

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIANA ZULIANI THEODORO DE LIMA

Estudos funcionais e estruturais de enzimas frutossiltransferases das  
famílias 32 e 68 de hidrolases de glicosídeos

São Carlos  
2015



MARIANA ZULIANI THEODORO DE LIMA

Estudos funcionais e estruturais de enzimas frutossiltransferases das  
famílias 32 e 68 de hidrolases de glicosídeos

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

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. João Renato  
Carvalho Muniz

Versão Corrigida  
(Versão Original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos  
2015

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)

Lima, Mariana Zuliani Theodoro de  
Estudos funcionais e estruturais de enzimas  
frutossiltransferases das famílias 32 e 68 de  
hidrolases de glicosídeos / Mariana Zuliani Theodoro  
de Lima; orientador João Renato Carvalho Muniz -  
versão corrigida -- São Carlos, 2015.  
157 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São  
Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Hidrolases de glicosídeos 32 e 68. 2.  
Frutossiltransferases. 3. Frutooligossacarídeos. I.  
Muniz, João Renato Carvalho, orient. II. Título.

*À meus pais, por serem meus exemplos de caráter,  
dedicação e perseverança.*



## AGRADECIMENTOS

*A meus pais, Edelcir e Izete, dos quais adquiri a paixão pelo conhecimento e o gosto pela ciência. Obrigada pelo apoio incondicional em minhas decisões, por serem meus exemplos de força, coragem, disposição e por me ajudarem a trilhar este bonito caminho.*

*Ao meu irmão Caio, obrigada pelo incentivo e por me alegrar todos os dias...obrigada por cada ligação atendida (mesmo durante suas aulas, provas, trabalhos...), obrigada por cada mensagem lida...pela paciência em aguentar a irmã mais velha e por ser o melhor irmão do mundo!*

*À minha irmãzinha querida Gabriela, agradeço por cada desenho, cada cartinha e pelo carinho e o abraço bem apertado que recebo toda vez que volto pra casa...a Nana te ama muito!*

*Ao meu namorado Ray...obrigada por ser essa pessoa maravilhosa! Obrigada por ser meu melhor amigo, meu companheiro, pelo apoio constante desde a graduação...obrigada por tornar o dia-a-dia mais leve, pelas palavras de incentivo, por apoiar minhas decisões, por ter me acompanhado muitos dias no laboratório (sábados, domingos, feriados...) e por inúmeras vezes ter aberto mão de suas atividades para auxiliar nas minhas, seja fazendo caixinha, correndo gel ou me ouvindo falar de ases e mais ases...ídeos e mais ídeos....*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. João Renato, por todo conhecimento compartilhado, pelas discussões sempre construtivas e pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionou.*

*Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov pela infraestrutura disponibilizada para que pudesse desenvolver o projeto de Mestrado, por ter me auxiliado e me aconselhado com o mesmo.*

*Ao Prof. Dr. Alessandro Nascimento, pelos conselhos sempre bem-vindos e por sua disponibilidade constante.*

*Aos amigos de graduação, Rapha, Hernan, Ariane, Letícia e Márcia, por todas as horas de estudo, trabalhos e provas...pelas alegrias, risadas e gordices pós provas e por todos os perrengues que passamos juntos...a vida não seria tão maravilhosa sem vocês!*

*À amiga e companheira de laboratório Nicoli, que me ensinou tanto durante a IC e que se tornou uma grande amiga me incentivando a continuar a trilhar o caminho da ciência...*

*À Profa. Dra. Ilana Camargo e ao Prof. Dr. Nathan Shankar, meus primeiros orientadores, pelos ensinamentos e pela maneira exemplar com que conduzem seu trabalho.*

*Aos amigos da sala 09, Eric, Heloísa, Karina, Suelen e Rosinha, pelos bons momentos vividos...seja no bandeirão ou nas pausas para um café+cookie...*

*Ao amigo Milton, pelo apoio e incentivo que me deu quando mais precisei...*

*Aos companheiros de laboratório, Caio, Evandro, Hêmily, Marina, Renata e Vanessa, pelos bons momentos vividos...*

*Ao amigo Atílio, pela descontração no laboratório, pelas risadas e piadas em meio a muito trabalho e por tornar nossa rotina mais alegre e divertida...*

*Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Molecular, Livia e Josimar, pelo auxílio, pelas conversas e apoio constante em todos os momentos...*

*Ao Marco e à Mariana, pela querida amizade, pelas discussões sempre muito construtivas, pelos cafés, pelas ideias, pelo incentivo, pela garra e pela imensa ajuda com a realização dos ensaios de atividade e cinética enzimática e tantos outros experimentos, pelo apoio constante na realização deste projeto e correção desta dissertação...*

*À Amanda pelo auxílio nas medidas e análise dos dados de Thermofluor e auxílio na correção dessa dissertação...*

*Ao César por ter realizado as clonagens com a competência que admiro muito...*

*Ao Prof. Wanius Garcia que muito me auxiliou nas análises das enzimas em solução e à sua aluna de doutorado Viviam Moura pela linda amizade e pela parceria no laboratório...*

*Ao pessoal do Instituto de Botânica - SP e em especial à Dra. Rita Figueiredo, ao Dr. Mauricio Batista e à aluna de mestrado Fernanda Zaninette que me auxiliaram na análise dos frutanos e fizeram com que me sentisse acolhida....*

*Ao pessoal dos laboratórios de Cristalografia e Biofísica do IFSC onde ingressei no universo científico e onde sempre fui muito bem-vinda...*



*Ao pessoal do serviço de pós-graduação, Sílvio, Ricardo e Patrícia, pela atenção e dedicação...*

*Às funcionárias da biblioteca do IFSC e também da gráfica...*

*Ao IFSC pela infraestrutura...*

*À CAPES pela bolsa de mestrado concedida e à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.*

*À todas as pessoas que estiveram presentes em meu dia-a-dia e que de uma forma ou de outra tornaram este trabalho possível...Muito obrigada!*



*“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos”.*

*-Marie Curie.*



## RESUMO

LIMA, M. Z. T. **Estudos funcionais e estruturais de enzimas frutossiltransferases das famílias 32 e 68 de hidrolases de glicosídeos.** 2015. 163 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A busca por substâncias benéficas à saúde humana tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas visando o estudo de enzimas e seus produtos através da otimização de bioprocessos. Um dos principais componentes utilizados como base para a indústria de alimentos funcionais são carboidratos denominados frutooligossacarídeos (FOS) derivados da sacarose. Estes são sintetizados por enzimas denominadas frutossiltransferases que podem ser encontradas em plantas, bactérias e fungos. Os FOS têm atraído grande interesse da indústria, devido às suas características fisiológicas e biomoduladoras. Por serem polissacarídeos prebióticos não-digeríveis, têm a capacidade de estimular seletivamente o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, auxiliando na prevenção da cárie dentária e câncer de cólon em humanos. Podem também contribuir na diminuição do colesterol total e triglicerídeos no sangue, promover a reabsorção de cálcio e magnésio e serem utilizados em dietas com restrições alimentares, por serem açúcares de baixo valor calórico e elevado valor nutricional. Tendo em vista a existência de diferentes formas de FOS sintetizados por diferentes mecanismos, o presente trabalho buscou realizar a caracterização estrutural e funcional de um conjunto de 13 frutossiltransferases de bactérias e fungos. Os genes alvo foram clonados e as enzimas expressas e purificadas. Ensaios estruturais e de atividade enzimática, incluindo de hidrólise e polimerização da sacarose, foram conduzidos para a melhor compreensão das bases moleculares envolvidas no reconhecimento do substrato. Oito enzimas, duas  $\beta$ -frutofuranosidases de *B. adolescentis*, três *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *B. licheniformis* e *L. gasseri* e uma invertase de *A.niger* foram cristalizadas e as enzimas de *B. adolescentis* e de *L. gasseri* tiveram suas estruturas resolvidas e seus sítios catalíticos mapeados. Estas apresentam em sua estrutura uma região  $\beta$ -propeller, local identificado como sítio catalítico, conectada à um módulo  $\beta$ -sanduíche. Ambas as enzimas apresentaram atividade hidrolítica da sacarose e a enzima de *L. gasseri* apresentou a formação dos FOS nistose e 1-cestose com concentrações de 1 M de sacarose bem como em tempos de 8 e 12 horas de incubação. Estes estudos, somados às análises das outras enzimas, permitirão o melhoramento na produção em larga escala, além da otimização e o controle destes processos de obtenção de FOS.

Palavras-chave: Hidrolases de glicosídeos 32 e 68. Frutossiltransferases. Frutooligossacarídeos.



## ABSTRACT

LIMA, M. Z. T. **Functional and Structural studies of the fructosyltransferases enzymes from the families 32 and 68 of glycoside hydrolases** 2015. 163 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The search for beneficial substances to human health has driven the development of researches on the study of enzymes and their products through bioprocess optimization. One of the main components used as a basis for functional food industry are carbohydrates called fructooligosaccharides (FOS) derived from sucrose. These are synthesized by enzymes called fructosyltransferases which can be found in plants, bacteria and fungi. The FOS has attracted great interest of the industry due to its physiological and biomodulator properties. Because it is non-digestible polysaccharides prebiotics, have the ability to selectively stimulate the growth of bifidobacteria and lactobacilli, assisting in the prevention of tooth decay and colon cancer in humans. They can also contribute to decrease total cholesterol and triglycerides in the blood, to promote the absorption of calcium and magnesium and can be used in diets with dietary restrictions, because they are low-calorie sugars presenting high nutritional value. Considering there are different forms of FOS synthesized by different mechanisms, the present work attempts to make structural and functional characterization of a set of 13 fructosyltransferases of bacteria and fungi. The target genes were cloned and the enzymes were expressed and purified. Structural testing of X-ray crystallography and enzymatic activity, including sucrose hydrolysis and polymerization were carried out for a better understanding of the molecular basis involved in substrate recognition. Eight enzymes, two  $\beta$ -fructofuranosidases *B. adolescentis*, three sucrose-6-phosphate hydrolase of *B. licheniformis* and *L. gasseri* and *A. niger* invertase, were crystallized and the enzymes from *B. adolescentis* and from *L. gasseri* had their structures determined and their catalytic site mapped. These are similar to each other and present in their structure one  $\beta$ -propeller region which was identified as catalytic site, connected to one  $\beta$ -sandwich module. Both enzymes showed hydrolytic activity of the sucrose and *L. gasseri* showed the formation of FOS, 1-kestose and nystose with 1 M sucrose concentrations and times of 8 and 12 hours of incubation. These studies together with the analysis of other enzymes will enable the improvement in large-scale production, besides the optimization and control of these processes for the production of FOS.

Keywords: Glycoside Hydrolases 32 and 68. Fructosyltransferases. Fructooligosaccharides.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem representativa dos organismos. (A) <i>Lactobacillus gasseri</i> . (B) <i>Bifidobacterium adolescentis</i> . (C) <i>Bacillus licheniformis</i> .....	34
Figura 2 -	Esquema representativo da síntese de FOS iniciais a partir da sacarose. ....	36
Figura 3 -	Esquema da síntese de FOS a partir da sacarose; os três principais trissacarídeos – 1-cestose; 6-cestose e neocestose que podem originar as demais séries de frutanos.....	38
Figura 4 -	Demonstrativo da produção anual dos principais prebióticos utilizados na indústria mundial.....	39
Figura 5 –	(A) Flores da planta <i>Cichorium intybus</i> . (B) Destaque das raízes da planta <i>Cichorium intybus</i> de onde são extraídos grande parte dos frutanos atualmente. ....	40
Figura 6 -	Processo em escala laboratorial de obtenção de FOS a partir de enzimas previamente purificadas. ....	41
Figura 7 -	Diagrama representativo do Reator de Leito Embalado utilizado para produção contínua de FOS. ....	42
Figura 8 -	Estrutura tridimensional da enzima $\beta$ -frutossidase de <i>Thermotoga marítima</i> .....	44
Figura 9 -	Representação esquemática dos açúcares utilizados para avaliação da atividade hidrolítica da enzima $\beta$ -frutossidase de <i>Thermotoga marítima</i> . ....	45
Figura 10 -	Estrutura tridimensional da enzima Inulosucrase de <i>Lactobacillus johnsonii</i> .....	46
Figura 11 -	Reação enzimática das $\beta$ -frutofuranosidases ou invertases.....	47
Figura 12 -	Reação enzimática da grande maioria das frutossiltransferases. Sendo A – B a molécula (sacarose ou FOS) com o grupo funcional doador, E a enzima, C a molécula aceptora e A – C o produto final formado (FOS com um resíduo de frutose a mais do que inicialmente). ....	48
Figura 13 -	Esquema representativo do experimento <i>Thermofluor</i> . ....	60
Figura 14 -	Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BlaGH32</i> do organismo <i>Bacillus licheniformis</i> , gene BLi04016 or BL03892 (SacA). ....	63
Figura 15 -	Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BabadGH32</i> do organismo <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , gene BAD_1325.. ....	63

Figura 16 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BlabGH32</i> do organismo <i>Bacillus licheniformis</i> , gene BLi04178 or BL01929 (SacAB). .....	64
Figura 17 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>LgGH32</i> do organismo <i>Lactibacillus gasseri</i> , gene LGAS_1779. ....	64
Figura 18 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>HtGH68</i> do organismo <i>Haloterrigena turkmenica</i> , gene Htur_4097. ....	65
Figura 19 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BlGH32</i> do organismo <i>Bacillus licheniformis</i> , gene BLi03707 or BL03606. ....	65
Figura 20 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BaGH32</i> do organismo <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , gene BAD_1150. ....	66
Figura 21 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>AsGH32</i> do organismo <i>Aspergillus sydowii</i> , gene denominado frutossiltransferase. ....	66
Figura 22 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>AnGH32</i> do organismo <i>Aspergillus niger</i> , gene denominado <i>putative ntracelular invertase</i> . ....	67
Figura 23 - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima <i>BlcGH32</i> do organismo <i>Bacillus licheniformis</i> , gene BLi02827 / BL03120 (SacC). ....	67
Figura 24 - Esquema de avaliação da estabilidade enzimática em relação à variação de pH. ....	70
Figura 25 - Análise da estabilidade térmica da enzima <i>BABADGH32</i> em função da variação da concentração de pH e NaCl, pela técnica <i>Thermofluor</i> . ....	71
Figura 26 - Fotos dos cristais obtidos da enzima <i>BLAGH32</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	74
Figura 27 - Fotos dos cristais obtidos da enzima <i>BABADGH32</i> de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> após 10 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	75
Figura 28 - Fotos dos micro cristais obtidos da enzima <i>BLABGH32</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	76
Figura 29 - Fotos dos cristais obtidos da enzima <i>LGGH32</i> de <i>Lactobacillus gasseri</i> após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	76
Figura 30- Fotos dos cristais obtidos da enzima <i>BAGH32</i> de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	77
Figura 31 - Fotos dos cristais obtidos da enzima <i>ANGH32</i> de <i>Aspergillus niger</i> após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. ....	78

Figura 32 - Cristais utilizados nos experimentos de difração de raios X, para a caracterização estrutural.....	83
Figura 33 - Imagens dos padrões de difração dos cristais proteicos..	84
Figura 34 - Estruturas cristalográficas dos monômeros das enzimas. ....	87
Figura 35 - Detalhes da estrutura de <i>sucrose-6-phosphate hydrolase</i> de <i>L. gasseri</i> .....	88
Figura 36 - Detalhes da estrutura de $\beta$ -frutofuranosidase de <i>B. adolescentis</i> .....	89
Figura 37 - Representação do sítio catalítico da enzima <i>sucrose-6-phosphate hydrolase</i> de <i>L. gasseri</i> ..	91
Figura 38 - Representação do sítio catalítico da enzima $\beta$ -frutofuranosidase de <i>B. adolescentis</i> .....	92
Figura 39 - Sobreposição das estruturas das enzimas <i>sucrose-6-phosphate hydrolase</i> de <i>L. gasseri</i> (em rosa) e $\beta$ -frutofuranosidase de <i>B. adolescentis</i> (em laranja).....	93
Figura 40 - Caracterização da enzima <i>BLAGH32</i> por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da <i>BLAGH32</i> (em 25 °C) em função da variação de temperatura.....	100
Figura 41 - Caracterização da enzima <i>BLAGH32</i> por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 8,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da <i>BLAGH32</i> (em 25 °C) em função da variação de temperatura.....	101
Figura 42 - Caracterização da enzima <i>LGGH32</i> por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da <i>LGGH32</i> (em 25 °C) em função da variação de temperatura.....	102
Figura 43 - Caracterização da enzima <i>BAGH32</i> por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 6 e 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da <i>BAGH32</i> (em 25 °C) em função da variação de temperatura.....	103
Figura 44 - Dados de SAXS coletados para a enzima <i>BLAGH32</i> a 25 °C e diferentes valores de pH. Curvas experimentais de SAXS da enzima em pH 6,0 (quadrado aberto), pH 7,5 (círculo aberto) sobreposta nas curvas de espalhamento baseado no modelo de baixa resolução (DAMs, linhas sólidas). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.....	105
Figura 45 - Gráfico de Guinier (A) Gráfico de Guinier ( $\ln I$ versus $q^2$ ) para a <i>BLAGH32</i> em pH 6,0 (círculo aberto), pH 7,5 (quadrado aberto). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.....	106
Figura 46 - Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da <i>BLAGH32</i> em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos). (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A).....	107

Figura 47 - Dados de SAXS coletados para a enzima <i>LGGH32</i> a 25 °C e diferentes valores de pH. ....	108
Figura 48 - Gráfico de Guinier e curva experimental da função de distribuição de distância. ....	109
Figura 49 - Gráfico de Kratky dos dados de SAXS para a enzima <i>LGGH32</i> em diferentes valores de pH [pH 6,0 (linha cinza), pH 7,5 (linha tracejada) e pH 8,5 (linha sólida)] e comparação com monômero da enzima (linha sólida preta). ....	110
Figura 50 - Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da <i>LGGH32</i> em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos) e GASBOR, respectivamente. (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A). ....	112
Figura 51 - Dados de SAXS coletados para a enzima <i>BAGH32</i> a 25 °C e diferentes valores de pH.. ....	113
Figura 52 - Gráfico de Guinier e curva experimental da função de distribuição de distância.. ....	115
Figura 53 - Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da <i>BAGH32</i> em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos). (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A). ....	116
Figura 54 - Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para enzima <i>BLAGH32</i> a 20 °C e valores de pH 6,0 (linha preta) e pH 7,5 (linha cinza). ....	117
Figura 55 - Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para enzima <i>LGGH32</i> a 20 °C e pH 7,5 (linha preta). ....	118
Figura 56 - Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para a enzima <i>BAGH32</i> a 20 °C e valores de pH 6,0 (linha preta) e pH 7,5 (linha cinza). ....	119
Figura 57 - Identificação da concentração ótima de enzima para a <i>LGGH32</i> . ....	128
Figura 58 - Identificação da concentração ótima de enzima para a <i>BAGH32</i> . ....	128
Figura 59 - Representação da identificação do melhor tempo e concentração da enzima <i>LGGH32</i> . ....	129
Figura 60 - Representação da identificação do melhor tempo e concentração da enzima <i>BAGH32</i> . ....	130
Figura 61 - Representação do ensaio de variação de pH em função da Atividade Relativa (%) da enzima <i>LGGH32</i> . ....	131

Figura 62 - Representação do ensaio de variação de pH em função da Atividade Relativa (%) da enzima <i>BAGH32</i> .....	131
Figura 63 - Avaliação da melhor temperatura para reação de hidrólise enzimática em função da Atividade Relativa para a enzima <i>LGGH32</i> .....	132
Figura 64 - Avaliação da melhor temperatura para reação de hidrólise enzimática em função da Atividade Relativa para a enzima <i>BAGH32</i> .....	133
Figura 65 - Ensaio de termo estabilidade realizado para a enzima <i>LGGH32</i> em função da atividade residual (%).....	134
Figura 66 - Ensaio de termo estabilidade realizado para a enzima <i>BAGH32</i> em função da atividade residual (%).....	134
Figura 67 - Curva de caracterização cinética da enzima <i>LGGH32</i> .....	135
Figura 68 - Curva de caracterização cinética da enzima <i>BAGH32</i> .....	136
Figura 69 - Cromatografia em Camada Delgada dos produtos da enzima <i>LGGH32</i> .....	139
Figura 70 - Espectrometria de Massas MALDI-TOF com identificação do FOS 1-cestose. Produto da polimerização de frutose da enzima <i>LGGH32</i> .....	140
Figura 71 - Gráficos representativos do produto da enzima <i>LGGH32</i> de <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	141
Figura 72 - Quantificação da produção de 1-cestose pela enzima <i>LGGH32</i> de <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	142
Figura 73 - Quantificação da produção de nistose pela enzima <i>LGGH32</i> de <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	143



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Exemplos de oligossacarídeos, organismos provenientes e aplicações. ....	32
Tabela 2 -	Porcentagem de FOS e outros carboidratos presentes em plantas comestíveis. ....	37
Tabela 3 -	Enzimas GHs e suas diversas aplicações industriais.....	43
Tabela 4 -	Estruturas resolvidas e organismos da família 68 das hidrolases de glicosídeos.....	46
Tabela 5 -	Apresentação dos genes clonados, família das hidrolases de glicosídeos a que pertencem, organismos e código utilizado pelo laboratório.....	55
Tabela 6 -	Avaliação da estabilidade das enzimas pela técnica <i>ThermoFluor</i> por meio da variação do pH e concentração de sal. ....	69
Tabela 7 -	Evolução do <i>screening</i> inicial e secundário realizado para as enzimas em estudo. Fonte: elaborado pela autora .....	73
Tabela 8 -	Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos dos alvos <i>LGGH32</i> e <i>BAGH32</i> , na ausência e presença dos ligantes. Entre parênteses .....	85
Tabela 9 -	Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima <i>BLAGH32</i> . Fonte: elaborado pela autora ...	108
Tabela 10 -	Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima <i>LGGH32</i> .....	110
Tabela 11 -	Resultados gerais de SAXS para a enzima <i>LGGH32</i> .....	113
Tabela 12 -	Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima <i>BAGH32</i> .....	114
Tabela 13 -	Resultados gerais de SAXS para a enzima <i>BAGH32</i> . * Estrutura homodimérica de alta resolução. ....	116
Tabela 14 -	Parâmetros cinéticos de caracterização da enzima <i>LGGH32</i> .....	136
Tabela 15 -	Parâmetros cinéticos de caracterização da enzima <i>BAGH32</i> .....	136
Tabela 16 -	Parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato sacarose por enzimas da família GH32 .....	137





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes Database</i>
CD	Dicroísmo Circular
DAM	Modelo atômico dammy
$D_{max}$	Dimensão máxima
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNS	<i>Dinitrosalicylic Acid</i>
DP	<i>Degree of polymerization</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FOS	Frutooligossacarídeos
FT	Frutossiltransferases
GH	Hidrolases de Glicosídeos
GI	Trato Gastrointestinal
LB	Luria Bertani
LIC	Clonagem Independente de Ligação
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MMT	Malic acid, MES e Tris
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
PEG MME	Polietilenoglicol Monometil Éter
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>
P(r)	Função de distribuição de distância
$R_g$	Raio de giro
$R_s$	Raio hidrodinâmico
SAXS	Espalhamento de raios X a baixo ângulo
SDS- PAGE	Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tm	<i>Melting Temperature</i>
UV	Ultra-violeta
VC	Volume de Coluna

## Sumário

1	Introdução .....	31
1.1	OLIGOSSACAÍDEOS .....	31
1.2	PROBIÓTICOS .....	32
1.2.1.	<i>Lactobacillus gasseri</i> .....	33
1.2.2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....	33
1.2.3.	<i>Bacillus licheniformis</i> .....	34
1.3	PREBIÓTICOS .....	35
1.3.1	FRUTOOLIGOSSACAÍDEOS (FOS) .....	35
1.4	MERCADO GLOBAL DE OLIGOSSACARÍDEOS .....	39
1.4.1	OBTENÇÃO DE FOS PELA INDÚSTRIA .....	40
1.5	HIDROLASES DE GLICOSÍDEOS .....	42
1.5.1	FAMÍLIAS 32 E 68 DAS HIDROLASES DE GLICOSÍDEOS .....	43
1.5.2.	GH32 .....	44
1.5.3.	GH68 .....	45
1.5.4.	MECANISMOS DE AÇÃO FRENTE AO SUBSTRATO.....	47
2.	OBJETIVOS .....	51
2.1	Objetivos Gerais .....	51
2.2.	Objetivos Específicos .....	51
2.3	Justificativa.....	52
3	Realização da Triagem inicial pelo método <i>High-throughput screening</i> .....	55
3.1	Metodologia da Triagem inicial .....	55
3.1.1	Procedência das cepas para obtenção do gene de interesse.....	55
3.1.2	Clonagem dos genes de interesse .....	56
3.1.3	Preparação de células <i>E. coli</i> competentes .....	56
3.1.4	Transformação em <i>E. coli</i> quimio-competentes .....	57
3.1.5	Expressão heteróloga em larga escala das proteínas fusionadas com cauda His-Trx .....	57
3.1.6	Obtenção das proteínas de interesse na presença de cauda His-Trx.....	58
3.1.7	Purificação das proteínas de interesse na presença de cauda His-Trx.....	58
3.1.8	Clivagem da cauda His-Trx .....	59
3.1.9	Cromatografia de Exclusão por Massa Molecular .....	59
3.1.10	Fluorimetria diferencial de varredura ( <i>ThermoFluor</i> ).....	59
3.1.11	Ensaio de Cristalização .....	61

3.2 Resultados e Discussões da Triagem Inicial de enzimas .....	62
3.2.1 Análises de <i>Thermofluor</i> .....	68
3.3 Escolha dos alvos .....	73
3.4 Resultados dos ensaios de cristalização .....	74
4 Cristalografia.....	81
4.1 Coleta e processamento de dados de difração de raios X .....	81
4.2 Obtenção das fases, Refinamento e determinação das estruturas cristalográficas.....	81
4.3 Caracterização Estrutural .....	82
4.3.1 Análises das coletas e processamento dos dados de difração de raios X das enzimas sucrose-6-phosphate hydrolase de <i>L. gasseri</i> e $\beta$ -frutofuranosidase de <i>B. adolescentis</i> .....	82
4.3.2 Análises do sítio catalítico .....	90
5 Metodologia da Caracterização Biofísica das enzimas .....	97
5.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	97
5.2 Estudos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) .....	97
5.2.1 Análise de dados de SAXS .....	98
5.2.2 Modelos de baixa resolução obtidos dos dados de SAXS .....	98
5.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) .....	99
5.4 Resultados e Discussões da caracterização biofísica .....	99
5.4.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	99
5.4.1.1 DLS da enzima <i>BLAGH32</i> .....	100
5.4.1.2 DLS da enzima <i>LGGH32</i> .....	101
5.4.1.3 DLS da Enzima <i>BAGH32</i> .....	103
5.4.2 Resultados dos estudos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	105
5.4.2.1 Enzima <i>BLAGH32</i> .....	105
5.4.2.2 Enzima <i>LGGH32</i> .....	108
5.4.2.3 Enzima <i>BAGH32</i> .....	113
5.4.3 Resultados da Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) .....	117
5.4.3.1 Enzima <i>BLAGH32</i> .....	117
5.4.3.2 Enzima <i>LGGH32</i> .....	118
5.4.3.3 Enzima <i>BAGH32</i> .....	118
6 Caracterização Bioquímica.....	123
6.1 Ensaios de caracterização cinética da hidrólise .....	123
6.1.1 Identificação da concentração ótima de enzima .....	123
6.1.2 Identificação do tempo ótimo para reação enzimática.....	123

6.1.3	Determinação do pH e temperatura ótimos para hidrólise da sacarose .....	124
6.1.4	Atividade cinética em sacarose.....	124
6.1.4	Ensaio de termo estabilidade das enzimas .....	125
6.2	Ensaio de análise de atividade de frutossilção.....	125
6.2.1	Análise de carboidratos por HPAEC/PAD.....	126
6.2.2	Análise de carboidratos por CCD.....	126
6.2.3	Espectrometria de Massas .....	127
6.3	Resultados e Discussões da Caracterização Funcional.....	127
6.3.1	Análises dos ensaios de hidrólise das enzimas <i>LGGH32</i> e <i>BAGH32</i> .....	127
6.3.1.1	Identificação da concentração ótima de enzima.....	127
6.3.1.2	Identificação do melhor tempo de reação enzimática .....	129
6.3.1.3	Análise do melhor pH para atividade de hidrólise das enzimas .....	130
6.3.1.4	Análise da melhor temperatura para os ensaios de hidrólise enzimática .....	132
6.3.1.5	Termoestabilidade .....	133
6.3.1.6	Análises de cinética enzimática de hidrólise .....	135
6.3.1.7	Atividade de frutossilção.....	137
6.3.1.8	Análise dos carboidratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	138
6.3.1.9	Espectrometria de Massas .....	140
6.3.1.10	Análise de carboidratos por HPAEC/PAD.....	141
7	Conclusões e Perspectivas.....	147
7.1	Conclusões .....	153
7.2	Perspectivas .....	154
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	149



# CAPÍTULO 1

## Introdução

---



*Neste capítulo serão enfatizados os conceitos primordiais que motivaram a realização do presente trabalho, ressaltando-se a importância das inúmeras aplicações biotecnológicas das frutossiltransferases (do inglês, “fructosyltransferases”) dentro da família das hidrolases de glicosídeos (do inglês, “glycoside hydrolases”) bem como de seus produtos de hidrólise e frutossililação e os principais organismos de estudo que as apresentam.*





## 1 Introdução

A busca por compostos que aprimorem o processo de produção de diversos setores de consumo somados à necessidade de substâncias benéficas à saúde humana e ao meio ambiente, tem impulsionado o desenvolvimento da pesquisa a eles relacionada.<sup>1</sup> Dentre elas, destacam-se os crescentes investimentos na investigação de enzimas provenientes de diversos organismos e de seus produtos, além da busca pela otimização dos bioprocessos que permitam uma maior eficiência e rentabilidade.<sup>2</sup>

### 1.1 OLIGOSSACAÍDEOS

Oligossacarídeos são carboidratos caracterizados por sua baixa massa molecular e por apresentarem em sua formação resíduos monoméricos de açúcar com diversos graus de polimerização (do inglês, “*degree of polymerization*”, “DP”).<sup>3</sup> Sua síntese deve-se sobretudo à propriedade de determinadas enzimas de diversos organismos em hidrolisar recursos provenientes de biomassa ou então, por reações de transferência de açúcares, convertendo os mesmos em polissacarídeos.<sup>4</sup>

As aplicações biotecnológicas dos oligossacarídeos são bastante variadas e sua procedência decorre de diversos organismos sintetizadores, conforme reportado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Exemplos de oligossacarídeos, organismos provenientes e aplicações.

Oligossacarídeos	Organismos	Aplicações biotecnológicas
Galactooligossacarídeos	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Como prebióticos, formulações farmacológicas e adoçante de baixo valor calórico <sup>5-6</sup>
Xilooligossacarídeos	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i>	Como prebióticos, em formulações cosméticas, no auxílio à regulação do crescimento em plantas <sup>7-8</sup>
Frutooligossacarídeos	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Aureobasidium</i> <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	Adoçante natural, aumento da absorção de Ca e Mg, redução do risco de câncer de cólon <sup>9-10</sup>

Fonte: Adaptada de STAHL.<sup>11</sup>

Os carboidratos reportados na Tabela 1 podem ser divididos em duas classes: digeríveis e não-digeríveis pelo organismo humano. A segunda classe é caracterizada por apresentar em seus monômeros, uma configuração do átomo de carbono anomérico (C1 ou C2) que impede a atividade hidrolítica de enzimas digestivas humanas. Além disso, esta classe tem-se apresentado bastante interessante do ponto de vista biológico por suas inúmeras características biomoduladoras.<sup>12</sup>

## 1.2 PROBIÓTICOS

Os avanços no crescimento do mercado de alimentos funcionais estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da pesquisa da microbiota intestinal humana. Assim sendo, o aprimoramento dos probióticos permitiu um aumento no número de opções destes alimentos.

Probióticos são caracterizados por serem organismos considerados viáveis e não-patogênicos que auxiliam no equilíbrio intestinal humano.<sup>13</sup> As principais cepas utilizadas são as denominadas bactérias do ácido láctico (do inglês, “*Lactic Acid Bacteria*”, “LAB”) e que pertencem ao gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*.<sup>14-15</sup> Estas são

responsáveis pela biorregulação, biodefesa e também na prevenção e supressão de muitas doenças, auxiliando na modulação de respostas autoimunes.<sup>14,16</sup> Os componentes bioativos que compõem estes organismos tratam-se das enzimas neles presentes.<sup>16</sup>

### 1.2.1. *Lactobacillus gasseri*

Diversas espécies de *Lactobacillus* habitam naturalmente o trato gastrointestinal humano. Estas caracterizam-se por se tratarem de organismos aeróbios, gram-positivos e que possuem a capacidade de fermentar açúcares ramificados produzindo-se ácidos lácticos. Uma baixa porcentagem de proteínas destas espécies já foram estudadas em relação às suas funções e atividades enzimáticas.<sup>17</sup> Dentre estas espécies, resalta-se a de *Lactobacillus gasseri*, organismo que teve uma de suas enzimas estudadas no presente trabalho.

O organismo *Lactobacillus gasseri* é caracterizado por ser homofermentativo, habitante do trato gastrointestinal humano. O mesmo também pode ser utilizado no processo de fermentação de leites e derivados bem como alimentos, além de atuar como probiótico devido a sua capacidade de síntese de frutanos a partir da sacarose e na hidrólise dos mesmos.<sup>18</sup>

Diversos estudos têm sido realizados em relação às propriedades probióticas destes organismos, revelando dados como a melhoria no processo digestivo e desta forma, no metabolismo humano, quando são introduzidos na dieta alimentar.<sup>19</sup> Além disso, estão fortemente relacionados à diminuição de agentes patogênicos entéricos<sup>20</sup> e, por consequência, na melhoria do sistema imune humano.<sup>21</sup>

### 1.2.2 *Bifidobacterium adolescentis*

*B. adolescentis* é uma bactéria gram-positiva, sacarolítica e anaeróbia que coloniza seletivamente o organismo humano, sobretudo de recém-nascidos, sendo encontrados também em adultos, porém em menor quantidade.<sup>22</sup> Os frutooligossacarídeos (FOS) são os principais prebióticos responsáveis pelo estímulo ao crescimento das bifidobactérias devido ao

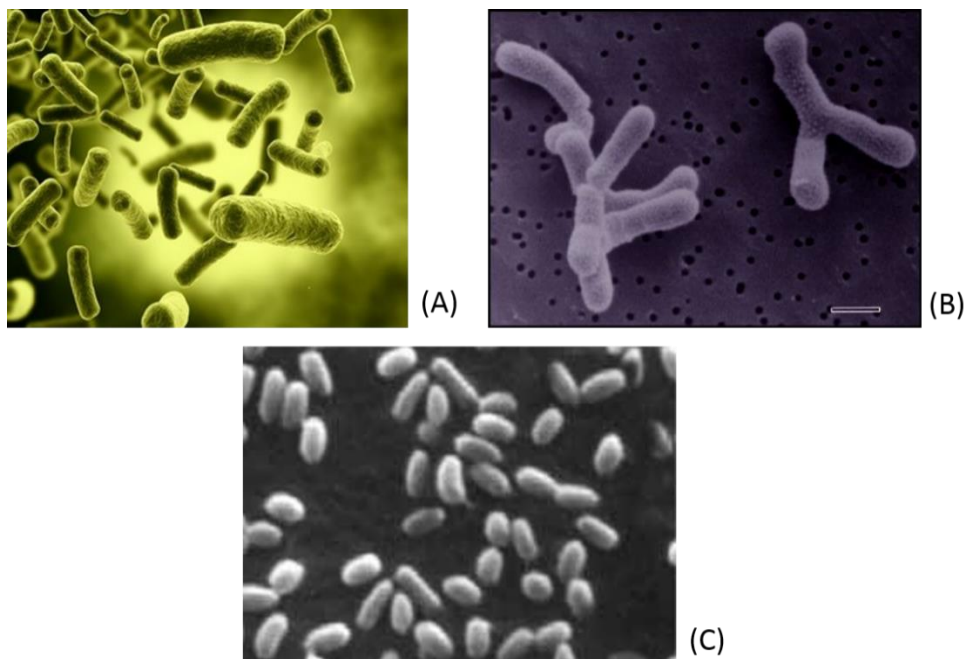
metabolismo destes açúcares pelas mesmas. Estes são convertidos em açúcares de cadeia curta que auxiliam no suprimento de energia e reabsorção de minerais.<sup>23</sup>

Devido a sua capacidade de conversão de polissacarídeos em compostos intermediários de degradação para posterior conversão em ácidos graxos de cadeias menores, as bifidobactérias tem a capacidade de acidificar o intestino grosso. Tal fato permite estimular a resposta imune do organismo contra agentes patogênicos bem como na resposta da atividade anti-inflamatória.<sup>24</sup>

### 1.2.3. *Bacillus licheniformis*

O organismo *Bacillus licheniformis* é gram-positivo, anaeróbio facultativo e comumente encontrado em plantas e no solo.<sup>25</sup> Assim como as demais bactérias apresentadas anteriormente, é também utilizado como probiótico, sobretudo por prevenir doenças relacionadas ao trato gastrointestinal humano.<sup>26</sup>

Inúmeras são as aplicações industriais de suas enzimas e produtos extracelulares. Muitas de suas proteases são utilizadas nas indústrias de detergentes e algumas de suas cepas podem ser empregadas na obtenção de peptídeos para produção de antibióticos<sup>27</sup>.



**Figura 1** - Imagem representativa dos organismos. (A) *Lactobacillus gasseri*. (B) *Bifidobacterium adolescentis*. (C) *Bacillus licheniformis*.

Fonte: Adaptada de DANIELLS<sup>21</sup>;BACILLUS...<sup>28</sup>

Com o desenvolvimento das pesquisas relacionadas à composição dos alimentos funcionais, os probióticos foram utilizados majoritariamente.<sup>29</sup> Um dos fatores que descontinuaram seu uso foi a dificuldade na manutenção destes probióticos em condições ativas para fins de comercialização. Desta forma, os prebióticos tornaram-se uma forma alternativa para os mesmos.<sup>4</sup>

### 1.3 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são caracterizados por serem oligossacarídeos não digeríveis pelo organismo humano<sup>14</sup>. Como principais exemplos tem-se os frutooligossacarídeos, os galactooligossacarídeos e a inulina que apresentam, entre outras funções, a de estimular o crescimento seletivo e benéfico de bactérias, particularmente, de lactobacillus e bifidobactérias no trato gastrointestinal humano (GI).<sup>30</sup> O universo dos oligossacarídeos prebióticos ainda é pouco compreendido em relação à sua origem, aos processos empregados para sua formação, bem como à dosagem requerida para efeitos benéficos à saúde humana. Sabe-se, no entanto, que eles existem graças ao metabolismo de certas bactérias, além de fungos e plantas.

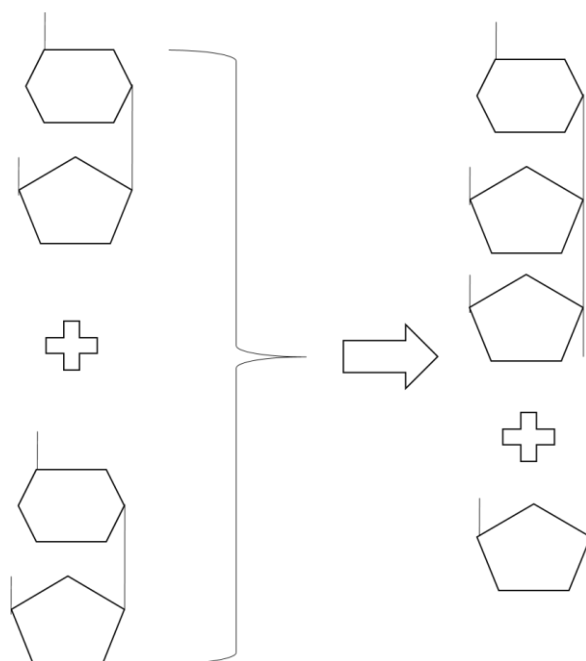
Atualmente, a obtenção dos prebióticos decorre da extração a partir dos produtos naturais bem como por processos químicos de hidrólise de polissacarídeos ou então por meio de processos enzimáticos a partir de dissacarídeos.<sup>16</sup> Além de conferir características nutricionais elevadas, aumentando o metabolismo do corpo e auxiliando na reabsorção de cálcio, podem ser empregados na modificação da viscosidade e na emulsificação de alimentos, bem como na fabricação de adoçantes (devido à característica adocificante que possuem) que apresentam baixas calorias.<sup>31</sup>

#### 1.3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os frutanos são prebióticos caracterizados por serem oligo ou polissacarídeos à base de frutose de origem natural.<sup>32</sup> Sua origem é bastante ampla, podendo ser encontrados em plantas, bactérias e fungos atuando, sobretudo, como reserva de carboidratos. Apresentam diferentes graus de polimerização dos resíduos de frutose dependendo do organismo em que se

encontram<sup>33</sup>. Em plantas, por exemplo, a síntese de frutanos é bastante importante para a sobrevivência da mesma ao frio e condições de seca.<sup>34</sup> Além disso, apresentam diversas estruturas, como resultado de uma combinação de reações catalíticas de várias enzimas, incluindo a sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST); a frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT); a frutano:frutano frutossiltransferase 6G (6G-FFT), e a sacarose:frutano frutossiltransferase 6 (6-SFT).<sup>32,34-35</sup>

FOS caracterizam-se por serem derivados da sacarose, sendo sintetizados a partir de frutossiltransferases (hidrolases de glicosídeos das famílias 32 e 68, *a serem evidenciadas nas seções de 1.4.1 à 1.4.3*). FOS constituem séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores que apresentam um resíduo de frutose a mais que o membro da série anterior<sup>33</sup>. Isto pode ser evidenciado pelo início da síntese de frutanos realizada pela enzima SST que transfere resíduos de frutose à moléculas de sacarose, resultando no trissacarídeo 1-cestose. A partir desta formação, outras enzimas atuam catalisando a transferência de resíduos de frutose, alongando a cadeia, conforme observado na Figura 2.<sup>33</sup>



**Figura 2** – Esquema representativo da síntese de FOS iniciais a partir da sacarose.

Fonte: Adaptada de EDELMAN; JEFFORD<sup>33</sup>

Os frutanos podem ser encontrados em muitos alimentos consumidos na dieta humana habitual como evidenciado na

Tabela 2.

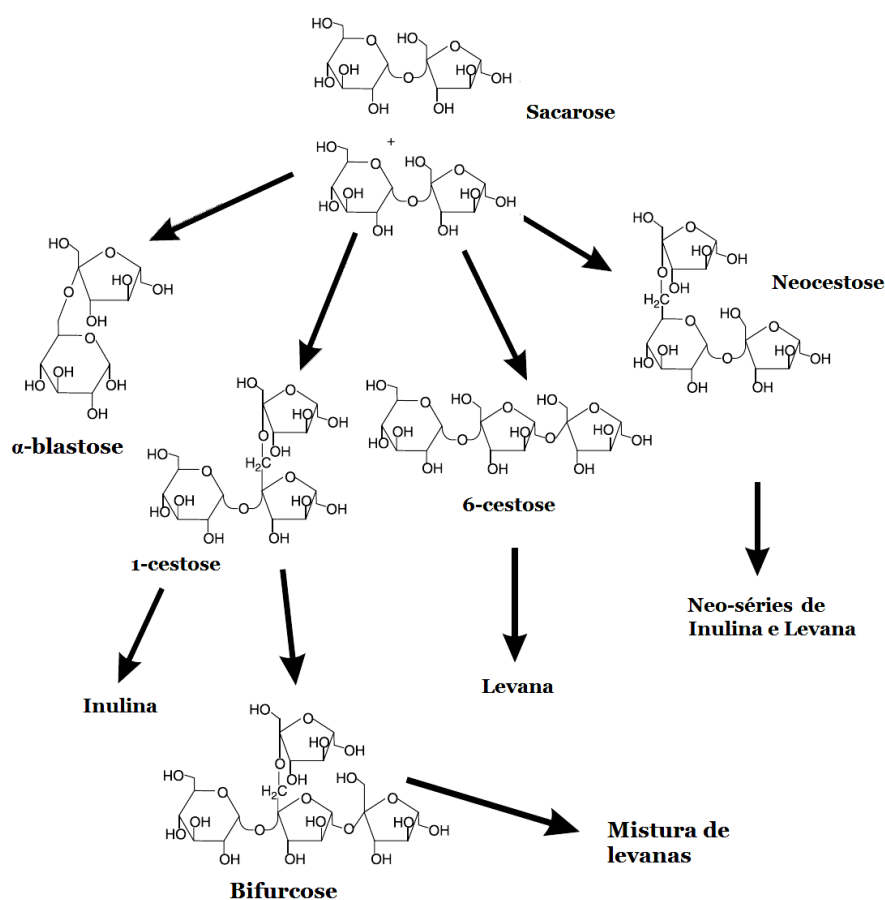
**Tabela 2** - Porcentagem de FOS e outros carboidratos presentes em plantas comestíveis.

Planta	Parte comestível	%FOS	Tipos de carboidratos
<b>cebola</b>	bulbo	2-6	glicose, frutose, sacarose
<b>alcachofra</b>	tubérculo	10-15	1-cestose
<b>chicória</b>	raiz	5-10	carboidratos de cadeias longas
<b>alho</b>	bulbo	3-6	1-cestose e neocestose
<b>banana</b>	fruta	0,3-0,7	glicose, frutose, sacarose, neocestose
<b>centeio</b>	cereal	0,5-1	nistose e neocestose
<b>cevada</b>	cereal	0,5-1,5	1-cestose
<b>trigo</b>	cereal	1-4	1-cestose, nistose, neocestose

Fonte: Adaptada de SANGEETHA<sup>36</sup>; VANDRESEN<sup>37</sup>

Frutanos originados de fungos são essencialmente FOS denominados 1-cestose (DP 3), nistose (DP 4), 1<sup>F</sup>-frutofuranosil nistose (DP 5), e formados por ligações  $\beta$  - (2  $\rightarrow$  1) lineares.<sup>23-24</sup>

Em bactérias, os frutanos estão envolvidos principalmente na simbiose, variando conforme o grau de polimerização (DP), da articulação entre as unidades de frutoses adjacentes bem como da presença de glicose<sup>40</sup>. Frutanos com grau de polimerização superior a 10<sup>4</sup> contém uma ligação do tipo  $\beta$  - (2  $\rightarrow$  6). FOS denominados levanas e inulinas possuem ligações  $\beta$  - (2  $\rightarrow$  1), sendo convertidos a partir da sacarose por levanases e inulinases, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 3.



**Figura 3** - Esquema da síntese de FOS a partir da sacarose; os três principais trissacarídeos – 1-cestose; 6-cestose e neocestose que podem originar as demais séries de frutanos.

Fonte: Adaptada de DI BARTOLOMEO<sup>32</sup>

A classe dos frutooligosacarídeos tem atraído grande interesse da indústria, devido às suas características fisiológicas e biomoduladoras. Dentre eles, os FOS com DP 3-6 são de grande interesse devido aos seus significativos benefícios para os seres humanos. Da mesma forma, as enzimas relacionadas à síntese e hidrólise destes FOS têm atraído a atenção industrial para a produção em massa dos mesmos.<sup>41</sup>

Uma vez que os frutanos são considerados prebióticos não-digeríveis, os mesmos têm a capacidade de estimular seletivamente o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos,<sup>34</sup> auxiliando na prevenção da cárie dentária e câncer de cólon<sup>42</sup> em humanos. Estes fatores contribuem para a diminuição do colesterol total e triglicerídeos no sangue e promovem a reabsorção de cálcio e magnésio.<sup>43</sup> Por serem açúcares de baixo valor calórico e elevado valor nutricional, podem ser utilizados em alimentos dietéticos e em dietas com restrições



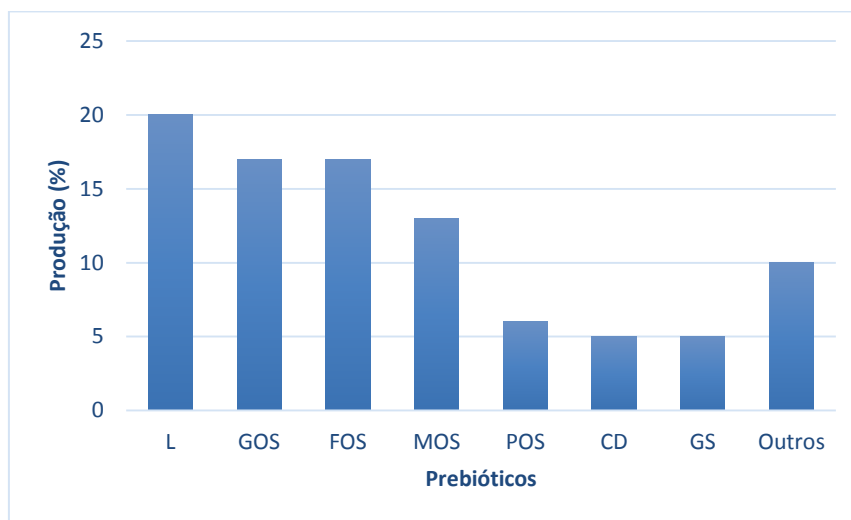
alimentares.<sup>15</sup> Assim também são empregados como base para síntese de muitos fármacos e em cosméticos, sobretudo, como estabilizantes em formulações.<sup>3</sup>

Não há dúvidas de que FOS são produtos com alto interesse tecnológico. Identificar e caracterizar as enzimas é de suma importância para entendermos como ocorre a interação com os substratos e as reações de promoção da oligomerização de sacarídeos e garantir assim uma maior eficiência de todo o mecanismo envolvido.

#### 1.4 MERCADO GLOBAL DE OLIGOSSACARÍDEOS

Produtos do gênero alimentício que apresentam em sua composição probióticos tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* ou suplementados com açúcares compostos como a inulina e frutooligossacarídeos, tem apresentado relevante destaque nos últimos 10 anos.<sup>16</sup> Os efeitos benéficos dos mesmos permitiu impulsionar o Mercado Global de alimentos funcionais avaliado em 33 bilhões de dólares e liderado pelos mercados japoneses e norte-americanos.<sup>44</sup>

No gráfico apresentado na Figura 4 é possível identificar a porcentagem da produção anual dos principais prebióticos utilizados na indústria mundial.



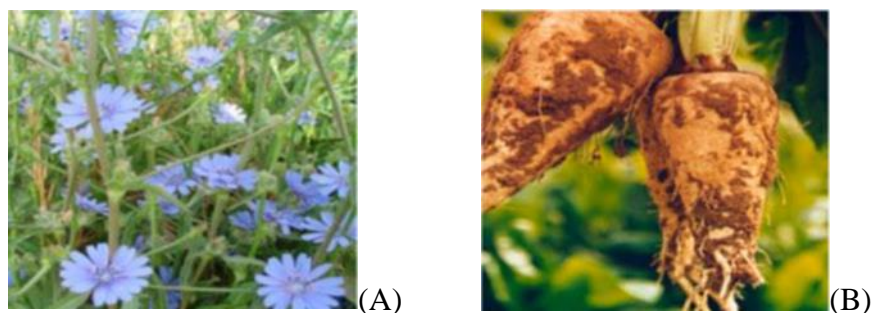
**Figura 4** -Demonstrativo da produção anual dos principais prebióticos utilizados na indústria mundial. [Abreviações: L-lactulose; GOS-galactooligossacarídeos; FOS-frutooligossacarídeos; MOS-maltooligossacarídeos; POS-oligossacarídeo palatinose; CD-ciclodextrina; GS-glucosil sacarose].

Fonte: Adaptada de PANESAR<sup>45</sup>

Atualmente, os principais oligossacarídeos no mercado são os frutooligossacarídeos e dos galactooligossacarídeos.<sup>4</sup> Em particular, FOS de cadeia curta, como a 1-cestose, são altamente requisitados no mercado de alimentos funcionais, devido à sua aplicação como prebiótico e como adoçante natural de baixa caloria.<sup>46</sup> A estimativa de consumo diário reportada para os mesmos é de 1-4 g nos Estados Unidos e de 3-11 g na Europa.<sup>44</sup>

#### 1.4.1 OBTENÇÃO DE FOS PELA INDÚSTRIA

A obtenção de FOS pelas indústrias ainda é realizada em sua grande maioria por meio da extração de frutanos de cadeias longas da chicória (*Cichorium intybus* – ilustrado na Figura 5) que como observado na seção 1.3.1, apresenta concentrações consideráveis de FOS, e posterior hidrólise enzimática dos mesmos em frutanos de cadeias menores.<sup>46</sup>



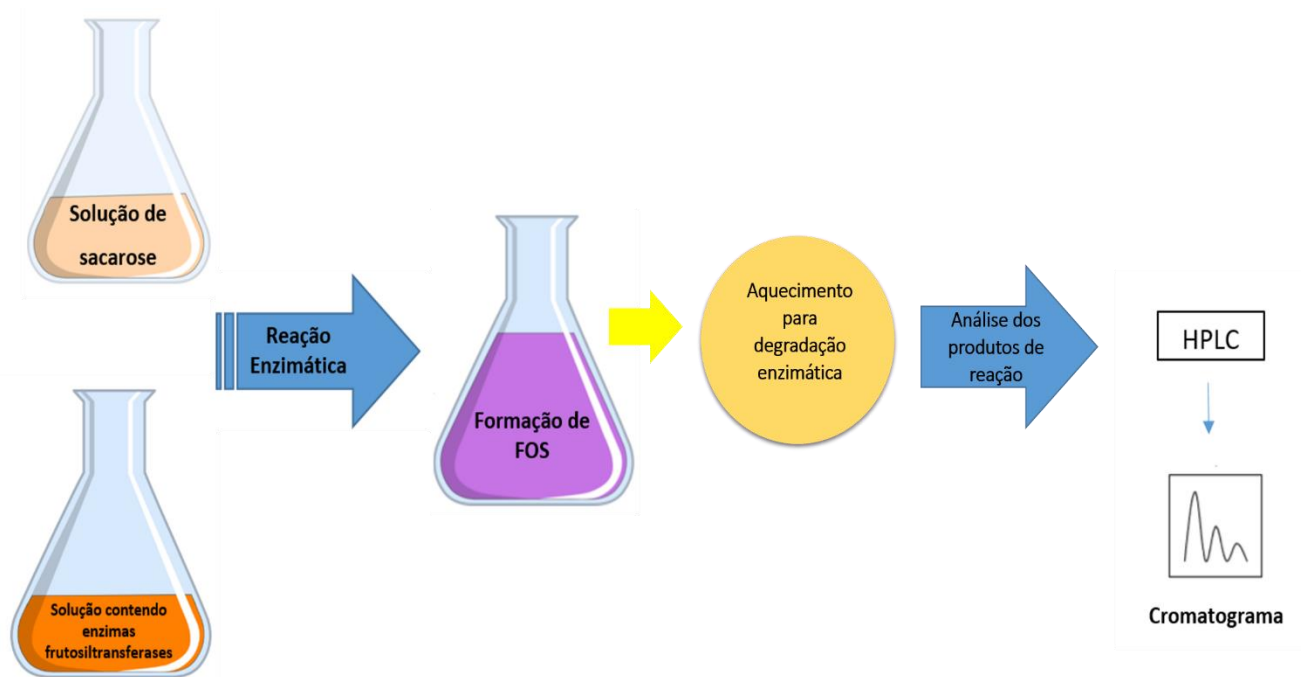
**Figura 5** – (A) Flores da planta *Cichorium intybus*. (B) Destaque das raízes da planta *Cichorium intybus* de onde são extraídos grande parte dos frutanos atualmente.

Fonte: TRUJILLO<sup>46</sup>

A necessidade de aumento na produção de frutanos permitiu o incentivo à pesquisa e desenvolvimento de enzimas que realizassem este processo a partir de açúcares simples, como a sacarose.<sup>47</sup> O esquema apresentado na Figura 6 demonstra o bioprocesso atualmente utilizado para a produção de FOS em escala laboratorial, partindo-se de uma solução contendo sacarose na presença das enzimas frutossiltransferases. A partir da reação enzimática à uma dada temperatura, ocorre-se a formação dos frutanos. A solução é então aquecida para degradação das enzimas e posterior análise dos produtos de reação utilizando-se técnicas de cromatografia. A Figura 7 apresenta o esquema utilizado na posterior escala industrial a partir de enzimas previamente imobilizadas em Reator de Leito Embalado refrigerado (A). Basicamente, o substrato utilizado (sacarose) encontra-se armazenado no *reservoir* (B) até ser

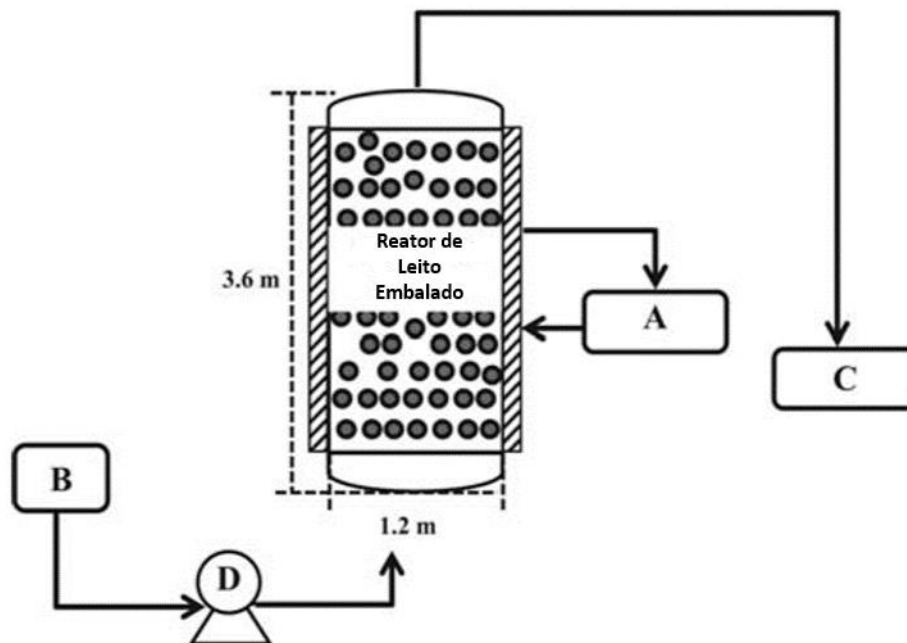
levado ao biorreator com o auxílio da bomba peristáltica (D). Encontrando-se as enzimas imobilizadas, decorre a reação enzimática e formação de FOS. Este é então armazenado em outro *reservoir* específico para o produto (C).

Dentre as principais enzimas utilizadas, destacam-se as enzimas das famílias GH 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos, que são objetos de estudo neste presente trabalho.



**Figura 6** - Processo em escala laboratorial de obtenção de FOS a partir de enzimas previamente purificadas.

Fonte: Adaptada de SANGEETHA.<sup>44</sup>



**Figura 7** - Diagrama representativo do Reator de Leito Embalado utilizado para produção contínua de FOS. A) Água circulante para refrigeração; B) *Reservoir* para o substrato (sacarose); C) *Reservoir* do produto (FOS); D) Bomba peristáltica.

Fonte: Adaptada de ORTIZ-SOTO<sup>48</sup>

## 1.5 HIDROLASES DE GLICOSÍDEOS

As hidrolases de glicosídeos (GH, EC 3.2.1.-) representam um extenso grupo de enzimas capazes de promover a hidrólise ou modificação da ligação glicosídica entre duas ou mais unidades de carboidrato ou entre um carboidrato e uma porção de não-carboidrato. As GHs são classificadas dentro de famílias, em um banco de dados denominado CAZy (do inglês, *Carbohydrate-Active enZymes database*), com base na semelhança de suas sequências de aminoácidos e na análise dos grupamentos hidrofóbicos.<sup>1-2</sup> Adicionalmente, essa classificação também é realizada por novos métodos que incluem análises filogenéticas das enzimas, de forma a promover a interação entre a sequência e a especificidade das mesmas e aprimorar tal divisão em subfamílias.<sup>51</sup> Atualmente, as GHs encontram-se divididas em 133 famílias.<sup>52</sup>

O potencial de aplicação destas enzimas é extremamente vasto, dentre eles, a ação catalítica das celulases e hemicelulases, atualmente bastante conhecidas e estudadas no auxílio à degradação da biomassa recalcitrante.<sup>53-54</sup> Estas enzimas são aplicadas na produção de coquetéis celulolíticos, compostos de uma variedade de enzimas GHs com diferentes especificidades e modos de ação, atuando sinergeticamente para potencializar a produção do etanol de segunda geração.<sup>7-8</sup> Assim, o emprego das GHs estende-se também à indústria alimentícia e de bens de consumo.<sup>11</sup> A Tabela 3 enumera diversas funções das GHs nos setores mencionados.

**Tabela 3** - Enzimas GHs e suas diversas aplicações industriais.

Enzima	Aplicações mais comuns
Celulase	Degradação lignocelulósica Processamento vegetal
$\beta$ -Glucanase	Degradação lignocelulósica Clareamento de sucos
$\beta$ -Glicosidase	Degradação lignocelulósica Realçamento de sabor em vinhos
Inulase	Produção de frutose e oligômeros utilizados como probióticos
Endoinulinase <sup>57</sup>	Produção de frutose e oligômeros Produção de bioetanol

Fonte: Adaptada de SATHL<sup>11</sup>

### 1.5.1 FAMÍLIAS 32 E 68 DAS HIDROLASES DE GLICOSÍDEOS

Como pode-se observar na Tabela 3, Inulases e Endoinulinases são enzimas que destacam-se devido às características biomoduladoras apresentadas por seus produtos finais de reação, conforme será demonstrado nas seções 1.5.2 e 1.5.3.<sup>9-10</sup> Estas são classificadas como pertencentes às famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos. Devido à semelhança em suas atividades, estas enzimas fazem parte do Clã-J<sup>58</sup>, envolvido na biosíntese ou hidrólise de frutanos.<sup>58,52</sup>

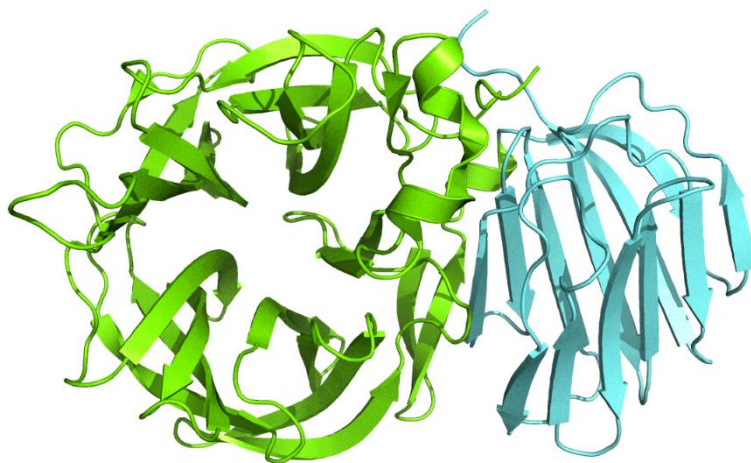
As famílias 32 e 68 das GHs abrangem parte do grupo das transferases, caracterizadas por serem enzimas que realizam a transferência de grupos funcionais de uma molécula

doadora para outra aceptora.<sup>59</sup> Assim sendo, a classificação dessas enzimas é baseada no mecanismo de transferência entre doador:receptor.<sup>60</sup> No caso das GH32 e 68, a sacarose atua como molécula doadora.<sup>40</sup>

### 1.5.2. GH32

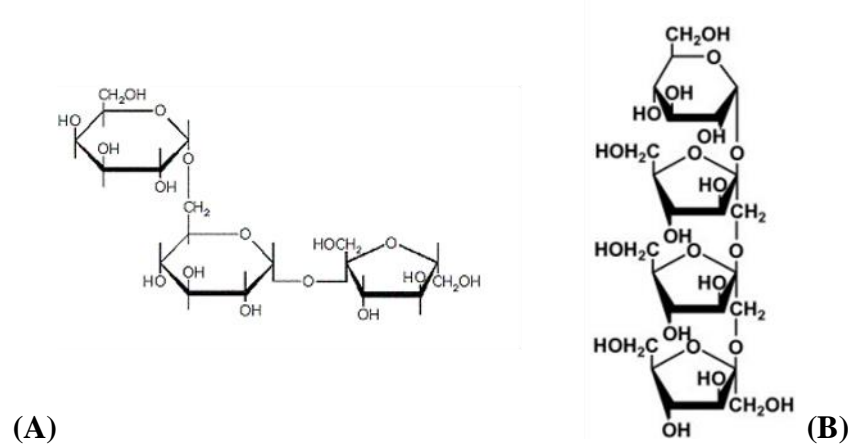
As GH32 são caracterizadas por abrangerem as invertases, exoidrolases de frutanos (FEHs) e enzimas biossintéticas de frutanos (FEBs), presentes sobretudo em plantas. As endo e exo-inulinases podem ser encontradas em fungos e bactérias, enquanto as levanases e algumas  $\beta$ -frutofuranosidases somente em bactérias.<sup>58</sup>

A primeira estrutura proteica de uma GH32 foi a  $\beta$ -frutosidase de *Thermotoga maritima* (PDB: 1W2T)<sup>61</sup> (Figura 8). A enzima  $\beta$ -frutosidase apresentou características termofílicas em relação à sua atividade enzimática de hidrólise da sacarose ou de outros açúcares como a rafinose e nistose<sup>12,14,62</sup> que apresentam suas estruturas identificadas na Figura 9.



**Figura 8** - Estrutura tridimensional da enzima  $\beta$ -frutosidase de *Thermotoga maritima*. Representação da unidade monomérica, destacando-se o módulo  $\beta$ -propeller N-terminal representado pelas cinco pás (representado em verde claro) e o C-terminal com o módulo  $\beta$ -sanduíche (representado em azul claro).

Fonte: Adaptada de ALBERTO.<sup>61</sup>



**Figura 9** - Representação esquemática dos açúcares utilizados para avaliação da atividade hidrolítica da enzima  $\beta$ -frutosidase de *Thermotoga maritima*. A) rafinose. B) nistose.

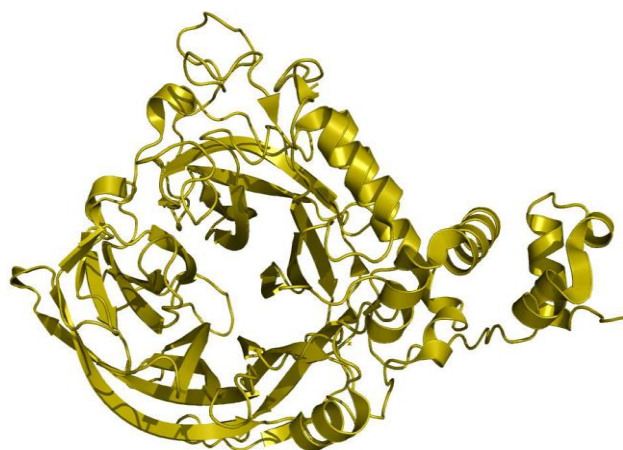
Fonte: Adaptada de LIEBL et al.;<sup>64</sup> RAFINOSE<sup>65</sup>

Posteriormente, enzimas provenientes de fungos e de plantas tiveram também suas estruturas elucidadas.<sup>52</sup> A estrutura cristalográfica das enzimas GH32 permitiram identificar diferentes conformações.<sup>58,65</sup> e dois domínios distintos: um módulo N-terminal  $\beta$ -propeller, constituído do sítio catalítico,<sup>66,18-19</sup> conectado por uma cadeia polipeptídica curta ao módulo  $\beta$ -sanduíche C-terminal.<sup>17-18</sup> Os domínios catalíticos são bastante conservados<sup>40</sup> e apresentam estrutura dimérica em sua grande maioria.<sup>66</sup>

### 1.5.3 GH68

As hidrolases de glicosídeos da família 68 são compostas basicamente por levanosucrases,  $\beta$ -frutofuranosidases e inulosucrases que apresentam características estruturais semelhantes às da família 32, sobretudo a região  $\beta$ -propeller catalítica.<sup>69</sup> Por outro lado, as enzimas da família 32 apresentam tipicamente um domínio extra C-terminal, formado por um conjunto de folhas- $\beta$  antiparalelas, resultando num enovelamento tipo  $\beta$ -sanduíche,<sup>58</sup> mais especificamente, por duas folhas  $\beta$ , formadas por 6 fitas antiparalelas.

A apresenta a primeira estrutura proteica de uma GH68 reportada, a inulosucrase de *L. johnsonii* (PDB: 2YFR).<sup>70</sup>



**Figura 10** – Estrutura tridimensional da enzima Inulosucrase de *Lactobacillus johnsonii*. Representação da unidade monomérica, destacando-se o módulo  $\beta$ -propeller N-terminal representado pelas cinco pás e C-terminal diferenciada em relação às estruturas da GH68.

Fonte: Adaptada de PIJNING.<sup>70</sup>

## A

Tabela 4 - Estruturas resolvidas e organismos da família 68 das hidrolases de glicosídeos.

Tabela 4 destaca as estruturas de GH 68 resolvidas.

**Tabela 4** - Estruturas resolvidas e organismos da família 68 das hidrolases de glicosídeos.

Nome	E.C.	Organismo	Estrutura representativa
$\beta$ -frutofuranosidade	3.2.1.26	<i>Arthrobacter sp.</i>	3VSR
levanosucrase	2.4.1.10	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	3OM2
levanosucrase	2.4.1.10	<i>Bacillus subtilis</i>	1OYG
levanosucrase	2.4.1.10	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus SRT4</i>	1W18
inulosucrase	2.4.1.9	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	2YFR

Fonte: CAZy<sup>52</sup>

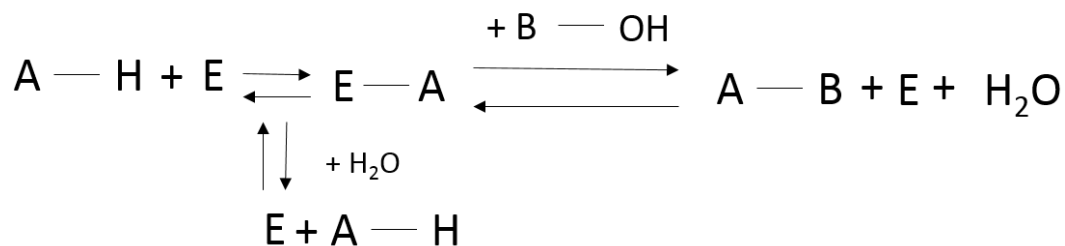


O número de enzimas da família GH68 com estruturas resolvidas ainda é bastante restrito. Isso mostra a importância da realização de mais estudos estruturais e do mecanismo de ação frente ao substrato.

#### 1.5.4 MECANISMOS DE AÇÃO FRENTE AO SUBSTRATO

As GH32 e 68 podem apresentar pelo menos dois mecanismos de reação frente ao substrato.<sup>71</sup> O primeiro trata-se da hidrólise enzimática de açúcares e o segundo da polimerização destes.<sup>58,71</sup> As  $\beta$ -frutofuranosidases ou invertases, por exemplo, são enzimas que apresentam elevado poder de hidrólise da sacarose em glicose e frutose, sendo que apresentam menor capacidade de transferência de grupos funcionais quando comparados às frutossiltransferases.<sup>68-69</sup>

As  $\beta$ -frutofuranosidases ainda possuem a característica de produzir FOS, todavia, em menores quantidades, por meio de dois mecanismos distintos: hidrólise reversa e transfrutossilacção.<sup>71</sup> Na Figura 11 é possível identificar as possíveis vias de reação enzimática.



**Figura 11** - Reação enzimática das  $\beta$ -frutofuranosidases ou invertases. Sendo A o grupo doador, B o grupo glicosil acceptor (sacarose ou um tipo de FOS), E a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase e A – B o produto final (constituído de um resíduo de frutose a mais que seu acceptor).

Fonte: Adaptada de ANTOSOVÁ.<sup>71</sup>

A reação ocorre primeiramente com a formação do complexo enzima:doador e, posteriormente, reagindo com o grupo hidroxil do acceptor. Este acceptor pode tratar-se de uma molécula de água (hidrólise) ou da sacarose (hidrólise reversa). A produção de frutooligossacarídeos, neste caso, está diretamente relacionada ao tipo de molécula acceptora. Assim sendo, o aumento na concentração de sacarose em relação à água, elevará a concentração final de frutooligossacarídeos produzidos.<sup>71</sup>

As frutossiltransferases são descritas por catalisarem a transferência de um resíduo de frutose a uma molécula de sacarose ou então a um frutooligossacarídeo. No final da reação, o produto gerado apresentará uma cadeia com uma unidade de frutose a mais que o anterior. As frutossiltransferases apresentam majoritariamente baixa afinidade por moléculas de água, assim seu poder de hidrólise não é considerado elevado e são capazes de produzirem FOS mesmo à baixas concentrações de substrato. A Figura 12 demonstra o mecanismo de ação mais comum.



**Figura 12** - Reação enzimática da grande maioria das frutossiltransferases. Sendo A – B a molécula (sacarose ou FOS) com o grupo funcional doador, E a enzima, C a molécula aceptora e A – C o produto final formado (FOS com um resíduo de frutose a mais do que inicialmente).

Fonte: Adaptada de ANTOSOVÁ.<sup>71</sup>

## CAPÍTULO 2

### Objetivos e Justificativa

---



*Este capítulo reporta os objetivos do presente trabalho e a justificativa da realização do mesmo como projeto de mestrado.*



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O desenvolvimento racional de coquetéis enzimáticos bem como a aplicação de enzimas em processos, dependem da análise e compreensão da relação estrutura-função proteica e estudos sinérgicos de componentes individuais dos preparados enzimáticos.

Os frutooligossacarídeos, produtos das frutossiltransferases, possuem diversas aplicações biotecnológicas e industriais promissoras, além de apresentarem uma grande diversidade na geração dos produtos. Por meio da utilização de técnicas de clonagem, expressão, purificação, cristalização, resolução estrutural e atividades enzimáticas de proteínas em larga escala pode-se realizar estudos sistemáticos estruturais e funcionais destas proteínas, uma vez que a grande maioria das estruturas não está disponível e a função em muitos casos ainda não é bem compreendida em nível molecular.

Assim sendo, os objetivos gerais do presente trabalho consistem na caracterização estrutural por meio da técnica de Cristalografia de Macromoléculas e na realização de estudos funcionais pela avaliação da atividade enzimática de um conjunto de enzimas das famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos, descritas como frutossiltransferases.

### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste projeto incluem:

- Clonagem dos genes em vetor de expressão;
- Transformação dos vetores em célula de propagação;
- Expressão e purificação das proteínas;
- Avaliação de termoestabilidade utilizando fluorimetria diferencial de varredura (*Thermofluor*);
- Cristalização e difração de raios X para elucidação estrutural;

- Ensaios biofísicos de Espalhamento de Raios X a baixos ângulos (SAXS), Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e *Dynamic Light Scattering* (DLS) para avaliação do comportamento das proteínas em solução;
- Caracterização funcional das proteínas por meio de análises de atividade enzimática;
- Verificação da produção de frutooligossacarídeos pelas enzimas em questão.

### 2.3 Justificativa

O presente projeto foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz, envolvendo atividades de pesquisa que buscaram contemplar uma abordagem multidisciplinar associada ao processo de elucidação dos mecanismos enzimáticos que envolvem as frutossiltransferases.

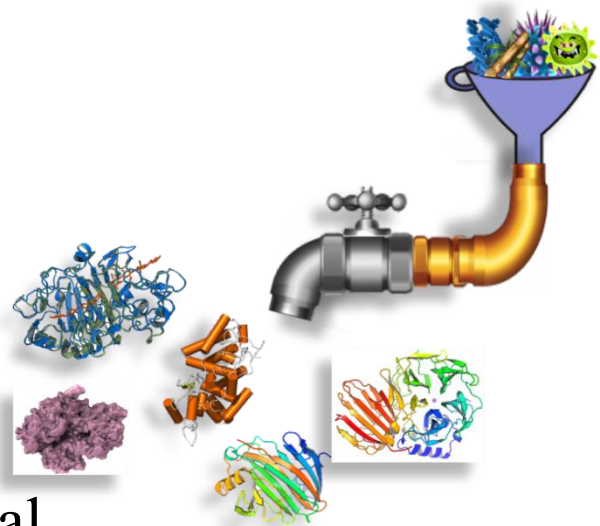
O entendimento dos mecanismos de ação das frutossiltransferases tem importância para bioquímica estrutural básica, procurando-se entender os mecanismos que regem a produção de frutooligossacarídeos em diferentes organismos. Desta forma, destaca-se a necessidade e importância do estudo abrangente dessas enzimas (13 no total) de organismos diferentes, englobando tanto enzimas de fungos quanto de bactérias. Esse estudo contribuiu com novas informações estruturais para um melhor entendimento dos mecanismos que regem a produção de frutooligossacarídeos.

Os produtos gerados nos processos supracitados possuem a utilização estabelecida em diferentes campos da biotecnologia e diversas aplicações na medicina, farmácia e nas indústrias alimentícias e sucroalcooleiras.<sup>73</sup> Mais especificamente, eles agem melhorando a base da dieta alimentar humana. Nesse contexto, obter conhecimentos relacionados ao comportamento dos microorganismos durante o processo de fermentação, assim como a sua ação enzimática, torna possível o aprimoramento de métodos, a otimização, modificação e controle dos processos.

## CAPÍTULO 3

# Metodologia, Resultados e Discussão da Triagem Inicial

---



*Neste capítulo, apresenta-se a Metodologia e os Resultados empregados na realização da Triagem Inicial das enzimas além da Discussão para prosseguimento na caracterização estrutural e funcional das mesmas.*





### 3 Realização da Triagem inicial pelo método *High-throughput screening*

#### 3.1 Metodologia da Triagem inicial

##### 3.1.1 Procedência das cepas para obtenção do gene de interesse

Inicialmente, treze genes de diferentes organismos apresentados como pertencentes às famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos (*frutossiltransferases*) e que encontravam-se disponíveis na biblioteca de nosso laboratório foram selecionados conforme a tabela apresentada abaixo.

**Tabela 5** - Apresentação dos genes clonados, família das hidrolases de glicosídeos a que pertencem, organismos e código utilizado pelo laboratório

Gene	Família	Organismo	Código
BLi04016 or BL03892 (SacA)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BLAgh32
BAD_1325	GH32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Babadgh32
BLi02827 / BL03120 (SacC)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BLCgh32
BLi04178 or BL01929 (SacAB)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BLABgh32
LGAS_1779	GH32	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 / ATCC 33323	Lggh32
BLi03707 or BL03606	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	Blgh32
BAD_1150	GH32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Bagh32
Htur_4088	GH32	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	Htgh32
Fructosyltransferase	GH32	<i>Aspergillus sydowii</i>	Asgh32
putative intracellular invertase	GH32	<i>Aspergillus niger</i>	Angh32
BLi03706 or BL02216 (SacB)	GH68	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BLBgh68
levansucrase (LevG)	GH68	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20077	Lggh68
Htur_4097	GH68	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	Htgh68

Fonte: Elaborada pela autora

A partir do genoma dos mesmos previamente depositados no NCBI, identificaram-se os genes responsáveis pela expressão dessas proteínas, objetos de estudo no presente trabalho.

### 3.1.2 Clonagem dos genes de interesse

Os genes das 13 enzimas descritos na tabela acima foram clonados pelo, na época, pós-Doutorando do grupo de Biotecnologia Molecular, Dr. César Moisés Camilo, utilizando-se o método de Clonagem Independente de Ligação (LIC)<sup>71-72</sup> em vetor pET-Trx, modificado e gentilmente cedido pelo Dr. Arie Geerlof (EMBL, Hamburgo - Alemanha). Por este método, não se faz necessária a utilização de enzimas de restrição nem de ligação. Em relação ao vetor, além deste estar preparado para clonagem pelo método LIC, também acrescenta à proteína alvo um domínio tiorredoxina e uma cauda de histidinas, bem como confere resistência ao antibiótico canamicina à célula bacteriana. O domínio tiorredoxina, pelo seu poder redutor, auxilia a evitar agregações causadas por ligações dissulfeto entre as enzimas. A cauda de histidina permite a purificação por afinidade.

### 3.1.3 Preparação de células *E. coli* competentes

Para que as bactérias estivessem aptas a receber o vetor, um tratamento prévio das mesmas fez-se necessário. Inoculou-se a estirpe da bactéria a partir do estoque glicerinado em placa contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido sem antibiótico. Posteriormente, incubou-se a mesma em estufa à 37 °C por 12 horas. Uma colônia isolada da placa foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido sem antibiótico por 12 horas à 37 °C sob agitação a 180 rpm. Transferiu-se 5 mL da cultura para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido LB sem antibiótico. Incubou-se a cultura a 37 °C e 180 rpm até que a  $DO_{600\text{ nm}}$  atingisse a faixa entre 0,5 e 0,7. A cultura foi centrifugada a 3000 rpm, 4 °C por 5 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensão em 20 mL de tampão 100 mM de  $MgCl_2$ . A amostra foi novamente centrifugada utilizando-se as mesmas condições anteriores e ressuspensão em 50 mL de tampão 100 mM de  $CaCl_2$ . A solução foi incubada no gelo por 20 minutos e posteriormente centrifugada. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão 100 mM de  $CaCl_2$  e 5% glicerol, aliquotadas e estocadas à -80 °C.

### 3.1.4 Transformação em *E. coli* quimio-competentes

Para inserção dos vetores em célula bacteriana empregou-se o seguinte protocolo: em 10 µL de solução contendo os plasmídeos (0,1 µg), foram adicionados 40 µL de tampão de transformação (1 mL KCM 10x – 1M de KCl, 0,3 M CaCl<sub>2</sub>, 0,5 M MgCl<sub>2</sub>; 1,5 mL PEG 10% 4000 m/L; 7,5 mL água *mili-Q* autoclavada) e 50 µL de células competentes (*E. coli Rosetta*). A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e posteriormente à temperatura ambiente por 10 minutos para o choque térmico. Meio LB foi adicionado à mesma (1 mL) (*Luria-Bertani* – 10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) e incubada por 1 hora a 100 rpm, 37 °C. Meio ágar sólido foi preparado para o isolamento dos transformantes adicionando-se os antibióticos nas seguintes concentrações: cloranfenicol: 35 µg/mL e canamicina: 50 µg/mL. 200 µL de amostra foram espalhados em 20 mL de meio com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubado *overnight* à 37 °C.

### 3.1.5 Expressão heteróloga em larga escala das proteínas fusionadas com cauda His-Trx

Tendo-se selecionado algumas colônias crescidas em meio ágar sólido posteriores à transformação, realizou-se um pré-inóculo a fim de se prosseguir com a realização da etapa de expressão das proteínas em maior escala, utilizando-se para tanto, 5 mL de meio LB (*Luria-Bertani* – triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) suplementado com antibióticos nas seguintes concentrações: cloranfenicol: 35 µg/mL e canamicina: 50 µg/mL. A expressão em maior escala foi realizada em meio autoindução (3,3 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,8 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,1 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 g/L de glicerol; 0,5 g/L de glicose; 2 g/L de lactose; 10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura<sup>76</sup>), em frascos contendo 1 litro de meio cada, também suplementados com os antibióticos nas concentrações descritas anteriormente. Esta foi realizada sob agitação de 100 rpm em *shaker* (*Incubator shaker 4430, New Brunswick Scientific, EUA*) a 37 °C até que fosse atingida a densidade óptica entre 0,5 - 0,6 à 600 nm e depois diminuiu-se a temperatura para 17 °C *overnight*. As proteínas foram expressas na forma recombinante com uma cauda contendo 6 histidinas acopladas à tioredoxina fusionadas

à região N-terminal. Após este processo, a massa celular obtida, foi centrifugada à 6000 rpm, por 20 minutos e numa temperatura de 4 °C para obtenção do *pellet* celular.

### 3.1.6 Obtenção das proteínas de interesse na presença de cauda His-Trx

Após obter-se o *pellet* celular, este foi ressuspenso em 50 mL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM de imidazol; 10% glicerol) para cada litro de meio de cultura seguido da adição em suas respectivas concentrações, de lisozima (0,2 mg/mL), PMSF (0,02 mM) e DTT (2 mM). As células da suspensão foram rompidas por sonicação por um período de 5 minutos, composto por ciclos de 30 segundos de sonicação seguido por 30 segundos de descanso. Esta foi centrifugada à 18.000 rpm, por 20 minutos a 4 °C para separação da fração solúvel contendo a proteína e da fração insolúvel da mesma.

### 3.1.7 Purificação das proteínas de interesse na presença de cauda His-Trx

Para a primeira etapa de obtenção da proteína pura, utilizou-se a técnica de cromatografia por afinidade, devido a presença da cauda His-Trx às enzimas. Desta forma, após o preparo da amostra, as proteínas foram submetidas à purificação, utilizando-se resina cromatográfica contendo íon níquel Ni Sepharose da GE Healthcare®, seguindo-se o seguinte protocolo: lavagem da coluna com 20 VC (volumes de coluna) de água *mili-Q*, equilíbrio da mesma com 10 VC em tampão (50 mM Tris 7,5; 500 mM de NaCl; 10 mM de imidazol), lavagens com 5 VC em tampão (50 mM Tris 7,5; 500 mM de NaCl) e eluição dos contaminantes com 30 mM de imidazol, eluição da enzima alvo com 150 mM de imidazol e limpeza da coluna com 500 mM de imidazol. As alíquotas da purificação foram analisadas utilizando-se gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE e corados com *Comassie Blue* para averiguação da migração das bandas e descoloração em solução 10% de Ácido acético.

### 3.1.8 Clivagem da cauda His-Trx

A fração eluída em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 150 mM de imidazol) contendo a proteína com cauda His-Trx e purificada em coluna de níquel, foi diluída 4 vezes em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) para a adição de aproximadamente 1 mg de TEV (*Tobacco Etch Virus*) para cada 50 mg de proteína<sup>77</sup> fusionada a His-Trx fosse clivada.

Posteriormente à clivagem da cauda, uma segunda purificação foi realizada em resina cromatográfica contendo íon níquel Ni Sepharose da GE Healthcare® visando-se separar a enzima clivada das que não foram pela protease TEV utilizando-se o seguinte protocolo: lavagem da coluna com 20 VC de água *mili-Q* seguido por equilíbrio com 10 VC de tampão (50 mM Tris 7,5; 125 mM de NaCl; 20 mM de imidazol), eluição da enzima clivada (50 mM Tris-HCl pH 7,5) e 2 VC de tampão (50 mM de Tris-HCl; 150 mM NaCl; 500 mM de imidazol) para eliminação da amostra de proteína não clivada pela TEV. As alíquotas foram também observadas utilizando-se gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE, corados com *Comassie Blue* para averiguação da migração das bandas e descoloração em solução 10% de Ácido acético.

### 3.1.9 Cromatografia de Exclusão por Massa Molecular

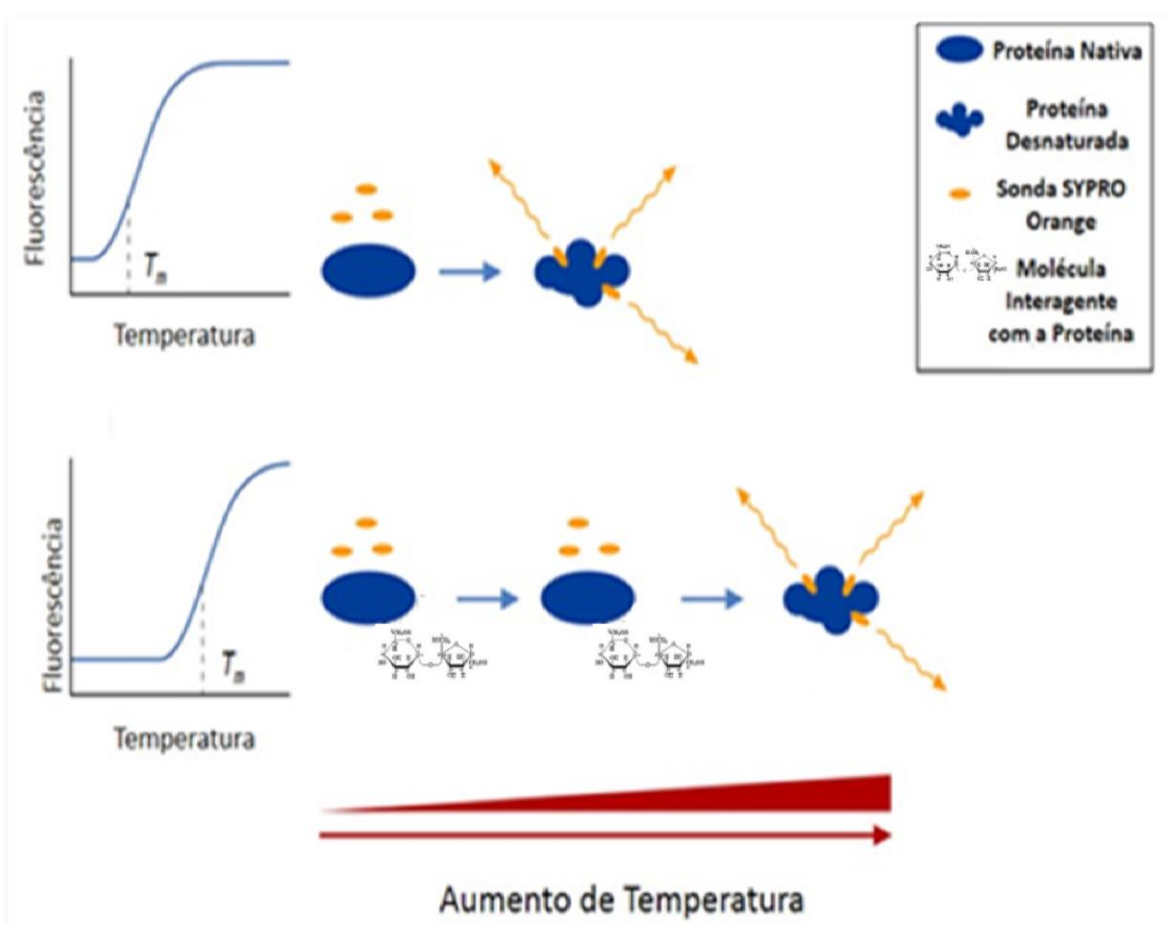
As amostras parcialmente purificadas da etapa anterior foram reunidas e concentradas até cerca de 5 mg/mL para realização da Cromatografia de Exclusão por Massa Molecular em coluna Superdex 200 16/60 (GE® Healthcare) acoplada ao cromatógrafo Äkta Purifier (Pharmacia Biotec/GE, EUA) em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Uma eluição isocrática utilizando um volume de coluna total, fluxo de 1 mL/min de tampão e monitoramento a 280 nm por espectrofotometria foi realizada. As frações de proteína eluídas da coluna foram coletadas e analisadas por gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE.

### 3.1.10 Fluorimetria diferencial de varredura (*ThermoFluor*)

Após a realização de um *screening* inicial e identificação das proteínas solúveis, buscou-se a determinação das melhores condições de estabilidade das proteínas por meio da escolha do tampão que lhes conferissem tal característica. A manutenção das amostras proteicas em condições de maior estabilidade pode auxiliar até mesmo no processo de

cristalização<sup>78</sup>. Para isso, realizou-se o experimento de fluorimetria diferencial de varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*), também conhecida como *ThermoFluor*<sup>78</sup>.

Essa técnica consiste na análise da temperatura em que ocorre a desnaturação de uma proteína pela medida do aumento da fluorescência de uma sonda, que possui afinidade por regiões hidrofóbicas da proteína e que são expostas somente quando a mesma está desenovelada. Isso permite o cálculo da temperatura do ponto médio de transição da curva de desnaturação ou, ponto médio da curva de *melt* (Temperatura de *melt* –  $T_m$ ) da fase enovelada para a desenovelada da proteína (Figura 13).



**Figura 13** - Esquema representativo do experimento *ThermoFluor*. Na primeira figura, identifica-se o aumento de fluorescência em relação à temperatura a medida que as regiões hidrofóbicas das proteínas são expostas e ligadas à sonda. Na segunda figura, pode-se visualizar a interação do ligante de interesse com a proteína e devido a isso um aumento na temperatura de *melt*ing da mesma.

Fonte: Adaptada de McCoy<sup>79</sup>

O experimento foi realizado com o auxílio da Pós-Doutoranda do grupo Dra. Amanda Bernardes Muniz e além de identificar as melhores condições tamponantes, a influência pH e

da concentração de NaCl, também visou-se encontrar possíveis ligantes para a mesma e possíveis moléculas aditivas<sup>78</sup>.

As medidas foram feitas em um equipamento CFX96 *Real-Time System* (Bio-Rad), disponível em nosso laboratório. As proteínas puras em concentrações finais de 1,5 mg/mL foram incubadas com os diferentes tampões para posterior análise. Logo após a adição da sonda *SYPRO orange* (Invitrogen), em uma diluição final de 1:2000, foram realizadas as medidas, que para a detecção da fluorescência, a excitação ocorre à 473 nm e a emissão à 570 nm. As amostras foram aquecidas passando por um intervalo de temperatura de 25 °C a 90 °C. Todas as medidas foram feitas em triplicata para cada molécula testada. A análise das curvas de desnaturação da proteína e obtenção do valor de  $T_m$  foi realizada para posterior comparação obtida utilizando o programa *Origin (OriginLab)* e a planilha Excel *DSF analysis tool*.

### 3.1.11 Ensaio de Cristalização

Dando continuidade à realização dos experimentos, obteve-se as enzimas em questão purificadas em tampão que lhes conferiam maior estabilidade. Assim sendo, estas foram concentradas em concentrador Milipore® e submetidas ao teste de pré-cristalização (baseados em PCT™ *Pre-Crystallization Test*, HAMPTON Research). Estes consistem na prévia análise e determinação empírica de uma concentração protéica adequada para possível obtenção de cristais. O teste consiste na utilização de 4 soluções, a saber: 1 - 0,1 M de Tris pH 8,5 e 20% PEG 3350; 2 - 0,1 M Tris pH 8,5 e 40% PEG 3350; 3 - 0,1 M Tris pH 8,5 e 1,4 M de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,1 M Tris pH 8,5 e 3,2 M de  $(NH_4)_2SO_4$ . Adiciona-se então à uma lâmina, 1 µL de cada solução em diferentes gotas e a cada uma delas, 1 µL de solução contendo a proteína concentrada, a fim de se verificar se a proteína encontrava-se em concentração adequada. Para tanto, analisa-se a precipitação da mesma nas gotas de maior concentração de precipitante (soluções 3 e 4) e a não precipitação nas soluções de menor concentração (1 e 2). Caso haja precipitação em pelo menos uma das soluções 3 ou 4 e não precipitação em 1 ou 2, há um indício de que tal concentração é adequada para a cristalização da proteína.

Posteriormente à realização dos testes de pré-cristalização, procedeu-se à triagem de mais de mil condições por meio do robô de cristalização Gryphon (*Art Robbins Instrumens*, Califórnia, EUA) utilizando-se o método de matriz esparsa e difusão de vapor em gota sentada (*sitting drop*) com kits comerciais (Index HT, Crystal Screen, Salt RX, PEG I e II,

*Hampton Research*; PACT, JCSG e MIDAS, *Molecular Dimensions*) com concentrações de solução proteica e solução de poço, nesta ordem, de 1:1, 1:2 e 2:1. As placas de cristalização foram armazenadas em hotel de cristalização (Formulatrix, EUA) numa temperatura de 18 °C para que posteriormente fosse averiguada em períodos de 7 em 7 dias, a formação de cristais.

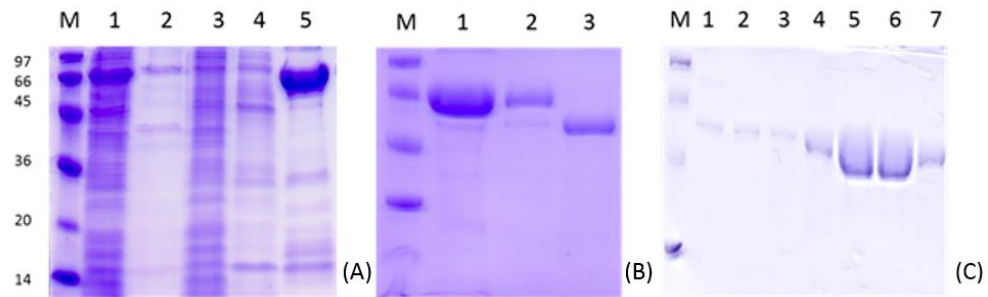
### 3.2 Resultados e Discussões da Triagem Inicial de enzimas

Posteriormente à seleção dos 13 genes das famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos, descritas como frutossiltransferases, as mesmas foram clonadas com sucesso pelo método LIC<sup>74</sup>. Da mesma forma, a transformação em bactérias quimio-competentes *E. coli Rosetta* apresentou colônias crescidas em meio àgar sólido para que se pudesse prosseguir à realização da expressão das proteínas seguida pela purificação das mesmas, avaliando-se a solubilidade e rendimento qualitativo (em gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE) de cada uma delas.

Os tampões utilizados nestas etapas de purificação (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, concentrações de 30, 150 e 500 mM de imidazol; 50 mM HEPES pH 7,5 e 150 mM NaCl para cromatografia de exclusão por massa molecular) foram inicialmente empregados para que se pudessem realizar as purificações das 13 enzimas e posterior avaliação do melhor tampão para aumento e melhoria da estabilidade de cada uma evidenciado pela técnica *ThermoFluor*.

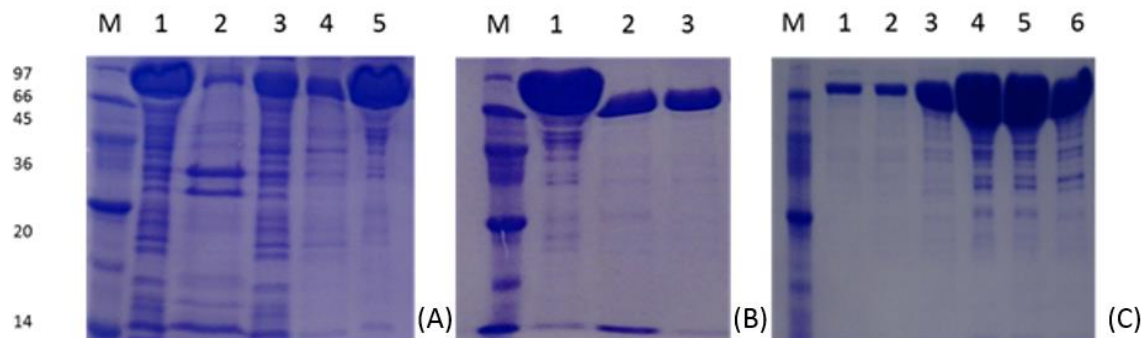
A maior parte das enzimas apresentou-se solúvel, com a presença de bandas intensas nos géis SDS-PAGE conforme pode-se evidenciar pelos resultados do *screening* inicial das etapas de purificação.





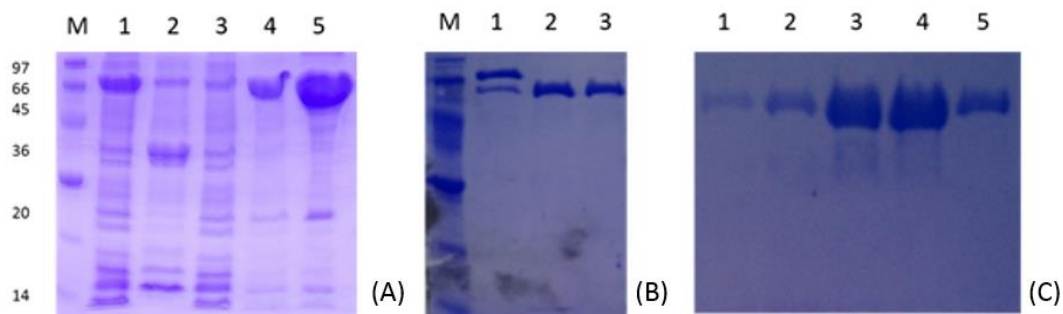
**Figura 14** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BlaGH32* do organismo *Bacillus licheniformis*, gene BLi04016 or BL03892 (SacA). (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-pellet celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) para clivagem da cauda His-Trx com TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada com a protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); linhas 1 à 7-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



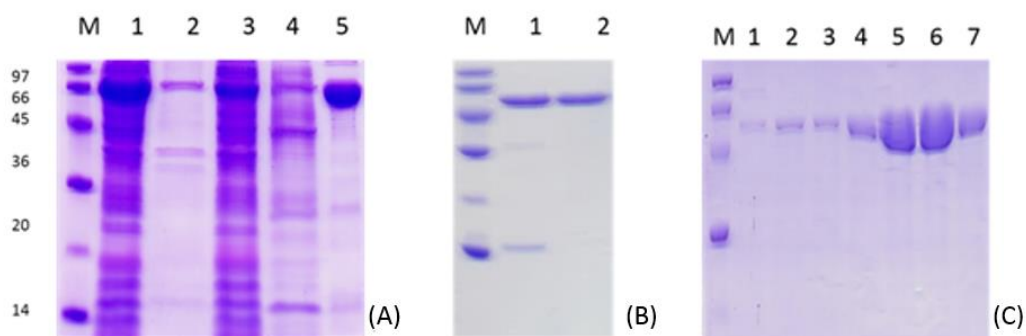
**Figura 15** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BabadGH32* do organismo *Bifidobacterium adolescentis*, gene BAD\_1325. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-pellet celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) e com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); linhas 1 à 6-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



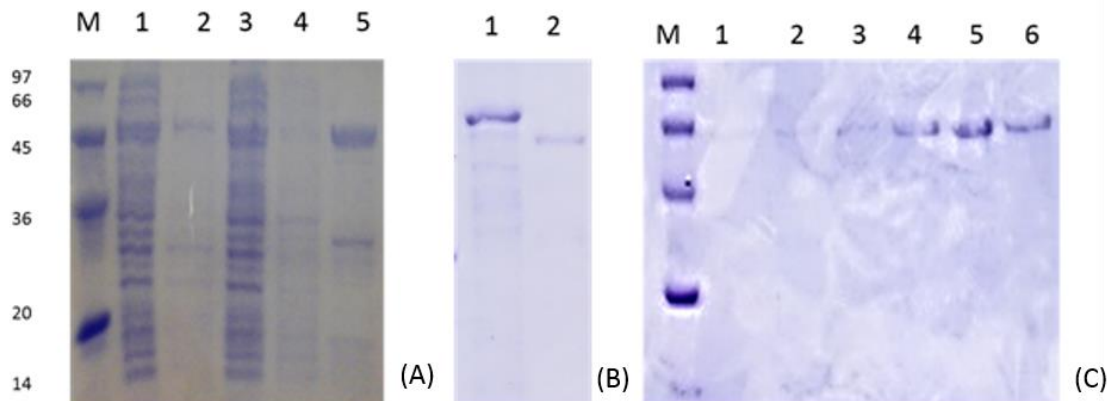
**Figura 16** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BlabGH32* do organismo *Bacillus licheniformis*, gene BLi04178 or BL01929 (SacAB). (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) e com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) 1 à 5-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborado pela autora



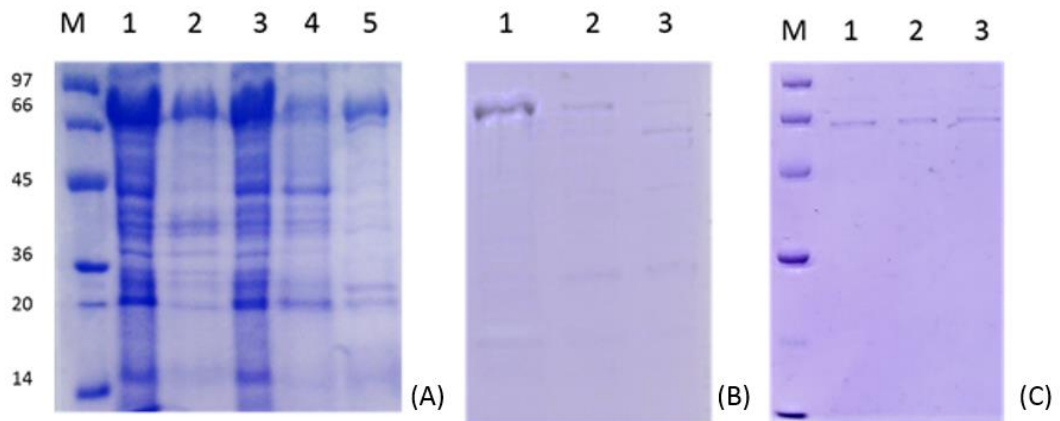
**Figura 17** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *LgGH32* do organismo *Lactibacillus gasserii*, gene LGAS\_1779. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) e com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV; linha 2- fração diluída, com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); 1 à 7-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



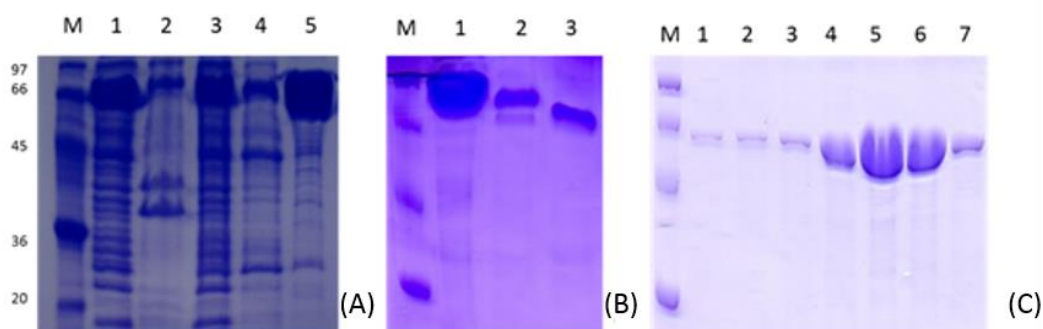
**Figura 18** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *HtGH68* do organismo *Haloterrigena turkmenica*, gene *Htur\_4097*. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-pellet celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol linha 2- fração diluída, com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); 1 à 6-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



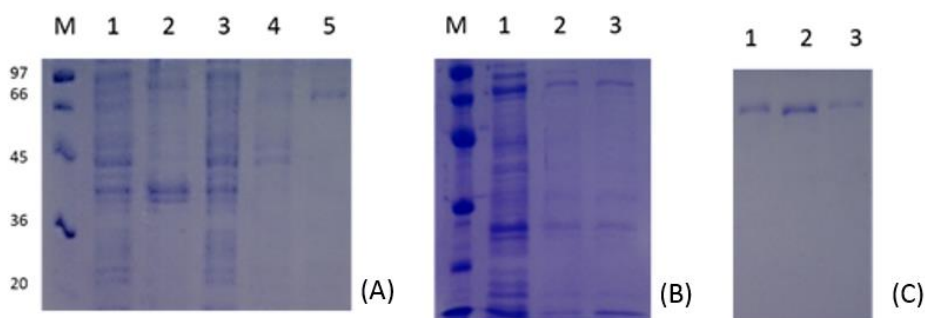
**Figura 19** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BIGH32* do organismo *Bacillus licheniformis*, gene *BLi03707* or *BL03606*. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-pellet celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) e com a cauda His-Trx; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada pela protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); 1 à 3-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.



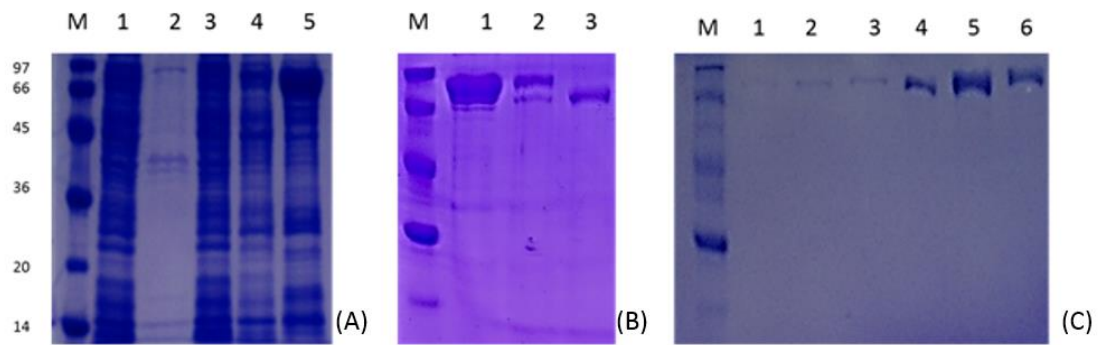
**Figura 20** -Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BaGH32* do organismo *Bifidobacterium adolescentis*, gene BAD\_1150. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) para clivagem da cauda His-Trx com TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada com a protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); linhas 1 à 7-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



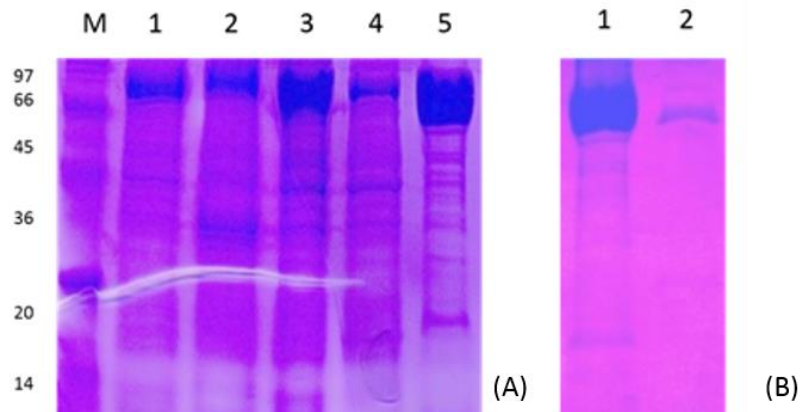
**Figura 21** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *AsGH32* do organismo *Aspergillus sydowii*, gene denominado frutossiltransferase. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) para clivagem da cauda His-Trx com TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada com a protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); linhas 1 à 3-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 22**– Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *AnGH32* do organismo *Aspergillus niger*, gene denominado *putative 67ntracelular invertase*. (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) para clivagem da cauda His-Trx com TEV; linha 3-fração diluída, com a cauda His-Trx clivada com a protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez. (C) M-marcador de massa molecular (kDa); linhas 1 à 6-frações eluídas contendo a proteína de interesse a partir da realização da cromatografia de exclusão por massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 23** - Eletroforese em gel SDS-PAGE das etapas de purificação da enzima *BlcGH32* do organismo *Bacillus licheniformis*, gene BLi02827 / BL03120 (SacC). (A) M-marcador de massa molecular (kDa); linha 1-extrato bruto solúvel obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 2-*pellet* celular obtido a partir da expressão em células *E. coli* Rosetta recombinante TrxA após indução *overnight*; linha 3-fração não-ligada à resina de níquel; linha 4-fração lavagem eluída em tampão com 30 mM de imidazol; linha 5-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão contendo 150 mM de imidazol. (B) linha 1-fração eluída contendo a proteína de interesse em tampão 150 mM de imidazol; linha 2-fração contendo a proteína de interesse diluída 4x em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5) com a cauda His-Trx clivada com a protease TEV e purificada em coluna de níquel pela segunda vez.

Fonte: Elaborada pela autora

A enzima da família 32 evidenciada no presente trabalho (Figura 23) como BlcGH32 de *Bacillus licheniformis*, mostrou-se bastante instável em relação às demais, dada a sua elevada precipitação ao tentar concentrá-la. Da mesma maneira, a enzima da família 32 identificada como *HtGH32* e da família 68 como *LgGH68* e *HtGH32* apresentaram-se muito pouco solúveis em relação às outras. Por isso, partiu-se para a continuidade dos experimentos com as 9 enzimas restantes.

### 3.2.1 Análises de *ThermoFluor*

A partir dos resultados obtidos da expressão e purificação das enzimas em questão, pode-se dar continuidade à realização dos experimentos biofísicos, como a análise da estabilidade das proteínas pelo método de fluorimetria diferencial de varredura (*ThermoFluor*).

Os dados reportados na Tabela 6 demonstram a relação das diferentes soluções tamponantes e pHs, acrescidos ou não de NaCl, a fim de se avaliar a estabilidade estrutural das enzimas frente ao desenovelamento por influência do aumento da temperatura.

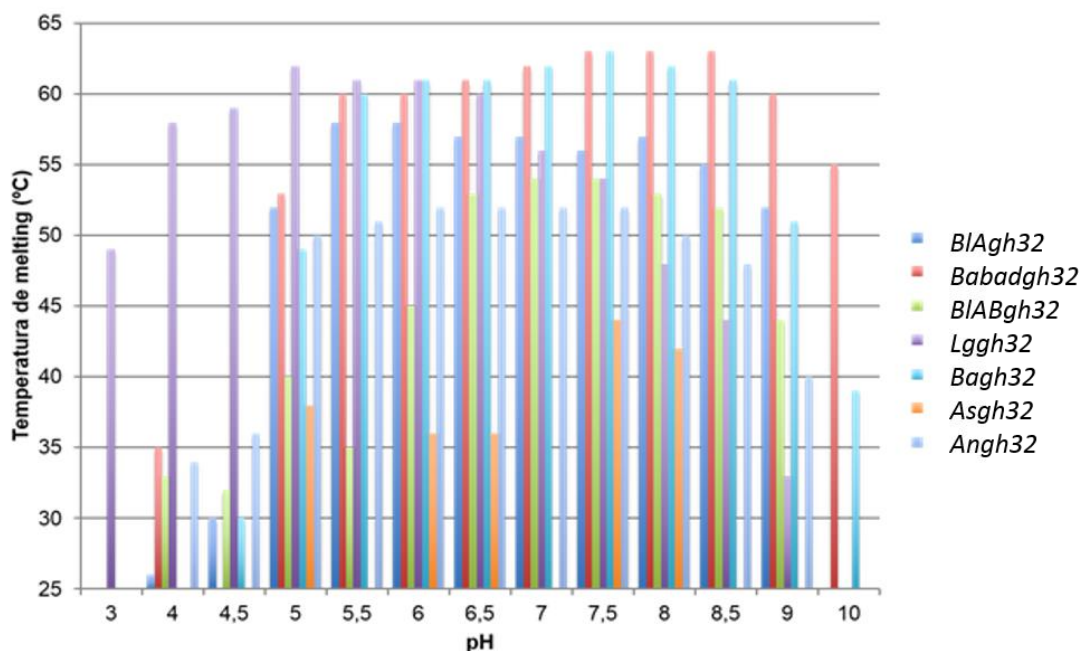
**Tabela 6** - Avaliação da estabilidade das enzimas pela técnica *Thermofluor* por meio da variação do pH e concentração de sal. A graduação de cores reporta os diferentes graus de estabilidade ao longo do processo avaliativo, do menos estável (vermelho escuro) para o mais estável (verde escuro). Os tracejados tratam-se de tampões que não foram avaliados ou não apresentaram boas avaliações.

Condição*	Temperatura de melting (°C)						
	BLAGH32	BABADGH32	BLABGH32	LGGH32	BAGH32	ASGH32	ANGH32
Água	54	-	52	56	60	41	52
HCl pH 1,2	-	-	-	-	-	-	-
HCl pH 2,0	-	-	-	34	-	-	-
Ácido Cítrico pH 3,0	-	-	-	49	-	-	-
Citrato de Sódio pH 4,0	-	35	33	58	-	-	34
Acetato de Sódio pH 4,5	-	-	32	59	30	-	36
Citrato de Sódio pH 4,7	51	46	35	61	42	-	43
Acetato de Sódio pH 5,0	48	53	40	61	40	36	46
Fosfato de Potássio pH 5,0	52	-	35	62	49	38	50
Citrato de Sódio pH 5,5	58	60	-	61	60	-	49
Fosfato de Sódio pH 5,5	58	-	-	61	60	-	51
Mes pH 5,8	53	-	45	62	55	-	52
Fosfato de Potássio pH 6,0	58	60	45	58	61	-	52
Bis-Tris pH 6,0	55	-	36	61	58	36	51
Mes pH 6,2	56	59	31	61	58	-	51
Fosfato de Sódio pH 6,5	57	-	44	53	60	-	50
Cacodilato de Sódio pH 6,5	57	-	45	56	61	-	52
Bis-Tris pH 6,5	57	61	53	56	61	-	52
Mes pH 6,5	57	-	38	60	60	36	52
Bis-Tris pH 6,7	56	61	51	58	61	-	51
Fosfato de Potássio pH 7,0	57	62	54	50	60	-	49
Hepes pH 7,0	57	61	53	56	61	-	52
Bis-Tris pH 7,0	56	-	53	56	62	-	51
Acetato de Amônio pH 7,3	57	-	54	55	62	41	50
Fosfato de Sódio pH 7,5	55	-	50	46	58	44	48
Tris pH 7,5	56	63	54	54	63	-	52
Imidazol pH 8,0	55	-	51	45	60	-	47
Hepes pH 8,0	56	61	52	45	60	42	48
Tris pH 8,0	56	63	53	48	62	42	50
Bicina pH 8,0	57	62	52	43	59	-	46
Tris pH 8,5	55	63	52	44	61	-	48
Bicina pH 9,0	52	60	44	33	51	-	40
Carbonato de Sódio pH 9,5	-	53	-	-	42	-	-
Carbonato de Sódio pH 10,0	-	55	-	-	39	-	-
Ácido Cítrico pH 3,0 + NaCl	-	-	-	48	-	-	-
Acetato de Sódio pH 4,5 + NaCl	-	38	-	57	-	-	-
Fosfato de Potássio pH 5,0 + NaCl	50	-	-	63	34	-	45
Bis-Tris pH 5,5 + NaCl	-	-	-	62	29	-	41
Citrato de Sódio pH 5,5 + NaCl	58	57	-	63	56	-	51
Mes pH 5,8 + NaCl	55	-	-	63	52	-	50
Bis-Tris pH 6,0 + NaCl	56	57	-	62	56	-	51
Cacodilato de Sódio pH 6,5 + NaCl	58	-	40	57	60	-	51
Fosfato de Sódio pH 6,5 + NaCl	58	-	42	56	60	-	51
Bis-Tris pH 7,0 + NaCl	57	-	50	55	60	-	51
Hepes pH 7,0 + NaCl	58	60	45	56	60	-	51
Acetato de Amônio pH 7,3 + NaCl	57	-	45	54	60	-	50
Tris pH 7,5 + NaCl	57	61	50	53	61	-	52
Hepes pH 8,0 + NaCl	55	58	50	43	59	-	48

\*Cada condição descreve o sal que compõe o tampão em uma concentração final de 100 mM e a presença ou não de 300 mM NaCl.

Fonte: Elaborada pela autora

A Tabela 6 apresenta os valores de  $T_m$  para cada condição e para cada enzima analisada, o que mostra como cada enzima comportou-se frente aos diferentes tampões, pHs e concentrações de NaCl. Por meio dela, obteve-se um gráfico em forma de barra em que buscou-se avaliar de outra forma, melhores condições de estabilidade enzimática se distribuíam em relação a variação de pH.



**Figura 24** - Esquema de avaliação da estabilidade enzimática em relação à variação de pH.

Fonte: Elaborada pela autora

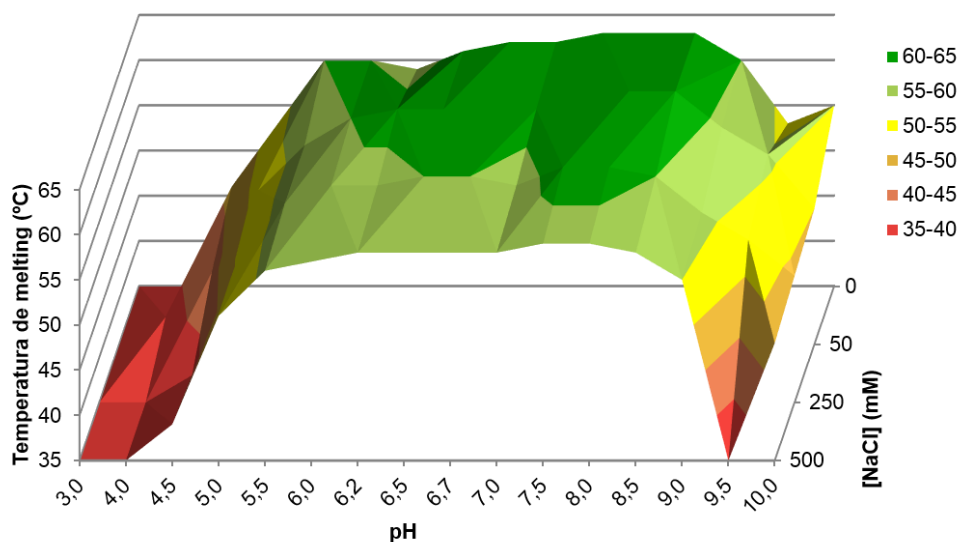
A partir da tabela e do gráfico apresentados, foi possível verificar que a maioria das enzimas analisadas apresentam altos valores de  $T_m$ , o que sugere a alta estabilidade dessas proteínas. Adicionalmente, essa alta estabilidade, na maioria, se estende a um grande intervalo de pHs, confirmando assim o potencial de aplicação tecnológica dessas enzimas. Mais especificamente podemos destacar algumas características importantes em relação à estabilidade das enzimas:

- As enzimas *BLAGH32*, *BABADGH32*, *LGGH32*, *ANGH32* apresentaram-se bastante estáveis em tampão com pH próximo à 7,5 e com concentrações consideráveis de NaCl;



- A enzima *LGGH32* apresentou um perfil um pouco diferente das outras enzimas que possuíam preferência por pHs mais básicos. Essa enzima exibiu um comportamento mais acidófilo, com estabilidade até mesmo em pHs extremamente ácidos (pH 3 e 4);
- As enzimas *BLABGH32* e *BAGH32* elegeram as menores concentrações de sal, sendo assim, procedeu-se à utilização da concentração mínima nas etapas de purificação, a fim de não se danificar as colunas e evitar interações inespecíficas com a mesma;
- Diferentemente das demais que se apresentaram estáveis em tampão Tris-HCl, a enzima *ASGH32*, além de apresentar valores de  $T_m$  menores e, conseqüentemente, menos estável, apresentou preferência para o tampão fosfato de sódio pH 7,5 e baixas concentrações de NaCl.

Em relação à enzima *BABADGH32*, foi possível verificar que a mesma apresenta altos valores de  $T_m$ , chegando a 63 °C e, ainda, estabilidade razoável em pH extremamente básico (pH10). Observamos também que na presença de NaCl, mesmo em condições tamponantes semelhantes, ocorria uma diminuição da estabilidade térmica da enzima. Para melhor averiguar a influência do NaCl, realizou-se também um experimento de varredura, em diferentes pHs, de concentrações de NaCl e que está representada por um gráfico de superfície (Figura 25).



**Figura 25** - Análise da estabilidade térmica da enzima *BABADGH32* em função da variação da concentração de pH e NaCl, pela técnica *Thermofluor*.

Fonte: Elaborada pela autora

No gráfico de superfície da Figura 25, as regiões apresentadas em verde são as mais favoráveis e com maiores valores de  $T_m$ . Em amarelo a laranja, as intermediárias e em vermelho as de menor valor.

Tendo em vista que moléculas aditivas, poderiam se comportar como ligantes ou cofatores das enzimas, gerando assim uma estabilização adicional na estrutura proteica, realizou-se também, para a enzima *BABADGH32* o experimento de *ThermoFluor* com a adição de diversos aditivos (96 condições diferentes) presentes no *kit Additive Screen HT* (Hampton Research). Esse conjunto de soluções explora a adição de metais multivalentes, sais, amino ácidos, agentes redutores e quelantes, entre outros. A adição de muitas dessas moléculas resultou em um aumento do valor de  $T_m$  da proteína, entretanto, a amostra acrescida com o carboidrato sacarose garantiu a enzima um aumento significativo de seu  $T_m$ , cerca de 5 °C. Isso é esperado, uma vez que é sabido que essas enzimas são ativas em carboidratos e, principalmente, por se tratar do substrato descrito e amplamente utilizado para essas enzimas.<sup>80</sup>

Em relação à concentração de NaCl nas amostras, identificou-se que a maior parte das enzimas (*Blagh32*, *Babadgh3232*, *Lggh32* e *Angh32*) apresentaram um aumento na estabilidade em solução com o aumento na quantidade de sal. Isto deve-se sobretudo aos íons do sal serem altamente hidratados, favorecendo assim o aumento da camada de hidratação da molécula, aumentando sua estabilidade.

Os experimentos de *ThermoFluor* foram também realizados com as enzimas *HTGH68* e *BLGH32*. Estas, no entanto, apresentaram a ligação da sonda e fluorescência ainda na avaliação à baixas temperaturas, indicando a exposição dos resíduos hidrofóbicos das mesmas. Isto pode inferir o prévio desenovelamento dessas enzimas.

Com base nos resultados apresentados e previamente analisados, partiu-se para a realização dos experimentos específicos com as 7 enzimas que obtiveram resultados conclusivos em relação aos dados de *ThermoFluor*.

### 3.3 Escolha dos alvos

De acordo com a Tabela 7, pode-se avaliar os avanços dos estudos realizados na triagem inicial das amostras:

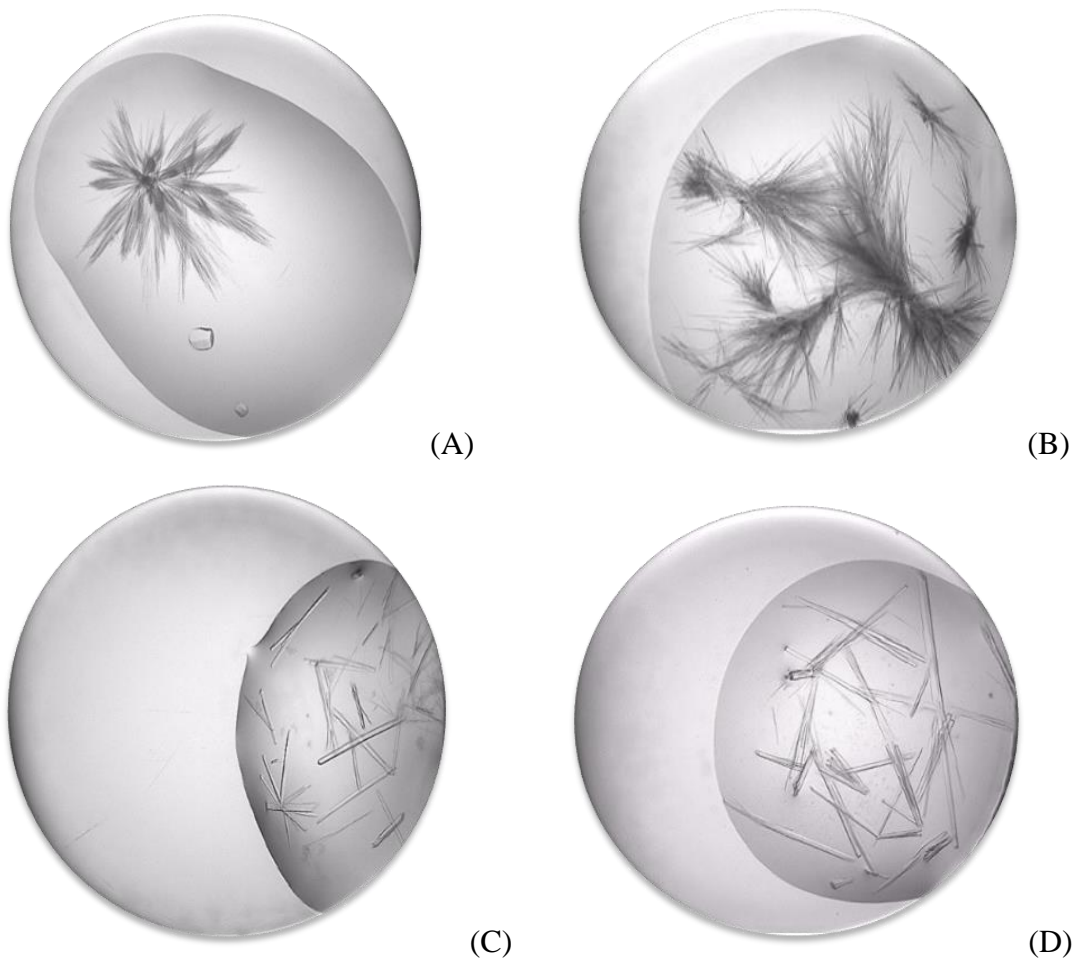
**Tabela 7** - Evolução do *screening* inicial e secundário realizado para as enzimas em estudo.

Gene	Familia	Organismo	Código	Clonagem	Transformação	Expressão	Purificação	Thermofluor
BLi04016 or BL03892 (SacA)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BlaGH32	✓	✓	✓	✓	✓
BAD_1325	GH32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	BabadGH32	✓	✓	✓	✓	✓
BLi02827 / BL03120 (SacC)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BlcGH32	✓	✓	✗	✗	✗
BLi04178 or BL01929 (SacAB)	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BlabGH32	✓	✓	✓	✓	✓
LGAS_1779	GH32	<i>Lactobacillus gasei</i> DSM 20243 / ATCC 33323	LgGH32	✓	✓	✓	✓	✓
BLi03707 or BL03606	GH32	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BiGH32	✓	✓	✓	✓	✗
BAD_1150	GH32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	BaGH32	✓	✓	✓	✓	✓
Htur_4088	GH32	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	HrGH32	✓	✓	✗	✗	✗
fructosyltransferase	GH32	<i>Aspergillus sydowii</i>	AsGH32	✓	✓	✓	✓	✓
putative intracellular invertase	GH32	<i>Aspergillus niger</i>	AnGH32	✓	✓	✓	✓	✓
BLi03706 or BL02216 (SacB)	GH68	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 / DSM13	BlbGH68	✓	✓	✗	✗	✗
levansucrase (LevG)	GH68	<i>Lactobacillus gasei</i> DSM 20077	LgGH68	✓	✓	✗	✗	✗
Htur_4097	GH68	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	HrGH68	✓	✓	✓	✓	✗

Fonte: Elaborada pela autora

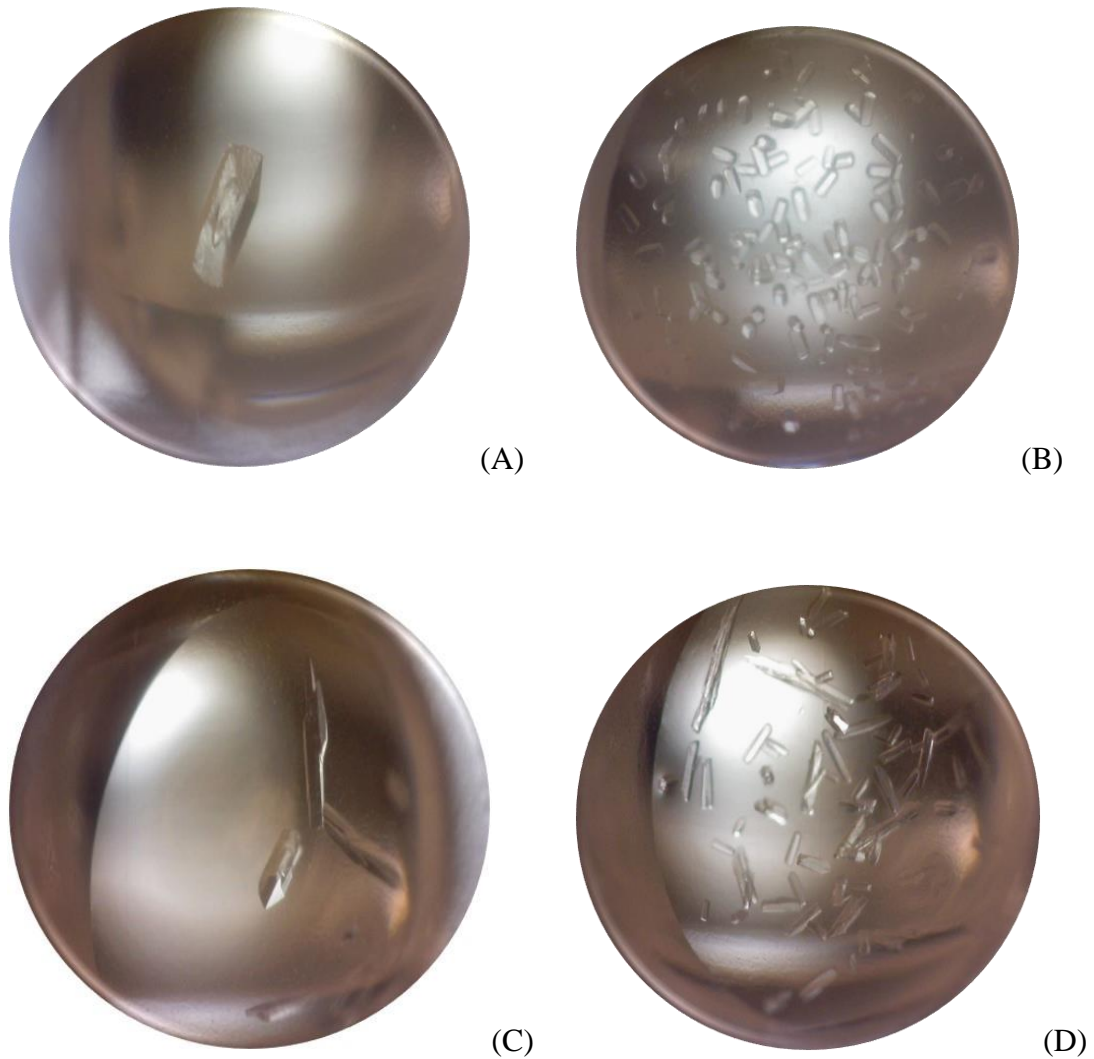
### 3.4 Resultados dos ensaios de cristalização

Inúmeros cristais foram obtidos em diversas condições de cristalização. São aqui reportados os cristais que se apresentaram visualmente com melhor formação para possível coleta e processamento da difração de raios X.



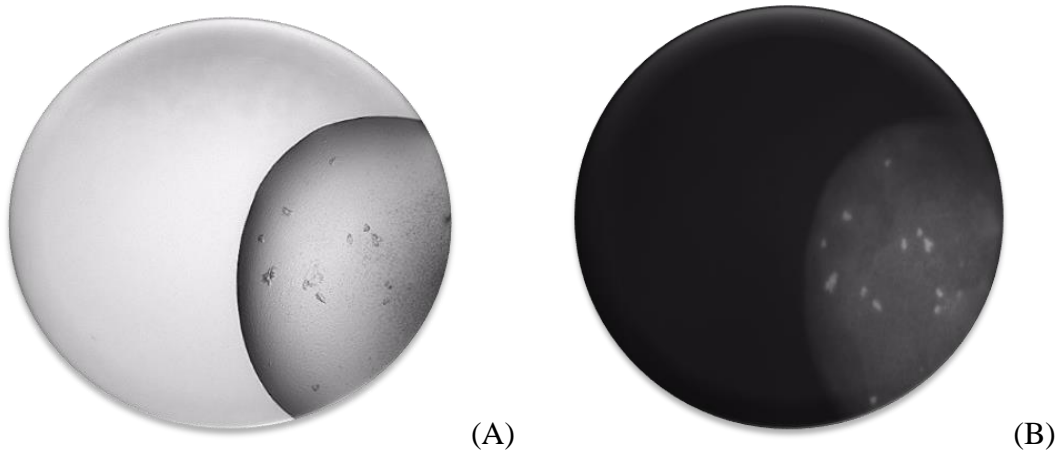
**Figura 26** - Fotos dos cristais obtidos da enzima *BLAGH32* de *Bacillus licheniformis* após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. A concentração da proteína para cristalização foi de 13 mg/mL. As condições de cristalização e a relação proteína:tampão de cada uma tratam-se de: A) 0,2 M de cloreto de magnésio; 0,1 M HEPES pH 7,5; 30% (m/v) PEG 400; concentração na gota 1:1. B) 0,15 M de brometo de potássio; 30% (m/v) PEG monometil éter 2000; concentração na gota 1:2. C) 0,2 M fosfato de sódio/potássio; 0,1 M Bis-Tris propano pH 6,5; 20% (m/v) PEG 3350; concentração na gota 2:1. D) 0,2 M de sulfato de amônio; 0,1 M Bis-Tris pH 6,5; 25% PEG 3350; concentração na gota 1:1.

Fonte: Elaborada pela autora



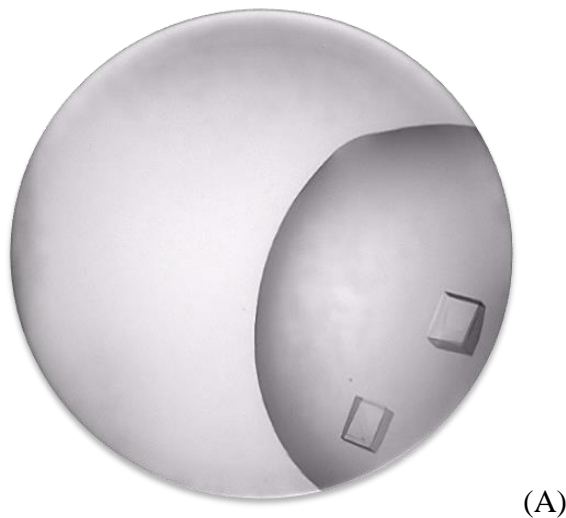
**Figura 27** - Fotos dos cristais obtidos da enzima *BABADGH32* de *Bifidobacterium adolescentis* após 10 dias da realização das caixinhas de cristalização. A concentração da proteína para cristalização foi de 30 mg/mL. As condições de cristalização e a relação proteína:tampão de cada uma tratam-se de: A) 0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 20% PEG (m/v) 10000; concentração na gota 1:1; B) 0,1 M HEPES sódico pH 7,5; 25% (m/v) PEG 6000; concentração na gota 1:2; C) 0,05 M acetato de magnésio; 0,1 M acetato de sódio; 10% (m/v) PEG 8000; concentração na gota 1:1; D) 0,1 M MES pH 6,5; 0,6 M cloreto de sódio; 20% (m/v) PEG 4000; concentração na gota 1:2.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 28** - Fotos dos micro cristais obtidos da enzima *BLABGH32* de *Bacillus licheniformis* após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. Destaque para a foto B em UV para identificação dos micro cristais como sendo de proteína devido à seu brilho característico. A concentração da proteína para cristalização foi de 11 mg/mL. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão trata-se de: A) 0,2 M cloreto de sódio; 0,1 M MES pH 6,0; 20% (m/v) PEG 6000; concentração na gota 1:1.

Fonte: Elaborada pela autora



(A)

**Figura 29** - Fotos dos cristais obtidos da enzima *LGGH32* de *Lactobacillus gasseri* após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. A concentração da proteína para cristalização foi de 26 mg/mL. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão trata-se de: A) 0,1 M tampão MMT pH 9,0; 25% (m/v) PEG 1500; concentração na gota 2:1.

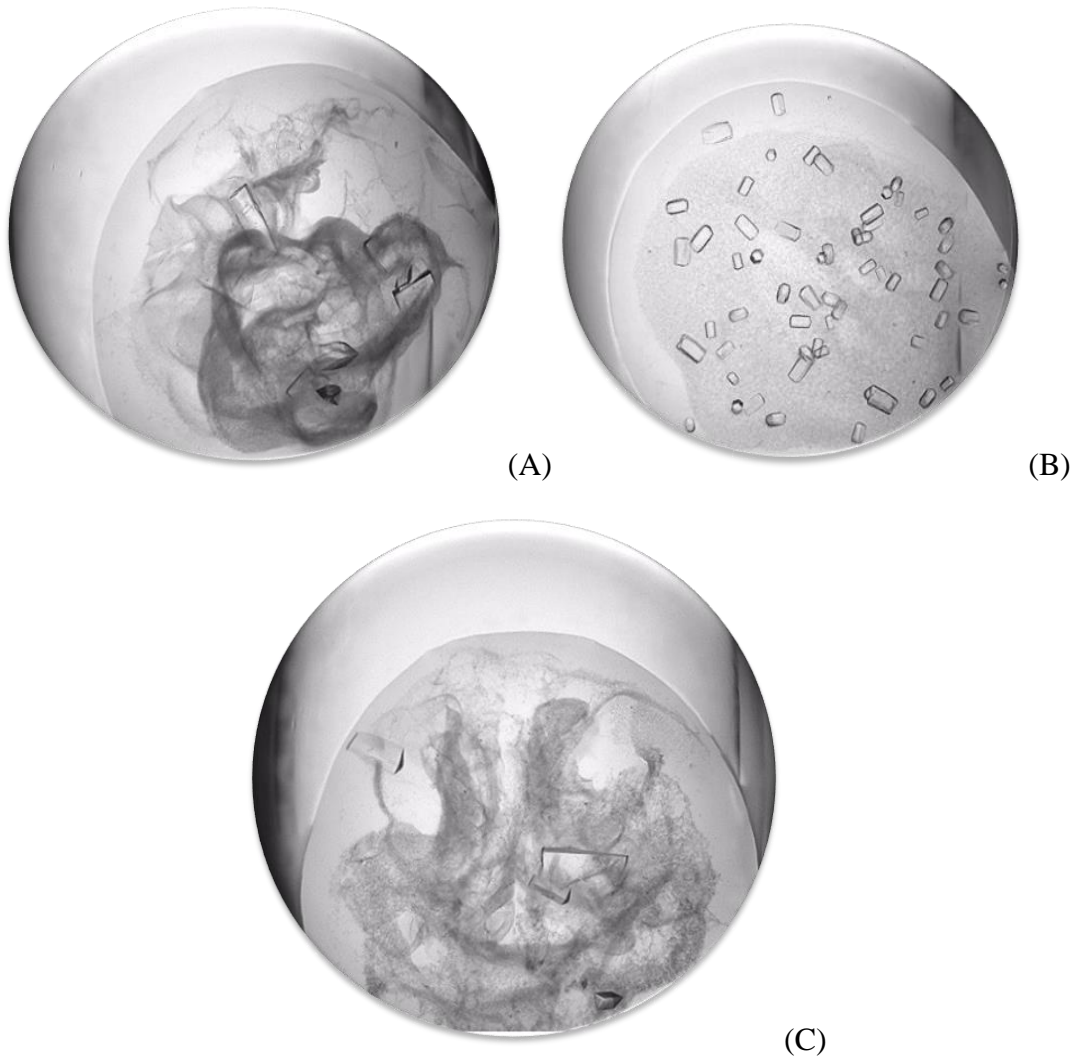
Fonte: Elaborada pela autora



(A)

**Figura 30** - Fotos dos cristais obtidos da enzima *BAGH32* de *Bifidobacterium adolescentis* após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. A concentração da proteína para cristalização foi de 31 mg/mL. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão trata-se de: A) 0,1 M cloreto de lítio; 0,1 MMES pH 6,0; 20% (m/v) PEG 6000; concentração na gota 2:1.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 31** - Fotos dos cristais obtidos da enzima ANGH32 de *Aspergillus niger* após 7 dias da realização das caixinhas de cristalização. A concentração da proteína para cristalização foi de 11 mg/mL. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão trata-se de: A) 0,1 M MES pH 6,5; 30% (m/v) PEG 4000; concentração na gota 1:2. B) 0,1 M MES pH 6,5; 20% (m/v) PEG 4000; 0,6 M cloreto de sódio; concentração na gota 1:2; C) 0,1 M de cloreto de lítio; 0,1 M HEPES pH 7,5; 25% (m/v) PEG 6000; concentração na gota 1:2.

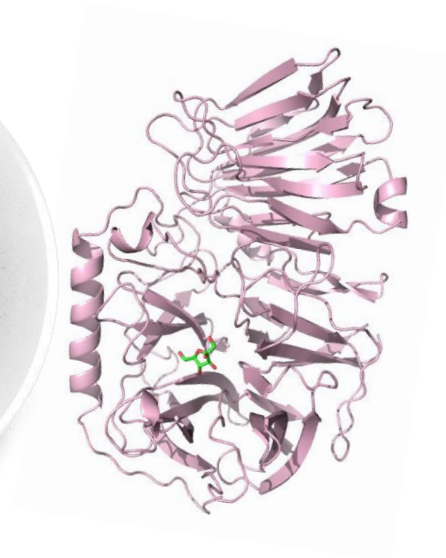
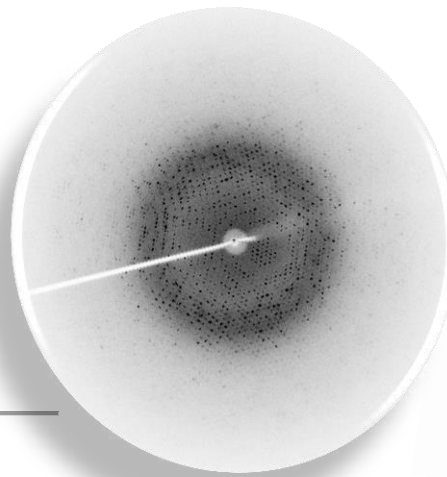
Fonte: Elaborada pela autora



## CAPÍTULO 4

### Estudos Estruturais

---



*Neste capítulo, abordam-se os resultados obtidos em cristalografia: coleta e processamento de dados de difração de raios X bem como a caracterização estrutural das enzimas.*



## 4 Cristalografia

### 4.1 Coleta e processamento de dados de difração de raios X

Inúmeros cristais foram obtidos em diversas condições de cristalização conforme descrito e apresentado no capítulo anterior. Estes foram crioprotégidos com 10% de etileno glicol (exceto os que já apresentavam elevadas concentrações de PEG em suas condições de cristalização) e então testados em temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de vapor de nitrogênio. Os cristais que obtiveram bons padrões de difração foram coletados *in house* Bruker APEX DUO e Rigaku em aparelho, detector CCD e MAR345 Image Plate e em um comprimento de onda de 1,5418 Å. Os conjuntos de dados foram obtidos por meio de rotações ( $\Delta\phi$ ). As estratégias de coleta dos dados de difração de raios X e posteriores determinações dos parâmetros de célula unitária (a, b, c,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), indexação e integração do conjunto de imagens de difração foram realizados utilizando-se o programa iMOSFLM<sup>81</sup> e Bruker (SIBAS, SAINT, XPREP).<sup>82</sup>

A fim de se escalonar as intensidades médias previamente quantificadas para o conjunto de dados, utilizou-se o programa Aimless,<sup>83</sup> que faz parte do pacote de programas CCP4<sup>84</sup> e excluindo-se 5% dos dados para cálculo do  $R_{free}$ , o qual é isento de minimizações artificiais para vias de comparação com o  $R_{work}$ .

O número de moléculas por unidade assimétrica, bem como a porcentagem de solvente foram estimados pelo programa Matthews\_coeff,<sup>84</sup> o qual utiliza o método proposto por Matthews.<sup>85</sup>

### 4.2 Obtenção das fases, refinamento e determinação das estruturas cristalográficas

Após os procedimentos realizados no item 4.1, passou-se para a aquisição das fases, aplicando-se a técnica de substituição molecular por meio do programa PHASER,<sup>86</sup> o qual utiliza de informações de similaridade estrutural. O modelo para substituição molecular foi gerado utilizando-se a ferramenta BLAST<sup>87</sup> para alinhamento da sequência proteica em questão contra um banco de dados a fim de se avaliar a que apresenta maior identidade

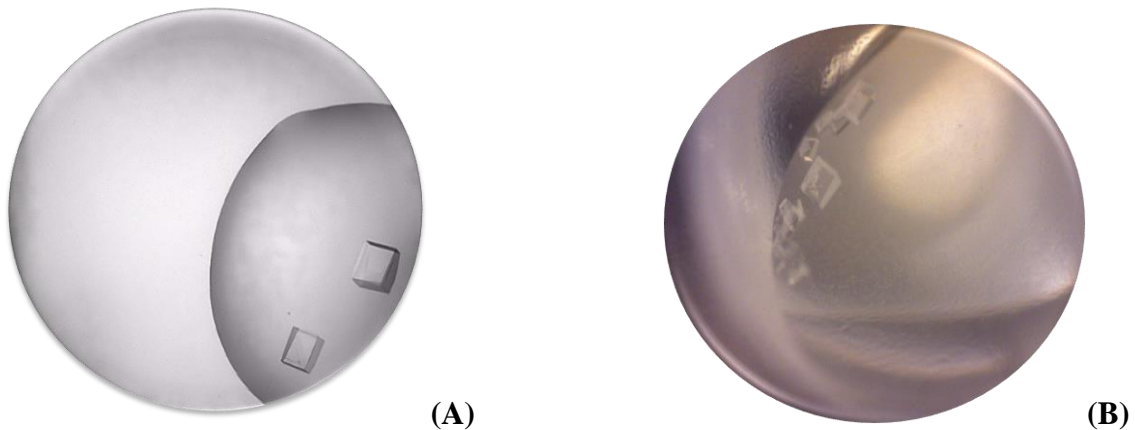
sequencial. Para a enzima *BAGH32* de *Bifidobacterium adolescentis* e descrita como  $\beta$ -frutofuranosidase utilizou-se a enzima descrita no PDB:3PIG<sup>66</sup> apresentando 84% de identidade. Assim também para a enzima *LGGH32* de *Lactobacillus gasseri* descrita como *sucrose-6-phosphate hydrolase* utilizou-se a enzima descrita no PDB:1UYP<sup>61</sup> e apresentando 30% de identidade. Para a enzima *BAGH32*, o modelo gerado foi ajustado utilizando-se o programa *Chainsaw*.<sup>88</sup> Já para a *LGGH32*, baseando-se na solução de maior *score* apresentada, realizou-se a rotina de construção automática utilizando-se o ARP/wARP.<sup>89</sup> Ambas foram então submetidas ao refinamento do espaço recíproco utilizando-se o programa REFMAC<sup>90</sup> alternando-se com ciclos de inspeção e reconstrução manual do espaço real por meio da visualização gráfica, utilizando-se o programa COOT (posições atômicas, restrições geométricas).<sup>91</sup> Para os estágios finais de refinamento, foi empregado a operação TLS (“Translation/Vibration/Screw”)<sup>92</sup> e a qualidade do modelo gerado foi analisada empregando-se o MolProbity.<sup>93</sup> A cada ciclo de refinamento, a variação e coerência dos valores de  $R_{free}$  e  $R_{work}$  foram checados e avaliados até que os mesmos deram-se por encerrados quando não houve mudança significativa entre os mesmos e assumiram valores compatíveis com a resolução das estruturas. As estruturas obtidas puderam então ser submetidas à análises de similaridade entre elas, comparação com estruturas da mesma família bem como evidências de mecanismos da reação enzimática por elas catalisada.

### 4.3 Caracterização Estrutural

#### 4.3.1 Análises das coletas e processamento dos dados de difração de raios X das enzimas *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri* e $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*

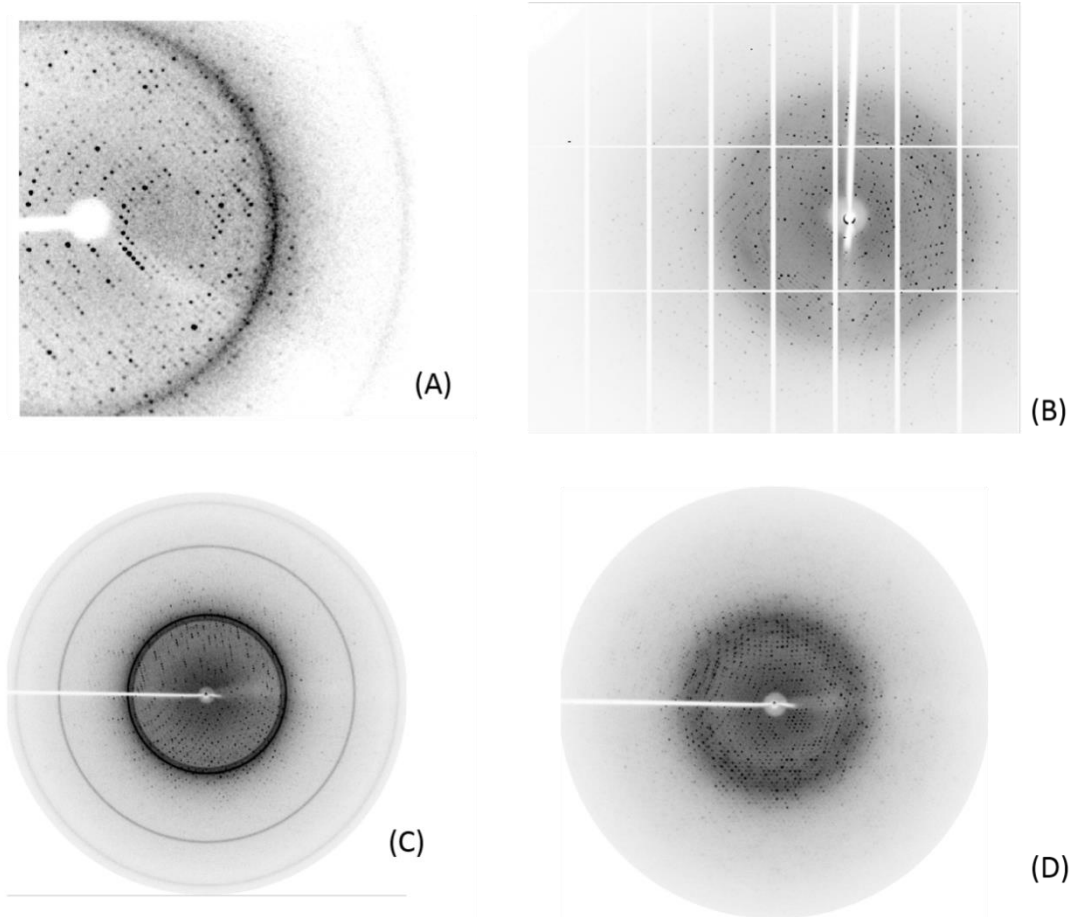
A partir dos ensaios de cristalização realizados, os cristais das diferentes enzimas foram testados, a temperaturas criogênicas (100 K) e previamente crioprotetidos com a adição de 10% (v/v) de etilenoglicol à solução de cristalização, quando se fez necessária a adição de agentes crioprotetores. Os conjuntos de dados de mais alta resolução, utilizados para posterior obtenção dos modelos estruturais, foram coletados tanto dos cristais formados pela forma *apo* (sem ligante) da enzima quanto dos cristais que foram utilizados no processo de *soaking* (cristal nativo deixado em solução com altas concentrações do substrato) com o substrato

sacarose. Ambos os conjuntos de dados da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis* e o da forma *apo* da enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri* foram coletados *in house*. O cristal da última, após o processo de *soaking*, foi coletado na linha MX-2 do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas - SP). Os padrões de difração bem definidos e, aparentemente com ausência de sobreposição de pontos ou *overlaps*, foram coletados para os alvos supracitados e que tiveram suas estruturas de alta resolução resolvidas. As Figura 32 e Figura 33 apresentam as fotos dos cristais que foram utilizados na coleta de dados e as imagens dos padrões de difração resultantes dos experimentos de difração de raios X, respectivamente.



**Figura 32** - Cristais utilizados nos experimentos de difração de raios X, para a caracterização estrutural. (A) Cristais da enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *Lactobacillus gasseri*. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão tratam-se de: 0,1 M tampão MMT pH 9,0; 25% (m/v) PEG 1500; concentração na gota 2:1. (B) Cristais da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bifidobacterium adolescentis*. A condição de cristalização e a relação proteína:tampão tratam-se de: 0,1 M cloreto de lítio; 0,1 MMES pH 6,0; 20% (m/v) PEG 6000; concentração na gota 2:1.

Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 33** - Imagens dos padrões de difração dos cristais proteicos. (A) Padrão de difração do cristal da enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri* em sua forma *apo*, com resolução máxima de 1,9 Å e (B) dos cristais após a realização de *soaking* com o substrato sacarose e resolução máxima de 1,8 Å. (C) Padrão de difração do cristal enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*, com resolução máxima de 1,9 Å e (D) cristais do mesmo alvo após a realização de *soaking* com o substrato sacarose e resolução máxima de 1,9 Å.

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente à realização da coleta, integração e escalonamento dos dados de difração, os dados estatísticos foram obtidos e estão reportados na Tabela 8.

**Tabela 8** -Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos dos alvos *LGGH32* e *BAGH32*, na ausência e presença dos ligantes. Entre parênteses estão as estatísticas referentes a última camada de resolução.

Parâmetros	<i>LGGH32</i>	<i>LGGH32</i> + ligante	<i>BAGH32</i>	<i>BAGH32</i> + ligante
Grupo espacial	P4 <sub>2</sub> ,2	P4 <sub>2</sub> ,2	P3 <sub>1</sub> ,2	P3 <sub>1</sub> ,2
Moléculas de proteína na unidade assimétrica	1	1	1	1
Parâmetros da célula unitária a, b, c (Å) $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	a = b = 103,2 c = 102,0	a = b = 103,9; c = 102,0	a = b = 88,6; c = 114,6; $\beta$ = 120	a = b = 88,9; c = 115,5; $\beta$ = 120
Intervalo de resolução (Å)	42,37-1,90 (2,0-1,90)	41,89-1,80 (1,84-1,80)	45,91-1,90 (1,94-1,90)	45,82-1,87 (1,91-1,87)
Número de imagens	1171	1799	360	360
$\Delta_{\phi}$ (°)	0,7	0,2	1,0	1,0
Mosaicidade (°)	-*	0,36	0,68	0,97
B-fator médio				
Proteína	-	27,54	-	12,94
Ligante		21,84		15,55
Número de reflexões únicas	84089	51784 (2668)	41542 (2636)	42137 (2604)
Multiplicidade	16,43 (7,62)	18,0 (4,3)	18,7 (17,3)	20,7 (17,4)
$R_{meas}$	0,1277 (0,3939)	0,096 (0,345)	0,137 (0,790)	0,141 (1,100)
Completeza (%)	99,9 (97,3)	99,1 (87,5)	99,8 (99,6)	99,5 (92,1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	12,34 (2,67)	17,0 (2,7)	19,9 (4,5)	15,4 (2,6)
$R_{work}^{\S}$ (%)	17,01	24,04	21,16	18,30
$R_{free}^{\S}$ (%)	21,08	27,78	23,83	23,66
Rmsd do ideal comprimento de ligação (Å)	0,0189	0,0131	0,0181	0,0172
Rmsd do ideal ângulos de ligação (Å)	1,8441	1,5251	1,8476	1,7606
Ramachandran outliers (%)	0	1	0	1

Fonte: Elaborada pela autora.

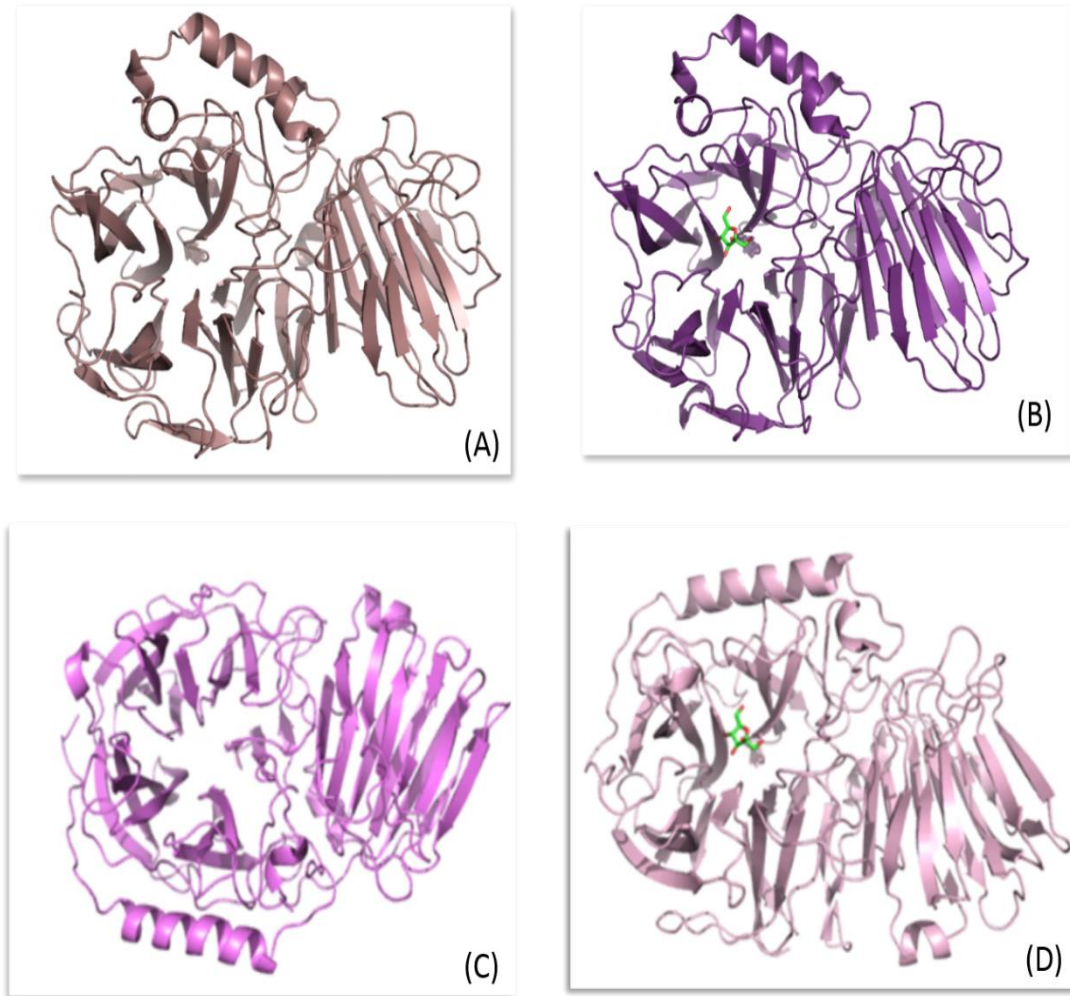
$\S R_{work}/R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$  onde  $F_{obs}$  e  $F_{calc}$  tratam-se dos fatores de estrutura observados e calculados; 5% das reflexões foram incluídas nos testes de ajuste para o cálculo de  $R_{free}$ . \*Os dados deste conjunto foram coletados e processados *in house* no difratômetro Bruker, o qual não fornece os dados da mosaicidade.

O número de moléculas por unidade assimétrica foi estimado por meio da massa molecular das enzimas *sucrose-6-phosphate hydrolase* (LGGH32) e  $\beta$ -frutofuranosidase (BAGH32), de 55 e 58 kDa, respectivamente. Isso resultou na presença de uma molécula por unidade assimétrica para ambos os casos, e o conteúdo de solvente no cristal em torno de 50% para a enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* em sua forma apo e complexada ao ligante. No caso da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase, o conteúdo de solvente foi de 45,11% na presença de ligante e de 43,47% para o complexo.

As moléculas de água foram introduzidas nos últimos passos de refinamento realizados, por meio da inspeção visual pelo programa COOT<sup>91</sup>, seguindo-se os critérios de distância mínima e máxima de 1,8 e 3,2 Å e fator de temperatura menor que 50 Å<sup>2</sup>.

O refinamento foi dado como encerrado quando não houve a possibilidade de melhora dos valores de  $R_{factor}$  e  $R_{free}$  (Tabela 8), à exceção da enzima LGGH32 na presença de ligante que ainda se encontra em fases finais de refinamento. Os resultados dos modelos finais são apresentados na Figura 34. As validações dos modelos estruturais foram realizadas com a ferramenta MolProbity<sup>93</sup> e os diagramas obtidos demonstraram a qualidade dos modelos finais. A enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* e a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase apresentou 0% de *outliers* em seu Ramachandram sem a presença de ligante, porém ambas apresentaram 1 resíduo de *outlier* em seu Ramachandram na presença de seus respectivos ligantes. Os modelos representativos dos monômeros cristalográficos das estruturas de alta resolução, com e sem o ligante, podem ser observadas na Figura 34. O ligante apresentado nos monômeros cristalográficos (Figura 34 (B) e (D)) trata-se da frutose, entretanto, o *soaking* foi realizado com a sacarose. Tal fato indica a hidrólise da molécula de sacarose por ambas as enzimas, restando a frutose em seu sítio ativo e a glicose na solução.



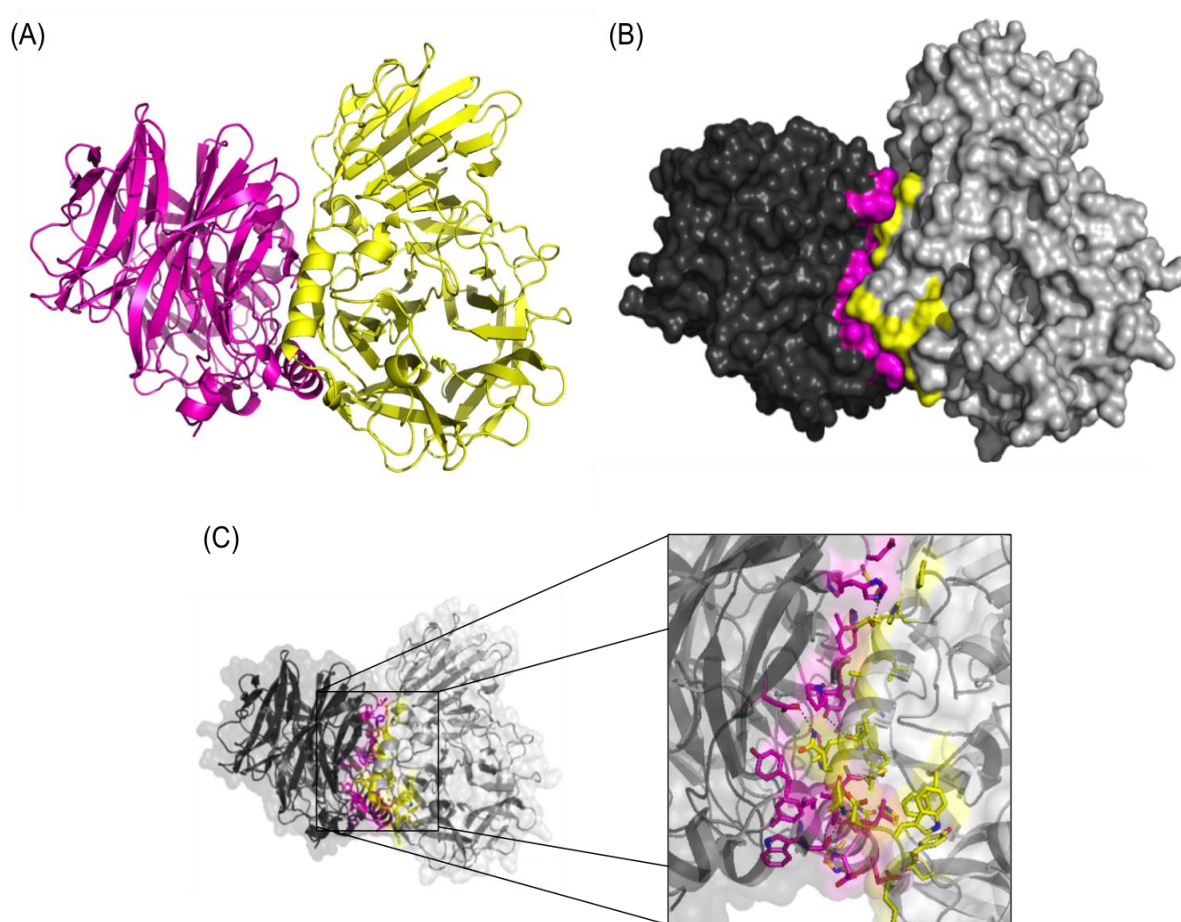


**Figura 34** - Estruturas cristalográficas dos monômeros das enzimas. (A) Monômero da enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* (LGGH32) *apo* e (B) na presença de ligante. (C) Monômero da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase (BAGH32) sem a presença de ligante e (D) do complexo enzima:frutose.

Fonte: Elaborada pela autora.

As enzimas *sucrose-6-phosphate hydrolase* e  $\beta$ -frutofuranosidase são semelhantes em relação à sua estrutura geral, apresentando um módulo  $\beta$ -propeller, onde se localiza também seu sítio catalítico, e um módulo  $\beta$ -sanduíche. Estas características são bastante conservadas na família das GH32.<sup>94</sup> Outra característica importante para essa família é a capacidade de dimerização das mesmas.<sup>94</sup> A formação de um homodímero, não covalente, foi evidenciado para ambas as enzimas por meio dos ensaios de caracterização biofísica (SAXS – geração de modelo e DLS – análise do raio hidrodinâmico, que serão posteriormente abordados no Capítulo 5). Os possíveis dímeros foram gerados através da análise de moléculas simetricamente relacionadas, presentes no empacotamento cristalino e também sugeridas pelo programa PISA.<sup>95</sup> Na Figura 35 (A) é possível observar o arranjo dimérico da enzima

*sucrose-6-phosphate hydrolase* bem como sua interface de dimerização e os resíduos que o realizam as interações (Figura 35 (B) e (C)).



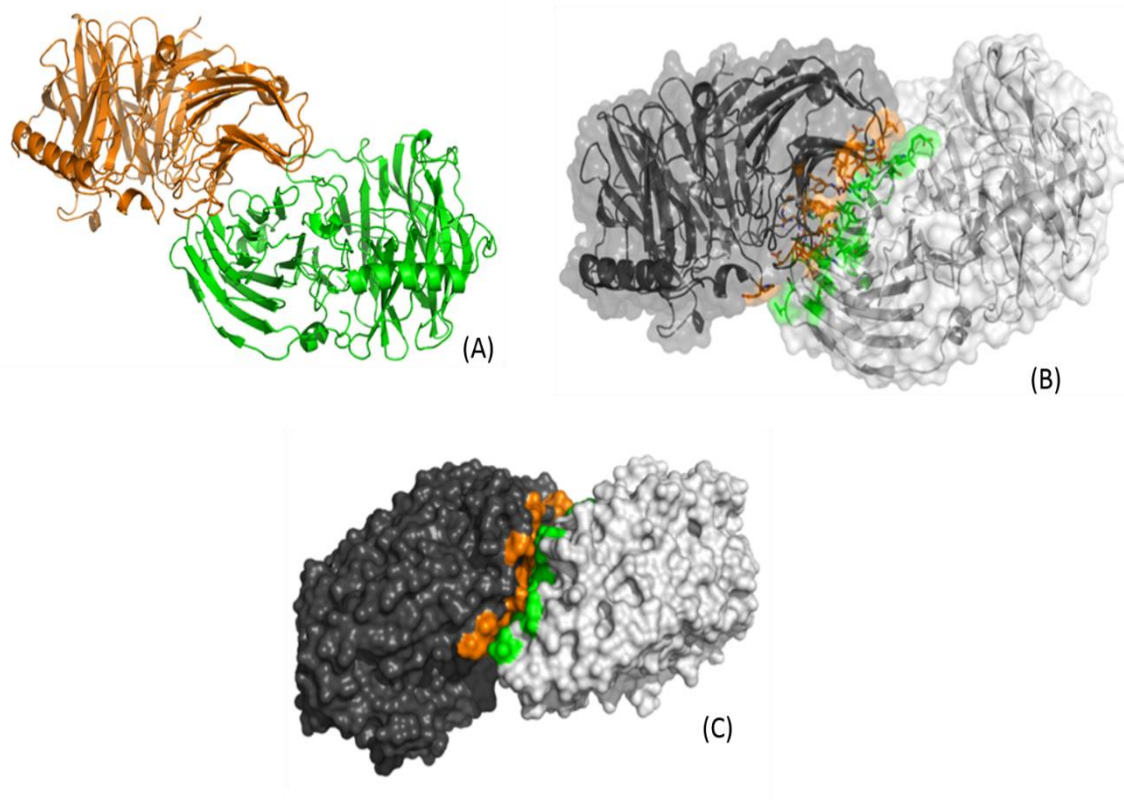
**Figura 35** - Detalhes da estrutura de *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri*. (A) Interface de dimerização da enzima. (B) Superfície com destaque para a estrutura da enzima e suas ligações. (C) Ligações realizadas na interface de dimerização.

Fonte: Elaborada pela autora

Ao todo, 27 resíduos participam da formação da interface dimérica (Tyr12; Lys13; Trp15; Asp16; Ala17; Gln18; Leu20; Leu21; Gln24; Ala25; Ala28; Thr29; Pro31; His35; Phe67; Pro82; His88; Tyr89; Leu90; Pro92; Asp95; Asn144; Asn145; His146; Asn486; Ser487; Leu489) e 8 participam da realização das ligações de hidrogênio (Trp15; Ala17; Gln18; Gln24; Thr29; Tyr89; His146; Asp95). A superfície é considerada simétrica, isto é, os

mesmos resíduos de um monômero são interagentes com os do outro monômero. A área de interface foi estimada em  $1464 \text{ \AA}^2$ .<sup>96</sup>

A enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis* também apresentou a formação de uma estrutura quaternária dimérica, observada pelos experimentos de DLS e SAXS, no entanto, sua dimerização apresenta uma interface de interação entre as enzimas distinta da descrita anteriormente para *sucrose-6-phosphate hydrolase* (Figura 35).



**Figura 36** - Detalhes da estrutura de  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*. (A) Interface de dimerização da enzima. Superfície do dímero com destaque para a região de interface. (B) Superfície com destaque para a estrutura da enzima e suas ligações.

Fonte: Elaborada pela autora

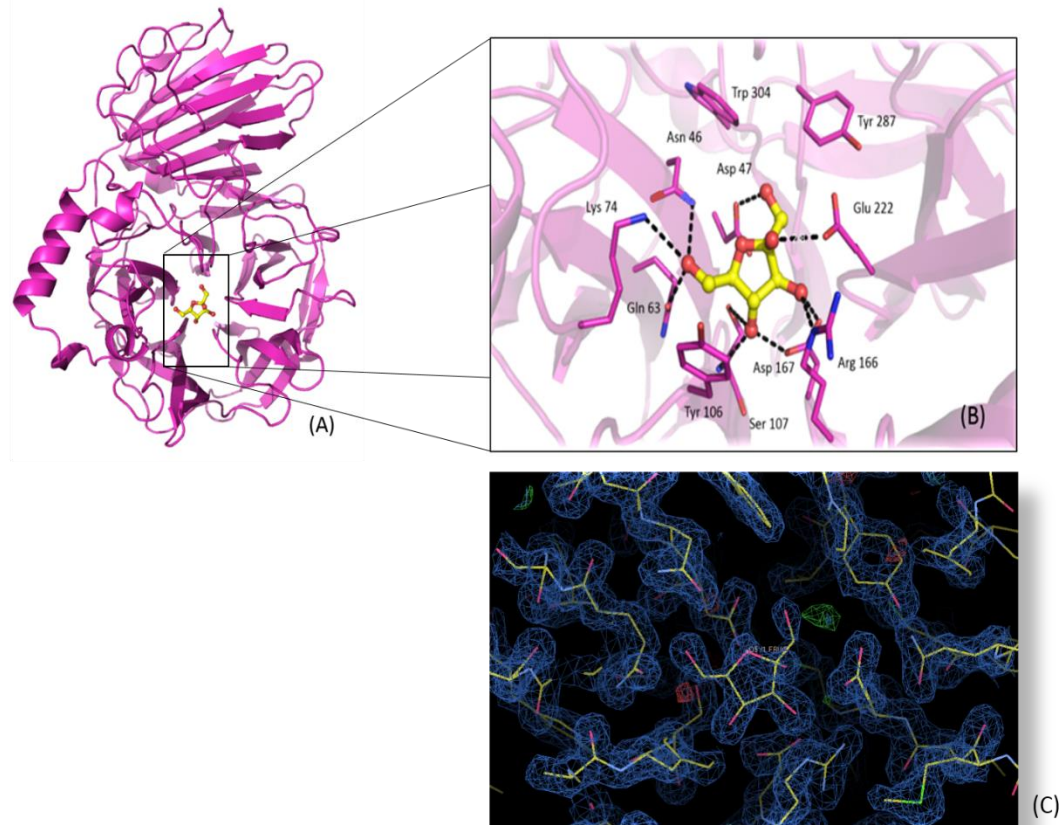
A interface do dímero *BAGH32* (Figura 36) trata-se de uma superfície simétrica, isto é, os mesmos resíduos de cada cadeia participam da interface dimérica. A área de interface do dímero é da ordem de  $1367 \text{ \AA}^2$  e no total há a presença de 32 resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio (Arg268; Glu379; Glu403; Arg404; Arg408; Tyr417; Asp423; Asp424; Gln425; Asp432; Gln434; Asp440; Arg441; Gly442; Ty443; Arg444; Glu498; Ser499), 8 resíduos envolvidos em pontes salinas (Arg268; Glu379; Glu403; Arg404; Asp424; Asp432;

Arg441; ArgR444) e 241 resíduos envolvidos nas demais interações (Gly264; Phe265; Arg268; Glu324; Pro325; Val376; S3er77, Glu379; Glu403; Arg404; Arg408; Asp414; Gly415; Tyr417; Arg423; Arg424; Gln425; Ile426; Asp432; Gln434; Ala435; Arg440; Arg441; Gly442; Tyr443; Arg444; Val496; Glu498; Ser499)<sup>96</sup>.

Analisando-se a superfície dimérica de ambas as enzimas, pode-se dizer que estas apresentam diferenças em sua dimerização. Isto será mais detalhado no Capítulo 5 sobre Caracterização Biofísica, sendo que os dímeros não poderiam ser iguais pois não foram gerados igualmente a partir dos modelos obtidos pelo SAXS.

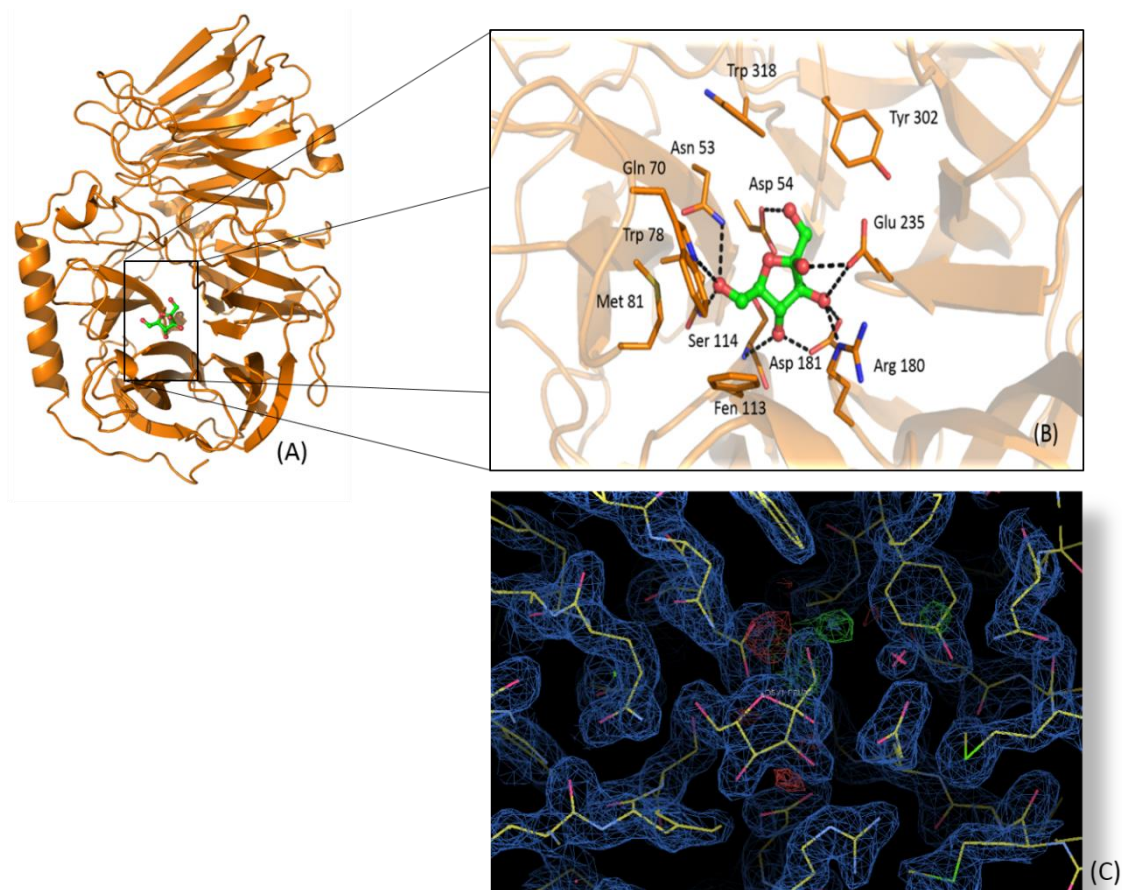
#### 4.3.2 Análises do sítio catalítico

As enzimas *LGGH32* e *BAGH32* tiveram também suas estruturas com ligante resolvidas. Como será evidenciado no Capítulo de Estudos Bioquímicos, a sacarose é o principal substrato utilizado para os estudos envolvendo as enzimas frutossiltransferases. Assim sendo, após a coleta de dados dos cristais na ausência do ligante, foi realizado o *soaking* de outros cristais, da mesma gota (Figura 32 (A) e (B)), com a sacarose e observou-se a presença de uma frutose no sítio catalítico de ambas as enzimas, confirmando a atividade hidrolítica das mesmas. Nas Figura 37 e Figura 38 pode-se observar as enzimas e a presença do ligante em seu sítio catalítico bem como os detalhes da região do sítio catalítico de cada uma.



**Figura 37** -Representação do sítio catalítico da enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri*. (A) Enzima *sucrose-6-phosphate hydrolase* na presença do ligante frutose. (B) Detalhes da região do sítio catalítico com os resíduos de aminoácidos da enzima responsáveis pela coordenação do ligante.

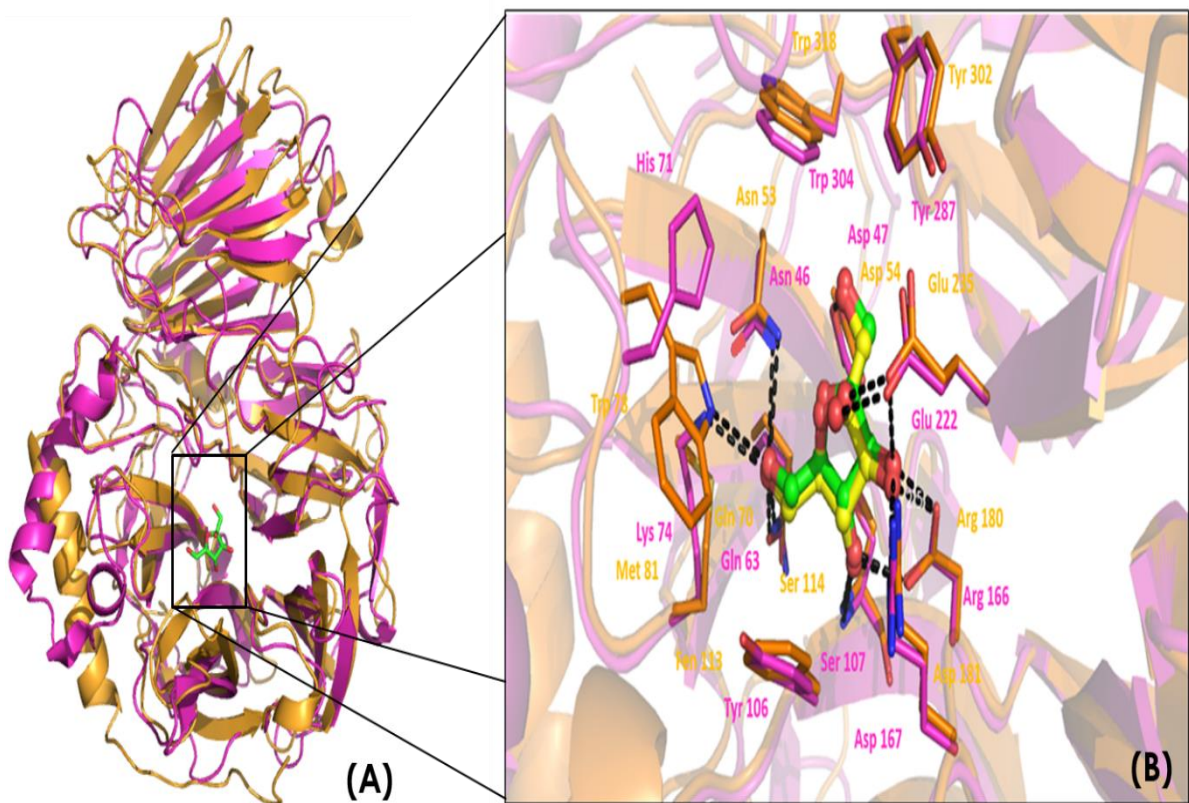
Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 38** - Representação do sítio catalítico da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*. (A) Enzima  $\beta$ -frutofuranosidase na presença do ligante frutose. (B) Detalhes da região do sítio catalítico com os resíduos de aminoácidos da enzima responsáveis pela coordenação do ligante.

Fonte: Elaborada pela autora

As enzimas foram sobrepostas entre si a fim de se visualizar a semelhança entre elas (Figura 39 (A)). Além disso, realizou-se o alinhamento de seu sítio catalítico buscando-se avaliar as similaridades e diferenças na coordenação de seu ligante (Figura 39 (B)).



**Figura 39** - Sobreposição das estruturas das enzimas *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri* (em rosa) e  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis* (em laranja). (A) Sobreposição das estruturas completas. (B) Detalhe do sítio catalítico das enzimas coordenando o ligante frutose.

Fonte: Elaborada pela autora

Utilizando-se o programa Pymol,<sup>97</sup> realizou-se a sobreposição das estruturas de ambas as enzimas (Figura 39 (A)). Observou-se que o alinhamento foi realizado com 265 resíduos presentes em ambas as estruturas e que o valor de r.m.s.d. foi de 1,166 Å, o que indica a alta conservação do enovelamento dessas enzimas, com algumas diferenças principalmente nas regiões sem estrutura secundária (*loops*).

Em relação à sobreposição dos sítios catalíticos, pode-se dizer que estes são semelhantes entre si, apresentando em sua grande maioria os mesmos resíduos que coordenam o ligante, no presente caso, a frutose. A grande diferença encontra-se nos aminoácidos His 71 (enzima *LGGH32*) e Trp 78 (enzima *BAGH32*), bem como de uma lisina 74 (enzima *LGGH32*) e uma metionina 81 (enzima *BAGH32*). Isso faz com que a ligação perdida entre o triptofano de uma enzima seja realizada pela lisina da outra.

A enzima *LGGH32* apresentou 30% de identidade com a enzima utilizada para a realização da substituição molecular (1UYP) e 86% de cobertura empregando-se a ferramenta Blast<sup>87</sup>. A enzima *LGGH32* apresenta 84% de identidade com a enzima utilizada em sua substituição molecular (3PIG), com 100% de cobertura da sequência, dados também obtidos utilizando-se a ferramenta Blast.<sup>87</sup>

Comparando-se a enzima *LGGH32* com a enzima de maior identidade,<sup>94</sup> destaca-se a semelhança na estrutura das mesmas, constituídas por um  $\beta$ -propeller conectado à um módulo  $\beta$ -sanduíche. O sítio catalítico também é conservado em sua maioria, coordenando as reações de hidrólise.<sup>94</sup>

O sítio catalítico é localizado no término da cavidade do  $\beta$ -propeller com abertura tipo funil. A coordenação do sítio catalítico é realizado pelos resíduos hidrofóbicos de triptofano e tirosina e os resíduos de aspartato e glutamato conferem carga negativa ao sítio ativo, propiciando a hidrólise do substrato sacarose<sup>94</sup>. Tais resíduos aromáticos não estão envolvidos na interação de resíduos de glicose, fato este que comprova a presença de frutose e não de glicose na realização do *soaking* com sacarose das enzimas deste presente trabalho.<sup>66</sup>

A enzima *BAGH32* apresentou 84% de identidade com uma  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. longum*. Seus sítios catalíticos são semelhantes entre si, apresentando em sua grande maioria os mesmos resíduos para coordenação das ligações da frutose.<sup>98</sup> Os resíduos catalíticos Asp 54 e Glu 235 localizados nas pás I e IV são conservados em ambas as estruturas.

As enzimas *LGGH32* e *BAGH32* apresentam o formato característico de enzimas que tem a capacidade de hidrolisar polímeros de frutose com elevados graus de polimerização, tendo-se como exemplo a inulina.<sup>66,98</sup>

Enzimas como as de plantas e algumas bactérias e fungos, em sua maioria sintetizadoras de polímeros de frutose apresentam um sítio catalítico de menor profundidade, fato este que pode explicar a facilidade na formação dos mesmos.<sup>33</sup>

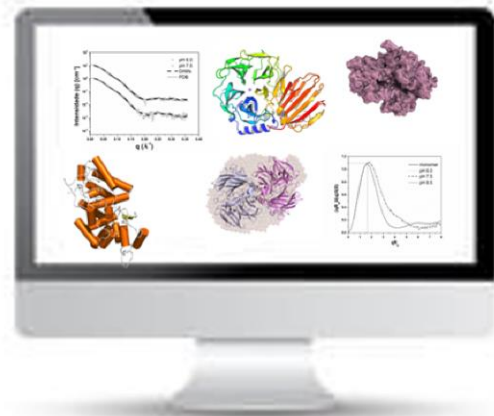
Por meio do que foi apresentado em relação às estruturas das enzimas, pode-se revelar e compreender melhor como os mecanismos de reação das frutossiltransferases ocorrem, como é composto seu sítio catalítico e os resíduos que regem sua dinâmica.



# CAPÍTULO 5

## Estudos Biofísicos

---



*Neste capítulo serão abordados a metodologia e os resultados dos estudos biofísicos realizados para caracterizar a enzima BLAGH32 (sucrose-6-phosphate hydrolase de B. licheniformis) e de complementar a caracterização estrutural das enzimas LGGH32 (sucrose-6-phosphate hydrolase de L. gasseri) e BAGH32 ( $\beta$ -frutofuranosidase de B. adolescentis). Estes experimentos foram conduzidos em colaboração com o Prof. Dr. Wanius Garcia na Universidade Federal do ABC, o qual auxiliou com a realização das medidas e interpretação dos resultados.*



## 5 Metodologia da Caracterização Biofísica das enzimas

### 5.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) das enzimas recombinantes *BLAGH32* (*sucrose-6-phosphate hydrolase* de *B. licheniformis*), *LGGH32* (*sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri*) e *BAGH32* ( $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*) previamente purificadas bem como o estado de oligomerização das mesmas em solução foram avaliados por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS)<sup>99</sup> utilizando-se o equipamento Nano-ZS (*Malvern Instruments Ltd*, Malvern, UK).<sup>100</sup> Este sistema emprega um laser com comprimento de onda de 633 nm e um ângulo fixo (173°). A intensidade de luz espalhada é medida utilizando-se um fotodiodo de avalanche. O experimento consistiu na análise das enzimas em solução (1 mg/mL) em 25 mM de tampão acetato-borato-fosfato com pH 7,5 ou 6,0 contendo 150 mM de NaCl. As amostras das enzimas *BLAGH32*, *LGGH32* e *BAGH32* foram filtradas em uma membrana de poro 0,22  $\mu$ m (Milipore, EUA) e centrifugadas à 16.000  $\times$  g por 10 minutos em temperatura ambiente e, subsequentemente adicionada à uma cubeta de quartzo para realização das medidas. As medidas foram realizadas variando-se a temperatura num intervalo de 25 a 65 °C e para cada temperatura, as amostras foram equilibradas durante 5 minutos antes do início de cada medida. Coletaram-se múltiplos registros do perfil de DLS para cada temperatura. Em cada caso, o raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) foi obtido pelo ajuste do cumulante de segunda ordem para a função de auto correlação de intensidade (distribuição de massa por volume).

### 5.2 Estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Visando-se à complementação dos ensaios estruturais das enzimas em questão (*LGGH32* e *BAGH32*) e também a verificação do comportamento da enzima *BLAGH32* em solução, procedeu-se à realização dos estudos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).

As medidas de espalhamento de raios X foram realizadas na linha SAXS2 no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, Brasil). Os dados das enzimas

*BLAGH32*, *LGGH32* e *BAGH32* foram coletados em diferentes concentrações proteicas (1 e 4 mg/mL em tampão acetato-borato-fosfato e pH 6 e 7,5 contendo 150 mM NaCl). As amostras foram preparadas filtrando-se as mesmas em uma membrana de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore, EUA) para remoção de possíveis partículas e/ou agregados e centrifugadas a 16.000  $\times$  g por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então inseridas em um porta amostra com comprimento de 1 mm constituído por 2 janelas finas de mica paralelas. A temperatura das amostras (25 °C) foi controlada durante todo o experimento. O comprimento de onda do feixe de raios X monocromático incidente foi de  $\lambda = 1.55 \text{ \AA}$  e a distância da amostra ao detector foi de 0,95 m, fornecendo um intervalo de  $q$  (vetor de espalhamento) de 0,015 à 0,35  $\text{\AA}^{-1}$ , onde  $q = 4.\Pi.\sin(\theta)/\lambda$  e  $\theta$  é a metade do ângulo de espalhamento. Dois *frames* sucessivos de 300 s foram registrados para cada amostra a fim de se monitorar eventuais danos por radiação e a estabilidade do feixe. O espalhamento gerado pelo tampão foi registrado antes do espalhamento de cada amostra. Os padrões de espalhamento de raios X obtidos foram registrados utilizando-se um detector bidimensional CCD (MarResearch, EUA). Os efeitos gerados pela dispersão do ar e pelas janelas do porta amostra foram subtraídos do total das intensidades mensuradas. A integração dos padrões de SAXS foi realizada utilizando-se o software FIT2D<sup>101</sup> e as curvas foram escalonadas de acordo com a concentração de proteína. O espalhamento da água medido na mesma célula em que as amostras, foi utilizado a fim de se normalizar os dados para uma escala absoluta. Não foram detectados efeitos de concentração para as amostras.

### 5.2.1 Análise de dados de SAXS

O raio de giro ( $R_g$ ) das moléculas foi determinado por meio de dois procedimentos independentes: i) utilizando-se a equação de Guinier  $I(q) = I(0).\exp[(-q^2.R_g^2)/3]$ ,  $q < 1.3/R_g$  e ii) por meio da transformada indireta de Fourier empregando-se o programa GNOM.<sup>89-90</sup> A função de distribuição de distância  $P(r)$  foi também avaliada utilizando-se o programa GNOM, e por meio dele obteve-se o diâmetro máximo ( $D_{max}$ ).

### 5.2.2 Modelos de baixa resolução obtidos dos dados de SAXS

Modelos de átomos dammy (DAMs) foram calculados a partir das curvas experimentais de SAXS por meio do procedimento *ab initio* implementados no programa DAMMIN.<sup>89,91</sup> Os modelos de baixa resolução (envelopes moleculares) obtidos foram comparados entre si por meio do programa DAMAVER<sup>105</sup> sendo que o modelo mais representativo foi utilizado. A resolução (R) foi estimada pela equação  $R = 2\pi/q_{max}$ . O programa CRY SOL<sup>102</sup> foi utilizado para gerar as curvas de espalhamento teóricas a partir das estruturas cristalográficas tridimensionais.<sup>106</sup> O  $R_g$  e  $D_{max}$  das estruturas cristalográficas tridimensionais foram determinadas utilizando-se o mesmo programa. O programa PISA<sup>95</sup> foi empregado para gerar as diferentes interfaces de dimerização utilizando-se o monômero cristalográfico.

### 5.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram coletados utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um dispositivo de controle de temperatura tipo Peltier. As concentrações das enzimas foram de 0,25 mg/mL em 25 mM de tampão acetato-borato-fosfato, ajustado em diferentes valores de pH (pH 6 e 7,5) e contendo 150 mM NaCl. Todos os dados foram coletados à 25 °C utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm e os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 195 a 260 nm. Realizou-se uma média de oito acumulações a fim de se formar o espectro de CD, utilizando-se uma varredura de 100 nm min<sup>-1</sup>, com linha espectral de 1 nm e tempo de resposta de 0,5 s e obtidos na escala de graus (mdeg). A contribuição do tampão foi subtraída em cada um dos experimentos. Os espectros foram então transformados em elipticidade molar  $[\theta]$  utilizando-se a massa molecular média dos resíduos de aminoácidos e a concentração enzimática para análise da estrutura secundária.

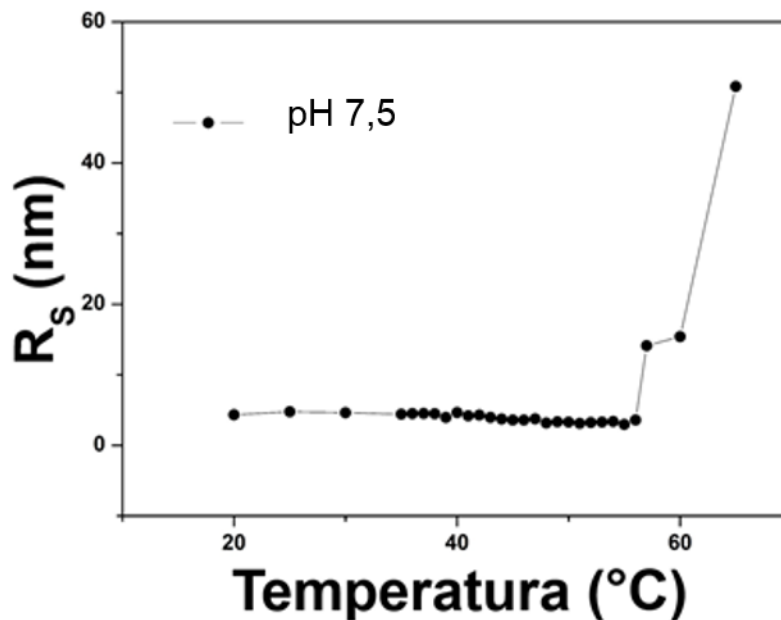
## 5.4 Resultados e Discussões da caracterização biofísica

### 5.4.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

#### 5.4.1.1 DLS da enzima *BLAGH32*

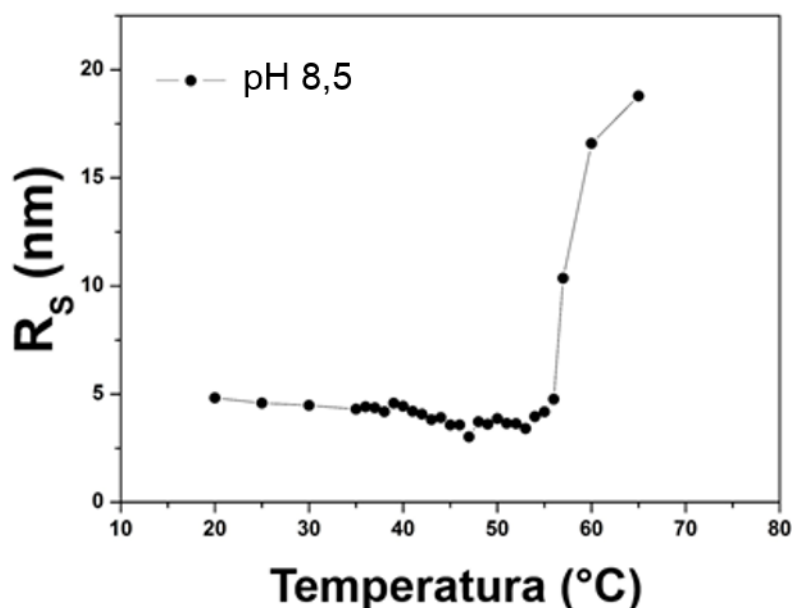
Um importante parâmetro a ser considerado e caracterizado na dinâmica de macromoléculas em solução, trata-se do raio hidrodinâmico das mesmas ( $R_s$ ), o qual pode ser determinado por meio do experimento de espalhamento dinâmico da luz (DLS).<sup>87-95</sup>

A enzima *BLAGH32* em solução foi submetida aos experimentos de DLS à 25 °C em valores de pH 7,5 e 8,5, e observou-se um perfil característico de soluções monodispersas (Figura 40 e Figura 41).



**Figura 40** -Caracterização da enzima *BLAGH32* por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da *BLAGH32* (em 25 °C) em função da variação de temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 41** - Caracterização da enzima *BLAGH32* por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 8,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da *BLAGH32* (em 25 °C) em função da variação de temperatura.

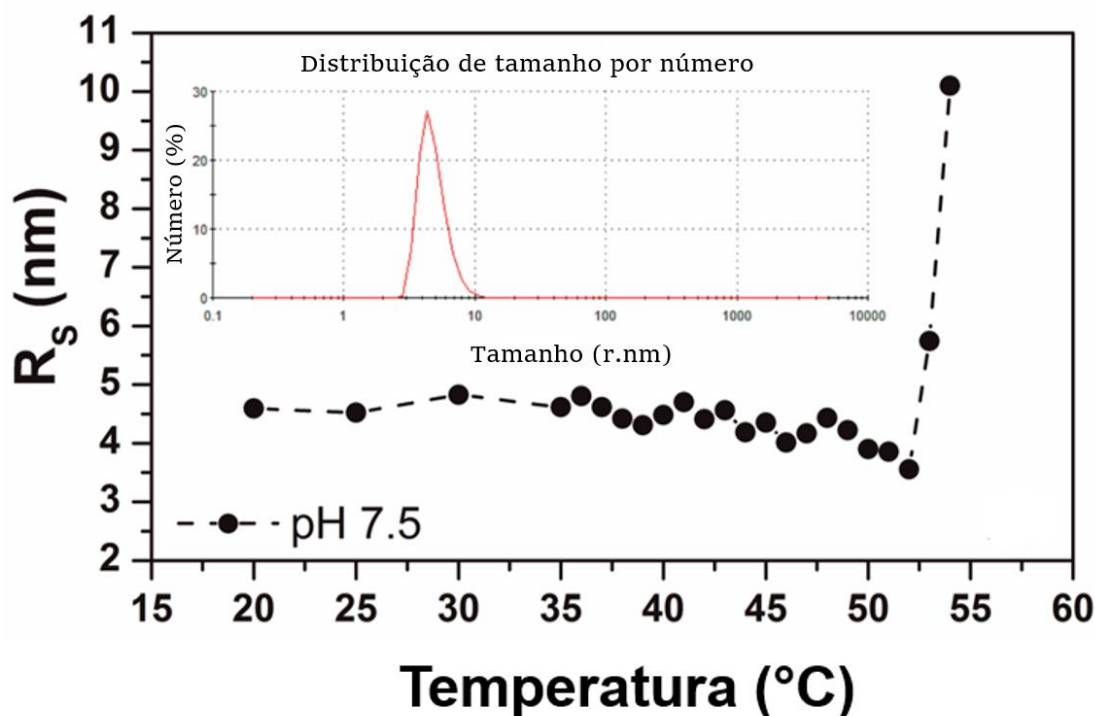
Fonte: Elaborada pela autora

O valor médio de  $R_s$  determinado para a enzima *BLAGH32* em pH 7,5 e 8,5 foi de  $5,0 \pm 0,3$  nm, o que corresponde à uma massa molecular de  $114 \pm 18$  kDa, inteiramente consistente com o esperado para a massa molecular do homodímero de 110 kDa. As Figura 40 e Figura 41 mostram a variação de  $R_s$  em função da temperatura para a enzima em pH 7,5. Como pode-se observar, o valor de  $R_s$  exibe uma dependência mínima com a temperatura no intervalo de 20 a 58 °C. Entretanto, quando a enzima *BLAGH32* foi incubada num intervalo de temperatura entre 59 e 62 °C, o valor de  $R_s$  aumentou para  $50,0 \pm 0,3$  nm, sugerindo uma associação dos homodímeros presentes na solução. Para temperaturas acima de 62 °C, o valor de  $R_s$  aumentou significativamente, com o aparecimento de um precipitado amorfo, como resultado do processo de desnaturação enzimática. O processo de desnaturação foi essencialmente irreversível, a partir das condições descritas, e que pode ser deduzido pelos valores inalterados de  $R_s$  após resfriar-se a amostra até 20 °C posterior à desnaturação à 60 °C.

#### 5.4.1.2 DLS da enzima *LGGH32*

Um importante parâmetro a ser considerado e caracterizado na dinâmica de macromoléculas em solução, trata-se do raio hidrodinâmico das mesmas ( $R_s$ ), o qual pode ser determinado por meio do experimento de espalhamento dinâmico da luz (DLS).<sup>87-95</sup>

A enzima *LGGH32* em solução foi submetida aos experimentos de DLS à 25 °C, e observou-se um perfil característico de soluções monodispersas (Figura 42).



**Figura 42** - Caracterização da enzima *LGGH32* por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da *LGGH32* (em 25 °C) em função da variação de temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora

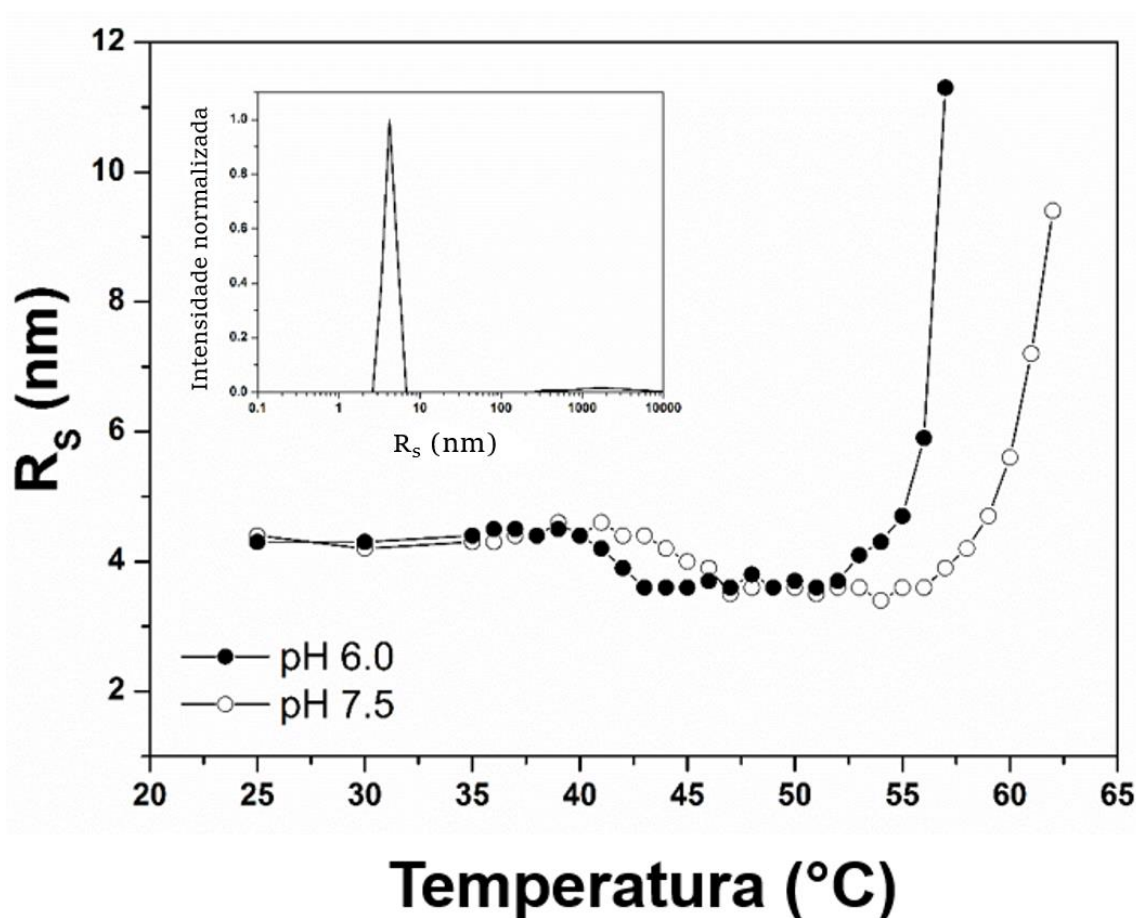
O valor médio de  $R_s$  determinado para a enzima *LGGH32* em pH 7,5 foi de  $4,5 \pm 0,3$  nm, o que corresponde à uma massa molecular de  $114 \pm 18$  kDa, inteiramente consistente com o esperado para a massa molecular do homodímero de 111 kDa. A Figura 42 mostra a variação de  $R_s$  em função da temperatura para a enzima em pH 7,5. Como pode-se observar, o valor de  $R_s$  exibe uma dependência mínima com a temperatura no intervalo de 20 a 48 °C. Entretanto, quando a enzima *LGGH32* foi incubada num intervalo de temperatura entre 49 e 52 °C, o valor de  $R_s$  decaiu para  $3,9 \pm 0,3$  nm, sugerindo uma dissociação do homodímero. Para temperaturas acima de 52 °C, o valor de  $R_s$  aumentou significativamente, com o aparecimento de um precipitado amorfo, como resultado do processo de desnaturação



enzimática. O processo de desnaturação foi essencialmente irreversível, a partir das condições descritas, e que pode ser deduzido pelos valores inalterados de  $R_s$  após resfriar-se a amostra até 20 °C posterior à desnaturação à 60 °C.

#### 5.4.1.3 DLS da Enzima *BAGH32*

Ao analisar-se a enzima *BAGH32* à 25 °C, os perfis observados foram característicos de soluções monodispersas (Figura 43).



**Figura 43** - Caracterização da enzima *BAGH32* por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em pH 6 e 7,5. Raio hidrodinâmico ( $R_s$ ) da *BAGH32* (em 25 °C) em função da variação de temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora

O valor médio de  $R_s$  determinado para a enzima em pH 6 e 7,5 foi de  $4,4 \pm 0,2$  nm. A Figura 43 mostra a variação de  $R_s$  em função da temperatura para a enzima em dois diferentes

valores de pH. Como se pode observar,  $R_s$  demonstra uma mínima dependência da temperatura no range de 25 a 44 °C em pH 7,5. Entretanto, ao ser incubada em temperaturas entre 44 e 56 °C, o valor de  $R_s$  decaiu para  $3,6 \pm 0,3$  nm, sugerindo uma dissociação do homodímero. Para valores de temperatura acima de 56 °C,  $R_s$  aumente significativamente, sugerindo o aparecimento de agregados amorfos, como resultado de um processo de desnaturação.

Observa-se na Figura 43 que em pH 6,  $R_s$  exibe uma mínima dependência em relação à temperatura no intervalo de 25 a 40 °C. Para temperaturas entre 40 e 52 °C, o valor de  $R_s$  decaiu para  $3,6 \pm 0,3$  nm, sugerindo dissociação do homodímero. Entretanto, quando a enzima *BAGH32* é incubada em temperaturas superiores à 52 °C, os valores de  $R_s$  aumentam substancialmente, sugerindo o aparecimento de agregados amorfos.

Em ambos os valores de pH, observou-se que o processo foi essencialmente irreversível, nas condições descritas, e que pode ser deduzido pelos valores inalterados de  $R_s$  após o resfriamento da amostra até 25 °C posterior à desnaturação à 65 °C.

As análises dos dados de DLS revelaram que as três enzimas caracterizadas são monodispersas em solução. O valor médio de  $R_s$  determinado para a enzima *BLAGH32* em pH 7,5 e 8,5 foi de  $5,0 \pm 0,3$  nm, o que corresponde à uma massa molecular de  $114 \pm 18$  kDa, inteiramente consistente com o esperado para a massa molecular do homodímero de 110 kDa (massa molecular do monômero de 55 kDa). Como se pode observar, o valor de  $R_s$  exibe uma dependência mínima com a temperatura no intervalo de 20 a 58 °C. Em temperaturas acima de 62 °C, o valor de  $R_s$  aumentou significativamente, com o aparecimento de um precipitado amorfo, como resultado do processo de desnaturação enzimática. A enzima *LGGH32* apresentou um valor de  $R_s$  de  $4,5 \pm 0,3$  nm, correspondendo ao valor estimado de massa molecular de  $114 \pm 18$  kDa. Este valor é condizente com um homodímero da enzima em solução, cuja massa molecular teórica é 110 kDa (massa molecular do monômero de 55 kDa). Os resultados de variação de temperatura em pH 7,5 demonstraram uma dependência mínima da temperatura no intervalo de 20-48 °C, sendo que a partir de 52 °C, observou-se o aparecimento de um precipitado amorfo e por consequência o indício de desnaturação proteica. Da mesma forma, a enzima *BAGH32* apresentou-se monodispersa e seu valor de  $R_s$  de  $4,4 \pm 0,2$  nm, correspondendo à um homodímero da enzima em solução com massa molecular estimada de  $108 \pm 11$  kDa. Este valor é condizente com o teórico calculado de 116 kDa (massa molecular do monômero de 58 kDa). A enzima *BAGH32* foi analisada em dois

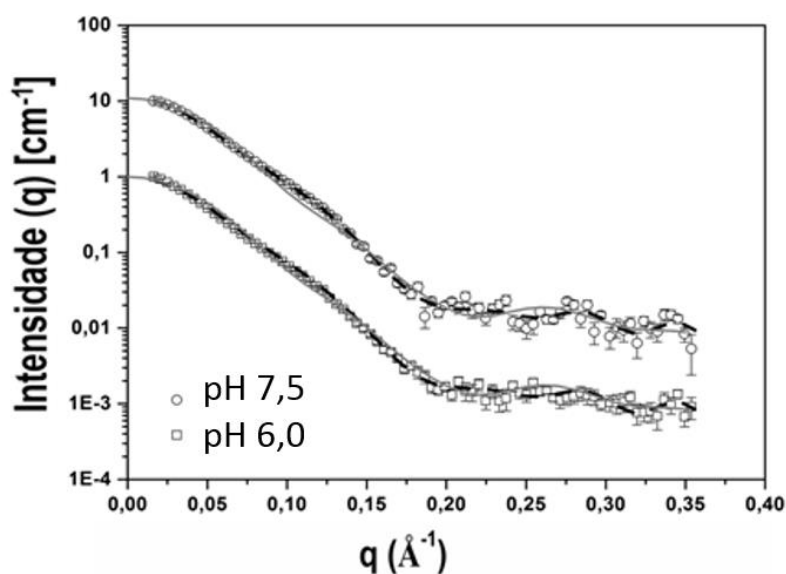
valores de pH distintos 6,0 e 7,5. Esta apresentou-se mais estável em pH 7,5 onde houve o aparecimento de precipitado amorfo numa temperatura de 56 °C. Já em pH 6,0, o mesmo foi observado e temperatura de 52 °C.

#### 5.4.2 Resultados dos estudos de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

A fim de se obter maiores informações sobre a estrutura quaternária das enzimas em questão, e assim também como forma de se complementar os estudos estruturais, as enzimas *BLAGH32*, *LGGH32* e *BAGH32* foram submetidas às análises de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).

##### 5.4.2.1 Enzima *BLAGH32*

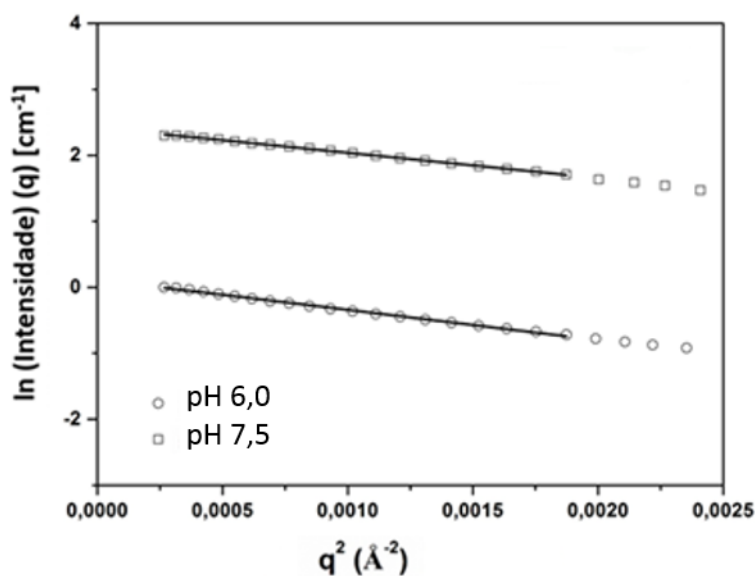
A Figura 44 mostra as curvas de espalhamento de raios X para a enzima *BLAGH32* medidas para dois valores de pH (pH 6,0 e 7,5 a 25 °C).



**Figura 44** -Dados de SAXS coletados para a enzima *BLAGH32* a 25 °C e diferentes valores de pH. Curvas experimentais de SAXS da enzima em pH 6,0 (quadrado aberto), pH 7,5 (círculo aberto) sobrepostas nas curvas de espalhamento baseado no modelo de baixa resolução (DAMs, linhas sólidas). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.

Os dados coletados para ambos os valores de pH demonstram um caráter geral semelhante para ambas as enzimas, indicando a similaridade entre as estruturas.

O gráfico de Guinier exibiu um comportamento linear (Figura 45), indicando a monodispersividade da amostra e que a mesma se encontrou livre de agregados.

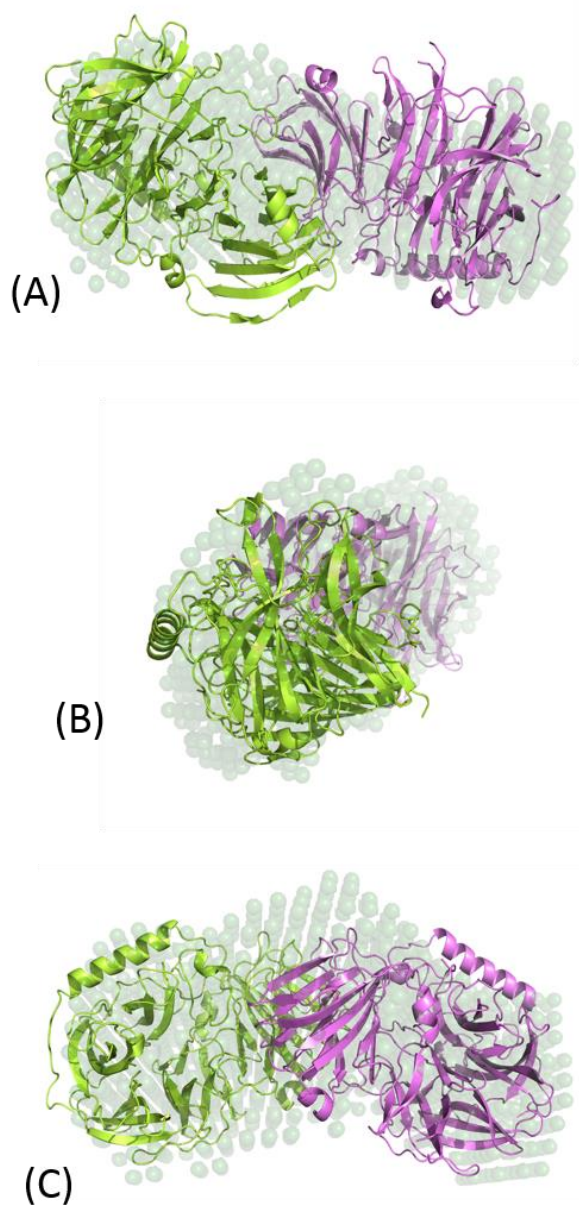


**Figura 45** -Gráfico de Guinier (A) Gráfico de Guinier ( $\ln I$  versus  $q^2$ ) para a *BLAGH32* em pH 6,0 (círculo aberto), pH 7,5 (quadrado aberto). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.

Fonte: Elaborada pela autora

Os raios de giro ( $R_g$ ) determinados pela aproximação de Guinier nos diferentes valores de pH foram de  $33,83 \pm 1,8 \text{ \AA}$  em pH 7,5 e de  $33,33 \pm 1,91 \text{ \AA}$  em pH 6,0.

A forma molecular de baixa resolução foi determinada para a *BLAGH32* em pH 7,5 por meio dos dados de espalhamento de raios X empregando-se o programa DAMMIN<sup>104</sup> para visualização da enzima em solução em diferentes valores de pH. Os resultados dos envelopes de baixa resolução são demonstrados na Figura 46. Dez simulações independentes *ab initio* foram realizadas e os modelos obtidos foram capazes de reproduzir as curvas experimentais. Os resultados foram comparados um com o outro com o uso do programa DAMAVER<sup>105</sup> e o modelo mais representativo ( $\chi^2 = 1.4$ ) é mostrado na Figura 46.



**Figura 46** -Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da *BLAGH32* em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos). (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A).

Fonte: Elaborada pela autora

Como a enzima *BLAGH32* não apresentava estrutura cristalográfica resolvida, realizou-se a sobreposição de seu envelope de SAXS com a estrutura de alta resolução da enzima *BAGH32*. Um resumo dos principais resultados de SAXS da enzima *BAGH32* obtidos está descrito na Tabela 9.

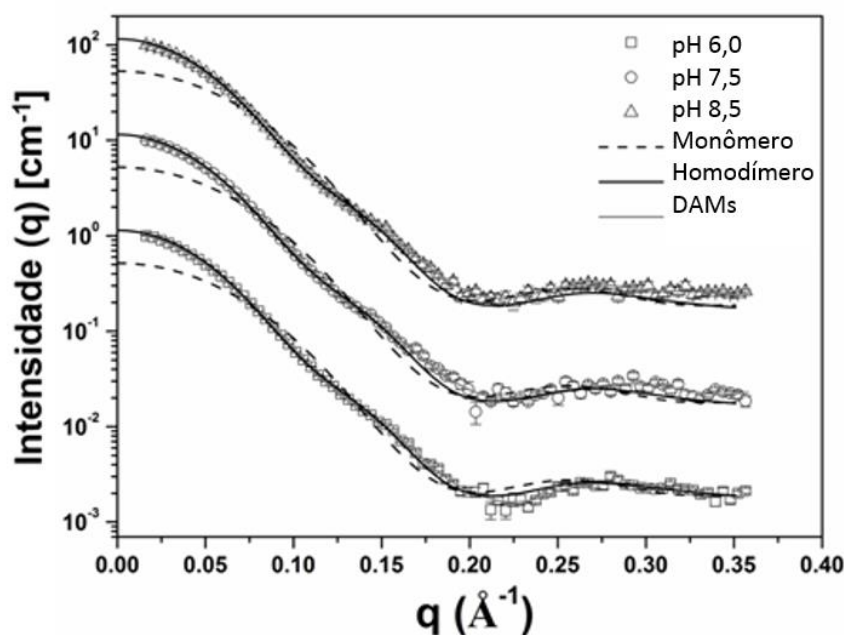
**Tabela 9** -Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima *BLAGH32*. Fonte: elaborado pela autora

$R_g$ (Å) em pH 6,0	$R_g$ (Å) em pH 7,5
$33,33 \pm 1,91$	$33,83 \pm 1,8$

Fonte: elaborado pela autora

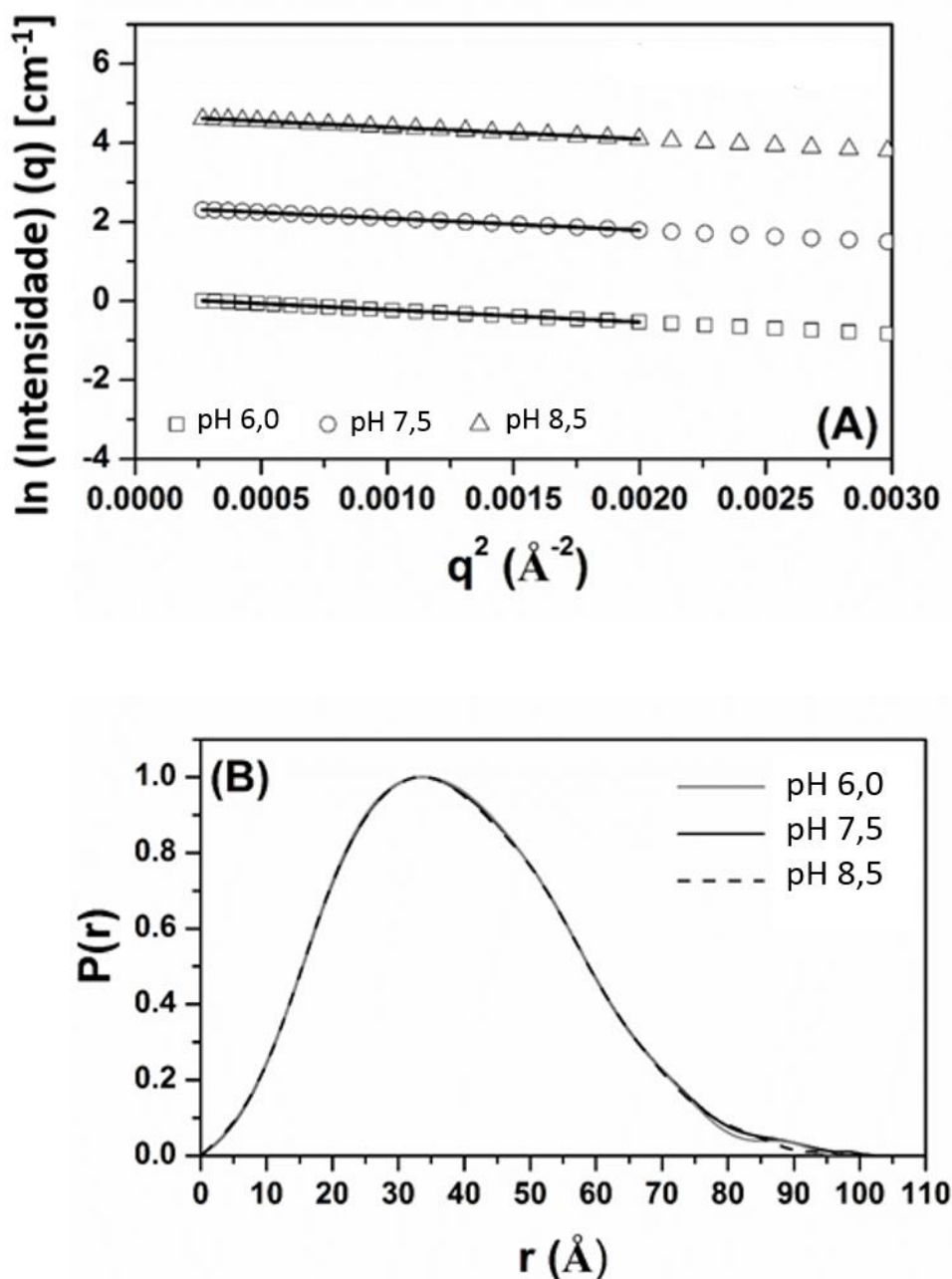
#### 5.4.2.2 Enzima *LGGH32*

A enzima *LGGH32* recombinante trata-se de um homodímero estável em solução. Os perfis de intensidade de SAXS medidos para a enzima *LGGH32* em três diferentes valores de pH, bem como os gráficos de Guinier associados, são demonstrados nas Figura 47 e Figura 48 (A), respectivamente.



**Figura 47** -Dados de SAXS coletados para a enzima *LGGH32* a 25 °C e diferentes valores de pH. Curvas experimentais de SAXS da enzima em pH 6,0 (quadrado aberto), pH 7,5 (círculo aberto) e pH 8,5 (triângulo aberto) sobreposta nas curvas de espalhamento baseado no modelo de baixa resolução (DAMs, linhas sólidas). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 48** - Gráfico de Guinier e curva experimental da função de distribuição de distância. (A) Gráfico de Guinier ( $\ln I$  versus  $q^2$ ) para a *LGGH32* em pH 6,0 (quadrado aberto), pH 7,5 (círculo aberto) e pH 8,5 (triângulo aberto). As curvas foram deslocadas para melhor visualização. (B)  $P(r)$  experimental da *BAGH32* em pH 6,0 (linha cinza), pH 7,5 (linha sólida) e pH 8,5 (linha tracejada). As curvas estão em escala para um máximo de 1,0 para uma pronta comparação.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados coletados para as três condições apresentam um caráter bastante similar, indicando, em caráter global, a similaridade estrutural. O gráfico de Guinier exibiu um comportamento linear, sugerindo que as moléculas se encontram livre de interferências intermoleculares e agregados (Figura 48 (A) e Tabela 10). Os valores dos raios de giro ( $R_g$ )

determinados em pH 6,0; 7,5 e 8,5 utilizando-se a aproximação de Guinier, foi de aproximadamente  $30.65 \pm 0.19$ ,  $30.05 \pm 0.11$  e  $29.98 \pm 0.18$  Å, respectivamente.

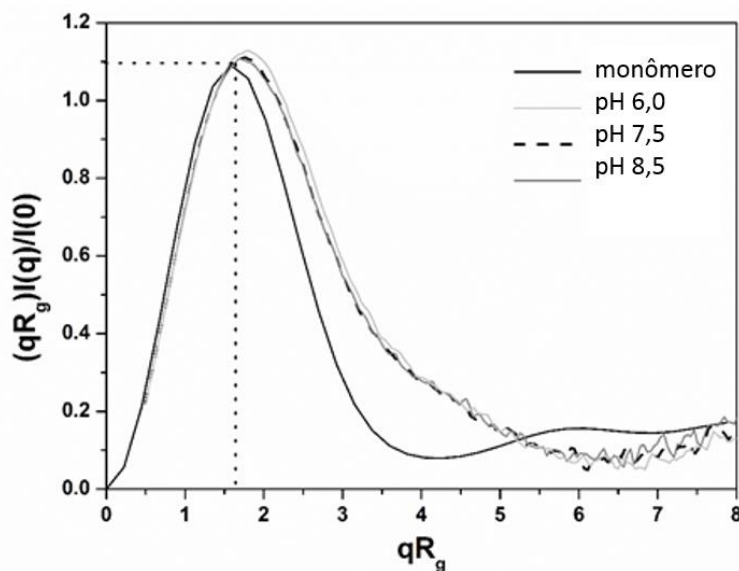
A função de distribuição de função  $P(r)$ , avaliada pela transformada indireta de Fourier empregando-se o programa GNOM<sup>103</sup> é demonstrada na Figura 48 (B). Os perfis têm formatos e posições similares ao pico principal, em 34 Å e o valor da dimensão máxima ( $D_{\max}$ ) de  $105 \pm 5$  Å.

**Tabela 10** -Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima *LGGH32*.

$R_g$ (Å) em pH 6	$R_g$ (Å) em pH 7,5	$R_g$ (Å) em pH 8,5
$30.65 \pm 0.19$	$30.05 \pm 0.11$	$29.98 \pm 0.18$

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico de Kratky gerado a partir dos dados de SAXS (Figura 49) é utilizado para caracterizar o tipo de conformação adotada pela proteína.



**Figura 49** -Gráfico de Kratky dos dados de SAXS para a enzima *LGGH32* em diferentes valores de pH [pH 6,0 (linha cinza), pH 7,5 (linha tracejada) e pH 8,5 (linha sólida)] e comparação com monômero da enzima (linha sólida preta).

Fonte: Elaborada pela autora



A linha sólida preta apresentada na Figura 49, trata-se da curva teórica correspondente ao monômero cristalográfico da estrutura. A curva exibe um valor máximo de 1,1 para  $qR_g = \sqrt{3}$ , típico de uma proteína globular<sup>108</sup>. Para as curvas experimentais, em diferentes valores de pH, o pico deslocado para a direita com um máximo maior que 1,1, o que indica que a enzima *LGGH32* mostra-se como uma molécula esfericamente assimétrica. Além disso, as curvas experimentais mostram decaimento próximo à zero (linha de base) para altos valores de  $qR_g$  o que indica, uma molécula compacta com flexibilidade negligenciável em solução.

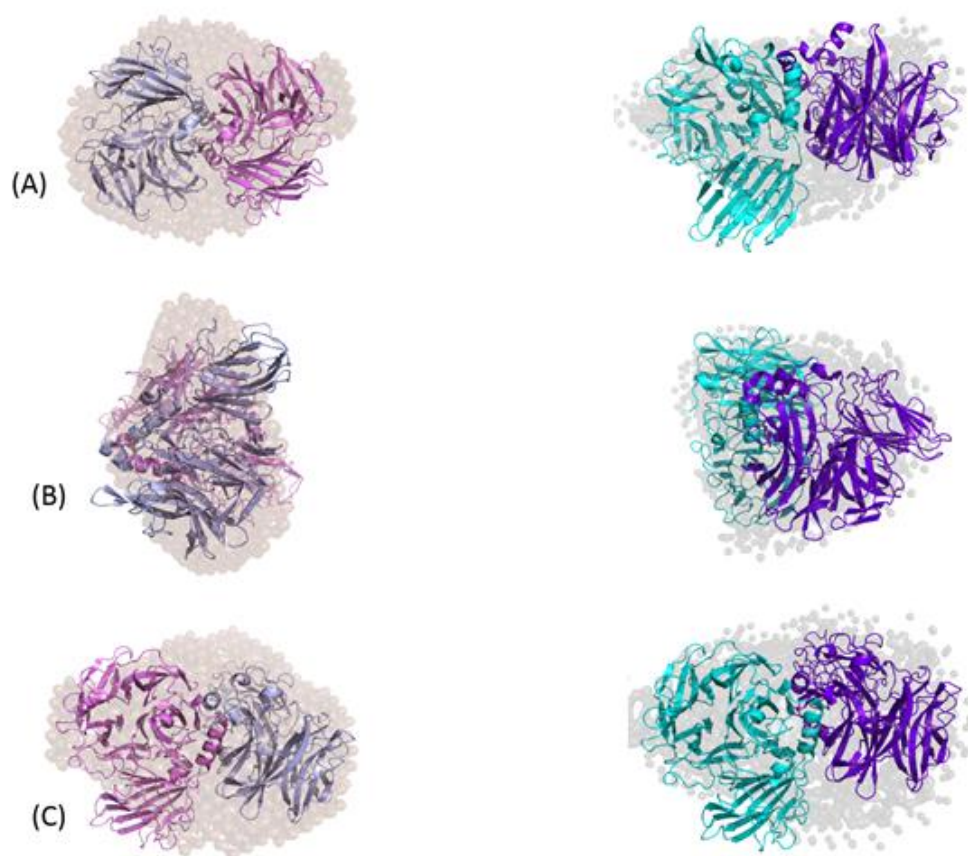
Análises prévias de SAXS indicam que a enzima *LGGH32* é uma molécula assimétrica com raio de giro ( $R_g = 30 \text{ \AA}$  and  $D_{max} = 105 \text{ \AA}$ ) maior que o raio de giro da estrutura monomérica cristalográfica ( $R_g = 22,29 \text{ \AA}$  and  $D_{max} = 73,65 \text{ \AA}$ ). Desta maneira, realizou-se uma busca por interfaces biológicos na estrutura cristalina da enzima *LGGH32* utilizando-se o servidor PISA<sup>95</sup>. Apenas um conjunto homodimérico estável foi detectado (Figura 50). Além disso, a estabilidade química do complexo foi analisada pelo cálculo da energia livre de dissociação do complexo ( $\Delta G^{diss}$ ) e o ganho de energia livre de solvatação sobre a formação do complexo ( $\Delta G_{int}$ ), também utilizando o servidor PISA. Os valores determinados foram de  $\Delta G^{diss} = 10,7 \text{ kcal/mol}$  and  $\Delta G_{int} = -40,8 \text{ kcal/mol}$ . Os valores positivos obtidos para  $\Delta G^{diss}$ , indicam que a enzima *LGGH32* homodimérica, é termodinamicamente estável e que uma força motriz externa é necessária para dissociar o complexo.

A Figura 51 mostra as curvas experimentais de SAXS para a enzima *LGGH32* medidas em 3 diferentes valores de pH e sobrepostas sobre as curvas de espalhamento calculadas com base na estrutura de alta resolução homodimérica detectada pelo servidor PISA.

As curvas de espalhamento teóricas calculadas a partir da estrutura homodimérica (Figura 51), fornece um bom ajuste aos dados em pH 6,0 ( $\chi = 3,7$ ); 7,5 ( $\chi = 3,8$ ) e 8,5 ( $\chi = 3,7$ ). Entretanto, as curvas de espalhamento calculadas para a estrutura monomérica (Figura 49, linhas tracejadas) fornece um pior ajuste para as curvas de espalhamento em pH 6,0 ( $\chi = 8,9$ ), 7,5 ( $\chi = 8,6$ ) e 8,5 ( $\chi = 8,4$ ). Desta maneira, é claro que os dados de SAXS para a enzima *LGGH32* nos três valores distintos de pH são consistentes com moléculas homodiméricas em solução.

A estrutura homodimérica de alta resolução, apresenta-se como uma partícula com  $R_g = 30,98 \text{ \AA}$  e  $D_{max} = 105,5 \text{ \AA}$ . Estes valores encontram-se de acordo com os resultados obtidos por meio da análise de SAXS (Tabela 11).

Os modelos de baixa resolução determinados para a enzima *LGGH32* em pH 7,5 foram determinados pela análise de dados de espalhamento de raios X empregando-se o programa DAMMIN<sup>89-91</sup> e GASBOR<sup>89,98</sup> a fim de se visualizar a forma da proteína em solução. O envelope molecular final obtido é mostrado na Figura 50. Um total de dez (10) simulações *ab initio* foram realizadas e os modelos descrevem corretamente as curvas experimentais. Os resultados foram comparados entre si gerados utilizando-se o programa DAMAVER.<sup>105</sup> Os modelos mais representativos ( $\chi= 1,3$ ) e ( $\chi= 1,7$ ), respectivamente, para o conjunto são apresentado na Figura 50.



**Figura 50** -Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da *LGGH32* em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos) e GASBOR, respectivamente. (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A).

Fonte: Elaborada pela autora

A reconstrução do modelo de baixa resolução para a enzima *LGGH32* a 20 °C e pH 7,5 e 18 Å de resolução, mostrou uma molécula alongada, com um  $D_{max}$  de aproximadamente

106,80 Å e  $R_g = 30,79$  Å. Um resumo dos principais resultados de SAXS descritos neste estudo para a enzima *LGGH32* são apresentados na Tabela 11.

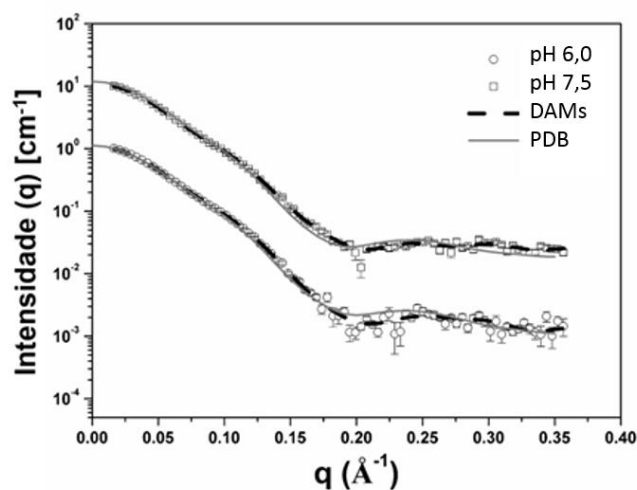
**Tabela 11** - Resultados gerais de SAXS para a enzima *LGGH32*.

Parâmetros	Experimental	Experimental	Experimental
	pH 6,0	pH 7,5	pH 8,5
$R_g$ (Å)	30.65 ± 0.19 (Guinier)	30.05 ± 0.11 (Guinier)	29.98 ± 0.18 (Guinier)
$D_{max}$ (Å)	105 ± 5	105 ± 5	105 ± 5

Fonte: Elaborada pela autora

#### 5.4.2.3 Enzima *BAGH32*

A enzima *BAGH32* foi submetida às análises de SAXS, sendo estas medidas em diferentes concentrações (1 e 4 mg/mL) e diferentes valores de pH (pH 6 e 7,5). Os perfis de intensidade de SAXS medidos para a enzima em pH 6 e 7,5 (4 mg/mL) são demonstrados na Figura 51.



**Figura 51** - Dados de SAXS coletados para a enzima *BAGH32* a 25 °C e diferentes valores de pH. Curvas experimentais de SAXS da enzima em pH 6,0 (círculo aberto) e pH 7,5 (quadrados abertos) sobrepostas nas curvas de espalhamento baseado no modelo de baixa resolução (DAMs, linhas sólidas). As curvas foram deslocadas para melhor visualização.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados coletados para ambas as condições revelam um caráter global bastante semelhante, indicando que à grosso modo, as estruturas são também similares.

O gráfico de Guinier exibiu um comportamento linear, indicando excelente monodispersividade e que as moléculas se encontram livre de interferências intermoleculares e agregados (Figura 52 (A)).

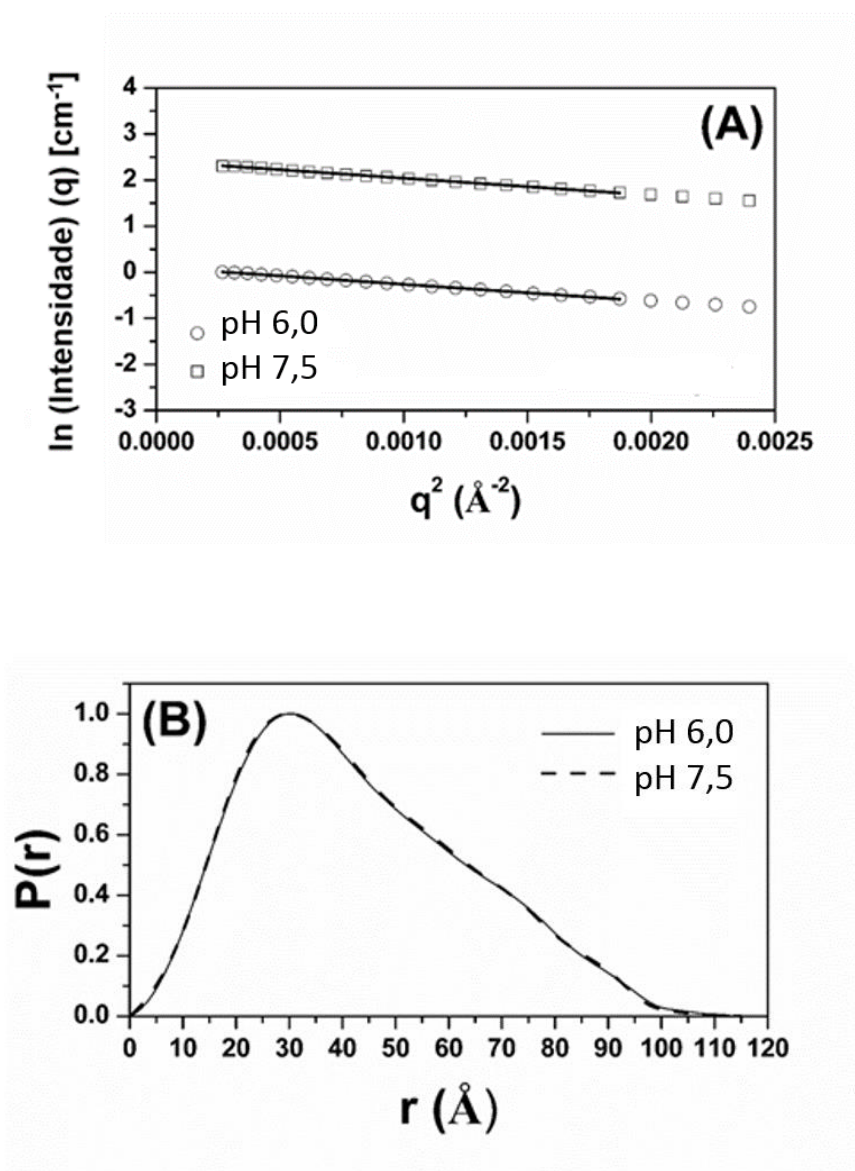
Os raios de giro ( $R_g$ ) determinados pela aproximação de Guinier em pH 6,0 e 7,5 foram  $33,21 \pm 0,24 \text{ \AA}$  e  $33,20 \pm 0,16 \text{ \AA}$ , respectivamente. Além disso, os valores de  $R_g$  determinados em 1 e 4 mg/mL são similares (Tabela 12), indicando que  $R_g$  é independente da concentração proteica utilizada nestes experimentos.

A função de distribuição de distância,  $P(r)$ , foi avaliada pela transformada indireta de Fourier utilizando-se o programa GNOM<sup>103</sup> como mostrado na Figura 52 (B). Os perfis exibiram formato bastante semelhante e dimensão máxima ( $D_{\max}$ ) de  $115 \pm 5 \text{ \AA}$ . Os valores de  $R_g$  determinados em pH 6,0 e 7,5 com o pacote GNOM foram de  $34,26 \pm 0,05 \text{ \AA}$  e  $34,19 \pm 0,06 \text{ \AA}$ , respectivamente.

**Tabela 12** -Raio de giro ( $R_g$ ) calculado pela aproximação de Guinier em duas diferentes concentrações proteicas para a enzima BAGH32.

Concentration (mg/mL)	$R_g$ (Å) at pH 7.5	$R_g$ (Å) at pH 6
1	$33,58 \pm 0,47$	$33,19 \pm 0,63$
4	$33,21 \pm 0,24$	$33,20 \pm 0,16$

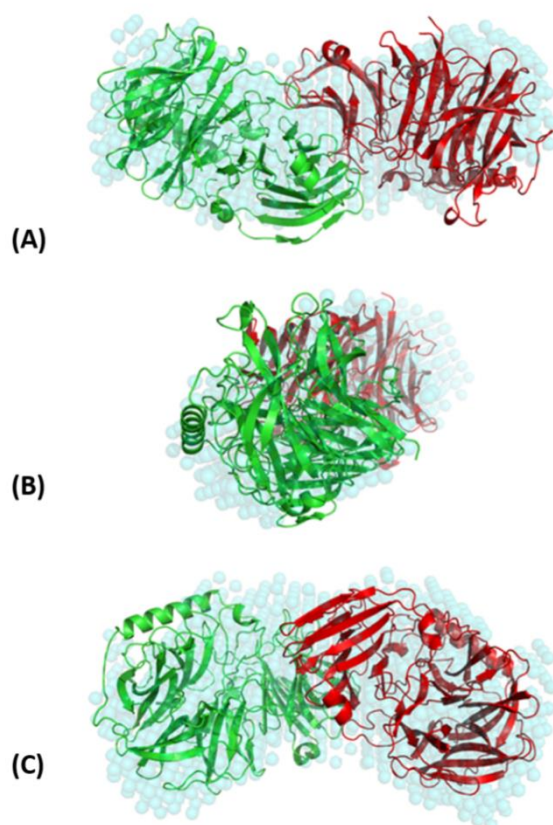
Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 52** -Gráfico de Guinier e curva experimental da função de distribuição de distância. (A) Gráfico de Guinier ( $\ln I$  versus  $q^2$ ) para a *BAGH32* em pH 7,5 (quadrado aberto) e 6,0 (círculo aberto). As curvas foram deslocadas para melhor visualização. (B)  $P(r)$  experimental da *BAGH32* em pH 7,5 (linha tracejada) e 6,0 (linha sólida). As curvas estão em escala para um máximo de 1,0 para uma pronta comparação.

Fonte: Elaborada pela autora

A forma molecular de baixa resolução foi determinada para a *BAGH32* em pH 7,5 por meio dos dados de espalhamento de raios X empregando-se o programa DAMMIN<sup>104</sup> para visualização da enzima em solução em diferentes valores de pH. Os resultados dos envelopes de baixa resolução são mostrados na Figura 53. Um total de dez simulações independentes *ab initio* foram realizadas e os modelos obtidos foram capazes de reproduzir as curvas experimentais. Os resultados foram comparados um com o outro com o uso do programa DAMAVER<sup>105</sup> e o modelo mais representativo ( $\chi^2 = 1.7$ ) é mostrado na Figura 53.



**Figura 53** -Modelos de baixa resolução. (A) Envelope molecular da *BAGH32* em solução a 25 °C e pH 7,5 obtido pelo programa DAMMIN (dammy átomos). (B) Estrutura central rotacionada 90° no eixo y e (C) Estrutura rotacionada 90° no eixo x em relação à estrutura (A).

Fonte: Elaborada pela autora

A reconstrução do modelo de baixa resolução obtido para a *BAGH32* a 25 °C e pH 7,5, restaurado à 18 Å de resolução, revelou uma molécula alongada com um  $D_{max}$  de aproximadamente 116,9 Å e  $R_g = 34,66$  Å. Um resumo dos principais resultados de SAXS da enzima *BAGH32* obtidos está descrito na Tabela 13.

**Tabela 13** - Resultados gerais de SAXS para a enzima *BAGH32*. \* Estrutura homodimérica de alta resolução.

Parâmetros	Experimental	Experimental	DAM	PDB*
	pH 7.5	pH 6	pH 7.5	
$R_g$ (Å)	33,21 ± 0,24 (Guinier)	33,20 ± 0,16 (Guinier)	34,66	34,96
	34,19 ± 0,06 (GNOM)	34,26 ± 0,05 (GNOM)		
$D_{max}$ (Å)	115 ± 5	115 ± 5	116,9	117,1

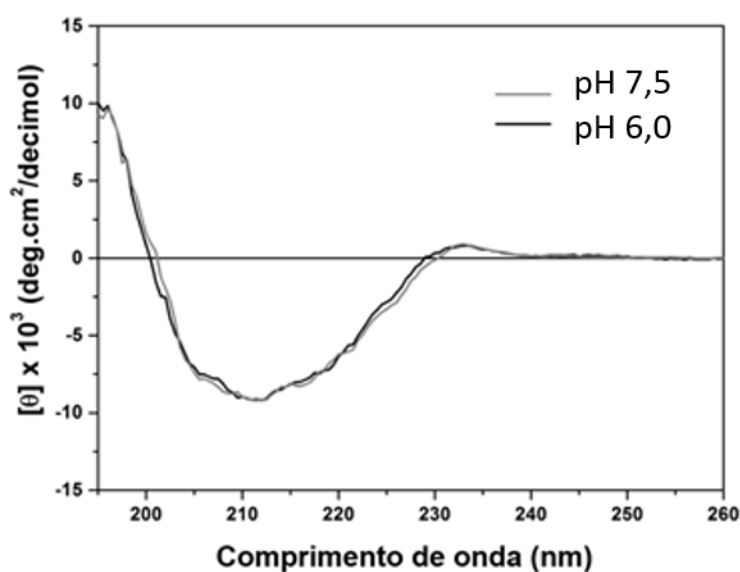
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.4.3 Resultados da Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma das técnicas mais difundidas e utilizadas para a estimativa de estrutura secundária de proteínas em solução. Desta forma, a mesma foi empregada para investigar-se as estruturas secundárias presentes nas enzimas *BLAGH32*, *LGGH32* e *BAGH32*.

#### 5.4.3.1 Enzima *BLAGH32*

Os espectros de Dicroísmo Circular da enzima *BLAGH32* medidos em pH 6,0 e 7,5 são apresentados na Figura 54.



**Figura 54** -Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para enzima *BLAGH32* a 20 °C e valores de pH 6,0 (linha preta) e pH 7,5 (linha cinza).

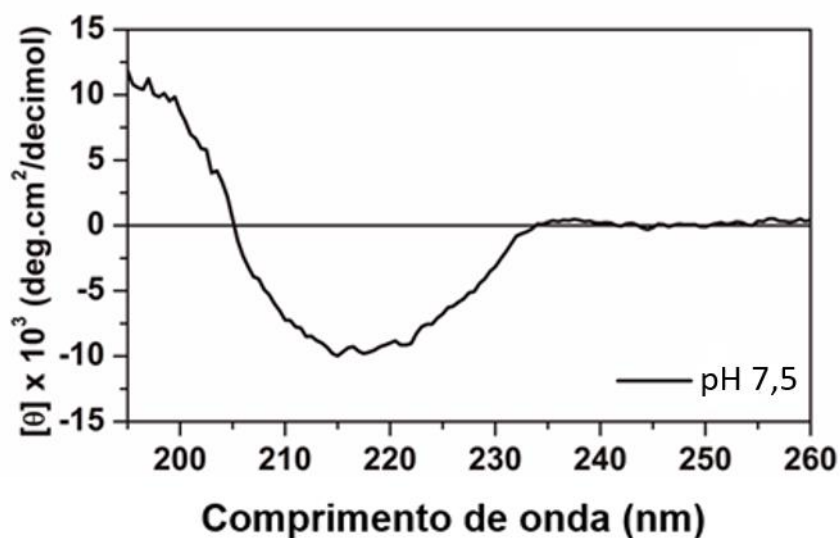
Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de CD para a enzima *BLAGH32* caracterizou-se num amplo mínimo na região de 210-215 nm, sendo indicativo da presença de folhas- $\beta$  em sua estrutura. Assim também, a banda positiva em  $233 \pm 1$  é característica de proteínas ricas em triptofano. Os estudos realizados também indicam que a estrutura secundária da enzima *BLAGH32* não se

altera significativamente em resposta aos diferentes valores de pH 6,0 e 7,5, como observado na Figura 54.

#### 5.4.3.2 Enzima *LGGH32*

O espectro de Dicroísmo Circular da enzima *LGGH32* medido em pH 7,5 é apresentada na Figura 55.



**Figura 55** -Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para enzima *LGGH32* a 20 °C e pH 7,5 (linha preta).

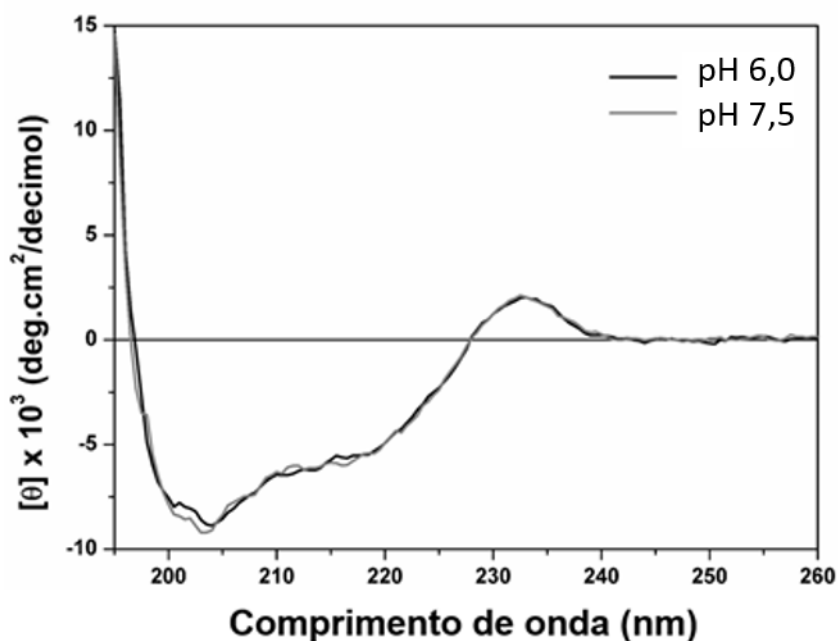
Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de CD caracterizou-se por um amplo mínimo centrado em torno de 215-220 nm, sugerindo a presença de folhas-β em sua estrutura. Além disso, a banda positiva em  $237 \pm 1$  é característica de proteínas com a presença de triptofano.

#### 5.4.3.3 Enzima *BAGH32*



O espectro de CD medido para a enzima *BAGH32* em pH 6,0 e 7,5 é apresentado na Figura 56.



**Figura 56** -Espectroscopia de dicroísmo circular. Espectro de CD coletado para a enzima *BAGH32* a 20 °C e valores de pH 6,0 (linha preta) e pH 7,5 (linha cinza).

Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de CD caracterizou-se por um nítido mínimo centrado em aproximadamente  $204 \pm 1$  nm e um ombro largo em torno de 210-225 nm, sugerindo a presença tanto de folhas- $\beta$  como  $\alpha$ -hélice. Além disso, a banda positiva em  $233 \pm 1$  é característica de proteínas ricas em triptofano. Finalmente, os resultados indicam que a estrutura secundária da enzima *BAGH32* não se altera significativamente em resposta aos diferentes valores de pH 6,0 e 7,5, como observado na Figura 56.

Em relação aos resultados de CD, a enzima *BLAGH32* foi avaliada em dois diferentes valores de pH 6,0 e 7,5. Para ambos, não houve alteração significativa na estrutura devido à variação de pH. Observou-se um amplo mínimo em seu espectro no range 210-215nm, sendo um indicativo da presença de folhas- $\beta$ . Além disso, a banda positiva em  $233 \pm 1$  nm revela uma estrutura rica em triptofano.

Para a enzima *LGGH32* avaliada em pH 7,5, o espectro reportado em 215-220 nm revela a presença de folhas- $\beta$  e assim também a banda positiva em  $237 \pm 1$  nm indica uma estrutura com presença de triptofano.

A enzima *BAGH32* foi analisada em pH 6,0 e 7,5 e para ambos, não houve alteração significativa na estrutura devido à variação de pH. A banda reportada em  $204 \pm 1$  nm e o ombro largo em 210-225 nm em seu espectro revela a presença de folhas- $\beta$  e hélices- $\alpha$ . Assim também, a banda positiva em  $233 \pm 1$  nm indica uma proteína rica em triptofano.

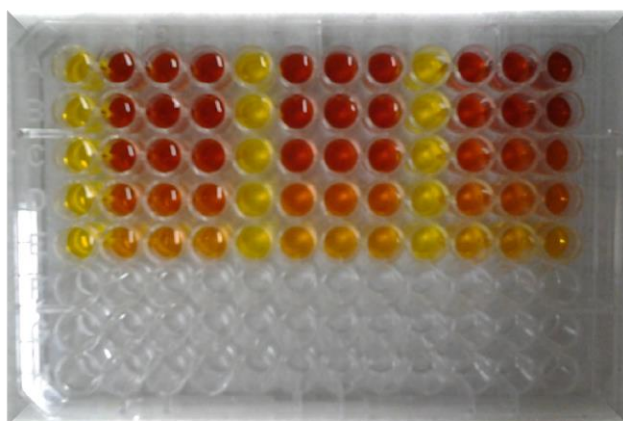
Observando-se os dados teóricos das enzimas, avaliados pelo programa *ExPASy ProtParam*<sup>110</sup>, tem-se um total de 14 triptofanos para a enzima *BLAGH32* e 17 para a *BAGH32*, evidenciados pela banda positiva que apresentam. A curta banda positiva identificada para a enzima *LGGH32* deve-se à presença de somente 10 triptofanos em sua estrutura.

Comparando-se os resultados obtidos de CD com as estruturas cristalográficas das enzimas *LGGH32* e *BAGH32* e fazendo-se uma prospecção para a enzima *BLAGH32*, devido à ausência de estrutura da mesma, pode-se dizer que o conteúdo de estrutura secundária indicada no CD é condizente com as estruturas tridimensionais obtidas em cristalografia, com a presença de folhas- $\beta$  e a evidência de estruturas ricas em triptofano.

## CAPÍTULO 6

### Estudos Bioquímicos

---



*Apresentamos os resultados obtidos com os ensaios de caracterização funcional das proteínas LGGH32 (sucrose-6-phosphate hydrolase de L. gasseri) e BAGH32 ( $\beta$ -frutofuranosidase de B. adolescentis) ressaltando-se a importância das mesmas e comparando-as entre si.*



## 6 Caracterização Bioquímica

### 6.1 Ensaio de caracterização cinética da hidrólise

As frutotransferases apresentam basicamente dois tipos de atividade cinética: a de hidrólise de açúcares e a de frutooligomerização.<sup>71</sup> Na hidrólise de açúcares sejam simples ou compostos são convertidos em monômeros simples e na atividade de frutooligomerização temos a conversão de açúcares simples em frutooligossacarídeos ou frutanos. Baseando-se nisso, os ensaios de caracterização enzimática visaram à identificação destas características nas enzimas em estudo.

#### 6.1.1 Identificação da concentração ótima de enzima

A identificação da concentração ótima para atividade das enzimas *LGGH32* de *L. gasseri* e *BAGH32* de *B. adolescentis* foram inicialmente mensuradas utilizando-se o substrato 500 mM de sacarose<sup>111</sup> com uma varredura nas concentrações enzimáticas de 10 a 100 nM. O experimento consistiu no preparo de micro-reações adicionando-se 40 µL de 1,25 M de sacarose (solução estoque) diluída em água Milli-Q, 50 µL de tampão (50 mM Tris-HCL; 150 mM NaCl), 10 µL de enzima. O procedimento experimental consistiu no aquecimento da solução a 37 °C por 15 minutos, seguido pela adição de 100 µL de DNS e posterior aquecimento a 95 °C por 15 minutos. A quantificação de açúcares redutores foi realizada utilizando-se o reagente DNS<sup>112</sup> à 540 nm em aparelho espectrofotométrico (*Multiskan spectrum, Thermo Scientific, EUA*), com curva padrão de glicose (Sigma). Todas as reações foram realizadas em Termociclador (BioRad®), reações em triplicata e com controle negativo.

#### 6.1.2 Identificação do tempo ótimo para reação enzimática

A identificação do tempo ótimo de reação a partir da varredura do mesmo em relação a concentração ótima possibilita a obtenção do tempo com melhor eficiência para as reações

enzimáticas. O experimento consistiu em ensaios enzimáticos, com variação temporal de 1, 5, 10 e 15 minutos. A reação foi inibida com a adição de DNS e aquecimento a 95 °C por 15 minutos. Além disso, foi avaliada a variação da concentração de enzima numericamente próxima em função da determinada como ótima ( $x$  = concentração original,  $x/2$ ,  $2x$  e  $3x$ ). A quantificação de açúcares redutores foi realizada utilizando-se o reagente DNS<sup>112</sup> à 540 nm em aparelho espectrofotométrico (*Multiskan spectrum, Thermo Scientific, EUA*).

### 6.1.3 Determinação do pH e temperatura ótimos para hidrólise da sacarose

A identificação do pH e temperatura ótimos para as enzimas, foram determinados utilizando-se a sacarose como substrato. O valor de pH foi determinado com reações cujo valor de pH da solução tamponante (tampão 20 mM de fosfato de sódio/citrato de sódio e glicina) variou de 2,0 a 10,0, com acréscimo a cada 0,5. As concentrações finais das proteínas no meio reacional foram de 20 nM e 35 nM para a *LGGH32* e *BAGH32*, respectivamente.

O preparo das reações consistiu na adição de 40 µL de 1,25 M de sacarose (solução estoque) diluída em água Mili-Q, 50 µL de 0,04 M do tampão (20 mM de fosfato de sódio/citrato de sódio e glicina) com valores de pH distintos e 10 µL de enzima diluída no tampão com o respectivo pH tamponante de análise. A reação processou-se a 37 °C por 15 minutos, seguido da adição de 100 µL de DNS e aquecimento a 95 °C por 15 minutos. A quantificação de açúcares redutores utilizou o reagente DNS<sup>112</sup> à 540 nm e aparelho espectrofotométrico (*Multiskan spectrum, Thermo Scientific, EUA*). Entre cada passo experimental as amostras foram mantidas à baixa temperatura (gelo) para inibição da atividade. Para a identificação da temperatura ótima das enzimas, avaliou-se a reação enzimática no intervalo de 20 a 80 °C, utilizando os procedimentos experimentais descritos acima.

### 6.1.4 Atividade cinética em sacarose

Determinada as condições ótimas de temperatura e pH das enzimas, realizou-se a caracterização dos parâmetros cinéticos das mesmas. Para tanto, a reação da enzima *LGGH32* foi preparada utilizando-se: 50 µL de 0,04 M do tampão citrato de sódio pH 5,5 e 10 µL de

enzima diluída no mesmo tampão para concentração final de 20 nM. A reação processou-se a 50 °C por 5 minutos seguida da adição do reagente de DNS e aquecimento a 95 °C por 15 minutos. Para os ensaios com a enzima *BAGH32*, preparou-se o tampão Bis-Tris pH 6,0 nas mesmas condições de reação descritas para *LGGH32* salvo a concentração enzimática final de 35nM, temperatura reacional de 45°C por 5min.

#### 6.1.4 Ensaios de termo estabilidade das enzimas

A estabilidade das enzimas *LGGH32* e *BAGH32* foi avaliada na ausência do substrato específico: a sacarose. O experimento consistiu na incubação por 0,08, 0,16, 0,5, 1, 5, 24 e 48 h da enzima *LGGH32* em temperaturas entre 40 e 70 °C e da enzima *BAGH32* em temperaturas entre 30 e 70 °C em seus respectivos pH e concentração ótimos. Posteriormente à incubação, foi adicionada a cada condição, 500 mM de sacarose (concentração final) e processou-se a reação a 50°C por 5 min e 45°C por 5 min respectivamente para *LGGH32* e *BAGH32*. A avaliação do açúcar redutor para cada condição utilizou reagente DNS<sup>112</sup> à 540 nm em aparelho espectrofotométrico (*Multiskan spectrum, Thermo Scientific, EUA*), com procedimentos experimentais descritos no item anterior.

#### 6.2 Ensaios de análise de atividade de frutossiliação

Conforme já ressaltado, as proteínas das famílias GH32 e GH68 podem apresentar tanto a função de hidrólise de açúcares, dentre eles o mais comum, a sacarose, bem como uma atividade secundária, porém não menos importante, de frutossiliação que é a formação de açúcares compostos por uma glicose e ramificações de frutose. Visando-se à análise dessa atividade pelas enzimas *LGGH32* e *BAGH32*, realizaram-se os ensaios que prosseguem. Tais ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. Maurício Batista Fialho, UFABC e com a mestrandia Fernanda Zaninette, do Instituto de Botânica, SP e com o pós-doutorando Marco Kadowaki do Grupo de Biotecnologia Molecular IFSC-USP.

### 6.2.1 Análise de carboidratos por HPAEC/PAD

A formação de possíveis frutooligossacarídeos (FOS) foi avaliada da seguinte maneira: as proteínas *LGGH32* e *BAGH32* foram diluídas em seus tampões ótimos para hidrólise (citrato de sódio pH 5,5 e Bis-Tris pH 6,0, respectivamente), concentração enzimática final de 20 nM e 35 nM, respectivamente e temperatura (50 °C e 45 °C, respectivamente). Selecionaram-se tempos distintos (5 minutos, 12 horas e 24 horas) para diferentes concentrações de sacarose (50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000 e 2000 mM). Em uma segunda avaliação, foram selecionados os tempos (8 horas e 10 horas) e as concentrações de sacarose (300 mM e 2000 mM). A reação foi inibida por aquecimento em água fervente por 10 min., em seguida as reações foram diluídas (10 µL de amostra para 990 µL de água Mili-Q) e filtradas em membrana de nitrocelulose (0,45 µm) (Millipore®). As amostras foram então analisadas por Cromatografia Líquida de Troca Aniônica de Alto Desempenho acoplada a Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex ICS-3000 (USA), utilizando coluna Carbo Pack PA 1 (4 x 250 mm). A eluição foi realizada utilizando gradientes de hidróxido de sódio 150 mM (eluente A) e acetato de sódio 500 mM em hidróxido de sódio 150 mM (eluente B), conforme metodologia já estabelecida.<sup>113-114</sup> O tempo de eluição das amostras foi de 40 minutos cada, com fluxo de 0,250 mL min<sup>-1</sup>. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões comerciais. A quantificação dos açúcares identificados foi realizada utilizando curvas com diferentes concentrações dos padrões (25, 50, 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>), considerando-se a concentração e a área do pico de cada açúcar. Foram empregados padrões comerciais de frutose, glicose, sacarose, 1-cestose e nistose (*Sigma-Aldrich*), e padrão de neocestose, gentilmente fornecido pelo Dr. Norio Shiomi (*Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japão*) ao Instituto de Botânica, SP.

### 6.2.2 Análise de carboidratos por CCD

Para a análise de carboidratos solúveis (FOS) por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram avaliadas as amostras que apresentaram 80 µg de açúcares totais as quais foram aplicadas em lâminas de sílica-gel 60254 20x20 cm (*Merck*). A CCD foi conduzida, utilizando como fase móvel álcool isobutílico- álcool n-propílico- água (3:12:4; v:v:v), com



desenvolvimento duplo totalizando 12 h de corrida. A revelação dos açúcares empregou uma solução de uréia/ácido ortofosfórico<sup>115</sup>, seguida de secagem em estufa a 150 °C por três minutos. Foram empregados padrões comerciais de frutose, glicose, sacarose, 1-cestose e nistose (*Sigma-Aldrich*) e padrão de neocestose cedidos pelo Dr. Norio Shiomi ao Instituto de Botânica.

### 6.2.3 Espectrometria de Massas

Para a medida da massa dos carboidratos solúveis (FOS) por espectrometria de massas os produtos reacionais das enzimas *LGGH32* e *BAGH32*, foram analisados da seguinte maneira: Uma alíquota (1 µL) do produto reacional das enzimas *LGGH32* (20 nM) e *BAGH32* (35 nM) em sacarose (300 mM e 2000 mM) avaliadas em tempos distintos (8 e 10 horas) foi misturada à 1 µL da matriz DHB (ácido diidroxibenzoico) à 10 mg/mL diluída em 30% de acetonitrila e deixou-se secar sobre a placa de amostras<sup>116</sup>. Os padrões de massas para avaliação dos produtos reacionais foram: sacarose, 1-cestose e nistose, utilizando-se a mesma matriz. As amostras foram analisadas utilizando-se o Espectrômetro de Massas Microflex LT MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*, EUA). As medidas foram realizadas no modo linear íon-positivo com um range de 300-720 m/z, utilizando-se uma potência do laser de 61 e 600 tiros no mesmo ponto. A média das massas obtidas foram atribuídas e processadas utilizando-se o software *flexAnalysisTM* (*Bruker Daltonics*, EUA).

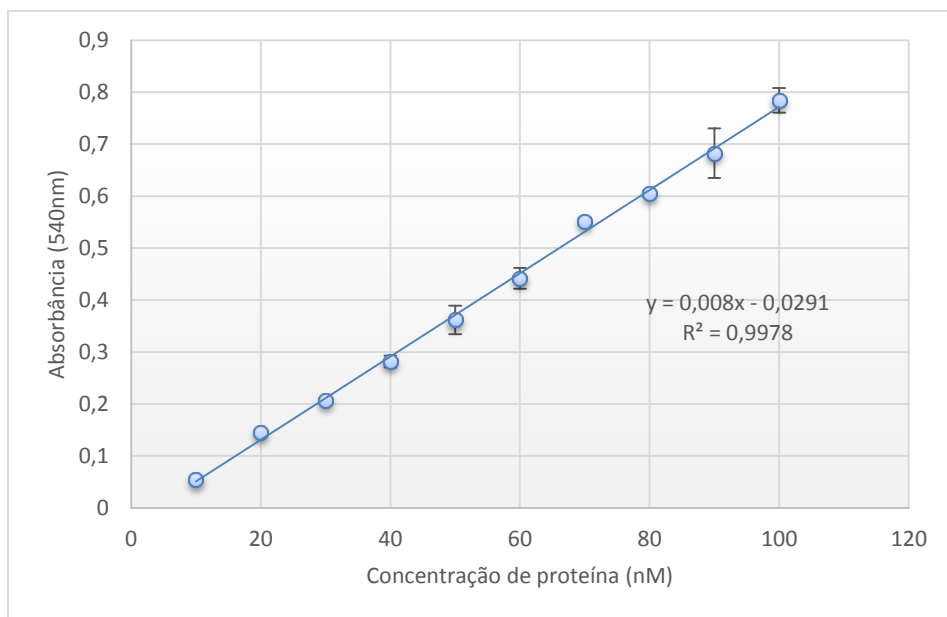
## 6.3 Resultados e Discussões da Caracterização Funcional

### 6.3.1 Análises dos ensaios de hidrólise das enzimas *LGGH32* e *BAGH32*

#### 6.3.1.1 Identificação da concentração ótima de enzima

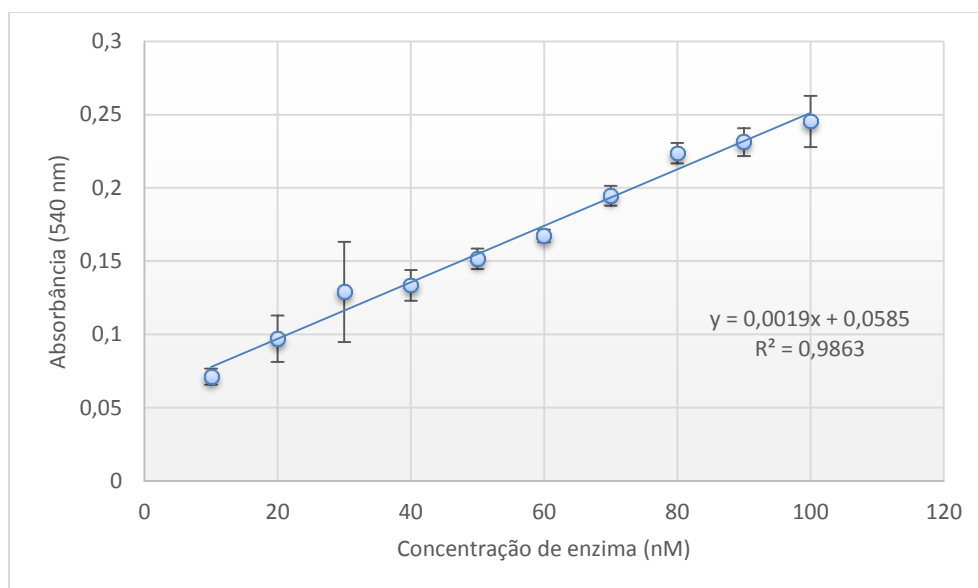
A determinação de uma concentração eficiente de enzima para o desempenho da atividade das mesmas constitui-se no ponto inicial para a caracterização das proteínas de estudo. Assim, utilizando a temperatura de 37 °C (temperatura média onde desenvolve os

organismos *Bifidobacterium adolescentis* e *Lactobacillus gasserique* foram fonte dos genes para as enzimas de estudo) e uma concentração de sacarose saturante (500 mM) para a enzima foi avaliada a concentração enzimática ideal. A concentração enzimática ideal foi tomada como a maior concentração em que se poderia mensurar a quantidade de açúcar redutor liberado sem extrapolar a lei de Lambert-Beer. Assim de acordo com as Figura 57 e Figura 58, admitimos um valor entre 0,8 e 0,9 para a absorbância.



**Figura 57** - Identificação da concentração ótima de enzima para a *LGGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 58** - Identificação da concentração ótima de enzima para a *BAGH32*

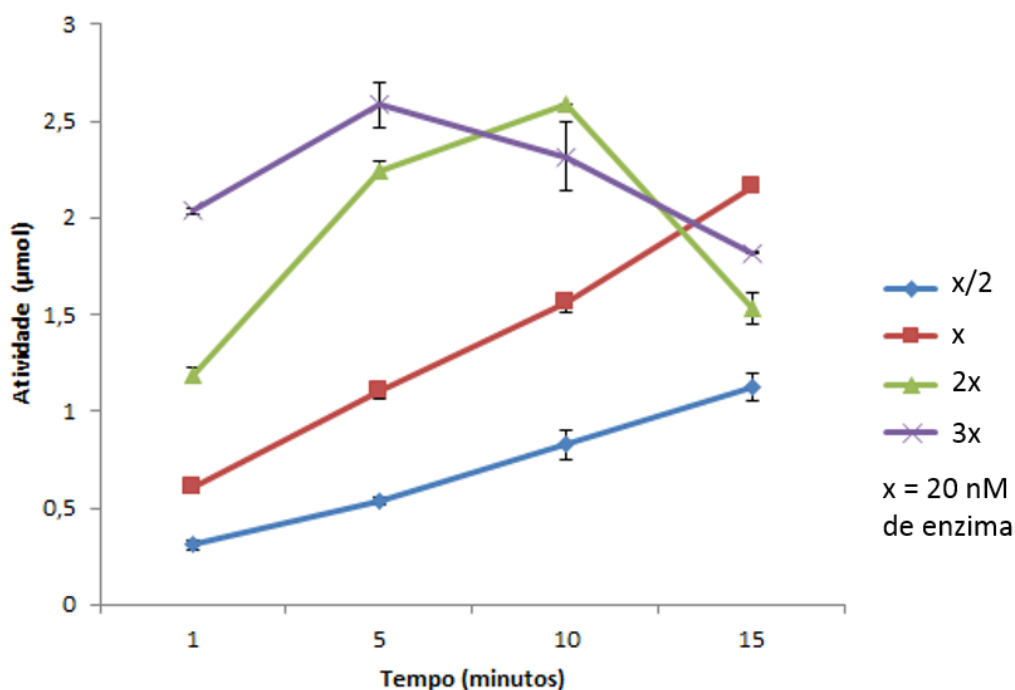
Fonte: Elaborada pela autora

Dessa maneira, de acordo com os dados experimentais obtemos que para a enzima *LGGH32* a concentração foi de 20 nM e para a *BAGH32* de 35 nM.

### 6.3.1.2 Identificação do melhor tempo de reação enzimática

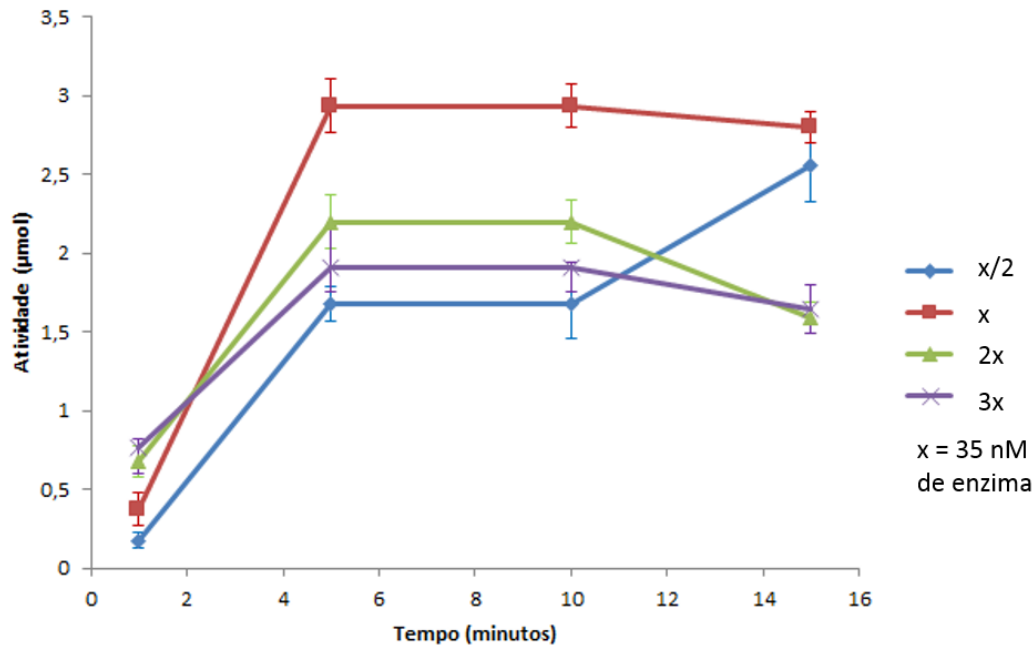
A identificação do melhor tempo de reação enzimática, isto é, o menor tempo de reação para que ocorra a degradação do substrato sacarose frente a menor concentração enzimática foi determinada a partir da variação do tempo de reação para a hidrólise enzimática. Neste experimento, foi analisado conjuntamente com o tempo a variação na concentração enzimática, tomando como referência a determinada no experimento anteriormente discutido.

Os resultados estão apresentados na Figura 59 e para a enzima *LGGH32* e na Figura 60 para a *BAGH32*.



**Figura 59** -Representação da identificação do melhor tempo e concentração da enzima *LGGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora



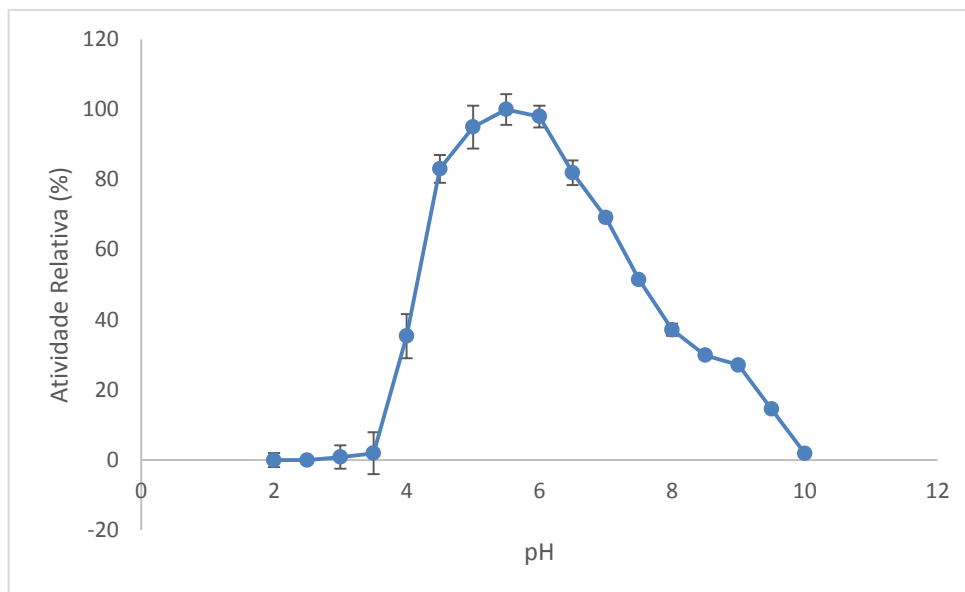
**Figura 60** - Representação da identificação do melhor tempo e concentração da enzima *BAGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com os dados experimentais observados nas Figura 59 e Figura 60, a enzima *LGGH32* apresenta como melhor tempo 5 minutos e concentração de enzimática de 3x, isso é, 60 nM. Já a enzima *BAGH32* apresentou menor tempo e melhor concentração enzimática em 5 minutos e concentração de 35 nM de enzima.

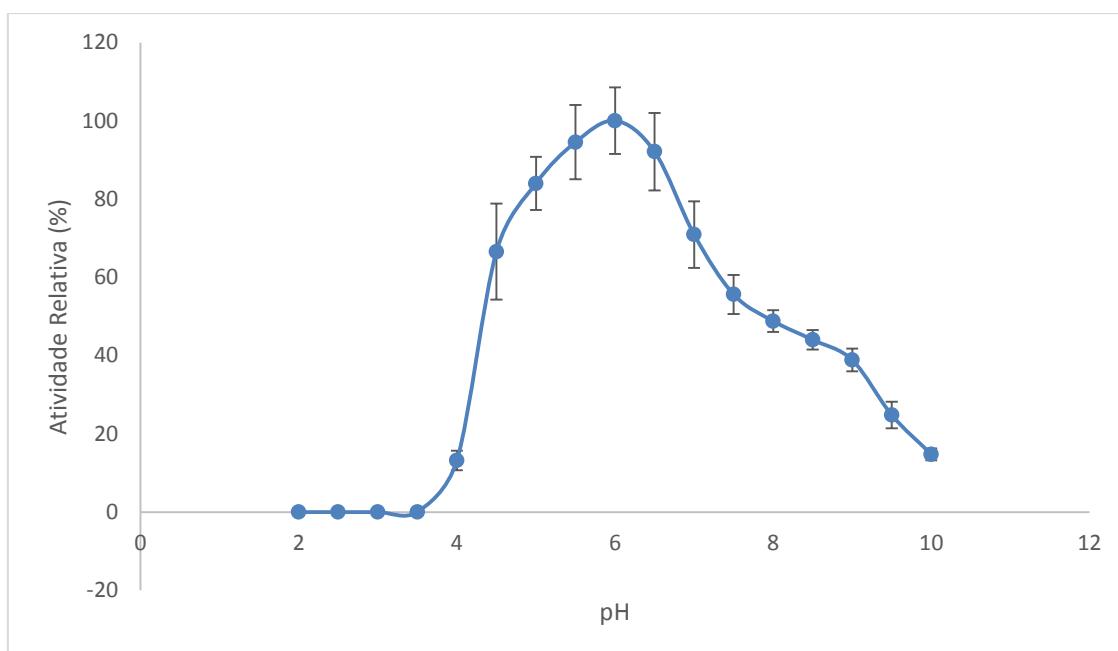
### 6.3.1.3 Análise do melhor pH para atividade de hidrólise das enzimas

A atividade de hidrólise das enzimas em função da variação de pH do meio tamponante foi realizado a partir da determinação da concentração e tempo para hidrólise adequado. As Figura 61 e Figura 62 representam os dados obtidos a partir destes ensaios.



**Figura 61** -Representação do ensaio de variação de pH em função da Atividade Relativa (%) da enzima *LGGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 62** -Representação do ensaio de variação de pH em função da Atividade Relativa (%) da enzima *BAGH32*.

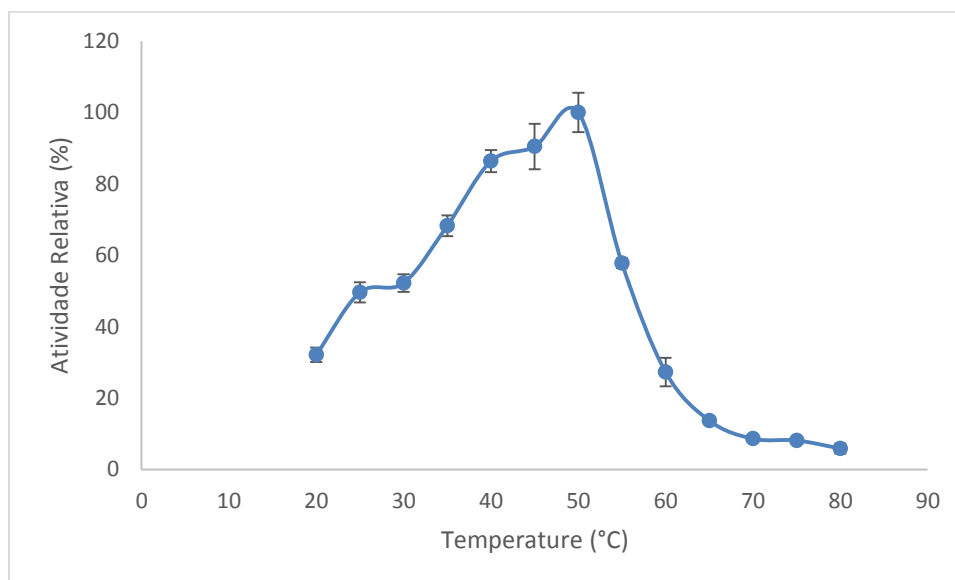
Fonte: Elaborada pela autora

Para a enzima *LGGH32* vale destacar que os experimentos foram realizados utilizando-se inicialmente a concentração de enzima de 60 nM. No entanto, esta concentração em valores de pH levemente ácidos atingiram o limite de detecção colorimétrica. Desta forma, o experimento foi repetido em 40 nM e 30 nM e o problema repetiu-se. Assim, utilizou-se a concentração de 20 nM que se apresentou com bons valores na determinação do tempo e concentração ótima de enzima.

A partir dos dados experimentais podemos inferir que as enzimas *LGGH32* e *BAGH32* apresentam atividade ótima em meio tamponante levemente ácido entre 5,5 para a primeira e 6,0 para a segunda. Assim, os tampões selecionados para caracterização enzimática foram acetato de sódio para *LGGH32* e Bis-Tris para *BAGH32*.

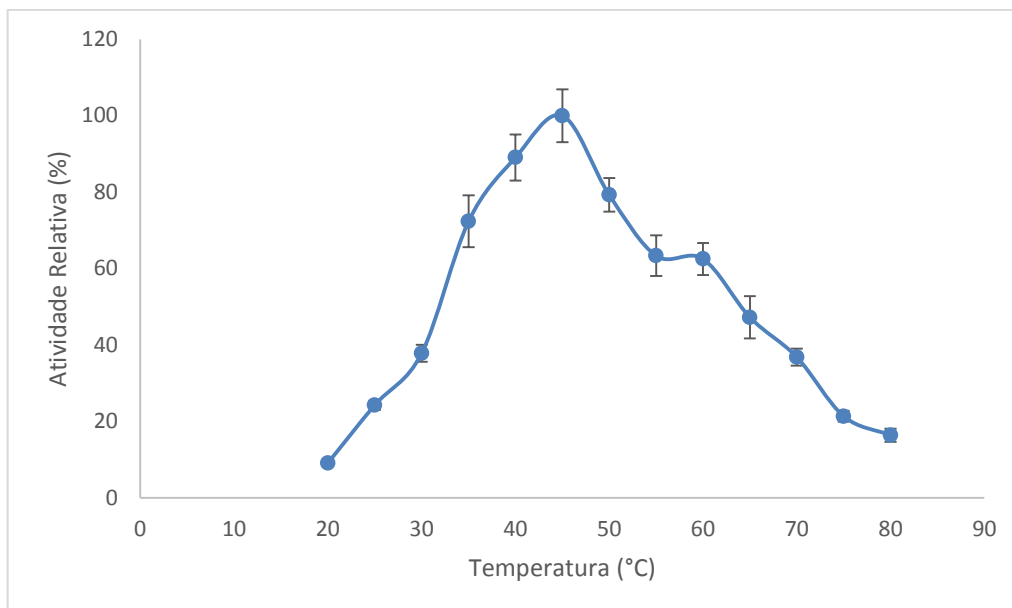
#### 6.3.1.4 Análise da melhor temperatura para os ensaios de hidrólise enzimática

A atividade de hidrólise das enzimas em função da variação de temperatura para as enzimas *LGGH32* e *BAGH32* estão apresentados nas Figura 63 e Figura 64.



**Figura 63** -Avaliação da melhor temperatura para reação de hidrólise enzimática em função da Atividade Relativa para a enzima *LGGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora



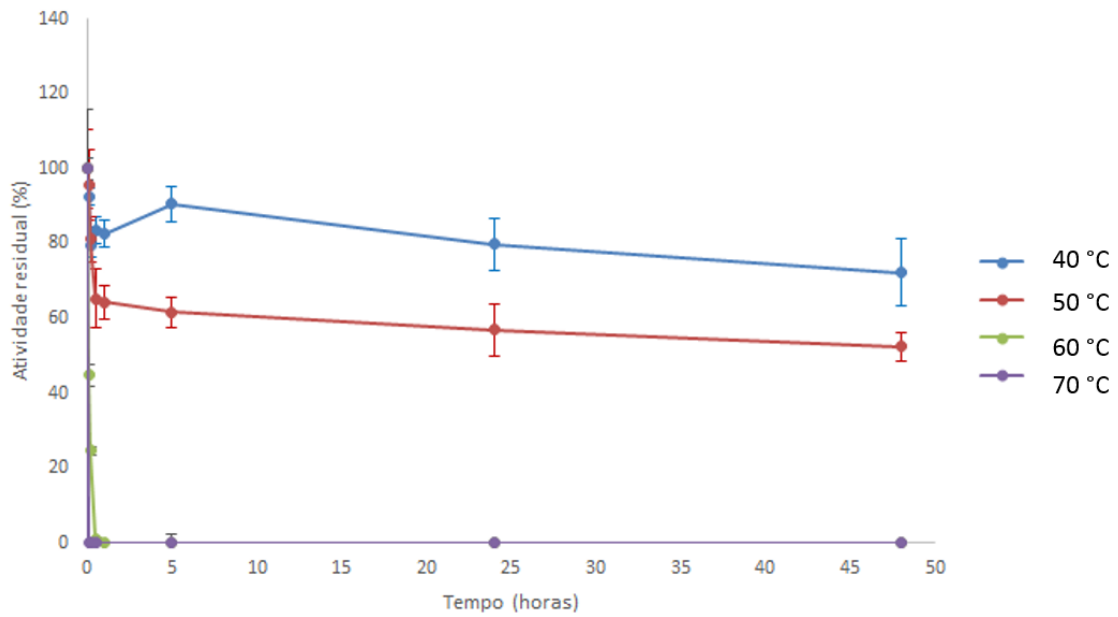
**Figura 64** - Avaliação da melhor temperatura para reação de hidrólise enzimática em função da Atividade Relativa para a enzima *BAGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir deste resultado, observamos que a atividade das enzimas *LGGH32* e *BAGH32* foi melhor para as temperaturas de 50 °C e 45 °C respectivamente.

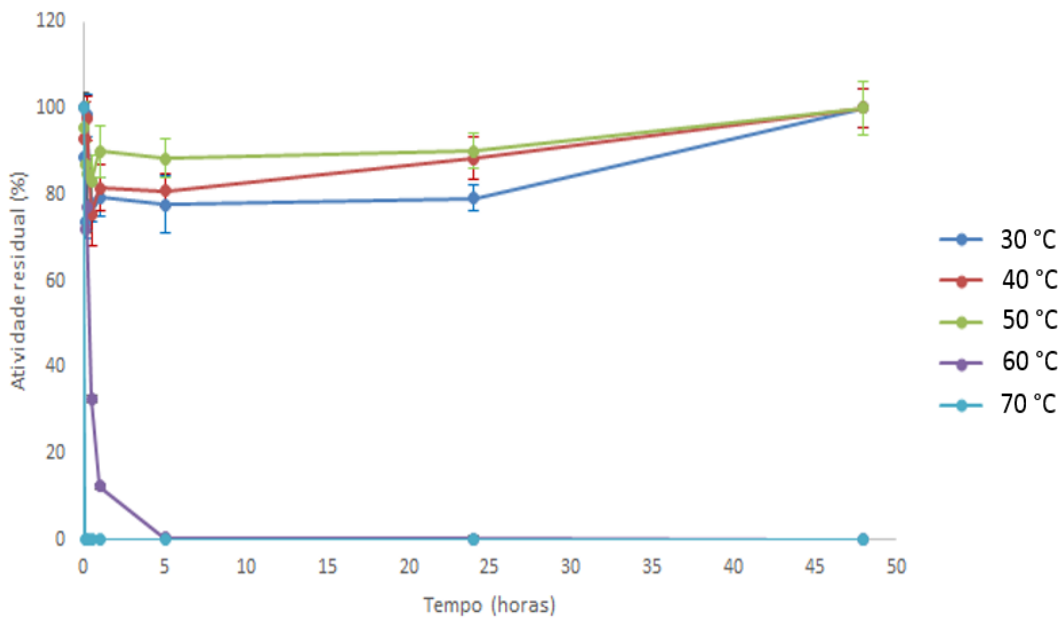
#### 6.3.1.5 Termo estabilidade

Os ensaios de termo estabilidade avaliaram a capacidade das enzimas manterem-se ativas por longos períodos em determinadas temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C). Os resultados dos ensaios realizados são apresentados nas Figura 65 e Figura 66.



**Figura 65** - Ensaio de termo estabilidade realizado para a enzima *LGGH32* em função da atividade residual (%)

Fonte: Elaborada pela autora



**Figura 66** - Ensaio de termo estabilidade realizado para a enzima *BAGH32* em função da atividade residual (%)

Fonte: Elaborada pela autora

A atividade residual (%) foi utilizada como sendo a atividade restante da proteína após seu período de incubação. Conforme pode-se observar pelos gráficos das Figura 65 e Figura

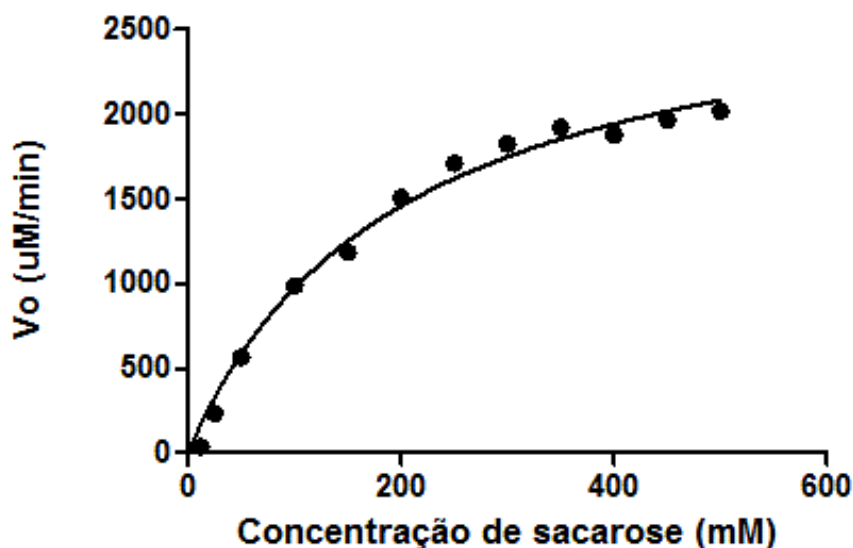


66. A enzima *LGGH32*, analisada entre 40 e 70 °C apresentou-se termoestável à 40 °C, tendo sua atividade reduzida após 2 dias de incubação e ao redor de 73% da atividade apresentada pelo padrão de enzima (sem incubação). Já a 50 °C a atividade após 48 horas foi de cerca de 53% da apresentada pelo padrão de enzima (sem incubação). Para as temperaturas de 60 e 70 °C houve presença de atividade somente até 1 hora de incubação.

A enzima *BAGH32* avaliada entre 30 e 70 °C revelou estabilidade com atividade mesmo após incubação nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, como pode ser observado no gráfico da Figura 65. Além disso, houve aumento na atividade enzimática após 2 dias de incubação. Enquanto isso, para a temperatura de 60 °C houve um expressivo decaimento na atividade após 5 horas de incubação, e por fim, não houve atividade enzimática após a incubação da enzima à 70 °C.

#### 6.3.1.6 Análises de cinética enzimática de hidrólise

A partir da determinação das melhores condições de concentração, tempo, pH e temperatura para as enzimas *LGGH32* e *BAGH32*, realizou-se as análises para determinação das constantes de cinética enzimática. Os resultados para ambas são apresentados nas Figura 67 e Figura 68. Assim também seus parâmetros cinéticos nas Tabela 14 e Tabela 15.



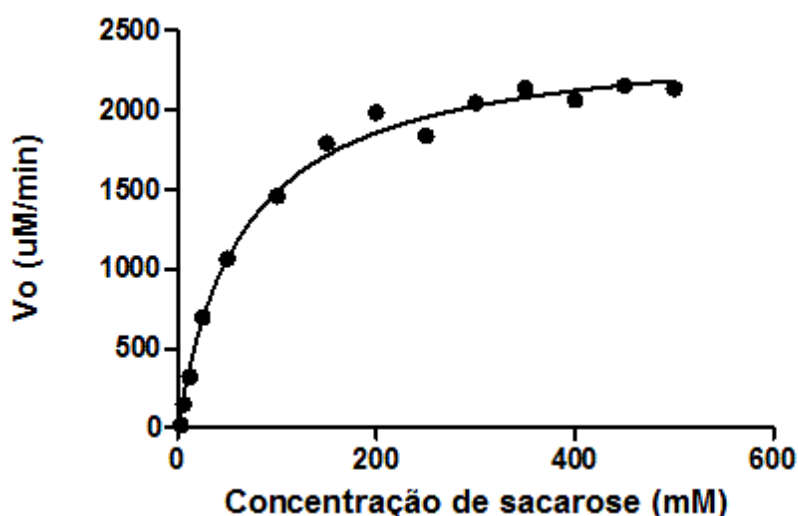
**Figura 67** - Curva de caracterização cinética da enzima *LGGH32*.

Fonte: Elaborada pela autora

**Tabela 14** - Parâmetros cinéticos de caracterização da enzima *LGGH32*

	Valores	Erro associado
$K_m$	200	27
$V_{max}$	$3 \cdot 10^3 \mu\text{M}/\text{min}$	$162 \mu\text{M}/\text{min}$
$k_{cat}$	$2,5 \cdot 10^3 \text{s}^{-1}$	$260 \text{s}^{-1}$

Fonte: elaborado pela autora

**Figura 68** - Curva de caracterização cinética da enzima *BAGH32*

Fonte: Elaborada pela autora

**Tabela 15** - Parâmetros cinéticos de caracterização da enzima *BAGH32*

	Valores	Erro associado
$K_m$	67	6
$V_{m\acute{a}x}$	$2,5 \cdot 10^3 \mu\text{M}/\text{min}$	$59 \mu\text{M}/\text{min}$
$k_{cat}$	$2,1 \cdot 10^3 \text{s}^{-1}$	$153 \text{s}^{-1}$

Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com as Figura 67 e Figura 68 e com os parâmetros cinéticos calculados a partir da curva experimental, pode-se dizer que  $K_m$  para a enzima *LGGH32* é bem maior do que para a enzima *BAGH32*, inferindo-se ao compararmos as duas, que a primeira possui menor afinidade pelo sítio catalítico do que a segunda. Sendo  $V_{max}$  o valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados, e  $k_{cat}$  como o número de renovação, isto é, o número máximo de mols de substrato que podem ser convertidos em

produto por mol de enzima por unidade de tempo<sup>118</sup>, pode-se dizer que ambos os valores de  $V_{max}$  e  $k_{cat}$  para ambas as enzimas são próximos entre si, da mesma ordem de grandeza.

A comparação dos valores de  $K_m$  que obtivemos com os descritos na literatura, Tabela 16, para membros da família 32 das hidrolases de glicosídeos possibilita as seguintes conclusões: o valor de  $K_m$  da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bifidobacterium adolescentis* comparada com as demais  $\beta$ -frutofuranosidases de diferentes organismos. Seu resultado é comparável ao da enzima de *Thermotoga maritima*, apresentando-se afinidades relativas pelo substrato próximas entre si.

**Tabela 16** - Parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato sacarose por enzimas da família GH32

Organismo	Enzima	$K_m$ (mM)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (BAGH32)	$\beta$ -frutofuranosidase	67
<i>Bifidobacterium longum</i>	$\beta$ -frutofuranosidase	31,45
<i>Thermotoga maritima</i>	$\beta$ -frutofuranosidase (invertase)	64
<i>A. Thaliana</i>	invertase	0,35
<i>Lactobacillus gasseri</i> (LGGH32)	sucrose-6-phosphate hydrolase	200
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	inulina	168
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604	inulina	108
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20077	levana	230

Fonte: Adaptada de ANWAR et al.;<sup>19</sup> BUJACZ et al.<sup>98</sup>

O mesmo não se pode dizer da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bifidobacterium longum*, a qual apresente 84% de identidade com a de *B. adolescentis* e da invertase *A. thaliana*. A principal explicação para uma maior afinidade das enzimas bacterianas em relação às plantas deve-se ao sítio catalítico que é mais profundo e largo do que o das mesmas<sup>98</sup>.

Em relação à enzima sucrose-6-phosphate hydrolase de *Lactobacillus gasseri*, ao ser comparada com enzimas frutossiltransferases do mesmo organismo, pode-se dizer que os valores de  $K_m$  são próximos, indicando uma baixa afinidade pelo substrato ao serem comparadas com as  $\beta$ -frutofuranosidases dos demais organismos.

#### 6.3.1.7 Atividade de frutossililação

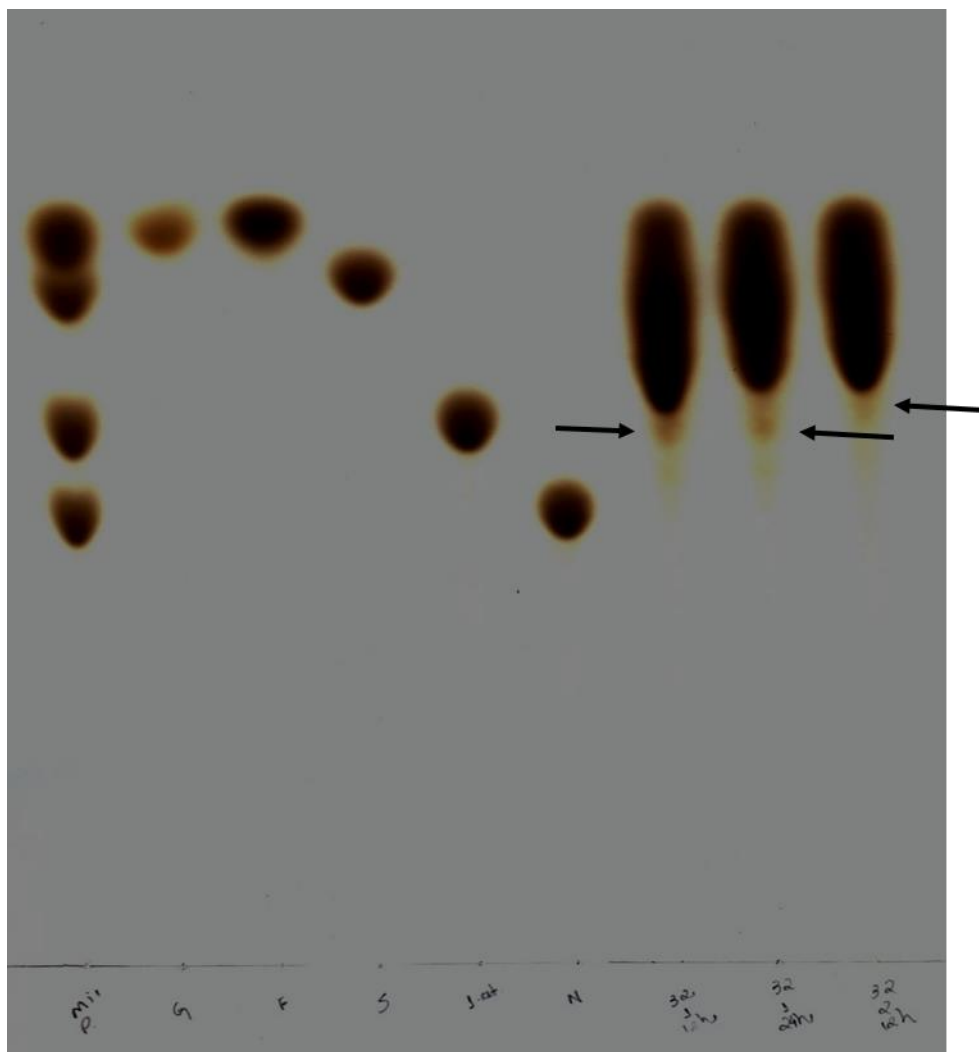
As enzimas *LGGH32* e *BAGH32* foram submetidas à avaliação da atividade de frutossililação utilizando-se 3 técnicas de identificação; duas delas caracterizaram-se por serem

qualitativas (Cromatografia em Camada Delgada e Espectrometria de Massas) e uma delas quantitativa por HPAEC/PAD.

#### 6.3.1.8 Análise dos carboidratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Como primeiro ensaio, a fim de se avaliar a presença qualitativa de FOS foi realizado o ensaio de CCD para ambas as enzimas. A enzima *BAGH32* apresentou como produto de reação de hidrólise das diferentes concentrações de sacarose, elevadas quantidades de frutose e glicose, sem demonstrar a presença de FOS.

A enzima *LGGH32* apresentou para elevadas concentrações de sacarose e longos períodos de incubação, a presença de um FOS em particular que de acordo com a avaliação dos padrões trata-se da 1-cestose. A Figura 69 apresenta o experimento de CCD para os produtos da enzima *LGGH32*.



**Figura 69** – Cromatografia em Camada Delgada dos produtos da enzima *LGGH32*. Nesta ordem: Mix contendo glicose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose; glicose; frutose; sacarose; 1-cestose; nistose; amostra *LGGH32* 2 M 12h; amostra *LGGH32* 2 M 24 h; amostra *LGGH32* 1 M 12 h. Apontado pela seta podemos identificar a produção de 1-cestose. As setas indicam a presença de FOS na amostra.

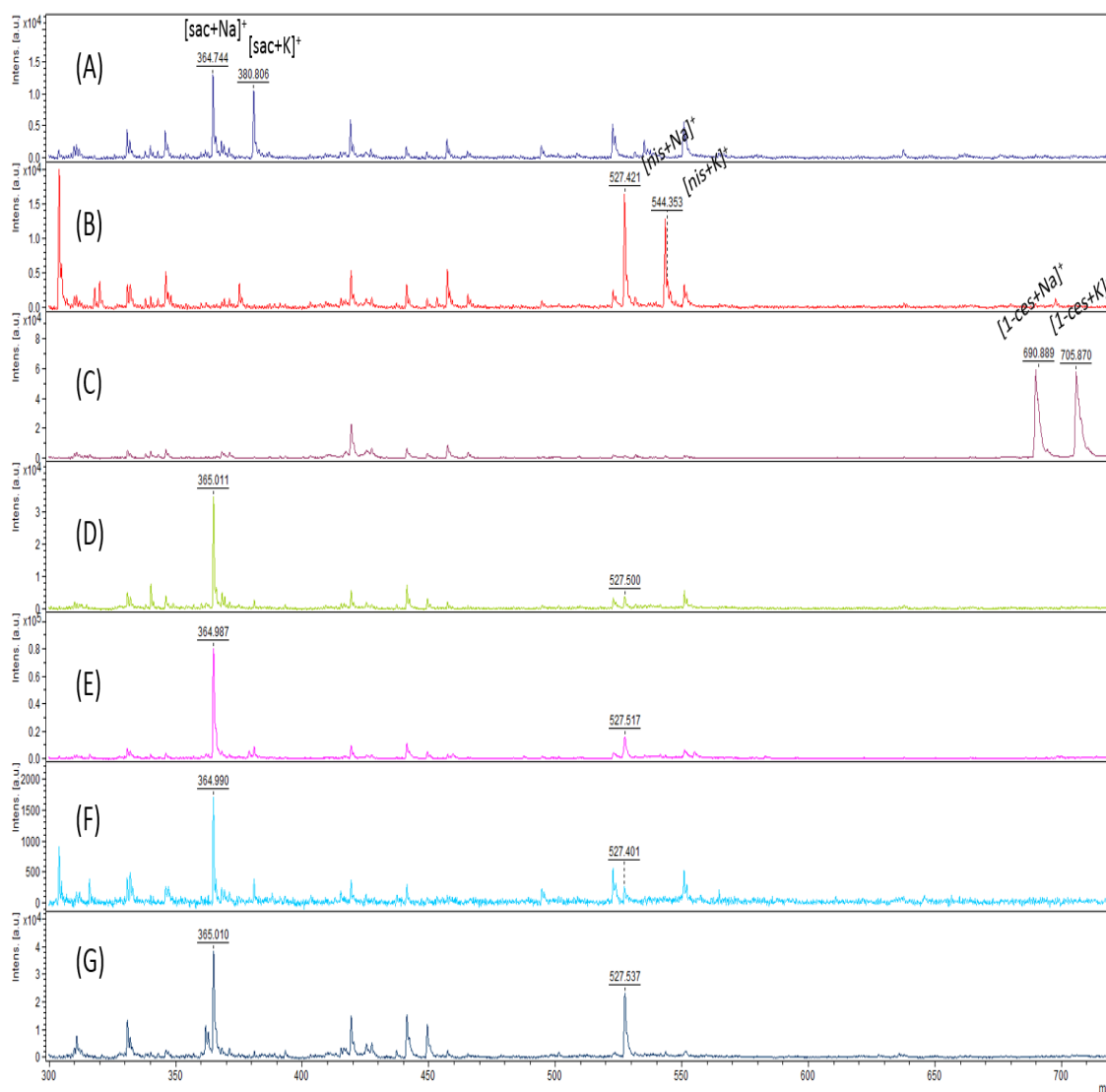
Fonte: Elaborada pela autora

Observou-se a presença do FOS 1-cestose em pequenas concentrações e uma elevada quantidade de sacarose, frutose e glicose unidas devido ao arraste presente na Figura 69.

Baseando-se na identificação da produção de 1-cestose em elevadas concentrações de sacarose bem como em longos períodos de tempo, buscou-se a avaliação da presença de FOS em outras concentrações e tempos. Para tanto, foi realizado o experimento de Espectrometria de Massas, o qual pode ser evidenciado na próxima seção. Este é um experimento de curto período além de apresentar maior sensibilidade, por isso foi utilizado para avaliação da presença de FOS em demais produtos das enzimas.

## 6.1.3.9 Espectrometria de Massas

Os resultados da avaliação dos produtos das enzimas *LGGH32* e *BAGH32*, utilizando a técnica de espectrometria de massas são apresentados na Figura 70.



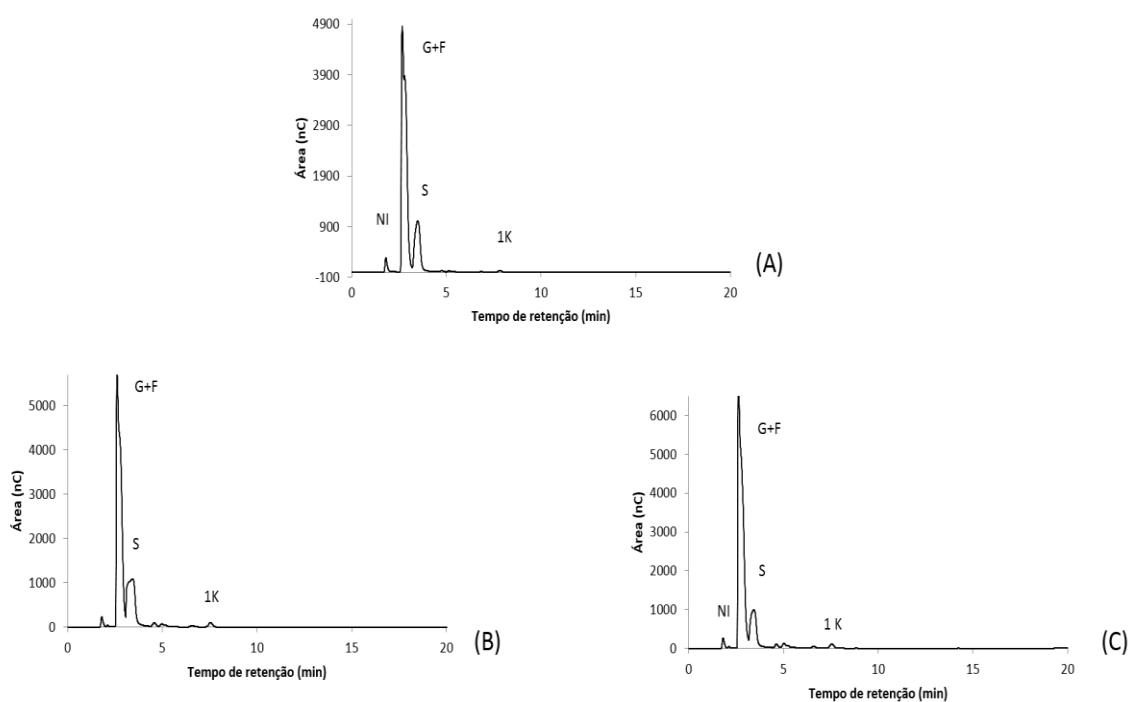
**Figura 70** - Espectrometria de Massas MALDI-TOF com identificação do FOS 1-cestose. Produto da polimerização de frutose da enzima *LGGH32*. (A) Padrão de sacarose deslocado devido à presença dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  provenientes do tampão. (B) Padrão da 1-cestose deslocado devido à presença dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  provenientes do tampão. (C) Padrão da nistose deslocado devido à presença dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  provenientes do tampão. (D) Produto da enzima *LGGH32* em 300 mM de sacarose e 10 horas de reação. (E) Produto da enzima *LGGH32* em 2 M de sacarose e 10 horas de reação (F) Produto da enzima *LGGH32* em 2 M de sacarose e 12 horas de reação. (G) Produto da enzima *LGGH32* em 2M de sacarose e 24 horas de reação.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados apresentados na Figura 70 revelam a presença de 1-kestose em concentração de 300 mM e 10 horas, condições menores do que as demais envolvendo de 1 a 2 M de sacarose e tempos entre 12 e 24 horas. Esta foi a menor condição encontrada para produção de FOS a partir da sacarose pela enzima *LGGH32*. Assim sendo, com a intenção de se avaliar a quantidade de FOS produzido pela enzima, realizou-se o experimento de HPAEC/PAD.

#### 6.3.1.10 Análise de carboidratos por HPAEC/PAD

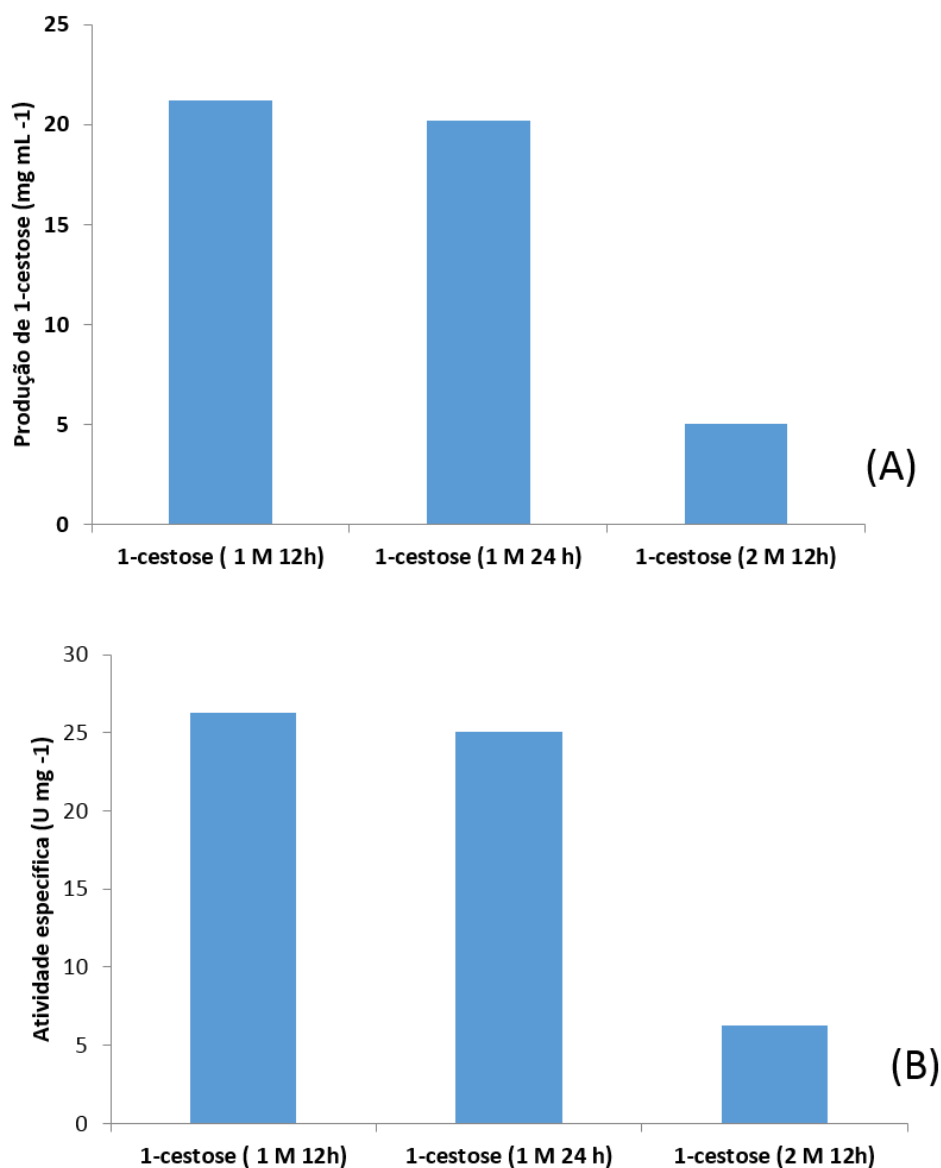
As amostras que tiveram a presença de frutanos, foram submetidas à análise quantitativa da produção dos mesmos. Os cromatogramas dos produtos da enzima *LGGH32* são apresentados na Figura 71.



**Figura 71** - Gráficos representativos do produto da enzima *LGGH32* de *Lactobacillus gasseri*. (A) substrato = 1 M de sacarose e 24 horas de incubação. (B) substrato = 2 M de sacarose e 12 horas de incubação. (C) substrato = 2 M de sacarose e 24 horas de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com os gráficos da Figura 71, pode-se observar a produção do FOS 1-cestose em altas concentrações e tempos de incubação. Estes foram também quantificados e os resultados são apresentados na Figura 72.

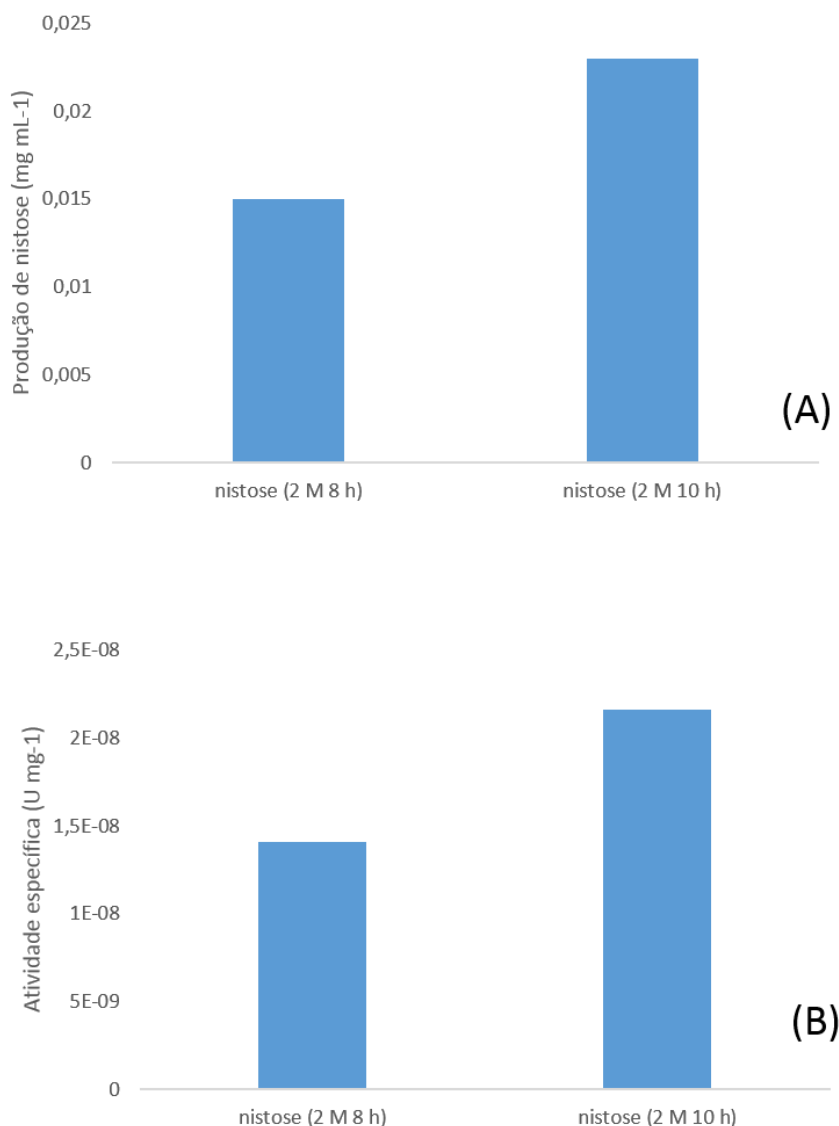


**Figura 72** - Quantificação da produção de 1-cestose pela enzima *LGGH32* de *Lactobacillus gasseri*. (A) Produção de 1-cestose em mg/mL. (B) Atividade específica da enzima em U/mg.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a identificação da produção de 1-cestose pela enzima *LGGH32* em altas concentrações de sacarose e tempos de incubação, foram realizados ensaios de tempos intermediários (8 e 10 horas). Destaca-se a detecção da produção de nistose em pequenas concentrações (Figura 73).





**Figura 73** - Quantificação da produção de nistose pela enzima *LGGH32* de *Lactobacillus gasseri*. (A) Produção de 1-cestose em mg/mL. (B) Atividade específica da enzima em U/mg.

Fonte: Elaborada pela autora

A produção dos FOS nistose e 1-cestose a partir da sacarose não foi observada para a enzima *BAGH32*,  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*, somente a atividade hidrolítica. Pela enzima *LGGH32*, *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri*, é a primeira vez que se reporta a produção de frutanos pela mesma na literatura a partir da expressão heteróloga de enzimas recombinantes.

Comparando-se a enzima *LGGH32* com a de *L. reuteri*, mais comumente utilizada atualmente<sup>118</sup>, embora a produção de nistose seja relativamente maior, destaca-se a produção de 1-cestose que é 3 vezes menos que a reportada pela *LGGH32*.



## **CAPÍTULO 7**

### Conclusões e Perspectivas

---





## 7 Conclusões e Perspectivas

### 7.1 Conclusões

O presente trabalho foi o primeiro desenvolvido no grupo de Biotecnologia Molecular envolvendo enzimas das famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos e teve como objetivos principais identificar e caracterizar estruturalmente e funcionalmente um conjunto de 13 enzimas das famílias 32 e 68 das hidrolases de glicosídeos, as frutossiltransferases. Ao longo do processo, sete dessas enzimas passaram pelas etapas de purificação e seis delas apresentaram cristais. Destas, três delas puderam ser caracterizadas utilizando-se técnicas biofísicas de SAXS, CD e DLS, sendo que duas delas, enzimas *LGGH32*, *sucrose-6-phosphate hydrolase* de *L. gasseri* e *BAGH32*,  $\beta$ -frutofuranosidase de *B. adolescentis*, tiveram sua estrutura resolvida e sua caracterização bioquímica realizada com o substrato sacarose.

Em relação aos estudos de cristalografia, envolvendo as enzimas *LGGH32* e *BAGH32*, as estruturas se apresentaram com *folding* semelhantes caracterizados por um  $\beta$ -*sanduíche* conectado à um módulo  $\beta$ -*propeller*, sendo este o sítio catalítico da enzima identificado por meio da presença da frutose no mesmo.

Os estudos biofísicos das enzimas serviram de complemento direto à caracterização estrutural, avaliando-se a qualidade da amostra por meio dos experimentos de DLS, as quais se apresentaram monodispersas e ausentes de contaminantes. A fim de se analisar a estrutura secundária das amostras de proteínas, realizou-se o experimento de CD. Este possibilitou a conclusão de que as mesmas se encontravam bem estruturadas e com enovelamento característico de folhas- $\beta$  em sua maioria. Assim também, os resultados de SAXS permitiram perceber que as enzimas se tratavam de dímeros em solução, havendo diferenças na dimerização das enzimas *LGGH32* e *BAGH32* quando comparados seus envelopes de SAXS e suas estruturas cristalográficas.

Os resultados bioquímicos analisados, permitiram identificar e quantificar a produção de FOS 1-cestose pela enzima *LGGH32* e comparar com outras enzimas de *Lactobacillus* produtores de FOS, demonstrando a elevada produção do mesmo em relação à enzima mais comumente utilizada atualmente.

## 7.2 Perspectivas

Novos projetos podem ser desenvolvidos, visando-se a caracterização bioquímica por meio da avaliação quantitativa de outros tempos de incubação para a produção de FOS. Assim também, com outros substratos para identificação da atividade bem como a obtenção de cristais em complexo com diferentes ligantes. Além disso, a caracterização biofísica utilizando-se o substrato em complexo com a proteína a fim de se verificar a estabilidade da mesma, bem como seu comportamento em solução. Experimentos de mutação sítio dirigida de resíduos do sítio catalítico poderão ser desenvolvidos a fim de se avaliar a estabilidade de ligação ao substrato e a atividade catalítica da enzima.

As enzimas deste trabalho que ainda não foram caracterizadas, mas que já se encontram com os protocolos de purificação estabelecidos, foram designadas a outros alunos de Mestrado e Iniciação do grupo para que possam dar continuidade ao projeto.

Este projeto é aplicável em indústrias que visam o emprego de enzimas para a produção de FOS na utilização em seu produto final, com o objetivo de otimizar os processos e viabilizar os custos.

## REFERÊNCIAS

- 1 DE ROODE, B. M. et al. Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnology Progress*, v. 19, n. 5, p. 1391–1402, 2003.
- 2 DRIOUCH, H.; ROTH, A.; DERSCH, P.; WITTMANN, C. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 6, p. 2011–24, 2010.
- 3 PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 1119–1128, 2011.
- 4 RASTALL, B. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 1, p. 305–339, 2010. doi:10.1146/annurev.food.080708.100746
- 5 KIM, Y.-S., PARK, C.-S.; OH, D.-K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 4, p. 903–908, 2006.
- 6 GOULAS, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 6, p. 648–656, 2007.
- 7 MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 9, p. 1913–1923, 2006.
- 8 NACOS, M. et al. Kenaf xylan – a source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, n. 1, p. 126–134, 2006.
- 9 SÁNCHEZ, O., GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food and Bioproducts Processing*, v. 86, n. 2, p. 109–115, 2008.
- 10 OKADA, H. et al. Novel fructopyranose oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract. *Carbohydrate Research*, v. 345, n. 3, p. 414–418, 2010
- 11 STAHL, U.; DONALIES, U. E.B.; NEVOIGT, E. *Food biotechnology*. New York: Springer, 2008. (Advances in biochemical engineering/biotechnology, 111)
- 12 MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 3, p. 587–597, 2007.
- 13 FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 8, p. 1341–1348, 2011.

14 MITSUOKA, T. Development of functional foods. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, v. 33, n. 3, p. 117–128, 2014.

15 UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, v. 30, n. 2, p. 126-132, 2015.

16 SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 1, p. 1–16, 2013.

17 MAKAROVA, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 103, n. 42, p. 15611–15616, 2006.

18 ANWAR, M. A. et al. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: Characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, v. 156, pt. 4, p. 1264–1274, 2010.

20 PEDROSA, M. C. et al. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, n. 2, p. 353–359, 1995.

21 PRIDMORE, R. D. et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 101, n. 8, p. 2512–2517, 2004.

22 DANIELLS, S. Heat-killed bacteria may offer immune support for the elderly. 2015. Disponível em: <<http://www.nutraingredients-usa.com/Research/Heat-killed-bacteria-may-offer-immune-support-for-the-elderly>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

23 BIFIDOBACTERIUM.jpg - microbeWiki. Disponível em: <<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Bifidobacterium.jpg>>. Acesso em: 30 ago. 2014.

24 HAROS, M.; BIELECKA, M.; SANZ, Y. Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 2, p. 231–239, 2005.

25 POMPEI, A. et al. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 179-185, 2007.

26 BACILLUS licheniformis - microbeWiki. Disponível em: <[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus\\_licheniformis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis)>. Acesso em: 30 ago. 2014.

27 ALHOMOUD, M. et al. Probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* attenuates gastric ulcer healing and antagonizes the ulcer healing effect of ranitidine in rats. *Advances in Bioresearch* v. 6, n. 1, p. 25–30, 2015.



- 28 REY, M. W. et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, v. 5, p. r 7, 2004. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r77.
- 29 BACILLUS LICHENIFORMIS ATCC 14580. Disponível em: <<http://bacmap.wishartlab.com/organisms/203>>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- 30 RASTALL, R. A. et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, n. 2, p. 145–152, 2005.
- 31 PATEL, R.; DUPONT, H. L. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, v.60, S108–S121, 2015. Supplement 2.
- 32 BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v.12, n. 5, p.303–310, 2015. doi:10.1038/nrgastro.2015.47.
- 33 DI BARTOLOMEO, F.; VAN DEN ENDE, W. Fructose and fructans: opposite effects on health? *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 70, n. 3, p. 227–237, 2015. doi:10.1007/s11130-015-0485-6
- 34 EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, v.67, n. 3, p. 517–531, 1968.
- 35 RITSEMA, T.; SMEEKENS, S. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, n. 3, p. 223–230, 2003.
- 36 VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, v. 120, n. 2, p. 351–360, 1999.
- 37 SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 10, p. 442–457, 2005.
- 38 VANDRESEN, S. *Purificação parcial de inulina obtida a partir de yacon e recuperação de compostos antioxidantes por processos de sorção*. 2011. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Centro Tecnológico - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- 39 YANG, H.; WANG, Y.; ZHANG, L.; SHEN, W. Heterologous expression and enzymatic characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *New Biotechnology*, 2015. doi:10.1016/j.nbt.2015.04.005. In press.
- 40 MAIORANO, A. E.; PICCOLI, R. M.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, M. F.A. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnology Letters*, v.30, n. 11, p. 1867–1877, 2008.

- 41 ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J. et al. Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. *Gene*, v.484,n. 1-2, p. 26–34, 2011.
- 42 CHUANKHAYAN, P. et al. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, v.285,p. 23251–23564, 2010. doi: 10.1074/jbc.M110.113027.
- 43 BURNS, A.J.; ROWLAND, I.R. Anti-Carcinogenicity of Probiotics and Prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v. 1,n. 1, p. 13-24, 2005.
- 44 DELZENNE, N. M.; KOK, N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*,v. 73,p. 456S–458S, 2001. Supplement 2.
- 45 SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 10, p. 442–457, 2005.
- 46 PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*,v. 33,n. 4, p. 345–364, 2013.
- 47 TRUJILLO, L. E.; MARCILLO, V. E.; AVALOS, R.; PONCE, L. K.; RAMOS, T. From the laboratory to the industry: enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides ( fos ). recent advances and current perspectives.*RevistaBionatura*, v. 1, n. 1, p.112–117, 2015.
- 48 RAWAT, H. K.; GANAIE, M. A.; KANGO, N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.107,n. 3,p. 799–811, 2015.
- 49 ORTIZ-SOTO, M. E.; SEIBEL, J. Biotechnological synthesis and transformation of valuable sugars in the food and pharmaceutical industry.*Current Organic Chemistry*, v. 18, n. 8, p. 964-986, 2014.
- 50 HENRISSAT, B.; VEGETALES, M.; GRENOBLE, F. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid.*Biochemical Journal*, v.280,n. 2, p. 309-316, 1991.
- 51 HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*,v.293, pt 3,p. 781–788, 1993.
- 52 LOMBARD, V., GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, v. 42, D1, p.D490-D495, 2013. doi:10.1093/nar/gkt1178
- 53 CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES - CAZy. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

54 LUCY, T. et al. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

55 MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, v. 227, n. 4, p. 723–740, 2008.

56 JALAK, J.; KURAŠIN, M.; TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 34, p. 28802–28815, 2012.

57 ZHANG, Y.-H. P.; 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, 2004.

58 YUAN, B.; WANG, S.-A.; LI, F.-L. Improved ethanol fermentation by heterologous endoinulinase and inherent invertase from inulin by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v. 139, p. 402–405, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.076.

59 LAMMENS, W. et al. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 3, p. 727–740, 2009.

60 TRANSFERASES: latest content. Disponível em: <<http://www.nature.com/subjects/transferases>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

61 EXPLORENZ: search the enzyme list. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/>>. Acesso em 15 jan. 2015.

62 ALBERTO, F.; BIGNON, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B.; CZJZEK, M. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 18903–10, 2004. doi: 10.1074/jbc.M313911200

63 LIEBL, W.; BREM, D.; GOTSCHLICH, A. Analysis of the gene for  $\beta$ -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, n. 1, p. 55–64, 1998.

64 RAFINOSE (Gossipose; Melitose; Melitriose). Disponível em: <[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Rafinose&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Rafinose&lang=3)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

65 UENO, K. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central Journal*, v. 5, n. 1, p. 16, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1752-153X-5-16.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

66 VERHAEST, M. et al. X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica D*, v. 62, p. 1555–1563, 2006. doi:10.1107/S0907444906044489

67 ALBERTO, F.; JORDI, E.; HENRISSAT, B.; CZYZEK, M. Crystal structure of inactivated *Thermotoga maritima* invertase in complex with the trisaccharide substrate raffinose. *Biochemical Journal*, v. 395, n. 3, p.457–462, 2006.

68 NAGEM, R. A P. et al. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of Molecular Biology*, v.344, n. 2, p. 471–480, 2004.

69 POUYEZ, J. et al. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. *Biochimie*, v.94, n. 11, p. 2423-2430, 2012.

70 OHTA, Y. et al. Enhancing thermostability and the structural characterization of *Microbacterium saccharophilum* K-1  $\beta$ -fructofuranosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 15, p. 6667–6677, 2014.

71 PIJNING, T. et al. Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*, v. 412, n.1, p. 80–93, 2011.

72 ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIC, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chemical Papers*, v. 55, n. 5, p. 471-480, 2001. Disponível em: <[http://www.chempap.org/file\\_access.php?file=556a350.pdf](http://www.chempap.org/file_access.php?file=556a350.pdf)>. Acesso em: 20 ago. 2014.

73 GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology*, v. 128, n. 1, p. 204–211, 2007.

74 SABATER-MOLINA, M.; LARQUÉ, E.; TORRELLA, F.; ZAMORA, S. Dietary fructooligosaccharides and potential. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 65, n. 3, p.315–328, 2009.

75 CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). *Protein Expression and Purification*, v.99, p. 35–42, 2014. doi:10.1016/j.pep.2014.03.008

76 DOYLE, S. High-throughput cloning for proteomics research. *Chemical Genomics*, 2005. doi: 10.1007/978-1-59259-948-6\_7.

77 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, v. 41, p. 207–234, 2005. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016.

78 KIM, Y. et al. Automation of protein purification for structural genomics. *Journal of Structural and Functional Genomics*, v.5, n. 1-2, p. 111-118, 2004.

79 ERICSSON, U. B.; HALLBERG, B. M.; DETITTA, G. T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, v. 357,n. 2, p. 289-298, 2006.

80 QIAGEN NEWS. Rapid, high-throughput assessment of protein stability on the Rotor-Gene Q cycle. Disponível em: <<http://www.beta-sheet.org/resources/T7-QIAGEN-DSF.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

81 SEIBEL, J.; BUCHHOLZ, K. Tools in oligosaccharide synthesis current research and application. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 63,p. 101-138, 2010. doi:10.1016/S0065-2318(10)63004-1

82 LESLIE, A. G. W. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica D*,v. 62,p. 48-57, 2006.doi:10.1107/S0907444905039107

83CHEMICAL Crystallography APEX2 software. Disponível em: <<http://brukersupport.com/ProductDetail/1148>>. Acesso em: 31 ago. 2015.

84 EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica D*,v. 69,pt. 7, p. 1204-1214, 2013.

85 The CCP4 suite : programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica D*, v. 50, pt. 5, p.760–763, 1994. doi:10.1107/S0907444994003112

86 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Bioliology*, v.33,n. 2, p. 491-497, 1968.

87 McCOY, A. J.et al. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallographic* v. 40,p. 658–674, 2007. doi:10.1107/S0021889807021206.

88 NCBI Blast : protein sequence. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 01 ago. 2013.

89 STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of Applied Crystallographic*, v.41, p. 641–643, 2008.doi:10.1107/S0021889808006985.

90 LANGER, G.; COHEN, S. X.; LAMZIN, V. S.; PERRAKIS, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nature Protocols*, v.3, n. 7, p.1171-1179, 2008.

91 MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta CrystallographicaD*, v.53,p. 240–255, 1997. doi:10.1107/S0907444996012255.

92 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica D*, v.60,p. 2126-2132, 2004. doi:10.1107/S0907444904019158.

93 PAINTER, J.; MERRITT, E. A. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *Journal of Applied Crystallography*, v.39,p. 109–111, 2006. doi:10.1107/S0021889805038987 .

94 DAVIS, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, v.35,p.W375–W383, 2007. Supplement 2. doi: 10.1093/nar/gkm216.

95 ALBERTO, F.; BIGNON, C.; SULZENBACHER, G.; HENRISSAT, B.; CZYZEK, M. The three-dimensional structure of invertase ( $\beta$ -Fructosidase) from *thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biology Chemistry*, v.279,n.18, p. 18903-18910, 2004.

96 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, v.372,n.3, p. 774-797, 2007.

97 PDBsum home page. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>>. Acesso em 20 ago. 2015.

98 PyMOL. Disponível em: <<http://www.pymol.org/>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

99 BUJACZ, A.; JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; BIELECKI, S.; REDZY尼亚, I.; BUJACZ, G. Crystal structures of the apo form of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS Journal*, v.278,n. 10, p.1728–1744, 2011.

100 ROSS-MURPHY, S. B. Dynamic Light Scattering. B. J. Berne and R. Pecora, John Wiley, New York, 1976, pp. 376. *Br. Polym. J.*9, 177–177 (1977).

101 HALL, M.; RUBIN, J.; BEHRENS, S. H.; BOMMARIUS, A. S. The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is also a thermostabilizing domain. *Journal of Biotechnology*, v. 155,n.4, p. 370–376, 2011.

102 THE FIT2D home page. Disponível em: <<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

103 BIOLOGICAL SAXS - biological small angle scattering group - EMBL Hamburg. Disponível em: <<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

104 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, v.25,p. 495–503, 1992. doi:10.1107/S0021889892001663.

105 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*, v,76,n. 6, p. 2879–2886, 1999.

106 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v.36,p. 860–864, 2003. doi:10.1107/S0021889803000268.

- 107 SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, v.28, p. 768–773, 1995. doi:10.1107/S0021889895007047.
- 108 JACHIMSKA, B.; WASILEWSKA, M.; ADAMCZYK, Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir*, v. 24,n.13, p. 6866–6872, 2008.
- 109 GARCÍA DE LA TORRE, J.; HUERTAS, M. L.; CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophysical Journal*, v.78, n. 2, p. 719-730, 2000.
- 110 SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical Journal*, v.80,n. 6, p. 2946-2953, 2001.
- 111 ExPASy: SIB bioinformatics resource portal - home. Disponível em: <<http://www.expasy.org/>>. Acesso em: 15 abr. 2015.
- 112 PIJNING, T.; ANWAR, M. A.; LEEMHUIS, H.; KRALJ, S.; DIJKHUIZEN, L. Crystal structure of inulosucrase InuJ from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*, v. 412, n. 1, p. 80-93, 2011.
- 113 MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n.3, p 426-428, 1959.
- 114 SHIOMI, N.; ONODERA, S.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 55,n. 5, p. 1427–1428, 1991.
- 115 VIEIRA, C. C. J.; BRAGA, M. R.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*,v. 42, n. 3, 233-238,1995.
- 116 WISE, C. S.; DIMLER, R. J.; DAVIS, H. A.; RIST, C. E. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations.*Analytical Chemistry*,v.27,n. 1, p. 33-36, 1955. doi: 10.1021/ac60097a011
- 117 KADOWAKI, M. A. S.; CAMILO, C. M.; MUNIZ, A. B.; POLIKARPOV, I. Functional characterization and low-resolution structure of an endoglucanase Cel45A from the filamentous fungus *neurospora crassa* OR74A: thermostable enzyme with high activity toward lichenan and  $\beta$ -Glucan. *Molecular Biotechnology*,v. 57, n. 6, p. 574-588, 2015. doi:10.1007/s12033-015-9851-8
- 118 VAN, H. S. F. T., VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H., RAHAOUI, H., VAN DER MAAREL, M. J. E. C., DIJKHUIZEN, L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, n. 9, p. 4390–4398, 2002.