

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAIO VINICIUS DOS REIS

Produção heteróloga, caracterização biofísica e
estrutural de xilose isomerases visando potenciais
aplicações na fermentação pentoses

São Carlos
2017

CAIO VINICIUS DOS REIS

Produção heteróloga, caracterização biofísica e estrutural de xilose isomerases visando potenciais aplicações na fermentação de pentoses

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

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

Reis, Caio Vinicius dos
Produção heteróloga, caracterização biofísica e
estrutural de xilose isomerases visando potenciais
aplicações na fermentação de pentoses / Caio Vinicius
dos Reis; orientador Igor Polikarpov - versão
corrigida -- São Carlos, 2017.
135 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Xilose isomerase. 2. Etanol de segunda geração.
3. Cristalografia. 4. Xilose. 5. Pentoses. I.
Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

Dedico à minha família e amigos, que nunca deixaram de acreditar em mim, mesmo quando eu mesmo deixei de acreditar.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço imensamente aos meus pais, Verinha e Preto, por serem tão especiais a mim, por terem me feito acreditar e mesmo quando não acreditava mais, eles me ajudaram a prosseguir. É por eles que sempre levanto depois de uma queda. 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 que estiveram mais próximos: Atilio Tomazini, Paulo Santos, Tiago Medeiros e Joseph Corrales, por terem me aguentado nos momentos bons e ruins. Agradeço a todos os amigos que de certa forma estiveram presentes na minha vida durante o curso deste doutorado.

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

A Silvio Athayde pela dedicação, atenção e apoio em nome do qual agradeço a todos do departamento acadêmico;

Ao meu orientador Prof. Dr Igor Polikarpov, pelo apoio, orientação e suporte.

Aos colegas de trabalho e companheiros de sala e bancada, com os quais aprendi muito e me diverti mais ainda.

Aos técnicos do Grupo de Biotecnologia Molecular Livia, Maria, João e Josimar.

Às funcionárias do serviço de Biblioteca do IFSC-USP, pela prestatividade em todos os momentos e em especial a Cristina. Aos funcionários da gráfica do IFSC-USP, pela impressão da tese e qualidade de serviço. Aos funcionários Informática do IFSC-USP, pelo suporte sempre que solicitado.

À Universidade de São Paulo e o Instituto de Física de São Carlos, por oferecer toda a estrutura necessária para realização deste trabalho.

Aos que fizeram parte direta ou indiretamente do meu aprendizado acadêmico e científico.

A Capes, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro.

Àquela que me fez dizer a seguinte sentença por diversas vezes em momentos difíceis: *“if I fail, if I succeed, at least I’ll live as I believe”*

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 tí, 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 tí 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

REIS, C. V. dos. **Produção heteróloga, caracterização biofísica e estrutural de xilose isomerases com potencial para aplicação na fermentação industrial de pentoses.** 2017. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Fazemos parte de um cenário mundial em que o esgotamento das fontes de energias fósseis atrelado à poluição gerada por esse uso, preocupam os diferentes setores do comércio, da indústria, do governo e das instituições em defesa do meio ambiente. Nesse sentido, a busca por novas fontes energéticas renováveis tem dirigido diversas pesquisas, além de drenar bilhões de dólares em investimentos. Uma das linhas de pesquisa mais importantes é a da produção do etanol de segunda geração (2G), um etanol produzido a partir dos resíduos gerados na produção do etanol de primeira geração. No caso do Brasil, esses resíduos compreendem principalmente a palha e o bagaço de cana-de-açúcar; essa biomassa é formada majoritariamente por celulose (~45%), hemicelulose (~25%) e lignina (~20), e sua hidrólise envolve pré-tratamentos adequados e uso de enzimas que agem especificamente em seus alvos. Dessa forma, a produtividade de etanol aumenta, sem necessariamente ampliar áreas de cultivo. Essa vertente é muito promissora, porém os custos ainda são relativamente altos e a aplicabilidade depende bastante de adaptações do setor industrial e aprimoramentos na produção em si (atividade específica das enzimas e sua ação sinérgica). O objetivo principal deste projeto é reconhecer e mapear as bases moleculares que comandam a atividade da enzima xilose isomerase (XI), que converte xilose (presença majoritária na hemicelulose) em xilulose, possibilitando a utilização desta por *Saccharomyces cerevisiae* (já que a xilose não é fermentescível), para obtenção do etanol de segunda geração como produto final. Para isso, foi realizada uma busca extensiva de genes de diversos microrganismos, que codifiquem para XI, e que essas ainda não possuam estruturas resolvidas publicadas. A maioria das ORFs (*Open Reading Frame*, do inglês), ou regiões codificadoras, foram amplificadas, clonadas em vetores específicos e transformadas em bactérias *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Parte dessas cepas transformadas resultaram na produção da XI de interesse. Com isso, foi possível obter cristais e iniciar a resolução de estruturas cristalográficas. Esses resultados foram cruzados e correlacionados com os de atividade enzimática, cinética química e estabilidade térmica, fornecendo boa perspectiva para o entendimento das bases moleculares que regem a atividade xilose isomerásica.

Palavras-chave: Xilose isomerase. Etanol de segunda geração. Cristalografia. Xilose. Pentoses.

ABSTRACT

REIS, C. V. dos. **Heterologous production, structural and biophysical characterization of xylose isomerases aiming potential applications in pentoses fermentation.** 2017. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

We are part of a world scenario in which the depletion of fossil energy sources linked to the pollution generated by this use, concern the different sectors of commerce, industry, government and institutions in defense of the environment. In this regard, the search for new renewable energy sources has headed many researches, besides generating billions of dollars in investments. One of the most important research lines is the production of second generation ethanol (2G), an ethanol produced from the waste generated in the production of the first generation one. In the case of Brazil, these residues mainly include sugar cane straw and bagasse. This biomass is mostly composed of cellulose (~ 45%), hemicellulose (~ 25%) and lignin (~ 20), and its hydrolysis involves adequate pre-treatments and the use of enzymes that specifically act on their targets. In this way, ethanol productivity increases without necessarily expanding growing areas. This aspect is very promising, but the costs are still relatively high and the applicability badly depends on adaptations of the industrial sector and improvements in the production itself (specific activity of the enzymes and their synergistic action with others). The main goal of this project is to recognize and map the molecular bases that control the activity of the enzyme xylose isomerase (XI), which converts xylose (the mostly present carbohydrate in hemicellulose) into xylulose, allowing its use by *Saccharomyces cerevisiae* (since xylose is not fermentable), to obtain the second generation ethanol as final product. To reach this, an extensive search of genes of several microorganisms, that code for XI, and still do not have solved high resolution structures published are carried out. Most ORFs (Open Reading Frames) were amplified, cloned into specific vectors and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) bacteria. Some of these transformed strains led to the production of XI of interest. Furthermore, it was possible to obtain protein crystals and to start trying to solve crystallographic structures. These results were cross - checked and correlated with those of enzymatic activity, chemical kinetics and thermal stability, providing a good perspective for understanding the molecular bases which govern isomerase activity.

Keywords: Xylose isomerase. Second-generation ethanol. Crystallography. Xylose. Pentoses.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1** - Estrutura do xiloglicano, principal componente de paredes celulares primárias de plantas terrestres (exceto gramíneas). A cadeia principal é formada por moléculas de glicose (azul) interligadas por ligação glicosídica β -1,4. As ramificações envolvem moléculas de xilose (vermelho), fucose (marrom) e galactose (preto). Algumas das ligações glicosídicas das ramificações estão discriminadas por retângulos cinzas..... 28
- Figura 2** - Unidade repetitiva do arabinoxilano, hemicelulose mais abundante tanto na parede primária quanto secundária principalmente de gramíneas. A cadeia principal é formada por moléculas de xilose interligadas por ligações glicosídicas β -1,4. As ramificações são formadas por substituições nos carbonos 2 e/ou 3 da cadeia principal, com moléculas de arabinose..... 29
- Figura 3** - Celobiose, unidade formadora do polímero de celulose. Celobiose é formada pela reação de condensação de duas moléculas de glicose por uma ligação glicosídica β -1,4 30
- Figura 4** - Estrutura da celulose com destaque para regiões cristalinas e amorfas 31
- Figura 5** - À esquerda, deposição de alguns constituintes da parede secundária, contendo ligninas (complexo de compostos fenólicos ligados entre si, à direita, e representado por triângulo beje na imagem da esquerda) interconectadas a polissacarídeos através de pontes diferúlicas (azul claro). Em muitas células essa junção é suficiente para impedir a continuidade do crescimento da célula..... 32
- Figura 6** - Esquema de um corte transversal de uma célula vegetal e destaque para camadas circunscritas ao citoplasma celular, contendo de fora para dentro lamela média, parede celular primária, paredes celulares secundárias S1, S2 e S3, e membrana plasmática. O retângulo verde destaca a região A (engloba parede celular secundária) e o retângulo vermelho destaca a região B (engloba a parede celular primária). 33
- Figura 7** - Variação do PIB e variação do consumo de energia entre os anos de 1998 e 2007. 35
- Figura 8** - Oferta interna de energia no Brasil (2015). Supremacia da proporção dos renováveis na matriz energética brasileira. Mtep significa mega tonelada de equivalente de petróleo. 35
- Figura 9** - Oferta interna de energia elétrica (2015). OECD representa os países mais ricos do mundo..... 36
- Figura 10** - Vias de utilização de xilose em fungos e bactérias..... 43
- Figura 11** - Reação de isomerização realizada pela enzima xilose isomerase. (A) com substrato D-xilose e (B) com substrato D-glicose..... 44
- Figura 12** - A-Tetrâmero da xilose isomerase de *Streptomyces rubiginosus* (PDB id 4zb2) e em B seu monômero, com destaque para os dois domínios principais, domínio N-terminal, formado por barril $(\alpha/\beta)_8$, e domínio C-terminal, formado por uma alça de hélices e voltas. Figuras foram feitas no programa Pymol (DeLano Scientific)..... 45
- Figura 13** - 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, (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 positiva.(C). 46
- Figura 14** - Diagrama esquemático da etapa de abertura do anel de xilose no sítio ativo da XI. Estão destacados e numerados na imagem os carbonos da xilose e os resíduos catalíticos da enzima, que são sempre representados por uma histidina e um aspartato três resíduos upstream na estrutura primária. A base conjugada do resíduo de ácido aspártico facilita eletrostaticamente a abstração do próton da hidroxila 1 pelo nitrogênio NE2 do anel imidazólico. Essa abstração é equilibrada com o compartilhamento do par eletrônico remanescente entre o oxigênio 1 e o

carbono 1; nesse momento ocorre a abertura do anel de xilose, pois o par eletrônico compartilhado entre o carbono 1 e o oxigênio do éter migra inteiramente para este oxigênio, alternando sua carga formal para -1 e o transformando em um nucleófilo muito forte. Esse processo é finalizado neutralizando-se a carga formal do sistema com a transferência do próton do anel imidazólico para um novo compartilhamento do par eletrônico adicional do oxigênio nucleófilo, transformando essa nova sociedade em um grupamento hidroxila. Na etapa final, a cadeia da xilose encontra-se aberta, cuja nova hidroxila do carbono 5 estabelece interação de hidrogênio com a histidina catalítica (retângulo vermelho tracejado), permanecendo aí durante a etapa seguinte, a isomerização 47

- Figura 15** - Mecanismo da reação de isomerização da D-xilose para D-xilulose, através do deslocamento do hidreto, mediado por metal. (1) Ataque nucleofílico do oxigênio do aspartato (Asp) ao próton da molécula de água que faz coordenação com o metal 2 (M, dentro do círculo amarelo). (2) O novo nucleófilo formado pelo íon hidróxido remove um próton da hidroxila de C2, gerando um par de elétrons excedente em O2. (3) Através da interação com uma lisina próxima (Lys), o par eletrônico que C1 compartilhava com O1 se desloca para O1, formando um intermediário com C1 sendo um carbocátion secundário, o que faz haver uma transição para um estado mais estável em (4), com a transição do carbocátion para C2 (carbono terciário), mas para isso ocorre o deslocamento do hidreto de C2 para C1. Em (4) o carbocátion em C2 é resolvido através do novo compartilhamento do par eletrônico que estava excedente em O2, entre O2 e C2; e O1 que também estava com um par eletrônico excedente recebe o próton de uma nova molécula de água que estava fazendo coordenação com o metal 2, formando a hidroxila. Em (5) e (6) ocorre transferência de próton entre a hidroxila do resíduo de ácido aspártico próximo (Asp) e o novo íon hidróxido formado em (5). Após (6) deve ocorrer o fechamento do anel do produto e saída deste do sítio ativo da enzima. 49
- Figura 16** - Micrografia eletrônica da bactéria *Saccharophagus degradans*, de formato alongado, em haste, ocupando o centro da imagem 51
- Figura 17** - Micrografia eletrônica da bactéria *Jonesia denitrificans* 52
- Figura 18** - Bactéria *Flavobacterium johnsoniae* 53
- Figura 19** - Representação da condição de reação de amplificação em placa dos 96 genes que codificam para de XI. A temperatura de 72 °C foi selecionada para o anelamento dos primers; e 72°C também para a extensão, tanto a cíclica quanto a final. 58
- Figura 20** - 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 tampões no pH de teste, contém os cofatores necessários para haver atividade, CoCl₂ e MgSO₄, ambos a 10 mM finais. O teste procede com a adição de D-xilose (100 mM, concentração de reação) e com controle de temperatura (33°C) por 30 minutos e posterior inativação da enzima em nitrogênio líquido. 63
- Figura 21** - Método colorimétrico para quantificação de D-xilulose resultante da reação de isomerização da D-xilose pela enzima XI (método da cisteína-carbazol). São transferidos 25 µL de amostra do teste de atividade para uma placa de 96 poços. Adicionam-se 4,5 µL de solução aquosa 1,5% de Cloridrato de L-cisteína monoidratado. Em seguida, 141 µL de 71% H₂SO₄ são adicionados aos poços. Imediatamente, 4,5 µL de solução 0,12% (em EtOH) de carbazol são transferidos à mistura. A placa é deixada em repouso (temperatura ambiente, 25°C) por 1 hora. Passado este tempo, é feita a leitura da absorbância a 540 nm. Os dados são transferidos e analisados, gerando uma curva com o perfil de atividade da enzima. 65
- Figura 22** - Ilustração da curva e do princípio de utilização da técnica de Thermofluor. A teoria se baseia na liberação gradual da sonda fluorescente SYPRO Orange (Invitrogen), à medida que as regiões hidrofóbicas da proteína vão sendo expostas, devido ao desenovelamento por ação da temperatura 67
- Figura 23** - Esquema do processo de cristalização de macromoléculas. Em (A) o método de gota sentada (*sitting drop*) é ilustrado, onde a gota inicialmente é uma solução hiposaturada da macromolécula biológica, em tampão contendo agente precipitador e aditivos. Selados num mesmo ambiente, encontra-se a solução do poço, apresentando o agente precipitante numa

concentração um pouco maior. Com o tempo ocorre o equilíbrio entre as duas soluções, da gota e do poço, a medida que ocorre a difusão do vapor, do meio menos concentrado para o mais concentrado (com relação ao agente precipitante), até que as duas soluções atinjam um equilíbrio termodinâmico. Como o volume da gota tende a diminuir, a supersaturação pode ser atingida e a formação dos cristais pode ocorrer. (B) é a curva de solubilidade da macromolécula presente na gota. Inicialmente a solução da gota encontra-se na região abaixo da curva, de forma que a solução ainda é insaturada; a medida que a difusão de vapor ocorre, e o volume da gota diminui vagarosamente, a solução da gota caminha da zona de hiposaturação para a supersaturação. Dependendo principalmente da velocidade do processo, a zona metaestável pode ser atingida, região esta em que os monocristais mais interessantes se formam. 69

Figura 24 - 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra..... 73

Figura 25 - 2ª parte da placa de clonagem. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra. 74

Figura 26 - 3ª parte da placa de clonagem. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra. 74

Figura 27 - 4ª parte da placa de clonagem. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra. 75

Figura 28 - 1ª parte da placa. Teste de expressão do gene e produção de XI em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho de cada proteína e as bandas das proteínas solúveis. Esse resultado foi obtido por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos) com lise das bactérias contendo plasmídeos recombinantes e purificação da proteína de interesse (pelo método de Vincentelli⁶²). Os retângulos vermelhos destacam as bandas da proteína de interesse, que no caso, encontram-se na fração solúvel. Na imagem, “LADDER” indica marcadores de massa molecular. 76

Figura 29- 1ª parte da placa. Teste de expressão do gene e produção de XI em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho de cada proteína e as bandas das proteínas solúveis. Esse resultado foi obtido por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos) com lise das bactérias contendo plasmídeos recombinantes e purificação da proteína de interesse (pelo método de Vincentelli⁶²). Os retângulos vermelhos destacam as bandas da proteína de interesse, que no caso, encontram-se na fração solúvel. Na imagem, “LADDER” indica marcadores de massa molecular. 77

Figura 30 - Análise filogenética baseada em alinhamento sequencial das 24 XIs produzidas de forma solúvel. A partir da proximidade de cada XI, elas foram divididas em 6 grupos: A, B, C, D, E, e F.	78
Figura 31 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs dos grupos A, B e F. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.	79
Figura 32 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo C. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.	80
Figura 33 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo D. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.	81
Figura 34 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo E. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.	82
Figura 35 - Curva-padrão do teste da cisteína-carbazol. A curva relaciona absorvância a 540 nm com a concentração de D-xilulose purificação. O gráfico foi feito no programa Origin 9 (OriginLab) e foi utilizado um <i>Fit Linear</i> para reconhecer que o comportamento dos pontos se ajusta a uma reta	83
Figura 36 - Atividade enzimática da xilose isomerase F7, pertencente ao grupo A deste projeto.....	84
Figura 37 - Atividade enzimática das xilose isomerases C9, D7, B9 e E7, pertencentes ao grupo B deste projeto.....	85
Figura 38 - Atividade enzimática das xilose isomerases A1, D3, H2, E9, D2 e G5, pertencentes ao grupo C deste projeto.....	86
Figura 39 - Atividade enzimática das xilose isomerases C7, F4, H5 e F5, pertencentes ao grupo D deste projeto.....	87
Figura 40 - Atividade enzimática das xilose isomerases C1, E1, A5, C4 e D9, pertencentes ao grupo E deste projeto.....	88
Figura 41 - Velocidade de reação pela concentração de D-xilose, onde ao comportamento dos pontos foi adicionada a curva de Michaelis-Menten. Tanto em (A), cinética para D7, quanto em (B), cinética de G5, o ajuste a função de Michaelis-Menten permitiu obter seus parâmetros catalíticos (V_{max} e K_m), sendo eles $(0,58 \pm 0,03) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $(16 \pm 3) \text{mM}$ e $(0,087 \pm 0,008) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $(8 \pm 1) \text{mM}$, respectivamente.	89
Figura 42 - <i>Thermofluor</i> das XIs do grupo B, no caso, B9, E7 e C9. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.	92
Figura 43 - <i>Thermofluor</i> das XIs do grupo B, no caso, B9, E7 e C9. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.	93
Figura 44 - <i>Thermofluor</i> das XIs do grupo C, no caso, D3, A1, E9 e G5. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.....	94

Figura 45 - <i>Thermofluor</i> das XIs do grupo D, no caso, C7, F5 e H5. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.....	95
Figura 46 - <i>Thermofluor</i> das XIs do grupo E, no caso, C1 e D9 e E1. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.....	96
Figura 47 - Cristais obtidos dos testes de cristalização das XIs puras dos grupos B, C e E. Esses cristais foram obtidos pelo método de gota sentada em robô Honeybee.	98
Figura 48 - Cristais obtidos dos testes de cristalização das XIs puras dos grupos D e A.....	99
Figura 49 - Padrão de difração dos conjuntos de dados de algumas das XIs pertencentes aos grupos B, D e E. As imagens foram obtidas no programa ADXV.	100
Figura 50 - Padrão de difração dos conjuntos de dados de algumas das XIs pertencentes ao grupo C. As imagens foram obtidas no programa ADXV.	101
Figura 51 - Estruturas resolvidas das XIs C1, C4, D2, D7, D3, F5, G1 e G5. As estruturas estão refinadas, com exceção da C4, G1 e D3, que apenas tiveram um refinamento inicial. As imagens foram obtidas no programa Pymol.....	104
Figura 52 - Superfícies dos monômeros das XIs resolvidas por difração de raios-X em monocristal. A diferença mais evidente pode ser vista no domínio C-terminal das moléculas.....	105
Figura 53 - Superfície do tetrâmero da XI D7 (<i>Jonesia denitrificans</i>) rotacionado verticalmente e horizontalmente. As quatro cadeias monoméricas são representadas por A (laranja), B (verde), C (azul) e D (magenta).	106
Figura 54 - Disposição dos monômeros de XI na formação do tetrâmero ABCD. A sendo laranja, B verde, C azul e D magenta. Neste caso, está sendo mostrado o tetrâmero da D7.....	107
Figura 55 - Dímeros mais prováveis para XIs. Neste caso, a D7 está sendo mostrada na figura. Esses dímeros são mais conhecidos e consequentemente nomeados pelas figuras que parecem. <i>Borboleta</i> é formado por A/C, <i>diagonal</i> é formado por A/D e <i>69</i> ou <i>Yin Yang</i> é formado por A/B. As pequenas regiões em vermelho mostradas correspondem às superfícies dos resíduos catalíticos. Os dímeros laterais são nada mais que os dímeros centrais rotacionados de 90°.....	109
Figura 56 - Sítio ativo da C1 (xilose isomerase de <i>Escherichia fergusonii</i>). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, os dois resíduos catalíticos Asp-104 e His-101, uma molécula de etilenoglicol e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). M1 possui uma geometria de coordenação octaédrica e M2, tetraédrica. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC)	113
Figura 57 - Sítio ativo da D2 (xilose isomerase de <i>Saccharophagus degradans</i>). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp 110 e His 107 e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Ambos os magnésios têm uma geometria de coordenação tetraédrica com resíduos do bolsão catalítico. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).	114
Figura 58 - Sítio ativo da D7 (xilose isomerase de <i>Jonesia denitrificans</i>). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp 54 e His 51 e 2 átomos de magnésio. Os átomos de magnésio tanto em M1 quanto em M2 apresentam coordenação octaédrica, devido às interações de hidrogênio cada um com mais seis átomos mais próximos. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da enzima. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).	115
Figura 59 - Sítio ativo da F5 (xilose isomerase de <i>Ruminococcus champanellensis</i>). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp-103 e His-100 e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). A geometria molecular de coordenação de M1 é octaédrica, auxiliado por moléculas de água estruturais, e	

M2 apresenta também geometria octaédrica em sua coordenação, também auxiliada por moléculas de água. Lado direito - vista externa da região de entrada para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC). 116

Figura 60 - Sítio ativo da G5 (xilose isomerase de *Flavobacterium johnsoniae*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp-109 e His-106 e dois átomos de cobalto. Neste caso, o cobalto em M1 possui uma geometria de coordenação octaédrica e o segundo, em M2, ele também possui geometria de coordenação octaédrica. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC). 117

Figura 61 - Sobreposição das estruturas resolvidas (verde) de C1, D2, D7, F5 e G5 aos seus respectivos modelos gerados por homologia no servidor Swiss-Model (ciano). Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC). 119

Figura 62 - À esquerda, encontram-se sobrepostas no programa Pymol (sobreposição previamente realizada no programa Superpose¹¹⁰) as 5 estruturas resolvidas (C1, D2, D7, F5 e G5). À direita, é destacada a região do sítio ativo das XIs, mostrando os dois resíduos catalíticos (His-1 e Asp-1) e os resíduos que comumente fazem a coordenação com cátion de íon metálico (Asp-2, Asp-3, Asp-4, Asp-5, His-2, Glu-1 e Glu-2). As 5 estruturas estão representadas em diferentes cores – verde (D7), ciano (D2), laranja (G5), vermelho (F5) e rosa (C1). Imagens geradas no programa gráfico Pymol (DeLano Scientific)..... 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros bioquímicos teóricos das XIs estudadas neste projeto. As XIs já estão divididas em grupos, de acordo com identidade sequencial, para facilitar possíveis comparações	62
Tabela 2 - Valores de parâmetros e constantes catalíticas V_{\max} , K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m . São apresentadas também as condições em que foram realizados os experimentos (pH e Temperatura)	90
Tabela 3 - Parâmetros e estatísticas das coleta e processamentos dos conjuntos de dados cristalográficos das proteínas H2, C4, C9, C1, G5, D3, D2, C7, F4 e G1.	102
Tabela 4 - Parâmetros de refinamento e validação das estruturas cristalográficas de G5, D7, C1, F5 e D2, obtidos no programa <i>Phenix</i> ⁷⁶ e <i>MolProbity</i> ¹¹⁸	104
Tabela 5 - Interações que ocorrem na interface entre dois monômeros na formação dos possíveis dímeros biológicos das XIs, neste caso, essas interações pertencem à D7 e à G5	110
Tabela 6 - Volume da cavidade de entrada para o sítio ativo das XI, de apenas um monômero, com raio de procura configurado para 2 Å. Essa cavidade abriga o bolsão catalítico, representado pelos resíduos catalíticos e os de coordenação de metal de cada XI.....	112
Tabela 7 - Desvio da raiz média quadrática (RMSD, do inglês, <i>root mean square deviation</i>) do deslocamento dos átomos das estruturas cristalográficas sobrepostas no espaço. Resultado obtido com o programa <i>Superpose</i> ¹¹⁰	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF: Tampão Acetato Borato Fosfato

ANP: Agência Norte de Produção

Asp: Resíduo de ácido aspártico

ATP: Adenosina trifosfato

bep: Barril equivalente de petróleo

BRENDA: *BRaunschweig ENzyme DAtabase*

CASTp: Atlas Computacional da Topografia Superficial de Proteínas (do inglês, *Computed Atlas of Surface Topography of proteins*)

Conab: Companhia Nacional de Abastecimento

CTBE: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

dNTP: Desoxinucleotídeo Trifosfato

DSMZ: Coleção alemã de microrganismos e culturas celulares (do alemão, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*)

dTTP: Desoxiribonucleotídeo Trifosfato

EDO: Etilenoglicol (do inglês, *1,2-ethanediol*)

FFV: Veículos *flex* (do inglês, *flexible-fuel vehicle*)

gDNA: DNA genômico

GI: Glicose isomerase

GNS: Gás Natural Sintético

HFCS: Xarope de Milho Rico em Frutose (do inglês, *High Fructose Corn Syrup*)

His: resíduo de histidina

HIS-TAG: Cauda de histidinas

IPTG: Isopropiltio- β -D-galactopironosídeo

JCM: Japan Collection of Microorganism

LB: *Lysogenic Broth*

LIC: Clonagem independente de Ligase (do inglês, *Ligase Independent Cloning*)

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MO: Microrganismo

MR: Substituição Molecular (do inglês, *molecular replacement*)

MtCO₂: Mega tonelada de gás carbônico

Mtep: Mega tonelada de equivalente de petróleo

NAD(P)⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NAD⁺: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

OECD: Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

OIE: Oferta Interna de Energia

OIEE: Oferta Interna de Energia Elétrica

ORF: *Open Reading Frame*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

PDB: *Protein Data Bank*

PEG: Polietilenoglicol

PIB: Produto Interno Bruto

PISA: Proteínas, Interfaces, Estruturas e Conjuntos (do inglês, *Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies*)

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfuril (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

RMSD: Desvio da Raiz Quadrática Média (do inglês, *Root Mean Square Deviation*)

SDS-PAGE: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

T4: Tiroxina

tCO₂: Tonelada de gás carbônico

tep: Tonelada de equivalente de petróleo

TEV: Vírus do Tabaco (do inglês, *Tobacco etch virus*)

TIM: Triose-fosfato Isomerase

TRIS: Hidroximetil metil aminometano (do inglês, *(hydroxymethyl)aminomethane*).

TWh: Tera (10^{12}) Watt hora

Uniprot: *Universal Protein Research*

XDH: Xilitol desidrogenase

XI: Xilose Isomerase

XK: Xiluloquinase

XR: xilose redutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	BIOMASSA	27
1.1.1	<i>Hemicelulose</i>	27
1.1.2	<i>Celulose</i>	29
1.1.3	<i>Lignina</i>	31
1.2	PAREDE CELULAR	32
1.3	ENERGIA DA BIOMASSA	34
1.4	ENERGIA NO BRASIL	34
1.5	ETANOL	36
1.5.1	<i>Etanol de primeira geração (1G)</i>	37
1.5.2	<i>Etanol de segunda geração (2G)</i>	38
1.6	BIORREFINARIA.....	39
1.6.1	<i>Pré-Tratamento</i>	41
1.6.2	<i>Hidrólise</i>	42
1.7	VIAS DE TRATAMENTO DA XILOSE E PROBLEMÁTICA BIOQUÍMICA.....	42
1.8	XILOSE ISOMERASE (XI)	43
1.8.1	<i>Estrutura</i>	45
1.8.2	<i>Mecanismo de reação</i>	46
1.8.3	<i>Microorganisms de origem</i>	50
1.8.3.1	<i>Escherichia fergusonii</i>	50
1.8.3.2	<i>Saccharophagus degradans</i>	51
1.8.3.3	<i>Jonesia denitrificans</i>	51
1.8.3.4	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	52
1.8.3.5	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	52
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	SELEÇÃO DE ALVOS.....	57
3.2	LIC (LIGASE INDEPENDENT CLONING)	57
3.2.1	<i>Preparação dos vetores</i>	57
3.2.2	<i>Preparação dos insertos</i>	58
3.2.3	<i>Annealing</i>	59
3.2.4	<i>Transformação em E. coli DH10b</i>	59
3.2.5	<i>Testes de expressão em high throughput</i>	59
3.2.6	<i>Expressão e purificação de XIs solúveis</i>	60
3.3	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	63
3.3.1	<i>Teste de atividade enzimática</i>	63
3.3.2	<i>Quantificação pelo método colorimétrico cisteína-carbazol-sulfúrico</i>	64
3.3.3	<i>Curva padrão</i>	65
3.3.4	<i>Cinética enzimática das XIs de Flavobacterium johnsoniae (G5) e Jonesia denitrificans (D7)</i>	66
3.4	ESTABILIDADE TÉRMICA (<i>THERMOFLUOR</i>)	66
3.5	CRISTALOGRAFIA.....	68

3.5.1	<i>Ensaio de cristalização</i>	68
3.5.2	<i>Coleta de dados de difração de raio-X em monocristal de proteína</i>	70
3.5.3	<i>Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas</i>	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	73
4.2	TESTE DE EXPRESSÃO	76
4.3	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XIS SOLÚVEIS	78
4.4	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	83
4.4.1	<i>Curva padrão</i>	83
4.4.2	<i>Atividade enzimática em função do pH</i>	84
4.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA	89
4.6	ESTABILIDADE TÉRMICA (<i>THERMOFLUOR</i>)	91
4.7	CRISTALOGRAFIA	97
4.7.1	<i>Testes de cristalização</i>	97
4.7.2	<i>Coleta e processamento de dados de difração de raios-X</i>	99
4.7.3	<i>Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas</i>	103
4.7.4	<i>Oligomerização</i>	106
4.7.4.1	Tetrâmero	106
4.7.4.2	Dímero biológico	108
4.7.4.3	Sítio catalítico	111
4.7.4.3.1	C1 – Xilose isomerase de <i>Escherichia fergusonii</i>	113
4.7.4.3.2	D2 – Xilose isomerase de <i>Saccharophagus degradans</i>	114
4.7.4.3.3	D7 – Xilose isomerase de <i>Jonesia denitricans</i>	115
4.7.4.3.4	F5 – Xilose isomerase de <i>Ruminococcus champanellensis</i>	116
4.7.4.3.5	G5 – Xilose isomerase de <i>Flavobacterium johnsoniae</i>	117
4.7.5	<i>Modelagem por homologia</i>	117
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	123
	REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa

A biomassa é considerada como todo recurso renovável advindo da matéria orgânica, podendo ser de origem vegetal ou animal, e que comumente vem sendo alvo principal na produção de energia. E de fato, a utilização da biomassa é uma forma indireta de aproveitamento da luz solar, já que a energia solar foi utilizada para a formação das ligações químicas durante o processo de fotossíntese. Ela é uma das fontes para produção de energia com maior potencial de crescimento nos próximos anos. No mercado mundial, ela já é vista como uma das principais alternativas para a diversificação da matriz energética e consequentemente um caminho para redução da dependência dos combustíveis fósseis.

A biomassa lignocelulósica é formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, nas razões de 38% a 48%, 20% a 25% e 20% a 28%, respectivamente.¹⁻³ A celulose é formada por um homopolímero linear de alto peso molecular, de moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas. Nos vegetais, a molécula de celulose é organizada em microfibrilas, onde as várias moléculas de celulose paralelas estão ligadas entre si por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, de baixo peso molecular, composto por unidades de monossacarídeos contendo tanto cinco quanto seis carbonos. Já a lignina é formada pela polimerização dos álcoois orgânicos cumarílico, coniferílico e sinapílico, e a proporção desses diferentes álcoois representa diferentes tipos de lignina.

1.1.1 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, de baixo peso molecular, composto por unidades de monossacarídeos contendo tanto cinco quanto seis carbonos. Seus principais constituintes são: D-xilose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-manose e D-ácido glicurônico, sendo a xilose o principal e mais abundante.³⁻⁶ Esses açúcares estão ligados entre si principalmente por ligações glicosídicas β -1,4, em uma estrutura polimérica central,

de onde partem ramificações laterais mais curtas, de outros compostos, como exemplificado pela figura a seguir.

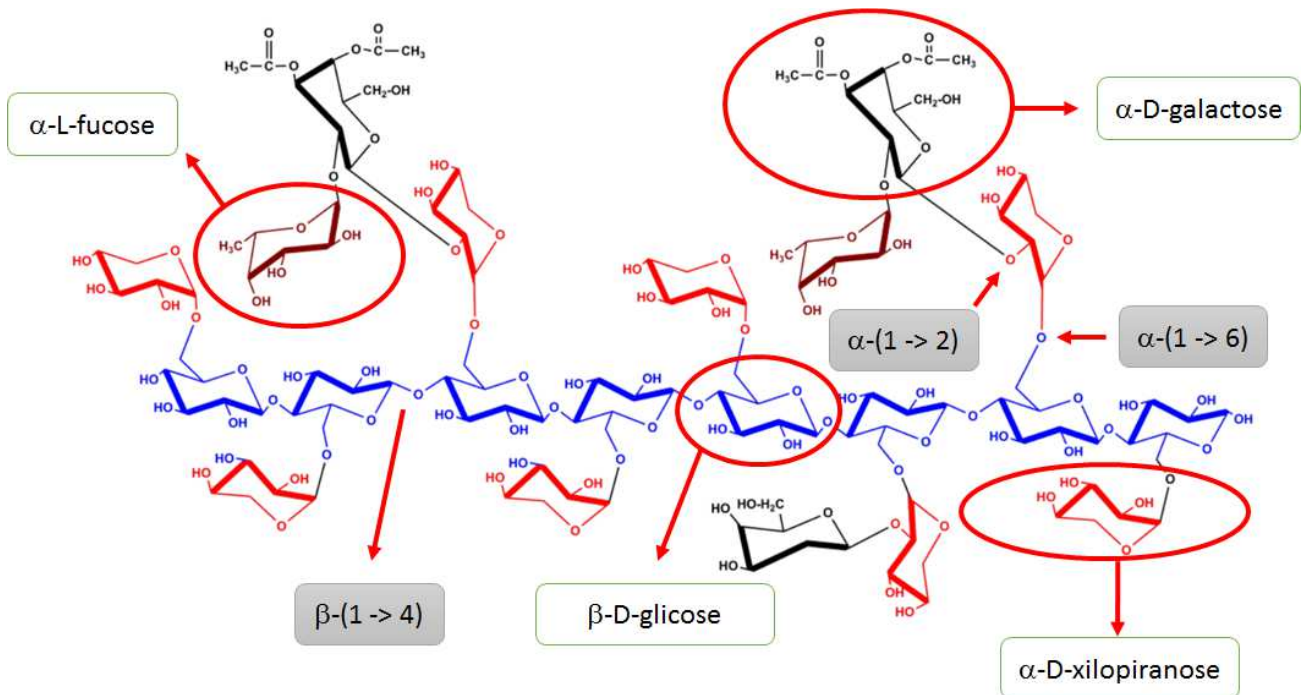


Figura 1 - Estrutura do xiloglicano, principal componente de paredes celulares primárias de plantas terrestres (exceto gramíneas). A cadeia principal é formada por moléculas de glicose (azul) interligadas por ligação glicosídica β-1,4. As ramificações envolvem moléculas de xilose (vermelho), fucose (marrom) e galactose (preto). Algumas das ligações glicosídicas das ramificações estão discriminadas por retângulos cinzas.

Fonte: Adaptada de CHAPLIN⁷

As hemiceluloses compreendem xiloglicanos (Figura 1), arabinoxilanos (Figura 2), xilanos, mananos e glicomananos, mas sua presença ou não no material depende de cada tipo de planta. Por exemplo, entre gramíneas, arabinoxilanos são mais comuns. Já xiloglicanos são muito comuns em paredes celulares primárias da maioria das plantas terrestres (exceto gramíneas), em que sua proporção chega a ser igual à da celulose.

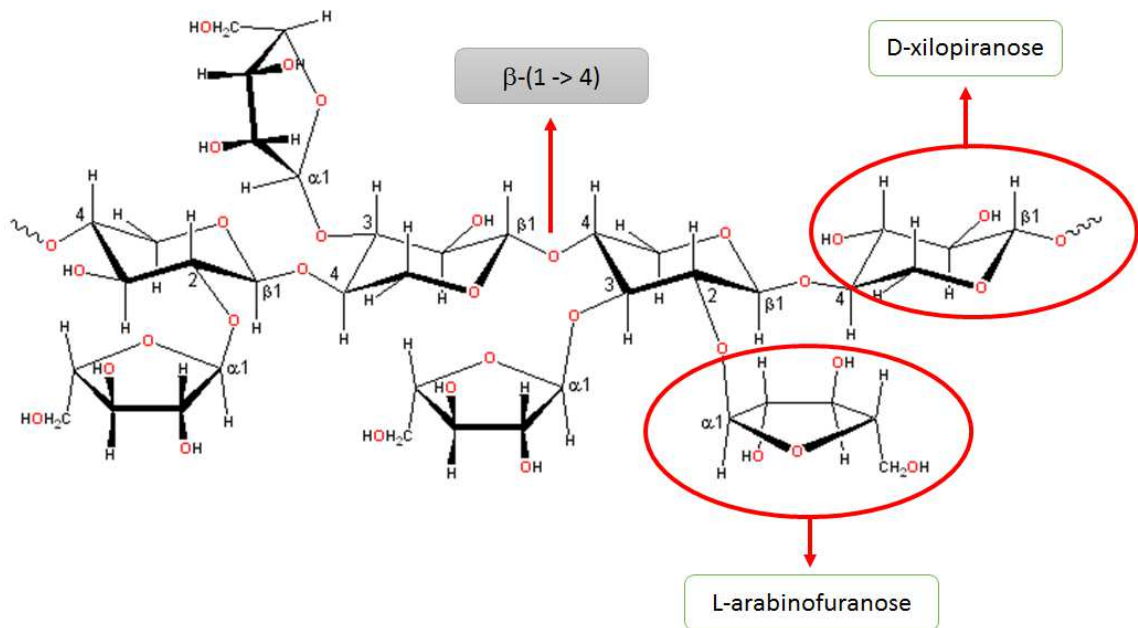


Figura 2 - Unidade repetitiva do arabinoxilano, hemicelulose mais abundante tanto na parede primária quanto secundária principalmente de gramíneas. A cadeia principal é formada por moléculas de xilose interligadas por ligações glicosídicas β-1,4. As ramificações são formadas por substituições nos carbonos 2 e/ou 3 da cadeia principal, com moléculas de arabinose.

Fonte: Adaptada de CHAPLIN ⁷

A 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 xilanases^{3, 5, 8}, pois se organizam em um arranjo fibroso totalmente amorfo. A hemicelulose ajuda a estabilizar a parede celular através de interações de hidrogênio com a celulose, formadas na etapa anterior a lignificação. Além disso, ela ainda se apresenta ligada por ligações covalentes à lignina, ou seja, a ligação entre hemicelulose e lignina são mais fortes e consistentes que hemicelulose com celulose. A maior parte das hemiceluloses pode ser extraída por soluções aquosas de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio.

1.1.2 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo não ramificado constituído unicamente por moléculas de celulose interligados por ligações covalentes β-1,4. Duas moléculas de glicose se condensam através da ligação glicosídica formando uma celobiose (dissacarídeo). E pela configuração especial alternada dessas ligações, a unidade repetitiva da celulose é a celobiose.

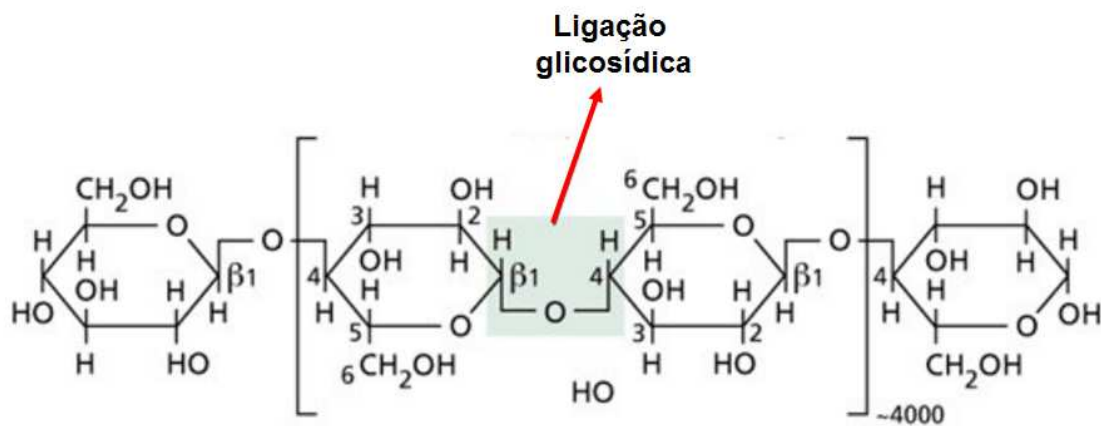


Figura 3 - Celobiose, unidade formadora do polímero de celulose. Celobiose é formada pela reação de condensação de duas moléculas de glicose por uma ligação glicosídica β -1,4.

Fonte: Adaptada de THAKUR et al.⁹

A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas (ordenadas) e amorfas (orientação randomizada), como mostrado na Figura 4. Essas regiões altamente ordenadas são estabilizadas por interações de hidrogênio inter e intramoleculares. Essas interações que se formam entre longas cadeias de celulose dão origem às microfibrilas insolúveis. As diferenças entre as microfibrilas estão no grau de ordenação, comprimento e largura. As microfibrilas podem ser tão longas que acabam possuindo tanto regiões cristalinas quanto regiões amorfas em sua extensão.

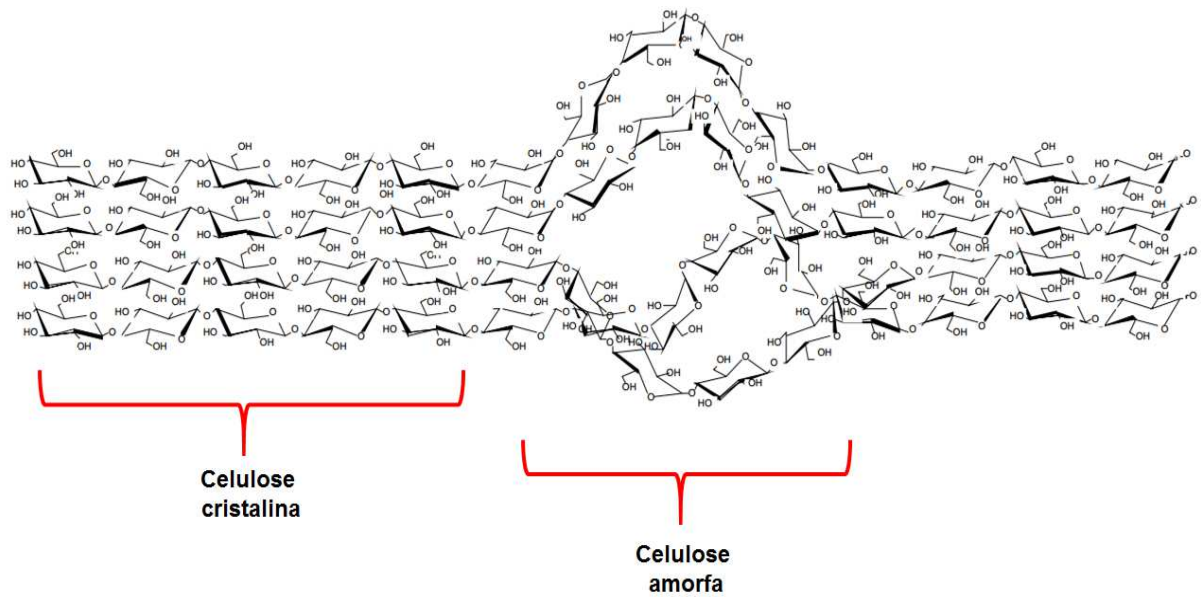


Figura 4 - Estrutura da celulose com destaque para regiões cristalinas e amorfas

Fonte: Adaptada de BÖRJESSON¹⁰

1.1.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero amorfo formada pela polimerização dos álcoois orgânicos cumarílico, coniferílico e sinapílico, e a proporção desses diferentes álcoois representa diferentes tipos de lignina. A função primordial dela é promover certa proteção à planta, envolvendo as moléculas de celulose e hemicelulose, a fim de aumentar a dificuldade no acesso de microrganismos, que representa um desafio na produção de biocombustíveis, já que o uso da biomassa como substrato requer a quebra dos componentes de sua fibra e acesso das enzimas a sua estrutura interna.¹¹ No processo de fabricação de papel, na maioria dos casos é importante a retirada completa de lignina da massa bruta (por processos químicos e mecânicos), pois pequenas quantidades de lignina no papel causam amarelamento deste com o tempo, por oxidação no ar. Para a retirada da lignina da fibra, é importante que sua solubilidade na solução de lavagem seja aumentada, geralmente isso é conseguido com a hidrólise das ligações éter e adição de grupos hidrofílicos à sua estrutura.

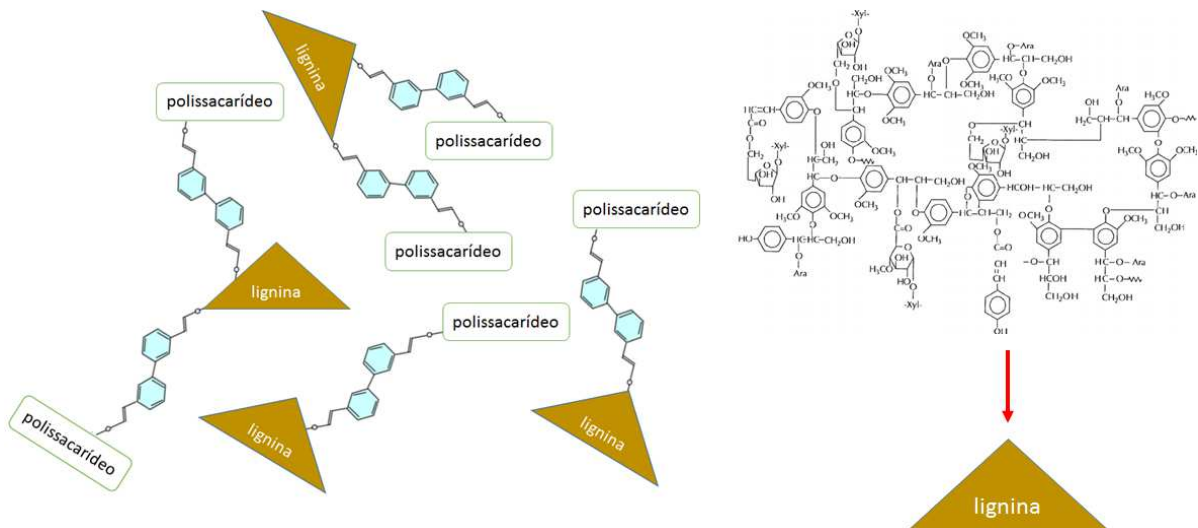


Figura 5 - À esquerda, deposição de alguns constituintes da parede secundária, contendo ligninas (complexo de compostos fenólicos ligados entre si, à direita, e representado por triângulo bege na imagem da esquerda) interconectadas a polissacarídeos através de pontes diferúlicas (azul claro). Em muitas células essa junção é suficiente para impedir a continuidade do crescimento da célula

Fonte: Adaptada de BUCKERIDGE¹²

1.2 Parede celular

A parede celular é uma estrutura externa à membrana plasmática e característica das células vegetais, formada por um arranjo complexo de polissacarídeos e proteínas, secretados pela célula. São várias as funções primordiais dessa parede, tais como: dar forma e rigidez à célula, garantir o fortalecimento mesmo em situações de expansão osmótica, proteger contra diversos microrganismos, além de promover uma continuidade entre as células para transferência de substâncias.

O constituinte mais presente é a celulose, que é basicamente é um polímero de glicose, e que estão associadas através de estruturas chamadas microfibrilas, imersos em uma matriz não celulósica formada por polissacarídeos chamados pectinas e hemicelulose.

Num primeiro momento, a parede celular pôde ser dividida em duas camadas: primária e secundária. Seguindo um modelo descontínuo da parede celular, a parede celular primária é composta por três domínios independentes: pectinas, celulose-hemicelulose e proteínas; esses três coexistem independentemente, ou seja, sem ligações químicas covalentes (apenas interações de hidrogênio). Ela possui um montante de aproximadamente 65% de água. Sua síntese ocorre ainda durante a telófase, com as microfibrilas sendo formadas na face exoplásmica da membrana plasmática; além disso, as pectinas e hemiceluloses são formadas no Complexo de Golgi e transportadas através de vesículas, para a membrana. Dependendo do

tecido vegetal, essas paredes podem apresentar espessuras diferentes, a fim de manter interconexões e comunicação entre as células vizinhas.

A parede secundária, em contraste à primária, apresenta uma baixa quantidade de água e alta quantidade de lignina (conferindo certa impermeabilidade à célula), segundo polímero mais abundante entre os vegetais. As microfibrilas são mais organizadas nessas paredes, entretanto, estas não existem em todas as células. A formação da parede secundária ocorre após o encerramento do crescimento celular, entre a membrana plasmática e a parede primária, e ela pode conter três camadas distintas, S1 (mais externa), S2 (intermediária) e S3 (mais interna).

A lamela média é uma camada existente entre as células, externa à parede primária, que permite a interconexão entre essas células.

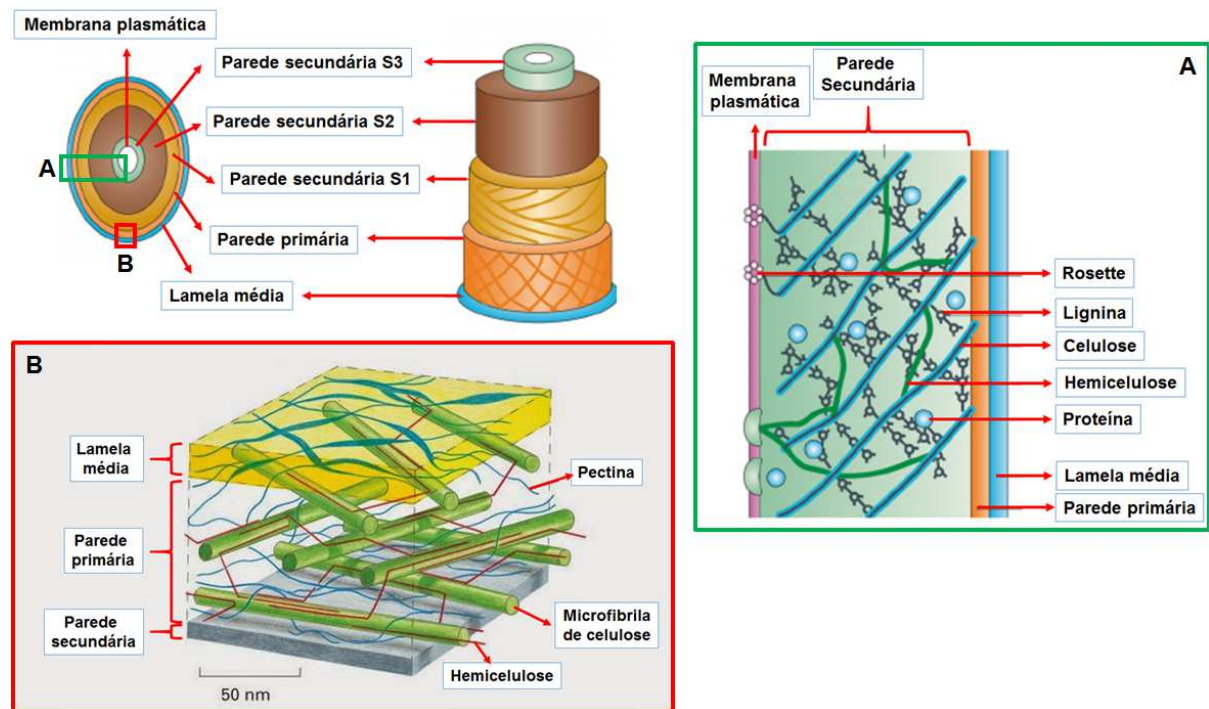


Figura 6 - Esquema de um corte transversal de uma célula vegetal e destaque para camadas circunscritas ao citoplasma celular, contendo de fora para dentro lamela média, parede celular primária, paredes celulares secundárias S1, S2 e S3, e membrana plasmática. O retângulo verde destaca a região A (engloba parede celular secundária) e o retângulo vermelho destaca a região B (engloba a parede celular primária).

Fonte: Adaptada de DENG¹³

1.3 Energia da biomassa

Hoje em dia existem duas rotas principais de conversão do material lignocelulósico em biocombustíveis: rota bioquímica e rota termoquímica.

Rota bioquímica é aquela que necessita de um pré-tratamento do material, seguido de hidrólise e fermentação; e nesses processos ocorre o envolvimento de enzimas. A rota bioquímica ainda apresenta muitos desafios tecnológicos, porém já vem sendo feita e aprimorada.

A rota termoquímica envolve a transformação da biomassa por meio da gaseificação e pirólise. Pode-se falar também da combustão e co-combustão, porém essas duas já são a queima propriamente dita, com excesso de oxigênio e com baixa eficiência energética – em torno de 20 a 25%

Na pirólise, o material é posto sob altas temperaturas na ausência de oxigênio, isso faz com que ocorra sua decomposição, e o que resta são óleos, mistura de gases e carvão vegetal. Já a gaseificação da biomassa consiste na sua conversão para gás combustível, possibilitando sua utilização em equipamentos como turbinas a gás e motores alternativos de combustão interna. Esses processos, seguidos de síntese catalítica ou da fermentação, tornam possível a obtenção de hidrocarbonetos, alcoois, hidrogênio, amônia e GNS (Gás Natural Sintético).

Sistemas energéticos baseados em biomassa tendem a ter maior viabilidade no mercado se a biomassa residual existe a baixo custo (cana-de-açúcar, resíduos industriais de papel e celulose). Além disso, outro aspecto importante na viabilização dos futuros sistemas energéticos que utilizam biomassa é a integração de vários processos e a geração de vários produtos, com diferentes funcionalidades e aplicações; e o conceito de biorrefinaria aparece para imperar a médio e longo prazo.

1.4 Energia no Brasil

O consumo de energia é um dos principais indicadores do desenvolvimento econômico e da qualidade de vida de uma sociedade (Figura 7), e no ano de 2015, a demanda de energia no Brasil recuou mais expressivamente que o PIB.

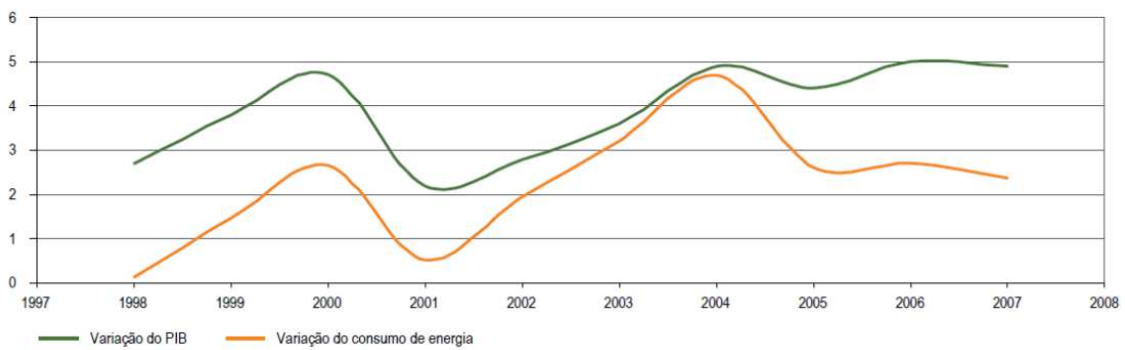


Figura 7 - Variação do PIB e variação do consumo de energia entre os anos de 1998 e 2007.

Fonte: IPEA ¹⁴

A oferta interna de energia (OIE) em 2015 ficou em 299,2 milhões de tep (toneladas equivalentes de petróleo), ou Mtep, mostrando retração de 2,1% em relação a 2014, e equivalente a 2,2% da energia mundial.

A expressiva queda da OIE, coerente com o recuo de 3,8% na economia, teve como principais indutores as taxas negativas de 3,0%, no consumo industrial de energia, e de 2,6%, no consumo de energia em transportes. Os usos não-energéticos, com baixa de 4,9%, também contribuíram, embora com menor consumo relativo.

Em 2015, a Oferta Interna de Energia Elétrica (OIEE) ficou em 615,9 TWh, montante 1,3% inferior ao de 2014 (624,3 TWh) – crescimento de 2,1% em 2014. Por fonte, merecem destaque os aumentos de 77,1% na oferta por eólica, de 7,1% por lixo e outras bioenergias, e de 5,8% por bagaço de cana. As ofertas por óleo fóssil e gás natural recuaram 19,0% e 2,0%, respectivamente.

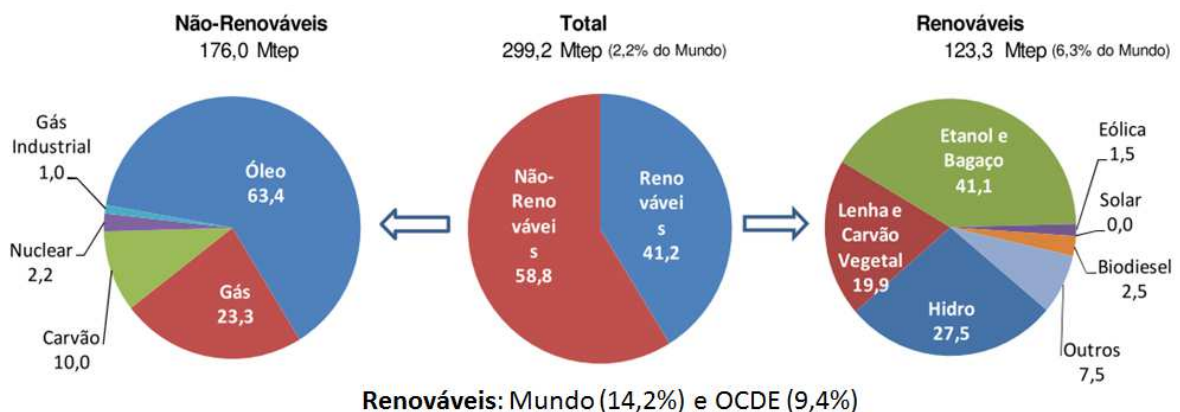


Figura 8 - Oferta interna de energia no Brasil (2015). Supremacia da proporção dos renováveis na matriz energética brasileira. Mtep significa mega tonelada de equivalente de petróleo.

Fonte: BANDEIRA ¹⁵

Em 2015, as fontes renováveis chegaram a 75,5% de participação na matriz de OIEE, indicador 0,9% superior ao verificado em 2014 (Figura 8).

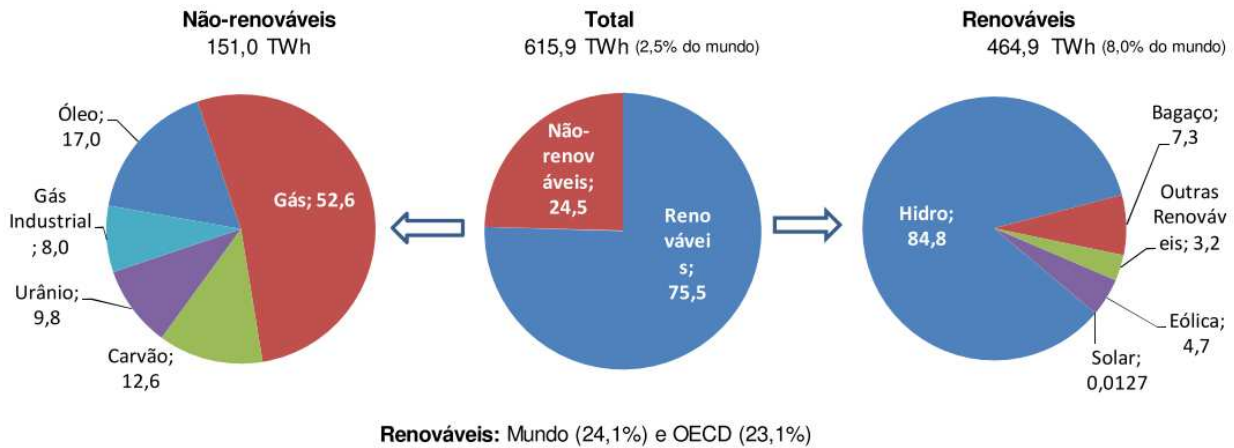


Figura 9 - Oferta interna de energia elétrica (2015). OECD representa os países mais ricos do mundo

Fonte: BANDEIRA¹⁵

Além disso, a expressiva participação da energia hidráulica e o uso representativo da biomassa na matriz energética brasileira proporcionam indicadores de emissões de CO₂ bem menores do que a média mundial e dos países desenvolvidos (OCDE). Em 2015, em termos de tCO₂/tep de energia consumida, o indicador do Brasil ficou em 1,56, enquanto que nos países da OCDE ficou em 2,25, e no mundo, em 2,35. Em 2013, os indicadores foram de 1,54, 2,27 e 2,38, respectivamente.

Em 2013, a China e os Estados Unidos, com uma emissão de 14143 milhões MtCO₂, responderam por 43,9% das emissões mundiais, que totalizaram 32190 Mt. Em 2010, a participação foi menor, de 41,8% (Resenha Energética Brasileira referente ao ano de 2015, Ministério de Minas e Energia, 2016)

1.5 Etanol

O etanol desempenha um papel importante na economia brasileira, pois pode ser utilizado como combustível nos veículos *flex-fuel* (hidratado), misturado com a gasolina, com vista a baratear o combustível, aumentar sua ocnatagem e reduzir a emissão de poluentes (anidro), além da utilização na fabricação de tintas, vernizes, solventes etc. Na safra deste ano, a estimativa é de aumento na produção de anidro, passando de 11,2 bilhões de litros para 11,49 bilhões de litros. O aumento de 25 para 27% da mistura de etanol anidro na gasolina também é um dos responsáveis por este aumento. Além disso, o etanol hidratado deverá ter

redução na sua produção pois uma parcela maior da moagem será destinada à produção de açúcar; ocorreu também a estagnação na sua demanda, por conseguinte, o etanol anidro se tornou mais vantajoso devido os preços mais baixos. A estimativa de 16,38 bilhões de litros é 14,9% inferior à safra passada. Segundo a Agência Norte de Produção (ANP), o consumo de gasolina subiu 2,1% (2336689 barris equivalente de petróleo - bep) no primeiro semestre de 2016 em relação a 2015, enquanto o consumo de etanol (hidratado) caiu 14% (4301067 bep). (Conab, Agosto de 2016)

Conforme o estudo, feito em conjunto com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), hoje o custo de produção do litro de etanol de primeira geração (1G) está próximo de R\$ 1,10, enquanto o de segunda geração, em R\$ 1,50, sendo que 30% do custo deste vem das enzimas utilizadas. A expectativa, no entanto, é de que esses valores fiquem entre R\$ 0,90 e R\$ 0,70 e entre R\$ 0,70 e R\$ 0,50, respectivamente, a longo prazo (2020). Basicamente, essa redução virá do próprio desenvolvimento tecnológico e biotecnológico pelo qual esse setor experimenta.¹⁶

Para questões químicas e funcionais, o etanol de primeira geração e o de segunda são exatamente equivalentes; sendo a única diferença advinda de sua produção.

1.5.1 Etanol de primeira geração (1G)

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo depois dos EUA, pois possui 25% de participação no mercado global. Diferente dos EUA que dependem do milho para alavancar sua produção, o Brasil produz etanol a partir da cana-de-açúcar. O etanol é uma fonte de combustível brasileira cuja origem remonta a princípios do século 20, mas que só ganhou força em 1973, com a crise do petróleo que resultou na criação do Programa Nacional do Álcool, o PROÁLCOOL. O programa acelerou o investimento público e privado na produção do bioetanol, tornando-se a peça central do setor de energia brasileiro.

Em 2003 houve a introdução dos veículos flex (FFV) no Brasil, que podem ser abastecidos tanto com gasolina quanto com etanol hidratado, e se tornaram rapidamente o padrão da frota de carros brasileira. Já em 2014, os veículos flex (FFV) respondiam por 88% das vendas de veículos leves e consolidavam a viabilidade de um mercado de etanol doméstico. Os benefícios ambientais do etanol em relação aos demais tipos de combustível permitiram ao Brasil tornar-se líder do espaço de combustíveis alternativos. Entretanto, a indústria brasileira do etanol teve que passar recentemente por desafios: um deles esteve ligado a queda brusca do preço do petróleo em 2015, devido à descoberta de novas reservas

petrolíferas na camada do pré-sal em 2007, no Rio de Janeiro. Isso fez com que o etanol perdesse um pouco de força no país e o processamento deste etanol de primeira geração está começando a dar sinais de cansaço. No período de 2013-2014, foram construídas apenas três novas usinas de etanol, ante 30 entre 2008 e 2009. O rendimento da produção convencional estagnou em 6000 litros por hectare.¹⁷

1.5.2 Etanol de segunda geração (2G)

Então ganha destaque a produção de etanol de segunda geração (2G), que ainda depende de melhorias no processo tecnológico e de inovações no que diz respeito a transformação da matéria-prima. Desde 2011, empresas brasileiras têm investido consideravelmente na tecnologia do etanol 2G. Além disso, se formos considerar investimentos bem-sucedidos, atrelados às vantagens relativas de custos aqui no Brasil e vasta quantidade de terras aráveis, o papel do Brasil no mercado global poderá mudar para melhor nos próximos anos.

Como já foi mencionado, a principal diferença entre os dois tipos de etanol está apenas na produção. Para se produzir etanol 1G, os açúcares advindos das lavouras tanto de cana-de-açúcar, quanto de milho e beterraba, têm de ser convertidos em etanol. Já com o etanol 2G, a matéria-prima não é definida e única – ela engloba uma enorme variedade de biomassas. Entretanto, não é qualquer insumo que fornece uma rentabilidade maior e isso deve ser estudado. De um modo geral, o etanol 2G tem maior compatibilidade com o meio ambiente comparado ao etanol 1G, pois sua planta de produção geralmente é melhor e seus índices de conversão e rendimentos são mais elevados, além da quantidade maior da captura de carbono da atmosfera.¹⁷

Desconsiderando a produção mais econômica e mais compatível como meio ambiente, do etanol 2G, a coleta de matéria-prima é mais simples, podendo haver associações e acordos entre as empresas de biotecnologia e agricultores. Isso permite, por exemplo, que haja recolhimento de palha da cana após o período de colheita. Porém isso limitaria as instalações para a produção de etanol 2G às proximidades dos campos, para diminuição de custos de transporte; apenas uma questão de logística e infraestrutura.

O que então deve-se considerar com maior peso são os ganhos em eficiência resultantes da utilização do material excedente – além de que a mesma área plantada pode resultar em até 50% a mais de etanol.

De maneira geral, a produção de etanol 2G ainda é 30% mais cara que a produção de 1G, visto que se utilizam muitas enzimas para a degradação dos açúcares presentes na palha e bagaço. Embora o preço das enzimas tenha caído 78% nos últimos quatro anos, essa parcela é a de maior custo na produção. Porém, deve-se ter uma visão além do presente, considerando planejamentos e projeções, e estudos dizem que o 2G tem maior potencial de gerar lucros que o etanol 1G; além disso, enzimas, que hoje em dia podem ser utilizadas uma única vez, estão sendo otimizadas para emprego em vários ciclos da produção, sem necessidade de troca. Essas transformações estão causando diminuição no preço final do produto, aumentando a competitividade, fator extremamente importante na cena energética global de quedas de preço de derivados do petróleo.¹⁷

A parte enzimática dentro do processo de produção do etanol 2G tem grandes influências no preço final do produto, não apenas pelo seu custo, mas sim, pelo seu resultado no rendimento final da produção. Por exemplo, com a utilização da palha, bagaço e outros resíduos da cana, conseguiu-se um aumento na conversão enzimática de 55%, e isso resultou em 25% de aumento no rendimento da produção do biocombustível.¹⁸ Somando a isso um *pool* de enzimas reutilizáveis, pode-se dizer que houve recentemente uma significativa redução no custo marginal de produção do etanol de segunda geração.

1.6 Biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria é análogo ao das refinarias de petróleo, que produzem combustíveis e também derivados do petróleo. Ela é uma unidade industrial que faz a integração de processos e equipamentos para a conversão de biomassa na produção de biocombustíveis, eletricidade, calor, insumos químicos e derivados refinados ou não, maximizando benefícios e lucros. Ela também está ligada à agregação de valor aos materiais intermediários (ou resíduos) na rota de produção de um determinado produto, reduzindo custos finais.

De forma mais prática, podemos dizer que o aproveitamento energético total da cana-de-açúcar, desconsiderando o etanol e o açúcar obtidos de forma convencional, está dentro do conceito geral de biorrefinaria. Conceito este que pode ser resumido da seguinte maneira: “A biorrefinaria é composta por facilidades e instalações produtivas que geram e utilizam matéria prima de origem vegetal e renovável, operando de forma totalmente integrada, e que através

de processos físicos-químicos, enzimáticos ou biológicos transformam estas matérias em subprodutos que atendam às necessidades do consumo contemporâneo, de forma sustentável e com o mínimo de impacto ambiental”.¹⁹

Quando analisamos de forma mais abrangente esse conceito, vemos que uma das principais e fundamentais matérias-primas em biorrefinaria é a energia solar, através da qual toda a biomassa é gerada. Além disso, como requisito de uma produção adequada, temos a inserção de tecnologia de ponta atrelada às condições climáticas de forma racional; de antemão a logística deve ser flexível e protegida das oscilações de preços que o mercado internacional impõe.

Existem muitos exemplos de como a biorrefinaria age no setor, um deles é que a maioria das usinas gerencia plantações alternadas em uma porcentagem do espaço total da plantação principal, plantando outro tipo de cultura, em geral grãos de curto ciclo de produção, maximizando o aproveitamento do solo e criando uma fonte alternativa de recursos. Outro exemplo é que o setor industrial da maioria das usinas brasileiras possui a tecnologia necessária para a produção de vários tipos de açúcares, de acordo com especificações particulares e com a demanda do mercado.

Algumas usinas até produzem leveduras desidratadas que atendem ao mercado japonês, onde lá eles as utilizam como ração para peixe. A vinhaça gerada durante a destilação do álcool é totalmente redirecionada novamente para o setor agrícola, assim como tortas de decantadores e cinzas das caldeiras, diminuindo a necessidade de adubação química.

Destaca-se também a autossuficiência em energia elétrica ganha pelas usinas de álcool e açúcar, além do excedente que é repassado para venda, fazendo-se uso do bagaço como fonte energética. Ganhos com a palha da cana também podem já ser considerados.

Para ser utilizado como ração animal, e a partir de tecnologia disponível no setor, o bagaço muitas vezes é passado por tratamentos adicionais, como cozimento a vapor seguido da despressurização, a fim de aumentar sua digestibilidade. Esse último processo representa o que chamamos de pré-tratamento, o que em muitos casos é necessário.

1.6.1 Pré-Tratamento

Como foi descrito anteriormente, a estrutura da lignocelulose é formada por fibras de celulose embebidas num emaranhado de hemicelulose e lignina. O processo de conversão desse material em etanol requer várias etapas, tais como lavagem, pré-tratamento, hidrólise, fermentação e purificação.²⁰ Na sacarificação, ocorre a hidrólise enzimática da celulose à glicose, porém esse processo pode ser dificultado devido à associação formada entre celulose, hemicelulose e lignina, impedindo o acesso fácil de enzimas à estrutura interna da fibra. Nesse sentido, o pré-tratamento da biomassa é um importante passo na conversão econômica de materiais lignocelulósicos a etanol.²¹ Os pré-tratamentos além de eficientes são extremamente necessários, visto que o subsequente rendimento das hidrólises vai de 20% a 90%, dependendo do tipo de pré-tratamentos utilizados e suas associações. Além disso, deve-se ter em mente que esse processo precisa ser seletivo e funcional, assegurando a acessibilidade, eficiência e redução de consumo de energia e insumos. Outro ponto a se considerar, é a geração de produtos que inibem a ação das enzimas da hidrólise e dos microrganismos que atuarão na fermentação.

A diversidade de pré-tratamentos que existem atualmente é alta e eles agem diferentemente em cada componente da biomassa, além de apresentarem vantagens e desvantagens um em relação ao outro. Os principais são: físico (moagem, trituração e explosão a vapor), químico (ácidos diluídos/concentrados e bases) e os biológicos (degradação por fungos ou bactérias).

Os pré-tratamentos físicos apresentam altos rendimentos de glicose e pentoses, pois conseguem romper as ligações da hemicelulose e lignina à celulose, porém apresentam alto gasto energético e a retirada da lignina não é tão eficiente. Já o químico gera um bom rendimento de glicose e hemicelulose, aumenta a reatividade e porosidade da fibra, entretanto, ocorre a formação de produtos de degradação e a necessidade de equipamentos especiais, além de etapa adicional para neutralização do produto. O pré-tratamento biológico requer baixa quantidade de energia, visto que pode ser realizado em condições brandas, além de retirar maior parte de lignina; porém o tempo de reação é maior, e as bactérias ou fungos utilizados acabam consumindo parte do produto (rendimento reduzido).

1.6.2 Hidrólise

O mecanismo de hidrólise da celulose mais aceito atualmente envolve no mínimo a ação sinérgica de três classes de enzimas: endoglucanases (ação randômica de despolimerização através da quebra de ligações β -1,4), exoglucanases (age sobre a celulose cristalina, liberando celobiose) e β -glucosidases (quebra da ligação glicosídicas β -1,4 de celobiose ou de pequenos oligossacarídeos, liberando moléculas de glicose).²²

O xilano é a molécula mais abundante das hemiceluloses, porém sua diversidade e complexidade estrutural requerem uma diversidade equivalente para sua quebra, envolvendo endo-1,4- β -xilanasas, β -D-xilosidases, α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases.²³ Várias dessas enzimas fazem apenas o trabalho da retirada das cadeias laterais, deixando a principal de xilano livre para ação das xilanasas. Neste caso, com a liberação das xilobioses, as β -xilosidases fazem então a separação das duas moléculas de xilose.

1.7 Vias de tratamento da xilose e problemática bioquímica

Em bactérias que consomem xilose, uma molécula de D-xilose é transformada em D-xilulose pela xilose isomerase (XI).²⁴ A xilulose é então fosforilada a xilulose-5-fosfato, que já é um intermediário da via das pentoses-fosfato.²⁵ Uma rota semelhante foi encontrada também em fungos anaeróbios²⁶, 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 10).

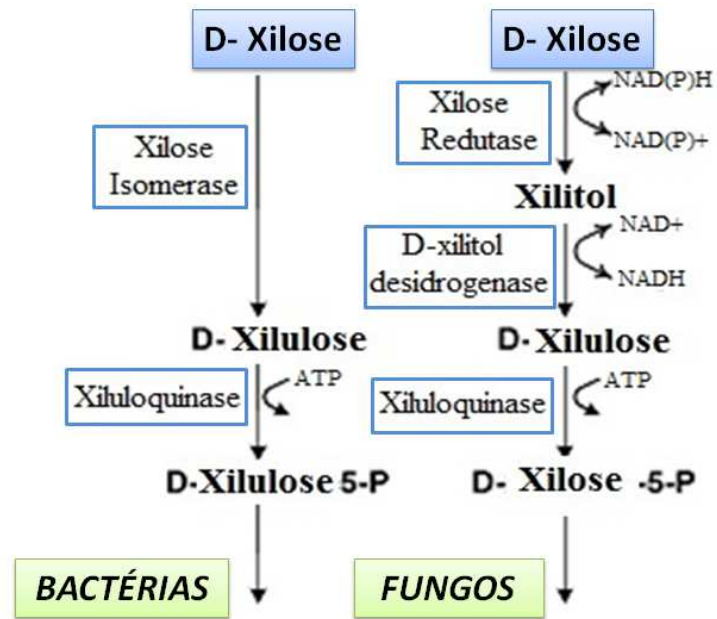


Figura 10 - Vias de utilização de xilose em fungos e bactérias

Fonte: Adaptada de HARHANGI et al.²⁷⁻²⁸

A xilose é então reduzida a xilitol²⁹⁻³¹ 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).³⁰⁻³² Assim como nas bactérias, a D-xilulose é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato por uma xiluloquinase (XK).³³⁻³⁴

1.8 Xilose isomerase (XI)

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 xilulose³⁵, Figura 11.

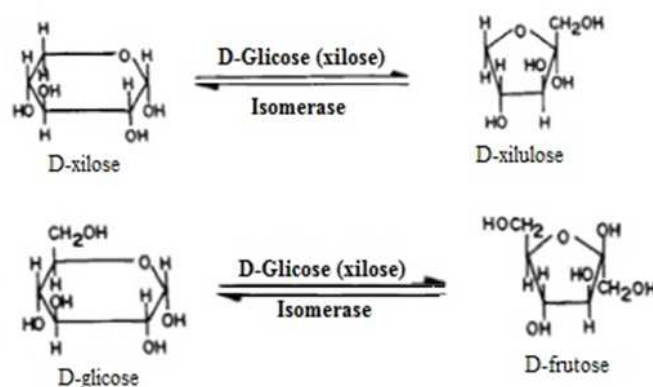


Figura 11- Reação de isomerização realizada pela enzima xilose isomerase. (A) com substrato D-xilose e (B) com substrato D-glicose.

Fonte: Adaptada BHOSALE³⁶⁻³⁷

Como xilulose é consumida facilmente por *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 segunda geração (2G).³⁸

No caso de procaríotos, 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 eficiência³⁹), e por isso também é conhecida como glicose isomerase (GI). Ela é uma das enzimas amplamente utilizadas na indústria,⁴⁰ para produção de xarope de milho rico em frutose, *high-fructose corn syrup* (HFCS), em uma reação sob altas temperaturas, o que otimiza a quantidade de produto final e ao mesmo tempo evita contaminações por outros microrganismos.

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.^{39, 41} Esta enzima é ativada por íons de metais divalentes, Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} , seus cofatores, e é inibida pelos íons⁴² Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} . Além disso, a enzima é inibida por D-xilitol e D-sorbitol.^{39, 41, 43-44} Tanto inibição pelo Ca^{2+} como pelo xilitol, além de baixa atividade específica da enzima, representam sérios problemas na utilização XI em processos industriais. Além disso, até poucos anos atrás, o que se conhecia desta enzima estava relacionado a sua vertente de glicose isomerase, o que de certa forma desviou o caminho da busca por novas XIs com atividade ótima a baixas temperaturas (pois em um processo de fermentação submersa simultânea, a conversão de xilose em xilulose estará ocorrendo ao mesmo tempo e no mesmo ambiente da fermentação de xilulose e outros açúcares pela *S. cerevisiae* para

produção final de etanol 2G, portanto, condições de reação devem ser compatíveis às condições ótimas de sobrevivência deste microrganismo).

1.8.1 Estrutura

Xilose isomerase é uma enzima globular, geralmente tetramérica (ou dimérica), formada por 4 unidades (monômeros) muito parecidas (ou idênticas), conectadas por interações não covalentes (ausência de pontes dissulfeto), como mostrado na figura a seguir. Além disso, seu monômero possui dois domínios principais. O domínio N-terminal é formado por um barril $(\alpha/\beta)_8$ (Figura 12b), que seria o *core* da enzima, e onde se situa seu bolsão catalítico. Já o domínio C-terminal, este é formado por uma alça com hélices e voltas. O que geralmente as mantém unidas são as interações de hidrogênio, que estabilizam a estrutura como um todo diante do solvente na qual a enzima se encontra.

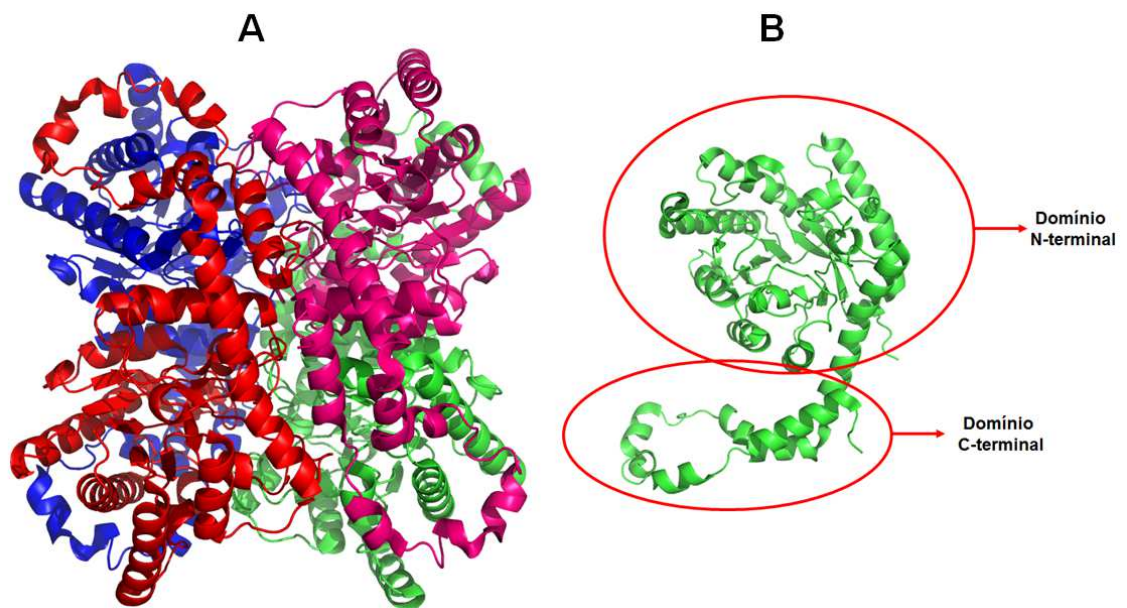


Figura 12 - A-Tetrâmero da xilose isomerase de *Streptomyces rubiginosus* (PDB id 4zb2) e em B seu monômero, com destaque para os dois domínios principais, domínio N-terminal, formado por barril $(\alpha/\beta)_8$, e domínio C-terminal, formado por uma uma alça de hélices e voltas. Figuras foram feitas no programa Pymol (DeLano Scientific)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Algumas delas, como a XI de *Bacillus sp.* são trímeros⁴⁵⁻⁴⁷, porém são incomuns.

Estudos envolvendo dissociação dessas enzimas permitiram afirmar que as estruturas que apresentam atividade catalítica são apenas as diméricas e tetraméricas, e além disso, já foi descrito o processo de enovelamento das XIs, permitindo também enfatizar a importância

crucial da estrutura terciária como responsável pela atividade enzimática, em detrimento à secundária.⁴⁸

Hoje em dia as XIs são divididas em duas classes: I e II. A diferença básica está na região inicial em N-terminal, de aproximadamente 50 resíduos, que enzimas do grupo I não possuem e do grupo II possuem. Não se sabe ao certo quais implicações na atividade catalítica que essa diferença promoveria.

1.8.2 Mecanismo de reação

Até recentemente, vários foram os mecanismos propostos de ação para a enzima xilose isomerase^{36, 49-53}, e ainda estão sendo investigados.^{20,54-55} Entretanto, no passado, muitos estudos indicavam estreita similaridade entre XI e triose fosfato isomerase (TIM), e isso sugeria o mesmo mecanismo de ação, da transferência de prótons com formação de intermediário *cis*-enediol.⁵⁶⁻⁵⁷

Estudos recentes propõem o mecanismo do deslocamento do hidreto,^{50-52,59} como mostrado na Figura 13. 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.

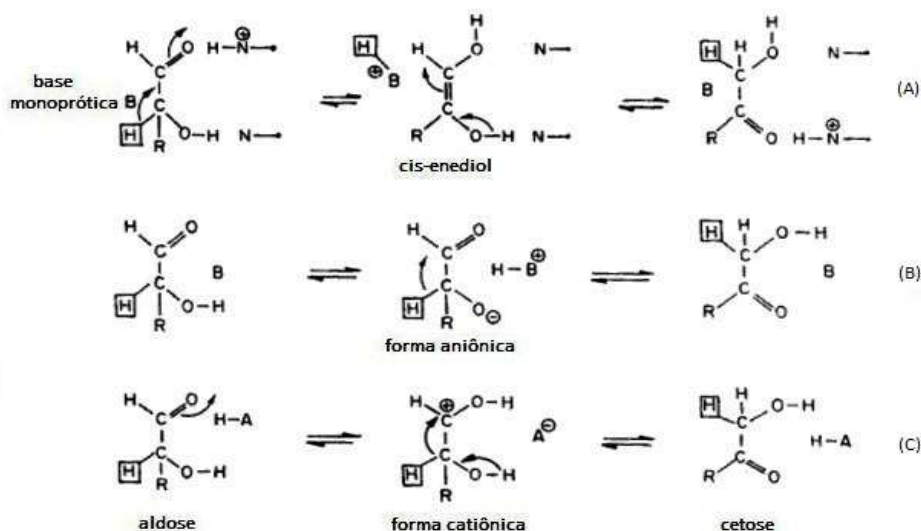


Figura 13 - Diferentes mecanismos propostos para reação de isomerização da XI. Abstração de um próton de C-2 formando um intermediário *cis*-enediol e subsequente transferência deste próton para C-1, auxiliado por grupo ácido capaz de protonar O-1, (A); transferência de prótons, gerando intermediário aniônico, (B); deslocamento do hidreto de C-2 para C-1, também gerando um intermediário portador de carga formal positiva, (C).

Quando falamos do mecanismo de reação para essa enzima, de antemão devemos destacar alguns pontos importantes: (1) XIs são específicas para os α -anômeros tanto de D-xilose, quanto de D-glicose, D-xilulose e D-frutose; (2) não apenas os resíduos usualmente marcados como catalíticos estão de fato envolvidos na catálise; (3) a enzima necessita de dois cátions de íons metálicos para estar completamente ativa; (4) não há evidências de transferência do próton de C1 ou C2 com solvente, reafirmando o deslocamento do hidreto e refutando a transferência de próton.

De início, espera-se que ocorra a adesão do substrato ao sítio catalítico, e sob influência do resíduo de histidina, agindo como uma base catalítica, convenientemente posicionada, ocorre a abertura do anel. Sabe-se que na sequência primária, sempre dois resíduos a diante da histidina catalítica aparece o resíduo de ácido aspártico catalítico. Esse é o resíduo responsável por facilitar e ativar eletrostaticamente a histidina no deslocamento do próton entre a hidroxila da histidina catalítica e o O1 do anel de D-xilose (Figura 14).

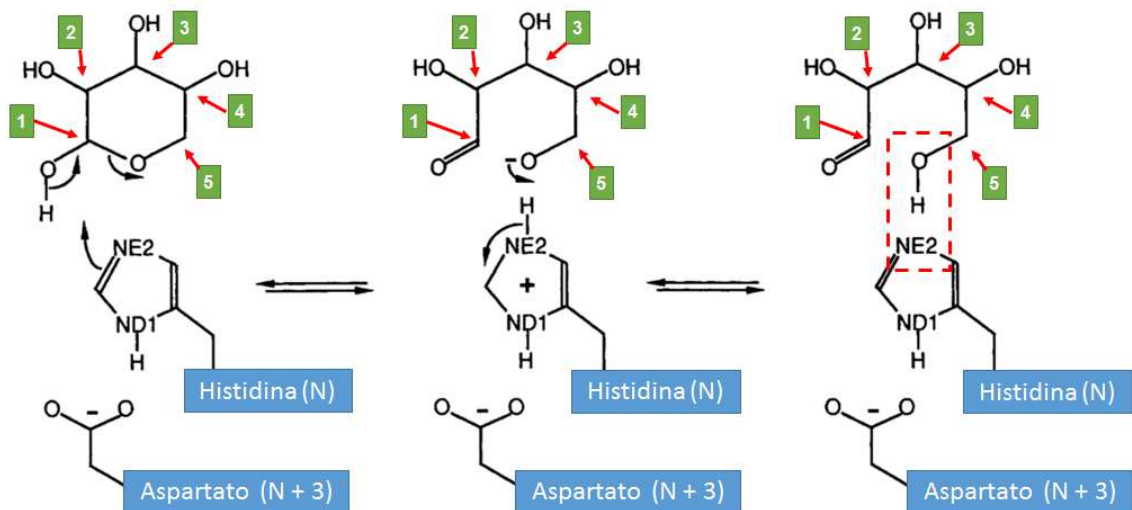


Figura 14 - Diagrama esquemático da etapa de abertura do anel de xilose no sítio ativo da XI. Estão destacados e numerados na imagem os carbonos da xilose e os resíduos catalíticos da enzima, que são sempre representados por uma histidina e um aspartato três resíduos upstream na estrutura primária. A base conjugada do resíduo de ácido aspártico facilita eletrostaticamente a abstração do próton da hidroxila 1 pelo nitrogênio NE2 do anel imidazólico. Essa abstração é equilibrada com o compartilhamento do par eletrônico remanescente entre o oxigênio 1 e o carbono 1; nesse momento ocorre a abertura do anel de xilose, pois o par eletrônico compartilhado entre o carbono 1 e o oxigênio do éter migra inteiramente para este oxigênio, alternando sua carga formal para -1 e o transformando em um nucleófilo muito forte. Esse processo é finalizado neutralizando-se a carga formal do sistema com a transferência do próton do anel imidazólico para um novo compartilhamento do par eletrônico adicional do oxigênio nucleófilo, transformando essa nova sociedade em um grupamento hidroxila. Na etapa final, a cadeia da xilose encontra-se aberta, cuja nova hidroxila do carbono 5 estabelece interação de hidrogênio com a histidina catalítica (retângulo vermelho tracejado), permanecendo aí durante a etapa seguinte, a isomerização

A segunda etapa principal da catálise é a isomerização de fato da D-xilose em D-xilulose. Através da Figura 15 podemos ver o passo-a-passo do mecanismo de reação, acompanhando o que ocorre das etapas de 1 a 6 (quadros vermelhos). Em (1), após a abertura do anel (Figura 14), a molécula se dispõe de forma a manter-se com carbonos 1 e 2 do lado oposto ao dos resíduos ácido aspártico e histidina catalíticos (Figura 14) e mais próximos do metal 2 (no círculo amarelo na Figura 15). Entre (1) e (2) ocorre a abstração do próton de uma molécula de água que estava fazendo parte da coordenação do metal 2 pelo oxigênio do aspartato (Asp), isso gera um íon hidróxido nucleófilo, que por sua vez colapsa o próton da hidroxila do carbono 2. Em (3), para aliviar o fato de haver um par eletrônico excedente situado em O2 (oxigênio do carbono 2), através da interação de hidrogênio estabelecida entre O1 e a lisina próxima (Lys), o par eletrônico compartilhado entre O1 e C1 (dupla ligação) se desloca inteiramente para O1. Após esse ocorrido, C1 se transforma em um carbocátion secundário, que não é mais estável do que seria um C2 se transformando em um carbocátion terciário. O intermediário com o carbocátion em C2 é mais estável, e através dele, ocorre o deslocamento do hidreto entre C2 e C1, acompanhada da neutralização do carbocátion em C2. Essa neutralização foi devido à formação da ligação dupla entre O2 e C2 (para isso foi utilizado o par eletrônico que se encontrava excedente em O2). Por fim, em (4), O1 nucleófilo ataca uma molécula de água (não necessariamente a inicial) e abstrai um próton, transformando-se numa hidroxila. Após essas transformações principais, em (5) e (6) ocorre apenas a transferência de prótons entre o íon hidróxido formado em (4), a partir da água, e oxigênio da base conjugada do resíduo de ácido aspártico próximo (Asp).

A catálise é concluída com o fechamento do anel (processo inverso ao demonstrado na Figura 14) e saída da molécula de produto do sítio catalítico da enzima.

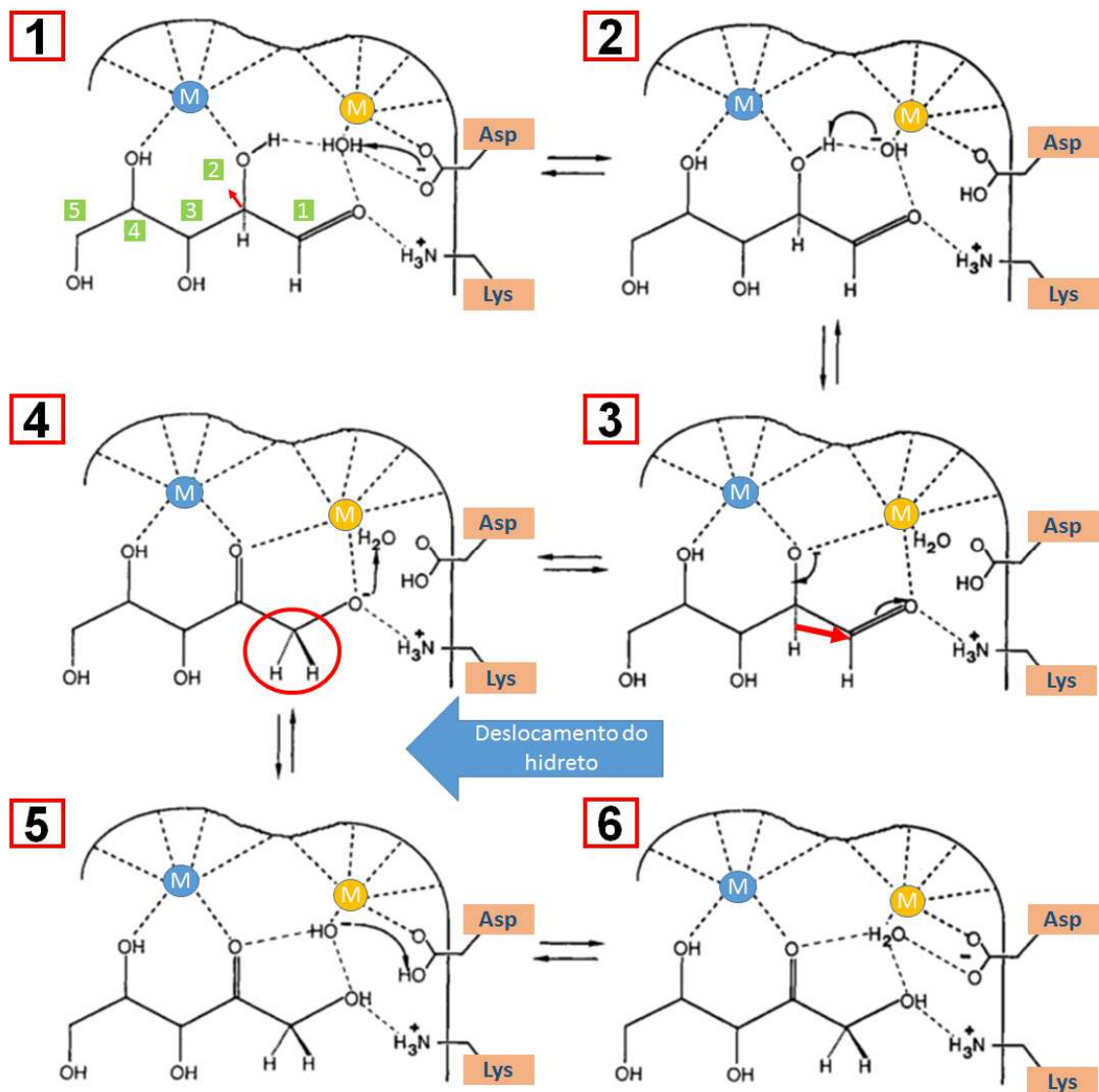


Figura 15 - Mecanismo da reação de isomerização da D-xilose para D-xilulose, através do deslocamento do hidreto, mediado por metal. (1) Ataque nucleofílico do oxigênio do aspartato (Asp) ao próton da molécula de água que faz coordenação com o metal 2 (M, dentro do círculo amarelo). (2) O novo nucleófilo formado pelo íon hidróxido remove um próton da hidroxila de C2, gerando um par de elétrons excedente em O2. (3) Através da interação com uma lisina próxima (Lys), o par eletrônico que C1 compartilhava com O1 se desloca para O1, formando um intermediário com C1 sendo um carbocátion secundário, o que faz haver uma transição para um estado mais estável em (4), com a transição do carbocátion para C2 (carbono terciário), mas para isso ocorre o deslocamento do hidreto de C2 para C1. Em (4) o carbocátion em C2 é resolvido através do novo compartilhamento do par eletrônico que estava excedente em O2, entre O2 e C2; e O1 que também estava com um par eletrônico excedente recebe o próton de uma nova molécula de água que estava fazendo coordenação com o metal 2, formando a hidroxila. Em (5) e (6) ocorre transferência de próton entre a hidroxila do resíduo de ácido aspártico próximo (Asp) e o novo íon hidróxido formado em (5). Após (6) deve ocorrer o fechamento do anel do produto e saída deste do sítio ativo da enzima.

Fonte: Adaptada de ^{39, 52}

1.8.3 Microrganismos de origem

Xilose isomerase é uma enzima vastamente presente em diversos microrganismos (MOs), de diferentes origens. Seu primeiro registro é em *Lactobacillus pentosus*, em que Mitsuhashi⁶⁰ descreve a conversão de xilose em xilulose a partir de extrato dessa bactéria; também outro dos primeiros registros foi em *Pseudomonas hydrophila*.⁶¹ A partir desses registros, as XIs foram sendo descobertas em um grande número de bactérias. Dentre os lactobacilos, *Lactobacillus brevis* é o que apresenta a maior taxa de expressão do gene que codifica esta enzima, além disso, o primeiro registro de cristalização de XI é de *L. brevis*. Acredita-se que como XI está envolvida no metabolismo da xilose, diversos MOs apresentem o gene *xylA* (gene que codifica para XI) em seu genoma, como herança de um metabolismo que extraía energia a partir da matéria orgânica vegetal em decomposição; em contrapartida, em alguns organismos esse gene encontra-se silenciado.

Neste projeto, foi realizada uma busca extensiva de genes que codifiquem a enzima xilose isomerase, de diversos MOs de origem. Mais especificamente, foram encontradas 96 genes de XIs até o momento sem estrutura de alta resolução resolvida e depositada no pdb (<http://www.rcsb.org>,⁶² último acesso em 12/12/2016). Das cinco estruturas resolvidas e refinadas deste trabalho, teremos um pouco mais de foco para seus MOs de origem, visto que apresentar detalhes e características de 96 diferentes MOs seria algo exaustivo à leitura e não tão útil ao escopo desta tese. Resumidamente, o que motivou essa busca dentre esses MOs foi justamente a diversidade; ou seja, encontrar XIs de diferentes origens e cujos genes passaram por diferentes pressões evolutivas até chegar onde chegaram.

1.8.3.1 *Escherichia fergusonii*

Essa é uma bactéria gram-negativa, mesófila, bacilar, anaeróbicas facultativas, e que guarda bastante similaridade com a *E. coli*. Foi primeiramente isolada de amostra de sangue humano. Algumas cepas são conhecidas por causar doenças e infecções em humanos, além de algumas apresentar resistência a certos antibióticos⁶³ (ampicilina, gentamicina ou cloranfenicol). Essa espécie é capaz de fermentar xilose, glicose, celobiose, tetralose, maltose, rhamnose, etc.⁶⁴

1.8.3.2 *Saccharophagus degradans*

Foi isolada pela primeira vez a partir do capim-marinho (*Spartina alterniflora*), na baía de Chesapeake, Estados Unidos. É uma bactéria marinha gram-negativa, com formato de haste (Figura 16), dotada de mobilidade, e reconhecida por degradar polissacarídeos como fonte de energia e consumo próprio.⁶⁵ Há ainda registros de fermentação da xilose e glicose a etanol.⁶⁶ Essa bactéria forma protuberâncias e associações com outras bactérias, formando uma espécie de maquinaria especializada na degradação de matéria orgânica marinha e vegetal (formada por celulose, quitina, pectina, agar, betaglicanos, xilanos, etc).

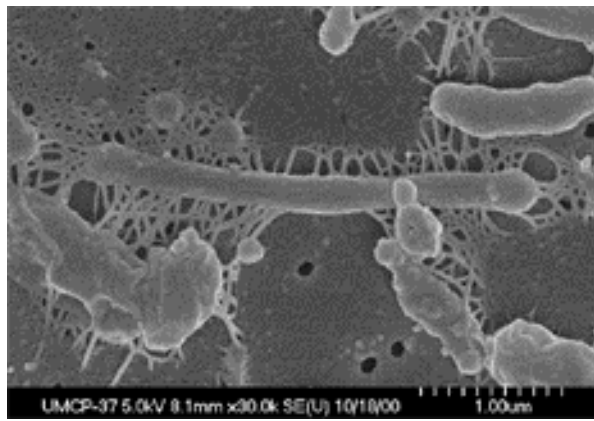


Figura 16 - Micrografia eletrônica da bactéria *Saccharophagus degradans*, de formato alongado, em haste, ocupando o centro da imagem.

Fonte: Adaptada de EKBORG⁶⁵

1.8.3.3 *Jonesia denitrificans*

Bactéria gram-positiva de formato irregular (antes da divisão possuem formato de haste, e após divisão apresentam forma de coco), não esporulante, anaeróbica facultativa, foi primeiramente isolada em 1948 de sangue de boi fervido. Esta bactéria está envolvida em processos de reciclagem do nitrogênio.

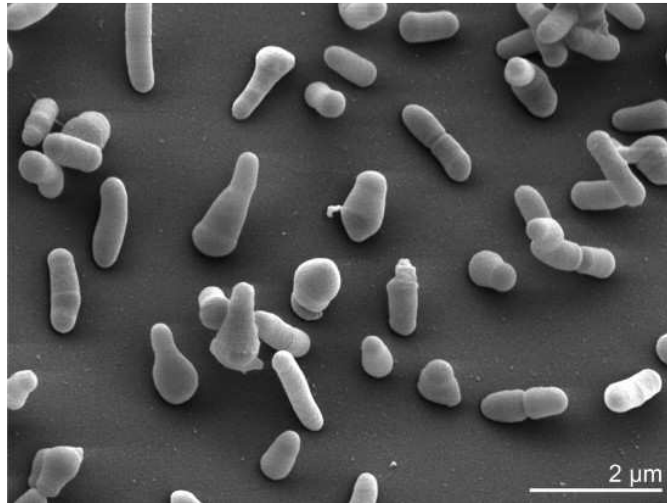


Figura 17 - Micrografia eletrônica da bactéria *Jonesia denitrificans*

Fonte: NORDBERT⁶⁷

1.8.3.4 *Ruminococcus champanellensis*

É uma bactéria estritamente anaeróbia, mesófila, isolada primeiramente de amostra fecal humana, formada por cocos gram-positivos sem mobilidade. São capazes de degradar celulose cristalina, além de celobiose, como substrato solúvel. Porém os subprodutos finais da fermentação da celulose e celobiose são acetatos e succinatos. Esses carboidratos são a base para o crescimento desses MOs, e não aminoácidos. Elas não são capazes de crescer em meio com apenas xilose, glicose, maltose, manitol, sorbitol, fucose, etc.⁶⁸

1.8.3.5 *Flavobacterium johnsoniae*

É uma bactéria aeróbica, gram-negativa, mesófila, encontrada geralmente no solo e em água doce, degrada quitina e outras macromoléculas por contato direto.⁶⁹ Essa bactéria é pertencente ao vasto grupo das bacteriodetes. Elas possuem movimento rápido por deslizamento (*gliding motility*), o qual é muito útil em seu processo de digestão da quitina, já que ela ocorre por contato direto com o material.

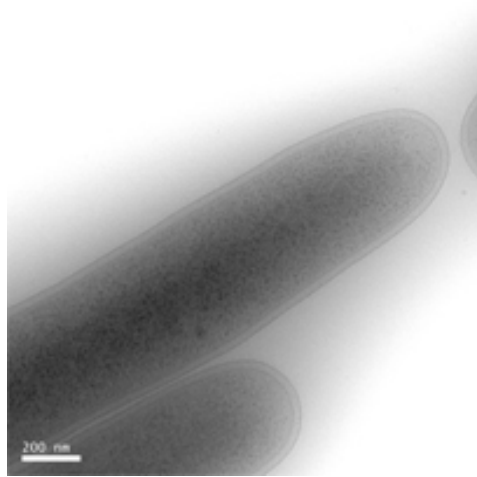


Figura 18 - Bactéria *Flavobacterium johnsoniae*

Fonte: Adaptada de STANIER⁶⁹

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A produção de etanol de segunda geração para ser economicamente sustentável é imprescindível a utilização da fração hemicelulósica. As pentoses (C5) que compõem a hemicelulose não são fermentáveis pelas leveduras utilizadas pela indústria brasileira (*Saccharomyces cerevisiae*). A xilose, fração predominante de C5, é uma molécula que pode ser robustamente convertida pela ação de xilose isomerases (XIs) em xilulose, que, por sua vez, é facilmente fermentada pela *S. cerevisiae*. No contexto da biorrefinaria, quanto mais agregarmos valor aos intermediários da produção final de etanol, mais viável e rentável essa prática se torna. Neste caso, o reaproveitamento da fração hemicelulósica dos resíduos (bagaço e palha da cana-de-açúcar) da produção do etanol 1G, mais do que agrega valor aos intermediários/resíduos, ele insere um novo produto de alto potencial competitivo ao mercado de biocombustíveis, o etanol de segunda geração. O novo desafio então é tornar cada vez mais esse etanol 2G em um produto mais economicamente viável que o etanol 1G, sem contar as questões ambientais, que já são claramente e indiscutivelmente mais promissoras.

Neste projeto estamos propondo utilizar ferramentas modernas de bioinformática, genética, expressão heteróloga de alta produtividade e biologia/bioquímica molecular estrutural para identificar, clonar e expressar em larga escala XIs novas com potencial para serem utilizadas na indústria. De maneira geral, queremos encontrar novas XIs com alto potencial enzimático para serem inseridas em modelos de produção do etanol 2G, e isso implica, primeiramente, em mapear atividade e comportamento enzimáticos em diversas condições de pH e temperatura. Independente de encontrar ou não esses alvos, é bastante interessante entender e encontrar bases moleculares (padrões estruturais) que dirigem determinado comportamento bioquímico (além da simples conservação de alguns resíduos de aminoácidos) de modo que esse reconhecimento também possa ser um ponto de partida para muitos outros estudos e avanços.

Objetivos mais específicos também foram listados no início do projeto. São eles:

1. Explorar ferramentas de bioinformática que permitam buscar genes que codifiquem para XIs inéditas (sem estrutura tridimensional de alta resolução), em bancos de dados;
2. Clonar e expressar as ORFs que codifiquem XIs, e produzir essas XIs de forma heteróloga em sistemas de expressão bacterianos (*E. coli*);

3. Analisar atividade enzimática específica, características bioquímicas (temperatura e pH ótimos); inibição por Ca^{2+} , xilitol e etanol, buscando enzimas com propriedades compatíveis às exigências impostas pelo processo industrial brasileiro;
4. Realizar ensaios de cristalização, de modo a obter monocristais proteicos com grande potencial de difração de raios-X;
5. Coletar conjuntos de dados de difração de raios-X do maior número possível de XIs;
6. Resolver o maior número possível de estruturas de alta resolução das XIs estudadas;
7. Estudar estruturalmente XIs promissoras propondo mutações sítio-dirigidas que possam adequar suas características bioquímicas deficientes;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de alvos

Através da busca extensiva por XIs no banco de dados do UNIPROT (www.uniprot.org), e fazendo o cruzamento de dados com estruturas de XIs já resolvidas, depositadas no PDB (www.pdb.org), foi gerada uma lista com 96 genes que codificam para XI a partir de diversas origens biológicas. Para se ter sucesso na expressão heteróloga desses genes, foi realizada a compra dos gDNAs (DNAs genômicos) dos microrganismos alvos. Uma parte foi adquirida através de um banco genômico alemão (DSMZ, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, do alemão) (63 gDNAs) e do japonês (JCM, *Japan Collection of Microorganisms*, do inglês) (36 gDNAs). Para as amplificações, o método de LIC (*Ligation Independent Cloning*)⁷⁰ é altamente viável para clonagens em larga escala, como neste caso, principalmente por sua flexibilidade, robustez e simplicidade, visto que requer um número menor de passos comparado às clonagens por métodos tradicionais. Esses experimentos iniciais de biologia molecular foram realizados em colaboração com o Doutor César Moysés Camilo. Portanto, fez-se o uso dos seguintes procedimentos.

3.2 LIC (Ligation independent cloning)

3.2.1 Preparação dos vetores

O vetor utilizado, pETTRXA-1a/LIC, foi previamente linearizado, amplificado com *primers* específicos e tratado com T4 DNA polimerase (Fermentas, Estados Unidos, MA) que possui atividade exonucleásica 3'->5'. Essa preparação permitiu que o vetor adquirisse as terminações complementares apropriadas para uso em LIC. Esse vetor codifica ainda para proteína de fusão tioredoxina⁷¹ e *HIS-TAG* na extremidade N-terminal da proteína, o que auxiliará na etapa de purificação. Além disso, na etapa de construção do vetor, ainda lhe foi adicionada uma sequência codificando gene que confere resistência ao antibiótico canamicina e um sítio de clivagem com TEV.⁷²

3.2.2 Preparação dos insertos

Desenhados e comprados os oligonucleotídeos específicos para as ampliações de cada gene, esses foram organizados em placa de 96 poços, sendo que duas placas foram utilizadas como réplicas e estoques principais dos *primers*. Em uma placa de 96 poços, os *primers* comprados foram diluídos e em cada poço foi adicionado uma quantidade de 10 nmol de *reverse primer* e *forward primer*. A cada poço específico foram adicionados 30 ng de gDNA, 0,2 mM de dNTP Mix, uma unidade de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Estados Unidos, MA) e 1x de tampão da *Phusion*. Ao final, cada reação totalizava 50 µL. A placa contendo 96 reações foi submetida à rotina mostrada na Figura 19.

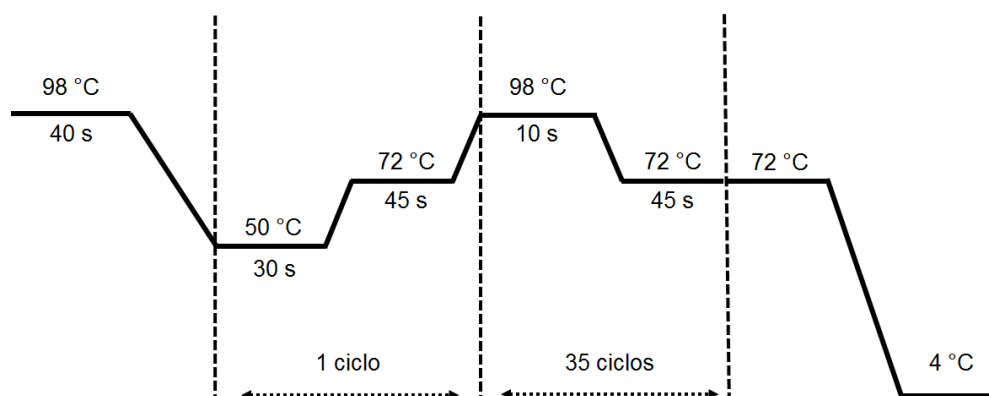


Figura 19 - Representação da condição de reação de amplificação em placa dos 96 genes que codificam para deXI. A temperatura de 72 °C foi selecionada para o anelamento dos primers; e 72°C também para a extensão, tanto a cíclica quanto a final.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a rotina mostrada na figura anterior, houve o acréscimo de 1 ciclo, esse que ajudou a diminuir as ampliações inespecíficas, já que as temperaturas de *melting* dos oligonucleotídeos utilizados na grande maioria são baixas. Os produtos do PCR foram purificados após minuciosa análise das bandas resultantes desta reação.

O tratamento com a T4 permitiu que ocorresse a retirada das extremidades 3' dos fragmentos amplificados. Esse processo gerou as terminações livres e coesivas para na etapa seguinte se hibridizarem com as terminações livres, coesivas e complementares do vetor pETTRX preparado. A reação ocorreu por 30 minutos a 22 °C e com subsequente inativação da enzima por 30 min a 75 °C.

3.2.3 *Annealing*

Em seguida, os insertos (contendo o gene) e os vetores foram misturados em temperatura ambiente para se ligarem, nos volumes de 1 μL de vetor tratado com T4 e 3 μL de insertos tratados com T4. Essa reação perdurou por 30 minutos.

3.2.4 Transformação em *E. coli* DH10b

Células competentes de *Escherichia coli* DH10b foram então transformadas com plasmídeos recombinantes, da seguinte maneira: para cada reação, adicionou-se 47 μL de tampão de transformação gelado (100 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂ and 1,5% (w/v) PEG 4000). Em seguida adicionou-se 50 μL de *E. coli* DH10b ultra competentes (obtidas pelo método de Inoue⁷³). Essa mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, seguido de 10 minutos em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, 200 μL de meio LB foram adicionados a cada um dos poços com reação de transformação e mantidos em repouso a 37 °C por 1 hora, até que se plaqueia com volume dos poços contendo meio LB sólido (com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina) de placas de 24 poços. Esse processo foi adaptado com robô *Freedom EVO* (Tecan, Suíça). Os clones positivos foram então cultivados em placas de 96 poços profundos, para haver quantidade suficiente de microrganismos para a subsequente extração dos plasmídeos com o *kit* de *miniprep Nucleospin*® (Macharey-Nagel, Alemanha).

3.2.5 Testes de expressão em *high throughput*

O teste de expressão em larga escala foi adaptado ao robô *Freedom EVO* 200 (Tecan, Suíça) e realizado de acordo com o protocolo de Vincentelli.⁷¹ O resultado dessas purificações foi analisado por eletroforese em gel com auxílio do sistema de detecção de microfluido *LabChip GXII* (PerkinElmer, Estados Unidos) utilizando o *kit* de expressão proteica (versão 2) e protocolo do fabricante.

3.2.6 Expressão e purificação de XIs solúveis

Na noite anterior ao início da expressão, foram preparados pré-inóculos de 5 mL de cada cepa, contendo meio LB, canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Esses pré-inóculos foram agitados por 16 horas a 37 °C. Decorrido esse tempo, eles foram transferidos para frascos maiores (contendo 1 L e meio LB e antibióticos) e cultivados sob agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica (absorbância a 600 nm) de 0,6 a 0,8. A partir daí os inóculos foram induzidos com 0,5 mM de IPTG, permanecendo sob agitação de 150 rpm por 16 horas, a 18 °C. Durante a extração, algumas XIs foram submetidas a testes de expressão com diferentes concentrações do detergente iônico sarcosil⁷⁴, para aumentar sua solubilidade e consequentemente o rendimento geral da expressão. Ficou estabelecido então que o protocolo padrão para todas as purificações seria com uma quantidade fixa de 0,4% de sarcosil em tampão de lise (25 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 5 mM imidazol, 10 mM β-mercaptoetanol e 1 mM PMSF). Foi ainda utilizado 250 µg/ml de lisozima para auxiliar no processo de lise bacteriana, e a mistura foi mantida em repouso sob refrigeração por 1 hora. Posteriormente as bactérias foram “sonicadas” com 10 ciclos de 30 segundos em modo *ON* e 45 segundos no modo *OFF*, alternados, em sonicador 550 *Sonic Dismembrator* (*Fisher Scientific*). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 30 minutos, sob refrigeração.

A etapa de purificação foi por cromatografia de afinidade em resina de Níquel. O imidazol foi usado para realizar a eluição das XIs não clivadas e da tioredoxina que estaria interagindo com a resina através da HIS-TAG que se liga à resina contendo os íons Ni²⁺, 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 foi a Ni-NTA-Agarose (*Metal Affinity Resin, Thermo Fisher Scientific*). Iniciou-se o processo com o empacotamento da resina de níquel e a exaustiva lavagem com água milli-Q, seguida do processo de equilíbrio da resina passando-se através da coluna 10 volumes de tampão de lise (exceto o β-mercaptoetanol). O sobrenadante foi incubado com a resina durante uma hora a 4°C. Passado este tempo, a resina foi lavada com o mesmo tampão a qual foi equilibrada e com tampão e 15 mM de imidazol (desligar proteínas fracamente ligadas). Em seguida foi realizada lavagem com tampão de lise sem imidazol (4 volumes), para então adicionar TEV na proporção de (1 mg de TEV para 50 mg de proteína). Essa mistura foi mantida a 4 °C *overnight* em homogeneizador, com baixa rotação. Após a clivagem, permaneceram ligadas a parte tioredoxina-hisTAG e também as proteínas não clivadas e coletou-se a fase móvel que

saiu primeiro, após o empacotamento da resina na coluna. Essa fase móvel recolhida foi submetida à dialise para troca do tampão de lise para o tampão de testes (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, em pH 7,5). Então, a proteína pura e clivada seguiu para as etapas subsequentes.

O valor da concentração de XI nas amostras geradas dessa purificação foi medida utilizando-se o espectrofotômetro *NanodropTM 1000 (Thermo Scientific)*. Com apenas 2 μ L 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*⁷⁵, obtivemos o valor da concentração de XI naquela amostra.

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

A Tabela 1 algumas informações e também parâmetros teóricos para XIs estudadas neste trabalho, como nome, abreviatura, classe, peso molecular, coeficiente de extinção molar (considerando resíduos de cisteína reduzidos) e pI.

Tabela 1 - Parâmetros bioquímicos teóricos das XIs estudadas neste projeto. As XIs já estão divididas em grupos, de acordo com identidade sequencial, para facilitar possíveis comparações

Grupo	XI	Microrganismo	N°R**	Classe	MM (kDa) [§]	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^{&}	pI
A	G6	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	382	I	42,3	42860	5,19
	F7	<i>Thermus thermophilus</i>	387	I	43,9	56840	5,33
B	E7	<i>Catenulispora acidiphila</i>	389	I	37,2	42400	4,95
	C9	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	397	I	43	40910	4,93
	D7	<i>Jonesia denitrificans</i>	392	I	43,1	47900	4,93
	B9	<i>Nakamurella multipartita</i>	397	I	43,4	47900	4,85
C	D3	<i>Paludibacter propionigenes</i>	438	II	49,8	68300	5,37
	A1	<i>Alistipes finegoldii</i>	437	II	49,5	66810	5,25
	G1	<i>Bacteroides helcogenes</i>	438	II	49,2	65320	5,36
	H2	<i>Bacteroides vulgatus</i>	438	II	49	66810	5,2
	E9	<i>Dyadobacter fermentans</i>	442	II	49,3	66810	5,35
	D2	<i>Saccharophagus degradans</i>	443	II	49,2	55810	5,15
	G5	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	441	II	49,3	55810	5,32
D	F4	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	436	II	49	55810	4,91
	C7	<i>Coralimargarita akajimensis</i>	434	II	48,5	55350	5,06
	B6	<i>Bifidobacterium animalis</i>	450	II	50,6	84800	4,71
	F5	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	441	II	49,3	56840	5,25
	H5	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	438	II	50,2	58790	5,5
E	E1	<i>Erwinia billingiae</i>	439	II	49,4	69330	5,79
	C1	<i>Escherichia fergusonii</i>	440	II	49,7	70820	5,65
	A5	<i>Salmonella enterica</i>	440	II	49,6	70820	5,72
	C4	<i>Roseobacter denitrificans</i>	433	II	48,3	63830	4,98
	D9	<i>Rhizobium meliloti</i>	436	II	48,9	70820	5,33
F	D5	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	228	x [¥]	31,4	20970	4,72

* Número de resíduos de aminoácidos

& Coeficiente de extinção molar

§ Peso molecular do monômero

¥ Não classificada em nenhum dos dois grupo existentes

Fonte: Elaborada pelo autor

Também na tabela acima constam o número de resíduos de aminoácidos, peso molecular e pI teórico das XIs purificadas.

3.3 Atividade enzimática

3.3.1 Teste de atividade enzimática

Para se medir a conversão de xilose em xilulose procedeu-se com testes de atividades de acordo com protocolos estabelecidos previamente ⁷⁶, com adaptações para testes em microplacas de 96 poços. Como se sabe, a presença de sais de cátions divalentes é bastante importante tanto na atividade dessa enzima quanto na sua estabilidade térmica. Portanto, são utilizados CoCl_2 e MgSO_4 , pois Co^{+2} e Mg^{+2} , que são reconhecidos como os cofatores que mais influenciam positivamente a atividade catalítica dessas Xis.⁷⁷⁻⁷⁹ A figura 20 seguir ilustra esquematicamente o teste enzimático realizado neste projeto. Inicialmente, a proteína foi incubada por duas horas na solução tampão do pH no qual seria medida a atividade (contendo os cofatores e não contendo o substrato) à baixa temperatura (em gelo) para inibição da atividade. Além disso, as amostras se apresentam quadruplicadas para melhor estatística e controle dos resultados. Em seguida, foi adicionado o substrato da reação (D-xilose), a fim de se obter uma concentração final de 100 mM.

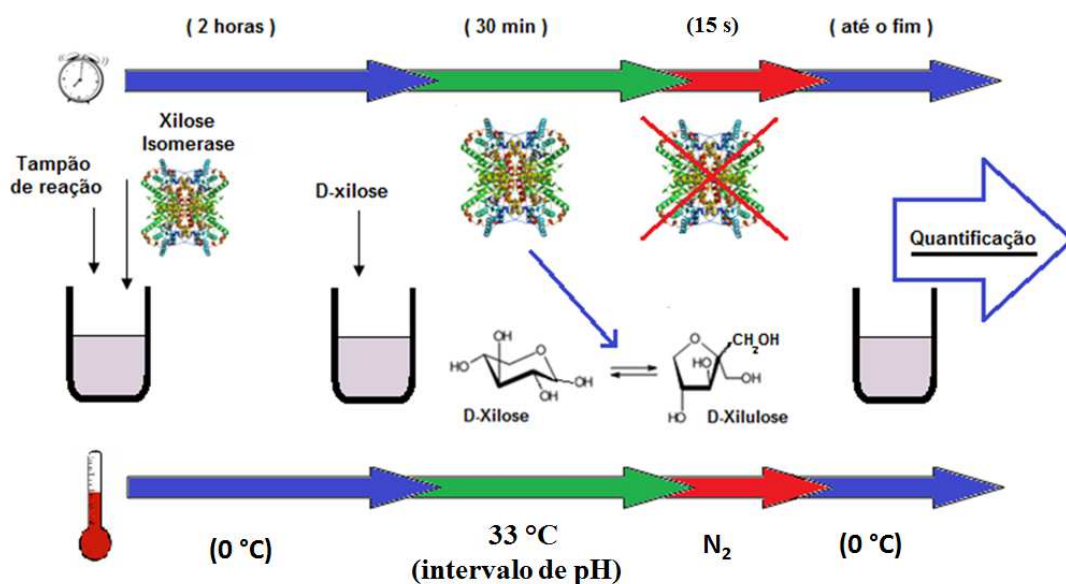


Figura 20 - Esquema para teste de atividade da enzima xilose isomerase (XI). A enzima é incubada por 2 horas com a solução tampão de reação, que além de conter tampões no pH de teste, contém os cofatores necessários para haver atividade, CoCl_2 e MgSO_4 , ambos a 10 mM finais. O teste procede com a adição de D-xilose (100 mM, concentração de reação) e com controle de temperatura (33°C) por 30 minutos e posterior inativação da enzima em nitrogênio líquido.

Fonte: Adaptada de REIS ⁸⁰

Lembrando que o tampão utilizado para se varrer uma extensa faixa de pH foi o tampão ABF (acetato borato fosfato), na concentração de 50 mM cada um deles individualmente. O intervalo de pH explorado foi no máximo de 2 a 10.

A reação foi incubada em termociclador *My Cycler* (BioRad®), por 30 minutos a 33 °C. A neutralização da enzima ocorre imediatamente ao fim do tempo de reação em nitrogênio líquido. A concentração padronizada para os testes de atividade foi de 20 µM de enzima.

3.3.2 Quantificação pelo método colorimétrico cisteína-carbazol-sulfúrico

Como o próprio nome diz, este é um teste colorimétrico, ou seja, um teste que se faz útil através das cores que podem ser reconhecidas e relacionadas ou não a presença de um produto específico. Neste caso, as interações que ocorrem durante o teste entre os reagentes (xilulose reagindo com o carbazol em meio extremamente ácido), liberam compostos, cujos espectros de absorção e emissão permitem a diferenciação e quantificação do produto da reação de isomerização da xilose pela XI. A radiação detectada, atrelada à presença de xilulose no meio, possui comprimento de onda em 540 nm. Até o momento, o que se sabe é que as reações que ocorrem envolvem radicais livres, porém o mecanismo ainda é desconhecido. Este teste é uma adaptação para volumes reduzidos, baseado em estudo realizado em Zacharias Dische e Ellen Borenfreund em 1951.⁸¹

A figura 21, abaixo, esquematiza esse processo de quantificação. Esse teste se inicia adicionando-se 25 µL de amostra (resultante do teste de atividade com XI) ao poço, a ele adicionam-se 4,5 µL de solução aquosa 1,5% de cloridrato de L-cisteína monoidratado. Em seguida, 141 µL de H₂SO₄ 71% são transferidos aos poços. Imediatamente, adicionam-se 4,5 µL de solução 0,12% (em etanol) de carbazol; a mistura deve ser rapidamente bem homogeneizada. A placa deve ser deixada em repouso (temperatura ambiente, 25°C) por 1 hora. Decorrido este tempo, prossegue-se com a leitura da absorbância a 540 nm, de acordo com o teste original, permitindo diferenciar cetopentoses (D-xilulose) de aldopentoses (D-xilose). O teste de quantificação da xilulose foi elaborado considerando-se diversas curvas de absorção de luz em vários comprimentos de onda para uma mistura de aldoses e cetoses. Aldopentoses absorvem, diferentemente das cetopentoses, luz nesse comprimento de onda. Como forma de controle, amostras sem enzima (brancos) foram submetidos à quantificação.

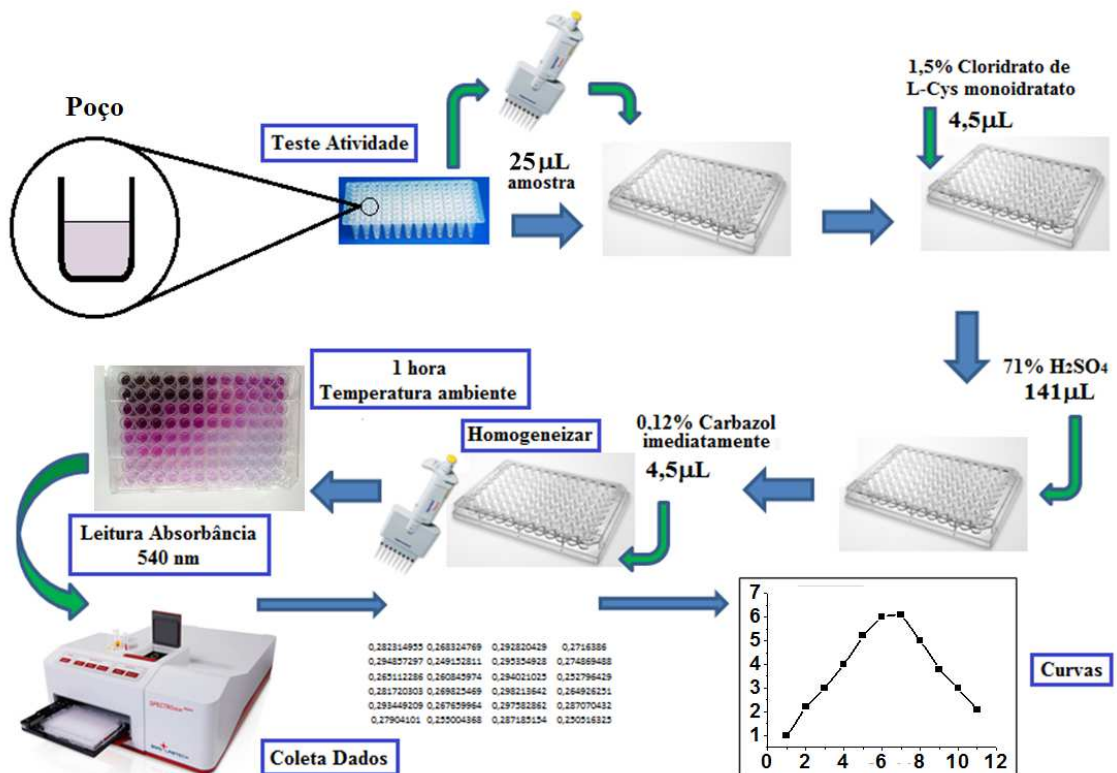


Figura 21 - Método colorimétrico para quantificação de D-xilulose resultante da reação de isomerização da D-xilulose pela enzima XI (método da cisteína-carbazol). São transferidos 25 µL de amostra do teste de atividade para uma placa de 96 poços. Adicionam-se 4,5 µL de solução aquosa 1,5% de Cloridrato de L-cisteína monidratado. Em seguida, 141 µL de 71% H₂SO₄ são adicionados aos poços. Imediatamente, 4,5 µL de solução 0,12% (em EtOH) de carbazol são transferidos à mistura. A placa é deixada em repouso (temperatura ambiente, 25°C) por 1 hora. Passado este tempo, é feita a leitura da absorbância a 540 nm. Os dados são transferidos e analisados, gerando uma curva com o perfil de atividade da enzima.

Fonte: Adaptada de REIS⁸⁰

3.3.3 Curva padrão

Antes de iniciar uma batelada de testes de atividades, uma curva padrão (para o teste colorimétrico) com diferentes concentrações de D-xilulose (produto da reação) teve de ser obtida. As concentrações de D-xilulose utilizadas nessa curva foram 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, todas em g/L (os dois últimos pontos foram abstraídos, já que não estavam alocados na região linear da curva). O teste de quantificação utilizado foi o da carbazol-cisteína-sulfúrico⁸¹, adaptado para pequenos volumes (em microplaca de 96 poços).

3.3.4 Cinética enzimática das XIs de *Flavobacterium johnsoniae* (G5) e *Jonesia denitrificans* (D7)

Os experimentos de cinética enzimática foram realizados para duas das 24 XIs deste projeto, até o momento, XI de *Flavobacterium johnsoniae* (G5) e de *Jonesia denitrificans* (D7). Primeiramente, foram realizados vários testes para garantir que as enzimas estavam agindo sob a cinética de Michaelis-Menten. Para tanto, a primeira bateria de reações foi realizada variando-se a concentração de enzima e mantendo-se fixa a concentração de substrato (D-xilose) em excesso (500 mM). Foram escolhidas 5 concentrações de XI de modo que a geração de produto mantivesse uma relação linear com a concentração de XI utilizada. Com essas 5 concentrações de XI, foram realizadas novas reações, só que agora com tempos variáveis (0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min e 30 min). Ou seja, para cada concentração de enzima, 6 tempos foram analisados. Convenientemente, tanto para D7 quanto para G5, buscamos uma concentração de enzima e um tempo de reação que se situassem numa região de comportamento linear, ou seja, concentrações de XI que permitam uma relação linear entre tempo de reação e geração de produto (velocidade), mantendo um excesso de substrato. Os valores encontrados foram os seguintes [D7] = 0,006957 mM, T_{D7} = 10 min; [G5] = 0,01656 mM, T_{G5} = 10 min. Finalmente, pôde ser realizada a reação com variação de concentração de substrato, para os tempos e concentrações de enzima pré-estabelecidos no experimento anterior. Dessa última curva que se obtém a curva de Michaelis-Menten, podendo extrair diversas constantes e parâmetros catalíticos.

3.4 Estabilidade térmica (*Thermofluor*)

Os experimentos de *Thermofluor* foram realizados em nosso laboratório, em colaboração com a doutora Amanda Bernardes.

A técnica funciona da seguinte forma: à medida que a enzima de estudo sofre processo de desdovimento, sob efeito do aumento gradual da temperatura, vai-se liberando um fluorófilo comercial (*Sypro Orange*, Invitrogen), que até então estava adsorvido em regiões internas hidrofóbicas da enzima, e isso causa um aumento da fluorescência emitida pela solução, como ilustrado na figura a seguir.

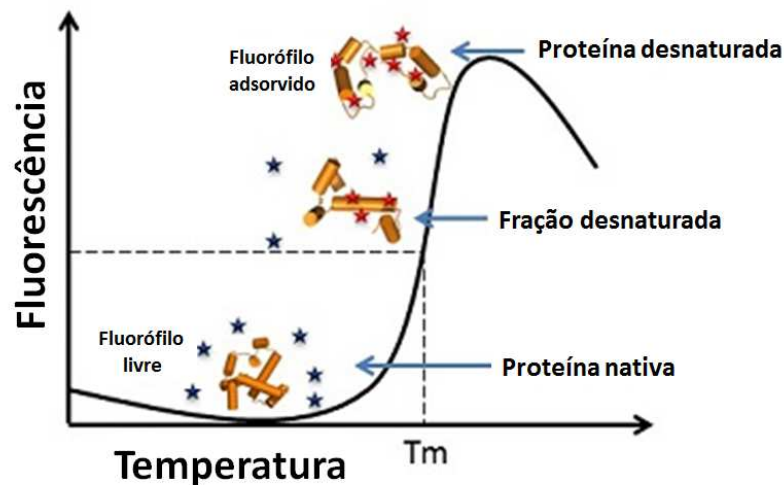


Figura 22 - Ilustração da curva e do princípio de utilização da técnica de Thermofluor. A teoria se baseia na liberação gradual da sonda fluorescente SYPRO Orange (Invitrogen), à medida que as regiões hidrofóbicas da proteína vão sendo expostas, devido ao desenovelamento por ação da temperatura

Fonte: Adaptada de ERICSSON⁸²

Com a finalidade de estudar a estabilidade térmica das XIs em diferentes tampões e diferentes pHs, ensaios de *thermofluor* foram realizados apenas para algumas das XIs (isso ainda será analisado para todas). O procedimento consiste em misturar 10 μM de solução de proteína com 1 μL de SYPRO Orange (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) (uma sonda fluorescente), a uma concentração final de 1/2000. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com volume final de 20 μL e os tampões utilizados estavam em 50 mM. O experimento é realizado em placa de PCR de 96 poços, com volume de reação selado com fita de qualidade óptica (BioRad, Hercules, Estados Unidos) e incubado em termociclador de tempo real *iCycler iQ* (BioRad, Hercules, Estados Unidos). O intervalo de temperatura coberto pelo experimento é de 25 $^{\circ}\text{C}$ a 90 $^{\circ}\text{C}$, com incrementos de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e a temperatura é mantida por 10 segundos para cada aumento, e a excitação/emissão de fluorescência é lida pelo detector, em comprimentos de onda de 490/530 nm. As temperaturas de *Melting* (T_m) e as curvas originais obtidas no experimento são analisadas no *software* gráfico *GraphPad Prism* (versão 5,0) (GrapPad Software, La Jolla, Estados Unidos).

3.5 Cristalografia

3.5.1 Ensaios de cristalização

Cristalização de proteínas é um processo pelo qual essas macromoléculas se juntam em arranjos periódicos e organizados, formando cristais. Termodinamicamente falando, essa técnica tem como objetivo principal levar a solução contendo a proteína de interesse para um estado de supersaturação. Esse estado pode ser atingido através de diferentes processos, um deles a difusão de vapor. A Figura 23a descreve esse processo de difusão de vapor em gota sentada (*sitting drop*), onde a gota na verdade é uma solução da macromolécula biológica em tampão contendo agente precipitador e aditivos. No mesmo ambiente da gota, selados, encontra-se outra solução (solução do poço), mas esta apresenta o agente precipitante numa concentração um pouco maior. Com o tempo ocorre o equilíbrio entre as duas soluções, da gota e do poço, a medida que ocorre transferência de espécies voláteis (água ou solventes orgânicos), do meio menos concentrado para o mais concentrado (com relação ao agente precipitante), até que a pressão de vapor de ambos se igualem. Consequentemente, isso promove uma diminuição do volume da gota, aumentando a concentração da macromolécula que está presente apenas na gota, fazendo a solução se deslocar em direção a saturação. Como pode-se observar na Figura 23b, cruzando-se a curva de solubilidade, os possíveis estados da solução ficam entre as zonas de precipitação, nucleação e metaestável, que dependem da cinética (velocidade) para se atingir esse equilíbrio termodinâmico e do nível da supersaturação.

A zona de precipitação é atingida quando o excesso de macromolécula se separa da solução rapidamente sob a forma de um precipitado amorfo. A zona de nucleação por sua vez é atingida quando o excesso de macromolécula se separa sob a forma cristalina, porém se formam muitos microcristais semelhantes a um pó cristalino. Já na zona metaestável a supersaturação pode não nuclear até que haja uma perturbação mecânica ou adição de uma semente (pequeno cristal). Neste processo, conhecido como semeadura, ocorre o crescimento do cristal, sem a formação de novos pontos de nucleação. Quando a solução caminha para esta última zona, os cristais mais interessantes para o estudo de moléculas biológicas são formados, ou seja, é quando ocorre formação de monocristais maiores e mais bem formados (faces homogêneas e bem delimitadas).

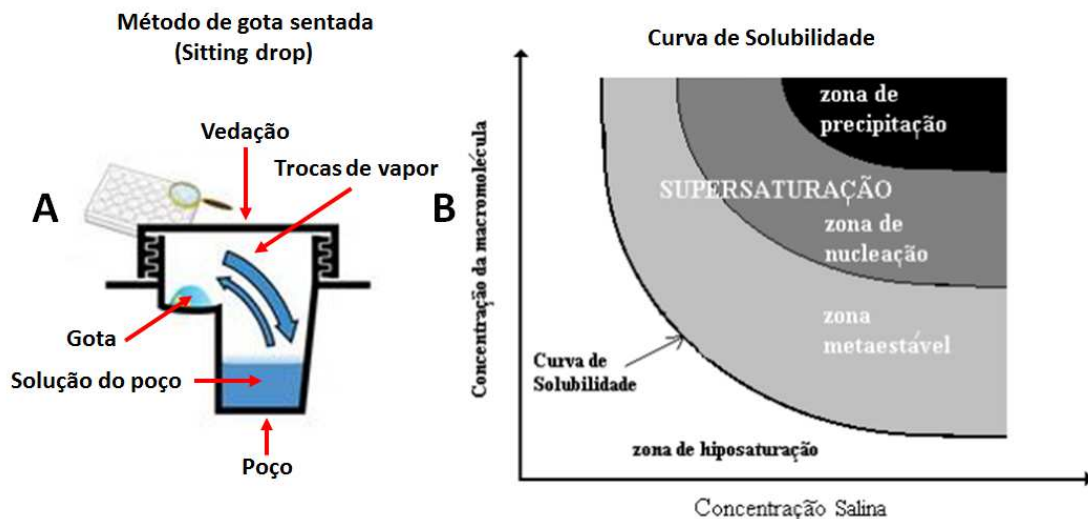


Figura 23 - Esquema do processo de cristalização de macromoléculas. Em (A) o método de gota sentada (*sitting drop*) é ilustrado, onde a gota inicialmente é uma solução hiposaturada da macromolécula biológica, em tampão contendo agente precipitador e aditivos. Selados num mesmo ambiente, encontra-se a solução do poço, apresentando o agente precipitante numa concentração um pouco maior. Com o tempo ocorre o equilíbrio entre as duas soluções, da gota e do poço, a medida que ocorre a difusão do vapor, do meio menos concentrado para o mais concentrado (com relação ao agente precipitante), até que as duas soluções atinjam um equilíbrio termodinâmico. Como o volume da gota tende a diminuir, a supersaturação pode ser atingida e a formação dos cristais pode ocorrer. (B) é a curva de solubilidade da macromolécula presente na gota. Inicialmente a solução da gota encontra-se na região abaixo da curva, de forma que a solução ainda é insaturada; a medida que a difusão de vapor ocorre, e o volume da gota diminui vagarosamente, a solução da gota caminha da zona de hiposaturação para a supersaturação. Dependendo principalmente da velocidade do processo, a zona metaestável pode ser atingida, região esta em que os monocristais mais interessantes se formam.

Fonte: Adaptada de DUCRUIX⁸³

Ensaio de cristalização com as XIs foram conduzidos na busca de condições que resultassem em cristais bem formados e com alto poder de difração. Um dos alicerces deste projeto é a obtenção de um conjunto de dados com um razoável número de estruturas de XIs, e uma etapa importante e crucial é obter os monocristais e registrar suas condições de cristalização.

Inicialmente, as condições de cristalização foram testadas utilizando o robô de cristalização (*Honeybee*), que aplica a técnica de difusão a vapor com gota sentada (XI na concentração de aproximadamente 15 mg/mL). As soluções testadas estavam presentes nos kits 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); *CryoSuite* (*QIAGEN*TM); *PACT Suite* (*QIAGEN*TM); *INDEX Suite* (*Hampton*TM), *PEG/ION Suite* (*Hampton*TM), *JCSG Plus* (*QIAGEN*TM).

3.5.2 Coleta de dados de difração de raios-X em monocristal de proteína

Durante os experimentos, os cristais foram crioprotetidos com 15% de etileno glicol (exceto os formados a partir de soluções do *kit MPD Suite (QIAGENTM)*, que já se tratam de soluções crioprotetoras) e coletados em fluxo de vapor de nitrogênio (100 K). As coletas 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 *Pilatus 2M (Dectris)*, a um comprimento de onda de 1,45866 Å. Os conjuntos de dados foram obtidos através do método de rotação. A indexação das primeiras imagens e as estratégias de coleta foram realizadas pelo programa *XDS*,⁸⁴ 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 e o refinamento dos parâmetros foram também conduzidos com o programa *XDS*.⁸⁴ O escalonamento dos dados foi realizado com o programa *Aimless* (CCP4⁸⁵). O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa *Matthews_coeff*.⁸⁵

3.5.3 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

Na tentativa de recuperar as fases da proteína no cristal foi aplicada a técnica de substituição molecular (*MR*, do inglês, *Molecular Replacement*) utilizando o programa *Phaser*,⁸⁶ disponível no pacote de programas cristalográficos CCP4.⁸⁵ 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 inicial gerado pelo programa *Phaser* foi submetido à etapa de refinamento. Alguns itens devem ser modificados (ângulos, resíduos, posições de alguns átomos, águas estruturais, etc) 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). Para esse refinamento das estruturas, está sendo utilizado o programa *Phenix*.⁸⁷ Um primeiro modelo é gerado no programa *AutoBuild*⁸⁸ e este passa também por um ciclo inicial de refinamento através do *phenix.refine*. Durante todo o processo, são realizados ciclos alternados de refinamento com uma inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente as posições dos resíduos com *COOT*.⁸⁹ A validação dos modelos foram realizadas através do programa *MolProbity*,⁹⁰ cujos diagramas apresentados demonstraram a qualidade dos modelos finais gerados. Os processos finais de refinamento para algumas XIs ainda estão em andamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Amplificação dos genes

Os produtos do PCR foram purificados após minuciosa análise das bandas resultantes dessa reação, de acordo com as Figuras 24,25,26 e 27 (uma placa de clonagem dividida em 4 partes, representando toda a extensão da placa de 96 poços), e fazendo-se um cruzamento com o tamanho que cada gene de interesse deve apresentar. Como pode-se notar, o resultado do processo apresentou muitas amplificações inespecíficas. Entretanto, deve-se ressaltar que foi realizado anteriormente um teste sem o ciclo adicional de 30 segundos a 50 °C, não obtendo sucesso quase a totalidade dos genes.

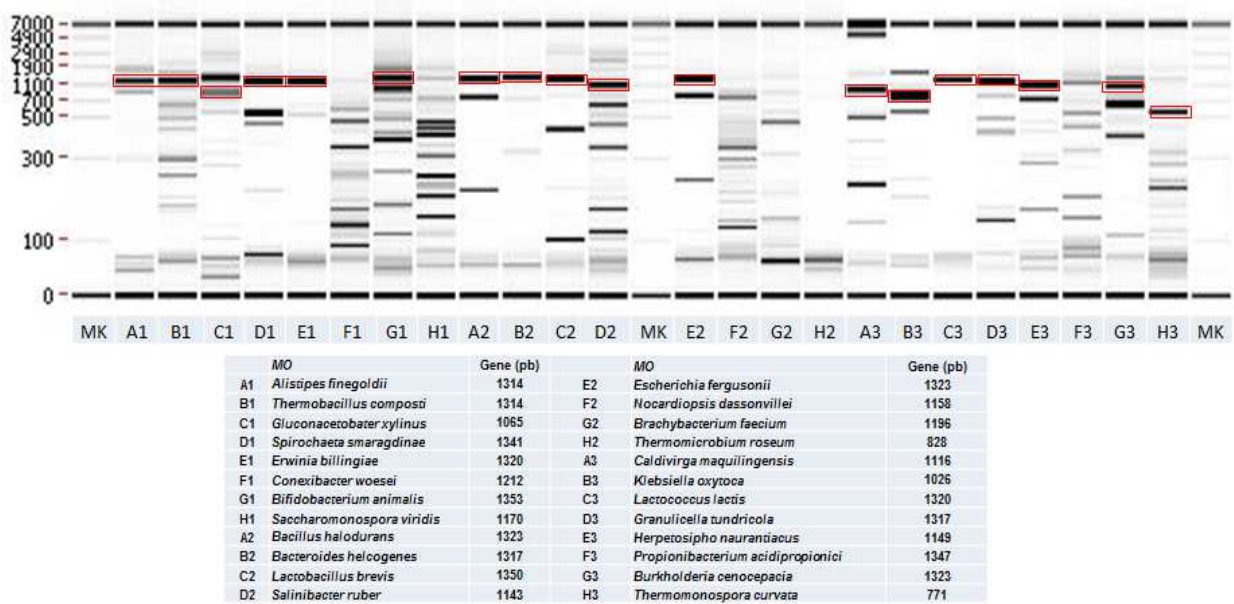


Figura 24 - 1ª parte da placa. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor

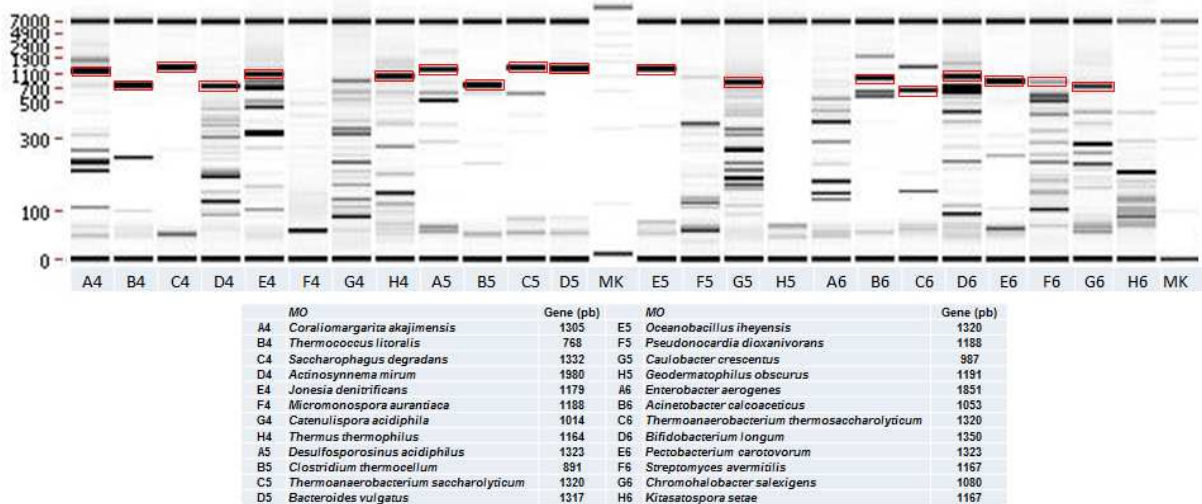


Figura 25 - 2ª parte da placa de clonagem. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor

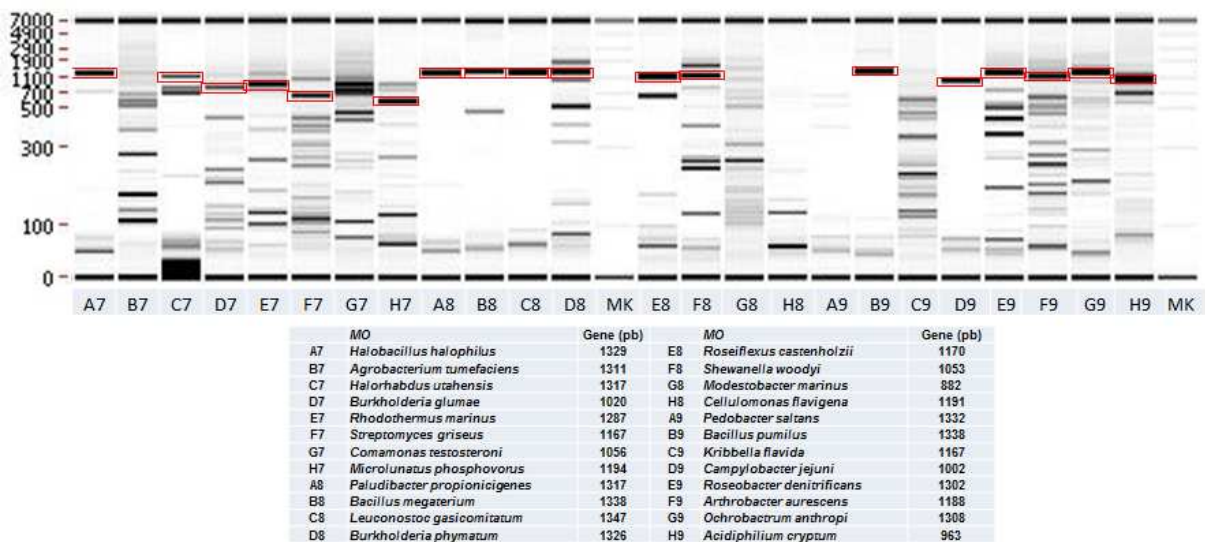


Figura 26 - 3ª parte da placa de clonagem. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das amplificações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor

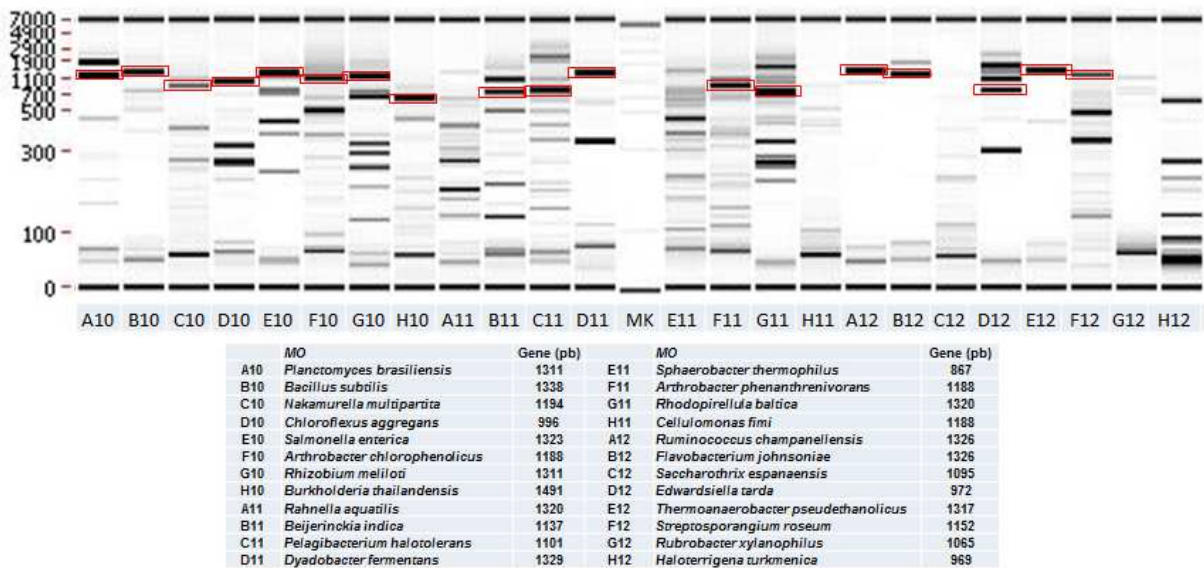


Figura 27 - 4ª parte da placa de clonagem. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção 1ª parte da placa. Resultado das ampliações por PCR realizadas em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho do gene e sua correspondente banda (se houver) por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos). Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas do gene de interesse para cada amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao final, foram amplificados com sucesso 72 genes. Uma média de 100 ng foi obtida de cada gene amplificado e purificado, e esses foram tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas Life Sciences), que possui atividade exonucleásica⁷³ 3' -> 5', na presença de dATP (e ausência dos outros nucleotídeos). O tratamento com a T4 permitiu que ocorresse a retirada das extremidades 3' dos fragmentos amplificados. Esse processo gerou as terminações livres e coesivas para na etapa seguinte se hibridizarem com as terminações livres, coesivas e complementares do vetor petTRX tratado. Não foi realizado sequenciamento desse material.

Os vetores, como já foi mencionado, foram amplificados e em seguida tratados com T4 DNA Polimerase, na presença de apenas dTTPs. As caudas LIC foram então preparadas. Com isso foi possível a reação de junção (hibridização) dos inserts e dos vetores. Com os novos plasmídeos recombinantes, foram realizadas as transformações em bactérias ultracompetentes DH10b. Após o crescimento das bactérias transformadas, os plasmídeos foram extraídos e utilizados para uma nova transformação bacteriana em *E. coli* Rosetta (DE3), e estas seguiram para a etapa de testes de expressão.

4.2 Teste de expressão

As bactérias transformadas na etapa anterior foram então cultivadas em placas conforme descrito na metodologia, e seus produtos proteicos foram confirmadas e analisadas por eletroforese em gel com auxílio do sistema de detecção de microfluído LabChip GXII (PerkinElmer, Estados Unidos) utilizando o *kit* de expressão proteica (versão 2) e protocolo do fabricante, como mostrado nas Figuras 28 e 29. Ainda nas Figuras 28 e 29, representando uma placa de 96 poços dividida em duas partes, há retângulos (vermelhos) destacando a produção de XI solúvel, o que representa sucesso na expressão do gene.

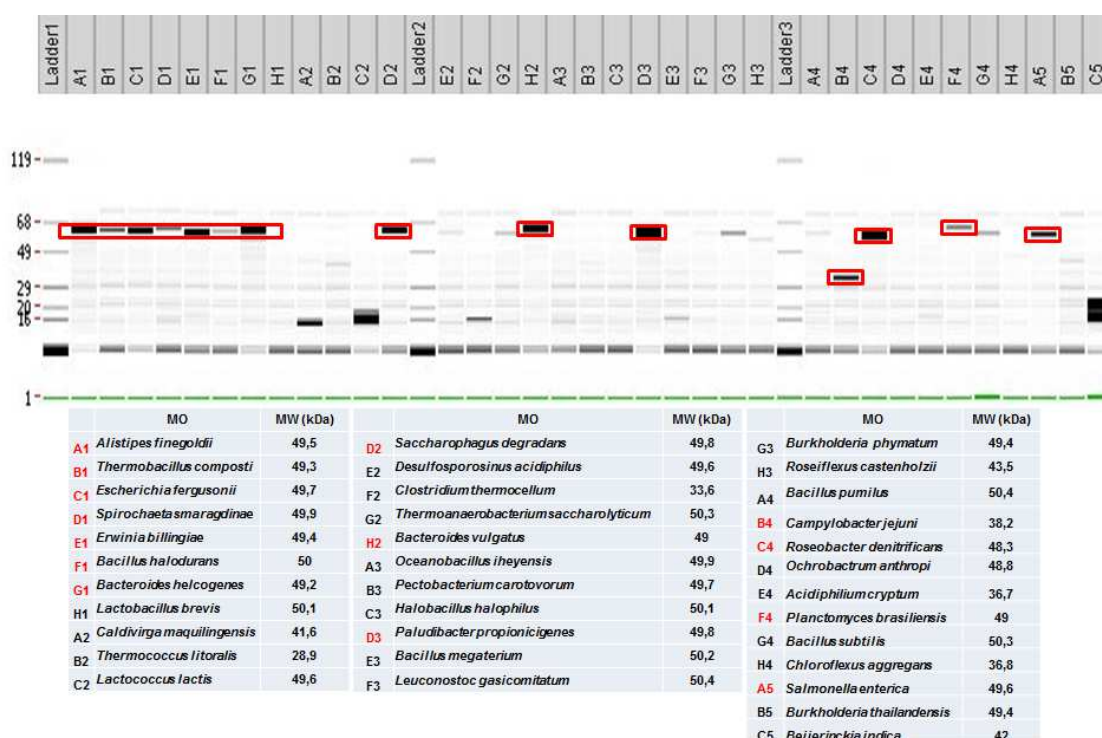


Figura 28 - 1ª parte da placa. Teste de expressão do gene e produção de XI em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho de cada proteína e as bandas das proteínas solúveis. Esse resultado foi obtido por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluída LabChip gxii (PerkinElmer, Estados Unidos) com lise das bactérias contendo plasmídeos recombinantes e purificação da proteína de interesse (pelo método de Vincentelli ⁷¹). Os retângulos vermelhos destacam as bandas da proteína de interesse, que no caso, encontram-se na fração solúvel. Na imagem, "LADDER" indica marcadores de massa molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor

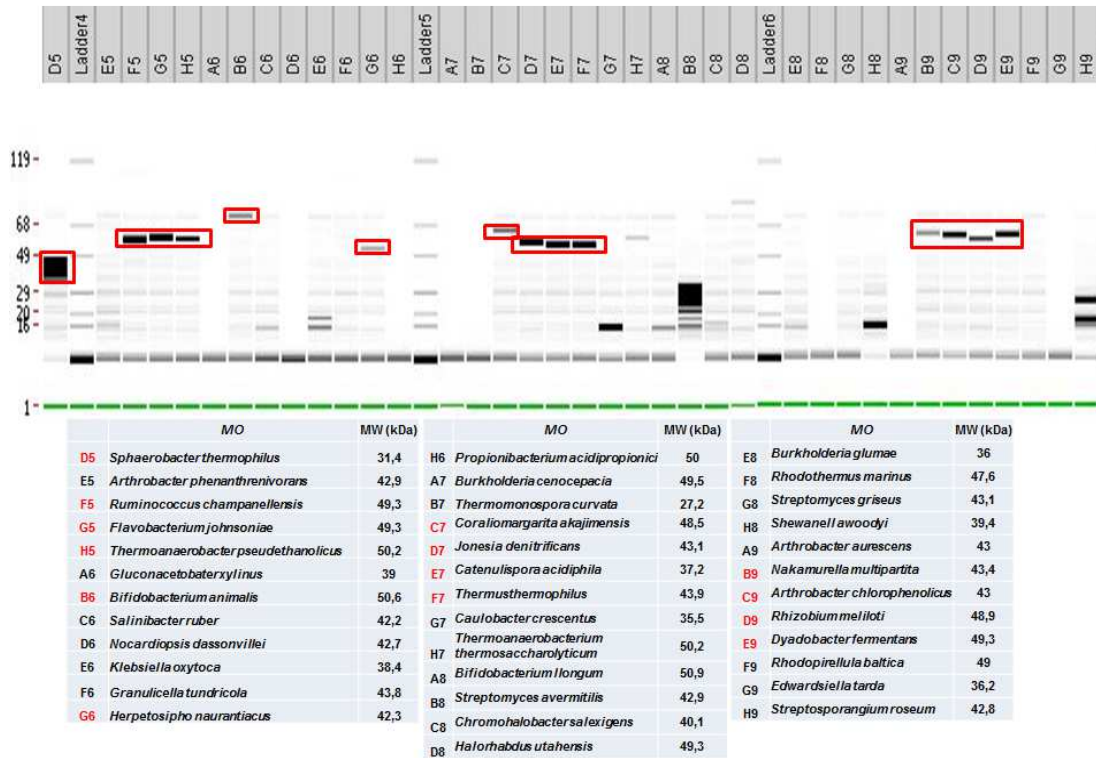


Figura 29 - 1ª parte da placa. Teste de expressão do gene e produção de XI em placa de 96 poços. Na imagem é possível verificar o tamanho de cada proteína e as bandas das proteínas solúveis. Esse resultado foi obtido por análise qualitativa e quantitativa feita no sistema de detecção microfluida LabChip gxi (PerkinElmer, Estados Unidos) com lise das bactérias contendo plasmídeos recombinantes e purificação da proteína de interesse (pelo método de Vincentelli⁷¹). Os retângulos vermelhos destacam as bandas da proteína de interesse, que no caso, encontram-se na fração solúvel. Na imagem, “LADDER” indica marcadores de massa molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor

Vale ressaltar que a princípio as proteínas são produzidas como proteína de fusão, no caso, com a tioredoxina (~12,5 kDa), cujo intuito é aumentar a solubilidade de proteínas às quais ela encontra-se fusionada.⁷²

Deste ponto em diante, as XIs produzidas serão referenciadas considerando sua localização na placa de teste de expressão inicial (Figuras 28 e 29). No caso, foram 72 XIs, cujas localizações na placa de 96 poços iam de A1 até H9, mas nem todas foram produzidas e/ou permaneceram na fração solúvel. Algumas específicas serão mais detalhadas que outras, pois passaram por mais testes bioquímicos.

4.3 Produção e purificação de XIs solúveis

As seqüências de aminoácidos de cada XIs (das 24 expressas solúveis) foram submetidas a um alinhamento múltiplo no programa ClustalX⁹¹ e à análise filogenética (obtenção de árvore filogenética), de modo que foi possível agrupar as 24 XIs em 6 grupos distintos, de acordo com sua proximidade na árvore filogenética. Esse agrupamento permite estreitar relações entre enzimas “parecidas” e facilitar o entendimento das relações que existem entre os resultados dos estudos bioquímicos com os estruturais. Na Figura 30 encontra-se um cladograma (diagrama em forma de árvore ramificada, usado como representação filogenética entre seres vivos/proteínas/genes) obtido no site (<http://www.phylogeny.fr>, acessado pela última vez em Agosto de 2016).⁹²

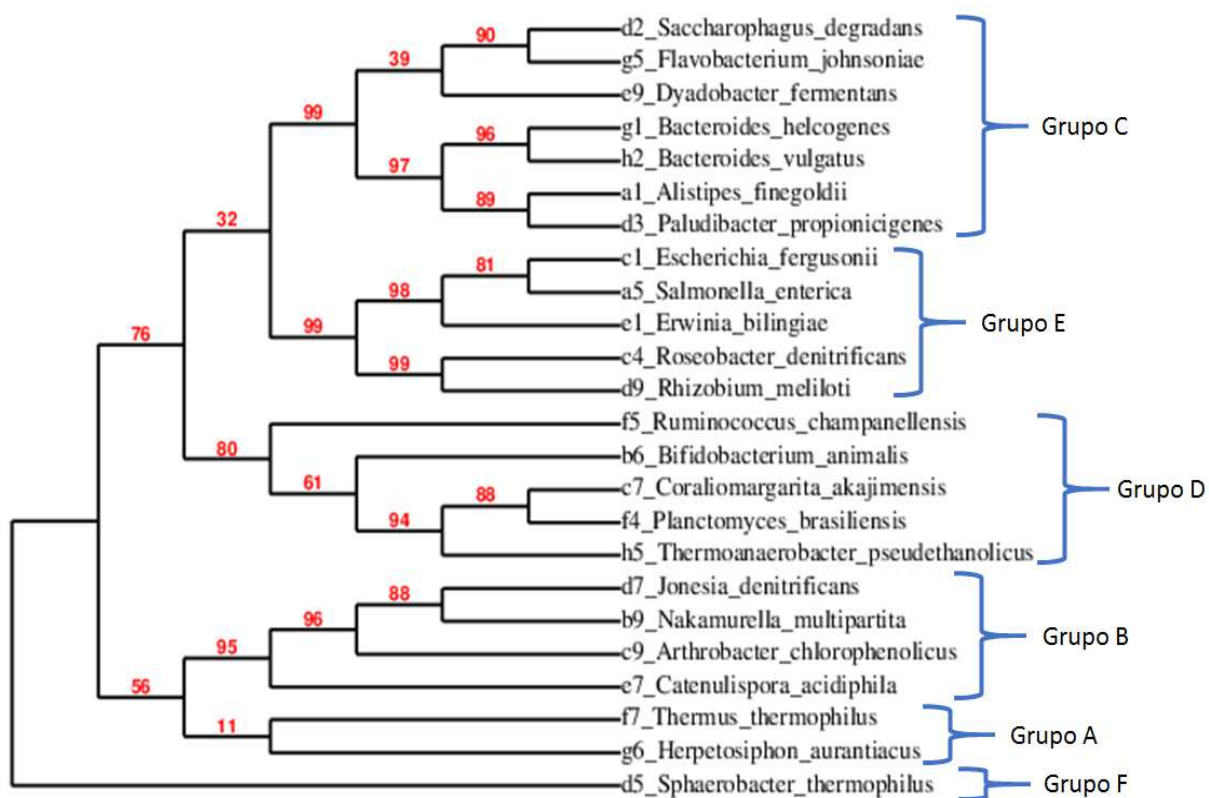


Figura 30 - Análise filogenética baseada em alinhamento sequencial das 24 XIs produzidas de forma solúvel. A partir da proximidade de cada XI, elas foram divididas em 6 grupos: A, B, C, D, E, e F.

Fonte: Elaborada pelo autor

As figuras a seguir contêm os resultados da purificação de 24 XIs, cujos rendimentos de proteína na fração solúvel (entre 15 mg e 40 mg por litro de cultura) permitiram testes

subsequentes. As figuras já foram agrupadas de acordo com cada grupo (de acordo com as Figura 28 e 29).

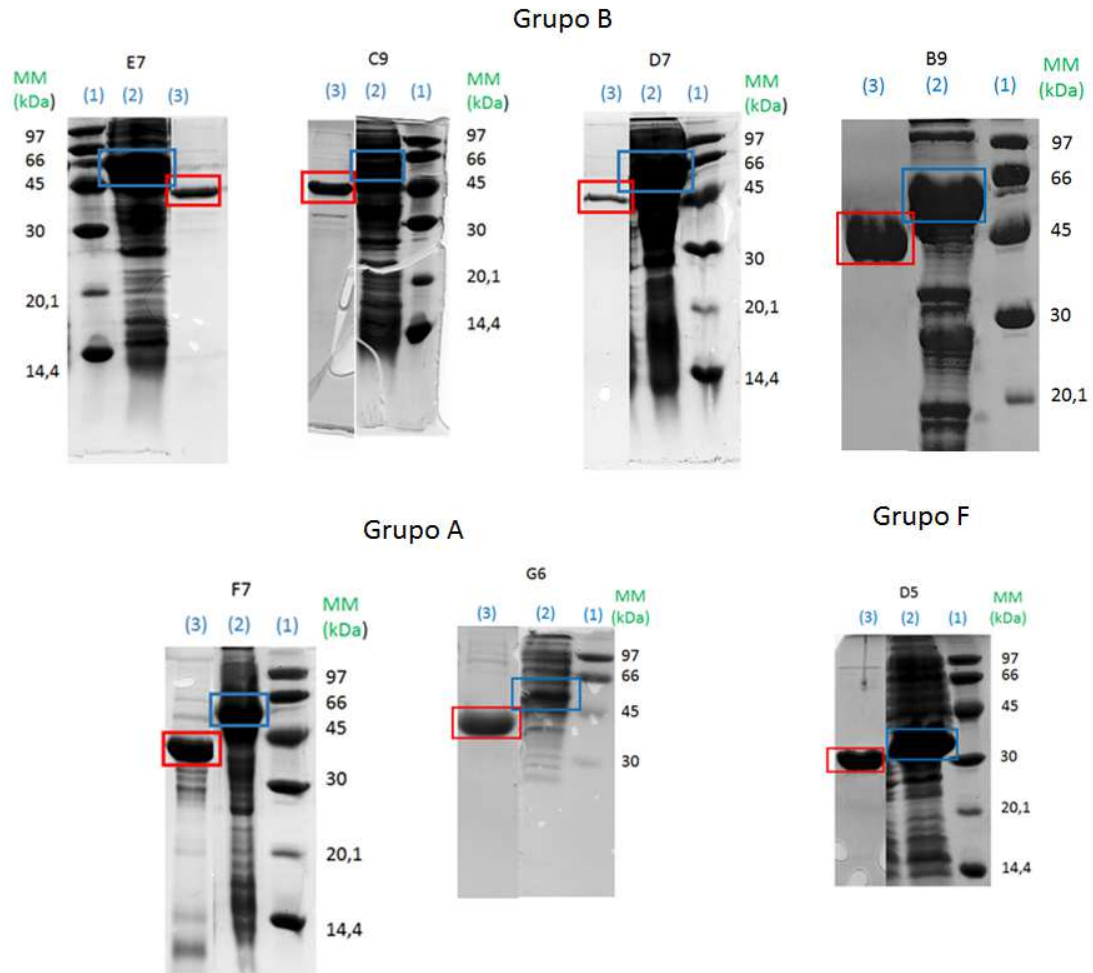


Figura 31 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs dos grupos A, B e F. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor

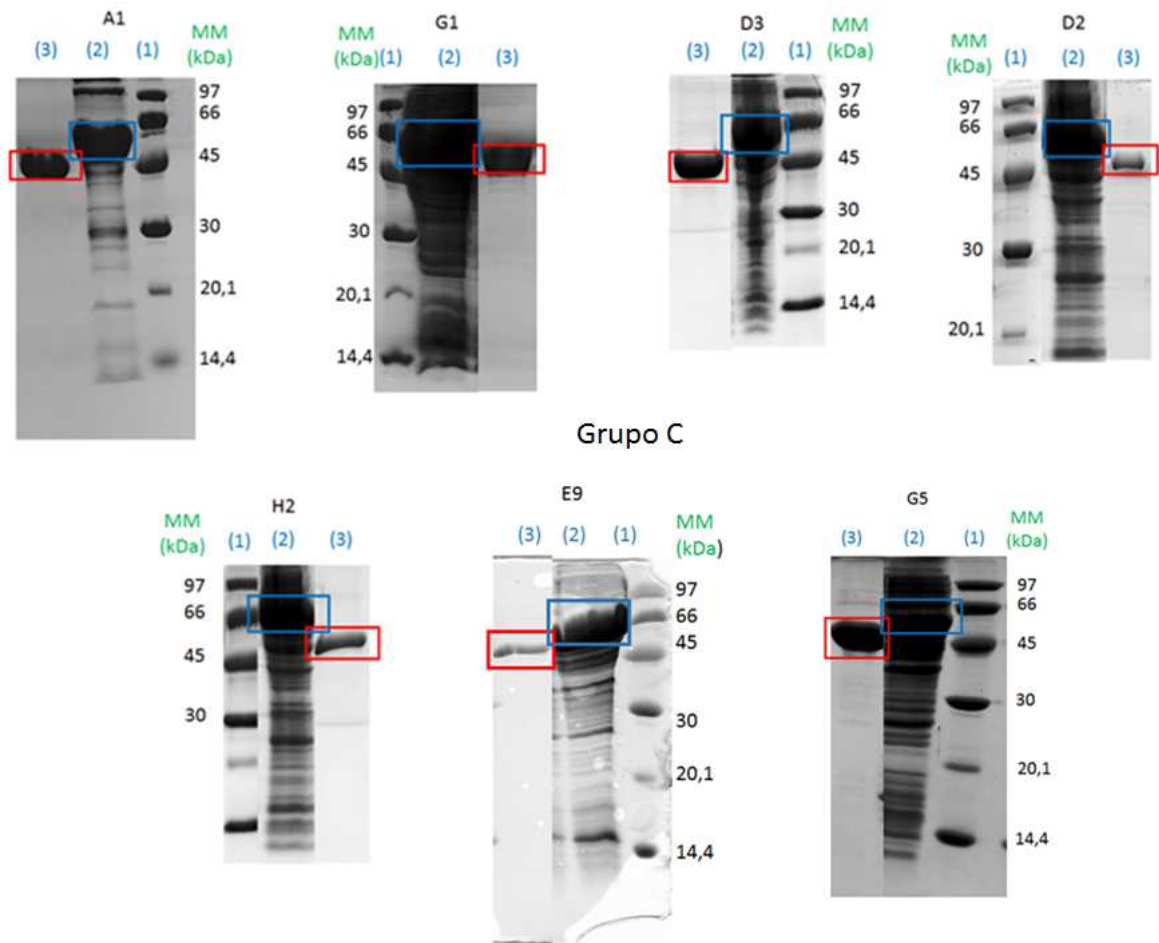


Figura 32 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo C. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor

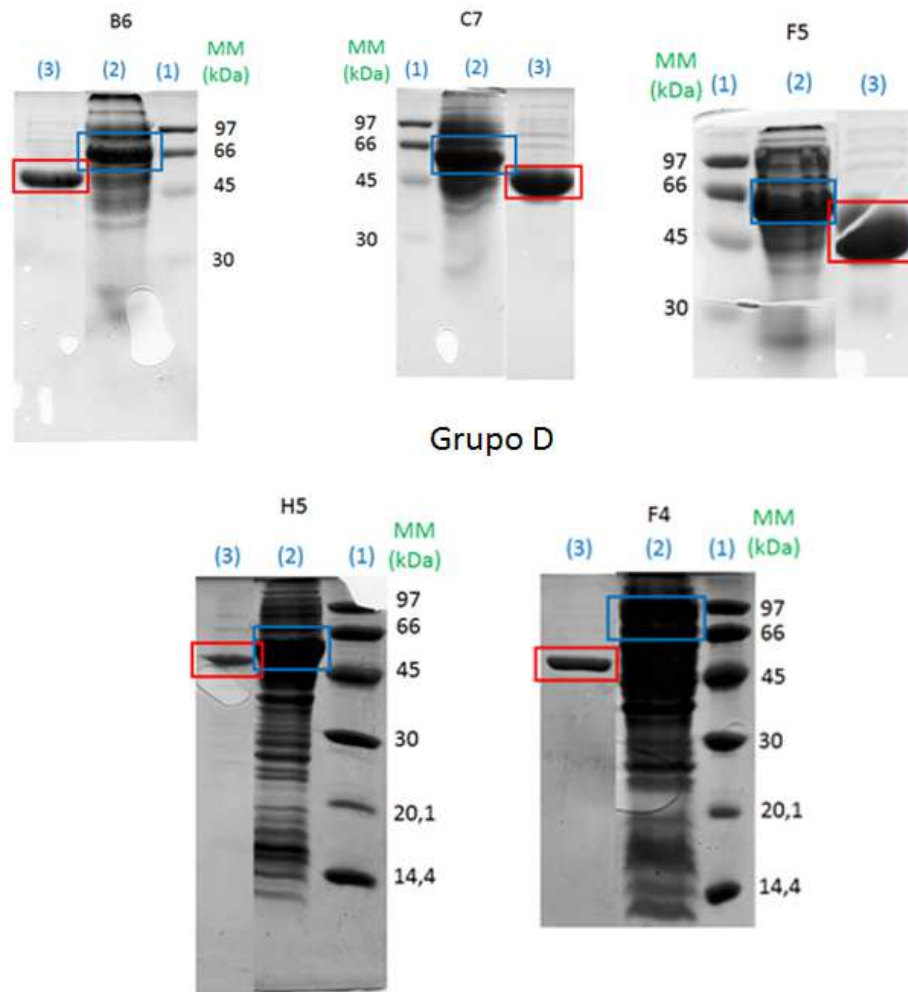


Figura 33 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo D. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor

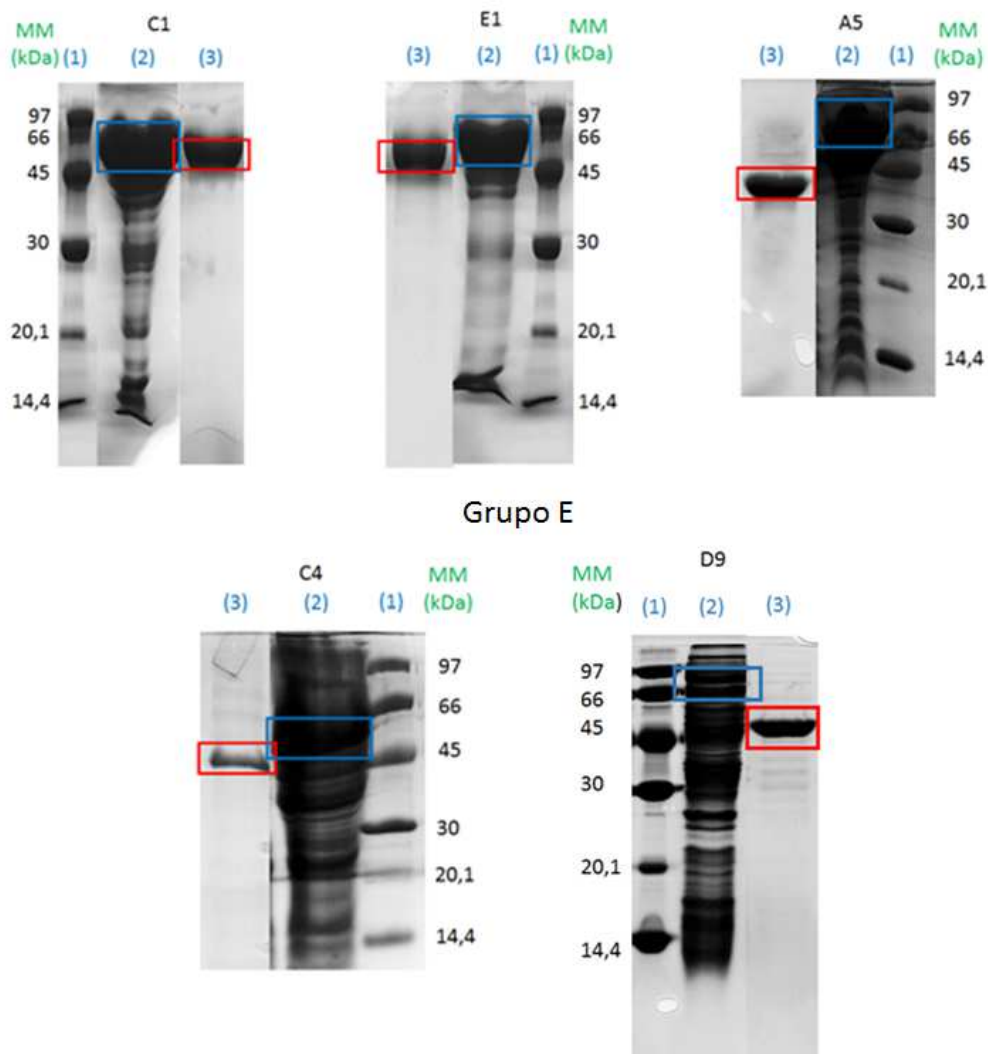


Figura 34 - Expressão e purificação. SDS-PAGE das purificações das XIs do grupo E. Em (1) encontra-se o marcador de massa molecular: Fosforilase b de músculo de rato (97 kDa); albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em (2) há a fração solúvel após lise bacteriana. (3) representa a banda da proteína pura e clivada, após toda a etapa de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir da figura anterior, pode-se concluir que o protocolo de purificação utilizado permite que se obtenha a maioria das XIs com alto grau de pureza em apenas uma etapa de purificação e clivagem, o que antes era feito em duas etapas intercaladas por diálise.

4.4 Atividade enzimática

4.4.1 Curva padrão

Como destacado na seção de Materiais e Métodos, o primeiro passo para se quantificar a atividade dessas enzimas em estudo foi a obtenção de uma curva padrão, relacionando o valor da absorbância a 540 nm (pelo teste cisteína-carbazol) e a concentração de D-xilulose. Essa curva foi obtida variando-se a concentração de D-xilulose e medindo-se a absorbância a 540 nm. Através dela, pode-se então verificar em testes rápidos se a enzima se encontrava ativa ou não. A Figura 35 mostra os pontos resultantes e o ajuste linear feito no programa Origin 9. Todas as XIs apresentaram atividade após etapa de purificação, com exceção da G6, G1, B6 e D5.

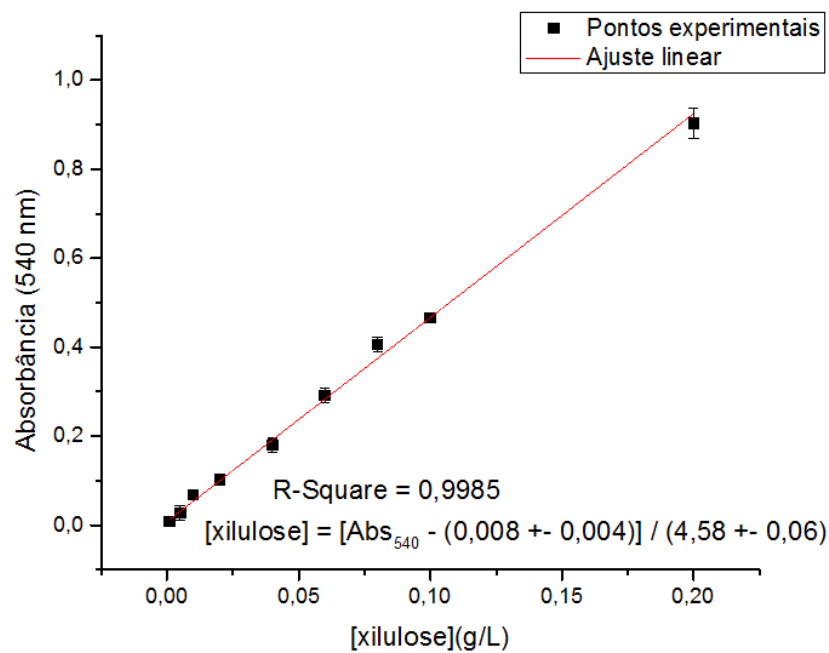


Figura 35 - Curva-padrão do teste da cisteína-carbazol. A curva relaciona absorbância a 540 nm com a concentração de D-xilulose purificação. O gráfico foi feito no programa Origin 9 (OriginLab) e foi utilizado um *Fit Linear* para reconhecer que o comportamento dos pontos se ajusta a uma reta

Fonte: Elaborada pelo autor

4.4.2 Atividade enzimática em função do pH

Os testes de atividade enzimática foram previamente detalhados na metodologia descrita na seção anterior. As enzimas utilizadas nesses testes foram encaminhadas a partir da última etapa de purificação, ou seja, apresentavam uma pureza acima de 90%. Além disso, para se realizar de forma eficaz o teste, foram adicionados os cofatores, CoCl_2 e MgSO_4 , já reportados como sendo essenciais na função destas enzimas.⁹³⁻⁹⁸ Nas figuras a seguir, as XIs estão separadas de acordo com cada grupo (de A a E, com exceção do representante do grupo F que não apresentou atividade), para facilitar comparações futuras.

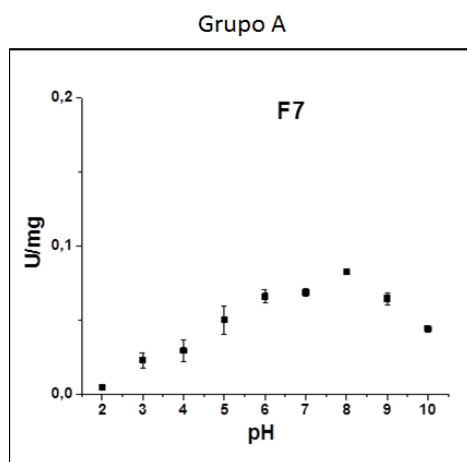


Figura 36 - Atividade enzimática da xilose isomerase F7, pertencente ao grupo A deste projeto

Fonte: Elaborada pelo autor

Xilose isomerase de *Thermus thermophilus*, F7, apresenta um perfil de atividade concentrado deslocado para valores de pH acima de 7, com pico em pH 8. Porém, para valores de pH mais altos, essa atividade cessa mais rapidamente do que para valores de pH menores que 8.

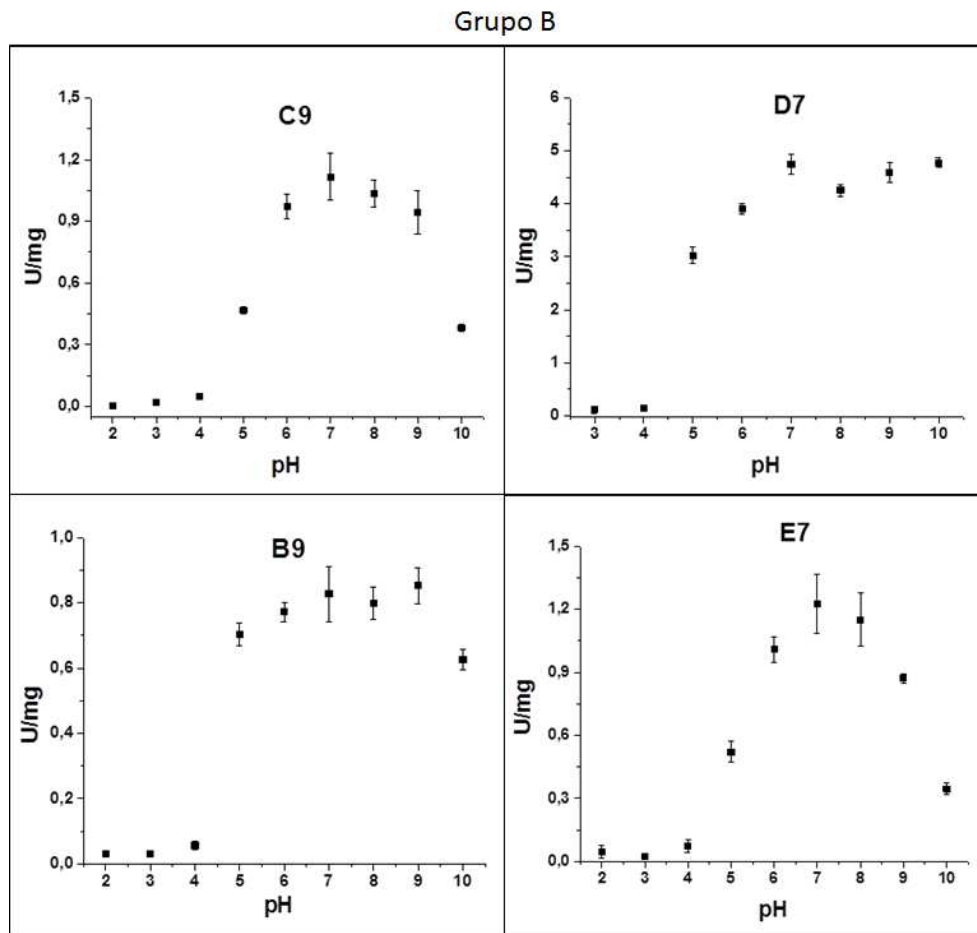


Figura 37- Atividade enzimática das xiloses isomerases C9, D7, B9 e E7, pertencentes ao grupo B deste projeto

Fonte: Elaborada pelo autor

A atividade da C9, xilose isomerase de *Arthrobacter chlorophenolicus*, tem seu pico em pH 7 e apresenta um perfil simétrico para valores maiores e menores que o pH 7. B9, xilose isomerase de *Nakamurella multipartita*, apresenta atividade mais alta na região de pH básico, com valores mais altos oscilando entre pH 6 e 9, com queda brusca para valores baixos de pH. Para a xilose isomerase de *Catelunispora acidiphila*, E7, o pico de atividade é em pH 7, razoavelmente centrado neste valor de pH. Para B9, C9 e E7 os valores absolutos de atividade específica são parecidos, na faixa de 1 U/mg de enzima. Porém, para a xilose isomerase de *Jonesia denitrificans*, D7, a atividade é 5 a 6 vezes mais alta, e apresenta valores altos a partir de pH 5, com aumentos constantes até pH 10 (limite do experimento).

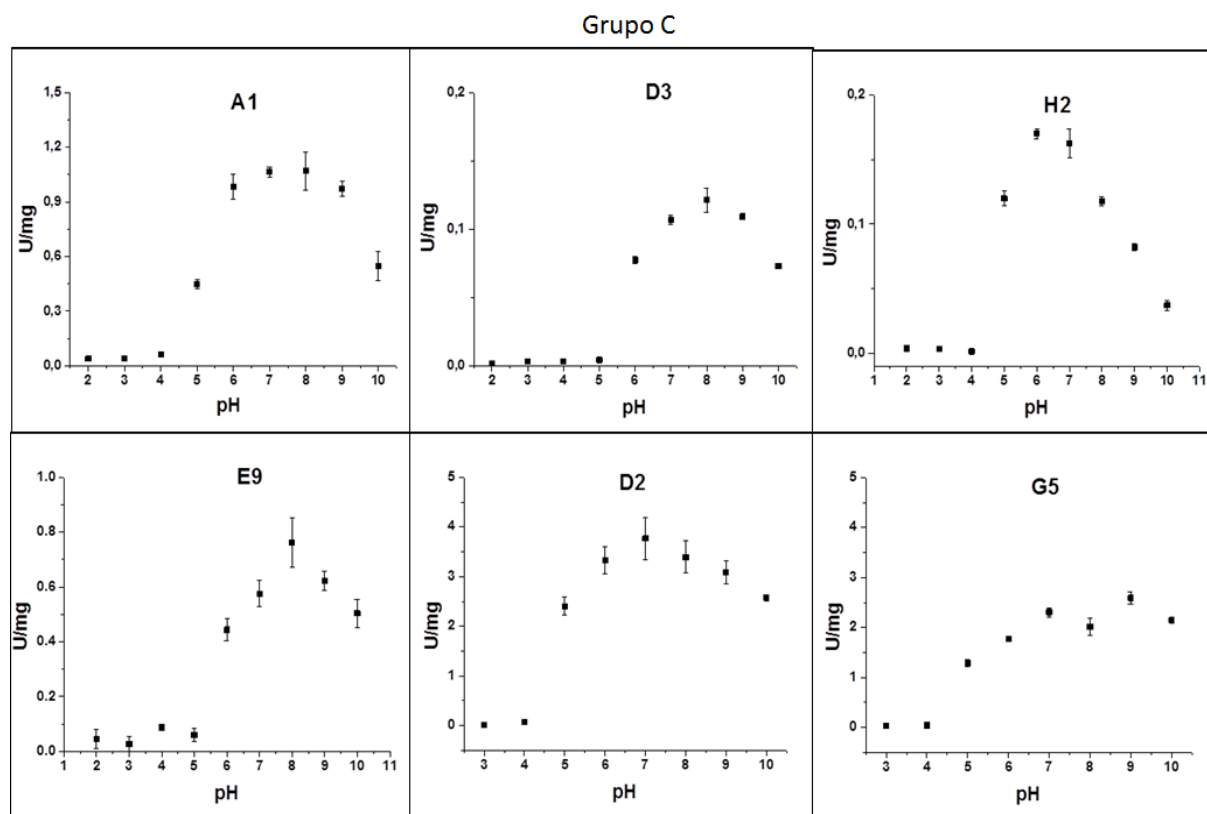


Figura 38 - Atividade enzimática das xilose isomerases A1, D3, H2, E9, D2 e G5, pertencentes ao grupo C deste projeto .

Fonte: Elaborada pelo autor

Observando a figura anterior, podemos ver que o perfil de atividade para a xilose isomerase de *Alistipes finegoldii*, A1, ele está um pouco deslocado para valores de pH mais altos (não estão sendo considerados valores maiores que 10), tendo um pico em pH 7, porém com pouca diferença de atividade na faixa de 6 a 9. Já a xilose isomerase de *Paludibacter propionicigenes*, D3, possui valores de atividade pouco expressivos, porém um perfil bem acentuado ao redor do pH 8. H2, xilose isomerase de *Bacteroides vulgatus*, também apresenta perfil de atividade de acordo com pH com pouca expressividade, mas concentrado em pH 6. Xilose isomerase de *Dyadobacter fermentans*, E9, ela já possui a terceira maior atividade registrada para este grupo, com perfil mais deslocado para valores de pH básicos. As duas maiores atividades, neste grupo, ficaram por conta da xilose isomerase de *Saccharophagus degradans*, D2, e de *Flavobacterium johnsoniae*, G5. A diferença é que D2 consegue ser maior em valor absoluto e apresenta pico em pH 7; já G5 começa a aumentar e oscila entre pH 5 e 10 entre valores parecidos.

A figura a seguir mostra as atividades para as XIs do grupo D.

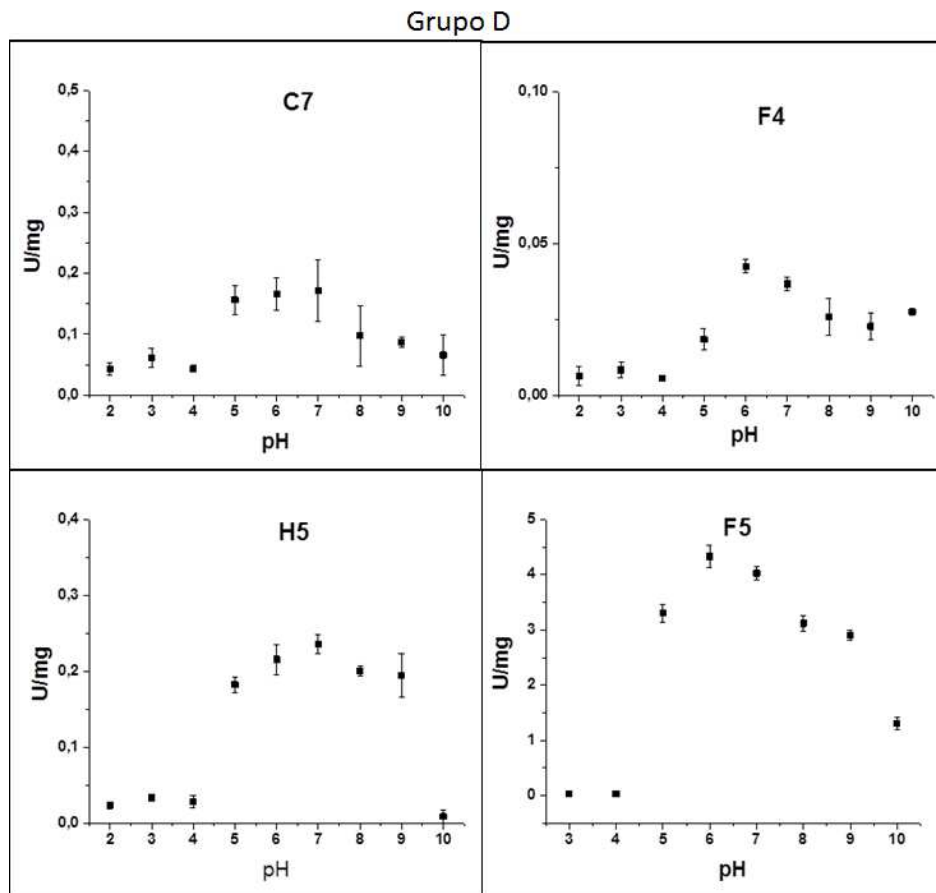


Figura 39 - Atividade enzimática das xilose isomerases C7, F4, H5 e F5, pertencentes ao grupo D deste projeto

Fonte: Elaborada pelo autor

O interessante também desse grupo é o fato de C7, H5 e F4 apresentarem baixa atividade absoluta e F5 apresentar valores altos. C7 (xilose isomerase de *Coralimargarita akajimensis*) tem valores de atividade menos inexpressivos entre pH 5 e 7, já H5 (XI de *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*) apresenta um rápido aumento na atividade entre pH 4 e 5, e permanece oscilando até pH 9 entre esses valores pequenos. F4 (XI de *Planctomyces brasiliensis*) apresenta um pico muito pouco expressivo em pH 6. F5 (XI de *Ruminococcus champanellensis*) apresenta pico em pH 6, com valor de atividade chegando a 4,5 U/mg.

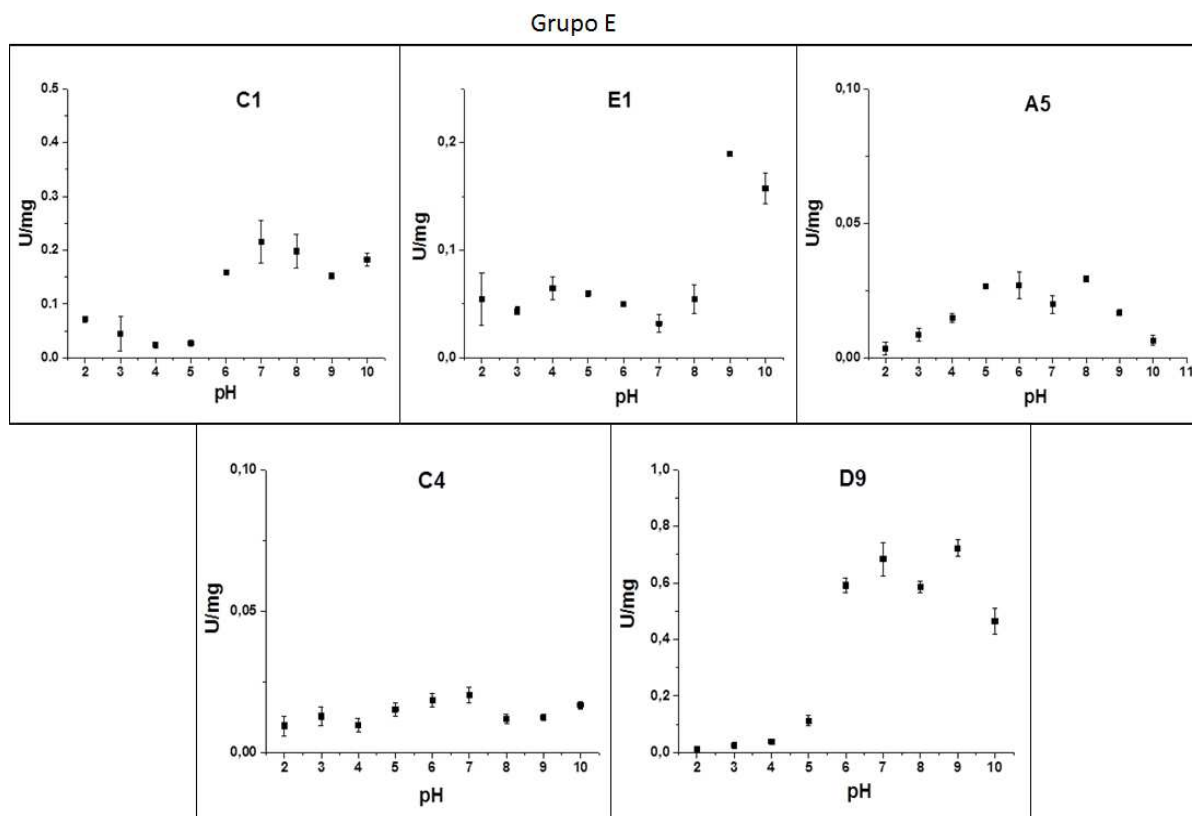


Figura 40 - Atividade enzimática das xiloses isomerases C1, E1, A5, C4 e D9, pertencentes ao grupo E deste projeto

Fonte: Elaborada pelo autor

Todos os valores de atividade desse grupo não foram altos, não ultrapassando 1 U/mg. C1 (XI de *Escherichia fergusonii*) apresentou atividade a partir de pH 6. Já E1 (XI de *Erwinia billingiae*) apresentou um abrupto aumento na atividade para pH 9 e 10. A5 (XI de *Salmonella enterica*) se mostrou ser uma enzima pouco ativa, considerando valores absolutos de atividade específica, entretanto, exibiu um perfil centrado em pH 6 e 7. C4 (XI de *Roseobacter denitrificans*) quase não demonstrou atividade, permanecendo com valores muito baixos e oscilantes. A que se demonstrou mais ativa deste grupo E foi a D9 (XI de *Rhizobium meliloti*), com picos em pH 6, 7, 8 e queda para valores de pH abaixo de 6 e maiores que 9.

Essas enzimas apresentam grande variação nos valores da atividade catalítica, principalmente quando se consideram estudos anteriores e trabalhos já publicados, como os que estão a maioria resumidos para XI no banco de dados chamado BRENDA (BRAunschweig ENzyme DATabase).⁴⁷

4.5 Cinética enzimática

A parte de cinética enzimática neste trabalho visava à obtenção primeiramente dos parâmetros K_m e V_{max} das enzimas estudadas. Esses experimentos foram realizados para D7 (XI de *Jonesia denitrificans*) G5 (XI de *Flavobacterium johnsoniae*) medindo-se a taxa de conversão do substrato em produto, variando-se a concentração de substrato de 0,2 mM a 150 mM (para G5) e 200 mM (para D7). Lembrando que para obter os valores de concentração de enzima e tempo de reação foram escolhidos previamente através de mais dois experimentos, descritos na seção de Materiais e Métodos. A Figura 41 expõe as curvas de Michaelis-Menten dessas enzimas, de onde podemos extrair os valores de V_{max} e K_m (constante de Michaelis), através do ajuste realizado no programa Origin 9 (OriginLab).

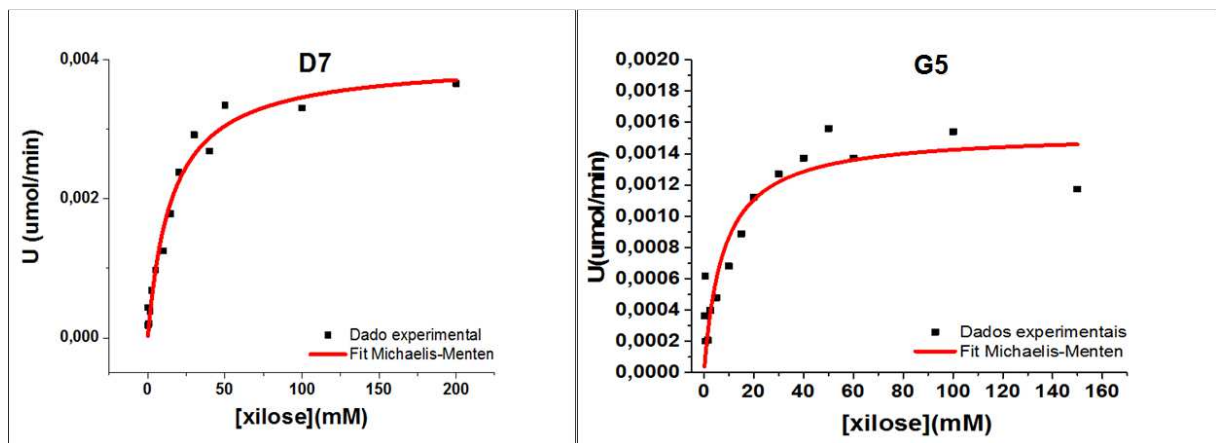


Figura 41 - Velocidade de reação pela concentração de D-xilose, onde ao comportamento dos pontos foi adicionada a curva de Michaelis-Menten. Tanto em (A), cinética para D7, quanto em (B), cinética de G5, o ajuste a função de Michaelis-Menten permitiu obter seus parâmetros catalíticos (V_{max} e K_m), sendo eles $(0,58 \pm 0,03) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $(16 \pm 3) \text{mM}$ e $(0,087 \pm 0,008) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $(8 \pm 1) \text{mM}$, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor

D7 possui V_{max} e K_m que valem respectivamente, $(0,58 \pm 0,03) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $(16 \pm 3) \text{mM}$. Já para G5 esses valores são $(0,087 \pm 0,008) \mu\text{mol}/\text{min}$ e $(8 \pm 1) \text{mM}$, respectivamente. É sempre importante salientar que o valor de K_m é uma característica intrínseca da enzima em estudo e do substrato sendo utilizado, e seu valor não depende da quantidade de enzima sendo utilizada. O valor de V_{max} , entretanto, não é absoluto para quaisquer quantidades de enzima empregada nos experimentos. Para tanto, a partir dele, outra constante é obtida, esta não dependendo da quantidade de enzima, conhecida como k_{cat} ou número de renovação (*turnover number*), definida por:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t} \quad (2)$$

onde E_t é o valor total de enzima utilizada no experimento. Esse k_{cat} é definido como o número máximo de mols de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima por unidade de tempo.⁹⁹⁻¹⁰⁰ D7 apresentou $(4,1 \pm 0,2) s^{-1}$ e G5 $(0,69 \pm 0,07) s^{-1}$ para essa constante. Há outra constante também, alternativa, muito utilizada em cinética enzimática, é a constante de especificidade, definida como k_{cat}/K_m . Esse valor expressa o quão eficiente uma enzima é na conversão de um substrato em produto, para baixas concentrações de substrato.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Os valores dessa constante para D7 e G5 diferem perto de uma ordem de grandeza, e valem $(0,26 \pm 0,05) s^{-1}mM^{-1}$ e $(0,09 \pm 0,01) s^{-1}mM^{-1}$, respectivamente. Podemos relacionar e comparar numericamente essas constantes com as de XIs já reportadas, como mostrado na tabela 2. Entretanto, deve-se evitar a comparação da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) de diferentes enzimas que agem sobre um mesmo substrato.¹⁰⁰

Com relação a termodinâmica do processo, deve ser destacado que k_{cat} aumentando pode refletir uma diminuição da energia livre de ativação; e o aumento de k_{cat}/K_m não significaria necessariamente que houve aumento de afinidade entre o substrato e a enzima, com a diminuição de K_m , e sim aumento mais pronunciado de k_{cat} .

Tabela 2 - Valores de parâmetros e constantes catalíticas V_{max} , K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m . São apresentadas também as condições em que foram realizados os experimentos (pH e Temperatura)

MO	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (1/s/mM)	pH	T (°C)	Referência
<i>Jonesia denitrificans</i> (D7)	0,57	16	4,1	0,26	7,5	33	Este trabalho
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> (G5)	0,087	8	0,69	0,09	7,5	33	Este trabalho
<i>Vibrio sp</i>	14,3	7,93	47	5,93	7,5	40	102
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	NR*	3	5,52	1,84	7,7	25	103
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	NR	83	0,41	0,0049	5,8	25	103
<i>Thermus thermophilus</i>	69,37	15,2	50,76	3,35	7,5	60	104
<i>Thermus thermophilus</i> K355A	158,48	11,8	115,98	9,8	7,5	60	104
<i>Lactobacillus reuteri</i>	43,1	177,4	146,6	0,83	5	65	105
<i>Piromyces sp</i>	0,053	86,97	NR	NR	7,5	30	106
<i>Fulvimarina pelagi</i>	0,142	1,75- 4,17	NR	NR	6,5	35	107
<i>Clostridium phytofermentans</i>	0,0344	66,01	NR	NR	7,5	30	44

*NR = não reportado

Fonte: Elaborada pelo autor

Comparativamente, D7 e G5 possuem parâmetros cinéticos pouco expressivos, mas considerando dados apresentados na tabela 2, seus valores de k_{cat} , V_{max} e K_m se encontram na média (com valores já reportados tanto acima quanto abaixo). Entretanto, comparar esses parâmetros é algo complicado, pois para diferentes enzimas, estas podem agir sobre diferentes substratos, além disso, as condições de reação nas quais foram realizados os testes cinéticos também devem ser levadas em consideração. O que é mais interessante e útil para análises científicas, por exemplo, é fazer comparações dos parâmetros cinéticos da enzima selvagem e mutante, ou de novas construções envolvendo ainda a mesma enzima e fusões, pois neste caso, estaríamos falando do mesmo sítio catalítico, mesmo ambiente químico e condições reacionais, com exceção dos resíduos mutados.

Pelos testes de atividade, variando-se o pH, de D7 e G5, pôde-se notar que para valores baixos de pH, a atividade enzimática específica não se encontrava dentro de seu valor ótimo. Ou seja, mesmo que os testes cinéticos não tenham sido realizados para baixos valores de pH, pode-se supor que os valores das principais constantes cinéticas nessas condições não superariam os já apresentados neste trabalho (pH 7,5 e temperatura 33 °C).

4.6 Estabilidade térmica (*Thermo*fluor)

Os testes de *Thermo*fluor foram realizados para pelo menos um representante de cada grupo das XIs. Houve também o esforço de se conseguir esses resultados para todas as XIs as quais obtivemos a estrutura cristalográfica, já que, a princípio, pode-se esperar uma relação entre a estrutura atômica e a estabilidade térmica da proteína. Foram utilizados diferentes agentes tamponantes para um mesmo valor de pH, porém foram mostrados apenas os tampões para os quais a estabilidade térmica foi maior de acordo com o valor de pH para cada uma das XIs. Essas soluções estão discriminadas na seção anterior (Materiais e Métodos).

A análise das curvas permite se dizer que o tampão no qual as enzimas são mantidas, após a diálise, é adequado na maioria dos casos. Porém ainda é possível melhorar para testes futuros, no caso, os testes de atividade, para os quais é importante que a enzima esteja em um estado estável e com uma estrutura não perturbada pelas condições do ambiente (tampão e pH). Além disso, nem todas as XIs purificadas passaram por esse experimento, ou seja, antes do início dos testes de atividade, é importante que todas as XIs tenham sua estabilidade térmica reconhecida e analisada com cuidado.

As figuras 42, 43, 44 45 e 46 apresentam os resultados de estabilidade térmica para diversos valores de pH, representado pelo T_m em cada situação. Para facilitar as interpretações

e comparações futuras, as imagens foram organizadas para cada grupo de XIs deste projeto (grupo A ao F).

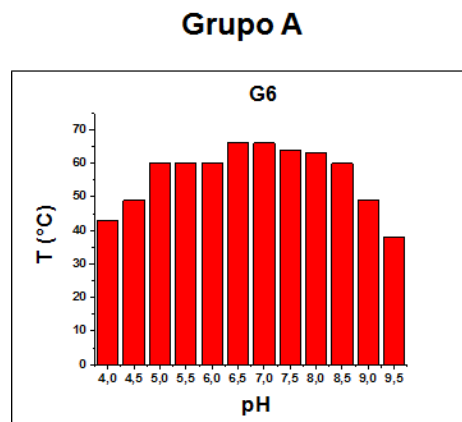


Figura 42 - *Thermofluor* das XIs do grupo B, no caso, B9, E7 e C9. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para este primeiro grupo, A, apenas foi possível obter os valores de T_m para G6. Já para F7, xilose isomerase de *Thermus thermophilus*, os valores de T_m foram muito altos para o *range* de temperatura que o experimento estava sendo feito; o que é explicado pelo fato dessa ser uma enzima de um microrganismo termófilo extremo.

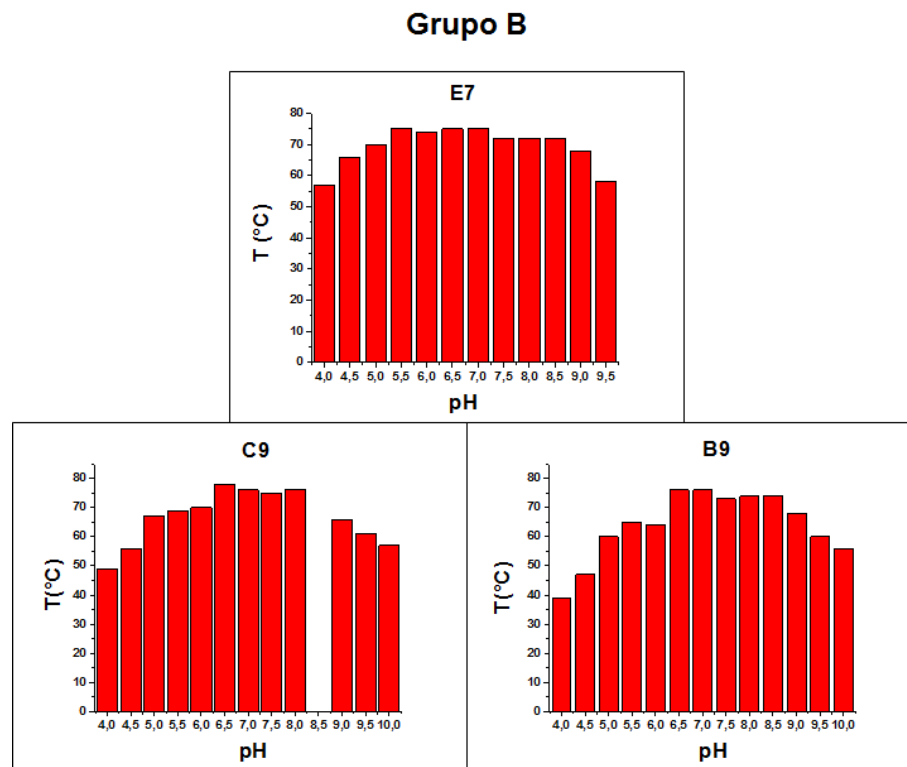


Figura 43 - *Thermofluor* das XIs do grupo B, no caso, B9, E7 e C9. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

De modo geral, as XIs do grupo B (Figura 43) apresentaram T_m s elevadas. É interessante notar que E7 apresenta uma estrutura menos susceptível à mudança de pH, já que foi a enzima deste grupo que menos apresentou variação para as T_m s encontradas, considerando a variação de pH do experimento. Em pH 8,5, em tampão Tris 50 mM, C9 desnaturou. B9 foi a XI que mais variou sua T_m para os diferentes pHs (aproximadamente 35°C). Quando estabelecemos uma conexão com as atividades enzimáticas em 33 °C e variando-se os pHs, mostrado anteriormente, vemos que para as estruturas que menos tiveram sua T_m variando, ou seja, para estruturas mais rígidas, o perfil de atividade apresenta um pH ótimo bem pronunciado – como pode ser observado na Figura 37. Nesse grupo, à medida que há maior flexibilidade na molécula, nota-se certa vantagem para se manter uma taxa de reação máxima para uma faixa extensa de pH.

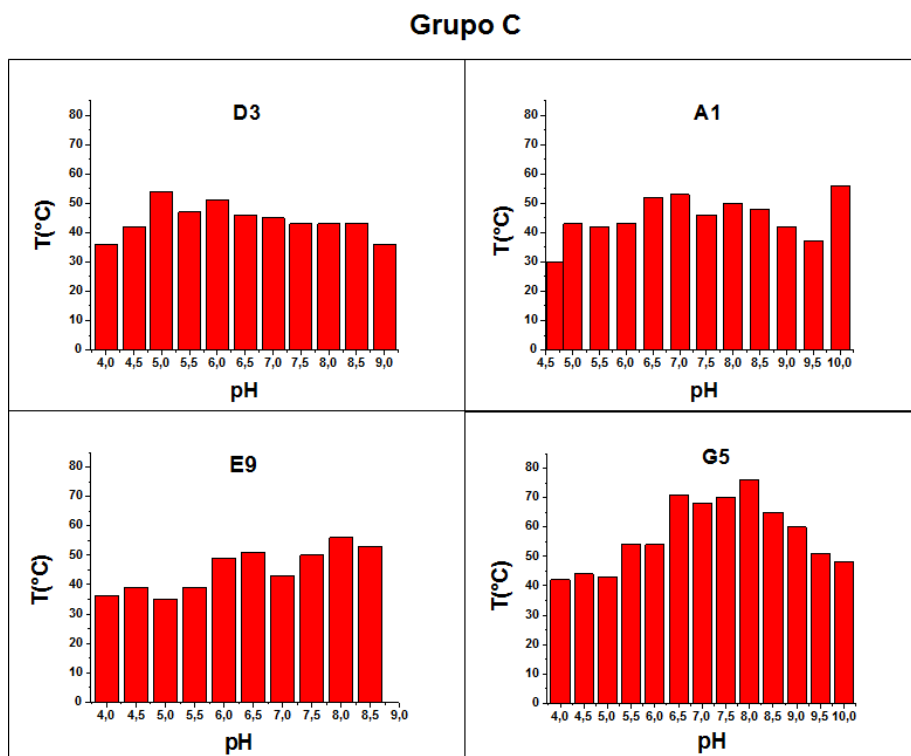


Figura 44 - *Thermofluor* das XIs do grupo C, no caso, D3, A1, E9 e G5. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

As XIs do grupo C (Figura 44) apresentaram T_m s baixas, em torno de 40 e 50 °C, com exceção de G5, que demonstrou bastante estabilidade térmica entre pH 6,5 e 9, com sua T_m variando entre 70 e 80 °C. Interessante que nessa faixa de pH, a enzima demonstrou maior atividade catalítica e valores absolutos altos comparados às XIs deste projeto. Isso pode sinalizar que a combinação do arranjo tridimensional dos resíduos exclusivos (ou mais comuns neste grupo C) e os resíduos do bolsão catalítico, permitiram maior eficiência na catálise, mesmo com pouca flexibilidade da molécula para baixas temperaturas – lembrando que o teste de atividade é realizado a 33 °C.

Grupo D

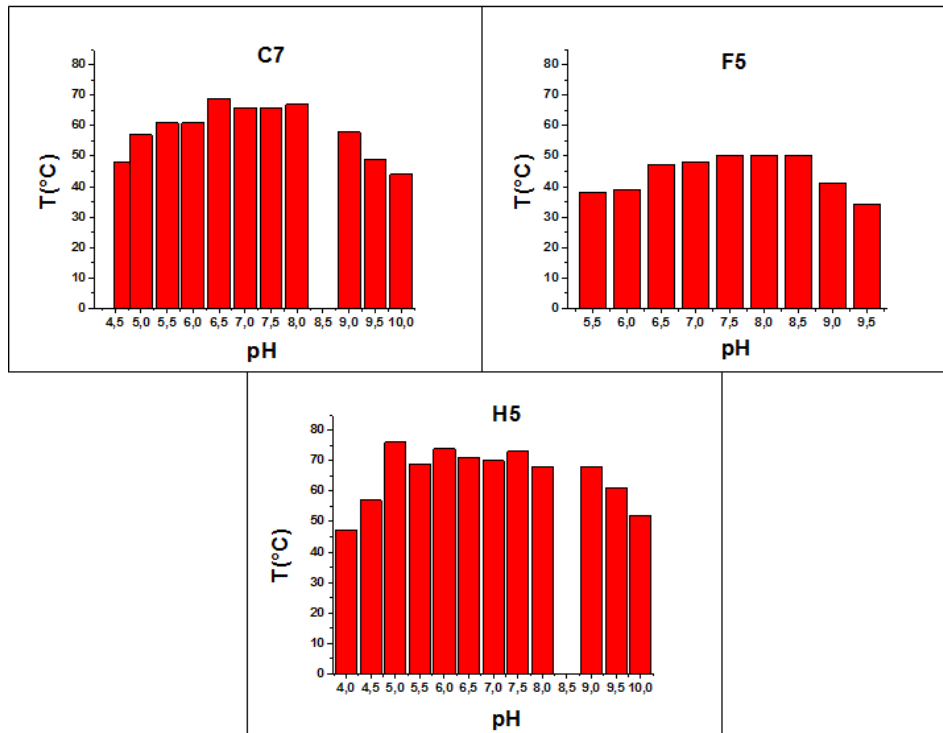


Figura 45 - *Thermofluor* das XIs do grupo D, no caso, C7, F5 e H5. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para o grupo D (Figura 45) convém relatar que F4 é uma enzima muito instável, mesmo em baixas temperaturas, e, portanto, não foi possível realizar esse experimento para ela, visto que a estrutura já se encontrava predominantemente desnaturada. Isso também pode ser notado quando se considera seu perfil de atividade, mostrado na figura 18, a enzima apresenta atividade catalítica baixíssima, e o comportamento diante da variação de pH não está claro. Já F5 é uma XI cuja atividade enzimática se mostrou bastante alta, mesmo demonstrando T_m s baixas e com pouca variação no intervalo de pHs desse experimento. Esse foi um caso então em que a combinação de uma flexibilidade alta da molécula e a disposição dos resíduos no sítio catalítico, culminou numa catálise bastante eficiente. Em pH 8,5, H5 e C7 se encontravam desnaturadas.

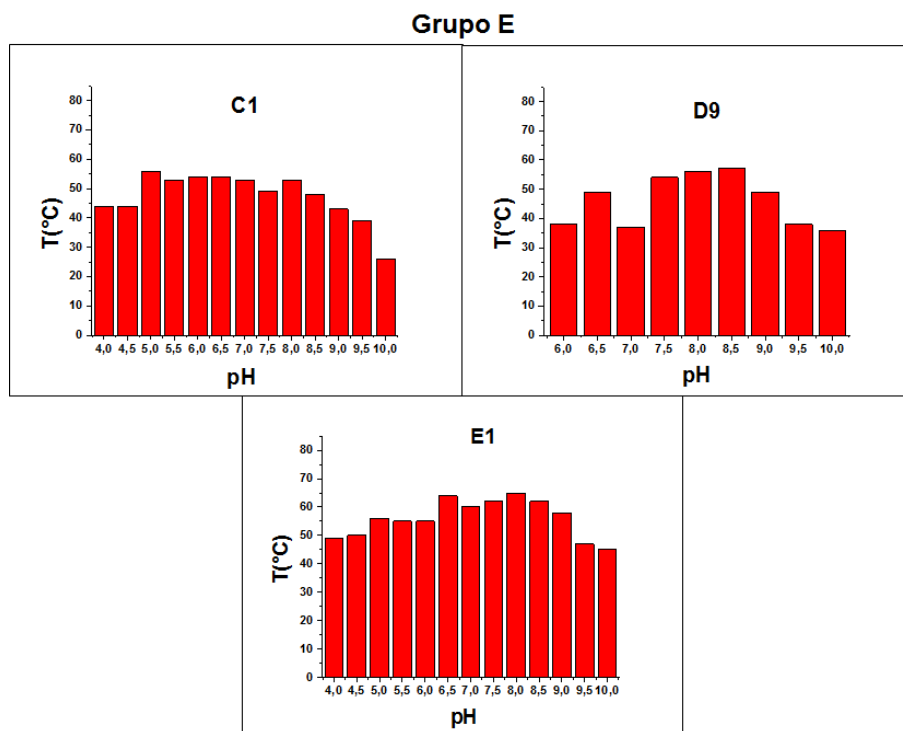


Figura 46 - *Thermofluor* das XIs do grupo E, no caso, C1 e D9 e E1. Gráficos feitos no programa Origin 9 (OriginLab) de valores de T_m em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

Primeiramente, como já observado na Figura 40, A5 e C4 apresentaram atividade enzimática extremamente baixa para essas XIs do grupo E estudadas, visto que grande parte delas, em solução, já se encontravam desnaturadas. Portanto, esses experimentos de estabilidade térmica foram mais difíceis de serem realizados para elas. As XIs desse grupo apresentaram T_m s baixos e com pouca variação em função do pH. Combinado a isso, as atividades enzimáticas também não tiveram bastante expressividade. Vale notar que C1 mantém uma certa estabilidade térmica em pH ácido, porém, para pHs básicos, a estrutura sofre uma queda bem acentuada, o que não é muito refletido em seus valores de atividade enzimática.

De maneira geral, pode-se notar claramente que as enzimas pertencentes ao grupo B foram as que apresentaram as mais altas temperaturas de *melting* (T_m), independente dos valores de pH. Além disso, partindo de uma análise mais ampla do resultado desses experimentos, o que se esperava eram temperaturas mais parecidas dentre as XIs, já que a grande maioria é proveniente de organismo mesófilo (das que foram submetidas ao *thermofluor*, apenas a H5 [XI de *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*] e F7 [XI de *Thermus thermophilus*] são termofílicas). Entretanto o que se observou foram temperaturas mais altas (faixa dos 70 °C) para o grupo B, faixa dos 50 °C para o grupo C (exceção a G5

[XI de *Flavobacterium johnsoniae*]); no grupo D as temperaturas são mais altas com exceção de C7 (XI de *Coralimargarita akajimensis*). O resultado para o grupo E foi de temperaturas medianas, entre 54 e 65 °C. Agora, considerando os valores de pH para os quais as temperaturas de *melting* são mais altas, esses ficam perto de 7, mas levemente ácido, isso para o grupo B e C. No grupo D, os valores de pH para as maiores T_m s situam-se na faixa de pH básico, e o mesmo se observa nas amostras do grupo E.

Como se pode observar pelos gráficos, algumas amostras não apresentaram os T_m s para alguns valores de pHs, isso devido a desnaturação da amostra naquele pH. Mais adiante, poderemos relacionar a estabilidade térmica de algumas XIs com as estruturas que foram resolvidas por difração de raios-X em monocristal.

Algo importante a se comentar, é que as XIs sofrem influência de seus metais no sítio ativo. Já é reportado que os íons divalentes presentes no sítio ativo dessa enzima interferem tanto na atividade catalítica quanto na estabilidade térmica.⁴⁶

4.7 Cristalografia

4.7.1 Testes de cristalização

Os testes de cristalização foram realizados utilizando-se o robô de cristalização (*Honeybee*) e os cristais das XIs lavaram um tempo médio de uma semana para surgirem na gota.

As figuras 47 e 48 apresentam alguns dos cristais obtidos e submetidos à coleta de dados de difração de raios-X. A qualidade dos cristais é bastante variada. Cristais considerados adequados para os experimentos de difração foram os das C9, D7, G1, G5, D2, D3 e F5, pois são cristais razoavelmente bem formados nas três direções. Alguns não foram suficientes, pois ou eram muito pequenos e frágeis, ou apresentavam crescimento em apenas duas direções (placas muito finas e agulhas), quando não formavam um agregado de formas cristalinas fusionadas. Nas figuras, os cristais obtidos pertencem apenas a 16 das XIs deste projeto. Para as demais que foram purificadas e testadas, os cristais até o momento não apareceram, ou necessitam fazer triagem com *kits* diferentes dos utilizados até o momento, além de explorar pequenas variações das condições dos *kits* comerciais, o que dentro dessa área se conhece por “abrir condições”. Esses cristais foram submetidos aos experimentos de difração de raios-X em monocristal.

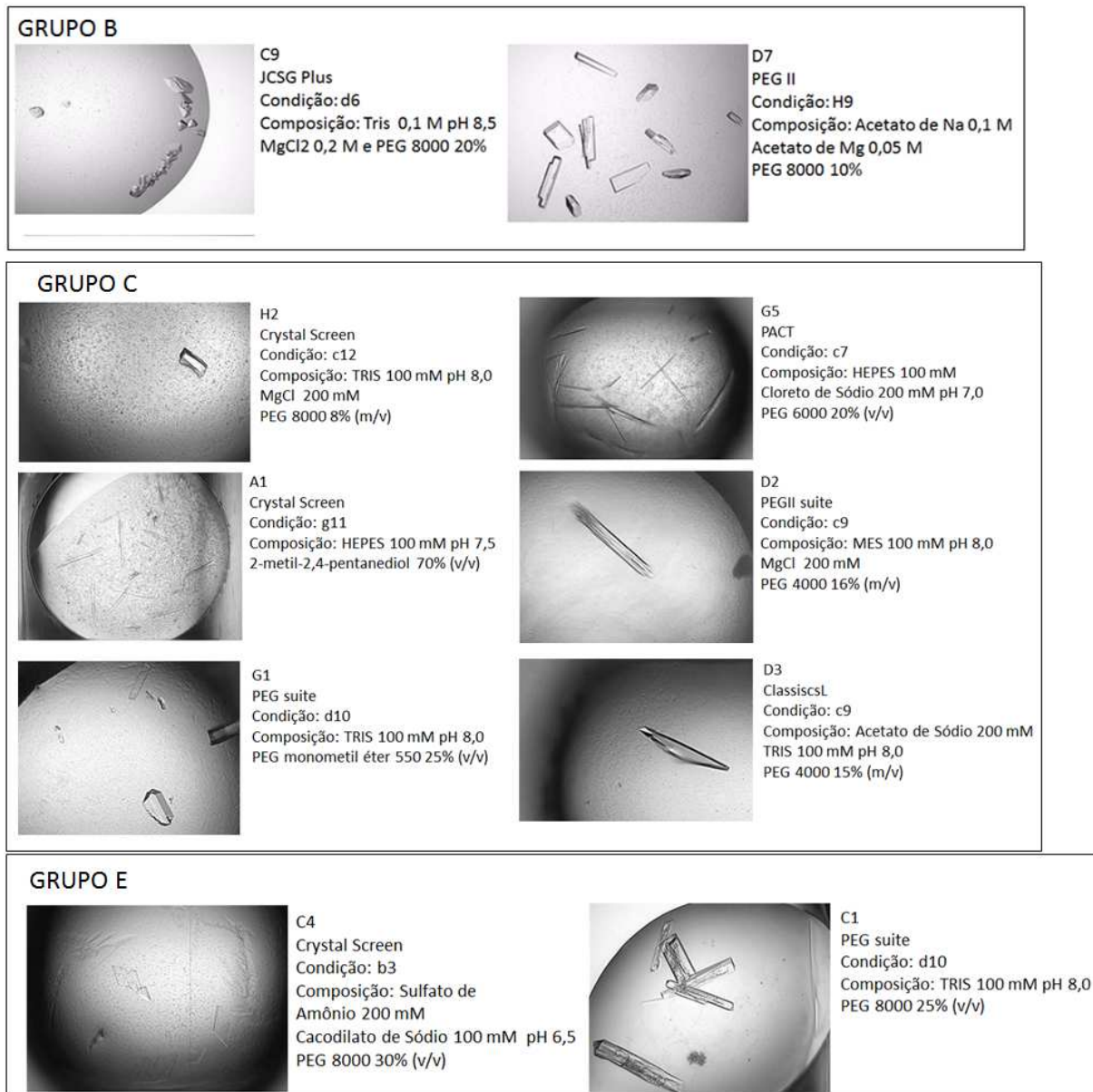


Figura 47 - Cristais obtidos dos testes de cristalização das XIs puras dos grupos B, C e E. Esses cristais foram obtidos pelo método de gota sentada em robô Honeybee.

Fonte: Elaborada pelo autor

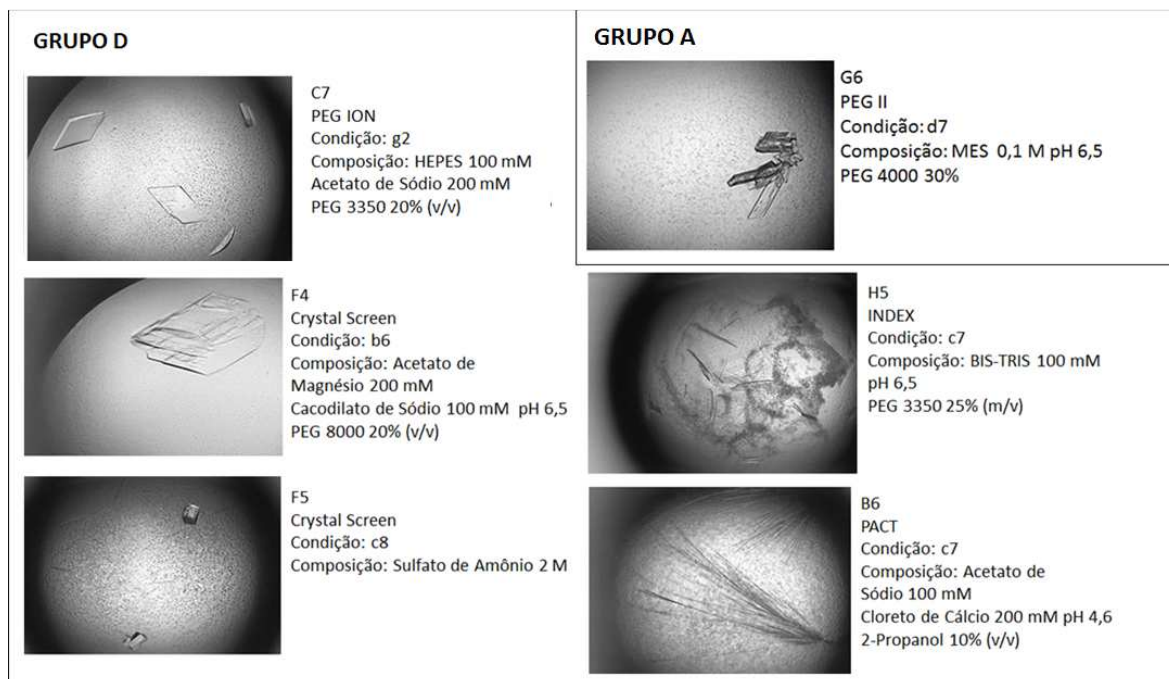


Figura 48 - Cristais obtidos dos testes de cristalização das XIs puras dos grupos D e A.

Fonte: Elaborada pelo autor

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

Os conjuntos de dados foram coletados na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). As Figuras 49 e 50 trazem para cada conjunto que foi coletado, uma imagem do padrão de difração. Os conjuntos não apresentaram anéis de gelo que prejudicassem um processamento inicial mais simples, e as reflexões são características da difração por uma rede cristalina de proteína – reflexões próximas e geralmente em formato de meia lua. Uma boa coleta de dados compreende o registro de imagens com reflexões (pontos) bem intensas e únicas, ou seja, deve-se evitar redes múltiplas e polimorfismos. Dependendo da qualidade do conjunto de dados, a resolução da estrutura é possível ou não. No caso de C9, H2, C7 e F4, seus padrões de difração não foram capazes até o momento de gerar um modelo único satisfatório através da substituição molecular. C7 e F4 geraram muitas soluções parciais apesar de sua rede e seus pontos estarem bem definidos; H2 apresentou mais de uma rede na sua difração; C9 apresentou pontos definidos, porém eles desapareciam abruptamente mesmo em baixa resolução, então a substituição molecular ocorreu, porém, a densidade eletrônica ficou precária.

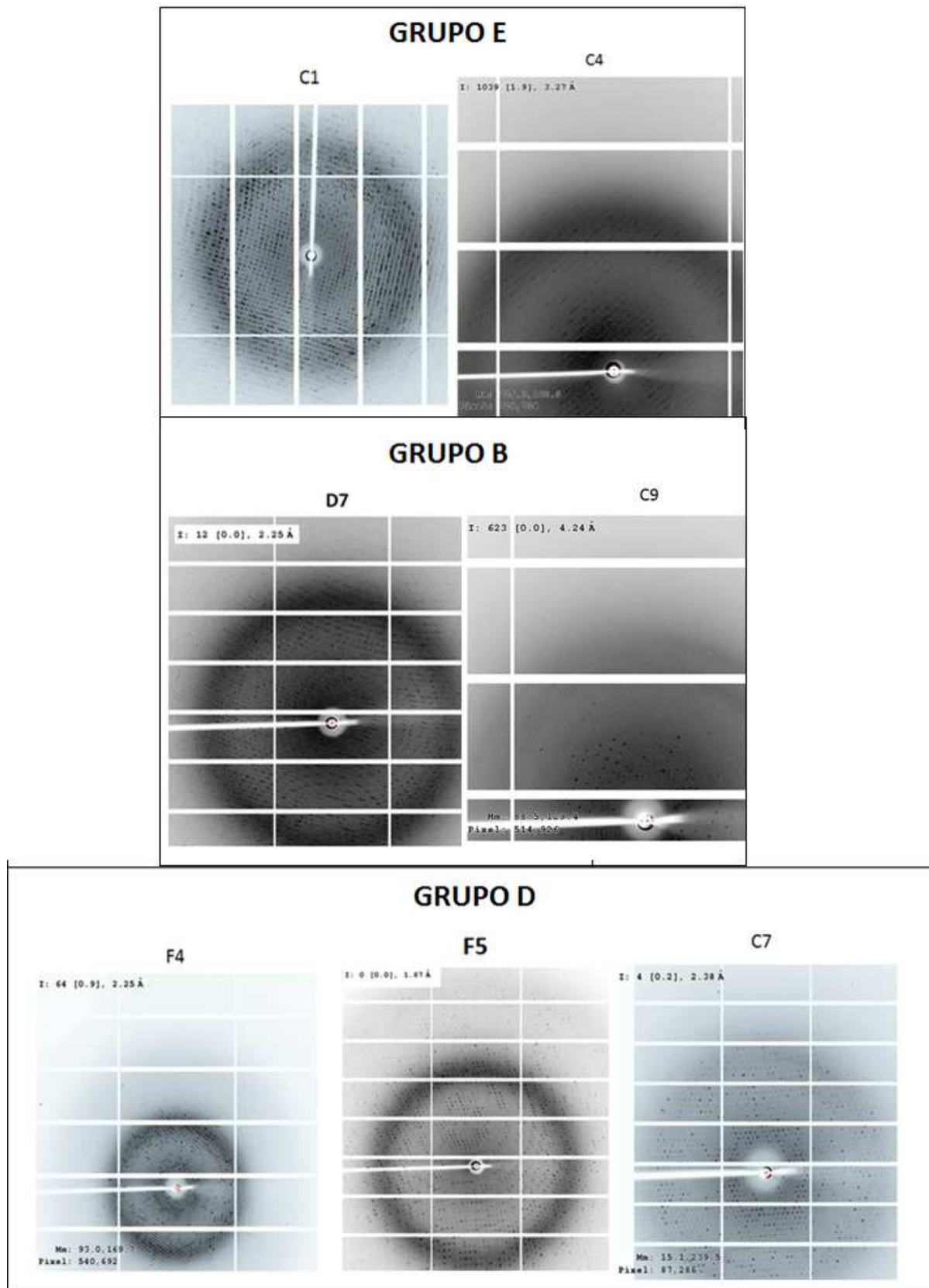


Figura 49 - Padrão de difração dos conjuntos de dados de algumas das XIs pertencentes aos grupos B, D e E. As imagens foram obtidas no programa ADXV.

Fonte: Elaborada pelo autor

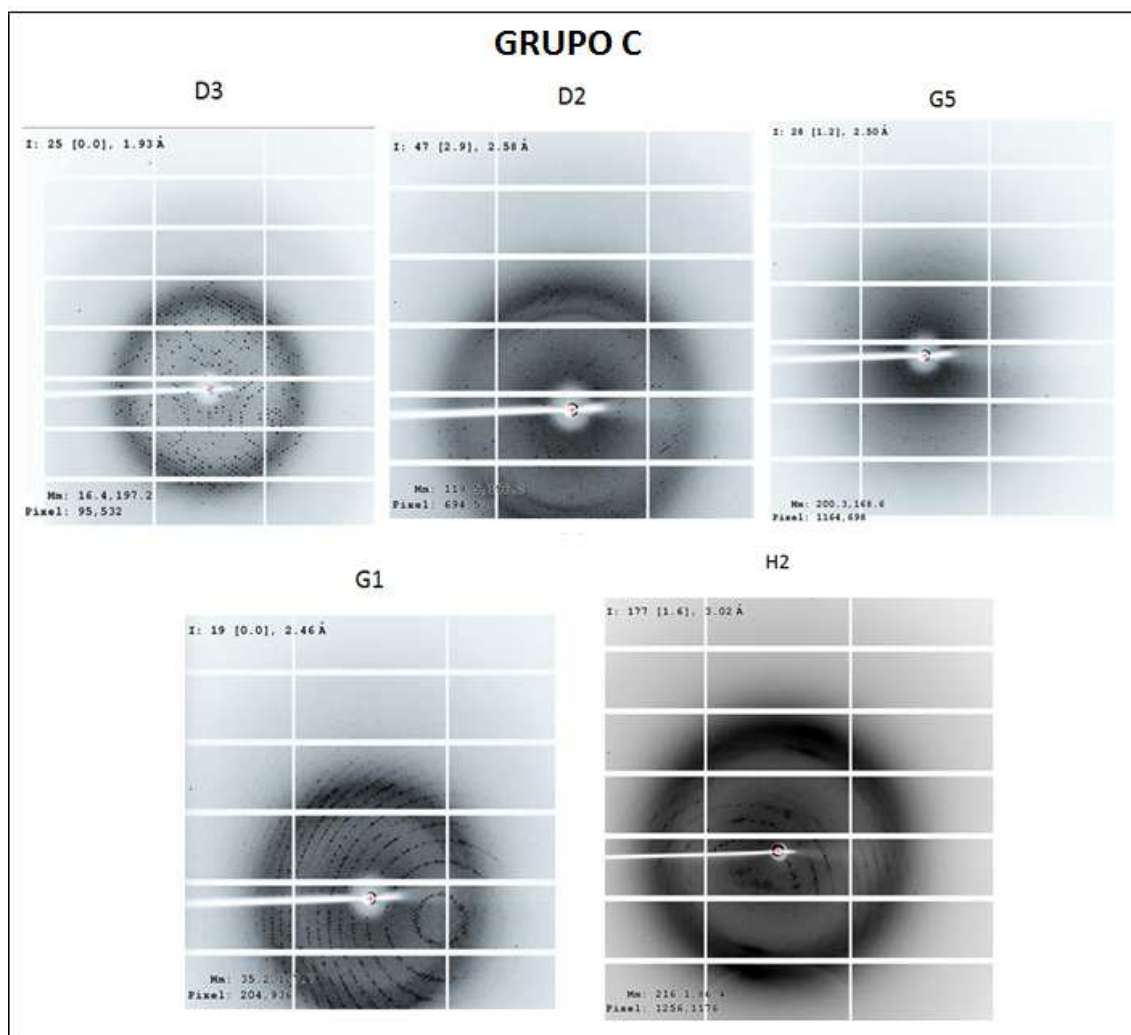


Figura 50 - Padrão de difração dos conjuntos de dados de algumas das XIs pertencentes ao grupo C. As imagens foram obtidas no programa ADXV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros de coleta encontram-se na Tabela 3. Deve-se lembrar que todos os cristais foram testados e apenas alguns tiveram seu conjunto de dados coletados. Desses, os melhores tiveram sua estrutura resolvida. Para os cristais que ainda não tiveram o experimento de difração de raios-X bem-sucedido, tentar-se-á reproduzi-los de forma otimizada (cristais mais bem formados) a partir da “abertura” de condições de cristalização encontradas na triagem inicial.

Tabela 3 - Parâmetros e estatísticas das coleta e processamentos dos conjuntos de dados cristalográficos das proteínas H2, C4, C9, C1, G5, D3, D2, C7, F4 e G1.

Parâmetros	F5	D7	G5	D3	D2	G1	C4	C1
Grupo espacial	I222	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4	C121	P1	P1 2 ₁ 1	P2 ₁ 22	P2 2 ₁ 2
Moléculas na unidade assimétrica	1	4	1	4	8	16	4	2
Parâmetros da célula unitária								
a (Å)	79,21	96,22	91,90	145,24	85,65 91,22	84,48 220,89	83,98	79,51
b (Å)	112,01	141,43	91,90	77,35	135,61	213,58	111,51	83,15
c (Å)	131,87	195,06	116,36	162,68	$\alpha = 72,23$ $\beta = 82,07$ $\gamma = 65,68$	$\beta = 95,57$	185,00	136,13
Ângulos (°)				$\beta = 110,01$				
Intervalo de resolução (Å)	46,17–1,90	49,20 – 2,39	30,63 – 2,45	46,73 – 2,10	49,40 – 2,39	30,26 – 2,45	47,6 – 3,0	45,38 – 2,2
Intervalo de maior resolução (Å)	(1,94 – 1,90)	(2,43 – 2,39)	(2,45 – 2,41)	(2,14 – 2,10)	(2,39 – 2,35)	(2,49 – 2,45)	(3,1 – 3,0)	(2,29 – 2,2)
Número de imagens	720	720	360	1200	1200	1800	360	720
$\Delta\phi$ (°)	0,5	0,5	1,00	0,30	0,30	0,20	1	0,5
Mosaicidade	0,32	0,15	0,25	0,28	0,31	0,37	0,49	0,61
Número de reflexões únicas	46483 (2971)	97690 (4571)	35566 (4027)	97781 (4674)	33089 (4771)	284381 (14157)	36161 (4332)	46284 (3865)
Multiplicidade	9,1 (8,5)	7,8 (4,6)	12,2 (10,9)	3,7 (2,5)	2 (1,8)	6,5 (6,5)	12,7 (12,2)	11,1 (8,4)
Completeza (%)	99,9 (99,8)	99,2 (95,1)	99,5 (93,9)	98,8 (95,8)	94,0 (72,8)	99,8 (99,7)	100 (100)	99,7 (97,2)
R_{meas}^ε	0,227 (1,149)	0,378 (1,7)	0,307 (1,747)	0,102 (0,479)	0,317 (1,248)	0,235 (0,732)	0,682 (2,491)	0,216 (0,996)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13,7 (3)	10,5 (1,8)	10 (1,6)	7,5 (1,7)	4,3 (1,5)	5,6 (1,6)	5,7 (1,5)	9,1 (1,9)

$$^{\epsilon} R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1}} \sum_{j=1}^n |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$$

Fonte: Elaborada pelo autor

Os parâmetros destacados na tabela anterior estão descritos na parte de Materiais e Métodos. Da tabela, vale comentar que apesar de a multiplicidade de D2 estar relativamente baixa em comparação aos outros conjuntos e devido ao seu grupo espacial, o seu modelo final possui uma qualidade alta.

4.7.3 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

O modelo empregado para resolução da estrutura foi o de substituição molecular isomórfica, fazendo uso de estruturas já resolvidas de proteínas homólogas depositadas no banco de dados *PDB*: 1A0E (xilose isomerase de *Thermotoga neapolitana*) para as G1 (51% de identidade sequencial), D2 (53% de identidade sequencial), D3 (46% de identidade sequencial), G5 (52% de identidade sequencial) e C4 (50% de identidade sequencial); 1A0C (xilose isomerase de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*) para C1 (51% de identidade sequencial) e F5 (62% de identidade sequencial); e 1DID (xylose isomerase de *Arthrobacter sp*) para D7 (69% de identidade sequencial). Havia ainda mais 2 conjuntos de dados coletados (para C7 e F4), porém a substituição molecular deles não resultou em uma solução única. Uma das possíveis razões é que, apesar de a resolução atingida ser satisfatória, a multiplicidade geral está muito baixa (1,3 e 1,4, respectivamente), e a substituição molecular convergiu para várias soluções parciais cujas densidades eletrônicas não eram satisfatórias. Os conjuntos de dados dessas duas XIs devem ser recoletados a partir de outros cristais, para enfim resolver a estrutura com bons parâmetros estatísticos. C9, apesar de a multiplicidade geral ser boa (14), a substituição molecular resultou em solução única com densidade eletrônica muito precária, provavelmente pela combinação de uma resolução não tão alta (3,4 Å) com outros fatores relacionados a estabilidade do cristal no feixe, qualidade da rede cristalina, etc. H2 apresentou um conjunto de dados de uma qualidade não muito boa, portanto sua substituição molecular não convergiu para uma solução única.

Através do programa *AutoBuild*,⁸⁸ algumas das soluções obtidas no programa *Phaser*⁸⁶ foram submetidas à construção parcial da estrutura, a partir da sequência de aminoácidos e do mapa de densidade eletrônica da XI em questão. Após esse procedimento, as estruturas passaram por ciclos de refinamento (5 delas foram refinadas, e outras 3 estão em processo de refinamento), um processo iterativo que envolve modificação da estrutura baseado na visualização do mapa de densidade eletrônica, no programa *Coot*,⁸⁹ e refinamento no programa *Phenix.refine*.⁸⁷

O monitoramento da concordância do modelo com os dados experimentais foi conduzido através da análise da variação do R_{factor} , juntamente com o R_{free} . Essas estatísticas do refinamento de 5 delas e a validação no programa *MolProbity*¹¹⁸ encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 4 - Parâmetros de refinamento e validação das estruturas cristalográficas de G5, D7, C1, F5 e D2, obtidos no programa *Phenix*⁸⁷ e *MolProby*¹¹⁸

Refinamento	G5	D7	C1	F5	D2
Intervalo de resolução	30,63 – 2,45	49,2 – 2,43	45,38 – 2,2	46,17 – 1,9	49,4 – 2,39
R_{factor} (%)	17,94	17,54	25,42	15,69	24,38
R_{free} (%)	22,81	21,20	30,40	18,76	31,04
<i>Ramachandran favored</i> (%)	99	99	97	99	98
<i>Clashscore</i>	3,23	3,1	13,4	3,24	10
B-fator médio (\AA^2)	13,6	30	34,8	15,2	16,4
R.M.S.D do ideal					
Comprimento ligações (\AA)	0,004	0,003	0,008	0,007	0,009
Ângulos ($^{\circ}$)	0,80	0,65	1,19	0,97	1,34

Fonte: Elaborada pelo autor

Para verificação do enovelamento geral, sem muitos detalhes, a figura 51 contém os monômeros resolvidos durante este projeto, para as 8 XIs.

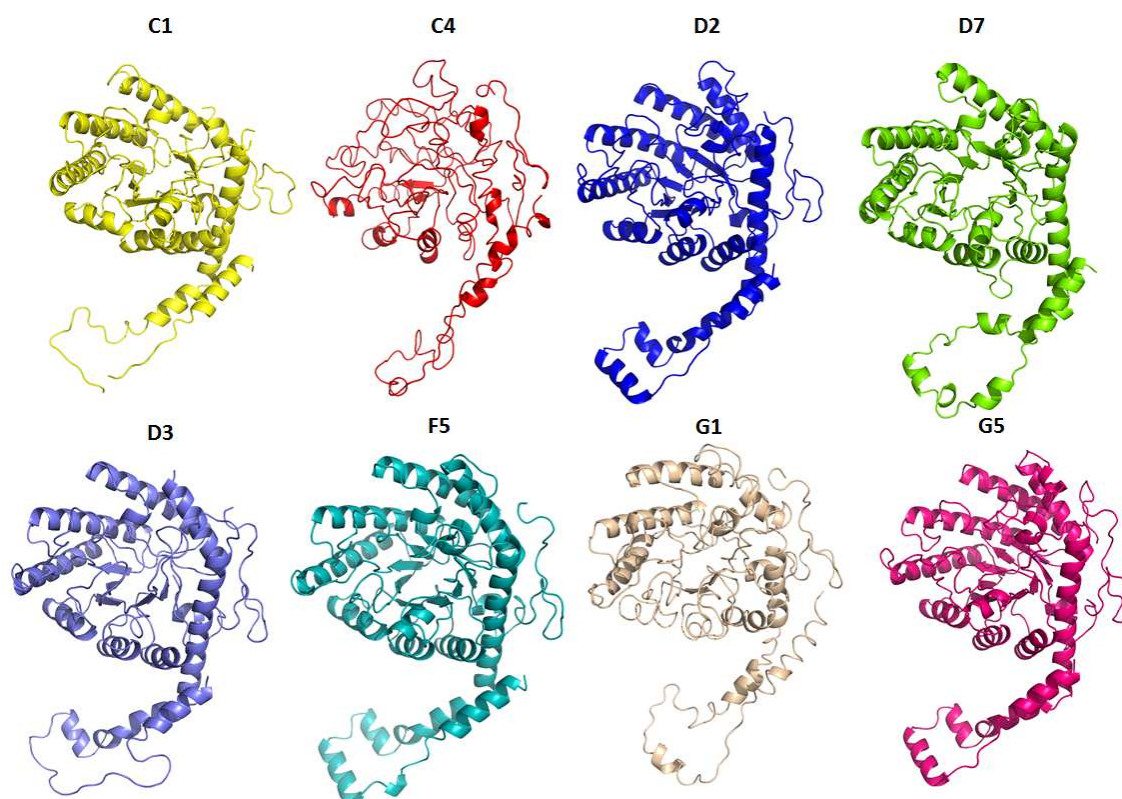


Figura 51- Estruturas resolvidas das XIs C1, C4, D2, D7, D3, F5, G1 e G5. As estruturas estão refinadas, com exceção da C4, G1 e D3, que apenas tiveram um refinamento inicial. As imagens foram obtidas no programa Pymol

Fonte: Elaborada pelo autor.

O enovelamento característico de todas as XIs é claramente conservado. O interessante é que mesmo D7 sendo uma XI de classe I, vê-se que a ausência natural de resíduos da extremidade N-terminal que existe nas XIs dessa classe a princípio não resulta comprometimento em seu *folding* usual.

Observando a figura anterior, pode-se claramente notar que as 8 estruturas apresentam o enovelamento característico dos monômeros das XIs, ou seja, um domínio N-terminal constituído de um barril alfa-beta e um domínio C-terminal formado por uma longa alça de hélices e voltas. Algumas diferenças podem ser observadas mais facilmente quando as superfícies desses monômeros são examinadas visualmente com mais detalhes, como mostrado na Figura 52.

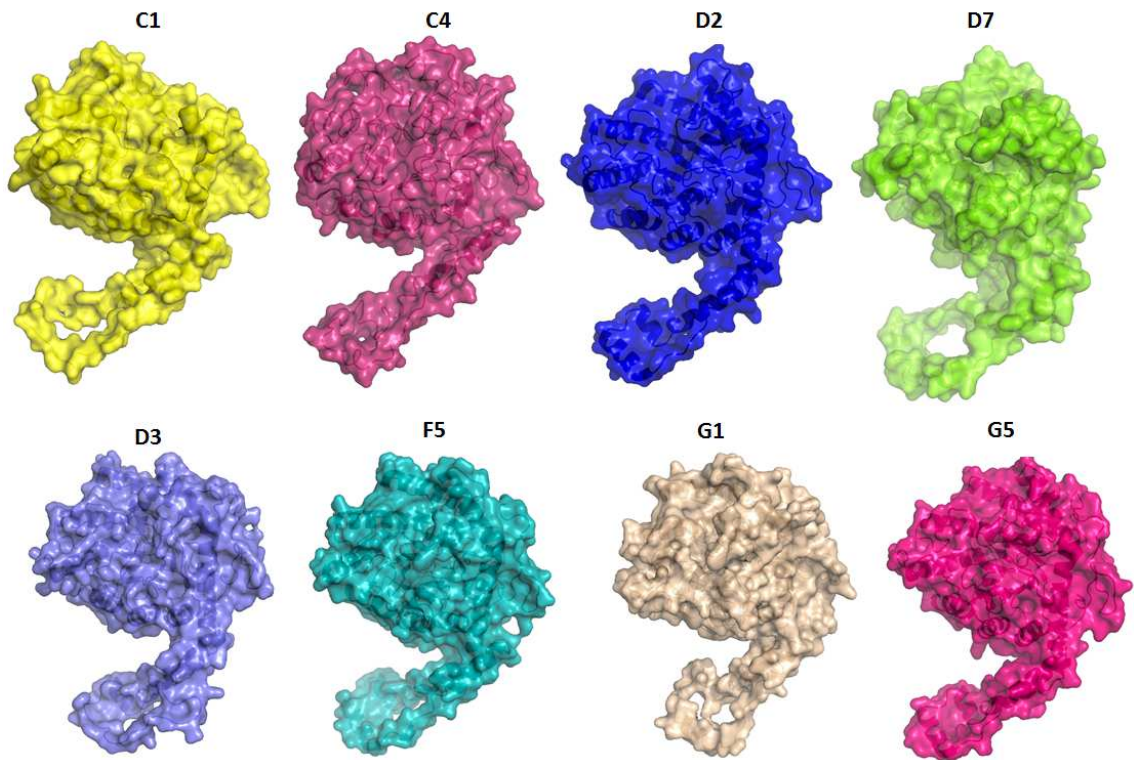


Figura 52 - Superfícies dos monômeros das XIs resolvidas por difração de raios-X em monocristal. A diferença mais evidente pode ser vista no domínio C-terminal das moléculas

Fonte: Elaborada pelo autor

A diferença mais evidente desses monômeros reside no domínio C-terminal, onde a abertura ou o laço que a alça forma, que tem seu tamanho e alargamento variados.

4.7.4 Oligomerização

O monômero das XIs possui, como já foi dito, um enovelamento característico, e ele não apresenta atividade enzimática, mesmo apresentando os resíduos catalíticos e os metais cofatores necessários para a atividade. O que se sabe até hoje é que apenas o dímero e o tetrâmero apresentaram atividade enzimática.

4.7.4.1 Tetrâmero

O tetrâmero da XI se forma a partir da “dimerização de dois dímeros”. O processo pelo qual é formado o tetrâmero pode ser descrito por simples operações de simetria de um monômero, gerando um homotetrâmero com forma globular de aproximadamente 92 Å de raio médio na rede cristalina, medida realizada no programa *Pymol* (DeLano Scientific LLC). Para todas as XIs resolvidas, o processo é o mesmo, então para generalizar, na figura 53 encontra-se a superfície tetramérica apenas da D7, rotacionada por eixos imaginários verticais e horizontais. Na figura, este tetrâmero está formado por quatro cadeias, A, B, C e D, nas cores, laranja, verde, azul e magenta, respectivamente.

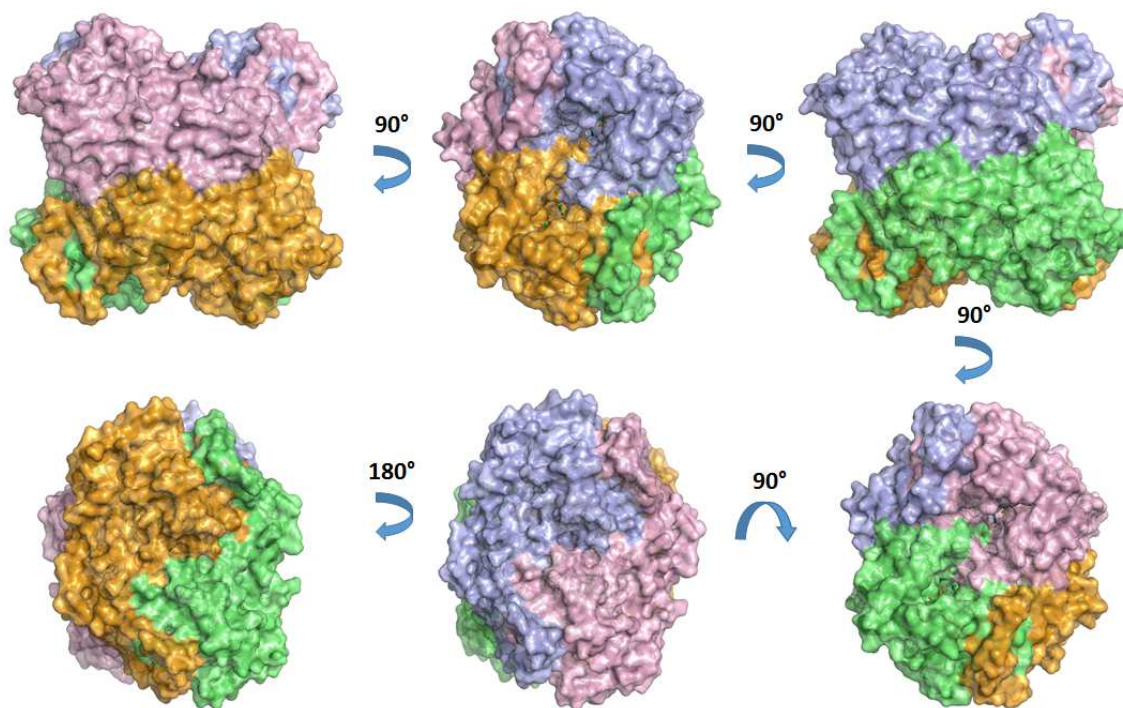


Figura 53 - Superfície do tetrâmero da XI D7 (*Jonesia denitrificans*) rotacionado verticalmente e horizontalmente. As quatro cadeias monoméricas são representadas por A (laranja), B (verde), C (azul) e D (magenta).

Termodinamicamente, a forma globular que apresenta esta enzima em solução reflete a característica química dos resíduos de cada monômero, ainda considerando sua disposição no espaço. Cada monômero possui seu sítio ativo, com os resíduos de coordenação de metal e resíduos catalíticos dispostos na mesma região, bem próximos. Isso então nos leva a pensar que de fato o bolsão catalítico da XI apenas se forma com a junção de dois monômeros (e de forma completa quatro monômeros), como mostrado na figura anterior. Na Figura 54, podemos verificar a disposição dos monômeros para formar o tetrâmero final. Mas é interessante pensar que a formação do tetrâmero não acontece com a junção dos quatro monômeros ao mesmo tempo, e sim, ocorre a formação dos dímeros e esses se juntam para a formação do tetrâmero final. A tentativa de descobrir qual dos dímeros possíveis seria um dímero com atividade enzimática pode ser mais difícil do que se parece, pois envolve muitas variáveis.

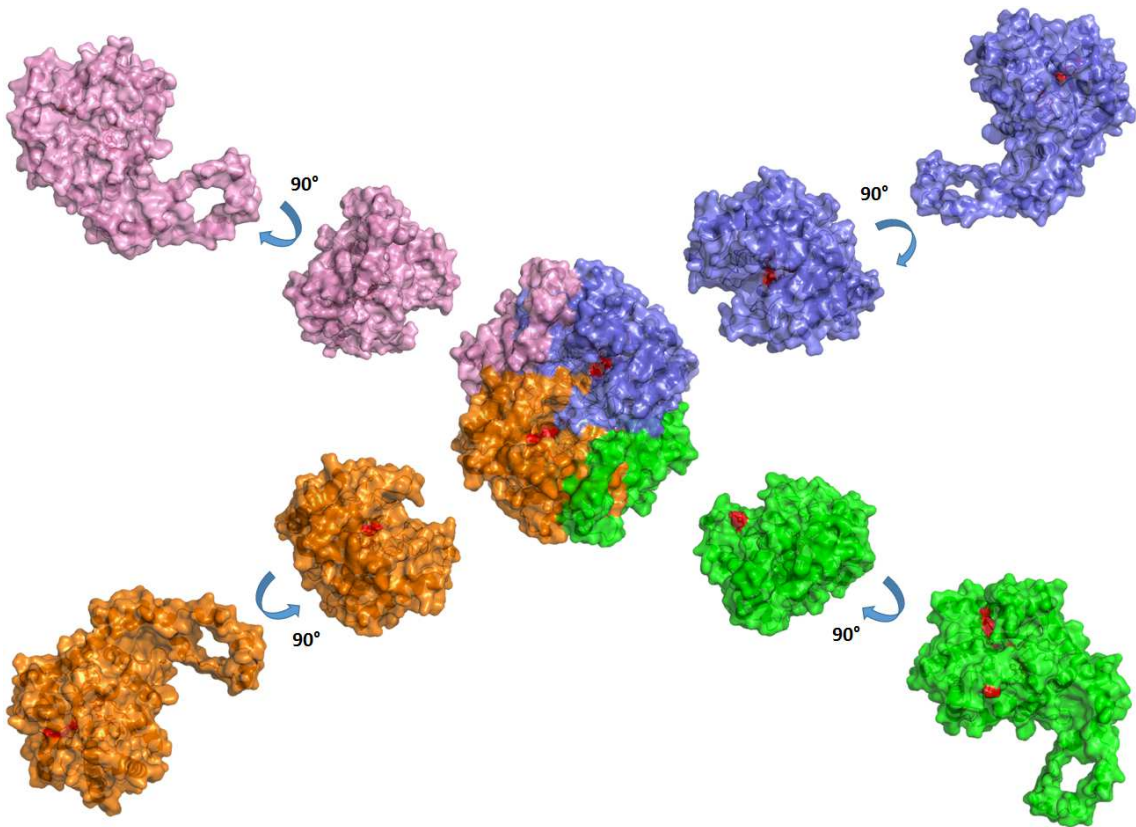


Figura 54 - Disposição dos monômeros de XI na formação do tetrâmero ABCD. A sendo laranja, B verde, C azul e D magenta. Neste caso, está sendo mostrado o tetrâmero da D7

Fonte: Elaborada pelo autor

4.7.4.2 Dímero biológico

A partir da resolução de estruturas cristalográficas de XIs, podemos sempre obter, tanto por operações de simetria quanto por investigação da unidade assimétrica, uma combinação de dois monômeros formando um dímero. A questão é que, pensando dessa forma, obtemos 3 dímeros mais prováveis e diferentes entre si, como mostrado na figura a seguir. Esses dímeros estão dispostos da forma que se encontram no tetrâmero, combinados dois a dois, e são conhecidos por nomes que vêm de figuras do cotidiano. Considerando o tetrâmero ABCD da Figura 54, os dímeros mais prováveis de serem o dímero biológico das XIs estão exibidos na figura abaixo.

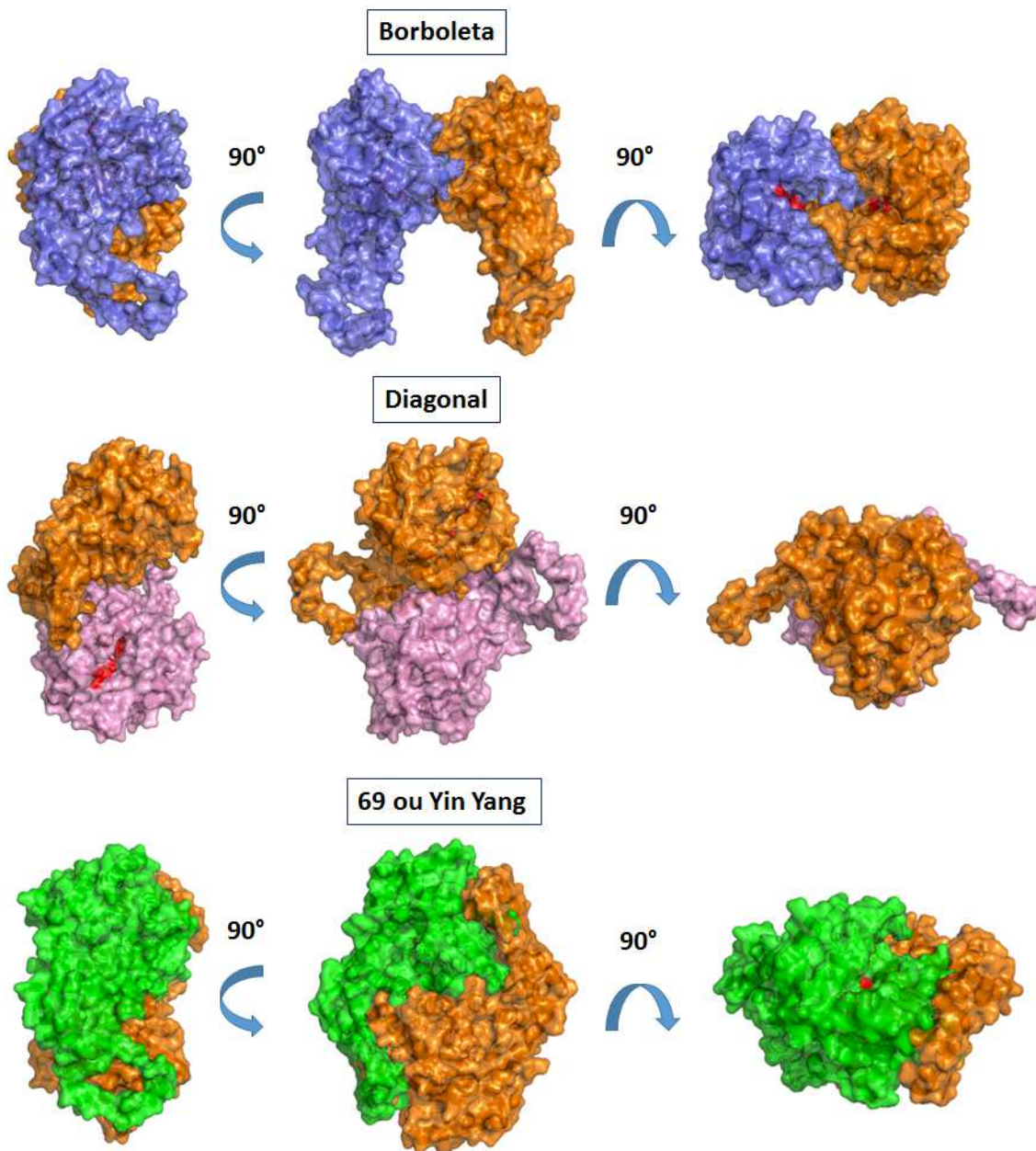


Figura 55 - Dímeros mais prováveis para XIs. Neste caso, a D7 está sendo mostrada na figura. Esses dímeros são mais conhecidos e conseqüentemente nomeados pelas figuras que parecem. *Borboleta* é formado por A/C, *diagonal* é formado por A/D e *69* ou *Yin Yang* é formado por A/B. As pequenas regiões em vermelho mostradas correspondem às superfícies dos resíduos catalíticos. Os dímeros laterais são nada mais que os dímeros centrais rotacionados de 90°.

Fonte: Elaborada pelo autor

Por uma análise apenas combinatória, os três tipos de dímeros poderiam existir, mas o que se questiona é qual desses seria o dímero biológico (com atividade enzimática). Até o momento essa resposta não foi encontrada.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Entretanto, podemos relacionar aos diferentes dímeros características que nos permitam analisar qual seria esse dímero biológico. Tais características podem ser: área exposta ao solvente, interações intermoleculares

(hidrofóbicas ou polares), contatos de sítios catalíticos adjacentes, etc. Isto é, se formos considerar apenas a superfície de oligomerização (dimerização), ou seja, a quantidade de interações polares e de hidrogênio que estabilizaria um dímero, muito provavelmente as estruturas escolhidas seriam as formadas pelo par A/B (*69* ou *Yin Yang*). Entretanto, o par A/C (*borboleta*) é o único que permite contato dos dois sítios catalíticos dos monômeros (o que poderia influenciar ou não de alguma forma).

Na tabela 5 estão reunidos alguns desses resultados obtidos através do servidor PISA¹¹¹, uma ferramenta útil para análise de interfaces macromoleculares e predição de estrutura quaternária. Esses resultados pertencem a D7 (XI de classe I) e G5 (XI de classe II), mas que podem, de certa forma, representar o que acontece para as demais XIs de classe I e II.

Tabela 5 - Interações que ocorrem na interface entre dois monômeros na formação dos possíveis dímeros biológicos das XIs, neste caso, essas interações pertencem à D7 e à G5

Cadeias	Nº Resíduos na interface	Área de interface (Å ²)	Nº pontes salinas	Nº ligações de hidrogênio	Nº interações não covalentes
A e B de G5	79 e 79	4330 e 4330	8	40	491
A e B de D7	88 e 86	4692 e 4696	10	52	645
A e C de G5	26 e 26	1336 e 1336	4	18	169
A e C de D7	30 e 28	1716 e 1706	2	10	123
A e D de G5	37 e 37	1862 e 1862	8	30	239
A e D de D7	32 e 32	1811 e 1803	6	20	170

Fonte: Elaborada pelo autor

Para de fato saber qual dos dímeros é o que apresenta atividade enzimática, ou mesmo se os três apresentem, deve-se quantificar a energia que é liberada ou absorvida quando se formam ou se rompem essas interações todas, partindo de um estado em que há apenas um tipo de dímero em solução e depois há apenas monômeros. A dificuldade reside, porém, em subtrair a energia liberada na agregação dos monômeros instáveis.

Partindo de uma abordagem diferente que desconsidera as interações que há entre dois monômeros na formação do dímero, e considerando agora o surgimento do tetrâmero, vê-se que a formação deste é facilitada quando se partem de dois dímeros *69* ou *Yin Yang*. Isso fica evidente pois envolve apenas a justaposição de dois dímeros quase planares, o que é intuitivamente mais fácil que juntar os outros dois, *borboleta* e *diagonal* (Figura 55). Além

disso, nota-se que na formação dímero 69, existe a ancoragem do *loop* C-terminal de um monômero A e uma das hélices do barril do monômero B. Esse acoplamento estabiliza mecanicamente a região C-terminal, uma região que apresenta naturalmente uma mobilidade maior comparada ao resto da enzima. O interessante é que no início desse domínio C-terminal, existe um resíduo de Asp essencial na coordenação de M1 (e também na catálise); portanto, supõe-se, que ao se apresentar sob a forma apenas monomérica, com cauda C-terminal não fixa, esse resíduo Asp de que estamos falando ficará também sujeito aos movimentos da cauda C-terminal, gerando um monômero de atividade catalítica comprometida. Já quando ocorre a estabilização da estrutura com a formação do dímero mais provável (69 ou *Yin Yang*, que possui mais interações favoráveis), a ausência de movimento de C-terminal permite que se forme a geometria correta de coordenação de M1, gerando um dímero ativo. Na formação do tetrâmero, os dois dímeros mantêm a sua configuração, gerando da mesma maneira, um tetrâmero ativo.

As outras duas configurações diméricas (a *diagonal* e a *borboleta*) provavelmente não possuiriam atividade catalítica, já que a cauda C-terminal não é fixa para ambas (menos fixa para *borboleta* que para *diagonal*).

4.7.4.3 *Sítio catalítico*

O sítio ativo das XIs é bem conservado dentre as diferentes enzimas, e seu estudo envolveu, durante anos, modificações de resíduos encontrados localizados dentro desse sítio e em seus arredores. Alguns estudos também mostraram evidências da presença de dois resíduos essenciais: histidina e carboxilato.^{48, 78, 112} Apesar da importância comercial da XI na isomerização de glicose em frutose, estudos sobre o mecanismo de ação dessa enzima não foram muitos, porém alguns já são bem conclusivos acerca do mecanismo conhecido por *hydride shift* (deslocamento do hidreto).^{39,95,113-115} Os cátions de íons metálicos variam de enzima para enzima, mas ambos ainda são necessários para a catálise. Entretanto, para diferenciá-los, chamamos M1 de cátion estrutural e M2 de catalítico. O cátion estrutural é chamado assim devido sua ligação com a manutenção da estabilidade térmica da enzima; já o cátion catalítico ganha essa denominação pois ele é o que fica mais próximo de C-1 e C-2 durante a catálise, e não tem sua geometria de coordenação alterada durante o processo.

Durante a catálise, é comum então que a geometria de coordenação desses metais no sítio ativo se altere – no caso, para diversas XIs, o que se espera (e o que se observa) é a alteração da geometria de coordenação do metal em M1 e a manutenção em M2.

Abaixo, na tabela 6, encontram-se dados das estruturas resolvidas de 5 XIs que já foram refinadas. Nelas pode-se observar à direita detalhes no sítio ativo, como interações de resíduos com os cátions de íons metálicos, além de uma molécula ligante (em C1, apenas). Na figura 56, são apresentadas imagens da região de entrada ao bolsão catalítico da enzima, uma visão externa da superfície do monômero das XIs. Para essas diferentes estruturas, o volume das cavidades onde situam-se os resíduos catalíticos foi calculado no servidor CASTp,¹¹⁶ e encontra-se na tabela abaixo.

Tabela 6 - Volume da cavidade de entrada para o sítio ativo das XI, de apenas um monômero, com raio de procura configurado para 2 Å. Essa cavidade abriga o bolsão catalítico, representado pelos resíduos catalíticos e os de coordenação de metal de cada XI.

XI	Área (Å ²)	Volume (Å ³)
C1	894,0	1864,4
D2	599,4	1232,2
D7	865,8	1537,0
F5	583,1	1314,4
G5	564,9	1185,3

Fonte: Elaborada pelo autor

A princípio, esses volumes apenas traduzem quantitativamente o acesso do meio externo da enzima ao seu bolsão catalítico. Para interpretações mais completas, é interessante obter estruturas com inibidor ou outros ligantes análogos ao substrato da enzima, pois desta forma, as modificações que ocorrem após ocupação do sítio ativo podem refletir um comportamento estratégico da própria enzima, como alosteria e/ou cooperatividade.

4.7.4.3.1 C1 – Xilose isomerase de *Escherichia fergusonii*

O sítio catalítico de C1 (Figura 56) apresentou 2 átomos de magnésio e uma molécula de etilenoglicol (EDO).

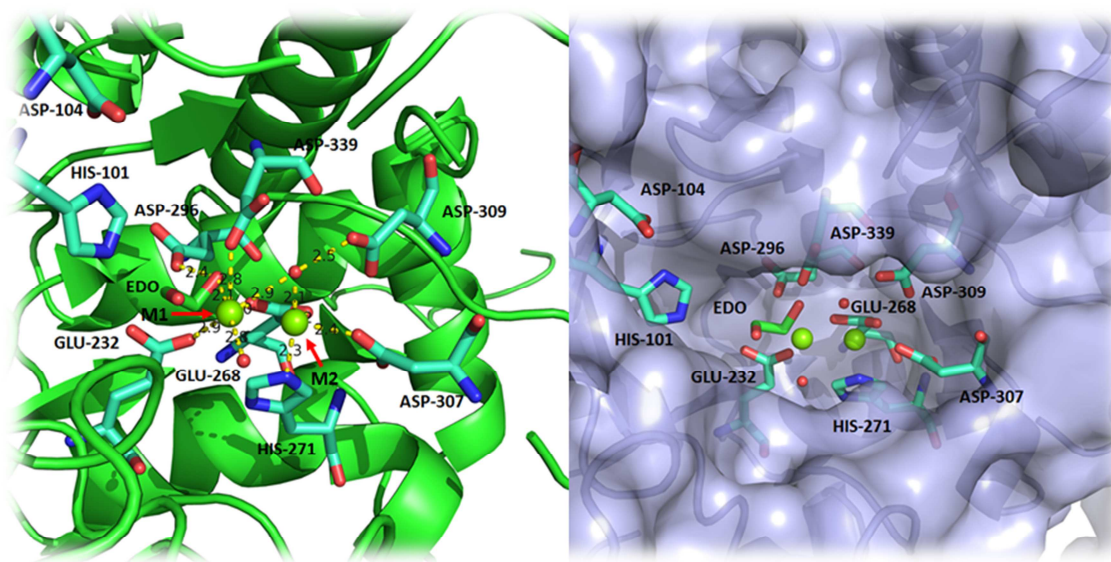


Figura 56 - Sítio ativo da C1 (xilose isomerase de *Escherichia fergusonii*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, os dois resíduos catalíticos Asp-104 e His-101, uma molécula de etilenoglicol e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). M1 possui uma geometria de coordenação octaédrica e M2, tetraédrica. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dois átomos de magnésio são denominados M1 e M2, para diferenciá-los. No uniprot, por conservação da estrutura primária, M1 deve fazer 4 coordenações com resíduos Glu-232, Glu-268, Asp-296 e Asp-339 (geometria tetraédrica na ausência do substrato¹¹⁷), porém com a presença de EDO, M1 ganha duas coordenações com essa molécula e outra com uma molécula de água, porém perde a coordenação com Asp-296, resultando em uma geometria octaédrica (assim como se a molécula do substrato estivesse ligada ao sítio¹¹⁷). Já o segundo magnésio, pela mesma análise feita no Uniprot, apresenta uma substituição de uma coordenação com Asp-309 por uma com uma molécula de água (a distância entre M2 e Asp-309 em C1 é de aproximadamente 4 Å), mantendo a geometria tetraédrica de coordenação. Em relação ao volume do bolsão catalítico, pode-se verificar visualmente que o acesso à cavidade é mais exposto comparado às outras XIs mostradas nesta seção (quantitativamente representado na Tabela 6).

4.7.4.3.2 D2 – Xilose isomerase de *Saccharophagus degradans*

O sítio catalítico de D2 (Figura 57) também apresenta dois átomos de magnésio, coordenados pelos resíduos presentes no bolsão catalítico.

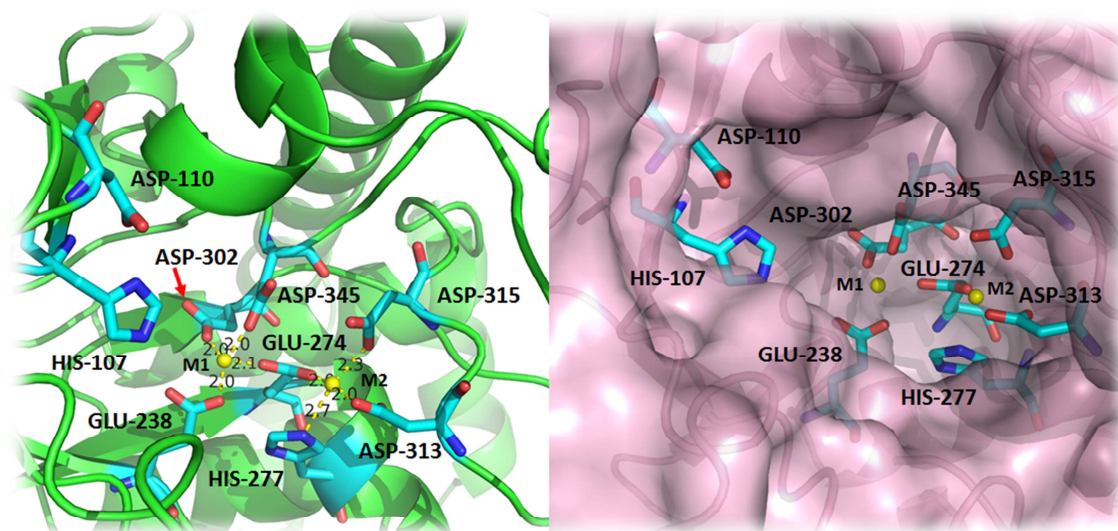


Figura 57 - Sítio ativo da D2 (xilose isomerase de *Saccharophagus degradans*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp 110 e His 107 e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Ambos os magnésios têm uma geometria de coordenação tetraédrica com resíduos do bolsão catalítico. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A geometria de coordenação do magnésio estrutural (M1) é tetraédrica, representada por interações de hidrogênio com resíduos Asp-345, Asp-302, Glu-274 e Glu-278. A mesma geometria de coordenação pode ser encontrada para o magnésio catalítico (M2), que apresenta interações com os resíduos Asp-315, Asp-313, Glu-274 e His-277. Nessas estruturas não havia moléculas de águas estruturais nessa região, fazendo interações os dois átomos de metais, o que é bastante comum nessas enzimas.²⁰

4.7.4.3.3 D7 – Xilose isomerase de *Jonesia denitrificans*

A XI de *Jonesia denitrificans* (Figura 58) apresentou dois átomos de magnésio em seu bolsão catalítico. Pela alta conservação de resíduos catalíticos e resíduos de coordenação de metal nessas enzimas, no Uniprot, quando se pesquisa pelo gene que codifica para D7, aparecem previamente alguns dos resíduos que possivelmente farão coordenação com metal dentro do sítio ativo.

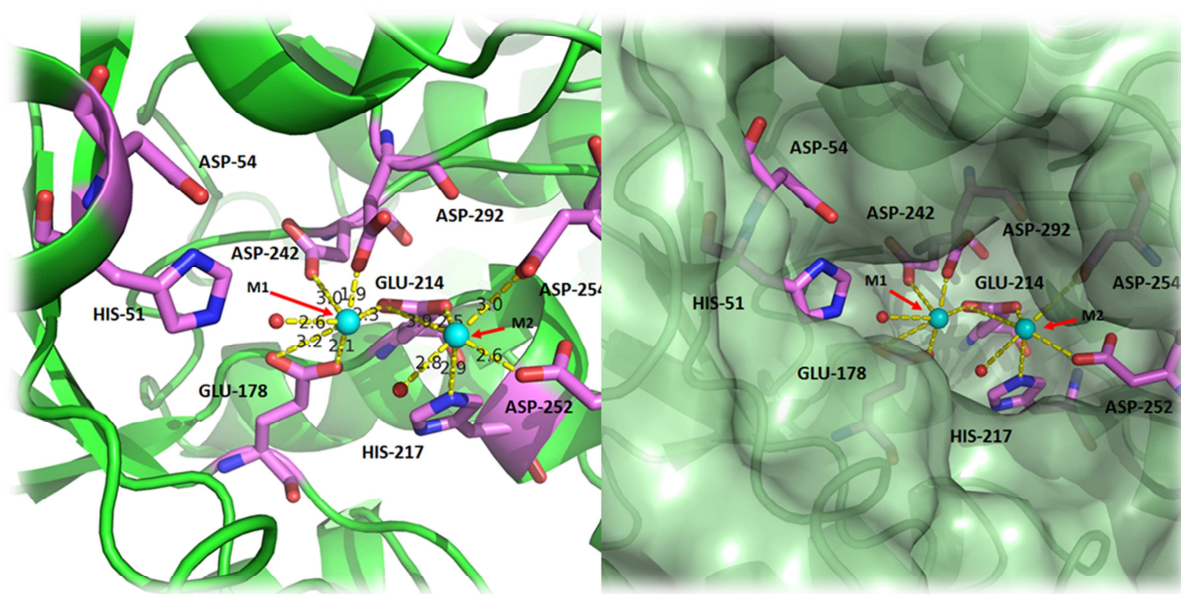


Figura 58 - Sítio ativo da D7 (xilose isomerase de *Jonesia denitrificans*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp 54 e His 51 e 2 átomos de magnésio. Os átomos de magnésio tanto em M1 quanto em M2 apresentam coordenação octaédrica, devido às interações de hidrogênio cada um com mais seis átomos mais próximos. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da enzima. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dois resíduos que ainda não estavam assinados para a coordenação, Asp-252 e Asp-254, nessa estrutura, estão interagindo com o metal em M2. As duas geometrias de coordenação são octaédricas, incluindo interação de hidrogênio com uma molécula de água cada um dos metais. A D7 foi a XI que apresentou maior atividade absoluta, porém, até o momento, não é possível fazer uma ligação estreita entre o que vemos aqui em seu sítio catalítico (e não vemos no sítio de outra XI com atividade relativamente menor) e seus valor de atividade enzimática.

4.7.4.3.4 F5 – Xilose isomerase de *Ruminococcus champanellensis*

F5, assim como D7, possui atividade catalítica bem alta (atividade ótima de 5 U/mg). Entretanto, uma diferença nesse perfil de atividade reside no comportamento dessas enzimas frente a variação de pHs. Para F5, existe um pH ótimo bem definido (pH 6,0), já D7 a atividade catalítica se mantém aproximadamente em 5 U/mg a partir de pH 6 (até pH 10, limite superior do experimento). Porém a princípio, a única diferença marcante que podemos apontar entre as duas estruturas é que no bolsão catalítico de D7 existem apenas duas moléculas de água estruturais, já em F5, são 5 moléculas de água (Figura 60).

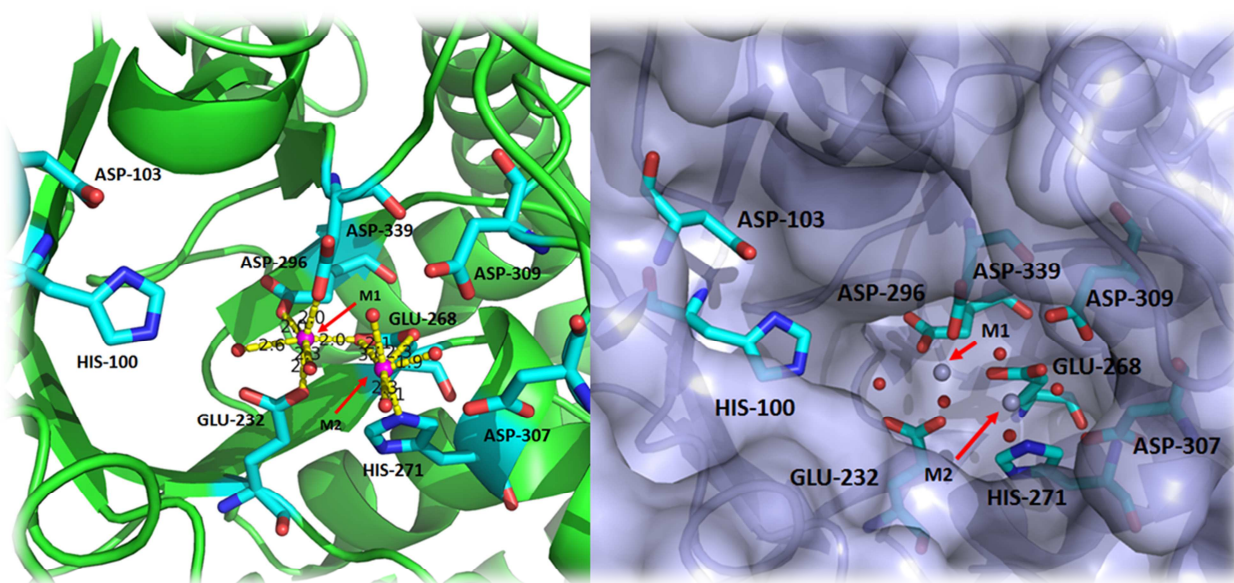


Figura 59 - Sítio ativo da F5 (xilose isomerase de *Ruminococcus champanellensis*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp-103 e His-100 e 2 átomos de magnésio (M1 e M2). A geometria molecular de coordenação de M1 é octaédrica, auxiliado por moléculas de água estruturais, e M2 apresenta também geometria octaédrica em sua coordenação, também auxiliada por moléculas de água. Lado direito - vista externa da região de entrada para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.4.3.5 G5 – Xilose isomerase de *Flavobacterium johnsoniae*

A estrutura da G5 representada na figura 60 mostra seu bolsão catalítico, cujos resíduos polares presentes fazem coordenação com dois cátions de íons metálicos. Além da coordenação que é feita principalmente através dos resíduos em destaque, moléculas de água a complementam, gerando duas geometrias octaédricas ao redor de M1 e M2.

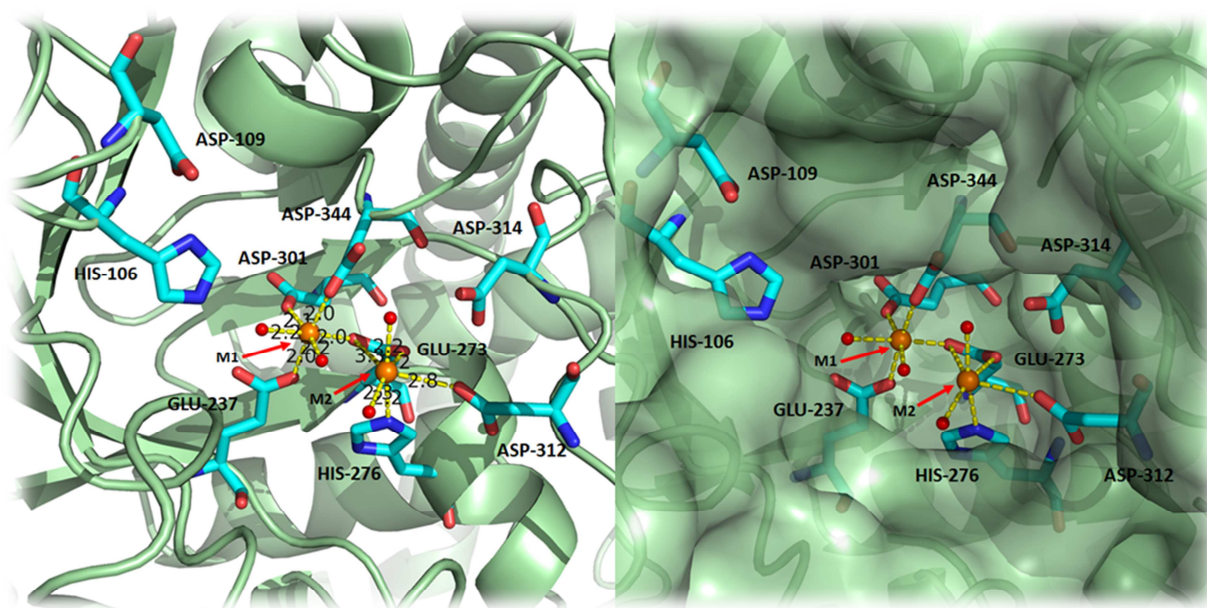


Figura 60 - Sítio ativo da G5 (xilose isomerase de *Flavobacterium johnsoniae*). Lado esquerdo - detalhes da região do sítio ativo, com destaque para os resíduos que fazem coordenação com metal, resíduos catalíticos Asp-109 e His-106 e dois átomos de cobalto. Neste caso, o cobalto em M1 possui uma geometria de coordenação octaédrica e o segundo, em M2, ele também possui geometria de coordenação octaédrica. Lado direito - vista externa da região de acesso para o sítio ativo da molécula. Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7.5 Modelagem por homologia

Das 25 XIs que foram produzidas neste projeto, para apenas 8 delas obtivemos um bom conjunto de dados de difração de raios-X que permitiu a resolução da estrutura (com 5 delas refinadas). Ou seja, 17 XIs não apresentam estruturas resolvidas ainda. Entretanto,

sabe-se que podem ser gerados modelos estruturais tridimensionais baseados no alinhamento sequencial dessas XIs com outras que já possuem estruturas resolvidas.

Esses modelos podem ser gerados remotamente por um serviço integrado *online*, chamado *Swiss-Model workspace* (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>, último acesso em outubro de 2016).¹¹⁸⁻¹²⁰

Esses modelos podem ser validados comparando previsões realizadas de proteínas que já possuem estrutura resolvida (conjunto de treinamento). O *Swiss-Model workspace* possui um RMSD médio para modelos gerados de acordo com a identidade sequencial entre estes e as estruturas usadas como referência. Para identidades sequenciais acima de 40%, o RMSD médio das posições dos carbonos- α vai diminuindo a partir de 3,5 Å. Além disso, para essa faixa de identidade sequencial, o modelo apresenta no mínimo 60% de posições equivalentes dos átomos do conjunto treinamento.

As XIs F5, C1, D2, G5 e D7 fazem parte do conjunto de treinamento deste projeto, e a sobreposição dos modelos gerados no *Swiss-Model workspace* com suas respectivas estruturas resolvidas encontra-se na figura 61. A tabela 7 contém os valores de RMSD médio para deslocamento dos átomos para as 5 sobreposições geradas. As sobreposições foram realizadas no programa *Superpose*,¹²¹ um programa para alinhamento estrutural baseado em combinação de estrutura secundária. Basicamente, o programa superpõe duas ou mais estruturas de proteínas por uma combinação de gráficos gerados a partir de elementos de estrutura secundária, complementado iterativamente por alinhamento tridimensional da cadeia principal.

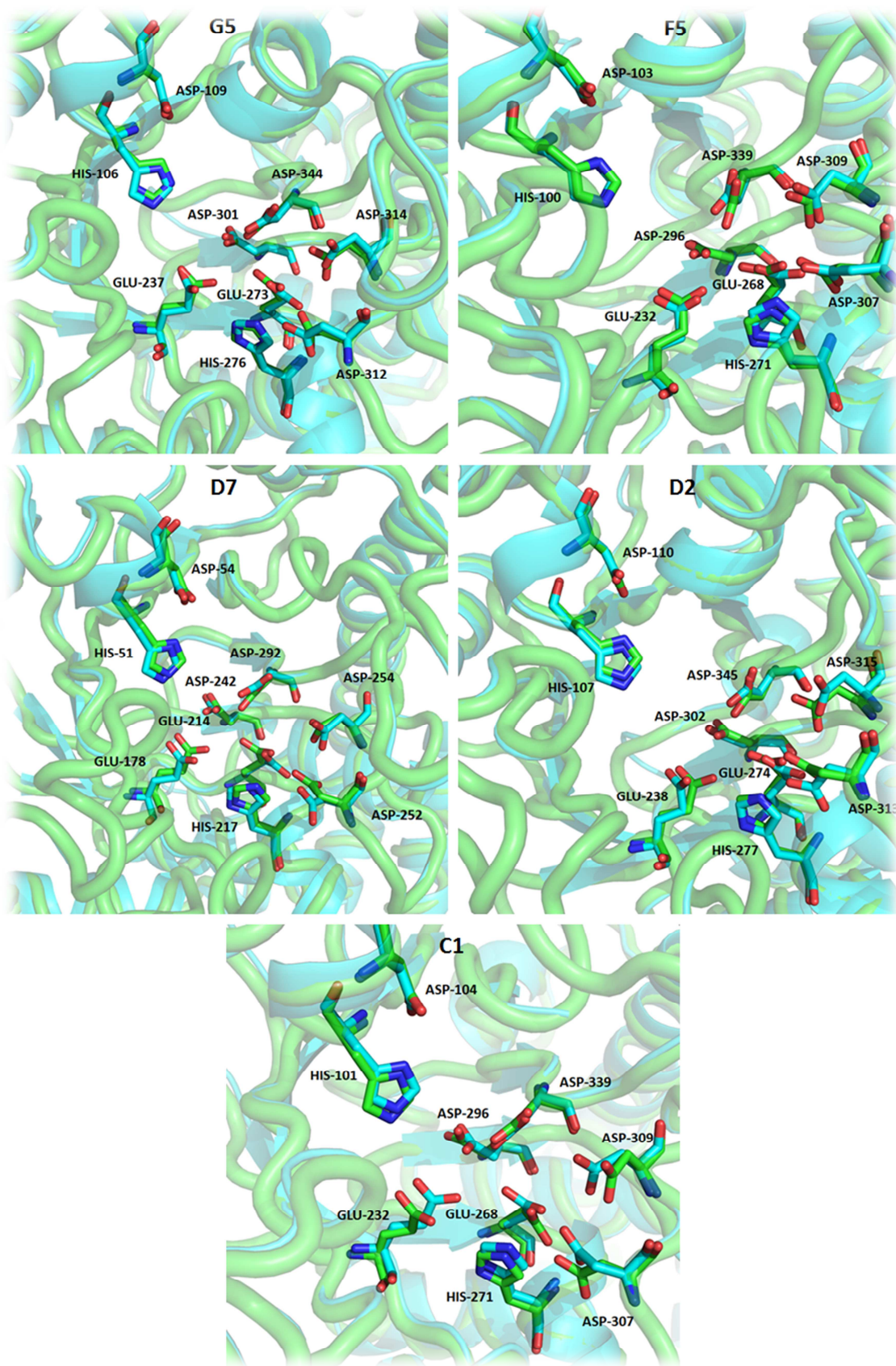


Figura 61 - Sobreposição das estruturas resolvidas (verde) de C1, D2, D7, F5 e G5 aos seus respectivos modelos gerados por homologia no servidor Swiss-Model (ciano). Imagens geradas no programa Pymol (DeLano Scientific LLC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As sobreposições entre as estruturas reais, obtidas por difração de raios-X em monocristal de proteína, e os modelos gerados por homologia no servidor Swiss-Model, geraram valores de RMSD médios para os desvios na posição dos átomos (em angstroms) das estruturas sobrepostas. Portanto, através dos resultados exibidos na tabela abaixo, podemos validar positivamente os modelos que foram gerados por homologia para as XIs deste projeto.

Tabela 7 - Desvio da raiz média quadrática (RMSD, do inglês, *root mean square deviation*) do deslocamento dos átomos das estruturas cristalográficas sobrepostas no espaço. Resultado obtido com o programa *Superpose*¹²¹

Estruturas sobrepostas	C1 e C1*	D2 e D2*	G5 e G5*	D7 e D7*	F5 e F5*
Átomos C alfa (Å)	0,84	0,72	0,7	0,77	0,98
Átomos cadeia principal (Å)	0,93	0,76	0,72	0,78	0,96
Todos os átomos (Å)	1,06	1,21	1,24	1,26	1,44

**Swissmodel*

Fonte: Elaborada pelo autor

As diferenças na posição dos resíduos catalíticos e de coordenação de metal exibidos na Figura 61, podem ser comprovadas, em média, pelos dados da Tabela 7. Para D2, G5 e D7, os modelos gerados por homologia foram bem fidedignos aos reais (por difração de raios-X), da mesma forma, porém com representação um pouco inferior, os modelos gerados para C1 e F5 também são adequados.

Fazendo uma comparação entre os 5 monômeros das XIs citadas, obtidos por difração de raios-X, podemos verificar que uma se sobrepõe a outra de forma adequada, mesmo D7 sendo uma XI da classe I e as demais de classe II. Na Figura 62, podemos apontar claramente que o resíduo Asp-5 é o que mais difere entre as 5 estruturas analisadas. Adicionalmente, podemos também dizer que D7 foi a XI que mais apresentou desvio em relação as outras 4, principalmente em Asp-4, Asp-5 e Glu-2. O resíduo Asp-252 em D7 é o equivalente ao Asp-5 da imagem; esse resíduo é o “protagonista” da segunda etapa da isomerização da D-xilose em D-xilulose no sítio ativo da XI (vide a seção Introdução e Figura 15 explicativa do mecanismo de reação das XIs). O fato de D7 ter apresentado o maior valor absoluto para a atividade enzimática específica pode ter alguma relação com a configuração espacial desse resíduo, entretanto, para uma análise mais adequada, deve-se comparar estruturas resolvidas dessa enzima na forma apo e na forma ligada (com inibidor análogo ao substrato no sítio ativo).

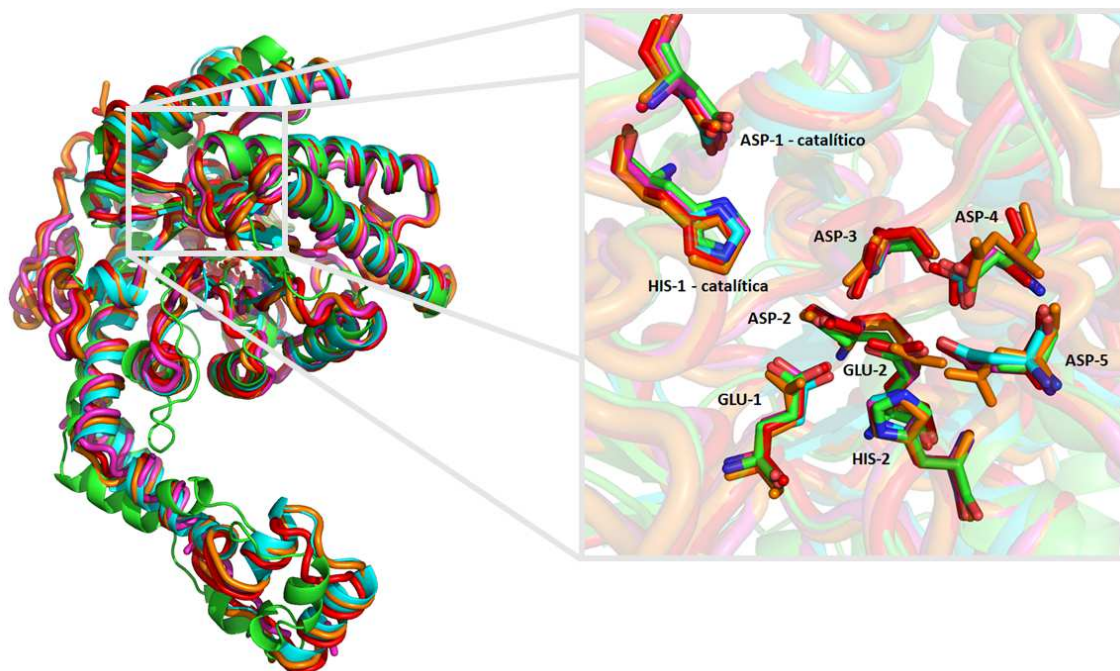


Figura 62 - À esquerda, encontram-se sobrepostas no programa Pymol (sobreposição previamente realizada no programa Superpose¹²¹) as 5 estruturas resolvidas (C1, D2, D7, F5 e G5). À direita, é destacada a região do sítio ativo das XIs, mostrando os dois resíduos catalíticos (His-1 e Asp-1) e os resíduos que comumente fazem a coordenação com cátion de íon metálico (Asp-2, Asp-3, Asp-4, Asp-5, His-2, Glu-1 e Glu-2). As 5 estruturas estão representadas em diferentes cores – verde (D7), ciano (D2), laranja (G5), vermelho (F5) e rosa (C1). Imagens geradas no programa gráfico Pymol (DeLano Scientific).

Fonte: Elaborada pelo autor

Por fim, diversos experimentos servem para descrever o comportamento das diferentes XIs de forma isolada. Apesar de o número de XIs neste projeto ter sido razoavelmente grande (partindo de 96 sequências gênicas e obtendo 72 genes clonados, e a partir desses, 25 proteínas produzidas de forma solúvel), a cartilha de experimentos deve ser completa. Ou seja, para as 24 XIs, experimentos que foram realizados para D7 e G5 (duas com maior número de resultados) devem ser realizados para todas, na medida do possível, através dos quais, poderemos gerar conhecimento mais embasado acerca das XIs. O comportamento catalítico das XIs é um resultado combinado de diversas variáveis, que envolvem não somente apresentar ou não os resíduos assinados como catalíticos, e sim, dispor das interações convenientes de átomos tanto na interface de dimerização quanto nas proximidades do solvente; além disso, alguns outros resíduos “coadjuvantes” desempenham um bom papel na ativação dos que estão ligados diretamente à catálise.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos iniciais deste projeto consistiram na busca extensiva de xilose isomerases sem estrutura de alta resolução publicada. Foram 96 alvos selecionados, de diferentes microrganismos fonte. Dos 96 iniciais, 72 foram clonados com sucesso através da técnica LIC em *high throughput*. A produção heteróloga dessas enzimas de forma solúvel foi possível apenas para 24 delas; e através de alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dessas XIs bem-sucedidas, elas foram divididas em grupos, de A a F. Essa divisão nos permitiu estabelecer comparações mais claras entre essas enzimas, além de facilitar o entendimento de resultados de experimentos realizados. Por exemplo, no grupo A e B foram reunidas as XIs da classe I, e as demais foram alocadas grupos restantes, todas da classe II. E de maneira geral, as integrantes do grupo B foram as que apresentaram maior valor de atividade específica na média, acompanhadas de uma estabilidade térmica alta. Ou seja, se para muitas enzimas a flexibilidade de sua estrutura é fator útil para sua atividade enzimática, para essas XIs, a não susceptibilidade da estrutura terciária às variações/aumento de temperatura refletiram ser quesitos importantes para se ter uma atividade enzimática apreciável. Isso pode ser talvez explicado pensando no domínio C-terminal de seus monômeros, a cauda de hélices e voltas, cuja flexibilidade pode interferir negativamente na formação dos dímeros ativos e consequentemente tetrâmeros ativos. Na extremidade N-terminal desse domínio situam-se resíduos de ácido aspárticos cruciais na catálise enzimática, cujas posições no bolsão catalítico de certa forma podem sofrer desvios prejudiciais ao curso padrão da reação. Também neste conceito e à luz das discussões que aconteceram durante o desenvolvimento deste projeto, as dúvidas sobre qual seria o dímero biológico dessas enzimas e o porquê de a forma monomérica não apresentar atividade enzimática foram extintas.

Através da resolução de estruturas cristalográficas de algumas das XIs, vimos que a conservação tanto dos resíduos catalíticos quanto dos que participam da coordenação de metal, ela é acompanhada da conservação das posições espaciais desses resíduos no bolsão catalítico, preparando a geometria e a configuração de interações convenientes à ocorrência da reação. Reação esta cujo mecanismo envolve o deslocamento de hidreto mediado por metal. Os dois cátions de íons metálicos são necessários para atividade completa das XIs, um estruturalmente (ajudando a manter o substrato no sítio ativo) e o outro cataliticamente (interagindo e aumentando reatividade dos resíduos que de fato participam da reação de isomerização). Para as XIs que não tiveram suas estruturas de alta resolução obtidas, uma

ferramenta útil para contornar essa deficiência pôde ser utilizada – a modelagem por homologia. Mas para validar essa possibilidade com as XIs, foram sobrepostas as estruturas cristalográficas refinadas obtidas neste projeto, com destaque para os resíduos mais importantes no bolsão catalítico, e os modelos gerados por homologia. As sobreposições foram bem-sucedidas, já que as posições dos resíduos de ambas corroboraram. Ou seja, para futuras análises, as quais dependeriam apenas da inspeção de estruturas de alta resolução que não foram obtidas, os modelos gerados por homologia seriam bastante confiáveis e úteis.

A clareza no entendimento da relação estrutura-atividade dessas XIs possibilitará o desenvolvimento de engenharia de XIs com atividades otimizadas, para emprego no processo de aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal. Estudos como estes fazem parte da busca por maiores visibilidade e reconhecimento dos quais o etanol de segunda geração precisa para ser competitivo e promissor na realidade brasileira num futuro próximo.

Aa condução do projeto permitiu tirar conclusões gerais e específicas importantes acerca das XIs e abriu portas para mais possibilidades de estudo, além das que ficaram remanescentes (não concluídas) a partir dos objetivos iniciais. Podemos dizer que objetivos não concluídos podem ser entendidos, a bons olhos, como primeiras perspectivas futuras de um projeto, já que muitas outras surgem durante o seu desenvolvimento. Para clareza de entendimento, algumas são listadas abaixo:

1. Os experimentos que foram realizados apenas para algumas XIs deveriam ser realizados para todas as 24;
2. Realizar testes completos de inibição por Ca^{2+} , xilitol e etanol, buscando enzimas com propriedades compatíveis às exigências impostas pelo processo industrial brasileiro;
3. Conduzir engenharia de XIs gerando mutantes com propriedades bioquímicas otimizadas;
4. Imobilizar XIs otimizadas e analisar suas características enzimáticas e bioquímicas nessas condições;
5. Produzir hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana usando pré-tratamento ácido e/ou hidrotérmico;
6. Realizar fermentação de hidrolisado hemicelulósico usando isomerização com XIs e leveduras comerciais e industriais na presença ou não de mosto de cana em escala laboratorial;

7. Avaliar dependência da eficiência de fermentação com parâmetros de pré-tratamento; concentração de XIs; composição de meio de fermentação e quantidade de leveduras aplicadas e possibilidade de reutilização das XIs junto com leveduras.
8. Por fim, finalizar manuscritos iniciados, iniciar a escrita de outros e publicá-los em revistas científicas

REFERÊNCIAS

- 1 PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000.
- 2 MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196 – 1201, May 2011.
- 3 REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, Nov. 2011.
- 4 MARSHALL, R. O.; KOOI, E. R. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. **Science**, v. 125, n. 3249, p. 648-9, Apr. 1957.
- 5 CHIN, J. W.; CIRINO, P. C. Improved NADPH supply for xylitol production by engineered *Escherichia coli* with glycolytic mutations. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 333-41, 2011 Mar-Apr. 2011.
- 6 SAPUNOVA, L. I. et al. Biosynthetic features and properties of xylose isomerases from *Arthrobacter nicotianae*, *Escherichia coli*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 42, n. 3, p. 279-84, 2006 May-June 2006.
- 7 CHAPLIN, M. **Arabinoxylan**. 2002. Disponível em <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/arabinoxylan.html>>. Acesso em: 12/12/20016.
- 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 THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K.; KUMAR, R. G. Review: raw natural fiber-based polymer composites. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 19, n. 3, p. 256-271, Feb. 2014.
- 10 BÖRJESSON, M.; WESTMAN, G. Crystalline nanocellulose — preparation, modification, and properties. In: POLETTO, M.; ORNAGHI JR, H. L. (Ed.). **Cellulose - fundamental aspects and current trends**. [s.l.]: InTech, 2015.
- 11 YOSHIDA, H. et al. The structures of L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* in complexes with L-rhamnose and D-allose provide insights into broad substrate specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 365, n. 5, p. 1505-16, Feb. 2007.
- 12 BUCKERIDGE, M. S. Parede celular. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.165-181.

- 13 MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A. M. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 2939-54, Apr. 2015.
- 14 IPEA. **Energia no Brasil e no Mundo: parte 1**. 2008. Disponível em <www.ipea.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2016.
- 15 BANDEIRA, D. D. O. et al. **Resenha energética brasileira: ano base 2015**. 2016. Disponível em <<http://www.mme.gov.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2016.
- 16 MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, n. 41, p. 237-294, Mar. 2015.
- 17 AZIAKOU, J. et al. **Second-generation ethanol production in Brazil: a historic opportunity**. Pennsylvania: University of Pennsylvania, 2016. p.37-40
- 18 PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.
- 19 SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico. In: _____ **Naippe**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012. v.2, p. 1-25.
- 20 KATZ, A. K. et al. Locating active-site hydrogen atoms in D-xylose isomerase: time-of-flight neutron diffraction. **Proceedings of National Academy of Science of United State of America**, v. 103, n. 22, p. 8342-8347, May 2006.
- 21 MEILLEUR, F. et al. An overview of the science: a quasi-Laue neutron crystallographic study of D-xylose isomerase. **European Biophysics Journal**, v. 35, n. 7, p. 601-609, Sept. 2006.
- 22 ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, Dec. 2004.
- 23 DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, Feb. 2009.
- 24 CHEN, W. P. Glucose isomerase. **Process Biochemistry**. v. 15, p. 30-35. 1980
- 25 HICKMAN, J.; ASHWELL, G. Purification and properties of D-xylose isomerase in liver. **Journal Biological Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 737-48, June 1958.
- 26 HARHANGI, H. R. et al. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Archives Microbiology**, v. 180, n. 2, p. 134-41, Aug. 2003.
- 27 HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 108, p. 147-177, 2007.

- 28 _____. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, Apr. 2007.
- 29 BRUINENBERG, P. M. et al. NADH- linked aldose reductase : the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, n.4, p.256-260,1984.
- 30 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 Environmental Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 660-664, Oct. 1986.
- 31 RIZZI, M. et al. Xylose fermentation by yeasts. 4. purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 148-154, 1988.
- 32 WANG, V. W.; JEFFRIES, T. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting *Candida shehatae*. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 197-206, Nov. 1990
- 33 DENG, X. X.; HO, N. W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. scientific note. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 24-25, p. 193-199, March 1990.
- 34 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. 155-160, May 1998.
- 35 JEFFRIES, T. W.; SHI, N. Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 65, p. 117-61, 1999. doi: 10.1007/3-540-49194-5_6.
- 36 BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 280-300, June 1996.
- 37 SRIPRAPUNDH, D.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozyms by site-directed mutagenesis. **Protein Engineering**, v. 13, n. 4, p. 259-265, Apr. 2000.
- 38 CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295-331, 1998.
- 39 ASBÓTH, B.; NÁRAY-SZABÓ, G. Mechanism of action of D-xylose isomerase. **Currently Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 3, p. 237-54, Nov. 2000.
- 40 WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Chichester, United Kingdom: Ellis Horwood Ltd, 1975.
- 41 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.

- 42 GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Evidence for specific interaction of guanidine hydrochloride with carboxy groups of enzymes/proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, n. 3, p. 979-984, June 1993.
- 43 RANGARAJAN, M.; ASBOTH, B.; HARTLEY, B. S. Stability of *Arthrobacter* D-xylose isomerase to denaturants and heat. **Biochemical Journal**, v. 285, Pt. 3, p. 889-898, Aug. 1992.
- 44 BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, Apr. 2009.
- 45 CHAUTHAIWALE, J.; RAO, M. Production and purification of extracellular d-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic bacillus sp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4495-4499, Dec. 1994.
- 46 EPTING, K. L. et al. Influence of divalent cations on the structural thermostability and thermal inactivation kinetics of class II xylose isomerases. **FEBS Journal**, v. 272, n. 6, p. 1454-64, Mar. 2005.
- 47 SCHOMBURG, I. et al. BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Database issue, p. D431-3, Jan. 2004.
- 48 GHATGE, M. S.; PHADTARE, S. U.; GAIKWAD, S. M. Unfolding and refolding of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces* sp. NCIM 2730. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 323-327, 1994.
- 49 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. 211-235, Mar. 1990.
- 50 _____. 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.
- 51 COLLYER, C. A.; BLOW, D. M. Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 87, n. 4, p. 1362-6, Feb. 1990.
- 52 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. 153-173, 1991.
- 53 HANSON, B. L. et al. A preliminary time-of-flight neutron diffraction study of *Streptomyces rubiginosus* D-xylose isomerase. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 60, n. Pt 2, p. 241-249, Feb. 2004.
- 54 KOVALEVSKY, A. Y. et al. 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.

- 55 _____. Hydrogen location in stages of an enzyme-catalyzed reaction: time-of-flight neutron structure of D-xylose isomerase with bound D-xylulose. **Biochemistry**, v. 47, n. 29, p. 7595-7597, July 2008.
- 56 ROSE, I. A.; O'CONNELL, E. L.; MORTLOCK, R. P. Stereochemical evidence for a cis-enediol intermediate in Mn-dependent aldose isomerases. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 178, n. 2, p. 376-379, Apr. 1969.
- 57 MAKKEE, M.; KIEBOOM, A. P. G.; VAN BEKKUM, H. Glucose-isomerase-catalyzed D-glucose-D-fructose interconversion. **Mechanism and Reactive Species**, v. 103, p. 361–364, 1984.
- 58 BLOW, D. M. et al. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. **Faraday Discussion**, n. 93, p. 67-73, 1992.
- 59 COLLYER, C. A. et al. Anomeric specificity of D-xylose isomerase. **Biochemistry**, v. 31, n. 48, p. 12211-12218, Dec. 1992.
- 60 MITSUHASHI, S.; LAMPEN, J. O. Conversion of D-xylose to D-xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 204, n. 2, p. 1011-1018, Oct. 1953.
- 61 MARSHALL, R. O.; KOOI, E. R. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. **Science**, v. 125, n. 3249, p. 648-649, Apr. 1957.
- 62 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, Jan. 2000.
- 63 SAVINI, V. et al. Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1551-1552, Apr. 2008.
- 64 FARMER, J. J. et al. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 77-81, Jan. 1985.
- 65 EKBORG, N. A. et al. *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, Pt. 4, p. 1545-1549, July 2005.
- 66 TAYLOR, L. E. et al. Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* strain 2-40T. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3849-3861, June 2006.
- 67 NORDBERG, H. et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D26-31, Jan. 2014.
- 68 CHASSARD, C. et al. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, Pt. 1, p. 138-143, Jan. 2012.

- 69 STANIER, R. Y. Studies on nonfruiting myxobacteria: i. cytophaga johnsonae, n.sp., a chitin-decomposing myxobacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 53, n. 3, p. 297-315, Mar. 1947.
- 70 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069-6074, Oct. 1990.
- 71 VINCENTELLI, R. et al. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 65-72, 2011.
- 72 KAPUST, R. B. et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 294, n. 5, p. 949-955, June 2002.
- 73 SAMBROOK, J.; D.W., R. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 74 TAO, H. et al. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. **Biotechniques**, v. 48, n. 1, p. 61-64, Jan. 2010.
- 75 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry**. New York: Freeman and Co, 1980.
- 76 JOO, G. J. et al. Purification and characterization of thermostable Xylose (Glucose) isomerase from *Streptomyces chibaensis*: **Agricultural Chemistry & Biotechnology**, v. 44, p. 113-118, 2001.
- 77 CALLENS, M. et al. 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.
- 78 _____. Metal ion binding to D-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 1, p. 285-290, Feb. 1988.
- 79 GAIKWAD, S. M.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. D-Glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*. differential roles of magnesium and cobalt ions: **Enzyme Microbiology Technology**, v.14, n,4,p. 317-320, 1992.
- 80 REIS, C. V. D. **Estudos biofísicos e estruturais de xilose isomerases para produção de etanol de segunda geração**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 81 DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. **Journal Biological Chemistry**, v. 192, n. 2, p. 583-587, Oct. 1951.
- 82 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-298, Oct. 2006.

- 83 DUCRUIX, A.; GIEGE, R. **Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992.
- 84 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-132, Feb. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124692> >.
- 85 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-763, Sept. 1994.
- 86 BELLISSIMI, E. et al. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 358-364, May 2009.
- 87 ZHANG, Q. et al. Crystal structures of *Streptococcus suis* mannonate dehydratase (ManD) and its complex with substrate: genetic and biochemical evidence for a catalytic mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 18, p. 5832-5837, Sept. 2009.
- 88 TERWILLIGER, T. C. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 64, Pt. 1, p. 61-69, Jan. 2008.
- 89 MADHAVAN, A. et al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, Apr. 2009.
- 90 DAVIS, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. w375-383, July 2007. doi: 10.1093/nar/gkm216.
- 91 CHENNA, R. et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3497-500, July 2003.
- 92 DEREPPER, A. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. w465-469, July 2008. doi: 10.1093/nar/gkn180.
- 93 ROZANOV, A. S.; ZAGREBEL'NYĬ, S. N.; BEKLEMISHCHEV, A. B. Cloning of *Escherichia coli* K12 xylose isomerase (glucose isomerase) and studying the enzymatic properties of its expression product. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 45, n. 1, p. 38-44, 2009 Jan-Feb 2009.
- 94 XU, W.; YAN, M.; OUYANG, P. Progress in the sequence and structure properties, thermostability mechanism and molecular modification of xylose isomerase: a review. **Chinese Journal of Technology**, v. 27, n. 12, p. 1690-1701, Dec. 2011.
- 95 TOTEVA, M. M. et al. Binding energy and catalysis by D-xylose isomerase: kinetic, product, and X-ray crystallographic analysis of enzyme-catalyzed isomerization of (R)-glyceraldehyde. **Biochemistry**, v. 50, n. 46, p. 10170-10181, Nov. 2011.

- 96 CHIN, J. W.; CIRINO, P. C. Improved NADPH supply for xylitol production by engineered *Escherichia coli* with glycolytic mutations. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 333-341, 2011 Mar-Apr. 2011.
- 97 HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**, v. 28, n. 9, p. 645-660, Sept. 2011.
- 98 GARCIA-VILOCA, M. et al. Sensitivity of molecular dynamics simulations to the choice of the X-ray structure used to model an enzymatic reaction. **Protein Science**, v. 13, n. 9, p. 2341-2354, Sept. 2004.
- 99 HAGEN, J. **Introduction in industrial catalysis: a practical approach**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2005.
- 100 EISENTHAL, R. A. D. M. J. A. H. D. W. Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator? **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 247-249, 2007.
- 101 PATEL, D. H. et al. Engineering of the catalytic site of xylose isomerase to enhance bioconversion of a non-preferential substrate. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 25, n. 7, p. 331-336, May 2012.
- 102 UMEMOTO, Y.; SHIBATA, T.; ARAKI, T. d-Xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain xy-214, and d-xylulose production from β -1,3-xylan. **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 10-20, 2012.
- 103 WALTMAN, M. J. et al. Engineering acidic *Streptomyces rubiginosus* D-xylose isomerase by rational enzyme design. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 27, n. 2, p. 59-64, 2014.
- 104 XU, W. et al. Engineering the activity of thermophilic xylose isomerase by site-directed mutation at subunit interfaces. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 2, p. 77-83, 2009.
- 105 STAUDIGL, P.; HALTRICH, D.; PETERBAUER, C. K. l-Arabinose Isomerase and d-Xylose Isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of d-galactose and d-glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1617-1624, 2014.
- 106 LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5708-5716, 2012.
- 107 LAJOIE, C. A. et al. Cloning, expression and characterization of xylose isomerase from the marine bacterium *Fulvamarina pelagi* in *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 5, p. 1230-1237, Sept. 2016.
- 108 HARTLEY, B. S. et al. Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. **Biochimical & Biophysical Acta**, v. 1543, n. 2, p. 294-335, Dec. 2000.

- 109 VIEILLEE, C. A. H. J. M. A. K. R. M. A. Z. J. G. xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1867-1875, 1995.
- 110 FATIMA, B. A. H. Z. Xylose isomerases from thermotogales. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 25, n. 1, p. 10-18, 2015.
- 111 KRISSINEL, E.; HENRICK, K.; BERTHOLD, M.; GLEN, R. C. Detection of protein assemblies in crystals. computational life sciences. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, COMPLIFE, 2005, Konstanz, Germany. **Proceedings...** Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. p.163-174. ISBN 978-3-540-31726-5.
- 112 GAIKWAD, S. M. et al. Evidence for the essential histidine residue at the active site of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 1, p. 270-277, Aug. 1988.
- 113 ASSARY, R. S.; CURTISS, L. A. Theoretical study of 1,2-hydride shift associated with the isomerization of glyceraldehyde to dihydroxy acetone by Lewis acid active site models. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 31, p. 8754-8760, Aug. 2011.
- 114 FENN, T. D.; RINGE, D.; PETSKO, 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.
- 115 ALLEN, K. N. et al. Isotopic exchange plus substrate and inhibition kinetics of D-xylose isomerase do not support a proton-transfer mechanism. **Biochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1481-1487, Feb. 1994.
- 116 DUNDAS, J. et al. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucleic Acids Research**, v. 34, web server issue, p.w116-8, July 2006.
- 117 BLACK, C. B. A. H. H. W. A. C. J. A. Biological coordination chemistry of magnesium, sodium, and potassium-ions - protein and nucleotide-binding sites. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 135, p. 165-202, 1994.
- 118 SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, July 2003.
- 119 KIEFER, F. et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n.database issue, p. D387-392, Jan. 2009.
- 120 ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, Jan. 2006.
- 121 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 60, Pt. 12, p. 2256-68, Dec. 2004.