XIs de organismos termoestáveis)^{51;60-62}. Já seu valor de pH ótimo em diversos organismos geralmente está entre 7,0 e 9,0²⁶. Mas existem exceções, assim como XI de *Lactobacillus brevis*, que possui pH ótimo entre 6,0 e 7,0. Estes valores de pH não são compatíveis às exigências de processos industriais de fermentação alcoólica, que requerem pH na faixa de 4,5 a 5,5⁶³⁻⁶⁴ e temperatura de 25°C a 35°C⁶⁵. Além disso, enzimas termoestáveis apresentam taxa reacional muito reduzida em temperaturas amenas (~30°C), o que prejudica ainda mais a eficiência enzimática de XIs⁶⁶.

Muitas estruturas cristalográficas já foram depositadas no PDB (do inglês, *Protein Data Bank*), grande parte de XI de organismos termófilos (*Thermus thermophilus* (pdb 1bxb) e *T. caldophilus*⁶⁷ (pdb 1bxc); *Thermotoga neapolitana* (pdb 1a0e); *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (pdb 1a0c); *Geobacillus stearothermophilus* [não publicadas] e *Bacillus stearothermophilus* (pdb 1a0d)), ou de organismos empregados em consórcios de genomas estruturais (de *Rhodospirillum rubrum* (pdb 3qxb) ATCC11170 [Joint Center for Structural Genomics/JCSG]; *Erwinia carotovora atroseptica* (pdb 3kte)[JCSG], *Planctomyces limnophilus* (pdb 3tva) e *Alicyclobacillus acidocaldarius acidocaldarius* (pdb 3u0h) [Midwest CSG]. Entretanto, estudos mais profundos da relação estrutura e função dessa enzima ainda devem ser explorados. Claramente, tal concentração de informação sobre GIs, utilizadas industrialmente para produção de frutose, em detrimento de estudos de XIs, com propriedades

mais compatíveis com fermentação alcoólica, está sendo prejudicial para desenvolvimento e aplicações de XIs que possam ser aplicados para conversão de hidrolisados de hemicelulose em E2G.

1.6 Cofatores

A xilose isomerase requer cátions divalentes tais como Mg^{+2} , Co^{+2} , ou Mn^{+2} , ou uma combinação desses para resultar em uma atividade máxima. Mesmo Mg^{+2} e Co^{+2} sendo essenciais para atividade, desempenham papéis diferentes. O Mg^{+2} tem um efeito superior de ativação em comparação ao Co^{+2} , entretanto este atua mais fortemente na estabilização da estrutura quaternária da enzima^{52; 68-69}. Estudos prévios afirmam que por tetrâmero devem existir quatro Co^{+2} , pelo menos em *Streptomyces griseofuscus*⁷⁰ ou por oito, como no caso de *S. rubiginosus*⁷¹. Além disso, esses cofatores participam diretamente do mecanismo de reação, coordenando transferências eletrônicas ou de prótons⁷²⁻⁷⁴, e auxiliando na estabilidade e manutenção do substrato no sítio ativo da enzima³⁶⁻³⁷.

1.7 Sítio ativo e mecanismo de ação

De forma geral, o estudo do sítio ativo da xilose isomerase se inicia com o reconhecimento dos aminoácidos que estão presentes nessa região, por meio de modificações químicas grupo-específicas e cristalografia de raios-x. Por exemplo, no sítio ativo da maioria das XIs existe a evidência de uma histidina essencial e resíduos carboxilados^{29;75-76}. Além disso, o ambiente estrutural e funcional foi determinado também pelo mapeamento diferencial de peptídeos⁷⁷. Como a xilose isomerase pode catalisar tanto a conversão de xilose em xilulose, quanto de glicose em frutose; então por um tempo ficou a dúvida se essa reação acontecia no mesmo sítio ou em sítios diferentes na mesma molécula. Isso foi resolvido utilizando-se um método cinético de experimentação^{75; 78}. Foi comprovado então que ambas (xilose e glicose) se ligam às mesmas regiões da enzima, onde ocorrem as reações, ou seja, o sítio catalítico é o mesmo, tanto para a glicose quanto para a xilose.

Embora vários mecanismos de ação catalítica de XIs tenham sido propostos^{26,36-37; 58;79-81}, os detalhes do mecanismo da reação de isomerização ainda estão sendo investigados⁷²⁻⁷⁴.

No passado, estudos indicavam estreita similaridade funcional entre esta enzima e a triose fosfato isomerase, sugerindo também o mesmo mecanismo de ação, com a formação de um intermediário *cis*-enediol⁸²⁻⁸⁴.

Figura 9 - Diferentes mecanismos propostos para reação de isomerização da XI. Abstração de um próton de C-2 formando um intermediário *cis*-enediol e subsequente transferência deste próton para C-1, auxiliado por grupo ácido capaz de protonar O-1⁸², (A); transferência de prótons, gerando intermediário aniônico, (B); deslocamento do hidreto de C-2 para C-1, também gerando um intermediário portador de carga formal positiva⁸⁵, (C).

Já estudos recentes propõem outro mecanismo, o do deslocamento do hidreto^{36; 37; 79; 86}, como mostrado na Figura 8. As principais características deste mecanismo proposto para XI são a abertura do anel do substrato, isomerização via deslocamento do hidreto do C-2 para o C-1, e o fechamento do anel do produto.

2 OBJETIVOS

A Xilose Isomerase é uma enzima que teve seu estudo bastante concentrado em sua aplicação industrial voltada à sua atividade de Glicose Isomerase. Voltado à produção de bioetanol pelo aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa, o ramo mais recente de estudo de XIs necessita da busca de enzimas com atividade de conversão de xilose em xilulose, em condições compatíveis às das fermentações industriais, na presença de *Saccharomyces cerevisiae*. O que implica estudar enzimas que ajam conveniente e eficientemente em temperaturas e pHs mais reduzidos, ao contrário do que se procurava até então. Sob esse foco, os objetivos específicos são:

- Identificar possíveis fontes de XIs;
- Amplificar e clonar o gene *xylA* (codifica para XI);
- Expressar heterologamente XIs em *E. coli* e purificá-las;
- Estudar condições ótimas de atividade enzimática e formas de medi-las;
- Estudar e analisar comportamento térmico das XIs por diferentes técnicas. Isso significa estudar perfis de desnaturação, tanto de estrutura secundária por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) quanto do enovelamento terciário por Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS);
- Criar modelos por SAXS que representem a estrutura da proteína em solução próxima às condições nativas;
- Relacionar comportamento e atividade com os modelos gerados por SAXS;
- Proceder com ensaios de cristalização obtenção estruturas de alta resolução;
- Relacionar comportamento e atividade com estruturas de alta resolução;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA genômico

Inicialmente, células de *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083(*B_{ad}*)(fornecido pelo Prof. Christian Riedel, *ULM University*, Alemanha) foram inoculadas em 25mL de meio de cultura *MRS* (Man-Rogosa-Sharpe) na presença de L-cisteína 0,1%(m/v). A cultura foi incubada dentro de uma jarra de anaerobiose a 37°C por 24 horas, cuja função é criar uma atmosfera livre de oxigênio para o crescimento e desenvolvimento da cultura. Após esse período de cultivo, a cultura foi centrifugada e submetida a um protocolo de extração de DNA genômico (gDNA) com o *kit Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA, Madison, WI). Os demais gDNAs utilizados neste trabalho, de *Lactobacillus crispatus* CCT 7554(*L_{cr}*) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913(*X_{cc}*), foram gentilmente cedidos pelo Programa CCT 7554 da Fundação André Tosello e pelo Prof. Dr Shaker Chuck Farah(IQ/USP), respectivamente.

3.2 Amplificação do gene *xylA* e construção de caudas *LIC*

Com base nas seqüências de nucleotídeos do gene *xylA*(que codifica para a proteína xilose isomerase), de *B.adolescentis* (*B_{ad}*), *X. campestris* (*X_{cc}*) e *L. crispatus* (*L_{cr}*), com números de acesso, respectivamente, NC_008618.1, NC_003902.1.e NZ_GG704613.1, no *NCBI* (*NCBI, National Center for Biotechnology Information*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram sintetizados oligonucleotídeos adaptados para amplificação genômica através de *LIC* (*Ligation/Ligase Independent Cloning*)⁸⁷. Nesta etapa, fizemos uso do programa *Gene Runner*⁸⁸ para alinhamento dos fragmentos de oligonucleotídeos e análise de temperaturas de anelamento.

Na Tabela 2, encontram-se os oligonucleotídeos confeccionados para amplificação do gene de interesse.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos criados para amplificação do gene *xylA* de *Xanthomonas campestris*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Lactobacillus crispatus*. A cor vermelha, representa caudas que ficarão livres (fita simples) nas extremidades 5' do gene (inserto) após a amplificação, convenientemente geradas para LIC. Regiões grifadas representam *start* e *stop* códons, de acordo com o *frame* correto de leitura (5'→3') na fita codificante.

PRIMERS		
	FORWARD (5' → 3')	REVERSE (5' → 3')
<i>X_{cc}</i>	CAGGGCGCC <u>AT</u> GAGCAACACCGTTTTCATC	GACCCGACGCGGT <u>CA</u> ACGCGTCAGGTACTG
<i>L_{cr}</i>	CAGGGCGCC <u>AT</u> GAAAGTTTCAGTGAATGCG	GACCCGACGCGGT <u>TAC</u> CGCATGTCTATAACAGC
<i>B_{ad}</i>	CAGGGCGCC <u>AT</u> GGGTCTGTGGGATATCG	GACCCGACGCGGT <u>CAC</u> GCCTCGGCCAGGG

A amplificação dos trechos de interesse, que contêm fusionadas o gene *xylA* de cada espécie estudada e a *cauda LIC*, foi feita através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês), utilizando-se tanto os oligonucleotídeos explicitados na Tabela 2 quanto os gDNAs de *X_{cc}*, *L_{cr}*, e *B_{ad}*, de acordo com o ciclo esquematizado na Figura 10, nas condições da Tabela 3. Ao invés de utilizar a enzima comumente empregada para PCR, utilizou-se *Phusion High Fidelity DNA Polimerase* (Finnzymes, Expoo, Finland), pois ao contrário da *Taq DNA polimerase* (Fermentas Life Sciences), a *Phusion* não adiciona cauda de poliadenilação ao produto da reação, o que inviabilizaria a utilização de LIC.

Tabela 3 - Quantidades utilizadas para amplificação dos genes de interesses a partir dos oligonucleotídeos da Tabela 2, gDNAs e reagentes especificados no manual da *Phusion High Fidelity DNA Polimerase* (Finnzymes, Expoo, Finland). X na tabela representa o volume de acordo com cada gDNA, cujos estoques estavam em concentrações diferentes, portanto, o protocolo requereria volumes diferentes, de modo que se completou com água o volume total da reação de 50 µL,

Reação de Amplificação	Volume (µL)
Tampão (20 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 100 mM KCl)	10
dNTPs [10mM] (N = A, G, C, T)	1
Oligonucleotídeos For (10µM)	2,5
Oligonucleotídeos Rev(10µM)	2,5
gDNA (500ng)	X
Phusion HF DNA polimerase (2U/µL)	0,5
H ₂ O Mili-Q	(33,5-X)

A Figura 10 contém o ciclo utilizado para a reação de amplificação descrita anteriormente.

Figura 10 - Representação da condição de reação de amplificação dos genes *xylA* de *X_{cc}*, *L_{cr}*, e *B_{ad}*. Tanto a temperatura de desnaturação inicial quanto a cíclica são de 98°C; ΔT representa $T_1=64^\circ\text{C}$, $T_2=67,3^\circ\text{C}$ e $T_3=72,4^\circ\text{C}$, que são as temperaturas de anelamento, que estão relacionadas à sequência dos oligonucleotídeos; e 72°C para a temperatura de extensão, tanto a cíclica quanto a final.

Como não se sabia qual a temperatura de anelamento ideal, procedeu-se com três temperaturas diferentes: T_1 , T_2 e T_3 cujos valores são 64, 67,3 e 72,4 °C, respectivamente, representado pelo ΔT , na figura.

O resultado foi analisado em gel analítico de agarose 0,8% (BioRad®) com brometo de etídio (0,5µg/mL), em tampão *TAE IX* (8mM Tris-acetato pH 8,0, 0,2 mM EDTA). Os fragmentos amplificados foram purificados a partir de um gel preparativo de agarose 1% (BioRad®) utilizando-se o *kit Wizard SV Gel Clean-Up System* (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas Life Sciences), que apresenta atividade exonucleásica⁸⁹ 3' -> 5'. O tratamento com a T4 permitiu que ocorresse a digestão das extremidades 3'dos fragmentos amplificados, de acordo com as regiões de vermelho apresentadas na Tabela 2 (complementares a elas, na realidade), para as três espécies; isso gerou as caudas livres e coesivas (ou caudas LIC) que posteriormente se hibridizaram com as caudas livres, coesivas e complementares do vetor pPROEX HTa (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) adaptado para LIC (pelo tratamento com T4 DNA polimerase) e que por questão de nomenclatura é então designado como pPROEX_HTa_LIC. A Tabela 4 expõe as quantidades utilizadas no tratamento dos fragmentos amplificados com a T4 DNA Polimerase.

Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de construção de caudas LIC, a partir dos fragmentos amplificados(*) na PCR descrita anteriormente. A atividade exonucleásica da T4 DNA Polimerase combinada à presença de dATPs (e ausência dos demais nucleotídeos) no ambiente reacional, faz com que os nucleotídeos diferentes de dATPs sejam retirados do fragmento a partir da extremidades 3', transformando as extremidades 5' em fitas simples coesivas (*overhangs*). Essa desfragmentação é contínua até a T4 deflagrar com o primeiro 3' dATP.

Reagente/Componentes	Quantidade/Volume	Concentração Final
Fragmento (ou inserto)*	200ng (X μ L)	10ng/ μ L
Tampão (5x) (335 mM Tris-HCl pH 8,8; 33 mM MgCl₂; 5 mM DTT, 84 mM (NH₄)₂SO₄)	4 μ L	1x
25mM de dATP	2 μ L	2,5mM
T4 DNA Polimerase	1 μ L	0,15U/ μ L
DTT	0,8 μ L	4mM
H₂O	(12,2-X) μ L	-
TOTAL	20μL	-

Os reagentes foram então incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C); em seguida, 20 minutos a 75 °C, para completa inativação da T4 DNA Polimerase. Com isso, para a junção das duas construções (vetor pPROEX_Hta_LIC e o inserto contendo o gene de interesse), bastou juntar o vetor e o inserto e manter a temperatura ambiente por no mínimo 1 hora, ambos previamente tratados pela T4 DNA Polimerase.

3.3 Transformação em células competentes DH5 α

Com os novos vetores recombinantes, pPROEX_Hta_LIC_{xy}/A, para cada um dos genes – pPROEX_Hta_LIC_{xy}/A *X_{cc}*, pPROEX_Hta_LIC_{xy}/A *L_{cr}*, e pPROEX_Hta_LIC_{xy}/A *B_{ad}* - foram feitas por eletroporação as transformações em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α e plaqueamento em meio meio LB sólido com 100 μ g/mL finais de ampicilina. As placas foram deixadas a 37°C por 12 horas até aparecerem as colônias positivas (foram feitas placas de controle – na presença e na ausência de ampicilina, e ambas sem as bactérias transformadas). Após o crescimento das colônias positivas (supostamente contendo os plasmídeos recombinantes), foi realizado uma “PCR de colônia”, para confirmar se a transformação foi bem sucedida. Uma PCR de colônia se baseia na amplificação do gene de interesse a partir do conteúdo plasmidial das bactérias pertencentes a certas colônias. A reação procedeu neste caso utilizando-se Taq DNA Polimerase (*Fermentas Life Sciences*) e os

oligonucleotídeos referentes a cada gene de interesse. O resultado foi analisado por gel de agarose 0,8% (BioRad®) com brometo de etídio. Ao final, tanto os plasmídeos quanto os genes foram submetidos a seqüenciamento de seus nucleotídeos utilizando método de *Sanger*.

3.4 Expressão heteróloga de Xilose Isomerase em *E. coli*

Células da cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pPROEX_Hta_LICxylA *X_{cc}*, pPROEX_Hta_LICxylA *L_{cr}*, e pPROEX_Hta_LICxylA *B_{ad}*, foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB (pré-inóculo) contendo ampicilina (100mg/mL) e incubadas por 16 horas sob agitação de 250 rpm a 37°C. Passado este período, 10 mL dessa cultura (dois pré-inóculos para cada construção) foram inoculados em 1L de meio de cultura LB líquido (inóculo), mantendo-se agitação de 250 rpm a uma temperatura de 37°C até atingir o valor de 0,6 de absorbância num comprimento de onda de 600 nm (densidade óptica). A partir deste valor abaixou-se a temperatura do inoculo para 18°C e fazendo-se a indução da expressão com 0,5 mM de IPTG. Então foram mantidas a temperatura de 18°C e agitação por mais 16 horas (tempo de expressão).

3.5 Extração e purificação de Xilose Isomerase

Passado o tempo de expressão, o volume total da cultura foi centrifugado por 20 minutos a 8000 rpm, em que o sobrenadante foi descartado (meio de cultura) e o *pellet* recuperado (células de *E. coli* contendo xilose isomerase expressa em seu citoplasma). O *pellet* foi então ressuspenso em 25 mL de tampão de Lise (25mM HEPES pH 8,0, 300mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 5mM imidazol, 1mM DTT e 1mM PMSF) com 250µg/mL de lisozima e deixado em repouso por 60 minutos no gelo. No caso da expressão de XI de *X. campestris* e *B. adolescentis*, ao tampão de Lise foi adicionado 0,6% (m/v) de sarcosil, um detergente iônico amplamente utilizado na solubilização de proteínas⁹⁰⁻⁹¹.

A suspensão foi submetida a 10 ciclos de 30 segundos em modo *ON* e 60 segundos no modo *OFF*, alternados, em sonificador 550 *Sonic Dismembrator* – *Fisher Scientific* para

completa lise celular. Após a lise celular, amostra foi centrifugada por 30 minutos a 11000 rpm a 4°C, a fim de separar a fração solúvel da insolúvel.

3.6 Cromatografia de Afinidade

Pelo fato de a proteína xilose isomerase ser subclonada no vetor pPROEX HTa/LIC, a proteína será expressa com uma cauda N-terminal de 6 histidinas. A presença desta cauda confere à proteína alta afinidade de ligação em resinas cromatográficas com íons de metal quelados, no caso o utilizado foi Co^{2+} . O composto químico imidazol foi utilizado para realizar a eluição da proteína que se liga à resina contendo os íons Co^{2+} , já que o anel imidazólico tem maior afinidade química para a ligação a esses íons em pH 8,0 e pode competir com os resíduos de histidina pela ligação. A resina utilizada nesta primeira etapa de purificação foi a *TALON^{TM} Metal Affinity Resin (BD Biosciences)*. No caso da XI, de *L. crispatus*, *X. campestris* e *B. adolescentis*, o procedimento adotado foi o mesmo para as três. Iniciou-se com o empacotamento de 1 mL de resina de cobalto e a exaustiva lavagem com água milli-Q, seguida do processo de equilíbrio da resina passando-se através da coluna 10 volumes (no caso, 10 mL) do tampão de lise (exceto o DTT). O sobrenadante proveniente da lise celular de 1L de cultura bacteriana descrito na seção anterior (seção 3.5) foi incubado com a resina equilibrada durante uma hora a 4°C. Decorrido este tempo, a resina foi lavada com o mesmo tampão a qual foi equilibrada, em uma coluna de empacotamento novamente. Além disso, foram passados quatro volumes do mesmo tampão, mas com 15 mM de imidazol, para eliminar as proteínas com baixa interação pela resina. A eluição da XI foi realizada empregando-se quatro volumes de resina de uma fase móvel com os mesmos componentes do tampão de lise (exceto pelo DTT), mas neste caso com 250 mM de imidazol. O restante das proteínas foi eluído com 2 M de imidazol. As frações que saíam da coluna empacotada com a resina, em cada etapa dessa purificação, tanto do *flow thorough* e lavagens, quanto as que foram eluídas com gradiente de imidazol, foram todas analisadas por SDS-PAGE. O valor da concentração de XI nas amostras geradas dessa purificação foram medidas utilizando-se o espectrofotômetro *Nanodrop^{TM} 1000 (Thermo Scientific)*. Com apenas 2 μL de amostra, com certa concentração de proteína, pode-se fazer a leitura da absorbância “A”, no caso a 280nm, e a partir da expressão abaixo (eq. 1), dado o coeficiente de extinção molar teórico “ ϵ ”, e

utilizando a Lei de *Lambert-Beer*⁹², obtivemos o valor da concentração de XI naquela amostra.

$$A(\lambda) = \log(I/I_0) = C\varepsilon(\lambda)l \quad (1)$$

As três XIs estudadas neste trabalho possuem os seguintes coeficientes de extinção molar teóricos, considerando Cys (resíduos de cisteína) reduzidos: 83310 M⁻¹cm⁻¹, 58330 M⁻¹cm⁻¹ e 35410 M⁻¹cm⁻¹, para Xyl_B_{ad}, Xyl_X_{cc} e Xyl_L_{cr}, respectivamente.

3.7 Cromatografia por Exclusão Molecular

Na cromatografia por exclusão molecular, as moléculas são separadas de acordo com seus tamanhos e formas moleculares. A matriz da coluna é formada por um polímero que possui poros de tamanhos convenientemente selecionados, de modo que proteínas de maior massa molecular migram mais rapidamente através da coluna, já que tendem a passar direto pela matriz, sem penetrar nos poros da resina. Já proteínas com menor massa molecular tendem a penetrar nos poros da resina e, portanto tendem a fazer essa migração mais vagarosamente. Para essa purificação foi utilizada uma coluna *Superdex 75 HR 16/60 (GE)* acoplada ao sistema de cromatografia *AKTA Explorer 10 (GE)*.

A XI eluída na etapa anterior de cromatografia de afinidade é então concentrada para um volume final de 2 mL e aplicada numa cromatografia gel filtração previamente equilibrada com Tampão GF (50 mM HEPES pH 7,5 e 150 mM de NaCl). Foi realizada uma eluição isocrática com uma unidade de volume de coluna total, com fluxo de 0,5 mL/min de tampão GF, com monitoramento a 280nm por espectrofotometria. As frações recuperadas da coluna foram analisadas por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida), corado com *Coomassie Brilliant Blue* (R-250), para validação do deste processo de purificação.

3.8 Estimativa da massa molecular e raio hidrodinâmico (raio de *Stokes*) por cromatografia de exclusão molecular

A partir da calibração da coluna de exclusão molecular, pode-se fazer a estimação da massa molecular e raio hidrodinâmico (R_H ou raio de *Stokes*) de uma proteína qualquer. Portanto, nas mesmas condições e tampões utilizados nas purificações das XIs consideradas neste trabalho, proteínas-padrão foram eluídas através da *Superdex 75 HR 16/60 (GE)*, a fim de se gerar uma equação que relacione o volume de eluição da proteína em estudo com a sua massa molecular e seu raio hidrodinâmico.

3.9 Eletroforese em gel nativo como forma de determinação de massa molecular e raio hidrodinâmico (raio de *Stokes*)

A eletroforese em gel nativo é uma técnica que permite determinar o grau de homogeneidade de amostras de proteína, bem como seu estado oligomérico em solução. O experimento foi realizado sob condições padrões, utilizando um gel com gradiente *PhastGel 8-25 (GE)* em tampão 0,112 M TRIS e 0,112 M de acetato pH 6,4. Foi aplicado no gel nativo o equivalente a 3 µg de amostra de proteína em diferentes concentrações. O gel foi corado com *Comassie Blue G-50* 0,1% em solução aquosa de 25% de metanol e 5% de ácido acético. Utilizou-se como padrão um conjunto de proteínas de massa molecular e raio hidrodinâmico conhecidos. A partir da distância de migração das “bandas” de proteína no gel e as curvas de calibração geradas, foi possível estimar a massa molecular e o raio hidrodinâmico (ou raio de *Stokes*) correspondentes a cada proteína.

3.10 Teste atividade

Para se medir a conversão de xilose em xilulose procedeu-se com testes de atividades de acordo com protocolos estabelecidos previamente ⁹³, com adaptações para menores volumes com testes em microplacas. A presença de sais como CoCl_2 e MgSO_4 é necessária, visto Co^{+2} e Mg^{+2} agem como cofatores ^{52; 68-69}. A tabela seguinte demonstra os reagentes utilizados neste teste. Lembrando que até início do teste, as amostras são mantidas à baixa temperatura (banho térmico em gelo) para inibição da atividade. O teste foi realizado em quadruplicata.

A proteína é incubada por duas horas na solução tampão do pH no qual se quer medir a atividade (contendo os cofatores e não contendo o substrato). Após esse período, à reação é adicionado o substrato (D-xilose), numa concentração final de 5 mM. Os detalhes das soluções tampão utilizadas encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Esquema de componentes que fazem parte do teste de atividade da enzima Xilose Isomerase. O volume total de reação é de 100 μL . CoCl_2 e MgSO_4 são cofatores e os tampões são glicina, acetato de sódio, BIS-TRIS ou HEPES, dependendo do valor de pH no qual se quer medir a atividade

Componente	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão de Reação	80	Para todos os valores de pH:
		- 10 mM de CoCl_2
		- 10 mM de MgSO_4
		Dependendo do pH da reação:
		- 20 mM glicina (pH 2,5 e 9,0)
		- 25 mM acetato de sódio (pH 4,5 e 5,5)
		- 25 mM BIS TRIS (pH 6,5)
		- 25 mM HEPES (pH 7,5)
Xilose Isomerase	10	Entre 0,3 mg/mL e 0,7 mg/mL
Substrato (D-xilose)	10	5 mM

A reação ocorre em Termociclador com gradiente de temperatura *My Cycler* (BioRad®), de modo que a temperatura é controlada durante toda a reação segundo programação do usuário. O processo está esquematizado na Figura 11. Para todos os valores de pH e para cada temperatura do experimento são feitos os controles negativos de reação, ou seja, amostras nas quais não é adicionada enzima, e sim o mesmo volume de tampão na qual a enzima se encontra.

Para os testes de atividade realizados visando encontrar temperatura e pH ótimos de reação, as concentrações de enzimas utilizadas foram: 0,67 mg/mL (13,74 μ M) e 0,22 mg/mL (4,29 μ M) para Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad}, respectivamente. A temperatura foi mantida em 65°C e variou-se apenas o pH a fim de se obter o valor de pH ótimo de atividade da enzima XI.

Figura 11 - Esquema para teste de atividade da enzima xilose isomerase (XI). A enzima é incubada por 2 horas com a solução tampão de reação, que além de conter o sistemas tampão do pH de teste propriamente dito, contém os cofatores necessários para haver atividade xilose isomerásica, CoCl_2 e MgSO_4 , ambos a 10 mM. O teste procede com a adição de D-xilose (5 mM, concentração de reação) e com controle de temperatura (30°C a 75°C, ensaio térmico para a atividade) por 30 minutos e posterior inativação da enzima (95°C por 5 minutos).

A quantificação do produto (D-xilulose) foi feita imediatamente ao final do teste de atividade, com o teste do carbazol-cisteína⁹⁴ adaptado para microplaca de 96 poços. O teste de quantificação e as quantidades dos reagentes utilizados estão esquematizados na Figura 12

Figura 12 - Método espectrofotométrico para quantificação de D-xilulose resultante da reação de isomerização da xilose isomerase com o substrato D-xilose (Método da cisteína-carbazol). Transfere-se para a placa de 96 poços (ELISA) 20 µL de amostra do teste de atividade. Adicionam-se 4,5 µL de solução aquosa 1,5% de Cloridrato de L-Cisteína monoidratado. Em seguida, 141 µL de 71% H₂SO₄ são transferidos aos poços. Imediatamente, adicionam-se 4,5 µL de solução 0,12% (em EtOH) de carbazol. A placa é deixada em repouso (temperatura ambiente, 25°C) por 1 hora. Decorrido este tempo, prossegue-se com a leitura da absorbância a 540 nm. Os dados são transferidos e analisados, de modo a ser gerada uma curva com o perfil de atividade da enzima; para isso, a absorbância a 540 nm dos controles sem enzima foram subtraídos dos dados referentes às amostras que continham enzima.

Para se obter a curva de concentração de xilulose produzida neste tempo de reação, foi feita primeiramente uma quantificação de soluções de concentrações pré estabelecidas de xilulose em água (de 0,1g/L a 2g/L), de modo que ao final, construiu-se uma curva-padrão relacionando absorbância a 540 nm (descontado o controle com apenas com água) e concentração de xilulose.

3.11 Estabilidade térmica por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica que se baseia na interação diferenciada de moléculas assimétricas com feixes de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita ⁹⁵(Figura 13).

Figura 13 - (A) Luz linearmente polarizada pode ser vista como a superposição de componentes circularmente polarizadas para direita e para esquerda de iguais amplitudes. (B) Diferenças na absorção de uma dessas componentes dão origem a elipticidade (CD) e rotação óptica (OR). Adaptado⁹⁶.

O Dicroísmo circular pode ser definido como a diferença entre a absorção das componentes circularmente polarizadas à esquerda e à direita (ΔA) ⁹², com “A” dada pela equação 1.

A elipticidade (θ) corresponde ao ângulo cujo arco é igual à razão entre os semi-eixos maior e menor da elipse. Esses valores se relacionam da seguinte forma:

$$\theta \text{ (graus)} = 180(\ln 10)(\Delta A / 4\pi) \quad (2)$$

Peptídeos e proteínas são amplamente estudados por CD, pois os principais centros quirais destas moléculas estão ao longo da cadeia principal. Por consequência, seus espectros de CD na região entre 180 e 260 nm (UV distante) provem informação que permite caracterizar e diferenciar estruturas secundárias (α -hélices, fitas- β , voltas e estruturas sem ordenação) presentes nessas moléculas ⁹⁷ (Figura 14)

Figura 14 - Espectro de CD no UV distante está associado a diversas estruturas secundárias. O espectro de hélice- α e folhas β são os mais comuns, mas podem ser encontrados muitos outros. Adaptado ⁹⁸.

Com a espectroscopia de CD, pode-se estudar também mudanças conformacionais, tanto sofridas devido a variações de solventes, temperatura (ensaios de desnaturação térmica) e de pH, quanto pela interação com ligantes.

Foram realizados ensaios com variação de temperatura para o intervalo de 10°C a 90°C, a fim de se obter a temperatura de transição (T_m) do estado enovelado para o estado não enovelado. Para investigar se ocorre a renaturação ou não da XI em diferentes valores de pHs, tanto o aquecimento quanto o resfriamento foram monitorados para um comprimento de onda. As taxas de aquecimento e resfriamento foram constantes e iguais a 1°C por minuto.

O experimento foi realizado no Grupo de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos, e os espectros de CD foram coletados a temperatura de 25°C utilizando o espectropolarímetro *JASCO J-720* (*JASCO Corporation*, Tóquio, Japão) na faixa do UV distante, no intervalo de 250 a 190 nm (com algumas alterações de acordo com as amostras) com resolução de 0,2 nm, em cubetas de quartzo de caminho óptico de 1mm. A sensibilidade foi mantida em 100 miligraus e o tempo de resposta em 0,5 segundo. O programa *Spectra Manager* (*JASCO*) foi usado para registro dos dados. Os espectros de CD foram recuperados empregando-se uma média de 8 varreduras, e foram filtrados com Transformada de Fourier, preservando as bandas típicas de cada um. Os espectros de CD podem ser obtidos em elipticidade (θ) e convenientemente convertidos para elipticidade molar ($[\theta]$), de acordo com a equação 3. Os espectros dos tampões utilizados foram subtraídos das amostras.

$$[\theta] = \theta / Cl \quad (3)$$

“C” é o valor da concentração da amostra e “l” o caminho óptico.

As soluções de XI, provenientes das etapas gerais de purificação, foram utilizadas por meio de CD, para analisar a integridade das estruturas secundárias em diferentes condições e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas por influência do pH e temperatura. Os ensaios de desnaturação térmica (com monitoramento de uma faixa de 260 a 200 nm no comprimento de onda) utilizaram uma variação temperatura que vai de 10°C a 90°, a uma taxa de aquecimento de 1°C por minuto. Foram empregadas apenas XIs que se encontravam no pH 7,5. Para os demais valores de pH (2,5; 4,5; 6,5 e 8,5, para XI de *X. campestris* e *B. adolescentis*, e 3,0 ; 5,0 e 9,0 para XI de *L. crispatus*) foi monitorado apenas um comprimento de onda, correspondente ao mínimo das curvas de CD para cada proteína.

Na Tabela 6 encontram-se os tampões utilizados durante os ensaios. As proteínas foram no dia anterior diluídas no tampão na faixa de pH de interesse e mantidas *overnight* para estabilização da estrutura, em uma concentração de 0,2 mg/mL. (4,1 μ M, 3,9 μ M e 6,8 μ M para X_{cc}, B_{ad} e L_{cr}, respectivamente).

Tabela 6 - Tampões utilizados nos ensaios de CD, para XI dos três organismos estudados.

Tampões	Conteúdo	Ensaio de CD
1 – pH 2,5	Glicina 20 mM e NaCl 50 mM	X _{cc} e B _{ad}
2 – pH 3,0	Glicina 20 mM e NaCl 50 mM	L _{cr}
3 – pH 4,5	Acetato de Sódio 20 mM e NaCl 50 mM	X _{cc} e B _{ad}
4 – pH 5,0	Acetato de Sódio 20 mM e NaCl 50 mM	L _{cr}
5 – pH 6,5	BIS-TRIS 25 mM e NaCl 50 mM	X _{cc} e B _{ad}
6 – pH 7,5	TRIS 25 mM e NaCl 100 mM	L _{cr}
7 – pH 7,5	HEPES 25 mM e NaCl 50 mM	X _{cc} e B _{ad}
8 – pH 8,5	TRIS 25 mM e NaCl 50 mM	X _{cc} e B _{ad}
9 – pH 9,0	Glicina 20 mM e NaCl 50 mM	L _{cr}

3.12 Espalhamento de Luz a baixo Ângulo (SAXS)

Em SAXS, uma amostra é iluminada por feixe monocromático de raios-X, de modo que os átomos que compõem a amostra interagem com a radiação incidente. Os elétrons pertencentes a esses átomos se comportam como se fossem livres, já que a energia dos fótons incidentes é bem menor que a de ligação deles nos átomos. Portanto, considerando que partículas livres e oscilantes produzem ondas eletromagnéticas em todas as direções e coerentes com a onda incidente (mesma frequência e fase), no caso de um espalhamento elástico. A intensidade da onda espalhada dependerá do ângulo de espalhamento (2θ)⁹⁹.

Em solução, as partículas estão desordenadas em movimento *browniano*⁹⁹, ao contrário do que ocorre em um cristal, onde as partículas estão organizadas de forma periódica em uma rede tridimensional. Ocorre portanto a perda de informação em experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, principalmente devido à necessidade de se tomar a média do espalhamento sobre todas as direções no espaço. Em sistemas monodispersos, pode-se determinar a dimensão máxima ($D_{\max}$) das proteínas analisadas, bem como seu raio de giro (R_g), que corresponde à distância quadrática média dos elétrons relativa a posição do centro de massa da molécula. Perpetuando os cálculos, pode-se obter a função distribuição de distâncias, $p(r)$. Um modelo tridimensional *ab initio* pode ser obtido a partir do fator de forma $I(q)$ vs. q , permitindo inferir comparações estruturais entre esse modelo gerado e de proteínas homólogas que já possuem estrutura de alta resolução (por cristalografia ou/e RMN) determinada.

As medidas de espalhamento de raios-x a baixo ângulo foram realizadas em três concentrações diferentes para as três proteínas, 4, 8 e 10mg/mL, buscando o melhor conjunto

de dados, levando-se em consideração boa estatística de espalhamento, estabilidade da amostra para os ângulos mais baixos de espalhamento e análise de efeitos causados pela radiação sobre a amostra. Os dados de SAXS foram coletados na linha SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo), utilizando um comprimento de onda $\lambda = 1,55\text{\AA}$, em detector bidimensional (MarCCD) disposto a 986,45 mm da amostra, cobrindo um intervalo de transferência de momento de $0,01512\text{\AA}^{-1} < q < 0,3383\text{\AA}^{-1}$.

A medida do espalhamento da solução de proteína e do tampão foi feita em dois frames de 150 segundos, para monitoramento de danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática e processamentos iniciais dos dados foram feitas através do programa *FIT2D*¹⁰⁰, normalizando-se os dados pela intensidade do feixe e multiplicando-se pela absorção da amostra. Foi feita também a subtração do espalhamento do tampão do espalhamento da amostra analisada, para se contabilizar apenas o efeito espalhador das moléculas de proteínas, pelo menos o mais próximo disso. O padrão bidimensional da solução de xilose isomerase será integrado em 2Θ . O R_g (raio de giro) então foi obtido por dois métodos distintos, primeiramente utilizando a equação de Guinier¹⁰¹.

$$I(q) = I(0)\exp\left(-\frac{R_g^2}{3}q^2\right) \quad (4)$$

onde q é o módulo do vetor espalhamento ($q = 4\pi\sin(\theta/\lambda)$), R_g é o raio de giro e $I(0)$ é a intensidade no ângulo zero; de uma outra forma, pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa *Gnom*¹⁰², onde também obteremos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o $D_{\text{máx}}$ do envelope protéico. Através da curva de espalhamento contida no arquivo de saída do programa *Gnom*¹⁰² e o valor de $I(0)$ (extrapolado) normalizado para a concentração de proteína na amostra, estimou-se sua massa molecular no programa *SAXS MoW*¹⁰³. A partir da estimativa da massa molecular da proteína em solução, pôde-se inferir de antemão o estado oligomérico das XIs em solução.

A determinação do modelo de baixa resolução a partir dos dados de SAXS foi realizada utilizando procedimento *ab initio*, implementado no programa *Gasbor*¹⁰⁴ e *Dammin*¹⁰⁵. De modo a tornar o modelo mais verossímil possível, corroborando os dados experimentais, buscou-se a minimização da função do parâmetro discrepância, “ χ ” que leva em consideração a intensidade da luz espalhada e aquela calculada do modelo gerado. Para melhor estatística dos resultados e qualidade do modelo final gerado, foram geradas 10 construções *ab initio* independentes em ambos os programas, *Gasbor*¹⁰⁴ e *Dammin*¹⁰⁵, que foram promediadas através do programa *DAMAVR*¹⁰⁶ e sobrepostas no programa

*SUPCOMB*¹⁰⁵. O programa *Crysol*¹⁰⁷ foi utilizado para proceder com comparações entre as curvas simuladas dos modelos de alta resolução, homólogos, e a curva de espalhamento experimental

3.13 Experimento de Desnaturação Térmica por SAXS

Foram realizados experimentos de desnaturação térmica de XI, analisados por meio de SAXS. Kratky demonstrou¹⁰¹ que existe uma relação entre estado enovelado e perfil da curva de Kratky ($I(q) \cdot q^2$ versus q)¹⁰⁸. Para moléculas totalmente enoveladas e tendendo para a globularidade, o perfil de Kratky será representado por um pico parabólico (“barriga”) e uma linha de base constante para grandes valores de q (Figura 15 curva A). A região final das curvas é a chamada região de Porod¹⁰¹. À medida que vai ocorrendo certo desenovelamento (Figura 15 curva B), o pico parabólico é deslocado em relação à posição anterior, e sua linha de base sofre uma elevação para grandes valores de q . Quando a molécula atinge um estágio totalmente desenovelado, o pico parabólico tende a desaparecer e um perfil hiperbólico aparece na região de q grande (Figura 15 curva C)¹⁰¹.

Figura 15 - Perfil de Kratky exemplificando relação entre este perfil e os estados de enovelamento ou desenovelamento. (A) estado enovelado, (B) parcialmente desenovelado e (C) estado totalmente desenovelado. Observa-se que à medida que se vai diminuindo o grau de enovelamento, ocorre o deslocamento do pico parabólico e inclinação da linha de base para grandes valores de q , gerando uma região com perfil hiperbólico¹⁰⁸.

Os experimentos procederam com uma temperatura inicial de 10°C. O aquecimento foi realizado em “passos” de 10°C, com tempo de repouso na temperatura a ser medida de 5 minutos. Quando a temperatura se aproximou da temperatura ótima da enzima, os “passos” de aquecimento foram diminuídos para 5 °C. A concentração da XI para estes testes foi de 0,4 mg/mL, para ambas Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad}. Os pHs testados foram 7,5 e 6,5, com gradiente de temperatura, pH 2,5, apenas na temperatura de 20°C, para Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad}. Já para Xyl_L_{cr}, o experimento não foi realizado.

3.14 Cristalografia

3.14.1 Ensaios de cristalização

Vários ensaios de cristalização de XIs foram conduzidos na busca de condições que resultassem em cristais bem formados e com alto poder de difração.

A cristalização dessa classe de proteínas é de extrema importância para entendermos alguns de seus mecanismos de funcionamento, uma vez que nossos alvos possuem somente 50% de identidade sequencial com as proteínas homólogas que possuem estruturas de alta resolução depositadas no *PDB*. Obtendo a estrutura de alta resolução para as XIs, poderíamos desenvolver, dependendo do tipo de estrutura que se obtém e do experimento que se faz, novos conceitos a respeito do mecanismo de ação dessa enzima ou mesmo confirmar os já discutidos anteriormente (Seção 1.7) .

Inicialmente, as condições de cristalização foram testadas utilizando o robô de cristalização (*Honeybee*), que aplica a técnica de difusão a vapor com gota sentada (*sitting drop*, do inglês), com um volume da gota de 1 µL de solução de proteína (nas concentrações 15 mg/mL e 26 mg/mL para B_{ad} e X_{cc}, respectivamente) e 1µL de solução de poço. Para isso, foram necessários vários conjuntos comerciais de soluções de cristalização, além de tentativas de reprodução de resultados disponíveis na literatura. Os testes foram todos realizados a 18°C. As soluções testadas nos testes pertencem aos seguintes conjuntos comerciais: *Cristal screen 1 e 2* (*Hampton*^{TM}); *Classic I e II Suite* (*QIAGEN*^{TM}); *PEGs I e II Suite* (*QIAGEN*^{TM}); *MPD Suite* (*QIAGEN*^{TM}) e *CryosSuite* (*QIAGEN*^{TM}).

Estas condições foram testadas para as proteínas recém purificadas por cromatografia de exclusão molecular (Seção 3.7).

3.14.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

A parte central da análise na estrutura cristalina é a coleta de dados de difração de raios-X; então, para que seja maximizada a completeza e qualidade dos dados, a estratégia deve ser eficiente, além de evitar que o cristal sofra muitos danos causados pelo excesso de exposição à radiação.

Vários cristais de Xilose Isomerase (de X_{cc} e B_{ad}) foram expostos ao feixe de raios-X para a verificação do poder de difração dessas amostras. Para esses experimentos, os cristais foram crioprotetidos com 15% de etileno glicol (exceto os cristais de X_{cc} formados a partir de soluções do *kit MPD Suite (QIAGEN^{TM})*, que já se tratam de soluções crioprotetoras) e coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de vapor de nitrogênio. As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas na linha de cristalografia de proteínas MX-2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), com sistema de aquisição sendo o detector *Marmosaic-225 CCD (MarUSA)*, a um comprimento de onda de 1,4586 Å. O conjunto de dados foi obtido através do método de rotação ($\Delta\varphi = 0,5^\circ$ para a $Xyl_{B_{ad}}$ e $\Delta\varphi = 1,0^\circ$ para a $Xyl_{X_{cc}}$). Designa-se $Xyl_{B_{ad}}$ e $Xyl_{X_{cc}}$ para Xilose Isomerase de *Bifidobacterium adolescentis* e de *Xanthomonas campestris*, respectivamente.

A autoindexação das primeiras imagens e as estratégias de coleta foram realizadas pelo programa *iMOSFLM*¹⁰⁹, onde valores aproximados dos parâmetros de célula (a , b , c , α , β e γ) e a orientação para o cristal foram encontrados. A partir da distribuição de vetores de diferença, gerados a partir de pontos recíprocos extraídos do padrão de difração, o programa apresenta os parâmetros de célula calculados para cada uma das 14 possíveis redes de Bravais. Para cada um desses retículos, são atribuídas penalidades correspondentes à distorção da célula triclinica, para que esta se transforme nas redes de maior simetria. Portanto, a escolha do sistema cristalino correto é então realizada em função dessa penalidade, de modo a eleger o sistema de maior simetria ainda com penalidade baixa.

A integração das imagens de difração e o refinamento dos parâmetros foram conduzidos com o programa *XDS*¹¹⁰. O escalonamento dos dados foi realizado com o programa *Scala* (CCP4¹¹¹).

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa *Matthews_coeff*¹¹¹, que faz uso da metodologia proposta por Matthews¹¹².

3.14.3 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

Sabe-se que grande limitação na resolução de uma estrutura cristalográfica através da coleta de dados de difração de raios-X é a obtenção das fases, $\alpha(hkl)$, das ondas espalhadas pelas nuvens eletrônicas dos conjuntos de átomos que fazem parte do cristal. Na tentativa de recuperar as fases da proteína foi aplicada a técnica de substituição molecular (*MR*, do inglês, *Molecular Replacement*) utilizando o programa *Phaser*¹¹³, disponível no pacote de programas cristalográficos CCP4¹¹¹. Comumente, a substituição molecular faz uso das informações de similaridade sequencial entre proteínas da mesma família, uma vez que se espera que estas possuam enovelamentos muito semelhantes. O modelo empregado para resolução da estrutura foi o de proteínas homólogas depositada no banco de dados *PDB*: 1A0D para XylB_{ad} (57% de identidade) e *PDB* 1A0C para XylX_{cc} (51% de identidade). Os modelos foram ajustados através do programa *Chainsaw*¹¹⁴ (CCP4¹¹¹).

Após a obtenção do conjunto inicial de fases, utilizamos o *phenix.xtriage*¹¹⁵, uma ferramenta para análise dos dados, ajudando a identificar *outliers*, presença de *twin*, e outros percalços a que um conjunto de dados possa estar sujeito.

O modelo inicial gerado pelo programa *Phaser*, foi submetido ao refinamento de parâmetros necessários para se descrever o modelo. Estes parâmetros devem ser modificados para melhorar o acordo com os dados experimentais, com abordagem tanto no espaço recíproco (acordo entre fatores de estrutura teóricos e experimentais) como no espaço real (inspeção dos mapas de densidade eletrônica do modelo).

Os dados cristalográficos foram obtidos recentemente e, portanto, ainda estão na etapa de refinamento do modelo. Para esse refinamento do conjunto de dados, estamos utilizando o programa *Phenix*¹¹⁶. Durante todo o processo, realizamos ciclos alternados de refinamento

com uma inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente as posições dos resíduos com *COOT*¹¹⁷.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Amplificação do gene *xylA* e construção de caudas *LIC*

A amplificação do gene *xylA* a partir do DNA genômico de *L. crispatus*, *B. adolescentis* e *X. campestris* e dos respectivos oligonucleotídeos (na tabela 2, da seção 3.2) gerou fragmentos em torno de 760 pb para o primeiro microorganismo e 1400 pb para os dois últimos, como previsto, como mostrado na Figura 16, abaixo.

Figura 16 - Resultado da amplificação do gene para a enzima xilose isomerase de *B. adolescentis* (A), *L. crispatus* (B) e *X. campestris* (C) em gel de agarose 0,8% TAE 1X. A esquerda encontra-se o marcador de massa molecular *Gene Ruler 1kb Ladder Plus* (Fermentas Life Sciences)

Após o tratamento de ambas as estruturas, plasmídeo e insertos, com T4 DNA polimerase (com atividade exonuclease 3'-5'), para formação de “caudas LIC” adesivas entre eles, procedeu-se com a junção ente o pPROEX_HTa_LIC e o *xylA* (para L_{cr} , B_{ad} e X_{cc}) em temperatura ambiente por 30 minutos em repouso.

4.2 Transformação em DH5 α

Em seguida foi feita a transformação por eletroporação e subsequente plaqueamento e cultivo por 16 horas em estufa a 37°C. Posteriormente, para validação dos processos anteriores, procedeu-se com um PCR de colônias, Figura 17. Para todas as construções o

resultado foi claramente positivo, com exceção da pPROEX_Hta_LICxylA_X_{cc} que exibe uma única banda mais clara e tênue (foram coletadas 5 colônias de cada construção, porém as que não apresentaram uma banda no gel para X_{cc} foram omitidas). A partir das colônias que apresentaram resultado positivo, foram preparados pré-inóculos (5 mL de meio LB com 100µg/mL finais de ampicilina, cultivo por 16 horas a 37°C, sob agitação) para extração de plasmídeos recombinantes. Em seguida foram feitas as transformações (choque térmico, omitido protocolo) em células de *E. coli* competentes BL21 (DE3).

Figura 17 - Resultado do PCR de colônia para validação da transformação e propagação dos vetores recombinantes pPROEX_Hta_LICxylA_X_{cc}, pPROEX_Hta_LICxylA_L_{cr}, e pPROEX_Hta_LICxylA_B_{ad} contendo os genes de interesse amplificados: *xylA*_X_{cc}, (A); *xylA*_B_{ad}, (B); e *xylA*_L_{cr}, (C). Gel de agarose 0,8% TAE 1X. À esquerda encontra-se o marcador de massa molecular *Gene Ruler 1kb Ladder Plus* (Fermentas Life Sciences).

4.3 Expressão heteróloga de Xilose Isomerase em *E. coli* e lise celular

Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com a construção recombinante pPROEX_Hta_LICxylA_X_{cc}, pPROEX_Hta_LICxylA_L_{cr}, e pPROEX_Hta_LICxylA_B_{ad} para dar início à expressão, conforme descrito na seção 3.4. Foram colhidas alíquotas antes e depois da indução com 0,5 mM de IPTG, com separação da fração de proteínas solúveis das insolúveis. O resultado pode ser visualizado a partir do SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) corado com *Comassie Brilliant Blue*, Figura 18. As indicações na figura, (A), (B) e (C), representam as XI de *L. crispatus*, *X. campestris* e *B. adolescentis*, respectivamente.

Figura 18 - SDS-PAGE (15% poliacrilamida) com resultado da expressão de XI de *L. crispatus* (1), *X. campestris* (2) e *B. adolescentis* (3) **M**- marcador de massa molecular: albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (24 kDa) e citocromo C (13 kDa). **A** – frações pré-indução; **P** – frações pós-indução IPTG 0,5 mM

No gel desnaturante da Figura 18, pode-se notar a expressão basal de proteínas bacterianas (colunas com marcação A), antes da indução com 0,5 mM de IPTG. Com a indução, pode-se perceber que significativo aumento da expressão das proteínas de interesse nas bandas em torno de 30 kDa, 49 kDa e 51 kDa, para *L. crispatus*, *X. campestris* e *B. adolescentis*, respectivamente.

Decorrido o tempo de expressão de XI, as bactérias foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise e lisadas, conforme a metodologia indicada na seção 3.5. Após o processo de sonicação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido, seguindo para os processos subsequentes de purificação: cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular.

4.4 Purificação de Xilose Isomerases

4.4.1 Cromatografia de Afinidade

Na purificação por cromatografia de afinidade, em matriz com cobalto (Co^{+2}), os sobrenadantes do processo anterior de extração e lise bacteriana foram incubados com resina de Co^{+2} *TALON TM Metal Affinity Resin* (BD Biosciences) equilibrada no tampão de Lise sem DTT e sem PMSF, por uma hora. A Figura 19 apresenta gel desnaturante das alíquotas de frações eluídas através das colunas de afinidade (com resina empacotada), de acordo com a metodologia descrita na seção 3.6.

Figura 19 - SDS PAGE - Cromatografia de afinidade XI de *B. adolescentis* (A), *X. campestris* (B) e *L. crispatus* (C); M - Marcador de massa molecular; 1- amostra aplicada ou extrato bruto; 2- fração não ligada, *flow through*; 3- primeira lavagem, com mesmo tampão de equilíbrio da resina (50 mM HEPES pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 5 mM imidazol); 4- segunda lavagem, mesmo tampão do equilíbrio mas com 15 mM de imidazol; 5- primeira eluição em solução tampão do equilíbrio com 200 mM de imidazol; 6 - lavagem do restante das proteínas ligadas a resina, com solução 2 M de imidazol. Os diferentes quadros destacados na figura representam as bandas de xilose isomerase nas diferentes frações.

As frações eluídas contendo XI apresentam alguns contaminantes característicos de cada expressão. A maior parte dos contaminantes que antes pertenciam ao extrato bruto (sobrenadante com proteínas solúveis pós-lise bacteriana) foi eliminada nesta técnica. Os conteúdos das frações que os poços “5” representam foram submetidos à próxima etapa da de purificação, a cromatografia por exclusão molecular.

4.4.2 Cromatografia por Exclusão Molecular

De acordo com metodologia empregada e descrita na seção 3.7, foram conseguidas frações com grau de pureza maior que 90% de XI. A Figura 20 expõe esse processo de purificação. As purificações foram realizadas em coluna *Superdex 75 HR 16/60 (GE)* acoplada ao sistema de cromatografia *AKTA Explorer 10 (GE)*.

As frações correspondentes aos picos de absorbância em 280 nm (cromatogramas expostos na Figura 20) foram reunidas em um mesmo volume e tiveram as concentrações de XI puras obtidas utilizando-se o espectrofotômetro *Nanodrop^{TM} 1000 (Thermo Scientific)*. O rendimento médio das purificações realizadas para as XIs de cada microorganismo durante o andamento deste projeto foi de 10 mg, 50mg e 45mg de enzima por litro de cultura de expressão, para XI de *B. adolescentis*, *X. campestris* e *L. crispatus*, respectivamente. No decorrer do projeto a taxa de expressão da Xyl_B_{ad} foi diminuindo, provavelmente devida às mutações específicas que podem ter ocorrido no respectivo plasmídeo recombinante com o tempo.

As amostras foram concentradas (ou não), em concentrador *Centricon (Milipore)*, com filtro de 10 kDa), de acordo com os experimentos que se seguiriam após esta última etapa de purificação.

Figura 20 - Resultado da cromatografia por exclusão molecular – Cromatograma e gel desnaturante. Purificação de XI de *B. adolescentis* (A), *X. campestris* (B) e *L. crispatus* (C). M representa o marcador de massa molecular. Os primeiros poços do gel desnaturante (1, 2 e 6) representam as fração injetadas na coluna de exclusão molecular, os poços 3, 5 e 7 representam as frações eluídas (com grau de pureza maior que 90%) e correspondem aos picos maiores nos seus respectivos cromatogramas. O poço 2 representa, em (A), um “ombro” no cromatograma, fração a qual ainda apresentava um contaminante de maior massa molecular. A coluna de exclusão molecular utilizada foi a *Superdex 75 HR 16/60* (GE), e o fluxo de tampão GF (50 mM HEPES pH 7,5 e 150mM de NaCl) foi de 0,5 mL por minuto com frações coletadas de acordo com cromatograma e resultados dos géis desnaturantes, no caso, as frações para estas purificações foram de 2 mL. As bandas da XI estão destacadas nos géis desnaturantes por retângulos.

4.5 Estimativa da massa molecular e raio hidrodinâmico (raio de *Stokes*) por cromatografia de exclusão molecular

Como descrito na seção 3.8, foi realizada a calibração da coluna de exclusão molecular com proteínas-padrão (*SIGMA-ALDRICH*, Estados Unidos da América) de massas moleculares e raios hidrodinâmicos conhecidos, de acordo com a Tabela 7. Para cada proteína, teve-se um volume de eluição registrado (V_E), além do parâmetro K_{av} , calculado a

partir deste volume e do volume “morto” da coluna (V_0 , que é igual ao volume de eluição do Dextran Azul, omitido da Tabela 7). O parâmetro ($K_{av} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$) também se encontra na Tabela 7. O volume total da coluna (V_T) é de 120 mL.

Tabela 7 - Padrões para calibração da *Superdex 75 HL* (GE) e respectivos volumes de eluição experimentais

Padrões	MM (kDa)	R_H (Å)	V_E (mL)	K_{av}
Conalbumina	75	-	58,21	0,175033
Anidrase	29	23,6	71,62	0,354072
Ovalbumina	44	30,5	63,88	0,250734
Rnase A	13,7	16,4	81,67	0,482851
Aprotinina	6,5	-	94,5	0,659546

A partir das curvas de calibração para as massas moleculares e para os raios hidrodinâmicos, Figura 21 (A) e (B), respectivamente, foram obtidas equações, como mostradas na própria figura. Essas equações relacionam os volumes de eluição (V_E) de cada amostra com as massas moleculares e raios hidrodinâmicos.

Figura 21 – (A) Curva de calibração para as massas moleculares em cromatografia de exclusão molecular *Superdex 75 HR 16/60* (GE). (B) Curva de calibração para os raios hidrodinâmicos na mesma coluna de exclusão molecular.

A partir das equações mostradas nas figuras, foram feitas as estimações para as massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, como mostrados na Tabela 8, abaixo.

Tabela 8 - Resultado do cálculo estimado das massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, a partir das equações geradas pelas curvas de calibração por cromatografia de exclusão molecular

Amostra	MM teórica ³ (kDa)	MM estimada ⁴ (kDa)	Erro Relativo (%)	R _H (Å)
Xyl_X_{cc} (pico 5, Figura 20)	98 (dímero)	115,33±6,41	17,68	49,26±1,55
Xyl_B_{ad} (pico 3, Figura 20)	102 (dímero)	120,66±6,91	18,29	50,99±1,58
Xyl_L_{cr} (pico 7, Figura 20)	30 (monômero)	36,27±0,46	20,91	26,65±1,24

³ Massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos

⁴ Massa molecular calculada a partir das curvas de calibração da Figura 21

Portanto, os resultados da estimação da massa molecular e raio hidrodinâmico por cromatografia de exclusão molecular indicam que a XI de *B. adolescentis* foi eluída na forma dimérica. (MM = 120,66 kDa, Tabela 8), enquanto a de *L. crispatus* se mantém monomérica (MM = 36,27 kDa, Tabela 8). Já a XI de *X. campestris* também foi eluída com a predominância de dímeros (MM = 115,33 kDa, Tabela 8).

4.6 Eletroforese em gel nativo como forma de determinação de massa molecular e raio hidrodinâmico (raio de *Stokes*)

O experimento de Eletroforese em Gel Nativo foi realizado durante este projeto para verificar se as amostras que seriam utilizadas para experimentos de SAXS se encontravam monodispersas, além de averiguar o estado de oligomerização (e portanto fazer nova estimativa de massa molecular) das mesmas. Na Figura 22, encontra-se um gel nativo utilizado na estimação de massa molecular das proteínas em questão migradas através do gel. As amostras utilizadas nesse gel são das proteínas que haviam sido eluídas da coluna de exclusão molecular *Superdex 75*, durante a etapa de purificação, sendo que as amostras mais concentradas de Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} foram obtidas por concentração em concentrador *Centricon* (Milipore, com filtro de 10 kDa).

Figura 22 - Eletroforese em gel nativo. MM: amostra com proteínas do padrão de massa molecular. 1: Xyl_X_{cc} com alta concentração (em torno de 10mg/mL). 2: Xyl_X_{cc} com baixa concentração (1mg/mL). 3: Xyl_L_{cr} a 3mg/mL. 4: Xyl_B_{ad} com alta concentração (em torno de 5mg/mL). 5: Xyl_B_{ad} a 0,5mg/mL. O quadriculado vermelho indica a possível forma tetramérica da Xyl_X_{cc}. Os quadriculados em azul representam as bandas de XI nas possíveis formas diméricas (tanto da Xyl_X_{cc} quanto da Xyl_B_{ad}). Já o quadriculado verde destaca a forma monomérica da Xyl_L_{cr}.

Como padrão de massa molecular, foi utilizado o conjunto de proteínas mostrado na Tabela 9, junto com os valores de raio hidrodinâmico (R_H ou raio de Stokes) conhecidos e suas distâncias de migração D no gel de 5,76 cm de extensão virtual (D_t)(as distâncias foram medidas pela imagem gerada por *scanner* do gel, mantendo as proporções).

Tabela 9 – Padrões para determinação de massa molecular e raio hidrodinâmico por eletroforese em gel nativo. D é a distância de migração da proteína no gel

Padrões	MM (kDa)	R_H (Å)	D (cm)	D/D_t
BSA	66	33,9	4,25	0,737
Aldolase	140	43	2,38	0,413
Catalase	232	52,2	1,19	0,206

A partir das curvas de calibração para as massas moleculares e para os raios hidrodinâmicos, Figura 23 (A) e (B), respectivamente, foram obtidas equações, como mostradas na própria figura. Essas equações relacionam as distâncias migradas por cada amostra no gel com as massas moleculares e raios hidrodinâmicos.

Figura 23 - (A) Curva de calibração para as massas moleculares em gel nativo. (B) Curva de calibração para os raios hidrodinâmicos em gel nativo

A partir das equações mostradas nas figuras, foram feitas as estimações para as massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, como mostrados na Tabela 10, abaixo.

Tabela 10 - Resultado do cálculo estimado das massas moleculares e raios hidrodinâmicos das XIs, a partir das equações geradas pelas curvas de calibração por gel nativo

Amostra	MM teórica ³ (kDa)	MM estimada ^v (kDa)	Erro Relativo (%)	R_H (Å)
Xyl_X_{cc} (quadriculado vermelho, Figura 22)	196(tetrâmero)	$194,83 \pm 6,06$	0,59	$48,24 \pm 1,81$
Xyl_X_{cc} (quadriculado azul, Figura 22)	98 (dímero)	$118,38 \pm 4,83$	20,80	$40,13 \pm 1,32$
Xyl_B_{ad}	102 (dímero)	$120,35 \pm 4,87$	17,99	$40,34 \pm 1,33$
Xyl_L_{cr}	30 (monômero)	$40,58 \pm 2,49$	35,28	$30,72 \pm 0,75$

³ Massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos

^v Massa molecular calculada a partir das curvas de calibração da Figura 23

Portanto o resultado do gel nativo (Figura 22) indica que a XI de *B. adolescentis* se apresenta em solução exclusivamente na forma dimérica. (MM = 120,35 kDa, Tabela 10), enquanto a de *L. crispatus* se mantém monomérica (MM = 40,58 kDa, Tabela 10). Já a XI de *X. campestris* se predomina dimérica (MM = 118,38 kDa, Tabela 10) em equilíbrio dinâmico com a forma tetramérica (MM = 194,83 kDa, Tabela 10).

4.7 Teste atividade

Os testes para quantificação da atividade xilose isomerásica foram realizados de acordo com a metodologia descrita na seção 3.10. Esses testes foram realizados com variação das condições nas quais a enzima se encontrava após a purificação por cromatografia de exclusão molecular. Ora manteve-se o valor de pH, variando-se a temperatura, de modo a se obter o valor de temperatura ótima neste pH, ora a temperatura era fixada, variando-se apenas os valores de pH.

A medida da concentração de D-xilulose produzida pela XI durante o teste de atividade requereu, como descrito na metodologia, através do método da cisteína-carbazol, uma curva padrão (Figura 24), que relaciona a absorbância a 540 nm com a concentração de xilulose na fração da solução resultante do teste de atividade.

Figura 24 - Curva-padrão do teste da cisteína-carbazol. Cálculo da concentração de xilulose no volume de teste, segundo a metodologia descrita na seção 3.10. A curva relaciona absorbância a 540 nm com a concentração de xilulose.

A enzima XI de *L. crispatus* não apresentou atividade durante todo o experimento. A razão pode estar no fato desta enzima não ter apresentado a forma dimérica ou tetramérica (considerada as formas ativas da XI) em solução (como constatado pela estimativa de estado oligomérico por gel nativo e cromatografia de exclusão molecular).

Já as XIs de *B. adolescentis* e *X. campestris* apresentaram atividade de conversão de D-xilose em D-xilulose que superou o descrito anteriormente com XIs de outras fontes^{11;26; 28; 30}. A atividade ótima registrada para XI de *B. adolescentis* foi de $(16,3 \pm 0,8)$ U/mg de proteína pura, na condição em que o valor de pH era 5,5 e temperatura 55,15 °C. Já a de *X. campestris* apresentou uma atividade ótima de $(7,5 \pm 0,7)$ U/mg, em pH 5,5 a 60,1 °C. Padronizando que 1 U/mg de enzima significa que 1 mg de enzima converte 1 μ mol de D-xilose em 1 μ mol de D-xilulose por minuto. O conteúdo de cada solução no teste de atividade está descrito na seção 3.10.

4.7.1 Atividade: XI de *B. adolescentis*

A Figura 25 (A) apresenta o perfil de atividade em função da temperatura para a XI de *B. adolescentis* para diferentes pHs (4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 9,0), além disso, também pode-se verificar a curva de atividade relativa para uma temperatura fixa em 55°C em função do pH (pontos extraídos da Figura 25 (A), ao redor da temperatura ótima na qual se obteve o maior valor de atividade nos experimentos realizados), Figura 25 (B).

Os perfis de atividade para os pHs 4,5 e 5,5 quase se equivalem, concentrando a atividade ótima da enzima nesta faixa. Ocorre a diminuição da atividade como o aumento do valor de pH, como se observa a partir do 6,5, no qual a atividade relativa se reduz praticamente em 40%. Pelo gráfico, os perfis de atividade nos pHs 7,5 e 9,0 são próximos.

Figura 25 - Perfil de atividade da enzima xilose isomerase de *B. adolescentis* sobre o substrato D-xilose. (A) para diferentes valores de pH (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,0, de acordo com legenda na própria figura) em função da temperatura, variando-se de 30 °C a 75°C, verifica-se que a atividade ótima geral para esta enzima reside no pH 5,5 e para temperatura em torno de 55,15 °C e é de $(16,3 \pm 0,8)$ U/mg de enzima pura. Os demais valores foram normalizados a partir desse valor ótimo, tomado como 100% de atividade; além disso, foram feitos ajustes polinomiais para as diversas curvas, com *fit polinomial* no programa ORIGIN 8.0 (OriginLab). (B) Atividade relativa em função do pH, para uma temperatura fixa de 60,1 °C.

4.7.2 Atividade: XI de *X. campestris*

A Figura 26 (A) apresenta o perfil de atividade em função da temperatura para a XI de *X. campestris* para diferentes pHs (4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 9,0), além disso, também pode-se verificar a curva de atividade relativa para uma temperatura fixa em 60 °C em função do pH (pontos extraídos da Figura 26 (A), ao redor da temperatura ótima na qual se obteve o maior valor de atividade nos experimentos realizados), Figura 26 (B).

Diferente do que ocorre com Xyl_B_{ad}, os perfis de atividade nos pHs 5,5 e 6,5 se sobrepõem, concentrando a faixa de pH ótimo nesses valores. Além disso, a proteína no pH 7,5 exibe maior atividade relativa que em pH 4,5. Então, para um valor fixo de temperatura na região de maior atividade, para todos os valores de pH, como mostrado na Figura 26 (B), observa-se o deslocamento da faixa ótima de atividade para valores mais altos de pH, comparados ao que se obteve com Xyl_B_{ad}.

Apesar da XI de *X. campestris* apresentar perfil de atividade para todos os valores de pH mais deslocados para temperaturas mais altas que a de *B. adolescentis*, o valor absoluto dessas atividades são menores. A diferença no perfil de atividade entre as duas enzimas pode estar atrelada à resposta alostérica de cada uma em função do ambiente químico na qual ela se encontra (tipo de tampão, força iônica, etc). Para ambas, maiores valores de atividade encontram-se deslocados para valores de pHs abaixo da neutralidade.

Para o pH 2,5 ambas as XIs não apresentaram atividade considerável.

Figura 26 - Perfil de atividade da enzima xilose isomerase de *X. campestris* sobre o substrato D-xilose. (A) Para diferentes valores de pH (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,0, de acordo com legenda na própria figura) em função da temperatura, variando-se de 30 °C a 75°C, verifica-se que a atividade ótima geral para esta enzima reside no pH 5,5 e para temperatura em torno de 60,1 °C e é de $(7,5 \pm 0,7)$ U/mg de enzima pura; além disso, foram feitos ajustes polinomiais para as diversas curvas, com *fit polinomial* no programa ORIGIN 8.0 (OriginLab) Os demais valores foram normalizados a partir desse valor ótimo, tomado como 100% de atividade. (B) Atividade relativa em função do pH, para uma temperatura fixa de 60,1 °C.

4.8 Ensaio Térmico por Dicroísmo Circular (CD)

Tendo como finalidade encontrar a temperatura de transição entre o estado enovelado e o estado desenovelado (T_m) da xilose isomerase de diferentes fontes biológicas, *X.campestris*, *B.adolescentis* e *L.crispatus*, foram realizados ensaios térmicos utilizando espectroscopia de dicroísmo circular (CD), conforme a metodologia descrita na seção 3.11.

A princípio foi feito um ensaio térmico variando-se a temperatura entre 10°C e 90°C, nas condições de trabalho iniciais, ou seja, logo após a purificação por cromatografia de exclusão molecular, em tampão GF (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 5% de glicerol em pH 7,5). Neste tampão, ocorria saturação da fotomultiplicadora do equipamento para menores comprimentos de onda, ou seja, o menor comprimento de onda conseguido foi de 202 nm. Para os ensaios subsequentes de dicroísmo circular, a concentração do tampão foi alterada, reduzindo a quantidade de HEPES e NaCl, para 25 mM e 50 mM, respectivamente. A Figura 27 apresenta algumas das curvas geradas e suavizadas no programa ORIGIN 8.0 (OriginLab) (não foram expostas todas as curvas representativas de todas as temperaturas monitoradas no experimento, para clareza da imagem)

Figura 27 - Ensaio térmico para desnaturação de xilose isomerase por CD. As soluções de enzimas que fizeram parte deste experimento pertenciam às frações purificadas a partir da cromatografia por exclusão molecular. As soluções empregadas neste caso eram todas tampões GF (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 5% de glicerol em pH 7,5). Todas as curvas foram geradas e suavizadas no programa ORIGIN. (A) Perfis de dicroísmo circular de XI de *B. adolescentis* em função do comprimento de onda para, ensaio térmico de 10°C a 90°C (sendo expostos convenientemente na figura apenas os perfis de temperaturas que descreveram mudança significativa comparado ao perfil de temperatura logo abaixo). (B) Perfis de dicroísmo circular de XI de *X. campestris* e de (C) *L. crispatus*.

A análise da Figura 27 sugere que tanto XI de *B. adolescentis* (A) quanto de *X. campestris* (B) possuem uma cadeia com maior susceptibilidade à perda de estrutura secundária, comparado a XI de *L. crispatus* (C). Esse fato pode ser explicado, considerando que as duas primeiras são constituídas de dois domínios principais, um barril α/β (N-terminal) rígido e um conjunto de hélices e alças (C-terminal), com maior flexibilidade, ou seja, sua cadeia polipeptídica como um todo se torna mais susceptível às variações térmicas. O domínio único da XI de *L. crispatus* é formado por um α/β barril, ou seja, a proteína não

apresenta uma resposta perturbatória para pequenas variações térmicas comparada as outras duas proteínas neste valor de pH.

A Figura 28 expõe os resultados para a xilose isomerase de *X. campestris*, cujos ensaios foram unicamente realizados nos pHs 6,5 (A) e 8,5 (B). Para os demais valores de pH, houve limitações experimentais referentes ao comportamento de enzima na solução tampão (precipitação e agregação em tampão acetato de Sódio de um dia para o outro). De acordo com a Figura 28, feitos os ajustes sigmoidais (com função *baseresponse*) no programa gráfico ORIGIN (OriginLab), obtiveram-se os seguintes valores de T_m : $(51,83 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ e $(60,5 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, para XI de *X. campestris* nos pHs 6,5 e 8,5 respectivamente. A perda de estrutura secundária foi irreversível para os dois valores de pH, mais pronunciada no pH 6,5 comparado ao pH 8,5, que obteve um máximo de 20% de reversibilidade, conforme verificado na figura.

Figura 28 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *X. campestris* para os pHs 6,5 (A) e 8,5 (B). α representa fração de estrutura secundária, sendo “1” para 100% de estrutura secundária e proteína enovelada, e “0” para proteína sem estrutura secundária ou desenovelada. Para ambos os valores de pHs, foram gerados ajustes sigmoidais no programa ORIGIN, o que permitiu calcular o valor de T_m , temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. Os valores de T_m para a Xyl_{Xcc} nos pHs 6,5 e 8,5 são, respectivamente, $(51,83 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ e $(60,5 \pm 0,3)^\circ\text{C}$. A perda de estrutura secundária foi irreversível para os dois valores de pH, mais pronunciada no pH 6,5 comparado ao pH 8,5, que obteve um máximo de 20% de reversibilidade. Para (C) não foi computado o perfil de resfriamento.

Na Figura 29 é exposto o resultado do ensaio para a enzima de *L. crispatus*, cujo valor de T_m extraído do gráfico é de $(57 \pm 1)^\circ\text{C}$. Para esta enzima foi realizado o experimento apenas para o pH 7,5. Portanto, ocorre perda quase total de estrutura secundária para temperaturas acima de 70°C .

Figura 29 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *L. crispatus* para o pH 7,5. Para o valor de pH considerado foi feito um ajuste sigmoidal no programa *Origin* (OriginLab), permitindo obter o valor de T_m , temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. O valor encontrado foi de $(57 \pm 1)^\circ\text{C}$. Não foi feito o monitoramento do resfriamento para este experimento.

Os perfis de desnaturação térmica por CD da xilose isomerase de *B. adolescentis* encontram-se na Figura 30, para os valores de pH 2,5, 6,5, 7,5 e 8,5. Os ajustes sigmoidais (com função *baseresponse*) no programa gráfico ORIGIN (OriginLab) permitiram calcular os seguintes valores de T_m : $(58,5 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, $(59,2 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ e $(63,5 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, para os pHs 2,6, 6,5 e 8,5, respectivamente. Já para o pH 7,5 esse valor não é obtido, por limitações experimentais (temperatura máxima no equipamento utilizado foi de 80°C).

Pode-se verificar que, de acordo com a Figura 30 (A), a proteína possui estrutura secundária com reversibilidade para este valor de pH. Entretanto, deve-se levar em consideração que, como será visto mais adiante com SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo) (seção 3.13), a proteína se apresenta num estado desenovelado neste pH mesmo em temperatura ambiente, o que sugere que a recuperação total de estrutura secundária (reversibilidade no CD) é facilitada quando já não há organização em termos de estrutura terciária. Ou seja, os motivos estruturais locais que ainda se mantêm neste valor de pH são facilmente recuperados mesmo não havendo estrutura terciária remanescente.

Esses resultados não estão de acordo com as curvas de atividade para esta enzima, pois, como se pode perceber pela Figura 25, a atividade da enzima para temperaturas mais elevadas aumenta para menores valores de pH e diminui consideravelmente com o aumento do pH. Essa diferença nesses perfis pode estar relacionada à presença de substrato e cofatores junto a proteína (presença no teste de atividade e ausência no experimento de CD), que

possivelmente sua presença reflita no aumento da estabilidade da estrutura terciária da Xyl_B_{ad}. A mesma discussão é válida para os resultados contraditórios da Xyl_X_{cc}.

Figura 30 - Perfil da desnaturação térmica de XI de *B. adolescentis* para os pHs 2,5 (A), 6,5 (B), 7,5 (C) e 8,5 (D). O α representa fração de estrutura secundária. Para todos os valores de pHs, foram gerados ajustes sigmoidais no programa ORIGIN, o que permitiu calcular o valor de T_m , temperatura de transição entre estado enovelado e estado desenovelado. Os valores de T_m para a Xyl_B_{ad} nos pHs 2,5, 6,5 e 8,5 são, respectivamente, $(58,5 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, $(59,2 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ e $(63,5 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Para o pH 7,5, o perfil da curva não permitiu se fazer o ajuste sigmoidal, pois, por limitações experimentais, não se conseguiu coletar dados para temperaturas maiores que 80°C (o T_m em vermelho indicado em (C) é apenas representativo e indica que o ajuste sugere seu valor em torno de 114°C , um valor puramente especulativo, pois não há dados coletados nesta região de interesse). A perda de estrutura secundária para um pH de 2,5 (A) é reversível. Para os demais valores de pH, a perda de estrutura secundária foi irreversível, salvo pH 7,5 que ainda recupera 50% da estrutura no limite de dados considerados.

4.9 Espalhamento de Luz a baixo Ângulo (SAXS)

Com a finalidade de estudar e conhecer a forma molecular e a estabilidade química adquiridas pela enzima xilose isomerase em solução, foram realizados estudos de espalhamento de raios-x a baixo ângulo, como descrito na seção 3.12. As curvas de espalhamento das XIs (subtraído o espalhamento do tampão) nas três concentrações do experimento foram sobrepostas, a partir do escalonamento pela concentração de cada uma, demonstrando que não havia efeito de concentração nas amostras, ou seja, qualquer uma das amostras poderia ser usada para gerar modelos. Para a Xyl_X_{cc}, Xyl_B_{ad} e Xyl_L_{cr}, foram utilizadas as curvas nas concentrações de 8 mg/mL, 4 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente. As amostras também não sofriam efeito por radiação, considerando o tempo de 300 segundos de exposição.

4.9.1 Envelope Molecular da XI de *B. adolescentis*

A Figura 31 expõe a curva de espalhamento experimental da Xyl_B_{ad} (a 4 mg/mL, em tampão GF [50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 % glicerol em pH 7,5]), as curvas simuladas dos modelos gerados pelos programas *Gasbor*¹⁰⁴ e *Dammin*¹⁰⁵ (de acordo com metodologia descrita na seção 3.12), e a curva de espalhamento a baixo ângulo simulado para estruturas de alta resolução e mais alta identidade com a Xyl_B_{ad} (pdb 1A0D).

Dos modelos gerados, o que mais se aproximou do formato adquirido pela proteína em solução foi o gerado pelo programa *Dammin*¹⁰⁵, cuja curva de espalhamento simulada se ajusta melhor à curva de espalhamento experimental, como mostra a Figura 31 (A). Pela Tabela 11 também é possível verificar este fato, considerando o valor de χ (discrepância), menor para o modelo gerado pelo *Dammin*¹⁰⁵, comparado ao gerado pelo *Gasbor*¹⁰⁴.

Figura 31 - Curvas de espalhamento para xilose isomerase de *B. adolescentis*. (A) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Dammin*¹⁰⁵ (linha azul) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). (B) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Gasbor*¹⁰⁴ (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). Em ambas as figuras, (A) e (B), encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 4).

Através da curva experimental extrapolada para valor de q nulo ($Gnom^{102}$), e considerando um valor de q_{max} de $0,2\text{\AA}^{-1}$ (valor desprovido do efeito da flexibilidade da molécula¹⁰¹), foi possível estimar uma massa molecular de 183,4 kDa para XI de *B. adolescentis* (Figura 32). Considerando a massa do monômero sendo aproximadamente 51 kDa, a Xyl_B_{ad} se apresenta em solução como um tetrâmero, segundo calculado pelo programa *SAXS MoW*¹⁰³, com erro relativo de 10,1%.

Figura 32– Janela do programa *SAXS MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do *Gnom*, e seus resultados para estimação da massa molecular da XI de *B. adolescentis*.

No programa *Gnom*¹⁰², e pelo método de Transformada Inversa de Fourier, foi gerada a curva de distribuição de distâncias (Figura 33), junto com a $p(r)$ simulada para o modelo de alta resolução, *pdb 1A0D*. Também pelo *Gnom*¹⁰², foram obtidos os valores de R_g e D_{max} (Tabela 11). As duas funções de distribuição de distâncias são muito parecidas, exceto pela região de maiores valores de r , o que significa que a proteína em solução apresenta

distâncias atômicas internas maiores que sua homóloga de alta resolução possui na rede cristalina.

Figura 33 – Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_B_{ad} (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha).

A partir da curva de espalhamento foram gerados modelos *ab initio* do envelope da proteína pelos programas *Dammin*¹⁰⁵ e *Gasbor*¹⁰⁴ (foram omitidos, pois os gerados pelo *Dammin*¹⁰⁵ apresentaram melhores parâmetros de ajustes). O resultado obtido após a média de 10 modelos é mostrado na Figura 34, alinhado pelo programa *SUPCOMB*¹⁰⁵ com o modelo tridimensional de alta resolução e mais alta homologia (pdb 1A0D).

Figura 34 – Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína XI de *B. adolescentis* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (pdb 1A0D) no programa *SUPCOMB*¹⁰⁵. As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior de 90° em relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior direito de 90° em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página.

As discrepâncias (χ) dos modelos gerados pelo programa *Dammin*¹⁰⁵ giraram em torno de 2,5 e o alinhamento tridimensional do modelo médio e o cristalográfico revelou um bom ajuste, mesmo apresentando uma discrepância de certa forma alta.

Os parâmetros estruturais derivados das curvas de ajustes são mostrados na Tabela 11

Tabela 11 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de *B. adolescentis*, obtidos por SAXS

	Experimental	DAM [†]	Gasbor*	Pdb 1A0D
R_g(Å)	(37,9 ± 0,1) (<i>Guinier</i>) (36,37 ± 0,01) (<i>Gnom</i>)	36,35	36,04	34,84
D_{máx}(Å)	105 ± 5	106,6	105,9	101,05
MM(KDa)	183,4	-	-	-
χ	-	2,770	2,832	9,667
Resolução^ε(Å)	18,567	-	-	-

[†] DAM , parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *Dammin*

*Gasbor, parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *Gasbor*

^ε Resolução: $2\pi/q_{\text{máx}}$

Em comparação aos valores de χ obtidos pelos programas *Dammin* e *Gasbor*, o valor de χ (Tabela 11) para o ajuste do modelo de alta resolução na curva experimental é alto. Pelo fato da dispersão nos dados ser baixa para altos valores de q (representando um avanço técnico nos equipamentos utilizados atualmente), mesmo uma curva simulada que se ajuste bem à curva experimental, como no caso da simulação de espalhamento a baixo ângulo criado no programa *Crysol*¹⁰⁷, o valor da discrepância acaba sendo alto para pequenos desvios no ajuste da curva simulada na experimental. Além disso, observa-se que o valor da discrepância para o ajuste feito pelo programa *Gasbor* é bem próximo ao do programa *Dammin*, mesmo a curva referente a esse ajuste (Figura 31 (B)) não estar exatamente permeando tão bem a curva experimental, como no caso da curva gerada pelo programa *Dammin* (Figura 31 (A)). Ocorre que o programa *Gasbor* não simula corretamente o efeito da camada de solvatação sobre sua curva de ajuste, o que causa esse deslocamento na vertical (mesmo sendo fiel à forma da curva experimental, o que lhe confere o valor de χ reduzido). Essa discussão vale também para Xyl_X_{cc}.

4.9.2 Envelope Molecular da XI de *X. campestris*

A Figura 35 expõe a curva de espalhamento experimental da Xyl_X_{cc} (a 8 mg/mL, em tampão GF [50 mM HEPES, 150 mMNaCl, 5 % glicerol em pH 7,5]), os ajustes feitos pelos programas *Gasbor*¹⁰⁴ e *Dammin*¹⁰⁵ (de acordo com metodologia descrita na seção 3.12), e curva de espalhamento a baixo ângulo simulado para estruturas de alta resolução e mais alta identidade com a Xyl_X_{cc} (pdb 1A0C).

Dos modelos criados, da mesma forma com Xyl_X_{cc} , o que possivelmente mais se aproximou do formato adquirido pela proteína em solução foi o gerado pelo programa *Dammin*¹⁰⁵, cuja curva de espalhamento simulada se ajusta melhor à curva de espalhamento experimental (Figura 35(A)). Pela Tabela 12 também é possível verificar este fato, considerando o valor de χ (discrepância), menor para o modelo gerado pelo *Dammin*¹⁰⁵, comparado ao gerado pelo *Gasbor*¹⁰⁴.

Figura 35 - Curvas de espalhamento para xilose isomerase de *X. campestris*. (A) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Dammin* (linha azul) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0C) (linha vermelha). (B) Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Gasbor* (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 1A0D) (linha vermelha). Em ambas as figuras, (A) e (B), encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 4).

Através da curva experimental extrapolada para valor de q nulo ($Gnom^{102}$), e considerando um valor de q_{max} de $0,3\text{\AA}^{-1}$ (neste caso não se percebeu efeito da flexibilidade da molécula na curva de espalhamento na região de $Porod^{101}$), foi possível estimar uma massa molecular de 188,1 kDa para XI de *X. campestris* (Figura 36). Considerando a massa do monômero sendo aproximadamente 49 kDa, a Xyl_Xcc se apresenta em solução como um tetrâmero, segundo calculado pelo programa *SAXS MoW*¹⁰³, com erro relativo de 4 %.

Figura 36 – Janela do programa *SAXS MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do *Gnom*, e seus resultados para a estimação da massa molecular da xilose isomerase de *X. campestris*

No programa *Gnom*¹⁰², e pelo método de Transformada Inversa de Fourier, foi gerada a curva de distribuição de distâncias (Figura 37, junto com a $p(r)$ simulada para o modelo de alta resolução, *pdb 1A0C*. Também pelo *Gnom*¹⁰², foram obtidos os valores de R_g e D_{max} (Tabela 12). Percebe-se que as duas distribuições de distâncias estão muito próximas, o que significa que a proteína em solução apresenta distâncias atômicas internas equivalentes a sua homóloga de alta resolução.

Figura 37 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_{Xcc} (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 1A0C) (linha vermelha).

A partir da curva de espalhamento foram gerados modelos *ab initio* do envelope da proteína pelos programas *Dammin*¹⁰⁵ e *Gasbor*¹⁰⁴ (foram omitidos, pois os gerados pelo *Dammin*¹⁰⁵ apresentaram melhores parâmetros de ajustes). O resultado obtido após a média de 10 modelos é mostrado na Figura 38, alinhado pelo programa *SUPCOMB*¹⁰⁵ com o modelo tridimensional de alta resolução e mais alta homologia (pdb 1A0C).

Figura 38 - Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína XI de *X. campestris* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (*pdb 1A0C*) no programa *SUPCOMB*¹⁰⁵. As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior em relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior direito de 90° em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página

As discrepâncias (χ) dos modelos gerados pelo programa *Dammin*¹⁰⁵ giraram em torno de 2,5, assim como com a xilose isomerase de *B. adolescentis*, e o alinhamento tridimensional do modelo médio e o cristalográfico revelou um bom ajuste.

Os parâmetros estruturais derivados das curvas de ajustes são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de *X. campestris*, obtidos por SAXS

	Experimental	DAM [†]	Gasbor*	Pdb 1A0D
R_g(Å)	(36,3 ± 0,1) (<i>Guinier</i>) (35,00 ± 0,01) (<i>Gnom</i>)	34,97	34,52	34,25
D_{máx}(Å)	105 ± 5	106,5	105,7	104,2
MM(KDa)	188,1	-	-	-
χ	-	2,433	2,515	12,861
Resolução^ε(Å)	20,106	-	-	-

[†] DAM , parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *DAMMIN*

*Gasbor, parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *Gasbor*

^ε Resolução: $2\pi/q_{máx}$

Referente ao ajuste da curva de espalhamento simulada para a estrutura de alta resolução na de espalhamento experimental, o valor da discrepância (χ) é consideravelmente alto, mesmo essas curvas estando visivelmente bem ajustadas. A explicação para esse fato e para o deslocamento vertical (para altos valores de q), da curva de ajuste obtida pelo programa *Gasbor*, são as mesmas já discutidas para Xyl_B_{ad}.

4.9.3 Envelope Molecular da XI de *L. crispatus*

A Figura 39 expõe a curva de espalhamento experimental da Xyl_L_{cr} (a 10 mg/mL, em tampão GF [50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 % glicerol em pH 7,5]), o ajuste feito pelo programa *Gasbor*¹⁰⁴(de acordo com metodologia descrita na seção 3.6), e curva de espalhamento a baixo ângulo simulado para estruturas de alta resolução e mais alta identidade com a Xyl_L_{cr} (pdb3P6L).

O modelo gerado para esta proteína e que se aproximou do formato adquirido pela proteína em solução (pelo ajuste das curvas) foi gerado pelo programa *Gasbor*¹⁰⁴ e as imagens são expostas na Figura 42. Através da curva experimental extrapolada para valor de q nulo (*Gnom*²¹), e considerando um valor de q_{max} de 0,3 Å⁻¹(neste caso se percebeu leve efeito da flexibilidade da molécula na curva de espalhamento na região de *Porod*¹⁰¹), foi possível estimar uma massa molecular de 30,7 kDa para XI de *L. crispatus* (Figura 40). Considerando a massa do monômero sendo aproximadamente 30 kDa, a Xyl_L_{cr} se apresenta em solução como um monômero, segundo calculado pelo programa *SAXS MoW*, com erro de 2,3 %.

Figura 39 - Espalhamento experimental (círculos com barras de erro), resultado do ajuste no programa *Gasbor* (linha verde) e curva simulada para modelo de alta resolução (pdb 3P6L) (linha vermelha). Encontra-se um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 4), cujo valor neste caso é de $(20,1 \pm 0,1) \text{ \AA}$

No programa *Gnom*¹⁰², e pelo método de Transformada Inversa de Fourier, foi gerada a curva de distribuição de distâncias (Figura 41, junto com a $p(r)$ simulada para o modelo de alta resolução, *pdb 3P6L*. Também pelo *Gnom*¹⁰², foram obtidos os valores de R_g e D_{max} (Tabela 13). Percebe-se que as duas distribuições de distâncias diferem razoavelmente na região de r maiores, o que significa que a proteína em solução se apresenta mais alongada comparada a sua homóloga de alta resolução. Essa diferença pode ser explicada pelo fato das proteínas não apresentarem alta identidade (28%). Mesmo havendo essa diferença, essa estrutura de alta resolução foi utilizada pois, além de representar maior homologia pela *Xyl_Lcr*, ela é formada por α/β barril.

Figura 40 - Janela do programa SAXS *MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do *Gnom*, e seus resultados para a estimação da massa molecular da xilose isomerase de *L. crispatus*

Figura 41 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de Xyl_Lcr (linha preta com barras de erro), e simulada para o modelo de alta resolução (pdb 3P6L) (linha vermelha).

A partir da curva de espalhamento foram gerados modelos *ab initio* do envelope da proteína pelo programa *Gasbor*. O resultado obtido após a média de 10 modelos é mostrado na Figura 42, alinhado e sobreposto pelo programa *SUPCOMB*¹⁰³ com o modelo tridimensional de alta resolução e mais alta identidade (pdb 3P6L).

Figura 42 - Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína XI de *L. crispatus* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga (pdb 3P6L) no programa *SUPCOMB*¹⁰⁷. As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior em relação ao eixo paralelo à direção da largura da página, com exceção da imagem do centro, rotacionada da imagem do canto superior esquerdo de 90° em relação ao eixo paralelo à direção do comprimento da página

Tabela 13 - Parâmetros estruturais da enzima xilose isomerase de *L. crispatus*, obtidos por SAXS

	Experimental	Gasbor*	Pdb3P6L
R_g(Å)	(20,1 ± 0,1) (<i>Guinier</i>) (20,80 ± 0,01) (<i>Gnom</i>)	19,15	18,68
D_{máx}(Å)	65 ± 5	62,14	57,38
MM(KDa)	30,7	-	-
χ	-	2,314	2,400
Resolução^ε(Å)	18,921	-	-

*Gasbor, parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *Gasbor*

^ε Resolução: $2\pi/q_{\text{máx}}$

Conclui-se então mais uma vez que a Xyl_Lcr se apresenta em solução na sua forma monomérica. Portanto, por ter sido expresso apenas o chamado domínio N-terminal (de acordo com o gene *xylA* no genoma de *L. crispatus* (NZ_GG704613.1), ou seja, o domínio que estava em falta na Xyl_Lcr (o chamado domínio C-terminal, geralmente composto por “braço” de alças e hélices), e que está presente na maioria das XI expressas estudadas até o momento, este é essencial para a atividade da enzima, visto que muito provavelmente ele atua na formação do dímero (e consequentemente na do tetrâmero), forma ativa da enzima, como constatada por estudos prévios das XIs conhecidas⁵⁸.

Observa-se que o valor da discrepância para o ajuste feito pelo programa *Gasbor* é baixo, mesmo a curva referente a esse ajuste (Figura 39) não estar exatamente permeando tão bem a curva experimental. Ocorre que o programa *Gasbor* não simula corretamente o efeito da camada de solvatação sobre sua curva de ajuste, o que causa esse deslocamento na vertical (mesmo sendo fiel à forma da curva experimental, o que lhe confere o valor de χ reduzido).

4.10 Desnaturação Térmica por SAXS

Os experimentos de desnaturação térmica por meio de SAXS foram realizados para duas das três xiloses isomerases (de *B. adolescentis* e *X. campestris*).

Foram gerados os perfis de Kratky nos pHs 7,5 e 6,5, passando a proteína de um estado enovelado para um estado desenovelado e de maior flexibilidade em função da temperatura; para o pH 2,5, apenas constatou-se que as proteínas já se encontravam na forma desenovelada em 20°C, portanto, as demais temperaturas não foram analisadas. Para a XI de *L. crispatus* não foi realizado este experimento, ficando este como perspectiva futura.

4.10.1 Desnaturação térmica por SAXS: XI de *B. adolescentis*

A Figura 43(A) expõe o resultado do experimento de desenovelamento para a XI de *B. adolescentis* em pH 7,5; nela pode-se perceber que inicialmente, mesmo à temperaturas mais amenas (em torno de 20°C), a flexibilidade da molécula aumenta à medida que a temperatura vai aumentando, mantendo-se a estrutura globular enovelada da molécula (representada na forma tetramérica, como constatado anteriormente pela geração do modelo *ab initio* também com SAXS, seção anterior).

Entre 60°C e 65°C, inicia-se a diminuição da intensidade na região do pico parabólico, representando a perda de estrutura globular da molécula, ou seja, a proteína desenovela progressivamente à medida que a temperatura vai aumentando, até atingir um estado completamente desenovelado em torno de 80°C.

Estudos futuros poderiam ser feitos para averiguar detalhadamente esse processo: o tetrâmero vai se dissociando a dímeros, os dímeros em monômeros e os monômeros individualmente vão se desenovelando.

Já na Figura 43(B), em pH 6,5, a proteína mantém uma estrutura rígida nas temperaturas de 20°C e 30°C, a partir daí a flexibilidade aumenta, até que entre 55°C e 60°C o desenovelamento se inicia rapidamente, e em 65°C a estrutura já não se encontra mais globular. Neste caso, há a concordância entre os resultados exibidos aqui por SAXS e os obtidos por CD (seção 4.8), pois, considerando os dois valores de pH, 6,5 e 7,5, há o aumento da estabilidade térmica da estrutura secundária (Figura 30) acompanhado pelo aumento da estabilidade térmica da estrutura terciária (Figura 43).

A Figura 44 apresenta a curva de Kratky para Xyl_B_{ad} no pH 2,5. Como se pode notar, a proteína já se apresenta em um estado desenovelado, pois não há a presença do pico parabólico (“barriga”) no gráfico, além disso, a linha de base se encontra inclinada para cima, o que significa que a flexibilidade da molécula é alta. Ou seja, mesmo possuindo um perfil de atividade mais deslocado para valores de pH abaixo da neutralidade, como observado anteriormente (seção 4.7.1.), o que concordaria com a hipótese de um enovelamento mais estável em ambientes ácidos (já que Xyl_B_{ad} apresenta uma atividade alta em pH 4,5), a proteína perde rapidamente seu enovelamento quando caminhando para um pH abaixo de 4,5. Entretanto, confirma-se a necessidade de realização deste experimento para valores de pH

entre 2,5 e 6,5, e além de estudo completo na presença e ausência de substrato/inibidor, na presença e ausência de cofatores.

Outra observação importante é de que mesmo não havendo estrutura terciária em pH 2,5, existe a manutenção, para este valor de pH, de dobramentos (enovelamento) locais, o que pode ser entendido pela Figura 30 (A). Conclui-se então que para Xyl_B_{ab} a supressão da atividade está diretamente relacionada a ausência de enovelamento terciário e que, por hipótese, poderia estar atrelado a não dimerização ou tetramerização da proteína (os dobramentos locais que ainda há para este pH não são suficientes para formação do oligômero ativo)

Figura 43 - Experimentos de desnaturação térmica por SAXS da xilose isomerase de *B. adolescentis*. (A) Em pH 7,5; e (B) em pH 6,5. O início da desnaturação em pH 7,5 está entre 60°C e 65°C, já em pH 6,5 está entre 55°C e 60°C. O abaixamento da “barriga” das curvas indica a perda de estrutura enovelada e o levantamento da linha de base na região de Porod (final da curva) representa o aumento da flexibilidade da molécula¹⁰¹.

Figura 44 - Perfil de Kratky para xilose isomerase de *B. adolescentis* em pH 2,5 em 20°C

4.10.2 Desnaturação térmica por SAXS: XI de *X. campestris*

A Figura 45(A) expõe o resultado do experimento de desenovelamento para a XI de *X. campestris* em pH 7,5; nela pode-se perceber, assim como com Xyl_B_{ad}, que inicialmente, mesmo a temperaturas mais amenas, a flexibilidade da molécula aumenta à medida que a temperatura vai aumentando, mantendo-se a estrutura globular enovelada da molécula (também no estado tetramérico, como constatado anteriormente). Entre 60°C e 65°C, inicia-se a redução na intensidade do pico parabólico da curva, até sua completa extinção em 75°C, representando o estado completamente desenovelado da proteína. Já na Figura 45(B), em pH 6,5, a proteína se apresentou menos estável, pois mantém uma estrutura rígida até 20°C (o experimento foi realizado a partir de 10°C, mas foi exposto a partir de 20°C, pois as curvas não se alteravam até então). A partir de 30°C a flexibilidade aumenta, até que entre 40°C e 50°C o desenovelamento se inicia rapidamente, e em 55°C a estrutura já não se encontra mais globular.

Figura 45 - Experimentos de desnaturação térmica por SAXS para xilose isomerase de *X. campestris*. (A) Em pH 7,5; e (B) em pH 6,5. O início da desnaturação em pH 7,5 está entre 60°C e 65°C, já em pH 6,5 está entre 40°C e 50°C. O abaixamento da “barriga” das curvas indica a perda de estrutura enovelada e o levantamento da linha de base na região de Porod (final da curva) representa o aumento da flexibilidade da molécula¹⁰¹.

O resultado obtido condiz com o que se observou por dicroísmo circular (CD) na seção 4.8: o aumento da estabilidade térmica da estrutura secundária (por CD) acompanha o aumento da estabilidade térmica da estrutura terciária (por SAXS), o que faz sentido, visto que hierarquicamente analisando, o enovelamento terciário depende das interações (eletrostáticas ou simplesmente polares) que podem ocorrer entre as estruturas secundárias já formadas. Ou seja, juntos, os resultados obtidos por SAXS e CD obedecem à hierarquia estrutural do enovelamento protéico (o mesmo se observou com Xyl_B_{ad}).

A Figura 46 apresenta a curva de Kratky para Xyl_X_{cc} no pH 2,5. Como se pode notar, a proteína já se apresenta em um estado desenovelado, assim como o observado para Xyl_B_{ad} (onde já se fez uma discussão mais detalhada sobre este fato), pois não há a presença do pico parabólico no gráfico, além disso, a linha de base se encontra inclinada para cima, o que significa que a flexibilidade da molécula é alta.

Para ambas, Xyl_B_{ad} e Xyl_X_{cc}, a estabilidade da estrutura terciária varia de acordo com o valor de pH: aumentando para maiores pHs e diminuindo para os menos valores de pH.

Figura 46 - Perfil de Kratky para xilose isomerase de *X. campestris* em pH 2,5 na temperatura de 20°C

4.11 Cristalografia

4.11.1 Ensaios de cristalização

A análise da triagem de condições de cristalização, 72 horas após a montagem das placas, indicou o aparecimento de cristais nas condições explicitadas na Tabela 14

Tabela 14 - Ensaio de cristalização. Condições em que XI formaram cristais.

Condição/kit Comercial	Conteúdo	Proteína que cristalizou
E7/PEGI Suite (QIAGEN™)	0,2 M CaCl ₂ , 20% PEG 3350	Xyl_B _{ad} e Xyl_X _{cc}
F8/PEGI Suite (QIAGEN™)	0,2 M Formato de Mg, 20% PEG 3350	Xyl_B _{ad}
C9/PEGII Suite (QIAGEN™)	0,2 M MgCl ₂ , 0,1M TRIS pH 8,5, 16% PEG 3350	Xyl_X _{cc}
C6/MPD Suite (QIAGEN™)	0,2 M Acetato de Amônio, 40 % MPD	Xyl_X _{cc}

Os cristais eram visivelmente bem formados. Estes se mostraram em tamanho adequado para experimentos de difração de raios-X. Não há fotografia desses cristais obtidos devido ao fato deles terem sido observados em local sem câmera apropriada.

4.11.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

Os experimentos de coleta e processamento de dados foram feitos em colaboração com a aluna de doutorado Amanda Bernardes, pertencente ao mesmo grupo de pesquisa no qual este projeto teve andamento. Vários cristais de XIs foram testados, sempre em temperatura criogênica (100 K), crioprotetidos com a adição de etileno glicol 15% (v/v) à solução de cristalização quando necessária a adição de agentes crioprotetores. Os conjuntos de

dados de difração de raios-X de mais alta resolução, utilizado posteriormente para obtenção dos modelos estruturais, foram coletados na linha de cristalografia de proteínas MX-2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). Os cristais apresentaram padrões de difração bem definidos, aparentemente com ausência de sobreposição de pontos, ou *overlaps* (Figura 47). No caso os da Xyl_B_{ad}, o padrão de difração mostrado na Figura 47(A) pertence a um cristal da condição F8 (Tabela 14), já para Xyl_X_{cc} a difração mostrada na Figura 47(B) foi de um cristal da condição C9 (Tabela 14).

Figura 47 - Padrão de difração para os cristais de XIs de *Bifidobacterium adolescentis* (A) e *Xanthomonas campestris* (B)

A autoindexação das primeiras imagens e as estratégias de coleta foram realizadas no programa *iMOSFLM*¹⁰⁹, onde o ângulo de rotação estimado que não gerava *overlaps* foi de 0,5° para a Xyl_B_{ad} e 1,0° para a Xyl_X_{cc}. Além disso, a estratégia realizada apresentava o número de imagens a ser coletado, que renderia completeza suficiente de acordo com os grupos espaciais apresentados pelos cristais, que estão especificados na Tabela 15. Valores aproximados dos parâmetros de célula (*a*, *b*, *c*, α , β e γ) e a orientação para o cristal foram encontrados (Tabela 15).

A integração das imagens de difração e o refinamento dos parâmetros foram conduzidos pelo programa *XDS*¹¹⁰, e o escalonamento dos dados realizados com o programa

Scala (CCP4¹¹¹). Parâmetros e estatísticas desse conjunto também se encontram na tabela a seguir.

Tabela 15 - Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos da proteína Xilose Isomerase de *Bifidobacterium adolescentis* (Xyl_B_{ad}) e *Xanthomonas campestris* (Xyl_X_{cc})

Parâmetros	XylB _{ad}	XylX _{cc}
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	C2
Moléculas na unidade assimétrica	2	2
Parâmetros da célula unitária		
a (Å)	88,78	129,83
b (Å)	123,98	79,28
c (Å)	78,63	100,44
Ângulos (°)	-	β = 125
Intervalo de resolução (Å)	48,68 – 1,70 (1,79 – 1,70)	43,59 – 2,00 (2,11 – 2,00)
Número de imagens	265	180
Δφ (°)	0,50	1,00
Mosaicidade	0,22	0,31
Número de reflexões	485458 (63389)	200703 (26333)
Multiplicidade	5,1 (4,7)	3,6 (3,3)
Completeza (%)	99,7 (98,4)	99,3 (96,6)
R_{merge}†	0,069 (0,543)	0,084 (0,474)
⟨I/σ(I)⟩	15,4 (2,7)	11,9 (2,6)

† $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|$, onde $I_i(hkl)$ é a intensidade observada para $I(hkl)$ e $\langle I(hkl) \rangle$ é a média das intensidades. Entre parênteses os valores referentes à camada mais externa de resolução.

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa *Matthews_coeff* (CCP4¹¹¹), que faz uso da metodologia proposta por Matthews¹¹², considerando a massa molecular de cada monômero sendo aproximadamente 50 kDa. Essa análise resultou na presença de duas moléculas destas proteínas em cada unidade assimétrica do cristal com conteúdo de solvente de aproximadamente 40%.

4.11.3 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

Para a recuperação das fases da proteína aplicou-se a técnica de substituição molecular através do programa *Phaser*¹¹³, disponível no pacote de programas cristalográficos CCP4¹¹¹. Os modelos empregados para resolução das estruturas foram as estruturas homólogas de maior identidade com Xyl_B_{ad} e Xyl_X_{cc} depositadas no banco de dados *PDB*, ambas com homologia girando em torno de 50 % de acordo com o servidor *BLAST*¹¹⁸. Após escolha da solução correta (melhor estatística e ajuste), o empacotamento cristalino das moléculas foi manualmente inspecionado.

Após esse passo, iniciou-se o processo de refinamento utilizando o programa *Phenix*¹¹⁶. Vários ciclos de refinamento no espaço real (modificações manuais do modelo, através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica usando o programa gráfico *Coot*¹¹⁷), alternados com cálculos intermediários no espaço recíproco para refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, estão sendo realizados com os conjuntos de dados. O monitoramento da concordância do modelo com os dados experimentais está sendo conduzido através da análise da variação do fator R_{factor} , juntamente com o fator R_{free} . Os resultados de cristalografia expostos nesta dissertação fazem referência apenas ao enovelamento geral das XIs, cujas estruturas estão em fase avançada de refinamento.

Foi utilizado na análise a visualização e sobreposições das imagens de alta resolução geradas pelo programa *PYMO*L (DeLano Scientific LLC). Na Figura 48 encontram-se os modelos de alta resolução gerados para a XI de *B. adolescentis*. Nesta figura constam o monômero de Xyl_B_{ad} (A), as moléculas da unidade assimétrica (B), a superposição entre o monômero da Xyl_B_{ad} e o monômero da XI de maior homologia (pdb 1A0D) (C), e o tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica (D). Como se pode notar, o enovelamento da Xyl_B_{ad} se manteve de acordo com sua homóloga, ou seja, um domínio N-terminal formado por um barril α/β e um domínio C-terminal formado por um “braço” de alças e hélices.

Figura 48 - Estrutura de alta resolução da proteína xilose isomerase de *B. adolescentis*. (A) monômero de Xyl_B_{ad}. (B) o conteúdo da unidade assimétrica. (C) a superposição entre o monômero da Xyl_B_{ad} (lilás) e o monômero da XI de maior identidade (pdb 1A0D), em azul claro. (D) tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica

Na Figura 49 encontram-se os modelos de alta resolução gerados para a XI de *X. campestris*. Nesta figura constam o monômero de Xyl_X_{cc} (A), as moléculas da unidade assimétrica (B), a superposição entre o monômero da Xyl_X_{cc} e o monômero da XI de maior identidade (pdb 1A0C) (C), e o tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica (D). Como se pode notar, o enovelamento da Xyl_X_{cc} se manteve de acordo com sua homóloga, ou seja, um domínio N-terminal formado por um barril α/β e um domínio C-

terminal formado por um “braço” de alças e hélices, assim como observado também com Xyl_B_{ad}.

Figura 49 - Estrutura de alta resolução da proteína xilose isomerase de *X. campestris*. (A) monômero de Xyl_X_{cc}. (B) o conteúdo da unidade assimétrica. (C) a superposição entre o monômero da Xyl_X_{cc} (rosa) e o monômero da XI de maior identidade (pdb 1A0C), em azul claro. (D) tetrâmero gerado por operações de simetria a partir da unidade assimétrica

As formas tetraméricas globulares obtidas por operações de simetria nas unidades assimétricas das duas XIs (de *X. campestris* e *B. adolescentis*) corroboram os modelos *ab initio* de baixa resolução obtidos por SAXS (seção 4.9). Além disso, as estruturas de alta

resolução condizem com as predições de domínio realizadas pelo servidor *SMART*³⁵: barril α/β característico de XIs

Sabe-se que na rede cristalina a estrutura da molécula pode não obedecer ao formato adquirido em solução, pois a mobilidade, flexibilidade e temperatura são parâmetros que podem influenciar numa possível alteração.

A Figura 50 expõe a sobreposição feita pelo programa *PYMOL* (DeLano Scientific LLC) para as duas estruturas de alta resolução obtidas para Xyl_B_{ad} e Xyl_X_{cc}.

Figura 50 - Sobreposição das estruturas do monômero de alta resolução obtida por difração de raios-X das enzimas xilose isomerases de *B. adolescentis* (rosa) e *X. campestris* (vermelho).

A sobreposição das duas estruturas revela pequenas diferenças no enovelamento, mesmo havendo apenas 49% de identidade na seqüência de aminoácidos entre ambas. Portanto, pode-se afirmar que existem resíduos de aminoácidos que são alterados entre as duas proteínas por pressão evolutiva, porém os que se conservam entre as duas permitem que se mantenha o enovelamento geral da molécula. Análises mais detalhadas do posicionamento de cadeias laterais de aminoácidos estão sendo realizadas para verificar a influência desses resíduos não conservados e, dessa maneira, promover um conhecimento maior de características e peculiaridades dessas proteínas presentes em diferentes organismos e com conservação sequencial não muito alta. Alinhamentos e comparações com outras estruturas homólogas também fazem parte dessas análises.

Experimentos de cristalização de XI de *L. crispatus* e difração de raios-x foram realizados, porém, por haver homólogo com identidade insuficiente para aplicação da técnica de substituição molecular, esses resultados ainda estão sob análises.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho são apresentados experimentos de amplificação e clonagem do gene *xylA* que codifica para a enzima Xilose Isomerase de três fontes biológicas diferentes: de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xyl_X_{cc}), *Bifidobacterium adolescentis* (Xyl_B_{ad}) e *Lactobacillus crispatus* (Xyl_L_{cr}); o que permitiu a expressão heteróloga em *Escherichia coli*. As enzimas foram então convenientemente superexpressas e purificadas por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Suas massas moleculares e raios hidrodinâmicos foram estimados com boa aproximação, revelando predomínio da forma dimérica das Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad}, enquanto o predomínio do monômero da Xyl_L_{cr}. Este resultado ficou de acordo com o estimado também por gel nativo. Entretanto, para as duas primeiras, esses resultados não conferem com o que foi obtido por SAXS, já que por este, a forma predominante das Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} é a tetramérica. A dissociação dos tetrâmeros em dímeros, possivelmente causada pela interação (mecânica) da proteína com um sistema de emaranhados ou mesmo poros (como o que possivelmente ocorreu no gel nativo e na cromatografia de exclusão molecular, respectivamente) não é verificada no SAXS. Ou seja, o estado oligomérico real dessas XIs em solução é o tetrâmero, e monômero para Xyl_L_{cr}. Os resultados de atividade a princípio conferem com os anteriores, no que diz respeito à presença das formas ativas em solução das Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} (dímeros ou tetrâmeros, para ambos estaria em concordância) e da Xyl_L_{cr} (monômero), já que as duas primeiras exibiram atividade xilose isomerásica e a última não.

Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} apresentaram atividade relativamente alta em suas condições ótimas. Foi realizado estudo do perfil de atividade para diferentes condições de pH e temperatura, demonstrando que as duas proteínas têm atividade mais deslocadas para valores de pH abaixo da neutralidade, e ambas com temperaturas ótimas ao redor de 60°C, o que ainda é considerada uma temperatura alta comparada à temperatura ao redor de 30°C utilizada na produção industrial de etanol.

Os resultados de desnaturação térmica por CD e por SAXS permitem concluir que, na ausência de substrato e cofatores, a estabilidade térmica da estrutura secundária (por CD) e estrutura terciária (por SAXS) das XIs (Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad}) aumenta juntamente com a elevação do pH. Entretanto há a discordância desse resultado com os perfis de atividade dessas enzimas, que demonstram menor atividade para valores altos de pH. Entretanto, a

comparação não deve ser conclusiva, pois os ensaios de atividade eram na presença tanto do substrato quanto dos cofatores.

Como já foi mencionado acima, foram obtidos modelos de baixa resolução por meio de SAXS, com bons ajustes às curvas experimentais. Além disso, estruturas de alta resolução homólogas às XIs estudadas neste trabalho foram alinhadas e sobrepostas aos modelos de baixa resolução criados, exibindo bons ajustes.

Finalmente, foram obtidas estruturas de alta resolução das Xyl_X_{cc} e Xyl_B_{ad} por difração de raios-X sobre os cristais dessas enzimas. Isso permitiu concluir até então, que ocorre a conservação do domínio comum das XIs, o barril α/β e que era esperado por predição de estrutura secundária. Detalhes a respeito do mecanismo de ação, coordenação de cofatores, mapeamento do sítio ativo, entre outras, deverão ser realizados futuramente.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados que foram obtidos e concernente às discussões feitas neste trabalho, são geradas perspectivas de novos experimentos e pesquisas futuras, visando à busca por respostas que ainda não foram respondidas. São elas:

- Realização de experimentos de cinética bioquímica;
- Ensaio de desnaturação térmica por CD e por SAXS na presença dos cofatores e/ou do substrato/inibidores;
- Analisar e comparar efeitos na atividade enzimática específica para diferentes concentrações de cofatores e diferentes agentes tamponantes;
- Proceder com experimentos de Anisotropia de Fluorescência e Centrifugação Analítica, para averiguação do estado oligomérico em função da concentração;
- Testes comparativos com XIs comerciais imobilizadas;
- Modificações sítio-dirigidas na sequência protéica, buscando a otimização das propriedades bioquímicas com reflexo na atividade específica;

REFERÊNCIAS

- 1 SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. 58 p. Tese (Doutorado) - Departamento De Engenharia Química, Universidade De Lund, Suécia, 2005.

- 2 CONAB, C. N. D. A. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2011.

- 3 FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood:chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter De Gruyter Inc, 1989.

- 4 ROSSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913**. 2011. 94p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

- 5 MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P.(Ed.). **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington: ACS Publications, 1994. p. 294-324. (ACS Symposium Series, v. 566)

- 6 SATYANARAYANA, K. G.; GUIMARÃES, J. L.; WYPYCH, F. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil: part I: source, production, morphology, properties and applications. **Composites: part A**, v. 38, n. 7, p. 1694–1709, 2007.

- 7 PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

- 8 HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-8, Jan. 2009.

- 9 MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. p.1196 – 1201 p. 2011. doi:[10.1016/j.procbio.2011.01.022](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.022)

10 REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology Biofuels**, v.4,n.1,p.54,2011.ISSN 754-6834.

11 BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-11, Apr. 2009. ISSN 1098-5336.

12 TANINO, T. et al. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1215-21, Nov. 2010. ISSN 1432-0614.

13 JEFFRIES, T. W.; SHI, N. Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 65, p. 117-61, 1999. ISSN 0724-6145.

14 CHEN, W. P. Glucose Isomerase. **Process Biochemistry**, v.15, n.5, p.30-35, 1980

15 HICKMAN, J.; ASHWELL, G. Purification and properties of D-xylulokinase in liver. **Journal Biology Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 737-48, June 1958. ISSN0021-9258.

16 HARHANGI, H. R. et al. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Archives in Microbiology**, v. 180, n. 2, p. 134-41, Aug. 2003. ISSN 0302-8933.

17 BRUINENBERG, P. M. et al. NADH- linked aldose reductase : the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v. 19, n.4, p.256-260, 1984. DOI: uuid:d51a676f-c285-41e4-a541-256aef263b5e.

18 BOLEN, P. L.; ROTH, K. A.; FREER, S. N. Affinity purifications of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *pachysolen tannophilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52,n. 4,p. 660-4, Oct.1986. ISSN 0099-2240.

19 RIZZI, M. et al. Xylose fermentation by yeasts. 4. purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29,n.2-3, p.148-154, 1988. DOI: 10.1007/BF00939299.

20 WANG, V. W.; JEFFRIES, T. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting *Candida shehatae*, **Applied Microbiology and Biotechnology**,v.26,n.2,p. 197-206, 1990. DOI: 10.1007/BF02921534.

- 21 HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-53, Apr. 2007.

- 22 _____. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 108, p. 147-177, 2007. DOI: 10.1007/10_2007_062.

- 23 DENG, X. X.; HO, N. W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. Scientific note. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24-25, p.193-9, 1990.

- 24 RODRIGUEZ-PEÑA, J. M. et al. The YGR194c (XKS1) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, n. 1, p. 155-60, May 1998. ISSN 0378-1097.

- 25 CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Review Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295-331, 1998. ISSN 0738-8551.

- 26 ASBÓTH, B.; NÁRAY-SZABÓ, G. Mechanism of action of D-xylose isomerase. **Current Protein Peptides Science**, v. 1, n. 3, p. 237-54, Nov. 2000. ISSN 1389-2037.

- 27 WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Chichester, United Kingdom: Ellis Horwood Ltd, 1975.

- 28 RANGARAJAN, M.; HARTLEY, B. S. Mechanism of D-fructose isomerization by *Arthrobacter* D-xylose isomerase. **Biochemical Journal**, v. 283, Pt 1, p. 223-33, Apr. 1992. ISSN 0264-6021.

- 29 GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Evidence for specific interaction of guanidine hydrochloride with carboxy groups of enzymes/proteins. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 193, n. 3, p.979-84, June 1993. ISSN 0006-291X.

- 30 RANGARAJAN, M.; ASBOTH, B.; HARTLEY, B. S. Stability of *Arthrobacter* D-xylose isomerase to denaturants and heat. **Biochemical Journal**, v. 285, Pt.3, p.889-98, Aug. 1992. ISSN 0264-6021.

- 31 MARSHALL, R. O.; KOOL, E. R. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. **Science**, v. 125, n. 3249, p.648-9, Apr. 1957. ISSN 0036-8075.

- 32 Lactobacilos e a flora vaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 27, n. 5, 2005. Disponível em: < <http://www.globalevoce.com.br/ginecologia2> >. Acesso em: 25 jun. 2011.

33 BORIS S.; BARBÉS, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 5, p. 543-6, Apr 2000.

34 OJALA, T. et al. Genome sequence of *Lactobacillus crispatus* ST1. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3547-8, Jul 2010. ISSN 1098-5530.

35 SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 95, n. 11, p. 5857-64, May 1998. ISSN 0027-8424.

36 COLLYER, C. A.; HENRICK, K.; BLOW, D. M. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydride shift. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 1, p. 211-35, Mar. 1990.

37 COLLYER, C. A.; BLOW, D. M. Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 87, n. 4, p. 1362-1366, Feb. 1990.

38 YALPANI, M. **Synthesis and characterization of polysaccharides**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

39 SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. (Cambridge studies in biotechnology, 9).

40 RUDOLPH, K. **Infection of the plant by *Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, 1993. p. 193-245

41 SUTHERLAND, I. W.I. **Xanthan**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 363-368.

42 MONTPETIT, D. **A helpful bacterium that is an inhabitant of the human intestinal tract**. Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre:

43 KLIJN, A.; MERCENIER, A.; ARIGONI, F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v.29,n.3,p. 491-509, 2005.

44 UNIVERSITY, G. **A normal bacterial inhabitant of the healthy human gut**. Japan: Life Science Research Center.

45 ARUNACHALAM, K. D. Role of Bifidobacteria In Nutrition, Medicine and Technology **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, p. 1559-1597, 1999.

46 CHEN, W. P.; ANDERSON, A. W.; HAN, Y. W. Production of glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 324-31, Feb. 1979. ISSN 0099-2240.

47 CHEN, W. P.; Anderson, A. W. Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *streptomyces flavogriseus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 1111-9, Dec. 1979. ISSN 0099-2240.

48 DEKKER, K. et al. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 221-7, Jan. 1991. ISSN 0002-1369.

49 _____. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus*: cloning, sequencing, and comparison with other thermostable xylose isomerases. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 10, p. 3078-83, May 1991. ISSN 0021-9193.

50 CHAUTHAIWALE, J.; RAO, M. Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic bacillus sp. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4495-4499, Dec. 1994.

51 CALLENS, M. et al. Catalytic properties of d-xylose isomerase from *streptomyces-violaceoruber*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 11, p. 696-700, Nov.1986.

52 _____. D-xylose isomerase from *streptomyces-violaceus-ruber* - evidence for essential histidine-residues, lysine-residues, and carboxylate residues. **Archives Internationales de Physiologie de Biochimie et de Biophysique**, v. 94, n. 1, p. B9-B9, Apr. 1986

53 AMORE, R.; HOLLENBERG, C. P. Xylose isomerase from *actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 7515, Sept. 1989.

54 BOR, Y. C. et al. Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. **Gene**, v. 114, n. 1, p. 127-32, May 1992.

55 SCHELLENBERG, G. D. et al. Xylose isomerase from *Escherichia coli*: characterization of the protein and the structural gene. **Journal Biology Chemistry**, v. 259, n. 11, p. 6826-32, June 1984.

56 BASUKI, W. et al. Evidence for the existence of isozymes of glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 180-185, Feb. 1992.

57 KAWAI, Y. et al. Purification and characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n.12, p. 2236-40, 1994.

58 BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiology Review**, v. 60, n. 2, p. 280-300, June 1996.

59 SRIPRAPUNDH, D.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis. **Protein Engineering**, v. 13, n. 4, p. 259-65, Apr. 2000.

60 LÖNN, A. et al. Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis: gene cloning and protein characterization. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 1, p. 157-63, Jan. 2002.

61 WALFRIDSSON, M. et al. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4648-51, Dec. 1996.

62 SRIPRAPUNDH, D.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. **Protein Engineering**, v. 16, n. 9, p. 683-690, Sept. 2003.

63 MAIA, A. B. R. A. **Fundamentos de fermentação alcoólica**. Belo Horizonte: UFMG, 1989.

64 THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1616-1623, Apr. 2002.

65 BANAT, I. M. et al. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part i – yeast in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 809-821, 1998. DOI: [10.1023/A:1008802704374](https://doi.org/10.1023/A:1008802704374).

66 BANAT, I. M. et al. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part i – yeast in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 809-821, 1998. DOI: [10.1023/A:1008802704374](https://doi.org/10.1023/A:1008802704374).

67 CHANG, C. et al. Crystal structures of thermostable xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible structural determinants of thermostability. **Journal Molecular and Biology**, v. 288, n. 4, p. 623-634, May 1999.

68 CALLENS, M. et al. Metal ion binding to D-xylose isomerase from streptomyces violaceoruber. **Biochemistry Journal**, v. 250, n. 1, p. 285-90, Feb. 1988.

69 GAIKWAD, S. M.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. D-Glucose/xylose isomerase from Streptomyces: differential roles of magnesium and cobalt ions. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 14 n. 4 p. 317–320, 1992.

70 KASUMI, T.; HAYASHI, K.; TSUMURA, N. Role of cobalt in stabilizing the molecular structure of glucose isomerase from Streptomyces griseofuscus. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 21–30, 1982.

71 JÄNIS, J. et al. Characterization of the pH-dependent dissociation of a multimeric metalloprotein Streptomyces rubiginosus xylose isomerase by ESI FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 10, p. 1376-1380, Oct. 2008.

72 KATZ, A. K. et al. Locating active-site hydrogen atoms in D-xylose isomerase: time-of-flight neutron diffraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 103, n. 22, p. 8342-7, May 2006.

73 KOVALEVSKY, A. Y. et al. Hydrogen location in stages of an enzyme-catalyzed reaction: time-of-flight neutron structure of D-xylose isomerase with bound D-xylose. **Biochemistry**, v. 47, n. 29, p. 7595-7597, July 2008.

74 _____. Metal ion roles and the movement of hydrogen during reaction catalyzed by D-xylose isomerase: a joint x-ray and neutron diffraction study. **Structure**, v. 18, n. 6, p. 688-699, June 2010.

75 GAIKWAD, S. M. et al. Streptomyces glucose/xylose isomerase has a single active site for glucose and xylose. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 159, n. 2, p. 457-463, Mar. 1989.

76 _____. Evidence for the essential histidine residue at the active site of glucose/xylose isomerase from Streptomyces. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 1, p. 270-277, Aug. 1988.

77 VANGRYSPERRE, W. et al. Localization of the essential histidine and carboxylate group in D-xylose isomerases. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 699-705, Feb. 1990.

78 KELETI, T. et al. A kinetic method for distinguishing whether an enzyme has one or two active sites for two different substrates. Rat liver L-threonine dehydratase has a single active site for threonine and serine. **European Journal of Biochemistry**, v. 170, n. 1-2, p. 179-83, Dec. 1987.

79 WHITLOW, M. et al. A metal-mediated hydride shift mechanism for xylose isomerase based on the 1.6 Å Streptomyces rubiginosus structures with xylitol and D-xylose. **Proteins**, v. 9, n. 3, p. 153-73, 1991.

80 FENN, T. D.; RINGE, D.; PETSKE, G. A. Xylose isomerase in substrate and inhibitor michaelis states: atomic resolution studies of a metal-mediated hydride shift. **Biochemistry**, v. 43, n. 21, p. 6464-6474, June 2004.

81 HANSON, B. L. et al. A preliminary time-of-flight neutron diffraction study of Streptomyces rubiginosus D-xylose isomerase. **Acta Crystallographica D**, v. 60, n. pt 2, p. 241-249, 2004.

82 ROSE, I. A.; O'CONNELL, E. L.; MORTLOCK, R. P. Stereochemical evidence for a cis-enediol intermediate in Mn-dependent aldose isomerases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 178, n. 2, p. 376-379, Apr. 1969.

83 HANSON, K. R.; ROSE, I. A. Interpretations of enzyme reaction stereospecificity. **Accounts of Chemical Resources**, v.8, n. 1, p. 1-10, 1975.

84 MAKKEE, M.; KIEBOOM, A. P. G.; VAN BEKKUM, H. Glucose-isomerase-catalyzed D-glucose-D-fructose interconversion: Mechanism and reactive species. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, v. 103, n. 12, p. 361-364, 1984.

85 BLOW, D. M. et al. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. **Faraday Discussions**, n. 93, p. 67-73, 1992.

86 COLLYER, C. A. et al. Anomeric specificity of D-xylose isomerase. **Biochemistry**, v. 31, n. 48, p. 12211-8, Dec.1992.

87 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069-74, Oct. 1990. ISSN 0305-1048.

88 RUNNER, G. **Molecular biology analysis program**. Disponível em: <http://www.uoguelph.ca/~djoephylab/handbook_generunner.html>. Acesso em: 25 Jan. 2012.

89 SAMBROOK, J.; D.W., R. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

90 TAO, H. et al. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. **Biotechniques**, v. 48, n. 1, p. 61-4, Jan 2010. ISSN 1940-9818.

91 FRANGIONI, J. V.; NEEL, B. G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 210, n. 1, p. 179-87, Apr 1993. ISSN 0003-2697.

92 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry**. New York: Freeman and Co, 1980.

93 JOO, G. J. et al. Purification and characterization of thermostable Xylose (Glucose) isomerase from *Streptomyces chibaensis*: *Agricultural Chemistry & Biothechnology*, v. 44, p. 113-118, 2001.

94 DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **Journal of Biology Chemistry**, v. 192, n. 2, p. 583-7, Oct 1951. ISSN 0021-9258.

95 CAMPBELL, I.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. Benjamin Cummings Publish Co. Inc., 1984.

96 ALDER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. **Methods in Enzymology**, v. 27, p. 675-735, 1973.

97 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 271-4, Dec 2001. ISSN 0003-2697.

98 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-39, Aug. 2005. ISSN 0006-3002.

99 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 737-43, July 2010. ISSN 1437-4315.

100 HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D: an introduction and overview**. Grenoble: ERSF, 1997. Internal Report.

101 GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. p. 53-83.

102 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of applied Crystallography**, v. 25, p. 495-503, Aug. 1992. DOI: 10.1107/S0021889892001663

103 FISCHER, H. D. O. N.; NAPOLITANO, H. B.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. F. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, pt. 3, p. 101-109, Feb. 2010.

104 KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M.; SVERGUN, D. Automated matching of high-and low resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography*, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2001.

105 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-86, June 1999. ISSN 0006-3495.

106 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, pt. 3, p. 860-864, June 2003.

107 SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCK, M. H. J. Crysol – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, pt. 6, p. 768-773, Dec. 1995.

108 RAMBO, R. P.; TAINER, J. A. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. **Biopolymers**, v. 95, n. 8, p. 559-71, Aug 2011. ISSN 0006-3525.

109 LESLIE, A. Integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 55, pt. 10, p. 1696-702, Oct. 1999. ISSN 0907-4449.

110 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, pt. 2, p. 125-32, Feb. 2010. ISSN 1399-0047.

111 The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 50, pt. 5, p. 760-3, Sept. 1994. ISSN 0907-4449.

112 MATTHEWS, B. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491-7, Apr. 1968. ISSN 0022-2836.

113 MCCOY, A. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. pt. 4, p. 658-674, Aug. 2007.

114 STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n.3, p. 641 - 643, 2008.

115 ADAMS, P. et al. Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 11, pt. 1, p. 53-5, Jan. 2004. ISSN 0909-0495.

116 _____. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 58, pt. 11, p. 1948-54, Nov. 2002. ISSN 0907-4449.

117 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 60, pt. 12, p. 2126-32, Dec. 2004. ISSN 0907-4449.

118 ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.