



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX

**IMOBILIZAÇÃO DIRECIONADA E REVERSÍVEL DA L-ARABINOSE
ISOMERASE DE *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 EM AGAROSE ATRAVÉS DO
DOMÍNIO LECTINA β -TREBOL (LSLt)**

FORTALEZA

2018

ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX

IMOBILIZAÇÃO DIRECIONADA E REVERSÍVEL DA L-ARABINOSE ISOMERASE
DE *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 EM AGAROSE ATRAVÉS DO DOMÍNIO
LECTINA β -TREBOL (LSLt)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientadores: Prof. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar e Dr. Benevides Costa C. Pessela João.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F36i Felix, Anne Kamilly Nogueira.
Imobilização direcionada e reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em agarose através do domínio lectina B-trebol (LSLt) / Anne Kamilly Nogueira Felix. – 2018.
102 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar e Dr. Benevides Costa C. Pessela João.
1. L-arabinose isomerase. 2. LSLt. 3. lectina. 4. cristalização. 5. imobilização direcionada. I. Título.
CDD 660
-

ANNE KAMILLY NOGUEIRA FELIX

IMOBILIZAÇÃO DIRECIONADA E REVERSÍVEL DA L-ARABINOSE ISOMERASE
DE *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 EM AGAROSE ATRAVÉS DO DOMÍNIO
LECTINA β -TREBOL (LSLt)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 29 / 01 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Dra. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Ao meu maior tesouro, minha vida,
minha filha, minha MARIA CLARA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que em nenhum momento em minha vida me deixou desamparada.

A Nossa Senhora Aparecida e Santo Expedito, dos quais sou devota, agradeço pela vida, saúde e por me atender prontamente em momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais por tudo o que fizeram e fazem por mim, por meu marido e pela nossa filha. Sem o apoio e a ajuda de vocês não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada por cuidar do Marcelo como verdadeiros pais, enquanto estive longe do Brasil. Obrigada por ficar com minha pequena enquanto tive que me dedicar à escrita desta tese. Papai e mamãe, vocês ensinaram a mim e as minhas irmãs o verdadeiro significado da palavra família. Amo vocês demais. Mais uma vez muito obrigada.

Agradeço também às minhas irmãs, que sempre estão ao meu lado nos momentos bons e, principalmente nos momentos difíceis, me levantando e me ajudando a seguir em frente. Karol, sempre me proporcionando risadas todos os dias, todas as horas, felicidade é seu lema minha eterna Gordinha. Ludmila, minha irmã e minha comadre, a razão e o coração de toda a nossa família, muito obrigada. Meu compadre Valzemberg não podia ficar de fora, Bebeça te admiro muito, obrigada por apoiar e ajudar tanto o Marcelo e ser tão maravilhoso com nossa filha.

Minha madrinha Alzenir, o que falar dessa pessoa de coração tão enorme, um simples obrigada não é capaz de expressar toda a gratidão que tenho pela senhora e pelo Tio Weyder.

Meu padrinho Wellington, muito obrigada pelo amor e ajuda que sempre nos deu.

Ao Júnior, mais que um amigo, um verdadeiro irmão. Te amo cara.

As amigas irmãs que o GPBio me deu, Camilla, Mary, Tici, Jéssyca e Kênia, vocês tornaram meus dias no laboratório super agradáveis, sempre estavam dispostas para tirar dúvidas, ajudar em experimentos e até mesmo me ouvir quando precisava de um ombro amigo. Valeu galerinha, vocês são demais!

A todos os integrantes do GPBio e do GPTA que sempre me receberam de braços abertos e com sorriso no rosto.

Ao professor Benevides Pessela, um paizão que arranjei em Madri. Que homem espetacular! Um coração que não cabe no peito de tão grande.

Ao José Miguel, pesquisador e amigo incrível. Sempre com muita paciência para me explicar quantas vezes forem necessárias pra eu entender.

A todos os integrantes dos laboratórios MICROBIO, XTAL E BIOBACT do CSIC em Madri.

E por falar em Madri, foi lá que fiz amizades dignas de prêmio. Daiane, Sandro, Eric, Dani e Simone, vocês tornaram essa experiência internacional indescritível. Daiane, minha irmã Rio Grandense, sempre companheira e amiga, sinto muita saudade das nossas conversas no final do dia, das nossas idas ao supermercado (me divertia horrores). Sandro, meu Deus, o que falar desse cara? Ele simplesmente é o Sandro, um amigo lindo que Madri me deu, com seu jeito paizão sempre cuidando de mim de uma maneira linda, seus jantares, nossas conversas e nossas caminhadas me fazem muita falta. Eric, com seu jeitinho tímido sempre tinha algo engraçado pra falar, adorava “mangar” do meu *cearensês* e eu me divertia muito, suas dancinhas no meio do laboratório eram ótimas. Dani, minha doidinha favorita, presente no momento mais difícil da estadia e me fez um bem danado, adorava nossas saídas pra desopilar depois de um dia tão puxado no laboratório, nossas conversas sempre me faziam sorrir, e quando estávamos na companhia da Simone então, a diversão era mais que garantida, ela sempre conhecia os melhores locais de Madri. Diogo, César, Márcia, Michele, não esqueci desses brasileiros porretas, obrigada por tudo o que me proporcionaram em Madri.

A professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, meus sinceros agradecimentos, por sempre acreditar em meu potencial e me empurrar pra frente.

A professora Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar, por acreditar em mim ao me aceitar como sua orientanda e ter tanta paciência comigo.

A professora Dra. Maria Valderez Ponte Rocha, por estar sempre à disposição de todos no grupo GPBio do qual fazemos parte.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

A D-tagatose, um tipo de açúcar raro que apresenta 92% do poder de doçura quando comparada à sacarose, porém com 1/3 de seu valor energético, é obtida a partir da isomerização da D-galactose pela enzima L-arabinose isomerase EC 5.3.1.4. Esta enzima, de alto valor agregado, obtida a partir de *Enterococcus faecium*, teve sua estrutura tridimensional predita a partir de estudos cristalográficos e modelagem estrutural, possibilitando projetar-se uma enzima recombinante com a inserção de uma etiqueta de fusão, LSLt (lectina de *Laetiporus sulphureus*), que permite que a enzima seja purificada de modo eficaz, simples e barato em uma única etapa de afinidade, tendo agarose como suporte e lactose como eluente. Uma sequência de reconhecimento da endoprotease TEV (*Tobacco Etch Virus*), também foi inserida, permitindo clivar a etiqueta de fusão após um processo de purificação. O sucesso na construção resultou em uma enzima ativa e de fácil purificação, já que o suporte não exige nenhum tipo de ativação. Na caracterização da enzima, alcançou-se 50°C e 5,5 como temperatura e pH ideais, respectivamente. Os estudos também mostraram que a presença do íon Mn^{2+} afetou positivamente na atividade catalítica da LSLt-LAI. Quanto à imobilização, que ocorreu após 15 minutos, obteve-se um rendimento de 95%, com atividade recuperada em torno de 88%. O estudo da bioconversão de D-galactose em D-tagatose mostrou resultados promissores, 28%, alta taxa de conversão quando comparada a estudos já realizados com a enzima obtida de *Enterococcus faecium* em sua forma nativa ou recombinante.

Palavras-chave: L-arabinose isomerase, LSLt, lectina, cristalização, imobilização direcionada.\\\\\\

ABSTRACT

D-tagatose, a type of rare sugar that has 92% sweetness when compared to sucrose, but with 1/3 of its energy value, is obtained from the isomerization of D-galactose by the enzyme L-arabinose isomerase EC 5.3.1.4. This high value-added enzyme obtained from *Enterococcus faecium* had its three-dimensional structure predicted from crystallographic studies and structural modeling, making it possible to design a recombinant enzyme with the insertion of a fusion label, LSLt (*lectin Laetiporus sulphureus*), which allows the enzyme to be efficiently, simply and inexpensively purified in a single affinity step, having carrier agarose and lactose as eluent. A TEV endoprotease recognition sequence (*Tobacco Etch Virus*) was also inserted, allowing cleavage of the fusion label following a purification process. The success in the construction resulted in an active enzyme and of easy purification, since the support does not require any type of activation. In the characterization of the enzyme, 50 ° C and 5.5 were obtained as the ideal temperature and pH, respectively. The studies also showed that the presence of the Mn²⁺ ion positively affects the catalytic activity of LSLt-LAI. As for immobilization, which occurred after 15 minutes, a yield of 95% was obtained, with activity recovered around 88%. The study of D-galactose bioconversion in D-tagatose showed promising results, 28%, high conversion rate when compared to studies already performed with the enzyme obtained from *Enterococcus faecium* in its native or recombinant form.

Keywords: L-arabinose isomerase, LSLt, lectin, crystallization, directed immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ilustração da isomerização de D-galactose em D-tagatose (<i>in vitro</i>) e da isomerização de L-arabinose em L-ribulose (<i>in vivo</i>).....	18
Figura 2.2 – Esquema representativo das etapas de síntese de uma proteína recombinante.....	22
Figura 2.3 – Imagem do fungo basidiomiceto <i>Laetiporus sulphureus</i> . Esta espécie pode ser encontrada na América do Norte e na Europa.....	24
Figura 2.4 – Diagrama de fases da mistura proteína-precipitante.....	27
Figura 3.1 – Prováveis resultados e ações recomendadas na utilização do kit PCT™.....	30
Figura 3.2 – Innovadyne Nanodrop ExtY, permite pipetagens de baixo volume e alta precisão. É equipado com o software Nanobuilder que possui uma ampla gama de aplicações e manipulação de dados.....	31
Figura 3.3 – SDS-PAGE (12% de poliacrilamida) da expressão e purificação da LAI-DH10B. 1 – Marcador padrão de peso molecular; 2 – Fração solúvel do extrato livre de células (18,21mg/mL); 3 – fração purificada da LAI-DH10B em Ag-IDA-Ni eluída com 50mM de imidazol (4,66mg/mL).....	33
Figura 3.4 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular da LAI-DH10B em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade.....	34
Figura 3.5 – Otimização das condições que apresentaram placas cristalinas. Primeira linha e primeira coluna indicam a localização da gota na placa. Nomes em vermelho indicam o <i>screening</i> utilizado, nomes em azul indicam a condição do <i>screening</i> utilizada e o nome em preto indica a relação enzima:precipitante (1E1P: 1μ de enzima + 1μ de precipitante; 1E2P: 1μ de enzima + 2μ de precipitante; 2E1P: 2μ de enzima + 1μ de precipitante). A composição das condições encontra-se no Anexo A.....	35
Figura 3.6 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 0,2M cloreto de sódio, 0,1M Tris-HCl pH 8 e 20% (p/v) PEG 6000, na proporção 1μ de enzima + 1μ de precipitante, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.....	36

Figura 3.7 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 0,1M espermina, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.....	38
Figura 3.8 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 50% PEG 6K, 5M NaCl, 1M Tris-HCl pH 8,0, na proporção 1µL de enzima + 2µL de precipitante, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.....	38
Figura 3.9 – Fotografia de cristais, sob luz polarizada, da proteína LAI-DH10B (10mg/mL, suplementada com 0,5mM de Mn ²⁺) crescido a 18°C em 17% (m/v) polietileno glicol 1000; 0,1M acetato de amônio; 0,1M bis-tris pH 5,5, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada....	39
Figura 3.10 – (A) Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (14mg/mL) crescido a 18°C em 0,1M MMT pH 5,0; 25% (m/v) polietileno glicol 1500, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada. (B) Fotografia de cristais, sob luz polarizada, da proteína LAI-DH10B (10mg/mL, suplementada com 0,5mM de Mn ²⁺) crescido a 18°C em 0,1M MMT pH 5,0; 25% (m/v) polietileno glicol 1500, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.....	40
Figura 3.11 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da L-arabinose isomerase de <i>Escherichia coli</i> – ECAI, identificada como 2ajt (código PDB – 2AJT), com a LAI-DH10B identificada como Ef-LAI (código de acesso NCBI – KU221400.1). O alinhamento foi realizado pelo servidor ExPASy, ferramenta LALIGN.....	43
Figura 3.12 – (A) Estrutura biológica da ECAI, arquitetura hexamérica (dímero de trímeros), em cada trímero os monômeros estão representados por cores diferentes. (B) Unidade assimétrica da ECAI, composta de três monômeros.....	44
Figura 3.13 – (A) Vista frontal do modelo de estrutura hexamérica da LAI-DH10B, modelado no programa Swiss-Model, desenhado no programa PyMol a partir de alinhamento de sequência de aminoácidos com a ECAI realizado no LALIGN. (B) Vista lateral do modelo de estrutura hexamérica da LAI-DH10B, modelado no programa Swiss-Model, desenhado no programa PyMol a partir de alinhamento de sequência	

	de aminoácidos com a ECAI realizado no LALIGN.....	45
Figura 4.1 –	Conformação desejada do plasmídeo sintético. Com a presença da etiqueta de fusão, LSLt, (LSL ₁₅₀ + <i>linker</i> (braço espaçador) + sequência de reconhecimento da endoprotease TEV).....	56
Figura 4.2 –	Mapa do vetor pET28a-LSLt-LAI.....	56
Figura 4.3 –	SDS-PAGE (12% poliacrilamida) da expressão e purificação da enzima LSLt-LAI. 1 – Marcador padrão de peso molecular; 2 – Fração solúvel do extrato livre de células (10,48mg/mL); 3 – Fração purificada da LSLt-LAI eluída da cromatografia de afinidade com 200mM de lactose (3,41mg/mL).....	58
Figura 4.4 –	Efeito do pH e da concentração do cofator na atividade da LSLt-LAI solúvel. (■) Tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5; (●) Tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0; (▲) Tampão bicarbonato de sódio 50mM, pH 10,0. O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL. Erros menores que 0,003.....	60
Figura 4.5 –	Efeito do pH na atividade da LSLt-LAI solúvel. A enzima encontrava-se a uma concentração de 3,82mg/mL. Todos os tampões utilizados apresentavam força iônica de 50m e foram suplementados com 0,5mM de Mn ²⁺ . O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL. Erros menores que 0,05.....	61
Figura 4.6 –	Efeito da temperatura na atividade da LSLt-LAI solúvel. A enzima encontrava-se a uma concentração de 3,82mg/mL, em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5, suplementado com 0,5mM de Mn ²⁺ . O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL.....	63
Figura 4.7 –	Modelo construído, no programa PyMol, considerando as estruturas de cristal do LSLt (código PDB: 2Y9F (ANGULO <i>et al.</i> , 2011)) com o modelo desenhado da LAI-DH10B neste estudo, com o <i>linker</i> alongado contendo 11 resíduos de aminoácidos que fornece uma região flexível entre o LSLt e a L-AI. (A) Vista frontal do modelo (B) Vista lateral do modelo.....	66
Figura 4.8 –	Influência da concentração de substrato D-galactose na velocidade da reação de catálise da LSLt-LAI. Os símbolos representam os pontos	

experimentais e as retas o ajuste do modelo realizado pelo *software* Origin 8.1. (●) LSLt-LAI em sua forma solúvel em tampão (▲) LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL. Os experimentos foram realizados com a enzima a uma concentração de 1U/mL em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5..... 69

Figura 4.9 – Rendimento de conversão de D-galactose em D-tagatose usando LSLt-LAI como catalisador e o substrato a uma concentração de 400mM. (■)LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL (●)LSLt-LAI em sua forma solúvel..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Proteases usadas para a clivagem de etiquetas de fusão.....	25
Tabela 3.1 – Variações das concentrações dos componentes dos precipitantes que apresentaram cristais em cada <i>screen</i> . Para cada condição variou-se a relação enzima:precipitante 1E1P, 1E2P e 2E1P (1E1P: 1µ de enzima + 1µ de precipitante; 1E2P: 1µ de enzima + 2µ de precipitante; 2E1P: 2µ de enzima + 1µ de precipitante).....	37
Tabela 4.1 – Sequências dos nucleotídeos utilizados para a construção do vetor de expressão da L-arabinose isomerase.....	48
Tabela 4.2 – Purificação da LSLt-LAI a partir da dessorção da enzima com solução 200mM de lactose. A enzima encontrava-se em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0 + 100mM de NaCl, ligada ao suporte Ag-6BCL.....	59
Tabela 4.3 – Especificidade pelo substrato da recombinante LSLt-LAI de <i>Enterococcus faecium</i> em sua forma solúvel. Os ensaios foram realizados com substrato a 1M, 50°C e pH 5,5, em triplicata.....	64
Tabela 4.4 – Parâmetros de imobilização da LSLt-LAI em Ag-6BCL. Carga enzimática oferecida de aproximadamente 26 U de enzima/g de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 743 mg de proteínas totais / g de suporte. RI – rendimento de imobilização; At _R – atividade recuperada. O protocolo de imobilização ocorreu na presença de tampão acetato de sódio, pH 5,5.....	67
Tabela 4.5 – Parâmetros de imobilização de L-arabinose isomerase em estudos realizados por diferentes autores em sua forma nativa e recombinante. RI – rendimento de imobilização; At _R – atividade recuperada.....	68
Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL, D-galactose foi utilizada como substrato. Atividade enzimática oferecida 1U/mL. O protocolo de imobilização ocorreu na presença de tampão acetato de sódio, pH 5,5. Os resultados são a média das medidas em triplicata.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS

LB _{Kana}	Meio Luria-Bertani suplementado com o antibiótico kanamicina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
DpnI	Endonuclease de restrição
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
LB _{Amp}	Meio Luria-Bertani suplementado com o antibiótico ampicilina
LSLt	Etiqueta de fusão baseada no módulo lectina N-terminal de LSLa (LSL ₁₅₀ + <i>linker</i> + sítio de reconhecimento TEV)
LSL ₁₅₀	Módulo lectina N-terminal da isolectina A de <i>Laetiporus sulphureus</i>
TEV	Protease do vírus da gravura do tabaco (<i>Tobacco Etch Virus</i>)
Ag-IDA-Ni	Suporte epóxido multifuncional Agarose - ácido imino diacético - níquel
Ag-IDA-Cu	Suporte epóxido multifuncional Agarose - ácido imino diacético – cobre
Ag-6BCL	6% BCL Agarose Bead Standard
PEG	Polietilenoglicol
LSLt-LAI	L-arabinose isomerase associada à etiqueta de fusão LSLt
E333	Ácido glutâmico na posição 333
H446	Histidina na posição 446
E330	Ácido glutâmico na posição 330
D182	Ácido aspártico na posição 182
K194	Lisina na posição 194
E306	Ácido glutâmico na posição 306
(p/v)	Relação peso/volume
ECAI	L-arabinose isomerase de <i>Escherichia coli</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	L-arabinose isomerase	18
2.2	D-tagatose: um edulcorante promissor	20
2.3	Clonagem e expressão de proteínas recombinantes	21
2.3.1	<i>Escherichia coli: o sistema hospedeiro por eleição</i>	22
2.4	A importância do uso de <i>fusion tags</i> (etiquetas de fusão)	23
2.5	Estudo estrutural de proteínas	25
2.5.1	<i>Cristalografia de proteínas</i>	26
2.5.1.1	<i>Cristalização</i>	27
3	CONHECENDO A ESTRUTURA DA L-ARABINOSE ISOMERASE	28
3.1	Materiais e Métodos	28
3.1.1	<i>Preparo da enzima</i>	28
3.1.2	<i>Cristalização e coleta de dados</i>	29
3.1.3	<i>Modelagem molecular</i>	32
3.2	Resultados e discussões	32
3.2.1	<i>Obtenção da enzima purificada</i>	32
3.2.2	<i>Cristalização da LAI-DH10B</i>	34
3.2.3	<i>Modelagem estrutural da LAI-DH10B</i>	41
4	EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE (LSLt-LAI)	47
4.1	Materiais e Métodos	48
4.1.1	<i>Obtenção da LSLt-LAI a partir do plasmídeo da LAI-DH10B</i>	48
4.1.2	<i>Obtenção da LSLt-LAI a partir de plasmídeo sintético</i>	49
4.1.3	<i>Purificação da LSLt-LAI Ensaio de atividade enzimática</i>	50
4.1.4	<i>Ensaio de atividade enzimática</i>	50
4.1.5	<i>Concentração de proteínas</i>	51
4.1.6	<i>Determinação da massa molar por SDS-PAGE</i>	51
4.1.7	<i>Imobilização da LSLt-LAI em Ag-6BCL</i>	52

4.1.7.1	<i>Parâmetros de imobilização.....</i>	52
4.1.8	<i>Caracterização da LSLt-LAI solúvel e imobilizada.....</i>	53
4.1.8.1	<i>Caracterização físico-química da LSLt-LAI.....</i>	53
4.1.8.2	<i>Especificidade do substrato da LSLt-LAI.....</i>	54
4.1.8.3	<i>Análise cinética da LSLt-LAI.....</i>	54
4.1.8.4	<i>Análise de isomerização da D-galactose em D-tagatose pela LSLt-LAI.....</i>	54
4.2	Resultados e discussões.....	55
4.2.1	<i>Construção da LSLt-LAI.....</i>	55
4.2.2	<i>Expressão e purificação da LSLt-LAI.....</i>	57
4.2.3	<i>Atividade da LSLt-LAI solúvel frente ao pH e cofator.....</i>	59
4.2.4	<i>Atividade da LSLt-LAI solúvel frente à temperatura.....</i>	62
4.2.5	<i>Especificidade pelo substrato de LSLt-LAI solúvel.....</i>	64
4.2.6	<i>LSLt-LAI imobilizada.....</i>	65
4.2.6.1	<i>Determinação dos parâmetros de imobilização.....</i>	65
4.2.6.2	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos.....</i>	68
4.2.6.3	<i>Produção de D-tagatose por LSLt-LAI solúvel e por LSLt-LAI imobilizada em Ag-6BCL.....</i>	70
5	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO A – TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS SCREENS DE CRISTALIZAÇÃO.....	85
	ANEXO B – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA COLUNA HILOAD 16/600 SUPERDEX 200 PREP GRADE.....	101

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, reações enzimáticas têm sido amplamente estudadas como poderosas ferramentas na síntese de açúcares raros, que provaram ter potenciais benefícios médicos e importantes funções fisiológicas, uma vez que são clinicamente seguros e eficientes no uso como edulcorantes de baixa caloria (OH, 2007; LEVIN, 2002). E um desses açúcares é a D-tagatose, que é obtida a partir da isomerização da D-galactose pela L-arabinose isomerase EC 5.3.1.4, enzima que teve sua estrutura tridimensional modelada no presente estudo. No entanto, os açúcares raros são comercialmente caros devido sua natureza biossegura e seu alto custo de produção devido sua baixa produtividade, com isso a aproximação experimental que permite superar essa barreira é a clonagem e a expressão de enzimas recombinantes visando o aumento na produção e possibilitando que a purificação e imobilização ocorram em uma única etapa através da inserção de etiquetas de fusão (OH, 2007; LEVIN, 2002; ÁVALOS, 2014; KIM, 2004).

Alinhando todas essas informações, projetou-se a LSLt-LAI, um método inédito de expressão e purificação da enzima L-arabinose isomerase associada a LSLt, uma etiqueta de afinidade e solubilidade, que apresenta em sua estrutura um braço espaçador que confere mobilidade à enzima imobilizada, um sítio de reconhecimento da endoprotease TEV que permite clivar a etiqueta de fusão após a etapa de purificação, quando desejável, e a lectina de *Laetiporus sulphureus* (LSL₁₅₀) que confere as propriedades de afinidade e solubilidade (ÁVALOS, 2014). Esta etiqueta permite produzir a proteína com alto rendimento e purificá-la mediante um protocolo eficaz, simples e de baixo custo. O protocolo é baseado na capacidade do peptídeo se unir a açúcares derivados de agarose e exige como única etapa a cromatografia de afinidade que emprega agarose como suporte e lactose como eluente possibilitando a dessorção rápida e fácil sem comprometer a atividade da enzima (ÂNGULO *et al.*, 2011).

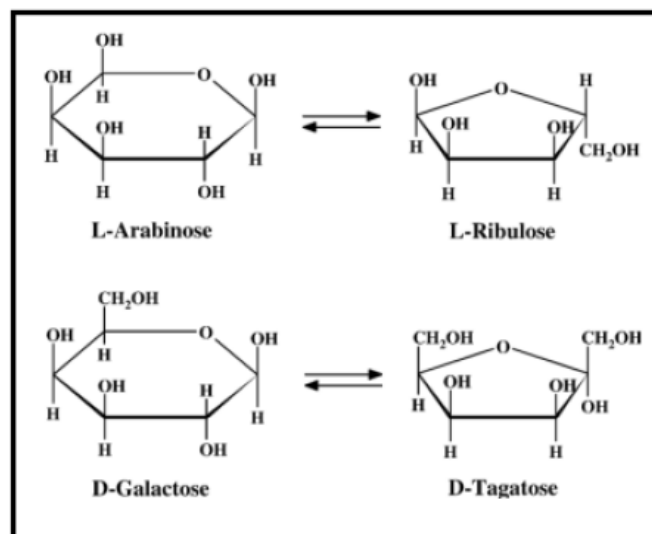
Com isso, no presente estudo relata-se uma nova abordagem enzimática para a produção da D-tagatose, a partir de clonagem, *overexpression* e inserção de uma etiqueta de fusão que favorece a purificação e imobilização da enzima L-AI de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 L-arabinose isomerase

A L-Arabinose isomerase EC 5.3.1.4(L-AI), uma enzima chave na via de fosfato pentose microbiana, é considerada um importante catalisador biológico na produção de açúcares raros. Esta enzima isomeriza L-arabinose em L-ribulose, bem como D-galactose em D-tagatose, monossacarídeos que apresentam excelentes valores comerciais nas indústrias alimentar e farmacêutica (GRANSTROM *et al.*, 2004), conforme mostrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Ilustração da isomerização de D-galactose em D-tagatose (*in vitro*) e da isomerização de L-arabinose em L-ribulose (*in vivo*).



Fonte: Kim, 2004.

Até o ano de 2014, mais de 40 origens de L-AI foram identificadas e caracterizadas. As propriedades enzimáticas dessas enzimas diferenciam significativamente em cinco aspectos, incluindo (1) atividade enzimática, (2) parâmetros cinéticos, (3) temperatura e termoestabilidade ótimas, (4) pH ideal e estabilidade do pH, e (5) requisitos de íons metálicos (XU *et al.*, 2014).

No que diz respeito à temperatura, as L-arabinose isomerases já estudadas apresentaram diferentes valores de temperatura ideal variando de 15 a 95°C. O microrganismo *Shewanella sp.* ANA-3 produziu uma L-AI que apresenta temperatura ideal variando de 15-35°C (RHIMI *et al.*, 2011a), L-AI de *Lactobacillus sakei* (RHIMI *et al.*, 2010) e de *Lactobacillus gayonii* (NAKAMATU e YAMANAKA, 1969) apresentaram temperatura ideal no intervalo de 30–40°C, L-AI de *Mycobacterium smegmatis* a 45°C (IZUMORI *et al.*, 1978) e de *E. coli* a 30°C (YOON *et al.*, 2003). L-AIs produzidas a partir de microrganismos termófilos e hipertermófilos demonstraram melhor atividade catalítica quando submetidas a temperaturas superiores a 60°C, L-AI de *T. mathranii* (LEE *et al.*, 2005a) e de *A. acidocaldarius* (LI *et al.*, 2011) apresentaram temperatura ideal de 65°C, L-AI de *T. saccharolyticum* NTOU1 (JORGENSEN *et al.*, 2004), de *G. stearothermophilus* T6 (LEE *et al.*, 2005b) e de *G. thermodenitrificans* (KIM e OH, 2005) obtiveram como temperatura ideal 70°C, outros atingiram temperatura ideal de 90°C – *T. maritima* (LEE *et al.*, 2004) e 95°C – *A. flavithermus* (LI *et al.*, 2011). No entanto, catálise a temperaturas superiores a 70°C causa reação de caramelização e formação de subprodutos (KIM, 2004).

Quanto à estabilidade da L-AI, leva-se em consideração os íons metálicos. As enzimas que apresentam característica termofílica requerem íon Mn^{2+} ou Co^{2+} para manter sua termoestabilidade, enquanto as hipertermófilas são dependentes de Co^{2+} . No entanto, Co^{2+} tem seu uso inibido na indústria de alimentos devido sua toxicidade (LEE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2014; KIM e OH, 2005; JORGENSEN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005a; LEE *et al.*, 2004, SOUSA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2014).

A maioria das L-AIs relatadas são ativas em condições neutras ou alcalinas e não são estáveis em condições ácidas (XU *et al.*, 2014). L-arabinose isomerase produzidas a partir de *Bacillus* possuem uma estreita faixa de pH ideal, 7,0 a 8,5 (LEE *et al.*, 2005a; RHIMI e BEJAR, 2006; PRABHU *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2002; KIM e OH, 2005; KIM *et al.*, 2010). Já em estudos realizados por CHOUAYEKH *et al.* (2007), RHIMI *et al.* (2010) e XU *et al.* (2011), as enzimas apresentaram pH ideal mais baixos, variando de 5,0 a 7,5, todos caracterizaram L-arabinose isomerases oriundas das bactérias do ácido láctico. Em contrapartida, a L-arabinose isomerase obtida a partir de *Anoxybacillus flavithermus*, atua em condições altamente alcalinas apresentando uma faixa de pH ideal de 9,5 a 10,5 (LI *et al.*, 2011).

Com a identificação de novas variedades de L-arabinose isomerases, as técnicas de engenharia proteica envolvendo design reacional através de melhoramento genético, aprimoraram efetivamente suas propriedades catalíticas através da inserção de etiquetas de fusão e da clonagem e expressão em células de *Escherichia coli*. Assuntos que serão discutidos nos tópicos 2.3 e 2.4 deste mesmo capítulo.

2.2 D-tagatose: um edulcorante promissor

A D-tagatose é um monossacarídeo raro presente na natureza com características prebióticas, classificado como uma substância segura (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) reconhecida pela *US Food and Drug Administration* (FDA), sua estrutura está demonstrada na Figura 2.1. Como edulcorante de baixa caloria e substituto da sacarose, a D-tagatose tem sido aplicada na indústria de alimentos, na formulação de suco de frutas, bebidas e goma (GUO, *et al.*, 2018). Além disso, a D-tagatose é considerada um potencial fármaco antidiabético para tratar a diabetes tipo II e um prebiótico para ajudar a aumentar as bactérias benéficas no cólon, reduzir o colesterol e prevenir o câncer de cólon, além de apresentar fraca absorção e metabolização pelo organismo humano (RHIMI, *et al.*, 2011b; SALONEN *et al.*, 2013). D-Tagatose deverá criar um novo mercado devido suas propriedades únicas e sua capacidade de competir com os mercados de polialcoóis que substituem o açúcar (JAYAMUTHUNAGAI *et al.*, 2017).

A D-tagatose pode ser sintetizada por dois diferentes métodos, os químicos ou os enzimáticos, ambos utilizam a D-galactose como substrato. E a D-galactose pode ser obtida a partir da hidrólise de lactose ou de materiais contendo lactose, como o soro de leite ou o permeado do soro de leite, que são subprodutos abundantes e baratos na indústria de laticínios (WANARSKA e KUR, 2012). No método químico, a produção de D-tagatose pode ser conseguida através da isomerização de D-galactose na presença de cloreto de cálcio sob a condição básica ou ácida. No entanto, devido à complexidade na purificação, o alto rendimento dos subprodutos e o alto custo do tratamento de resíduos limita a aplicação do método químico (GUO, *et al.*, 2018). Em contraste, o método enzimático atrai muitos

interesses de pesquisa, onde neste, a D-tagatose pode ser produzida a partir de D-galactose *in vitro* sob a catálise chave de L-arabinose isomerase (L-AI, EC 5.3.1.4).

Foi relatado que uma temperatura relativamente alta (60°C – 70°C) e uma condição fraca-ácida (pH 5,0 – 6,5) são desejáveis para melhorar a produção de D-tagatose e suprimir a reação de coloração e a formação de subprodutos (LIU *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012). Considerando esses parâmetros, muitos microrganismos foram relatados como fontes de L-arabinose isomerase. Algumas delas são bactérias termófilas (JAYAMUTHUNAGAI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2014), mas a segurança alimentar dessas bactérias e do gene derivado foi questionada (MEN *et al.*, 2014), logo o uso de microrganismos mesófilos para a produção da enzima vem crescendo bastante nos últimos anos e alguns deles são bactérias lácticas, possuem qualidade alimentar (JAYAMUTHUNAGAI *et al.*, 2017; STAUDIGL *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014), e são excelentes candidatas para a produção de D-tagatose. Dentre uma grande variedade de microrganismo destaca-se o *Enterococcus faecium* DBFIQ E36, cepa isolada por TORRES *et al.* (2014) a partir do leite de vaca cru. No entanto, a taxa de conversão e a produção de D-tagatose a partir de D-galactose não são suficientemente elevadas para uso comercial (CHOI *et al.*, 2016), problemas esses que podem ser solucionados com o uso de microrganismos recombinantes e métodos de purificação/imobilização eficientes.

2.3 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

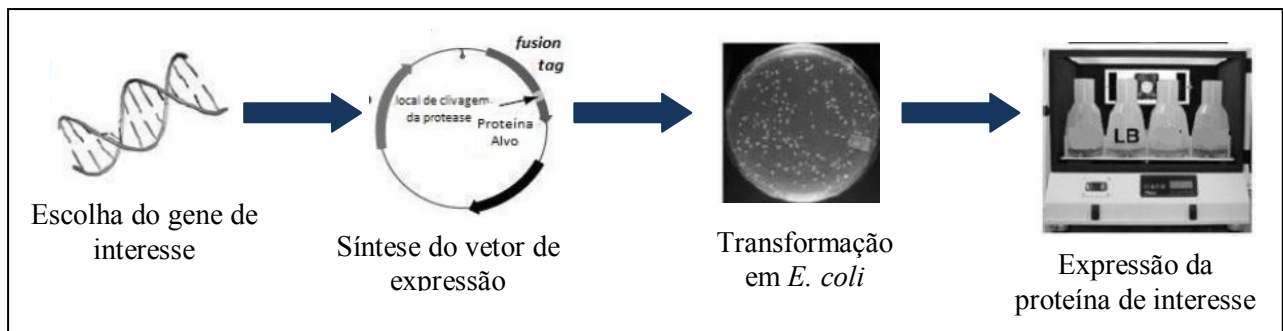
A produção de proteínas constitui uma das mais importantes aplicações da engenharia genética. O aparecimento da biologia molecular, nos anos 70, tornou possível a produção de proteínas heterólogas em diferentes células hospedeiras representando uma alternativa à extração da proteína original (LIMA, 2013). A extração clássica permite normalmente concentrações muito baixas tornando-a muito dispendiosa e, muitas vezes, impossível de implementar, além de apresentar o problema associado a pureza da proteína obtida (TEIXEIRA e FONSECA, 2007).

Na era pós-geômica são grandes as expectativas das reais potencialidades da expressão e purificação de proteínas recombinantes no diagnóstico e tratamento de doenças

genéticas, na área da saúde, bem como na agricultura, no ambiente e na indústria biotecnológica e de alimentos (AZEVEDO, 2005).

No entanto, a expressão de proteínas recombinantes necessita de um planejamento correto que vise a produção destas na conformação correta permitindo o estado solúvel e ativo. Para isso são necessários elementos essenciais: identificação e localização do gene de interesse, inserção do gene alvo num vector adequado, introdução do vector no hospedeiro designado, seleção de células de transformação e multiplicação/expressão do gene escolhido no hospedeiro (FRANCIS e PAGE, 2010). Sequência de eventos para a expressão de uma proteína recombinante está ilustrada na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Esquema representativo das etapas de síntese de uma proteína recombinante.



Fonte: Adaptada de LIMA, 2003.

2.3.1 *Escherichia coli*: o sistema hospedeiro por eleição

A *Escherichia coli* é um hospedeiro dominante na produção de proteínas recombinantes devido à sua produção protetora vantajosa, rápida, barata e de alto rendimento, juntamente com sua genética bem caracterizada e variedade de ferramentas moleculares disponíveis (DEMAIN e VAISHNAV, 2009; COSTA *et al.*, 2014).

O tamanho da proteína e os limites do domínio são outros fatores que influenciam na síntese proteica. Estudos mostram que existe uma grande probabilidade da expressão neste sistema diminuir com o aumento do peso molecular das proteínas, especialmente para proteínas maiores que 60 kDa (CANAVES *et al.*, 2004). Assim, quando se utiliza a *E. coli* como hospedeiro é, tipicamente, vantajoso expressar domínios individuais da proteína em vez

de expressar proteínas com o seu comprimento total, sempre que tal seja possível. Os resíduos de início e do fim do domínio alvo podem também afetar o rendimento e a solubilidade da expressão proteica (FRANCIS e PAGE, 2010).

Uma vez determinada a proteína de interesse e a correspondente construção, deve ser subclonada num vector que contenha todos os elementos necessários à transcrição e tradução do gene alvo. Os plasmídeos, pela sua maleabilidade, são os vectores de expressão por excelência que permitem clonar genes ou fragmentos de DNA específicos (VIDEIRA, 2001). E o sistema pET tem sido reconhecido como um dos plasmídeos mais poderosos desenvolvidos para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os genes de interesse são clonados nos plasmídeos pET sob o controle de fortes sinais de transcrição e (opcionalmente) de tradução do bacteriófago T7. A expressão é induzida pelo fornecimento de uma fonte da RNA polimerase T7 na célula hospedeira. Esta polimerase é tão seletiva e ativa que, quando completamente induzida, a maior parte dos recursos das células são convertidos para a expressão do gene pretendido. Assim, após algumas horas de indução, a proteína desejada pode compreender mais do que 50 % do total das proteínas presentes nas células (LIMA, 2013).

Outro elemento relevante que pode ser inserido no vetor são as *fusion tags* (etiquetas de fusão) elementos essenciais, pois são transcritos junto com o gene que codifica a proteína de interesse e permitem ajudar na expressão, aumentar a solubilidade e melhorar a produção/purificação da proteína alvo (FRANCIS e PAGE, 2010; YADAV *et al.*, 2016).

2.4 A importância do uso de *fusion tags* (etiquetas de fusão)

As tags de fusão são proteínas ou moléculas peptídicas capazes de serem expressas em *E. coli* e são comumente usadas para facilitar a expressão da proteína alvo, conferir resistência à degradação proteolítica, maior solubilidade e facilitar a purificação (BUTT *et al.*, 2005; WALLS e LOUGHRAN, 2011).

As etiquetas de fusão podem ser divididas em dois tipos, etiquetas de afinidade e etiquetas de solubilidade. As etiquetas de afinidade usadas para isolamento e purificação de proteínas incluem His6 – hexahistidina (HOCHULI e DOBELI 1987) e Strep-tag II

(SCHMIDT e SKERRA, 1994), GST – glutationa S-transferase (SMITH e JOHNSON, 1988), SPA – proteína estafilocócica A (KANNO *et al.*, 2000). As tags de solubilidade para a produção de proteínas solúveis incluem MBP – proteína ligada à maltose (KAPUST e WAUGH, 1999), N-utilização da substância A (DE MARCO *et al.*, 2004), TRX – tioredoxina A (LA VALLIE *et al.*, 1993; YASUKAWA *et al.*, 1995) e SUMO – pequeno modificador relacionado à ubiquitina (MALAKHOV *et al.*, 2004; BUTT *et al.*, 2005). Algumas tags de proteína, como GST e MBP, também podem funcionar como promotores de afinidade e solubilidade. Além disso, são utilizadas várias etiquetas de aumento de solubilidade juntamente com etiquetas de afinidade para aumentar a solubilidade e o rendimento da proteína, simplificando assim o processo de purificação (HAN *et al.*, 2018). No entanto, nenhuma das etiquetas disponíveis atualmente são adequadas para a produção de proteínas em grande escala, uma vez que a maioria das matrizes de purificação comercialmente disponíveis são caras e sua reutilização é limitada (LI *et al.*, 2016).

Em 1994, KONSKA e colaboradores isolaram a lectina de *Laetiporus sulphureus* – LSL (Figura 2.3) a partir dos basidiocarpos do dito fungo, que foi isolada por cromatografia de afinidade em sepharose por TATENO e GOLDSTEIN (2003). A ligação específica de LSL a sepharose levou ao desenvolvimento de um novo método de purificação para proteínas de fusão marcadas com LSL, onde a purificação ocorre em um único passo para proteínas de fusão marcadas com LSL. A resina sepharose não reticulada e a solução de lactose são utilizadas como adsorvente e eluente específicos, respectivamente (LI *et al.*, 2016).

Figura 2.3 – Imagem do fungo basidiomiceto *Laetiporus sulphureus*. Esta espécie pode ser encontrada na América do Norte e na Europa.



Fonte: ÁVALOS, 2014.

As etiquetas de fusão podem ser inseridas tanto na extremidade N-terminal como na C-terminal e esta localização é de suma importância, uma vez que pode ter um efeito profundo nos níveis de expressão da proteína no estado solúvel (LIMA, 2013). A fusão no N-terminal é a mais comum, pois expressa, frequentemente, proteínas solúveis com mais sucesso que a fusão no C-terminal (FRANCIS e PAGE, 2010).

A presença de etiquetas de fusão pode interferir potencialmente na atividade biológica da proteína expressa e, nestes casos, torna-se necessário clivar enzimaticamente o *fusion tag* após a purificação da proteína. Isto é conseguido através da utilização de uma protease que possui um sítio de clivagem específico (uma sequência de aproximadamente 7 aminoácidos que são especificamente reconhecidos pela protease) entre a etiqueta de fusão e a proteína alvo (LIMA, 2013; FRANCIS e PAGE, 2010). Na Tabela 2.1 estão referenciadas diferentes proteases.

Tabela 2.1 – Proteases usadas para a clivagem de etiquetas de fusão.

PROTEASE	DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIA DE CORTE*
TEV	Protease da família das cisteínas, que se encontra no vírus Etch do tabaco	ENLYFQ/X
3C	Forma recombinante da protease 3C proveniente do rinovírus humano do tipo 14	EVLFFQ/GP
Xa	O Fator Xa é uma protease de serina que converte protrombina em trombina	I(E-N)GR/
Thr	A Trombina é uma protease de serina que converte fibrinogênio em fibrina	LVPR/GS
Entk	Subunidade catalítica da enteroquinase bovina	DDDDK/

Fonte: LIMA, 2013.

* O símbolo “/” indica o local de corte da protease e a sequência de corte é dada no código de aminoácido com uma única letra, onde X representa qualquer aminoácido.

2.5 Estudo estrutural de proteínas

O conhecimento do mecanismo de ação biológica das proteínas implica estudá-las funcional e estruturalmente. E a caracterização dos detalhes específicos das interações que

estabelecem com os correspondentes ligando, que em última instância são os que nos permitem tirar conclusões acerca de seu mecanismo de atuação na natureza, passa necessariamente pelo conhecimento de suas estruturas tridimensionais (WEIS e DRICKAMER, 1996). Técnicas como a cristalografia de raios X aportam informações valiosas tanto da especificidade das proteínas como das relações entre as diferentes famílias estruturais de proteínas (LORIS, 2002).

2.5.1 Cristalografia de proteínas

A Biologia estrutural possui três principais diferentes técnicas que permitem caracterizar estruturalmente as proteínas que são a cristalografia de raios X, a ressonância magnética nuclear e a microscopia eletrônica. No entanto, a cristalografia é a que apresenta mais êxito quando observamos a quantidade de estruturas depositadas atualmente no *Protein Data Bank* (PDB).

Como vantagem sobre a técnica de RMN, a cristalografia permite resolver a estrutura de proteínas independente de sua massa molecular, e quando se compara com a microscopia eletrônica a vantagem de alcançar resoluções atômicas é apresentada. Entretanto, um dos principais problemas da cristalografia é obter cristais de proteína de alta qualidade (GÓMEZ-MORENO e SANCHO, 2003; ÁVALOS, 2014).

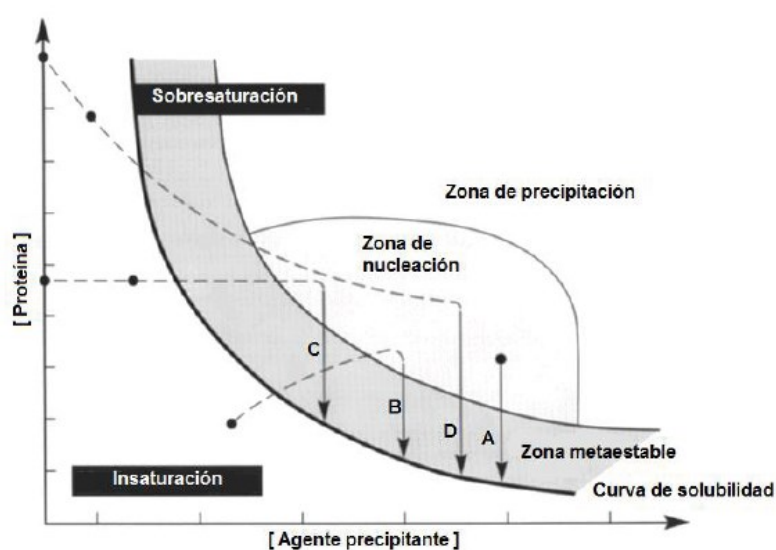
A resolução estrutural de proteínas mediante cristalografia de raios-x implica em uma série de fatos experimentais até a obtenção de um modelo estrutural final, que vão desde a purificação e cristalização, passando pelas etapas de difração, avaliação de dados, e finalmente chegando às etapas de construção, refinamento, validação e obtenção do modelo final. Análise do modelo, assim como a caracterização funcional da proteína, permite estabelecer a relação estrutura-função, o objetivo principal da biologia estrutural (ÁVALOS, 2014).

2.5.1.1 Cristalização

Como muitas outras moléculas, as proteínas podem formar cristais como resultado de sua ordenação regular no espaço mediante o estabelecimento de interações fracas não covalentes entre elas (McPHERSON, 2004). Atualmente, entende-se o processo de cristalização como uma transição da fase solúvel para a fase sólida cristalina. No entanto, não se pode prever se uma proteína é cristalizável, muito menos as condições que a mesma cristalizará, caso seja possível a cristalização. O que se pode afirmar é que para a cristalização de uma proteína, seu grau de pureza deve ser acima de 95%, além de apresentar homogeneidade química e conformacional (ÁVALOS, 2014).

Para se obter cristais são necessárias diferentes aproximações experimentais das dissoluções sobressaturadas de proteína na presença de um agente precipitante, a fim de conduzir a solução à região de nucleação, onde ocorre a formação de núcleos cristalinos que servem como ponto de partida para o posterior crescimento dos cristais de forma ordenada, alcançando a zona metaestável. O diagrama de fases é apresentado na Figura 2.4. Na região de precipitação ocorrem os agregados amorfos e precipitados não cristalinos (ÁVALOS, 2014; GÓMEZ-MORENO e SANCHO, 2003).

Figura 2.4 – Diagrama de fases da mistura proteína-precipitante.



Fonte: AVALOS, 2014.

3 CONHECENDO A ESTRUTURA DA L-ARABINOSE ISOMERASE

O conhecimento da função bioquímica, mecanismo enzimático, interações proteína-ligando e estado de oligomerização de uma proteína implica estudá-la funcional e estruturalmente (TEICHMANN *et al.*, 2001). E para se alcançar a resolução estrutural de uma enzima, diversos passos devem ser seguidos, sendo a cristalização o principal deles.

Para se alcançar condições ideais de cristalização o método tentativa e erro ainda é o mais utilizado, uma vez que cada proteína necessita de condições específicas que são difíceis de determinar (DILYANA, 2008; PECHKOVA e NICOLINI, 2002). Por isso a cristalização de proteínas, em geral, ainda é considerada mais arte do que ciência (PECHKOVA e NICOLINI, 2002).

E no que tange à elucidação da estrutura tridimensional de uma proteína o desafio é bem maior, uma vez que a obtenção de cristais ideais é rara – aproximadamente 0,5% das proteínas produzem cristais adequados (MAGGIO e RAMNARAYAN, 2001). Em consequência disso, diferentes métodos de elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas foram desenvolvidos, sendo a modelagem por homologia a ferramenta mais bem sucedida para essas predições.

Tendo em vista todos esses conceitos, neste capítulo serão descritas todas as tentativas de estabelecimento de condições ideais de cristalização, com formação de cristais que permitam a resolução estrutural da enzima em estudo, L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36, assim como a modelagem estrutural da enzima em estudo.

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Enzima

Para a determinação da estrutura utilizou-se a L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 depositada no NCBI sob o código de acesso KU221400.1,

com a inserção de uma cauda de histidina em seu N-terminal (LAI-DH10B), enzima mesófila que pouco se sabe sobre sua estrutura tridimensional. A enzima foi produzida e purificada de acordo com SOUSA *et al.*, 2017.

3.1.2 Cristalização e coleta de dados

A primeira ação a ser tomada para se tentar cristalizar uma enzima é ajustar sua concentração, já que esta é uma variável significativa no processo de cristalização. Para isso utilizou-se o *Pre-crystallization Test* – Hampton Research, que determina a concentração adequada de proteína para a triagem de cristalização e o comportamento das gotas obtidas nos revela qual caminho devemos seguir.

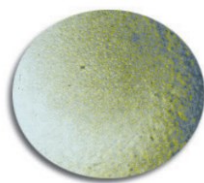
A enzima purificada e concentrada foi analisada frente ao contato com 4 diferentes reagentes pré-formulados:

- Reagente A1 - 0.1 M Tris-HCl pH 8.5; 2.0 M Sulfato de amônio;
- Reagente B1 - 0.1 M Tris-HCl pH 8.5; 1.0 M Sulfato de amônio;
- Reagente A2 - 0.1 M Tris-HCl pH 8.5; 0.2 M Cloreto de magnésio hexahidratado; 30% w/v Polietilenoglicol 4.000;
- Reagente B2 - 0.1 M Tris-HCl pH 8.5; 0.2 M Cloreto de magnésio hexahidratado; 15% w/v Polietilenoglicol 4.000.

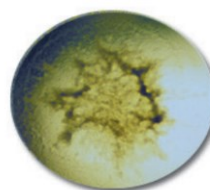
As gotas formadas, após 30 minutos de contato, foram analisadas em microscópio e segue-se com as orientações apresentadas na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Prováveis resultados e ações recomendadas na utilização do kit PCT™.

RESULTADOS		AÇÕES RECOMENDADAS
REAGENTES A1/B1	REAGENTES A2/B2	
Precipitado amorfo pesado	Precipitado amorfo pesado	Diluir a enzima 1:1 e repetir o experimento
Límpido	Límpido	Concentrar a enzima à metade do volume inicial e repetir o experimento
Precipitado granular leve	Límpido	Executar <i>screen</i>
Límpido	Precipitado granular leve	Executar <i>screen</i>
Precipitado amorfo pesado	Precipitado granular leve	Executar <i>screen</i>
Precipitado amorfo pesado	Límpido	Executar PCT com B1 e B2 e avaliar os resultados
Límpido	Precipitado amorfo pesado	Executar PCT com B1 e B2 e avaliar os resultados



Precipitado granular leve



Precipitado amorfo pesado

Fonte: Adaptado de Hampton Research.

Selecionada a concentração ideal, os experimentos de difusão de vapor em gota sentada seguiram sendo realizados por um sistema robotizado (Figura 3.2), Innovadyne Nanodrop ExtY (Solve Scientific) dispensa as gotas automaticamente sobre placas Innovaplate SD-2 de 96 poços. O volume final das gotas foi ajustado a 250nL de solução de proteína + 250nL de solução de cristalização, equilibrado com 65μL de solução de cristalização em cada um dos reservatórios. Assim foram realizados 384 experimentos rapidamente, explorando diversas possibilidades de precipitantes. As soluções de cristalização utilizadas pelo robô foram soluções de kits comerciais (JCSG Suite (Qiagen), Crystal Screen I e II (Hampton Research), PACT Suite (Qiagen) e INDEX HT (Hampton Research) – Anexo A), que foram escolhidas com base em relatos científicos de sucesso na cristalização de homólogos da molécula em estudo (XU, *et al.*, 2015; CAO, *et al.*, 2014).

Figura 3.2 – Innovadyne Nanodrop ExtY, permite pipetagens de baixo volume e alta precisão. É equipado com o software Nanobuilder que possui uma ampla gama de aplicações e manipulação de dados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A otimização das gotas obtidas foi realizada manualmente pelo método de difusão de vapor em gota sentada, provando diferentes relações de volume proteína:precipitante, o experimento foi realizado em placas de 48 poços (Linbro - Hampton Research) onde o volume do precipitante para o equilíbrio era de 140 μ L e o volume proteína:precipitante era variável. Posteriormente, seguiu-se com o preparo das soluções de cristalização manualmente (*in house*), variando pH, concentração de sal e de precipitante.

Com os cristais otimizados, prepararam-se crioprotetores adequados a serem usados em casos onde a solução de cristalização não tem em sua composição um agente crioprotetor. A crioproteção foi realizada por 10 segundos, após a coleta do cristal e antes de colocá-lo no nitrogênio líquido.

Os dados de difração foram coletados em estações com fonte de raios X intensas do tipo sincrotron, *ALBA Synchrotron Light Facility*, Sardeña del Vallés, Espanha e *ESRF – European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble, França. Os cristais foram difratados em diferentes linhas destinadas a macromoléculas biológicas com software específicos, *mxCuBE*, *EDNA* e *ADXV*.

3.1.3 Modelagem molecular

Para prever a estrutura tridimensional da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* (LAI-DH10B) utilizou-se uma metodologia conhecida como modelagem por homologia. Iniciou-se o estudo com uma vasta investigação no *Protein Data Bank* em busca da mais apropriada proteína-molde, em seguida realizou-se o alinhamento de sequência da proteína-molde com a proteína em estudo, rodado no servidor ExPASy utilizando a ferramenta LALIGN, possibilitando assim a construção das coordenadas do modelo no programa Swiss-model.

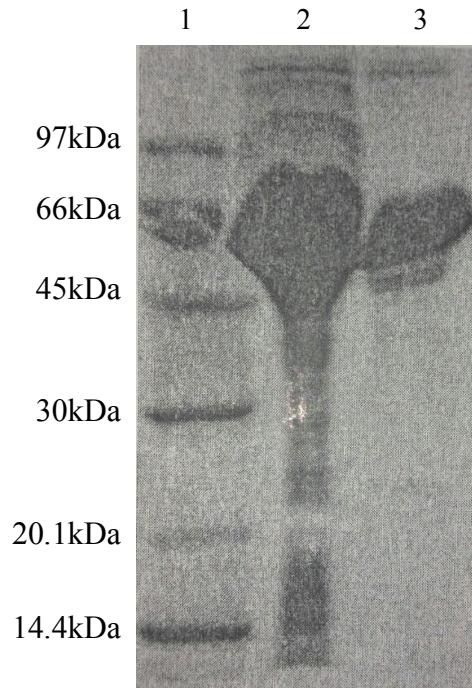
3.2 Resultados e discussões

3.2.1 Obtenção da enzima purificada

Devido ao fato de a enzima ter sido extraída de uma complexa mistura biológica, a purificação da mesma é necessária, sendo condição primordial para a cristalização. A Figura 3.3 mostra o perfil eletroforético da enzima em seu estado bruto e purificada.

O tampão usado nas etapas após o processo de expressão, foi substituído pelo tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,6, já que o tampão fosfato, usado pela autora, poderia causar precipitação da enzima ou o sal presente no mesmo poderia sofrer precipitações durante o processo de cristalização. Após a purificação, a enzima foi concentrada à 14,8mg/mL.

Figura 3.3 – SDS-PAGE (12% de poliacrilamida) da expressão e purificação da LAI-DH10B. 1 – Marcador padrão de peso molecular; 2 – Fração solúvel do extrato livre de células (18,21mg/mL); 3 – fração purificada da LAI-DH10B em Ag-IDA-Ni eluída com 50mM de imidazol (4,66mg/mL).

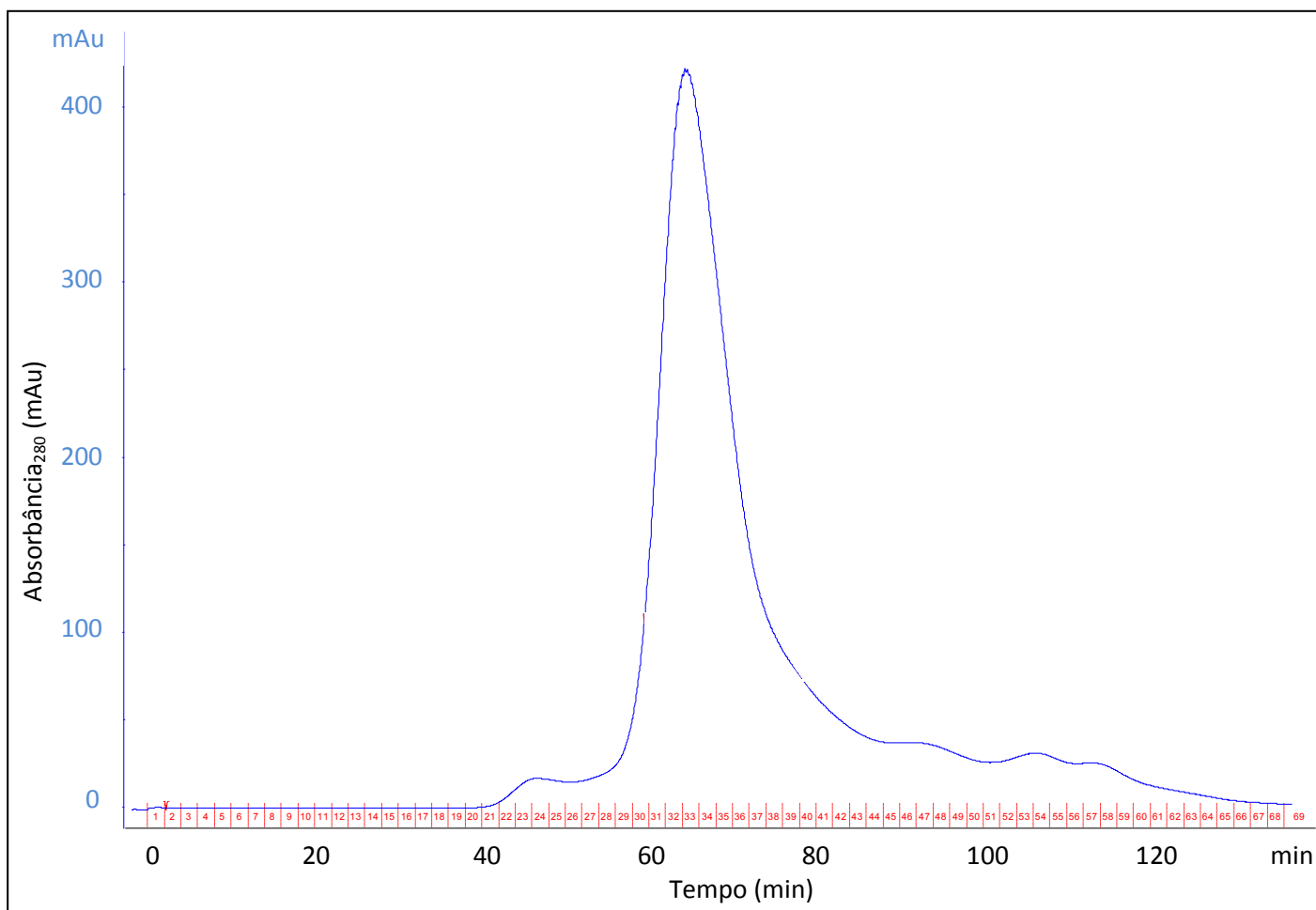


Fonte: Elaborada pelo autor.

A fim de se verificar a presença ou não de agregados, realizou-se cromatografia de exclusão molecular, em AKTA Prime Plus (GE Healthcare) utilizando uma coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade. Inicialmente a coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0 para, depois aplicar a proteína e iniciar a eluição a um fluxo de 1mL/min.

No perfil mostrado na Figura 3.4, observa-se um volume de exclusão nos primeiros 40 minutos, um pico aos 46 minutos e um pico entre 60 e 80 minutos aproximadamente, onde todas as frações desse pico foram coletadas (frações 31 a 41), reunidas e concentradas à 14mg/mL. Esse tempo de retenção indica que a L-arabinose em solução a pH 8 apresenta-se na forma de monômeros e dímeros, já que seu peso molecular é 56kDa (SOUSA, 2015), a curva padrão encontra-se disponível no Anexo B.

Figura 3.4 – Perfil da cromatografia de exclusão molecular da LAI-DH10B em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.2 Cristalização da LAI-DH10B

Com a enzima purificada e a uma concentração de 14mg/mL realizou-se o teste de pré-cristalização, seu resultado apresentou formação de material cristalino granular indicando que a concentração de enzima estava apropriada para prosseguir com os experimentos de cristalização. Com isso foram realizados 4 *screens*: JCSG Suite, Crystal Screen I e II, PACT Suite e INDEX HT.

Após 24 horas as placas foram visualizadas em microscópio óptico e 8 condições do INDEX, 22 condições do Crystal Screen I e II, 41 condições do PACT e 6 condições do JCSG apresentaram material cristalino. No entanto, dessas 77 condições com material cristalino, apenas 7 apresentaram cristal em forma de placas, assim esses pontos foram otimizados variando a relação de concentração proteína:precipitante como mostrado na Figura 3.5. As 70 gotas restantes não foram otimizadas, pois o material cristalino apresentado em algumas se degradou e em outras o material não difratava quando submetido à luz polarizada, além de apresentarem tamanho inferior a 0,1mm, o que impossibilita a coleta do cristal.

Figura 3.5 – Otimização das condições que apresentaram placas cristalinas. Primeira linha e primeira coluna indicam a localização da gota na placa. Nomes em vermelho indicam o *screening* utilizado, nomes em azul indicam a condição do *screening* utilizada e o nome em preto indica a relação enzima:precipitante (1E1P: 1 μ de enzima + 1 μ de precipitante; 1E2P: 1 μ de enzima + 2 μ de precipitante; 2E1P: 2 μ de enzima + 1 μ de precipitante). A composição das condições encontra-se no Anexo A.

	1	2	3	4	5	6
A	INDEX	INDEX	INDEX	JCSG	JCSG	JCSG
	H4	H4	H4	A2	A2	A2
	1E1P	1E2P	2E1P	1E1P	1E2P	2E1P
B	JCSG	JCSG	JCSG	CSII	CSII	CSII
	A3	A3	A3	D4	D4	D4
	1E1P	1E2P	2E1P	1E1P	1E2P	2E1P
C	CSII	CSII	CSII	PACT	PACT	PACT
	H2	H2	H2	G9	G9	G9
	1E1P	1E2P	2E1P	1E1P	1E2P	2E1P
D	PACT	PACT	PACT			
	G11	G11	G11			
	1E1P	1E2P	2E1P			

Fonte: Elaborada pelo autor.

De todos os pontos otimizados, nenhum apresentou material cristalino após 24 horas, alguns apresentaram precipitado/desnaturado, o que não é interessante para o estudo. Assim resolveu-se repetir as mesmas condições de otimização utilizando uma concentração de enzima mais baixa, 10mg/mL.

Após 5 dias, todas as placas de *screens* e otimização, foram observadas novamente e pôde-se notar a formação de material cristalino em condições antes não observadas, assim a

condição do PACT - 0,2M cloreto de sódio, 0,1M Tris-HCl pH 8 e 20% (p/v) PEG 6000, que apresentou cristais bem definidos, foi selecionada para prosseguir com os experimentos. Prosseguiu-se com a otimização, 1E1P, 1E2P e 2E1P, utilizando uma menor concentração de enzima, pois quanto maior a concentração de proteína, a tendência para a formação de muitos cristais pequenos é maior, e ao diminuir a concentração de proteína, aumenta a possibilidade de formação de menos núcleos, porém maiores (RUPP, 2009). E foi o que ocorreu ao utilizar uma menor concentração de enzima, a condição 1E1P apresentou um cristal maior, que foi tratado para ser enviado à estação do tipo sincrotron no ALBA (Figura 3.6). O preparo do cristal consistiu em crioprotégê-lo com uma solução que continha a condição de cristalização suplementada com 20% (v/v) de glicerol.

Figura 3.6 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 0,2M cloreto de sódio, 0,1M Tris-HCl pH 8 e 20% (p/v) PEG 6000, na proporção 1µ de enzima + 1µ de precipitante, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados dos cristais foram analisados na linha BL13_XALOC, a uma temperatura de 100K (-173,15). Apesar da otimização do cristal da L-arabinose isomerase DH10B, não foram conseguidos dados de difração de boa qualidade para poder resolver a estrutura desta enzima, a resolução alcançada foi de 7,8Å. No entanto, continuou-se investigando outras condições de cristalização.

As condições D7 e H7 do PACT, A3 do JCSG e H4 do INDEX foram selecionadas das placas anteriores e fez-se variação da concentração dos precipitantes, preparando-os

manualmente (*in house*), de acordo com variações mostradas na Tabela 3.1. E para cada condição fez-se também a variação de concentração enzima:precipitante, 1E1P, 1E2P e 2E1P.

Tabela 3.1 – Variações das concentrações dos componentes dos precipitantes que apresentaram cristais em cada *screen*. Para cada condição variou-se a relação enzima:precipitante 1E1P, 1E2P e 2E1P (1E1P: 1 μ de enzima + 1 μ de precipitante; 1E2P: 1 μ de enzima + 2 μ de precipitante; 2E1P: 2 μ de enzima + 1 μ de precipitante).

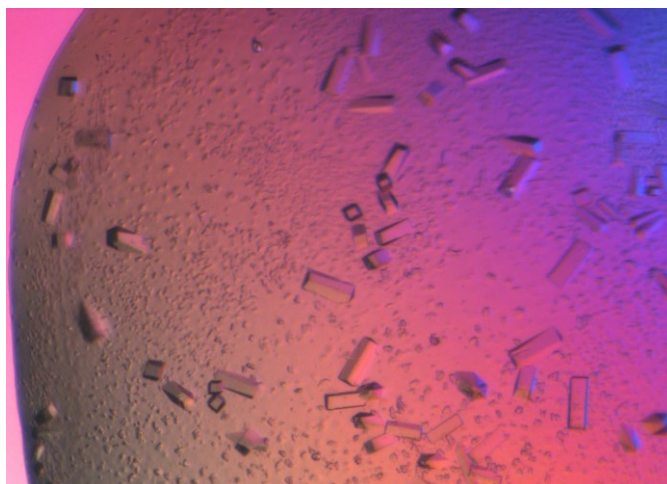
CONDIÇÕES	COMPOSIÇÃO DAS CONDIÇÕES	VARIAÇÕES
PACT D7	20% (p/v) PEG6000	15%; 17,5% e 20%
	0,2M NaCl	0,1; 0,15; 0,2 e 0,25
	0,1M Tris-HCl, pH 8	Permaneceu constante
PACT H7	20% (p/v) PEG3350	15%; 17,5% e 20%
	0,2M NaAc	0,1; 0,15; 0,2 e 0,25
	0,1M Bis-Tris propano, pH 8,5	Permaneceu constante
JCSG A3	20% (p/v) PEG3350	15%; 17,5% e 20%
	0,2M di-amônio citrato, pH 5,0	0,1 e 0,2
INDEX H4	20% (p/v) PEG3350	15%; 17,5% e 20%
	0,2M tri-amônio citrato, pH 7,0	0,1 e 0,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 72 horas todas as 108 condições foram visualizadas e apenas a condição 15% PEG6K, 0,25M NaCl, 0,1M Tris-HCl, relação 1E1P e 1E2P apresentaram cristais, e com esta condição prosseguiu-se com *screen* de pH (variou-se o pH de 4,5 a 8,5; Δ pH = 0,5) e de aditivos (kit comercial Additive Screen – Hampton Research).

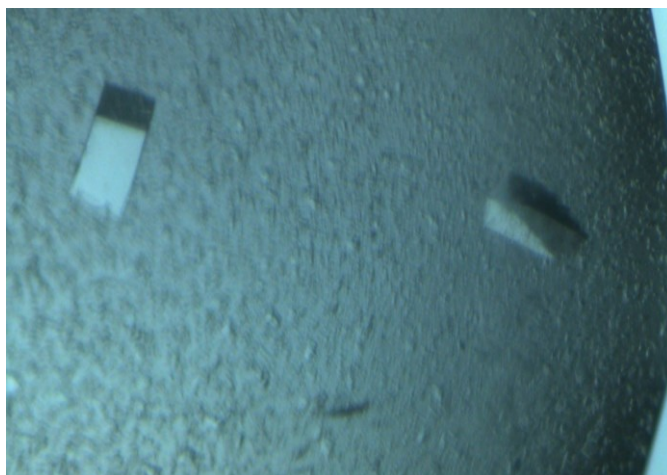
Como resultado do *screen* de aditivos a condição 0,1M espermina apresentou cristais (Figura 3.7) e a condição 50% PEG 6K, 5M NaCl, 1M Tris-HCl pH 8,0, na proporção 1E2P do pH também apresentou bons cristais (Figura 3.8).

Figura 3.7 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 0,1M espermina, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3.8 – Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (10mg/mL) crescido a 18°C em 50% PEG 6K, 5M NaCl, 1M Tris-HCl pH 8,0, na proporção 1µL de enzima + 2µL de precipitante, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.



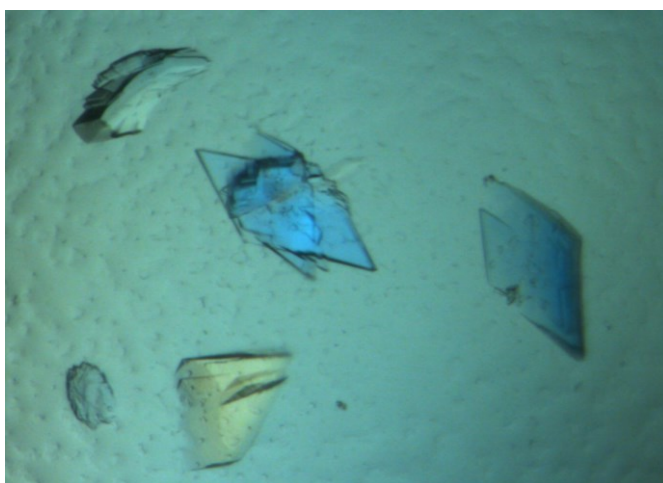
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tendo em vista o comportamento das gotas obtidas, concomitante a esses ensaios foram realizados novamente as 384 condições iniciais (JCSG Suite, Crystal Screen I e II, PACT Suite e INDEX HT), no entanto a enzima foi preparada a uma concentração de 10mg/mL e adicionou-se o co-fator Mn^{2+} a uma concentração de 0,5mM, a adição do íon

metálico pode tornar a proteína mais compacta e estável aumentando assim, a probabilidade de que cristalize (RUSSO KRAUSS *et al.*, 2013), relatos na literatura mostram a resolução de diferentes estruturas de L-arabinose isomerase com a adição do Mn^{2+} , ZHU *et al.* (2007), CHOI *et al.* (2016), XU, *et al.* (2015).

A adição do íon metálico Mn^{2+} resultou em condições com cristais não observados na sua ausência. A condição do INDEX, 17% (m/v) polietileno glicol 1000, 0,1M acetato de amônio, 0,1M bis-tris pH 5,5, apresentou placas de cristal que polarizavam bastante (Figura 3.9), na mesma condição sem Mn^{2+} não houve formação de cristais. A polarização do cristal é a primeira característica a ser observada para se determinar a qualidade do mesmo.

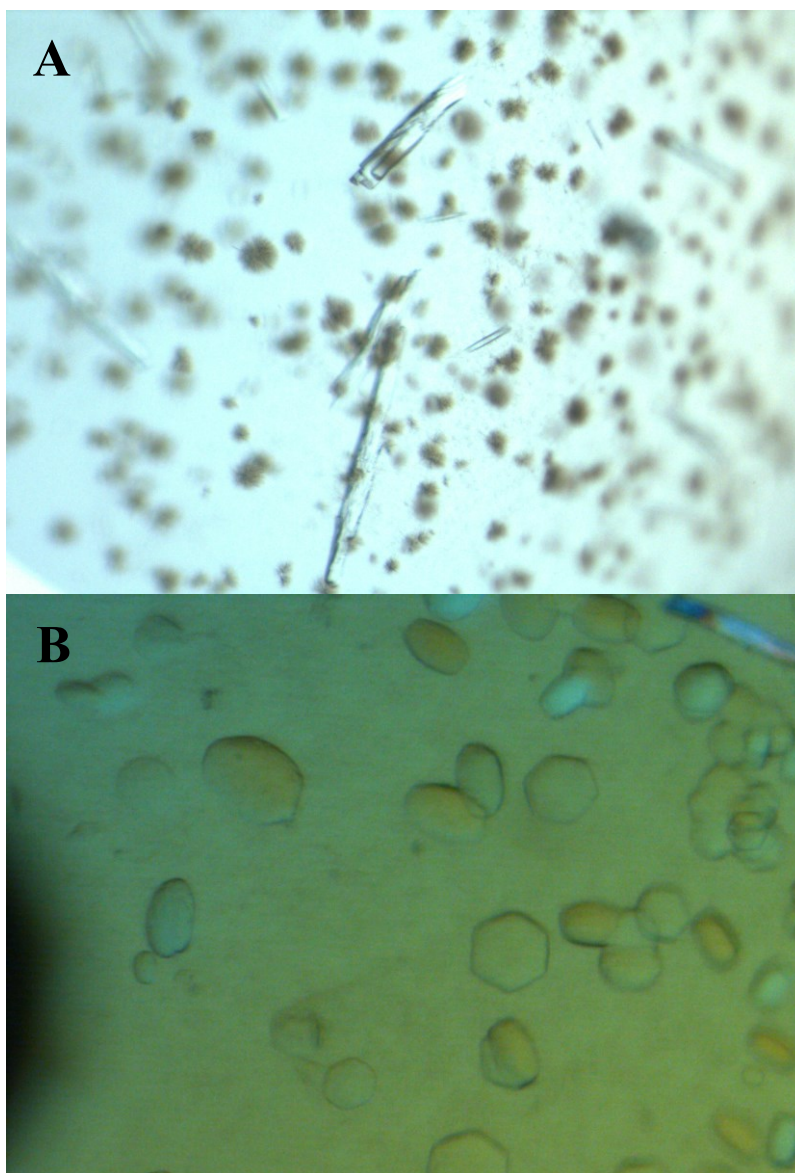
Figura 3.9 – Fotografia de cristais, sob luz polarizada, da proteína LAI-DH10B (10mg/mL, suplementada com 0,5mM de Mn^{2+}) crescido a 18°C em 17% (m/v) polietileno glicol 1000; 0,1M acetato de amônio; 0,1M bis-tris pH 5,5, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra condição que apresentou cristais diferentes da apresentada nos *screens* sem Mn^{2+} foi do kit PACT, 0,1M MMT pH 5,0; 25% (m/v) polietileno glicol 1500, onde na condição sem o íon metálico formaram-se cristais longos e finos, altamente instáveis e sensíveis até mesmo à coleta, e com a adição do íon os cristais formados apresentavam forma hexamérica e polarizavam (Figura 3.10).

Figura 3.10 – (A) Fotografia de cristais da proteína LAI-DH10B (14mg/mL) crescido a 18°C em 0,1M MMT pH 5,0; 25% (m/v) polietileno glicol 1500, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada. (B) Fotografia de cristais, sob luz polarizada, da proteína LAI-DH10B (10mg/mL, suplementada com 0,5mM de Mn^{2+}) crescido a 18°C em 0,1M MMT pH 5,0; 25% (m/v) polietileno glicol 1500, mediante o método de difusão de vapor em gota sentada.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cristais apresentados nas Figuras 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10(B) foram coletados, crioprotetidos com solução contendo a condição de cristalização suplementada com 20%

(v/v) de glicerol e enviados ao ALBA Sincrotron para serem analisados. Dois deles apresentaram difração a 6,5Å, resolução ainda não capaz de resolver a estrutura da enzima.

Diversos outros experimentos foram realizados com a enzima na tentativa de obter cristais que difratassem a menos de 3Å. Foi utilizado outro tampão para a solução enzimática, a cromatografia de exclusão molecular correu com tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,6. Diferentes substâncias crioprotetoras foram usadas, 15% (v/v) glicerol, 15% (m/v) PEG 400, 20% (m/v) PEG 400, 15% (v/v) etilenoglicol e 20% (v/v) etilenoglicol, no entanto alguns cristais que entraram em contato com 15% (v/v) glicerol, 15% (v/v) etilenoglicol e 20% (v/v) etilenoglicol se romperam. Outra estratégia utilizada foi submeter o cristal a uma concentração crescente de crioprotetor, na tentativa de diminuir a pressão osmótica sobre o mesmo. Ao final, foram dispensadas 749 gotas, entre *screening*, variação de concentração dos componentes da solução precipitante, variação da relação de concentração enzima:precipitante, preparo de soluções *in house*, enzima na presença e ausência de Mn^{2+} . De todas estas condições, 17 cristais foram enviados à estação do tipo sincrotron no ALBA e no ESRF para análise, no entanto, não difrataram, foram tomadas atitudes na tentativa de obter resultados de difração ao lavá-los com nitrogênio líquido, pois poderiam ter aparecido cristais de gelo no cristal, mas sem sucesso.

Diferentes possibilidades foram levantadas na tentativa de explicar a não difração dos cristais obtidos, assim como melhorar as condições de cristalização para aumentar a qualidade dos cristais obtidos. Como sugestões de mudanças surgiram as de melhoramento genético, e a inserção de um sítio de reconhecimento da endoprotease TEV para a clivagem da His-tag foi a mais plausível.

3.2.3 Modelagem estrutural da LAI-DH10B

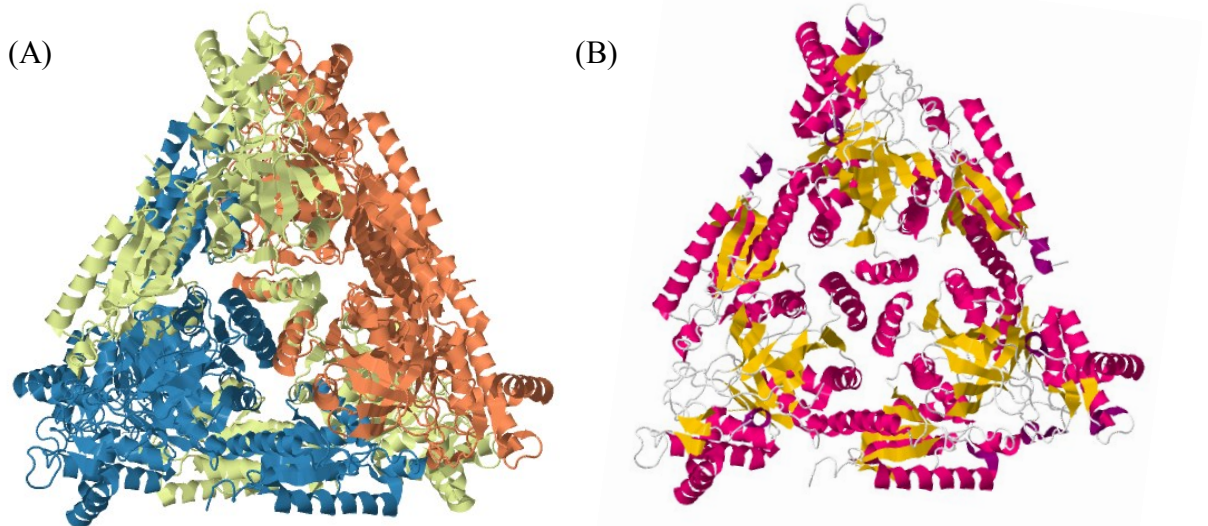
Quando não é possível obter experimentalmente a estrutura tridimensional de uma proteína, dispomos de aproximações bioinformáticas que permitem predizer com maior ou menor confiança sua estrutura. Em termos gerais a estratégia se baseia na análise das relações entre as estruturas e sequências de proteínas homólogas com a sequência da proteína em estudo. A modelagem por homologia funciona quando a porcentagem de identidade de

sequência é relativamente alto, quando compartilham de aproximadamente 50% da sequência. (ÁVALOS, 2014 e BORDOLI *et al.*, 2009).

Estudando a estrutura de L-AI originadas dos mais diferentes microrganismos, a enzima que mais se aproximou da LAI-DH10B, quanto à identidade de sequência de aminoácidos e estrutura com 48,5%, foi a ECAI (L-arabinose isomerase de *Escherichia coli*), registrada no *Protein Data Bank* sob o código de identificação 2AJT. O alinhamento de sequência é mostrado na Figura 3.11.

mediante utilização da ferramenta de modelagem Swiss-Model e obteve-se a estrutura mostrada na Figura 3.13.

Figura 3.12 – (A) Estrutura biológica da ECAI, arquitetura hexamérica (dímero de trímeros), em cada trímero os monômeros estão representados por cores diferentes. (B) Unidade assimétrica da ECAI, composta de três monômeros.



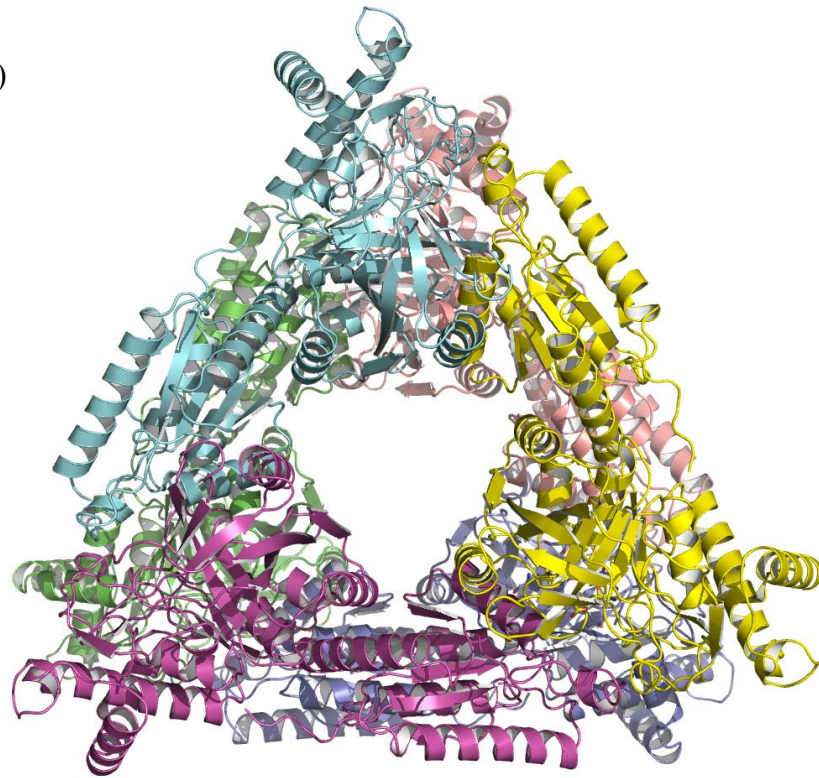
Fonte: *Protein Data Bank*.

Ao comparar a estrutura das duas enzimas observa-se uma conservação da unidade oligomérica, ambas apresentam uma estrutura de arquitetura hexamérica (dímero de trímeros). A unidade assimétrica da LAI-DH10B também apresenta três subunidades que exibem estruturas gerais essencialmente idênticas e que estão relacionadas por simetria, assumindo a forma de triângulo equilátero.

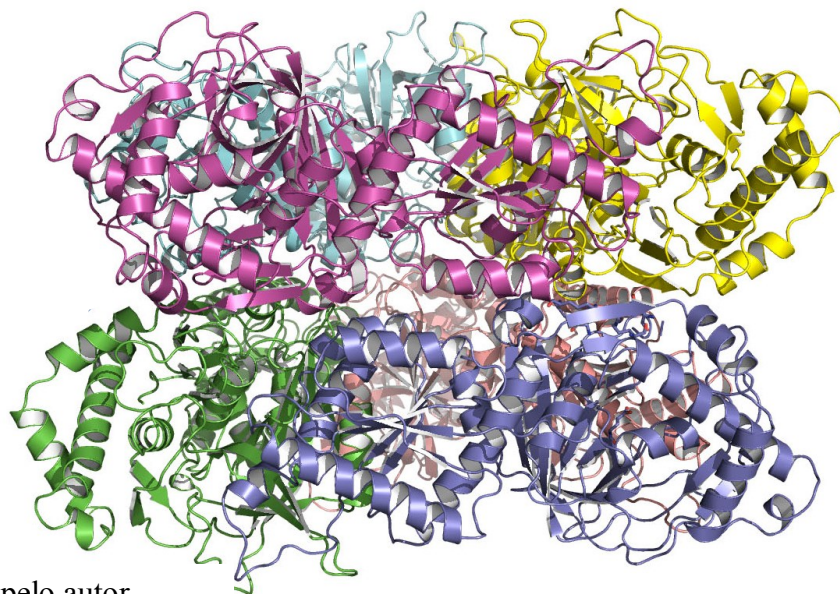
De acordo com estudo desenvolvido por MANJASETTY e CHANCE (2006), a superfície externa do trímero revela resíduos nas fendas entre as interfaces das subunidades adjacentes coincidindo com as três interfaces, localizados nas regiões de *loops* possibilitando ajustes estruturais que modulam a geometria da entrada do substrato no sítio ativo. E esses resíduos implicados na catálise se conservam na LAI-DH10B, como se observa na Figura 3.11, domínio C-terminal (H449, M351 e Y335), domínio central (F279 e M185) e domínio N-terminal da subunidade vizinha (H128, Q125, Y19, L18 e Q16).

Figura 3.13 – (A) Vista frontal do modelo de estrutura hexamérica da LAI-DH10B, modelado no programa Swiss-Model, desenhado no programa PyMol a partir de alinhamento de sequência de aminoácidos com a ECAI realizado no LALIGN. (B) Vista lateral do modelo de estrutura hexamérica da LAI-DH10B, modelado no programa Swiss-Model, desenhado no programa PyMol a partir de alinhamento de sequência de aminoácidos com a ECAI realizado no LALIGN.

(A)



(B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Outros resíduos de importância relevante que se encontram preservados são os resíduos de união do metal Mn^{2+} (H350, H450 e E333), a presença do metal torna o sítio catalítico mais estável e media a transferência de prótons envolvida na ação catalítica, convertendo a aldose D-galactose na cetose D-tagatose (ZHU *et al.*, 2007).

Apesar de a maioria dos resíduos das subunidades serem conservados, o que diferencia a LAI-DH10B da ECAI é a ausência da α -hélice (α -17) em sua extremidade C-terminal, o que configura esse espaço vazio no interior das subunidades assimétricas (Figura 3.13A). No entanto, a ausência desses resíduos, possivelmente, não interfere na estrutura e na catálise da enzima, já que, como demonstrado anteriormente, os resíduos de união do metal (Mn^{2+}), os resíduos implicados na catálise e os resíduos de união das interfaces (D183 e K195) permanecem conservados, resultados obtidos a partir de análise da ECAI no programa PyMol.

4 EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA L-ARABINOSE ISOMERASE RECOMBINANTE (LSLt-LAI)

Atualmente, dedica-se grande esforço no desenvolvimento de protocolos eficazes de produção, purificação e imobilização de proteínas recombinantes, tanto em uma escala de laboratório, como na busca mediante processos de alto rendimento.

Enquanto a grande quantidade de informação genética contribui, a heterogeneidade e o complexo comportamento das proteínas em solução, por outro lado, impossibilita o estabelecimento de protocolos genéricos de produção e purificação. No entanto, ultrapassar essa barreira é possível com o uso de etiquetas de fusão, mas qualquer estratégia baseada no seu uso deve proporcionar a possibilidade de eliminá-la da construção de modo eficaz (WAUGH, 2005).

Já as estratégias de imobilização e sua adequada utilização são mais facilmente delineadas quando se tem o conhecimento das características bioquímicas da enzima. Assim, a enzima em estudo, LSLt-LAI em sua forma livre e imobilizada, foi caracterizada quanto à atividade ideal de catálise e sua estabilidade em diferentes condições de pH, temperatura e concentração do íon metálico divalente manganês. O estudo de sua especificidade por diferentes substratos sintéticos e a determinação dos parâmetros cinéticos sobre o substrato D-galactose também foram realizados.

À continuação serão detalhados todos os procedimentos experimentais, com a descrição das diferentes técnicas utilizadas no desenvolvimento deste capítulo, assim como os resultados obtidos durante o processo de obtenção, purificação, imobilização e caracterização da L-AI recombinante.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Obtenção da LSLt-LAI a partir do plasmídeo da LAI-DH10B

Utilizou-se a cepa LAI-DH10B (SOUSA *et al.*, 2017) para a retirada do plasmídeo utilizando o FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan). A partir do plasmídeo obtido, os fragmentos gênicos foram amplificados mediante PCR com a polimerase PrimeSTAR HS DNA (Takara, Japão), utilizando os pares de oligonucleotídeos 1/2 e 3/4 (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Sequências dos nucleotídeos utilizados para a construção do vetor de expressão da L-arabinose isomerase.

Número	Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')
1	TEVisom5	CATCATCACCATGGTGAAAACCTGTATTTCCA GGGCATGCTGAACATTGG (50)
2	TEVisom3	CCAATGTTTCAGCATGCCCTGGAAATACAGGTT TTCACCATGGTGATGATG (50)
3	isompKLSL5	CTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCTGAAC ATTGGCGAAAAAGAG (47)
4	isompKLSL3	TCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTACTCGAGAC GAATCACAACAG (44)

Fonte: Eurofins Genomics.

Após a amplificação adicionou-se a endonuclease de restrição – DpnI – enzima que degrada seletivamente o DNA metilado, conseguindo assim, eliminar o plasmídeo molde e deixar presente no meio somente as moléculas de plasmídeos com as mutações introduzidas resultantes da amplificação *in vitro*.

Prosseguiu-se com a transformação em *E. coli* DH10B através de choque térmico a 37°C (10µL do resultado da PCR + 200µL de células quimiocompetentes DH10B (Novagen,

Alemanha) → gelo por 15 min → 37°C por 3 min → gelo por 5 min → 1 mL de meio LB → 37°C durante 1 hora → foram plaquedados 200µL da solução em LB_{Amp} e o restante, centrifugado a 13000rpm por 1 min → o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensionado e plaqueado em LB_{Amp}). Depois realizou-se extração rápida de DNA para checagem por PCR em agarose 0,7% de acordo com metodologia descrita por RUIZ-BARBA *et al.* (2005).

4.1.2 Obtenção da LSLt-LAI a partir de plasmídeo sintético

O gene que codifica a enzima LSLt-LAI e sua clonagem no vetor de expressão pET28a (+) foi realizada pela Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, EUA), obtendo-se como resultado, o correspondente plasmídeo pET28a-LSLt-LAI, que contém um gene de resistência à kanamicina.

O plasmídeo sintetizado foi utilizado para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH10B (Novagen, Alemanha), assim como BL21(DE3) (Novagen, Alemanha). Enquanto a DH10B foi utilizada para produzir quantidades adicionais de plasmídeos, a BL21 foi empregada para sobre expressar o gene e produzir proteína, uma vez que contém a polimerase T7.

As células transformadas mediante choque térmico a 37°C foram repicadas em placa ágar-LB (Sambrook *et al.*, 1989) com kanamicina (100µg/mL) – LB_{Kana}. Depois da incubação a 37°C overnight, colônias isoladas com o plasmídeo de interesse foram obtidas.

Para a expressão da proteína LSLt-LAI utilizando células de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas, foram preparados 10 mL do meio de cultivo LB_{Kana} para o pré-inóculo, este foi incubado a 37°C overnight, a 180rpm. Uma vez crescido, o pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 1L contendo 500mL de meio LB_{Kana} e deixado a 37°C, 180rpm, até que a densidade ótica do meio alcançasse valores em torno de 0,5-1,0. Depois da fase exponencial de crescimento ser atingida induziu-se a expressão da proteína recombinante adicionando IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida – concentração final 0,3mM) e deixando o meio de cultivo durante 20 horas a 16°C, 200rpm.

Finalmente, o cultivo celular foi centrifugado a 6.000rpm, durante 20 minutos a 4°C. O pellet obtido é armazenado em freezer a -20°C a espera de ser processado.

4.1.3 Purificação da LSLt-LAI

Para a purificação da LSLt-LAI, ressuspendeu-se o precipitado celular em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0 + 100mM de NaCl, foi padronizada a utilização de 20mL de tampão de ruptura para cada 1 litro de meio de cultivo. Ao homogeneizado prosseguiu-se com a sonicação (40% de amplitude, pulsação de 10s durante 5 minutos), seguida pela centrifugação do lisado a 15000rpm, durante 20 minutos a 4°C, a fim de separar as frações solúveis e insolúveis do extrato celular, a fração solúvel foi filtrada em filtro de celulose com 0,45µm de diâmetro de poro, deixando a amostra do extrato celular preparada para a purificação.

Para o processo de adsorção utilizou-se 10 mL de solução enzimática incubados com 1g de agarose 6BCL a temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação constante (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2012). Como controle usou-se a mesma solução enzimática sem a presença do suporte, a fim de se avaliar a provável desativação da enzima nas condições de purificação.

Para dessorver a enzima de interesse, LSLt-LAI, iniciou-se com uma pré-lavagem do suporte com uma solução de lactose 200mM a fim de se eliminar e/ou reduzir proteínas inespecíficas. A dessorção da LSLt-LAI prosseguiu com uma solução de lactose 200mM por 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação constante. O extrato purificado obtido foi concentrado (Amicon Ultra-15 50K) e armazenado a -20°C.

A dessorção foi avaliada através da medida padrão da atividade enzimática (HUNG *et al.*, 2014) e da concentração de proteína (BRADFORD, 1976). E a pureza da enzima foi avaliada mediante SDS-PAGE.

4.1.4 Ensaio de atividade enzimática

Para a determinação da atividade da LSLt-LAI, preparou-se uma solução 0,4mL de galactose 625mM em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5 suplementado com 0,5mM de MnCl₂ + 0,1mL de solução enzimática (reação enzimática) e incubou-se a 50°C durante 60 minutos. Já a reação colorimétrica, que determina a quantidade de D-tagatose sintetizada, foi realizada a partir do método ácido sulfúrico cisteína-carbazol (HUNG *et al.*, 2014), onde

reagiu-se 250µL de amostra da reação enzimática, 50µL de cisteína em tampão 1,5% (m/v), 1,5mL de ácido sulfúrico 70% e 50µL de carbazol em álcool absoluto 0,12% (m/v). A leitura se deu em espectrofotômetro a 560nm.

Para o cálculo da concentração de atividade enzimática usou-se a fórmula matemática apresentada na Equação 1.

$$AE(U/mL) = \frac{[TAG](mM) * Vr(\mu L)}{Ve(\mu L) * t(min)} \quad (1)$$

Onde:

- [TAG] é a concentração de tagatose sintetizada (valor encontrado a partir de uma curva padrão);

- V_r é o volume da reação;

- V_e é o volume de enzima utilizado;

- t é o tempo de reação.

A atividade enzimática da enzima LSLt-LAI (1U) é determinada pela quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de D-tagatose por minuto.

4.1.5 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas presente no extrato enzimático foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

4.1.6 Determinação da massa molar por SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada com a finalidade de estimar a massa molecular da enzima produzida, LSLt-LAI. Foi utilizado um sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) associado a uma fonte de alimentação. Na corrida utilizou-se uma voltagem de 200V durante 40-50 minutos. Todas as amostras foram preparadas em tampão de ruptura em condições redutoras (5% (v/v) β-mercaptoetanol), incubando-se a amostra durante

5 min a 80°C antes de ser aplicada. A estimativa da massa molecular da enzima foi realizada a partir do padrão de massa molecular Low Range (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad). As bandas de proteína foram visualizadas a partir da coloração azul brilhante de Coomassie 0,25% (p/v) em metanol:ácido acético:água (45:5:50 (v:v:v)) (LAEEMLI, 1970).

4.1.7 Imobilização da LSLt-LAI em Ag-6BCL

Incubou-se 10mL de uma solução de LSLt-LAI com 1g de agarose 6BCL (Ag-6BCL) a 30°C, a atividade oferecida foi de 26U/g_{suporte}. Amostras do sobrenadante e da suspensão foram retiradas em intervalos de tempo diferentes e a atividade da enzima e a concentração de proteínas foram determinadas de acordo com HUNG *et al.*, (2014) e BRADFORD (1976), respectivamente.

4.1.7.1 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram analisados a partir de alíquotas do sobrenadante durante o processo e ao final da imobilização, para determinação da atividade catalítica da enzima.

O rendimento de imobilização (R_I) foi calculado de acordo com a Equação 2. Sua determinação depende da atividade enzimática do sobrenadante no início da imobilização (At_0) e atividade do sobrenadante no final da imobilização (At_f).

$$R_I (\%) = \frac{At_0 (U/mL) - At_f (U/mL)}{At_0 (U/mL)} * 100 \quad (2)$$

A atividade teórica (At_t) foi determinada de acordo com o rendimento de imobilização (R_I) e a atividade do sobrenadante no início da imobilização (At_0), como demonstrado na Equação 2.

$$At_t (U/mL) = \frac{R_I (\%)}{100} * At_0 (U/mL) \quad (3)$$

Sendo que o valor da atividade oferecida no início da imobilização (At_{of}), depende da atividade do sobrenadante no início da imobilização (At_0), do volume de imobilização (V_{imob}) e da massa de suporte (m), como demonstrada na Equação 4.

$$At_{of} (U/g) = At_0 (U/mL) * \frac{V_{imob} (mL)}{m (g)} \quad (4)$$

Por fim, calculou-se a atividade recuperada (A_R) a partir da razão entre a atividade no derivado (At_d) e a atividade teórica (At_t), como mostra a Equação 5.

$$At_R (\%) = \frac{At_d (U/g)}{At_t (U/g)} * 100 \quad (5)$$

4.1.8 Caracterização da LSLt-LAI solúvel e imobilizada

4.1.8.1 Caracterização físico-química da LSLt-LAI

Para determinar o efeito da temperatura na atividade enzimática, os experimentos foram realizados com a enzima recombinante purificada solúvel. Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas no intervalo de 40-70°C. A reação (a pH 5,5) contendo 500mM de D-galactose como substrato e a enzima solúvel foram incubados durante 60 minutos, na presença de 0,5mM de Mn^{2+} e a atividade foi determinada em condições de ensaio colorimétrico padrão.

O efeito do pH na atividade da LSLt-LAI solúvel foi medido a valores de pH que variaram na faixa de 5,0-10,0 a 50°C durante 60 minutos – condições de ensaio padrão. Utilizou-se tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,0-5,5), tampão fosfato de sódio 50mM (pH

6,0-7,5), tampão tris-HCl (pH 8,0-9,0) e tampão bicarbonato de sódio 50mM (pH 10,0), todos suplementados com 0,5mM de Mn^{2+} .

O efeito da concentração do cofator Mn^{2+} foi estudado concomitante ao efeito de três pH diferentes (5,5,- básico; 7,0 – neutro e 10 – alcalino) para a enzima solúvel. A reação contendo 500mM de D-galactose como substrato e a enzima purificada foram incubados durante 60 minutos a 50°C, na presença de Mn^{2+} a concentrações que variaram de 0,1 a 2mM, seguida da determinação de atividade em condições de ensaio colorimétrico padrão.

4.1.8.2 Especificidade pelo substrato da LSLt-LAI

Para investigar a especificidade do substrato da LSLt-LAI solúvel, a atividade foi determinada sob condições de ensaio padrão usando diferentes aldoses (D-galactose, L-arabinose, D-glicose, D-mannose, D-ribose e D-xilose) a uma concentração de 1M.

4.1.8.3 Análise cinética da LSLt-LAI

A análise cinética da enzima solúvel e da imobilizada foi determinada a pH 5,5, 50°C por 60 minutos, em tampão acetato de sódio 50mM, na presença de 0,5mM de Mn^{2+} , contendo D-galactose como substrato a diferentes concentrações (0,00625; 0,0125 ; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,25; e 1,5M). A constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}), tiveram seus valores determinados pelo programa ORIGIN.

4.1.8.4 Análise de isomerização da D-galactose em D-tagatose pela LSLt-LAI

Para o estudo da bioconversão, os experimentos com a enzima solúvel e a enzima imobilizada foram realizados em reator batelada, a temperatura ambiente por 96 horas. Ao

reator adicionou-se uma solução que continha tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,5), D-galactose 0,4M, cloreto de manganês 0,5mM e LSLt-LAI (1,02U/mL).

4.2 Resultados e Discussões

4.2.1 Construção da LSLt-LAI

A construção da LSLt-LAI foi pensada devido ao fato de ser um novo método geral de expressão e purificação de proteínas de fusão contendo um domínio peptídico, lectina β -trebol como etiqueta de afinidade e solubilidade. Esta etiqueta permite produzir a proteína com alto rendimento e purificá-la mediante um protocolo eficaz, simples e de baixo custo, baseado na capacidade do peptídeo se unir a açúcares derivados de agarose e, que exige como única etapa a cromatografia de afinidade que emprega agarose como suporte e lactose como eluente.

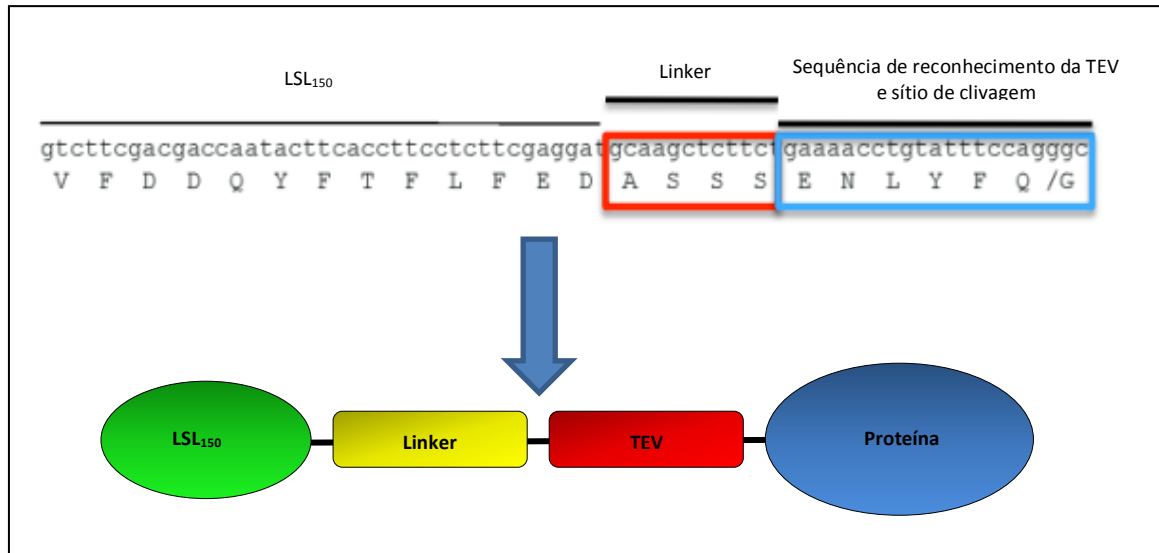
O clone construído a partir do plasmídeo extraído da LAI-DH10B não foi obtido com sucesso, ao solicitar sequenciamento da cepa clonada constatou-se que o *linker* não havia sido incorporado, e essa região é de suma importância na estrutura da enzima clonada, uma vez que sua presença garante mobilidade à enzima, pois age como um braço espaçador. A natureza e o comprimento do braço espaçador têm grande relevância no comportamento da enzima durante as etapas de purificação e imobilização (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Na purificação de proteínas através de cromatografia de afinidade, o braço espaçador ideal deve ser bastante longo, para evitar qualquer impedimento estérico durante o acesso do substrato ao sítio ativo (MURZA *et al.*, 2000).

Entretanto, o vetor solicitado à Invitrogen, conforme o desenhado na Figura 4.1, foi obtido com êxito, pois pET28a-LSLt-LAI apresenta todas as especificações exigidas para sua síntese (Figura 4.2):

- Gene de resistência à kanamicina;
- Promotor de indução através do IPTG;
- A etiqueta de fusão LSLt (LSL₁₅₀ + *linker* + sitio de reconhecimento da TEV);

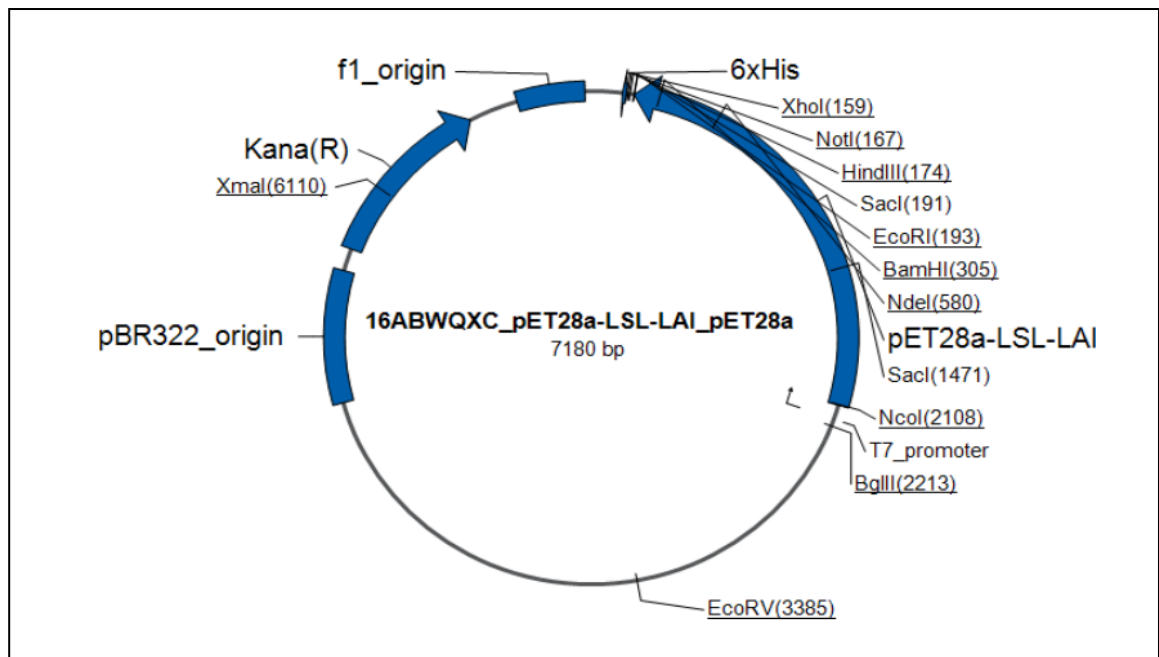
- Sequência 6x-His-tag.

Figura 4.1 – Conformação desejada do plasmídeo sintético. Com a presença da etiqueta de fusão, LSLt, (LSL₁₅₀ + *linker* (braço espaçador) + sequência de reconhecimento da endoprotease TEV (e sítio de clivagem)).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.2 – Mapa do vetor pET28a-LSLt-LAI.



Fonte: Invitrogen – Thermo Fisher Scientific.

A etiqueta de fusão LSLt foi inserida, pois sua presença possibilita a imobilização orientada da proteína de fusão com o ligante, entre o C-terminal da etiqueta e o N-terminal da enzima, agindo como um braço espaçador entre a superfície de apoio e o domínio catalítico, preservando a atividade do C-terminal enzimático dentro do compósito imobilizado. Além disso, esta metodologia permite potencializar o processo de purificação/imobilização devido sua alta interação seletiva entre a etiqueta e o suporte, processo este que não necessita de suportes funcionalizados, já que o domínio LSLt liga-se a matrizes de agarose não ativadas de forma específica e reversível, tornando o processo barato.

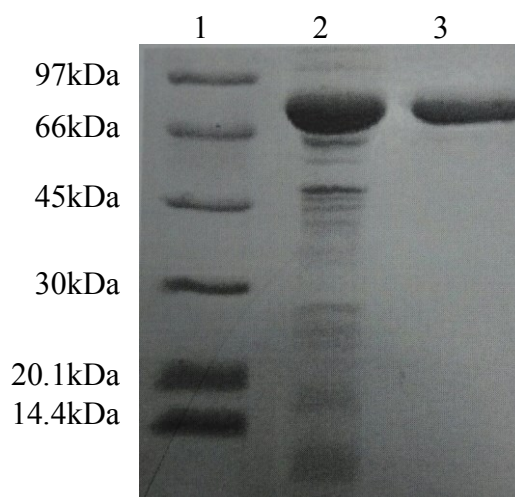
No entanto, a presença da etiqueta de fusão após o processo de purificação deve ser opcional, ou seja, sua eliminação deve ser possibilitada de modo eficaz, e isso é possível com a inserção da sequência que codifica um segmento flexível, conhecido como sequência *linker* (aminoácidos ASSS) e um sítio de reconhecimento pela endoprotease *Tobacco Etch Virus* (TEV), cuja sequência de reconhecimento em aminoácidos é ENLYFQG. Assim, uma vez produzida a proteína de fusão, a lectina LSLt pode ser eliminada mediante uma digestão controlada com a protease TEV (ANGULO *et al.*, 2011).

A retirada da etiqueta de fusão LSLt faz com que sistema 6x-His-tag, um dos exemplos mais representativos para a imobilização por afinidade, fique exposto possibilitando que a enzima ainda possa ser imobilizada através de quelatos de metal (SOUZA, 2015).

4.2.2 Expressão e purificação da LSLt-LAI

O plasmídeo pET28a-LSLt-LAI foi transformado com sucesso em *Escherichia coli* BL21, a análise de SDS-PAGE mostrada na Figura 4.3 apresenta este resultado. No poço 2 observa-se a expressão da LSLt-LAI no meio fermentativo, que aconteceu de maneira bastante expressiva, já no poço 3 é apresentado o perfil eletroforético da L-arabinose isomerase recombinante purificada em uma única etapa. O peso molecular da LSLt-LAI purificada foi medido em aproximadamente 70kDa, confirmando a presença da etiqueta de fusão LSLt que pesa 14kDa (ÁVALOS, 2014).

Figura 4.3 – SDS-PAGE (12% poliacrilamida) da expressão e purificação da enzima LSLt-LAI. 1 – Marcador padrão de peso molecular; 2 – Fração solúvel do extrato livre de células (10,48mg/mL); 3 – Fração purificada da LSLt-LAI eluída da cromatografia de afinidade com 200mM de lactose (3,41mg/mL).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a purificação da L-arabinose isomerase recombinante foi adotada uma única estratégia, a cromatografia de afinidade a partir do extrato livre de células. Conforme mostrado na Tabela 4.2, o protocolo de adsorção em agarose 6BCL e dessorção com lactose permitiu a recuperação de 77,18% da atividade da enzima. Com este resultado observa-se a vantagem ao utilizar técnicas de melhoramento genético, neste caso, clonagem em *Escherichia coli* e inserção de etiquetas de fusão, já que a enzima nativa L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 apresentou apenas 56% de recuperação de atividade (TORRES *et al.*, 2014), resultado este, obtido após duas etapas de purificação, saturação com sulfato de amônio a 85% seguido de cromatografia de afinidade. Em estudo realizado por Sousa, 2015, para a enzima recombinante L- AI DH10B também foram obtidos valores de recuperação de atividade menores, 31,9% quando imobilizado em Ag-IDA-Ni e 38% quando imobilizado em Ag-IDA-Cu, no entanto, para a proteína expressa em *E. coli* BL21 os valores de recuperação obtidos foram superiores ao obtidos no presente trabalho, 95,9% para o imobilizado em Ag-IDA-Ni e 79,8% para o imobilizado em Ag-IDA-Cu, porém, como se pode observar, para a purificação das duas cepas foram utilizados suporte

funcionalizados, quelatos de níquel e cobre, o que torna o processo oneroso e demorado, uma vez que a ativação do suporte dura em torno de 36h.

Tabela 4.2 – Purificação da LSLt-LAI a partir da dessorção da enzima com solução 200mM de lactose. A enzima encontrava-se em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0 + 100mM de NaCl, ligada ao suporte Ag-6BCL.

Frações	Atividade enzimática (U/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato livre de células	2,63 ± 0,01	74,30 ± 0,28	0,035	100	1
Cromatografia de afinidade	2,03 ± 0,05	22,47 ± 0,12	0,090	77,18	2,57

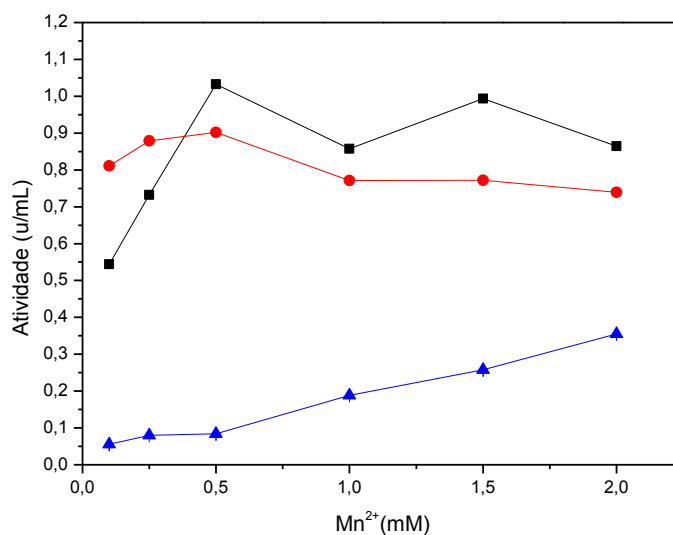
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Atividade da LSLt-LAI solúvel frente ao pH e cofator

A maioria das L-arabinose isomerase são ativadas na presença de íons metálicos e diversos estudos apontam o Mn^{2+} e o Co^{2+} como máximos ativadores (FAN *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2017; HUNG *et al.*, 2014). No entanto, relata-se que o cobalto é requerido como cofator por L-AI hipertermófilas e o manganês por L-AI termófilas e mesófilas para aumentar sua taxa de reação de isomerização assim, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de Mn^{2+} na atividade da LSLT-LAI, concomitante ao efeito do pH (KIM *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados na Figura 4.4 confirmam a exigência absoluta de íons metálicos para que a LSLT-LAI exerça seu papel catalítico, já que nenhuma atividade foi mensurável na ausência do íon metálico divalente (dado não mostrado).

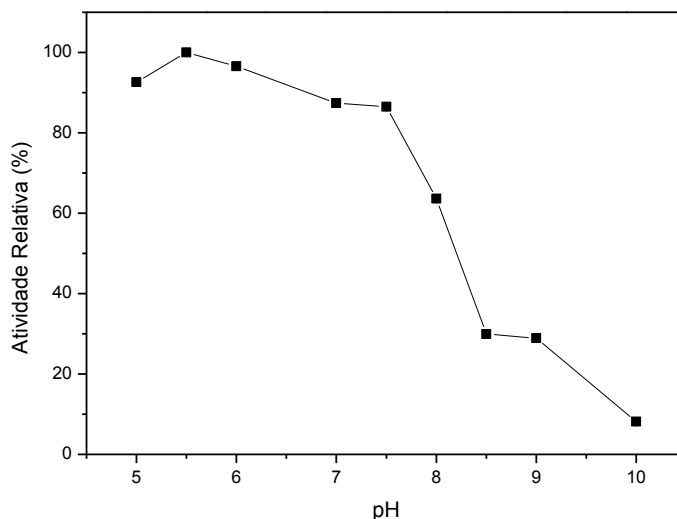
Figura 4.4 – Efeito do pH e da concentração do cofator na atividade da LSLt-LAI solúvel. (■) Tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5; (●) Tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0; (▲) Tampão bicarbonato de sódio 50mM, pH 10,0. O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL. Erros menores que 0,003.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 4.4 observa-se que em pH alcalino, o aumento da concentração de cofator favoreceu a atividade catalítica da LSLt-LAI, o que já não se observa em pH neutro, onde a atividade catalítica da enzima independe da concentração do metal. Já em pH ácido, a concentração de Mn²⁺ afeta significativamente o processo catalítico, onde em concentrações abaixo de 0,5mM sua atividade é bastante reduzida e, com o cofator a uma concentração de 0,5mM sua máxima atividade é alcançada, 1,03U/mL, o que leva a concluir também que o pH ideal para a reação de isomerização da LSLt-LAI é 5,5, índice de acidez que evita a formação de produtos indesejados e reduz as reações secundárias não específicas, como por exemplo reação de Maillard, possibilitando sua aplicação industrial (KIM, 2004; LEE *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005a). Resultado que foi confirmado em estudo mostrado na Figura 4.5, de relevante importância sobre o efeito do pH na atividade da enzima, já que mudanças no pH podem alterar sua estrutura devido uma repulsão de cargas e levar a dissociação de enzimas oligoméricas, que em solução podem apresentar-se em várias formatos: monômeros, dímeros, trímeros ou moléculas maiores, no caso do presente estudo, hexâmetros (SOUSA, *et al.*, 2017).

Figura 4.5 – Efeito do pH na atividade da LSLt-LAI solúvel. A enzima encontrava-se a uma concentração de 3,82mg/mL. Todos os tampões utilizados apresentavam força iônica de 50mM e foram suplementados com 0,5mM de Mn^{2+} . O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL. Erros menores que 0,05.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se que a LSLt-LAI apresentou queda em sua atividade catalítica quando submetida a pH superiores a 6,0, onde a enzima chegou a apresentar valores abaixo de 30% de atividade relativa (Figura 4.5). Essa queda na atividade enzimática da LSLt-LAI é explicada pelo fato de esta ser uma enzima multimérica, onde a força da interação subunidade-subunidade pode ser grandemente influenciada pelo pH, pois este é um dos principais parâmetros que pode transformar a dissociação da subunidade no primeiro passo da inativação de enzimas multiméricas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

Segundo dados da literatura, o pH ideal dos diferentes tipos de arabinose isomerases podem variar bastante, indo de valores ácidos a básicos e essa variação é determinada pelo organismo utilizado em sua produção, seja ele clonado em *E. coli* ou nativo (SOUSA, 2015). Por exemplo, as L-AIs produzidas a partir de *Bacillus* possuem uma faixa bastante estreita de pH ideal, 7,0 a 8,5 (LEE *et al.*, 2005a; RHIMI e BEJAR, 2006; PRABHU *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2001; KIM e OH, 2005; KIM *et al.*, 2010). Enquanto L-arabinose isomerases oriundas das bactérias do ácido lático, possuem pH ideal mais ácidos, variando de 5,0 a 7,5, sendo o candidato mais tolerante a ácido o *Lactobacillus sakei* 23 K que apresenta pH ideal entre 5,0-

7,0 (XU *et al.*, 2011; CHOUAYEKH *et al.*, 2007; RHIMI *et al.*, 2010). Em contraste, algumas L-arabinose isomerases atuam em condições altamente alcalinas, L-AI de *Anoxybacillus flavithermus* tem uma faixa de pH ideal de 9,5 a 10,5 (LI *et al.*, 2011).

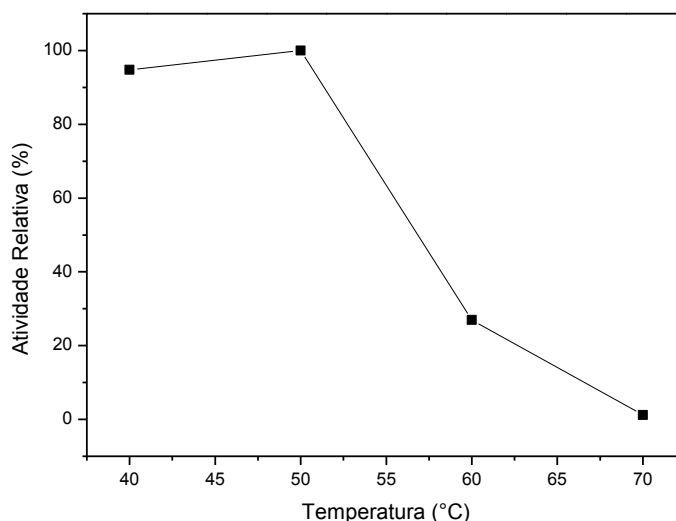
A tolerância ácida da LSLt-LAI constitui uma característica bioquímica atrativa e é super promissora do ponto de vista industrial, uma vez que a maioria das L-AI caracterizadas são intolerantes a ácidos e a indústria requer uma enzima com pH ideal mais baixo, em torno de 6-7, para a isomerização da galactose (OH *et al.*, 2006; RHIMI *et al.*, 2010). Seu pH ácido permite a bioconversão eficiente de D-galactose em D-tagatose durante a fermentação de produtos lácteos, por exemplo (RHIMI *et al.*, 2011a).

4.2.4 Atividade da LSLt-LAI solúvel frente à temperatura

O perfil de temperatura para a atividade da LSLt-LAI é apresentado na Figura 4.6.

A LSLt-LAI apresentou temperatura ideal para catálise enzimática a 50°C e teve sua atividade relativa bruscamente diminuída em temperaturas superiores. Um aumento de 10°C causou desnaturação proteica fazendo com que a enzima atingisse valores em torno de 26% de atividade relativa a 60°C.

Figura 4.6 – Efeito da temperatura na atividade da LSLt-LAI solúvel. A enzima encontrava-se a uma concentração de 3,82mg/mL, em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5, suplementado com 0,5mM de Mn^{2+} . O experimento ocorreu a temperatura ambiente e com volume reacional de 5mL.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a produção industrial de D-tagatose, indica-se que a reação ocorra em temperaturas que variam entre 60 e 65°C (KIM *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2001), no entanto L-AI já estudadas mostraram temperaturas ideais abaixo de 50°C, L-AI de *Lactobacillus sakei* (RHIMI *et al.*, 2010) e de *Lactobacillus gayonii* (NAKAMATU e YAMANAKA, 1969) apresentaram temperatura ideal no intervalo de 30–40°C, L-AI de *Mycobacterium smegmatis* a 45°C (IZUMORI *et al.*, 1978) e de *E. coli* a 30°C (YOON *et al.*, 2003). Já muitas outras L-AI produzidas a partir de microrganismos termófilos e hipertermófilos apresentaram temperatura ideal acima de 60°C, L-AI de *T. mathranii* (LEE *et al.*, 2005a) e de *A. acidocaldarius* (LI *et al.*, 2011) apresentaram temperatura ideal a 65°C, L-AI de *T. saccharolyticum* NTOU1 (JORGENSEN *et al.*, 2004), de *G. stearothermophilus* T6 (LEE *et al.*, 2005b) e de *G. thermodenitrificans* (KIM e OH, 2005) obtiveram como temperatura ideal 70°C, outros atingiram temperatura ideal de 90°C – *T. maritima* (LEE *et al.*, 2004) e 95°C – *A. flavithermus* (LI *et al.*, 2011).

Entretanto, esta característica é particularmente interessante para aplicações específicas, como a bioconversão de D-galactose residual em D-tagatose no leite durante a

fermentação, que precisa de uma L-AI ativa a temperaturas mais amenas (RHIMI *et al.*, 2009).

4.2.5 Especificidade pelo substrato de LSLt-LAI solúvel

Devido ao fato de a L-arabinose isomerase poder reagir com outros açúcares além da galactose, diversos substratos foram usados para o estudo da especificidade da recombinante *Enterococcus faecium* LSLt-LAI (Tabela 4.3). LSLt-LAI apresentou atividade relativa bastante elevada para L-arabinose quando comparada a D-galactose, que teve sua atividade relativa igualada a 100%, mas uma baixa atividade para D-glicose e D-mannose. E, quando D-ribose e D-xilose foram usados como substrato, o catalisador, LSLt-LAI, não apresentou atividade. O que mostra que a enzima em estudo é ideal para síntese enzimática de D-tagatose a partir de D-galactose, embora em taxas mais baixas, já que demonstra maior especificidade para L-arabinose (PATRICK e LEE, 1968; KIM *et al.*, 2001).

Tabela 4.3 – Especificidade pelo substrato da recombinante LSLt-LAI de *Enterococcus faecium* em sua forma solúvel. Os ensaios foram realizados com substrato a 1M, 50°C e pH 5,5, em triplicata.

Substrato (Aldose)	Produto* (Cetose)	Atividade Relativa (%) da LSLt-LAI
D-Galactose	D-Tagatose	100,00
L-Arabinose	L-Ribulose	3270,83
D-Glicose	D-Frutose	8,96
D-Mannose	D-Frutose	2,03
D-Ribose	D-Ribulose	ND
D-Xilose	D-Xilulose	ND

Fonte: Elaborada pelo autor.

*MENAVUVU *et al.*, 2006.

ND: não detectado

Estudo já realizados mostram que a L-AI de *B. subtilis* str.168 apresentou especificidade apenas em relação a L-arabinose (KIM *et al.*, 2010) e a L-AI de *B. licheniformis* ATCC 14580 apresentou 2% de atividade enzimática para D-galactose quando comparada com L-arabinose (PRABHU *et al.*, 2008).

A maior atividade relativa apresentada ao utilizar L-arabinose e D-galactose como substratos é explicado pelo fato de somente estes, entre todos os estudados, apresentarem a mesma configuração de grupamento hidroxil ligados a C2-C4 (HUNG *et al.*, 2014).

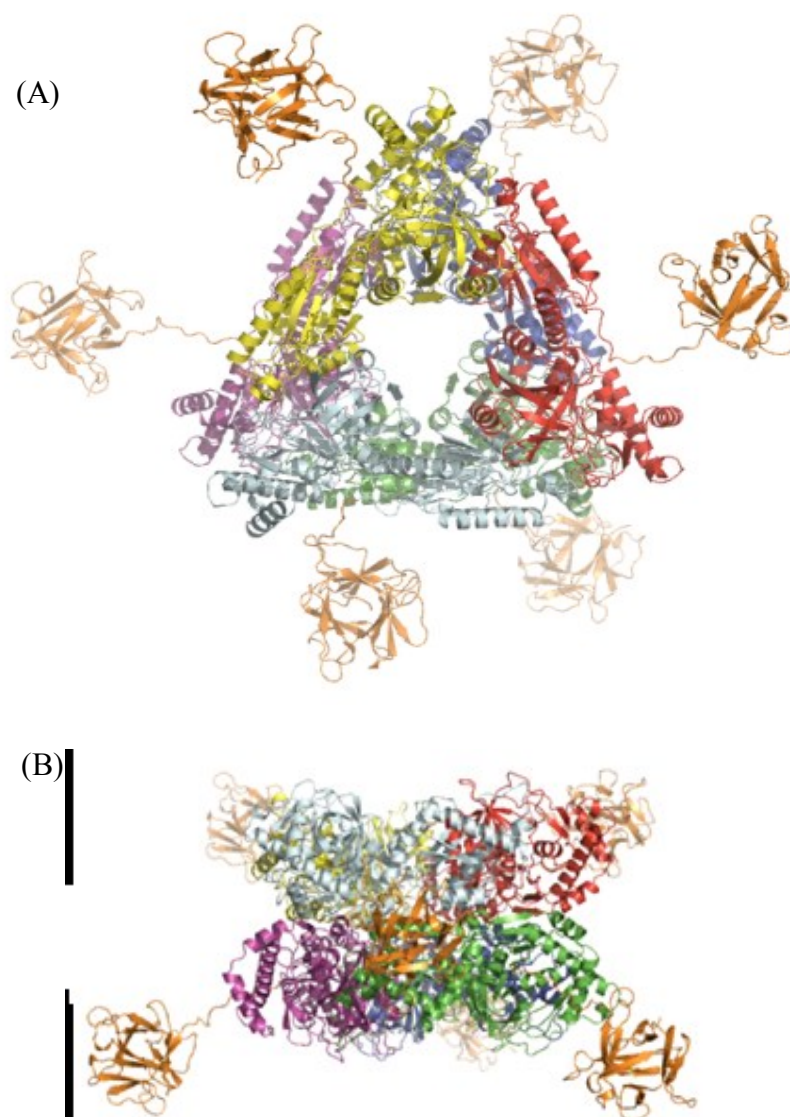
4.2.6 LSLt-LAI imobilizada

Com base em todos os dados coletados no estudo realizado com a enzima solúvel, parâmetros essenciais foram determinados, facilitando assim o desenvolvimento do estudo com a enzima imobilizada. Os resultados serão demonstrados a seguir.

4.2.6.1 Determinação dos parâmetros de imobilização

A LSLt-LAI foi imobilizada por afinidade em agarose polimerizada 6BCL através da interação específica entre o domínio da lectina e a superfície da agarose. A Figura 4.7 mostra o modelo LSLt-LAI construído pelo programa PyMol, com os braços espaçadores que permitem uma maior flexibilidade entre a L-arabinose isomerase e a etiqueta de fusão, quando imobilizada.

Figura 4.7 – Modelo construído, no programa PyMol, considerando as estruturas de cristal do LSLt (código PDB: 2Y9F (ANGULO *et al.*, 2011)) com o modelo desenhado da LAI-DH10B neste estudo, com o *linker* alongado contendo 11 resíduos de aminoácidos que fornece uma região flexível entre o LSLt e a L-AI. (A) Vista frontal do modelo (B) Vista lateral do modelo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como se pode observar na Tabela 4.4, apesar de 95% do rendimento de imobilização, a atividade recuperada da LSLt-LAI imobilizada foi de 88%, esse fato pode ser explicado pelo difícil acesso do substrato ao sítio ativo devido sua conformação quando em solução ou existência de uma difusão limitante de taxa do substrato no suporte. Entretanto,

pode-se afirmar que a estratégia de imobilização e o suporte utilizados foram apropriados para a produção do derivado LSLt-LAI-Ag6BCL, já que apresentaram valores maiores que os encontrados na literatura em estudos desenvolvidos com L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 (MANZO *et al.*, 2015; SOUSA, 2015). A utilização de agarose não reticulada para imobilização de proteínas de fusão por afinidade envolve interações físicas fortes e específicas, e sua utilização dificilmente pode ser substituída por outro suporte, uma vez que é quimicamente inerte, o que torna a agarose um suporte ideal para o ensaio desta nova estratégia de imobilização enzimática, já que os únicos grupos que podem reagir com as proteínas são aqueles que foram introduzidos no presente estudo, o que torna possível o controle das interações enzima-suporte (BUCUR *et al.*, 2005; ZUCCA *et al.*, 2005).

Tabela 4.4 – Parâmetros de imobilização da LSLt-LAI em Ag-6BCL. Carga enzimática oferecida de aproximadamente 26 U de enzima/g de suporte e carga de proteína oferecida de aproximadamente 743 mg de proteínas totais / g de suporte. RI – rendimento de imobilização; At_R – atividade recuperada; At_d – atividade do derivado; At_t – atividade teórica. O protocolo de imobilização ocorreu na presença de tampão acetato de sódio, pH 5,5.

Amostra	At _d (U/g)	RI (%)	At _t (U/mL)	At _R (%)
LSLT-LAI-Ag6BCL	2,21	95,39	2,5	88,08

Estudos de imobilização realizados com a L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em sua forma nativa (MANZO, *et al.*, 2015) e recombinante (SOUSA, 2015) têm seus resultados mostrados na Tabela 4.5. MANZO *et al.*, 2015 trabalharam com a L-arabinose isomerase em sua forma nativa e teve como resultado de maior atividade recuperada 63,56% quando a imobilizou em quitosana ativada com glutaraldeído suplementada com D-frutose, e o rendimento de imobilização foi de 92,68%, já quando usou quitosana ativada com 2% (m/v) glutaraldeído a pH 5,6, o rendimento de imobilização foi 100%, no entanto a atividade recuperada foi de 3,7%. No trabalho desenvolvido por SOUSA, 2015 a enzima L-arabinose isomerase foi caracterizada em sua forma recombinante, LAI-DH10B e LAI-BL21, para a enzima LAI-DH10B a maior atividade recuperada foi de 50,3% com rendimento de imobilização 60,4%, conseguidos ao imobilizar a enzima no suporte

MANAE, e para a recombinante L-AI BL21, a melhor atividade recuperada foi conseguida também ao imobilizá-la em MANAE, com recuperação da atividade atingindo 100% e 42% de rendimento de imobilização. Os resultados apresentados confirmam que a estratégia de imobilização e o suporte foram apropriados para a produção do derivado LSLt-LAI-Ag6BCL.

Tabela 4.5 – Parâmetros de imobilização de L-arabinose isomerase em estudos realizados por diferentes autores em sua forma nativa e recombinante. RI – rendimento de imobilização; At_R – atividade recuperada.

Microrganismo	Suporte	RI (%)	At _R (%)	Referência
<i>Enterococcus faecium</i> DBFIQ E36	Quitosana ativada com glutaraldeído	98 ± 1	26 ± 0,9	MANZO <i>et al.</i> , 2015
	Quitosana ativada com epíclorohidrina	83,7 ± 0,1	15 ± 0,5	
	Quitosana ativada com glicidol	48,1 ± 0,7	11 ± 0,25	
	D-frutose + Quitosana ativada com glutaraldeído	92,68	63,56	
Recombinante 6-His-tag de <i>Enterococcus faecium</i> DBFIQ E36 em <i>E. coli</i> BL21	IDA-Ni	56,5	81,7	SOUSA, 2015
	IDA-Ni-glioxil	56,5	55,9	
	MANAE	42,0	100,0	
Recombinante 6-His-tag de <i>Enterococcus faecium</i> DBFIQ E36 em <i>E. coli</i> DH10B	IDA-Ni	55,5	37,3	SOUSA, 2015
	IDA-Ni-glioxil	55,5	43,3	
	MANAE	60,4	50,3	

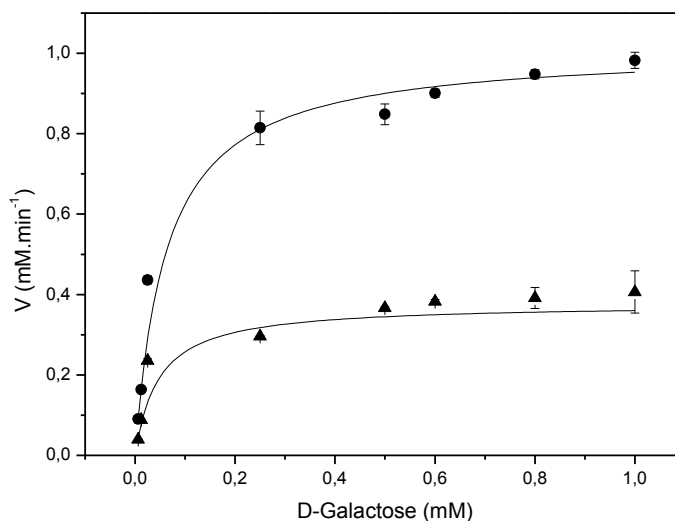
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.6.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade da LSLt-LAI imobilizada foi investigado e comparado com o da enzima solúvel, sob as mesmas condições de reação, empregando soluções de D-galactose em concentrações que variaram de 6,25 a 1000 μM. Os experimentos foram realizados em condições padrões de reação enzimática, com a enzima a

uma concentração de 1U/mL, a fim de evitar problemas difusionais. Os perfis de velocidade de reação em função da concentração de D-galactose são apresentados na Figura 4.8 e os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são apresentados na Tabela 4.6.

Figura 4.8 – Influência da concentração de substrato D-galactose na velocidade da reação de catálise da LSLt-LAI. Os símbolos representam os pontos experimentais e as retas o ajuste do modelo realizado pelo *software* Origin 8.1. (●) LSLt-LAI em sua forma solúvel (▲) LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL. Os experimentos foram realizados com a enzima a uma concentração de 1U/mL em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,5 temperatura ambiente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Verifica-se que o aumento na concentração do substrato de 6,25 a 250 μ M para a enzima imobilizada e de 6,25 a 600 μ M para a enzima solúvel resultou em um incremento significativo nas velocidades de reação da enzima. Para concentrações de substrato superiores a 250 μ M para a enzima imobilizada e superior a 800 μ M para a enzima solúvel, a atividade enzimática da LSLt-LAI tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten.

Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL, D-galactose foi utilizada como substrato. Atividade enzimática oferecida 1U/mL. O protocolo de imobilização ocorreu na presença de tampão acetato de sódio, pH 5,5, temperatura ambiente. Os resultados são a média das medidas em triplicata.

Amostra	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM.min ⁻¹)	R^2
LSLt-LAI solúvel	0,062	1,01	0,98
LSLt-LAI Ag-6BCL	0,005	0,05	0,97

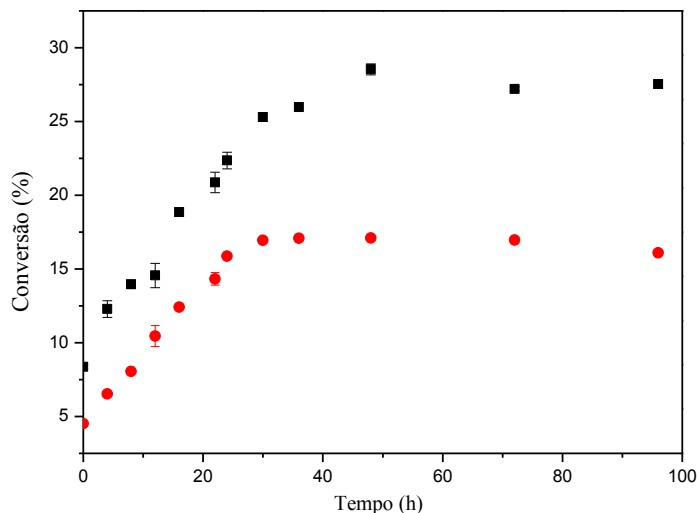
Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de K_m para a enzima livre foi de 0,062, maior do que o apresentado pela enzima imobilizada que foi de 0,005, mostrando que a afinidade pelo substrato é maior quando imobilizada.

4.2.6.3 Produção de D-tagatose por LSLt-LAI solúvel e por LSLt-LAI imobilizada em Ag-6BCL

O estudo da síntese de D-tagatose a partir de 0,4M de D-galactose pela enzima em sua forma solúvel e imobilizada em agarose-6BCL, ocorreu a 50°C na presença de 0,5mM de cloreto de manganês. Dados apresentados na Figura 4.9 mostram que a reação para a síntese de D-tagatose é favorecida quando a enzima é imobilizada. A enzima imobilizada obteve, após 48 horas de reação, sua máxima concentração de conversão, 112mM de D-tagatose (28% de conversão), e a enzima livre alcançou uma conversão de 17% de D-galactose em D-tagatose, o equivalente a 68mM de D-tagatose, após 36 horas de catálise. Embora a enzima imobilizada tenha demorado mais a atingir o equilíbrio, sua concentração de conversão foi 64% maior quando comparada a enzima solúvel.

Figura 4.9 – Rendimento de conversão de D-galactose em D-tagatose usando LSLt-LAI como catalisador e o substrato a uma concentração de 400mM. (■) LSLt-LAI imobilizada em agarose-6BCL (●) LSLt-LAI em sua forma solúvel.



Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar de os valores serem considerados baixos, enzimas oriundas de microrganismos mesófilos apresentam reduzidas taxas de conversão da D-galactose em D-tagatose, geralmente encontram-se na faixa de 28 a 50% (RHIMI *et al.*, 2010; SOUSA, 2015).

Realizando uma pesquisa em trabalhos onde autores estudaram a bioconversão de D-galactose em D-tagatose a partir das mais diferentes fontes de L-arabinose isomerase, pôde-se observar que a utilização de uma menor concentração de D-galactose aumenta a conversão (MEN *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2014). Outro fator que também favorece a conversão em D-tagatose é o aumento da temperatura, no entanto, esta informação só é relevante quando se fala em microrganismo termófilos ou hipertermófilos (KIM *et al.*, 2002). A utilização de uma menor concentração de substrato deve ser estudada, já que maiores valores de conversão podem ser atingidos ao utilizar microrganismos mesófilos para a produção de L-arabinose isomerase (MEN *et al.*, 2014).

5 – CONCLUSÕES

No processo de cristalização da enzima L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* foram obtidos três cristais que apresentaram resolução de 7,8Å e 6,5Å, mostrando que a enzima cristaliza, porém necessitam mais estudos a fim de aumentar a qualidade dos cristais.

O modelo estrutural da LAI-DH10B revela que a enzima apresenta arquitetura hexamérica, com subunidades idênticas, relacionadas por simetria e, que os resíduos de maior relevância como, os implicados na catálise, na união do metal manganês e na união das interfaces, foram conservados ao relacioná-la com a enzima-molde, ECAI.

As etapas de clonagem e expressão em *E. coli* foram realizadas com sucesso, com significativa expressão da proteína LSLt-LAI, que foi purificada após 15 minutos de reação, apresentando 77,18% de rendimento.

O perfil eletroforético do extrato enzimático permitiu a visualização de diferentes bandas e revelou a presença de uma proteína mais expressiva com massa molar de aproximadamente 70kDa, confirmando a expressão da L-arabinose isomerase associada à etiqueta de fusão LSLt.

O estudo físico-químico revelou 50°C e 5,5 como temperatura e pH ideais para catálise da D-galactose, respectivamente.

O íon metálico Mn^{2+} exerce influência positiva sob a enzima LSLt-LAI, favorecendo a isomerização da D-galactose em D-tagatose.

A imobilização da enzima LSLt-LAI apresentou rendimento de 95,39% com atividade recuperada de 88,08%, fato explicado pelo difícil acesso do substrato ao sítio ativo quando a enzima apresenta essa conformação. No entanto, a bioconversão de D-galactose em D-tagatose foi favorecida após 48 horas de catálise, alcançando valores em torno de 28%.

REFERÊNCIAS

ANGULO, I.; ACEBRON, I.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; MENENDEZ, M.; GARCIA, P.; TATENO, H.; GOLDSTEIN, I. J.; PEREZ-AGOTE, B.; MANCHEÑO, J. M. High-resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile beta-trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. **Glycobiology**, v. 21, n. 10, p. 1349-1361, 2011.

ÁVALOS, I. A. **Búsqueda racional de nuevas etiquetas de fusión: aplicaciones biotecnológicas de los dominios lectina trébol β** . Tese de Doutorado - Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2014.

AZEVEDO, C. **Biologia Celular e Molecular**. Lisboa: LIDEL, 2005.

BAESHEN, M. N.; AL-HEJIN, A. M.; BORA, R. S.; AHMED, M. M.; RAMADAN, H. A.; SAINI, K. S.; BAESHEN, N. A.; REDWAN, E. M. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, n. 7, p. 953-962, 2015.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2009.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BUCUR, B.; DANET, A. F.; MARTY, J. L. Cholinesterase immobilization on the surface of screen-printed electrodes based on concanavalin a affinity. **Anal. Chem. Acta**, v. 530, n. 1, p. 1-6, 2005.

BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO. Fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expr. Purif.**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2005.

CANAVES, J. M.; PAGE, R.; WILSON I. A.; STEVENS, R. C. Protein biophysical properties that correlate with crystallization success in *Thermotoga maritima*: maximum clustering strategy for structural genomics. **J. Mol. Biol.**, v. 344, n. 4, p. 977-991, 2004.

CAO, T. P.; CHOI, J. M.; LEE, S. J.; LEE, Y. J.; LEE, S. K.; JUN, Y.; LEE, D. W.; LEE, S. H. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of L-arabinose isomerase from *Geobacillus kaustophilus*. **Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 70, n. 1, p. 108-112, 2014.

CHOI, J. M.; LEE, Y. J.; CAO, T. P.; SHIN, S. M.; PARK, M. K.; LEE, H. S.; DI LUCCIO, E.; KIM, S. B.; LEE, S. J.; LEE, S. J.; LEE, S. H.; LEE, D. W. Structure of the thermophilic L-Arabinose isomerase from *Geobacillus kaustophilus* reveals metal-mediated intersubunit interactions for activity and thermostability. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 596, p. 51-62, 2016.

CHOUAYEKH, H.; BEJAR, W.; RHIMI, M.; JELLELI, K.; MSEDDEI, M.; BEJAR, S. Characterization of an L-arabinose isomerase from the *Lactobacillus plantarum* NC8 strain showing pronounced stability at acidic pH. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 260-267, 2007.

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Front. Microbiol.**, v. 5, p. 63, 2014.

DE MARCO, V.; STIER, G.; BLANDIN, S.; DE MARCO, A. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 322, n. 3, p. 766-771, 2004.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DILYANA, G. **Electron crystallography of three dimensional protein crystals**. Tese de Doutorado - Department of Biophysical Structural Chemistry, Faculty of Science, Leiden University. Leiden, 2008.

DOS SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **Chem. Cat. Chem.**, v. 7, n. 16, p. 2413-2432, 2015.

FAN, C.; LIU, K.; ZHANG, T.; ZHOU, L.; XUE, D.; JIANG, B.; MU, W. Biochemical characterization of a thermostable L-arabinose isomerase from a thermoacidophilic bacterium, *Alicyclobacillus hesperidum* URH17-3-68. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 120-126, 2014.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 405-418, 2009.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, p. 1-29, 2010.

GRANSTRÖM, T. B.; TAKATA, G.; TOKUDA, M.; IZUMORI, K. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. **J Biosci Bioeng**, v. 97, n. 2, p. 89-94, 2004.

GUO, Q.; AN, Y.; YUN, J.; YANG, M.; MAGOCHA, T. A.; ZHU, J.; XUE, Y.; QI, Y.; HOSSAIN, Z.; SUN, W.; QI, X. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 940-946, 2018.

HAN, Y.; GUO, W.; SU, B.; GUO, Y.; WANG, J.; CHU, B.; YANG, G. High-level expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* using an HE-maltotriose-binding protein fusion tag. **Protein Expression and Purification**, v. 142, p. 25-31, 2018.

HOCHULI, E.; DOBELI, H.; SCHNACHER, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. **J. Chromatogr.**, v. 411, p. 177-184, 1987.

HUNG, X. G.; TSENG, W. C.; LIU, S. M.; TZOU, W. S.; FANG, T. Y. Characterization of a thermophilic l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 121-128, 2014.

IZUMORI, K.; UEDA, Y.; YAMANAKA, K. Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose and D-galactose. **J. Bacteriol.** v. 133, n. 1, p. 413-424, 1978.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; GAUTAM, P.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M. Biocatalytic production of D-tagatose: a potential rare sugar with versatile applications. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 57, n. 16, p. 3430–3437, 2017.

JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 816–822, 2004.

KANNO, S.; YANAGIDA, Y.; HARUYAMA, T.; KOBATAKE, E.; AIZAWA, M. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. **J. Biotechnol.**, v. 76, n. 2-3, p. 207-214, 2000.

KAPUST, R. B.; WAUGH, D. S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. **Protein Sci.**, v. 8, n. 8, p. 1668-1674, 1999.

KIM, B. C.; LEE, Y. H.; LEE, H. S.; LEE, D. W.; CHOE, E. A.; PYUN, Y. R. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*:

bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 1, p. 121-126, 2002.

KIM, H. J.; OH, D. K. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. **J Biotechnol**, v. 120, n. 2, p. 162-173, 2005.

KIM, H. J.; RYU, S. A.; KIM, P.; OH, D. K. A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 400-404, 2003.

KIM, J. H.; PRABHU, P.; JEYA, M.; TIWARI, M. K.; MOON, H. J.; SINGH, R. K.; LEE, J. K. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1839–1847, 2010.

KIM, P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 3, p. 243-249, 2004.

KIM, P.; YOON, S. H.; SEO, M. J.; OH, D. K.; CHOI, J. H. Improvement of tagatose conversion rate by genetic evolution of thermostable galactose isomerase. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 34, n. 2, p. 99-102, 2001.

KRAUSS, I. R.; MERLINO, A.; VERGARA, A.; SICA, F. An overview of biological macromolecule crystallization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11643-11691, 2013.

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

LAVALLIE, E. R.; DIBLASIO, E. A.; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 187-193, 1993.

LEE, D. W.; CHOE, E. A.; KIM, S. B.; EOM, S. H.; HONG, Y. H.; LEE, S. J.; LEE, H. S.; LEE, D. Y.; PYUN, Y. R. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 434, n. 2, p. 333-343, 2005(a).

LEE, D. W.; JANG, H. J.; CHOE, E. A.; KIM, B. C.; LEE, S. J.; KIM, S. B.; HONG, Y. H.; PYUN, Y. R. Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1397-1404, 2004.

LEE, S. J.; LEE, D. W.; CHOE, E. A.; HONG, Y. H.; KIM, S. B.; KIM, B. C.; PYUN, Y. R. Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7888–7896, 2005(b).

LEVIN, G. V. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. **J. Med. Food**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 2002.

LI, X. J.; LIU, J. L.; GAO, D. S.; WAN, W. Y.; YANG, X.; LI, Y. T.; CHANG, H. T.; CHEN, L.; WANG, C. Q.; ZHAO, J. Single-step affinity and cost-effective purification of recombinant proteins using the Sepharose-binding lectin-tag from mushroom *Laetiporus sulphureus* as fusion partner. **Protein Expr. Purif.** v. 119, p. 51-56, 2016.

LI, Y. J.; ZHU, Y. M.; LIU, A. J.; SUN, Y. X. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in d-tagatose production. **Extremophiles**, v. 15, n. 3, p. 441–450, 2011.

LIU, Y.; LI, S.; XU, H.; WU, L.; XU, Z.; LIU, J.; FENG, X. Efficient production of D-tagatose using a food-grade surface display system. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 28, p. 6756–6762, 2014.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; ACEBRÓN, I.; MANCHEÑO, J. M.; RAJA, S.; LILLO, M. P.; GUIÁSÁN SEIJAS, J. M. Directed, strong, and reversible immobilization of proteins tagged with a beta-trefoil lectin domain: a simple method to immobilize biomolecules on plain agarose matrixes. **Bioconjug. Chem.**, v. 23, n. 3, p. 565-57, 2012.

LORIS, R. Principales of structures of animal and plant lectins. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, 2002.

MAGGIO, E. T.; RAMNARAYAN, K. Recent developments in computacional proteomics. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 19, p. 996-1004, 2001.

MALAKHOV, M. P.; MATTERN, M. R.; MALAKHOVA, O. A.; DRINKER, M.; WEEKS, S. D.; BUTT, T. R. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. **Struct. Funct. Genomics**, v. 5, n. 1-2, p. 75-86, 2004.

MANZO, R. M.; SOUSA, M.; FENOGLIO, C.; GONÇALVES, L. R. B.; MAMMARELLA, E. J. Chemical improvement of chitosan-modified beads for the immobilization of *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 L-arabinose isomerase through multipoint covalent attachment approach. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, n. 10, p. 1325–1340, 2015.

MEN, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, L.; KANG, Z.; IZUMORI, K.; SUNA, Y.; MA, Y. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: Cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2-3, p. 171-178, 2014.

MENAVUVU, B. T.; POONPERM, W.; LEANG, K.; NOGUCHI, N.; OKADA, H.; MORIMOTO, K.; GRANSTRÖM, T. B.; TAKADA, G.; IZUMORI, K. Efficient biosynthesis of D-Allose from D-Psicose by cross-linked recombinant L-rhamnose isomerase:

separation of product by ethanol crystallization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 340–345, 2006.

MURZA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Essential role of the concentration of immobilized ligands in affinity chromatography: purification of guanidine benzoatase on an ionized ligand. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 740, n. 2, p. 211-218, 2000.

NAKAMATU, T.; YAMANAKA, K. Crystallization and properties of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 178, n. 1, p. 156–165, 1969.

OH, D. K.; KIM, H. J.; RYU, S. A.; RHO, H. J.; KIM, P. Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 22, p. 1859-1862, 2001.

OH, D. K.; OH, H. J.; KIM, H. J.; CHEON, J.; KIM, P. Modification of optimal pH in L-arabinose isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* for D-galactose isomerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1 – 4, p. 108-112, 2006.

OH, D. K. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2007.

PATEL, M. J.; AKHANI, R. C.; PATEL, A. T.; DEDANIA, S. R. A single and two step isomerization process for d-tagatose and l-ribose bioproduction using L-arabinose isomerase and D-lyxose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 27-33, 2017.

PATRICK, J. W.; LEE, N. Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 16, p. 4312-4318, 1968.

PECHKOVA, E.; NICOLINI, C. From art to science in protein crystallization by means of thin-film nanotechnology. **Nanotechnology**, v. 13, n. 4, p. 460–464, 2002.

PRABHU, P.; TIWARI, M. K.; JEYA, M.; GUNASEKARAN, P.; KIM, I. W.; LEE, J. K. Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 283-290, 2008.

PRYOR, K. D.; LEITING, B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. **Protein Expr. Purif.**, v. 10, p. 309-319, 1997.

RHIMI, M.; BAJIC, G.; ILHAMMAMI, R.; BOUDEBBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. The acid-tolerant L-arabinose isomerase from the mesophilic *Shewanella* sp. ANA-3 is highly active at low temperatures. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-11, 2011a.

RHIMI, M.; CHOUAYEKH, H.; GOUILLOUARD, I.; MAGUIN, E.; BEJAR, S., 2011. Production of D-tagatose, a low caloric sweetener during milk fermentation using L-arabinose isomerase. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 3, p. 3309–3315, 2011b.

RHIMI, M.; BEJAR, S. Cloning, purification and biochemical characterization of metal-ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 2, p. 191-199, 2006.

RHIMI, M.; ILHAMMAMI, R.; BAJIC, G.; BOUDEBBOUZE, S.; MAGUIN, E.; HASER, R.; AGHAJARI, N. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade *Lactobacillus sakei* 23K is an attractive D-tagatose producer. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9171–9177, 2010.

RHIMI, M.; CHOUAYEKH, H.; MAGUIN, E.; BEJAR, S. **L-arabinose isomerase for converting D-galactose into D-tagatose in a dairy product which contains D-galactose.** WO2009066127, EP2211643, TN2010/0226, 2009.

RUIZ-BARBA, J. L.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal. Biochem.*, v. 347, n. 2, p. 333-335, 2005.

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: principles, practice, and application to structural biology**. Editora: Garland Science, 1 edição, 2009.

SALONEN, N.; SALONEN, K.; LEISOLA, M.; NYSSOLA, A. D-Tagatose production in the presence of borate by resting *Lactococcus lactis* cells harboring *Bifidobacterium longum* L-arabinose isomerase. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 36, n. 4, p. 489–497, 2013.

SCHMIDT, T. G.; SKERRA, A. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. **J. Chromatogr. A**, v. 676, n. 2, p. 337-345, 1994.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67, n. 1, p. 31-40, 1988.

SOUSA, M. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase**. Tese de Doutorado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Ceará, 2015.

STAUDIGL, P.; HALTRICH, D.; PETERBAUER, C. K. L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of D-galactose and D-glucose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 7, p. 1617–1624, 2014.

TATENO, H.; GOLDSTEIN, I. J. Molecular cloning, expression, and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 42, p. 40455-40463, 2003.

TEICHMANN, S. A.; MURZIN, A. G.; CHOTHIA, C. Determination of protein function,

evolution and interactions by structural genomics. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 11, n. 3, p. 354–363, 2001.

TEIXEIRA, J. A.; FONSECA, M. M. **Reactores Biológicos**. Lisboa: LIDEL, 2007.

TORRES, P. R.; MANZO, R. M.; RUBÍOLO, A. C.; BATISTA-VIEIRA, F. D.; MAMMARELLA, E. J. Purification of an L-arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 employing a biospecific affinity strategy. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 99-105, 2014.

VIDEIRA, A. **Engenharia Genética: Princípios e Aplicações**. 1ª Edição. Editora Lidel. p. 184. 2001.

WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. **Methods Mol. Biol.**, v. 681, p. 151-175, 2011.

WANARSKA, M.; KUR, J. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting beta-D-galactosidase from *Arthrobacter chlorophenicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter sp.* 22c. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, p. 111-113, 2012.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 316-320, 2005.

XU, Z.; LI, S.; FENG, X.; LIANG, J.; XU, H. L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, n. 21, p. 8869–8878, 2014.

XU, Z.; LI, S.; FU, F.; LI, G.; FENG, X.; XU, H.; OUYANG, P. Production of D-tagatose, a functional sweetener, utilizing alginate immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 cells. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, n. 4, p. 961–973, 2012.

XU, Z.; LI, S.; LIANG, J.; FENG, X.; XU, H. Protein purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921. **Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 71, p. 28-33, 2015.

XU, Z.; QING, Y.; LI, S.; FENG, X.; XU, H.; OUYANG, P. A novel L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for d-tagatose production: gene cloning, purification and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 1-2, p. 1-7, 2011.

YADAV, D. K.; YADAV, N.; YADAV, S.; HAQUE, S.; TUTEJA, N. An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 612, p. 57-77, 2016.

YASUKAWA, T.; KANEI-ISHII, C.; MAEKAWA, T.; FUJIMOTO, J.; YAMAMOTO, T.; ISHII, S. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 43, p. 25328-25331, 1995.

YOON, S. H.; KIM, P.; OH, D. K. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 47-51, 2003.

ZHU, W.; CHANCE, M. R.; MANJASETTY, B. A. Crystal Structure of Mn²⁺-bound *Escherichia coli* L-arabinose Isomerase (ECAI) and Implications in Protein Catalytic Mechanism and Thermo-Stability. **J. Young Investig.**, v. 17, p. 161-226, 2007.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1577-1601, 2016.

ZUMORI, K.; UEDA, Y.; YAMANAKA, K. Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerases induced by L-arabinose and D-galactose. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 1, p. 413-414, 1978.

ANEXO A

TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS SCREENS DE CRISTALIZAÇÃO

1. JCSG

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Final pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	50% (v/v) PEG 400		135901
2		0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.5	20% (w/v) PEG 3000		135902
3	0.18 M tri-Ammonium citrate		20% (w/v) PEG 3350		135903
4	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) MPD		135904
5	0.2 M Magnesium formate		20% (w/v) PEG 3350		135905
6	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (w/v) PEG 1000		135906
7		0.1 M CHES pH 9.5	20% (w/v) PEG 8000		135907
8	0.2 M Ammonium formate		20% (w/v) PEG 3350		135908
9	0.2 M Ammonium chloride		20% (w/v) PEG 3350		135909
10	0.2 M Potassium formate		20% (w/v) PEG 3350		135910
11	0.2 M Ammonium phosphate	0.1 M Tris pH 8.5	50% (v/v) MPD		135911
12	0.2 M Potassium nitrate		20% (w/v) PEG 3350		135912
13	0.8 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 3.5		4.0	135913
14	0.2 M Sodium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350		135914
15		0.1 M Bicine pH 8.5	20% (w/v) PEG 6000	9.0	135915
16		0.1 M HEPES pH 7.5	10% (w/v) PEG 8000; 8% (v/v) Ethylene glycol		135916
17		0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40% (v/v) MPD; 5% (w/v) PEG 8000		135917
18		0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40% (v/v) Ethanol; 5% (w/v) PEG 1000		135918
19		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	8% (w/v) PEG 4000		135919
20	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 7.0	10% (w/v) PEG 8000		135920
21		0.1 M Citric acid pH 4.0	20% (w/v) PEG 6000	5.0	135921
22	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	50% (v/v) PEG 200		135922
23		1.6 M tri-Sodium citrate pH 6.5		6.5	135923
24	0.2 M tri-Potassium citrate		20% (w/v) PEG 3350		135924
25	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (w/v) PEG 8000		135925
26	1 M Lithium chloride	0.1 M Citric acid pH 4.0	20% (w/v) PEG 6000	4.0	135926
27	0.2 M Ammonium nitrate		20% (w/v) PEG 3350		135927
28		0.1 M HEPES pH 6.5	10% (w/v) PEG 6000	7.0	135928
29	0.8 M Sodium phosphate; 0.8 M Potassium phosphate	0.1 M HEPES pH 7.5			135929
30		0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40% (v/v) PEG 300		135930
31	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	10% (w/v) PEG 3000		135931
32		0.1 M Tris pH 8.5	20% (v/v) Ethanol		135932
33		0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	25% (v/v) 1,2 propanediol; 10% (v/v) Glycerol		135933
34		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 20000; 2% (v/v) 1,4-Dioxane		135934
35	2 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.6			135935
36			10% (w/v) PEG 1000; 10% (w/v) PEG 8000		135936
37			24% (w/v) PEG 1500; 20% (w/v) Glycerol		135937
38	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 400		135938
39	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	50% (v/v) PEG 200		135939
40	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	30% (w/v) PEG 8000		135940
41		0.1 M HEPES pH 7.5	70% (v/v) MPD		135941
42	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PEG 8000		135942
43	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	40% (v/v) PEG 400		135943
44		0.1 M Tris pH 8.0	40% (v/v) MPD	8.0	135944
45	0.17 M Ammonium sulfate		25.5% (w/v) PEG 4000; 15% (v/v) Glycerol		135945
46	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40% (v/v) PEG 300		135946
47	0.14 M Calcium chloride	0.07 M Sodium acetate pH 4.6	14% (v/v) Isopropanol; 30% (v/v) Glycerol		135947
48	0.04 M Potassium phosphate		16% (w/v) PEG 8000; 20% (v/v) Glycerol		135948

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Final pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	1 M tri-Sodium citrate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5			135949
50	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	2 M Ammonium sulfate		135950
51	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	10% (v/v) Isopropanol		135951
52	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	1.26 M Ammonium sulfate		135952
53		0.1 M CAPS pH 10.5	40% (v/v) MPD		135953
54	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Imidazole pH 8.0	20% (w/v) PEG 3000		135954
55	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	10% (v/v) Isopropanol		135955
56	1 M di-Ammonium phosphate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5			135956
57	1.6 M Magnesium sulfate	0.1 M MES pH 6.5			135957
58		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 6000	9.0	135958
59	0.16 M Calcium acetate	0.08 M Sodium cacodylate pH 6.5	14.4% (w/v) PEG 8000; 20% (v/v) Glycerol		135959
60		0.1 M Imidazole pH 8.0	10% (w/v) PEG 8000		135960
61	0.05 M Cesium chloride	0.1 M MES pH 6.5	30% (v/v) Jeffamine M-600		135961
62	3.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 4.0	(final 5.0)	5.0	135962
63		0.1 M Tris pH 8.5	20% (v/v) MPD (final 8.0)	8.0	135963
64		0.1 M HEPES pH 7.5	20% (v/v) Jeffamine M-600		135964
65	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	50% (v/v) Ethylene glycol		135965
66		0.1 M Bicine pH 8.5	10% (v/v) MPD (final 9.0)	9.0	135966
67	0.8 M Succinic acid pH 7.0				135967
68	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0				135968
69	2.4 M Sodium malonate pH 7.0				135969
70	1.1 M Sodium malonate	0.1 M HEPES pH 7.0	0.5% (v/v) Jeffamine ED-2001	7.0	135970
71	1 M Succinic acid	0.1 M HEPES pH 7.0	1% (w/v) PEG MME 2000	7.0	135971
72		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine M-600	7.0	135972
73		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine ED-2001	7.0	135973
74	0.02 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	22% (w/v) Polyacrylic acid 5100, sodium salt		135974
75	0.01 M Cobalt chloride	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) Polyvinylpyrrolidone K15		135975
76	0.2 M Trimethylamine N-oxide	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PEG MME 2000		135976
77	0.005 M Cobalt chloride; 0.005 M Cadmium chloride; 0.005 M Magnesium chloride; 0.005 M Nickel chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	12% (w/v) PEG 3350		135977
78	0.24 M Sodium malonate pH 7.0		20% (w/v) PEG 3350		135978
79	0.1 M Succinic acid pH 7.0		15% (w/v) PEG 3350		135979
80	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0		20% (w/v) PEG 3350		135980
81	0.1 M Potassium thiocyanate		30% (w/v) PEG MME 2000		135981
82	0.15 M Potassium bromide		30% (w/v) PEG MME 2000		135982
83	2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135983
84	3 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135984
85	0.3 M Magnesium formate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135985
86	1 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	1% (w/v) PEG 3350		135986
87	0.1 M tri-Sodium acetate pH 4.5	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135987
88	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD		135988
89	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD		135989
90	0.1 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	17% (w/v) PEG 10000		135990
91	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135991
92	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135992
93	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135993
94	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135994
95	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135995
96	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	45% (v/v) MPD		135996

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

2. PACT

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1		0.1 M SPG buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135701
2		0.1 M SPG buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135702
3		0.1 M SPG buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135703
4		0.1 M SPG buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135704
5		0.1 M SPG buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135705
6		0.1 M SPG buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135706
7	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135707
8	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135708
9	0.2 M Lithium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135709
10	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135710
11	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135711
12	0.01 M Zinc chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135712
13		0.1 M MIB buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135713
14		0.1 M MIB buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135714
15		0.1 M MIB buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135715
16		0.1 M MIB buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135716
17		0.1 M MIB buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135717
18		0.1 M MIB buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135718
19	0.2 M Sodium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135719
20	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135720
21	0.2 M Lithium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135721
22	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135722
23	0.2 M Calcium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135723
24	0.01 M Zinc chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135724
25		0.1 M PCB buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135725
26		0.1 M PCB buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135726
27		0.1 M PCB buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135727
28		0.1 M PCB buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135728
29		0.1 M PCB buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135729
30		0.1 M PCB buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135730
31	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135731
32	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135732
33	0.2 M Lithium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135733
34	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135734
35	0.2 M Calcium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135735
36	0.01 M Zinc chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135736
37		0.1 M MMT buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135737
38		0.1 M MMT buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135738
39		0.1 M MMT buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135739
40		0.1 M MMT buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135740
41		0.1 M MMT buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135741
42		0.1 M MMT buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135742
43	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135743
44	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135744
45	0.2 M Lithium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135745
46	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135746
47	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135747
48		0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135748

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	0.2 M Sodium fluoride		20% (w/v) PEG 3350	135749
50	0.2 M Sodium bromide		20% (w/v) PEG 3350	135750
51	0.2 M Sodium iodide		20% (w/v) PEG 3350	135751
52	0.2 M Potassium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350	135752
53	0.2 M Sodium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	135753
54	0.2 M Sodium formate		20% (w/v) PEG 3350	135754
55	0.2 M Sodium acetate		20% (w/v) PEG 3350	135755
56	0.2 M Sodium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	135756
57	0.2 M Potassium/sodium tartrate		20% (w/v) PEG 3350	135757
58	0.2 M Sodium/potassium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	135758
59	0.2 M Sodium citrate		20% (w/v) PEG 3350	135759
60	0.2 M Sodium malonate		20% (w/v) PEG 3350	135760
61	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135761
62	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135762
63	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135763
64	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135764
65	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135765
66	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135766
67	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135767
68	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135768
69	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135769
70	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135770
71	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135771
72	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135772
73	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135773
74	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135774
75	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135775
76	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135776
77	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135777
78	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135778
79	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135779
80	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135780
81	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135781
82	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135782
83	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135783
84	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135784
85	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135785
86	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135786
87	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135787
88	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135788
89	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135789
90	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135790
91	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135791
92	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135792
93	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135793
94	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135794
95	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135795
96	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135796

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

3. CRYSTAL SCREEN 1 & 2

Crystal Screen 1 & 2 Formulation Hampton Research - Copyright 2006										
Well #	Reagent #	[Salt 1] units	[Salt 1] units	Salt	[Buffer] units	[Buffer] units	Buffer	pH		
A1	1	0.02 M		Calcium chloride dihydrate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6		
A2	2									
A3	3									
A4	4				0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
A5	5	0.2 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M		HEPES sodium	7.5		
A6	6	0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
A7	7				0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
A8	8	0.2 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
A9	9	0.2 M		Ammonium acetate	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6		
A10	10	0.2 M		Ammonium acetate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6		
A11	11				0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6		
A12	12	0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		HEPES sodium	7.5		
B1	13	0.2 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
B2	14	0.2 M		Calcium chloride dihydrate	0.1 M		HEPES sodium	7.5		
B3	15	0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
B4	16				0.1 M		HEPES sodium	7.5		
B5	17	0.2 M		Lithium sulfate monohydrate	0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
B6	18	0.2 M		Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
B7	19	0.2 M		Ammonium acetate	0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
B8	20	0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6		
B9	21	0.2 M		Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
B10	22	0.2 M		Sodium acetate trihydrate	0.1 M		Tris hydrochloride	8.5		
B11	23	0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		HEPES sodium	7.5		
B12	24	0.2 M		Calcium chloride dihydrate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6		
C1	25				0.1 M		Imidazole	6.5		
C2	26	0.2 M		Ammonium acetate	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6		
C3	27	0.2 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M		HEPES sodium	7.5		
C4	28	0.2 M		Sodium acetate trihydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5		
C5	29				0.1 M		HEPES sodium	7.5		
C6	30	0.2 M		Ammonium sulfate						
C7	31	0.2 M		Ammonium sulfate						
C8	32									
C9	33									
C10	34				0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6		
C11	35				0.1 M		HEPES sodium	7.5		

Reagent #	[Precipitant 1]	[Ppt 1] units	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2] units	Precipitant 2
1	30 %v/v		(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
2	0.4 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
3	0.4 M		Ammonium phosphate monobasic			
4	2 M		Ammonium sulfate			
5	30 %v/v		(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
6	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
7	1.4 M		Sodium acetate trihydrate			
8	30 %v/v		2-Propanol			
9	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
10	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
11	1 M		Ammonium phosphate monobasic			
12	30 %v/v		2-Propanol			
13	30 %v/v		Polyethylene glycol 400			
14	28 %v/v		Polyethylene glycol 400			
15	30 %w/v		Polyethylene glycol 8,000			
16	1.5 M		Lithium sulfate monohydrate			
17	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
18	20 %w/v		Polyethylene glycol 8,000			
19	30 %v/v		2-Propanol			
20	25 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
21	30 %v/v		(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
22	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
23	30 %v/v		Polyethylene glycol 400			
24	20 %v/v		2-Propanol			
25	1 M		Sodium acetate trihydrate			
26	30 %v/v		(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
27	20 %v/v		2-Propanol			
28	30 %w/v		Polyethylene glycol 8,000			
29	0.8 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
30	30 %w/v		Polyethylene glycol 8,000			
31	30 %w/v		Polyethylene glycol 4,000			
32	2 M		Ammonium sulfate			
33	4 M		Sodium formate			
34	2 M		Sodium formate			
35	0.8 M		Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.8 M		Potassium phosphate monobasic

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSL)

Crystal Screen 1 & 2 Formulation Hampton Research - Copyright 2006									
Well #	Reagent #	[Salt 1]	[Salt 1] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	
C12	36				0.1 M		Tris hydrochloride	8.5	
D1	37				0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
D2	38				0.1 M		HEPES sodium	7.5	
D3	39				0.1 M		HEPES sodium	7.5	
D4	40				0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
D5	41				0.1 M		HEPES sodium	7.5	
D6	42	0.05 M		Potassium phosphate monobasic					
D7	43								
D8	44								
D9	45	0.2 M		Zinc acetate dihydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5	
D10	46	0.2 M		Calcium acetate hydrate	0.1 M		Sodium cacodylate trihydrate	6.5	
D11	47				0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
D12	48				0.1 M		Tris hydrochloride	8.5	
	49	1 M		Lithium sulfate monohydrate					
	50	0.5 M		Lithium sulfate monohydrate					
E1	1	2.0 M		Sodium chloride					
E2	2	0.5 M		Sodium chloride					
		0.01 M		Magnesium chloride hexahydrate					
E3	3								
E4	4								
E5	5	2.0 M		Ammonium sulfate					
E6	6								
E7	7								
E8	8	1.5 M		Sodium chloride					
E9	9				0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
E10	10	0.2 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
E11	11	0.01 M		Cobalt (II) chloride hexahydrate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
E12	12	0.1 M		Cadmium chloride hydrate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
F1	13	0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium acetate trihydrate	4.6	
F2	14	0.2 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
F3	15	0.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
F4	16	0.5 M		Sodium chloride	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
F5	17				0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
F6	18	0.01 M		Iron (III) chloride hexahydrate	0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	
F7	19				0.1 M		Sodium citrate tribasic dihydrate	5.6	

Crystal Screen 1 & 2 Formulation Hampton Research - Copyright 2006									
Well #	Reagent #	[Salt 1] units	[Salt 1] units	Salt	[Buffer] units	[Buffer] units	Buffer	pH	
F8	20				0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F9	21	0.1 M		Sodium phosphate monobasic mon	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F10	22			Potassium phosphate monobasic	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F11	23	1.6 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F12	24	0.05 M		Cesium chloride	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G1	25	0.01 M		Cobalt (II) chloride hexahydrate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G2	26	0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G3	27	0.01 M		Zinc sulfate heptahydrate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G4	28								
G5	29	0.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		HEPES	7.5	
G6	30				0.1 M		HEPES	7.5	
G7	31				0.1 M		HEPES	7.5	
G8	32	0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		HEPES	7.5	
G9	33				0.1 M		HEPES	7.5	
G10	34	0.05 M		Cadmium sulfate hydrate	0.1 M		HEPES	7.5	
G11	35				0.1 M		HEPES	7.5	
G12	36				0.1 M		HEPES	7.5	
H1	37				0.1 M		HEPES	7.5	
H2	38				0.1 M		HEPES	7.5	
H3	39	0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H4	40				0.1 M		Tris	8.5	
H5	41	0.01 M		Nickel (II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H6	42	1.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Tris	8.5	
H7	43	0.2 M		Ammonium phosphate monobasic	0.1 M		Tris	8.5	
H8	44				0.1 M		Tris	8.5	
H9	45	0.01 M		Nickel (II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H10	46	0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		BICINE	9.0	
H11	47				0.1 M		BICINE	9.0	
H12	48				0.1 M		BICINE	9.0	

Crystal Screen 1 & 2 Formulation Hampton Research - Copyright 2006									
Well #	Reagent #	[Salt 1]	[Salt 1] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	
F8	20				0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F9	21	0.1 M		Sodium phosphate monobasic mon	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F10	22			Potassium phosphate monobasic	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F11	23	1.6 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
F12	24	0.05 M		Cesium chloride	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G1	25	0.01 M		Cobalt (II) chloride hexahydrate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G2	26	0.2 M		Ammonium sulfate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G3	27	0.01 M		Zinc sulfate heptahydrate	0.1 M		MES monohydrate	6.5	
G4	28								
G5	29	0.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		HEPES	7.5	
G6	30				0.1 M		HEPES	7.5	
G7	31				0.1 M		HEPES	7.5	
G8	32	0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		HEPES	7.5	
G9	33				0.1 M		HEPES	7.5	
G10	34	0.05 M		Cadmium sulfate hydrate	0.1 M		HEPES	7.5	
G11	35				0.1 M		HEPES	7.5	
G12	36				0.1 M		HEPES	7.5	
H1	37				0.1 M		HEPES	7.5	
H2	38				0.1 M		HEPES	7.5	
H3	39	0.2 M		Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H4	40				0.1 M		Tris	8.5	
H5	41	0.01 M		Nickel (II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H6	42	1.5 M		Ammonium sulfate	0.1 M		Tris	8.5	
H7	43	0.2 M		Ammonium phosphate monobasic	0.1 M		Tris	8.5	
H8	44				0.1 M		Tris	8.5	
H9	45	0.01 M		Nickel (II) chloride hexahydrate	0.1 M		Tris	8.5	
H10	46	0.1 M		Sodium chloride	0.1 M		BICINE	9.0	
H11	47				0.1 M		BICINE	9.0	
H12	48				0.1 M		BICINE	9.0	

Reagent #	[Precipitant 1]	[Ppt 1] units	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2] units	Precipitant 2
1	30	%v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
2	0.4 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
3	0.4 M		Ammonium phosphate monobasic			
4	2 M		Ammonium sulfate			
5	30	%v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
6	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
7	1.4 M		Sodium acetate trihydrate			
8	30	%v/v	2-Propanol			
9	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
10	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
11	1 M		Ammonium phosphate monobasic			
12	30	%v/v	2-Propanol			
13	30	%v/v	Polyethylene glycol 400			
14	28	%v/v	Polyethylene glycol 400			
15	30	%w/v	Polyethylene glycol 8,000			
16	1.5 M		Lithium sulfate monohydrate			
17	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
18	20	%w/v	Polyethylene glycol 8,000			
19	30	%v/v	2-Propanol			
20	25	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
21	30	%v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
22	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
23	30	%v/v	Polyethylene glycol 400			
24	20	%v/v	2-Propanol			
25	1 M		Sodium acetate trihydrate			
26	30	%v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
27	20	%v/v	2-Propanol			
28	30	%w/v	Polyethylene glycol 8,000			
29	0.8 M		Potassium sodium tartrate tetrahydrate			
30	30	%w/v	Polyethylene glycol 8,000			
31	30	%w/v	Polyethylene glycol 4,000			
32	2 M		Ammonium sulfate			
33	4 M		Sodium formate			
34	2 M		Sodium formate			
35	0.8 M		Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.8 M		Potassium phosphate monobasic

4. INDEX

Reagent #	[Salt]	[Salt]	Salt	[Buffer]	[Buffer]	Buffer	pH	[Ppt 1]	[Ppt 1]	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2]	Precipitant 2	Average pH
		units			units				units			units		
1				0,1	M	Citric acid	3,5	2,0	M	Ammonium sulfate				3,7
2				0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,5	2,0	M	Ammonium sulfate				4,5
3				0,1	M	BIS-TRIS	5,5	2,0	M	Ammonium sulfate				6,1
4				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	2,0	M	Ammonium sulfate				7,1
5				0,1	M	HEPES	7,5	2,0	M	Ammonium sulfate				7,6
6				0,1	M	Tris	8,5	2,0	M	Ammonium sulfate				8,2
7				0,1	M	Citric acid	3,5	3,0	M	Sodium chloride				3,1
8				0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,5	3,0	M	Sodium chloride				4,2
9				0,1	M	BIS-TRIS	5,5	3,0	M	Sodium chloride				5,7
10				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	3,0	M	Sodium chloride				7,2
11				0,1	M	HEPES	7,5	3,0	M	Sodium chloride				7,3
12				0,1	M	Tris	8,5	3,0	M	Sodium chloride				8,6
13				0,1	M	BIS-TRIS	5,5	0,3	M	Magnesium formate dihydrate				5,7
14				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	0,5	M	Magnesium formate dihydrate				6,5
15				0,1	M	HEPES	7,5	0,5	M	Magnesium formate dihydrate				7,4
16				0,1	M	Tris	8,5	0,3	M	Magnesium formate dihydrate				8,6
17				1,4	M		5,6	1,26	M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0,14	M	Potassium phosphate dibasic	5,1
18				1,4	M		6,9	0,49	M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0,91	M	Potassium phosphate dibasic	7,0
19				1,4	M		8,2	0,056	M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	1,344	M	Potassium phosphate dibasic	8,4
20				0,1	M	HEPES	7,5	1,4	M	Sodium citrate tribasic dihydrate				8,0
21								1,8	M	Ammonium citrate tribasic pH 7.0				7,0
22								0,8	M	Succinic acid pH 7.0				7,0
23								2,1	M	DL-Malic acid pH 7.0				7,0

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

24									2,8	M	Sodium acetate trihydrate pH 7.0				7,0
25									3,5	M	Sodium formate pH 7.0				7,0
26									1,1	M	Ammonium tartrate dibasic pH 7.0				7,0
27									2,4	M	Sodium malonate pH 7.0				7,0
28									35	% v/v	Tacsimate pH 7.0				7,0
29									60	% v/v	Tacsimate pH 7.0				7,0
Reagent #	[Salt]	[Salt] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Ppt 1]	[Ppt 1] units	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2] units	Precipitant 2	Average pH	
30	0,1	M	Sodium chloride	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	1,5	M	Ammonium sulfate				6,9	
31	0,8	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1	M	Tris	8,5	0,5	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000				8,9	
32	1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	1	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				5,8	
33	1,1	M	Sodium malonate pH 7.0	0,1	M	HEPES	7,0	0,5	% v/v	Jeffamine ED-2001 pH 7.0				7,2	
34	1,0	M	Succinic acid pH 7.0	0,1	M	HEPES	7,0	1	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000				7,1	
35	1,0	M	Ammonium sulfate	0,1	M	HEPES	7,0	0,5	% w/v	Polyethylene glycol 8,000				7,1	
36	15	% v/v	Tacsimate pH 7.0	0,1	M	HEPES	7,0	2	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,0	
37								25	% w/v	Polyethylene glycol 1,500				6,3	
38				0,1	M	HEPES	7,0	30	% v/v	Jeffamine M-600 pH 7.0				6,7	
39				0,1	M	HEPES	7,0	30	% v/v	Jeffamine ED-2001 pH 7.0				6,8	
40				0,1	M	Citric acid	3,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				4,3	
41				0,1	M	Sodium acetate trihydrate	4,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				5,1	
42				0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				5,5	
43				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				6,5	
44				0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,5	
45				0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				8,5	
46				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	20	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000				6,5	
47				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	28	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000				6,5	
48	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol				3,4	

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

49	0,2	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	4,4			
50	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	6,3			
51	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	6,7			
52	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	HEPES	7,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	7,4			
53	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Tris	8,5	45	% v/v	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	8,3			
54	0,05	M	Calcium chloride dihydrate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	30	% v/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	5,7			
55	0,05	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	30	% v/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	7,3			
56	0,2	M	Potassium chloride	0,05	M	HEPES	7,5	35	% v/v	Pentaerythritol propoxylate (5/4 PO/OH)	7,4			
57	0,05	M	Ammonium sulfate	0,05	M	BIS-TRIS	6,5	30	% v/v	Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)	6,5			
58				0,1	M	BIS-TRIS	6,5	45	% v/v	Polypropylene glycol P 400	6,4			
59	0,02	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	22	% w/v	Polyacrylic acid sodium salt 5,100	7,2			
Reagent #	[Salt]	[Salt]	Salt	[Buffer]	[Buffer]	Buffer	pH	[Ppt 1]	[Ppt 1]	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2]	Precipitant 2	Average pH
		units			units				units			units		
60	0,01	M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	M	Tris	8,5	20	% w/v	Polyvinylpyrrolidone K 15				7,7
61	0,2	M	L-Proline	0,1	M	HEPES	7,5	10	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,4
62	0,2	M	Trimethylamine N-oxide dihydrate	0,1	M	Tris	8,5	20	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000				8,6
63	5	% v/v	Tacsimate pH 7.0	0,1	M	HEPES	7,0	10	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000				6,9
64	0,005	M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	12	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,2
	0,005	M	Nickel(II) chloride hexahydrate											
	0,005	M	Cadmium chloride hydrate											
	0,005	M	Magnesium chloride hexahydrate											
65	0,1	M	Ammonium acetate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	17	% w/v	Polyethylene glycol 10,000				5,9
66	0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				5,6
67	0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				6,5
68	0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,3
69	0,2	M	Ammonium sulfate	0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				8,3

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

70	0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,4			
71	0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,6			
72	0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4			
73	0,2	M	Sodium chloride	0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,5			
74	0,2	M	Lithium sulfate monohydrate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,5			
75	0,2	M	Lithium sulfate monohydrate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,5			
76	0,2	M	Lithium sulfate monohydrate	0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,3			
77	0,2	M	Lithium sulfate monohydrate	0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,6			
78	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,1			
79	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,7			
80	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4			
81	0,2	M	Ammonium acetate	0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,4			
82	0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	BIS-TRIS	5,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	5,5			
83	0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	BIS-TRIS	6,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	6,5			
84	0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	HEPES	7,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,3			
85	0,2	M	Magnesium chloride hexahydrate	0,1	M	Tris	8,5	25	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	8,4			
86	0,2	M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4			
87	0,2	M	Sodium malonate pH 7.0					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,4			
88	0,2	M	Ammonium citrate tribasic pH 7.0					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,0			
89	0,1	M	Succinic acid pH 7.0					15	% w/v	Polyethylene glycol 3,350	7,3			
Reagent #	[Salt]	[Salt] units	Salt	[Buffer]	[Buffer] units	Buffer	pH	[Ppt 1]	[Ppt 1] units	Precipitant 1	[Ppt 2]	[Ppt 2] units	Precipitant 2	Average pH
90	0,2	M	Sodium formate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,3
91	0,15	M	DL-Malic acid pH 7.0					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				7,2
92	0,1	M	Magnesium formate dihydrate					15	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				6,9
93	0,05	M	Zinc acetate dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				6,6
94	0,2	M	Sodium citrate tribasic dihydrate					20	% w/v	Polyethylene glycol 3,350				8,3
95	0,1	M	Potassium thiocyanate					30	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000				6,8
96	0,15	M	Potassium bromide					30	% w/v	Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000				6,8

Imobilização Direcionada e Reversível da L-arabinose isomerase de *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 em Agarose através do Domínio Lectina β -trebol (LSLt)

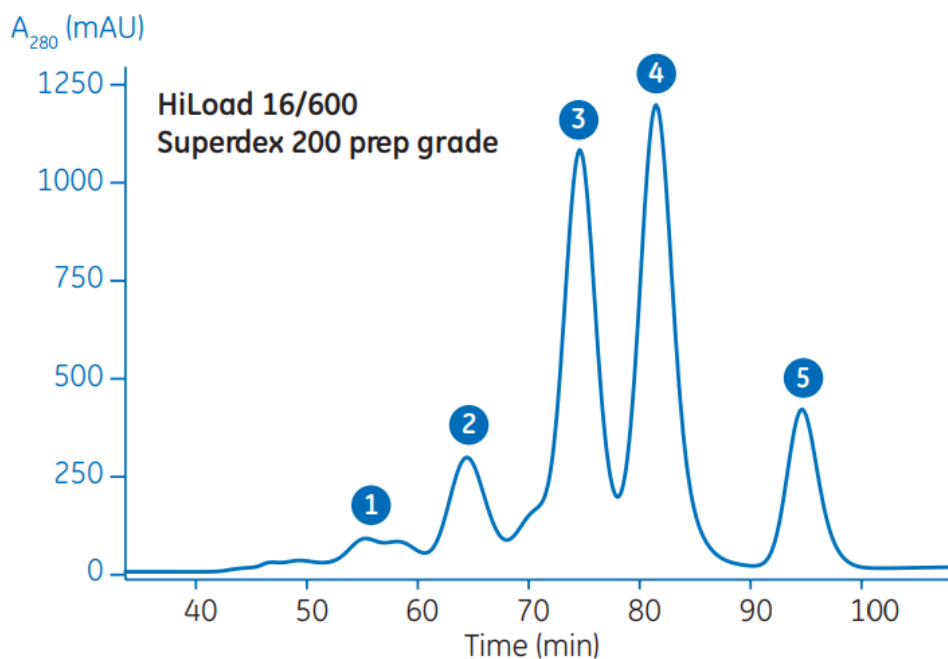
5. Additive Screen

Tube #	Salt	Tube #	Classification	Tube #	Suggested Drop Concentration
1. (A1)	0.1 M Barium chloride dihydrate	1. (A1)	Multivalent	1. (A1)	0.01 M (10 mM)
2. (A2)	0.1 M Cadmium chloride hydrate	2. (A2)	Multivalent	2. (A2)	0.01 M (10 mM)
3. (A3)	0.1 M Calcium chloride dihydrate	3. (A3)	Multivalent	3. (A3)	0.01 M (10 mM)
4. (A4)	0.1 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	4. (A4)	Multivalent	4. (A4)	0.01 M (10 mM)
5. (A5)	0.1 M Copper(II) chloride dihydrate	5. (A5)	Multivalent	5. (A5)	0.01 M (10 mM)
6. (A6)	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	6. (A6)	Multivalent	6. (A6)	0.01 M (10 mM)
7. (A7)	0.1 M Manganese(II) chloride tetrahydrate	7. (A7)	Multivalent	7. (A7)	0.01 M (10 mM)
8. (A8)	0.1 M Strontium chloride hexahydrate	8. (A8)	Multivalent	8. (A8)	0.01 M (10 mM)
9. (A9)	0.1 M Yttrium(III) chloride hexahydrate	9. (A9)	Multivalent	9. (A9)	0.01 M (10 mM)
10. (A10)	0.1 M Zinc chloride	10. (A10)	Multivalent	10. (A10)	0.01 M (10 mM)
11. (A11)	0.1 M Iron(III) chloride hexahydrate	11. (A11)	Multivalent	11. (A11)	0.01 M (10 mM)
12. (A12)	0.1 M Nickel(II) chloride hexahydrate	12. (A12)	Multivalent	12. (A12)	0.01 M (10 mM)
13. (B1)	0.1 M Chromium(III) chloride hexahydrate	13. (B1)	Multivalent	13. (B1)	0.01 M (10 mM)
14. (B2)	0.1 M Praseodymium(III) acetate hydrate	14. (B2)	Multivalent	14. (B2)	0.01 M (10 mM)
15. (B3)	1.0 M Ammonium sulfate	15. (B3)	Salt	15. (B3)	0.1 M (100 mM)
16. (B4)	1.0 M Potassium chloride	16. (B4)	Salt	16. (B4)	0.1 M (100 mM)
17. (B5)	1.0 M Lithium chloride	17. (B5)	Salt	17. (B5)	0.1 M (100 mM)
18. (B6)	2.0 M Sodium chloride	18. (B6)	Salt	18. (B6)	0.2 M (200 mM)
19. (B7)	0.5 M Sodium fluoride	19. (B7)	Salt	19. (B7)	0.05 M (50 mM)
20. (B8)	1.0 M Sodium iodide	20. (B8)	Salt	20. (B8)	0.1 M (100 mM)
21. (B9)	2.0 M Sodium thiocyanate	21. (B9)	Salt	21. (B9)	0.2 M (200 mM)
22. (B10)	1.0 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	22. (B10)	Salt	22. (B10)	0.1 M (100 mM)
23. (B11)	1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate	23. (B11)	Salt	23. (B11)	0.1 M (100 mM)
24. (B12)	1.0 M Cesium chloride	24. (B12)	Salt	24. (B12)	0.1 M (100 mM)
25. (C1)	1.0 M Sodium malonate pH 7.0	25. (C1)	Salt	25. (C1)	0.1 M (100 mM)
26. (C2)	0.1 M L-Proline	26. (C2)	Amino Acid	26. (C2)	0.01 M (10 mM)
27. (C3)	0.1 M Phenol	27. (C3)	Dissociating Agent	27. (C3)	0.01 M (10 mM)
28. (C4)	30% v/v Dimethyl sulfoxide	28. (C4)	Dissociating Agent	28. (C4)	3.0%
29. (C5)	0.1 M Sodium bromide	29. (C5)	Dissociating Agent	29. (C5)	0.01 M (10 mM)
30. (C6)	30% w/v 6-Aminohexanoic acid	30. (C6)	Linker	30. (C6)	3.0%
31. (C7)	30% w/v 1,5-Diaminopentane dihydrochloride	31. (C7)	Linker	31. (C7)	3.0%
32. (C8)	30% w/v 1,6-Diaminohexane	32. (C8)	Linker	32. (C8)	3.0%
33. (C9)	30% w/v 1,8-Diaminooctane	33. (C9)	Linker	33. (C9)	3.0%
34. (C10)	1.0 M Glycine	34. (C10)	Linker	34. (C10)	0.1 M (100 mM)
35. (C11)	0.3 M Glycyl-glycyl-glycine	35. (C11)	Linker	35. (C11)	0.03 M (30 mM)
36. (C12)	0.1 M Taurine	36. (C12)	Linker	36. (C12)	0.01 M (10 mM)
37. (D1)	0.1 M Betaine hydrochloride	37. (D1)	Linker	37. (D1)	0.01 M (10 mM)
38. (D2)	0.1 M Spermidine	38. (D2)	Polyamine	38. (D2)	0.01 M (10 mM)
39. (D3)	0.1 M Spermine tetrahydrochloride	39. (D3)	Polyamine	39. (D3)	0.01 M (10 mM)
40. (D4)	0.1 M Hexamine cobalt(III) chloride	40. (D4)	Polyamine	40. (D4)	0.01 M (10 mM)
41. (D5)	0.1 M Sarcosine	41. (D5)	Polyamine / Osmolyte	41. (D5)	0.01 M (10 mM)
42. (D6)	0.1 M Trimethylamine hydrochloride	42. (D6)	Chaotrope	42. (D6)	0.01 M (10 mM)
43. (D7)	1.0 M Guanidine hydrochloride	43. (D7)	Chaotrope	43. (D7)	0.1 M (100 mM)
44. (D8)	0.1 M Urea	44. (D8)	Chaotrope	44. (D8)	0.01 M (10 mM)
45. (D9)	0.1 M β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate	45. (D9)	Co-factor	45. (D9)	0.01 M (10 mM)
46. (D10)	0.1 M Adenosine-5'-triphosphate disodium salt hydrate	46. (D10)	Co-factor	46. (D10)	0.01 M (10 mM)
47. (D11)	0.1 M TCEP hydrochloride	47. (D11)	Reducing Agent	47. (D11)	0.01 M (10 mM)
48. (D12)	0.01 M GSH (L-Glutathione reduced), 0.01 M GSSG (L-Glutathione oxidized)	48. (D12)	Reducing Agent	48. (D12)	0.001 M (1 mM)

Tube #	Salt	Tube #	Classification	Tube #	Suggested Drop Concentration
49. (E1)	0.1 M Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	49. (E1)	Chelating Agent	49. (E1)	0.01 M (10 mM)
50. (E2)	5% w/v Polyvinylpyrrolidone K15	50. (E2)	Polymer	50. (E2)	0.5%
51. (E3)	30% w/v Dextran sulfate sodium salt (M _r 5,000)	51. (E3)	Polymer	51. (E3)	3.0%
52. (E4)	40% v/v Pentaerythritol ethoxylate (3/4 EO/OH)	52. (E4)	Polymer	52. (E4)	4.0%
53. (E5)	10% w/v Polyethylene glycol 3,350	53. (E5)	Polymer	53. (E5)	1.0%
54. (E6)	30% w/v D-(+)-Glucose monohydrate	54. (E6)	Carbohydrate	54. (E6)	3.0%
55. (E7)	30% w/v Sucrose	55. (E7)	Carbohydrate	55. (E7)	3.0%
56. (E8)	30% w/v Xylitol	56. (E8)	Carbohydrate	56. (E8)	3.0%
57. (E9)	30% w/v D-Sorbitol	57. (E9)	Carbohydrate	57. (E9)	3.0%
58. (E10)	12% w/v myo-Inositol	58. (E10)	Carbohydrate	58. (E10)	1.2%
59. (E11)	30% w/v D-(+)-Trehalose dihydrate	59. (E11)	Carbohydrate	59. (E11)	3.0%
60. (E12)	30% w/v D-(+)-Galactose	60. (E12)	Carbohydrate	60. (E12)	3.0%
61. (F1)	30% v/v Ethylene glycol	61. (F1)	Polyol	61. (F1)	3.0%
62. (F2)	30% v/v Glycerol	62. (F2)	Polyol	62. (F2)	3.0%
63. (F3)	3.0 M NDSB-195	63. (F3)	Non-detergent	63. (F3)	0.3 M (300 mM)
64. (F4)	2.0 M NDSB-201	64. (F4)	Non-detergent	64. (F4)	0.2 M (200 mM)
65. (F5)	2.0 M NDSB-211	65. (F5)	Non-detergent	65. (F5)	0.2 M (200 mM)
66. (F6)	2.0 M NDSB-221	66. (F6)	Non-detergent	66. (F6)	0.2 M (200 mM)
67. (F7)	1.0 M NDSB-256	67. (F7)	Non-detergent	67. (F7)	0.1 M (200 mM)
68. (F8)	0.15 mM CYMAL®-7	68. (F8)	Amphiphile	68. (F8)	0.000015 M (0.015 mM)
69. (F9)	20% w/v Benzamidine hydrochloride	69. (F9)	Amphiphile	69. (F9)	2.0%
70. (F10)	5% w/v n-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide, (LDAO, DDAO)	70. (F10)	Detergent	70. (F10)	0.5%
71. (F11)	5% w/v n-Octyl-β-D-glucoside	71. (F11)	Detergent	71. (F11)	0.5%
72. (F12)	5% w/v n-Dodecyl-β-D-maltoside	72. (F12)	Detergent	72. (F12)	0.5%
73. (G1)	30% w/v Trimethylamine N-oxide dihydrate	73. (G1)	Osmolyte	73. (G1)	3.0%
74. (G2)	30% w/v 1,6-Hexanediol	74. (G2)	Organic, Non-volatile	74. (G2)	3.0%
75. (G3)	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	75. (G3)	Organic, Non-volatile	75. (G3)	3.0%
76. (G4)	50% v/v Polyethylene glycol 400	76. (G4)	Organic, Non-volatile	76. (G4)	5.0%
77. (G5)	50% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0	77. (G5)	Organic, Non-volatile	77. (G5)	5.0%
78. (G6)	40% v/v 2,5-Hexanediol (mixture of isomers)	78. (G6)	Organic, Non-volatile	78. (G6)	4.0%
79. (G7)	40% v/v (±)-1,3-Butanediol	79. (G7)	Organic, Non-volatile	79. (G7)	4.0%
80. (G8)	40% v/v Polypropylene glycol P 400	80. (G8)	Organic, Non-volatile	80. (G8)	4.0%
81. (G9)	30% v/v 1,4-Dioxane	81. (G9)	Organic, Volatile	81. (G9)	3.0%
82. (G10)	30% v/v Ethanol	82. (G10)	Organic, Volatile	82. (G10)	3.0%
83. (G11)	30% v/v 2-Propanol	83. (G11)	Organic, Volatile	83. (G11)	3.0%
84. (G12)	30% v/v Methanol	84. (G12)	Organic, Volatile	84. (G12)	3.0%
85. (H1)	40% v/v 1,4-Butanediol	85. (H1)	Organic, Volatile	85. (H1)	4.0%
86. (H2)	40% v/v tert-Butanol	86. (H2)	Organic, Volatile	86. (H2)	4.0%
87. (H3)	40% v/v 1,3-Propanediol	87. (H3)	Organic, Volatile	87. (H3)	4.0%
88. (H4)	40% v/v Acetonitrile	88. (H4)	Organic, Volatile	88. (H4)	4.0%
89. (H5)	40% v/v Formamide	89. (H5)	Organic, Volatile	89. (H5)	4.0%
90. (H6)	40% v/v 1-Propanol	90. (H6)	Organic, Volatile	90. (H6)	4.0%
91. (H7)	5% v/v Ethyl acetate	91. (H7)	Organic, Volatile	91. (H7)	0.5%
92. (H8)	40% v/v Acetone	92. (H8)	Organic, Volatile	92. (H8)	4.0%
93. (H9)	0.25% v/v Dichloromethane	93. (H9)	Organic, Volatile	93. (H9)	0.025%
94. (H10)	7% v/v 1-Butanol	94. (H10)	Organic, Volatile	94. (H10)	0.7%
95. (H11)	40% v/v 2,2,2-Trifluoroethanol	95. (H11)	Organic, Volatile	95. (H11)	4.0%
96. (H12)	40% v/v 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol	96. (H12)	Organic, Volatile	96. (H12)	4.0%

Additive Screen contains ninety-six unique reagents beginning at position A1.
To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

ANEXO B
PERFIL CROMATOGRÁFICO DA COLUNA HILOAD 16/600 SUPERDEX 200
PREP GRADE



<i>Sample:</i>	1. Ferritin (M_r 440 000), 0.24 mg/ml 2. IgG (M_r 158 000), 0.2 mg/ml 3. Albumin (M_r 67 000), 5 mg/ml 4. Ovalbumin (M_r 43 000), 4 mg/ml 5. Myoglobin (M_r 17 000), 1.5 mg/ml
<i>Sample load:</i>	500 μ l
<i>Buffer:</i>	50 mM phosphate buffer, 150 mM sodium chloride, 0.01% sodium azide, pH 7.0
<i>Flow rate:</i>	1.5 ml/min (45 cm/h)