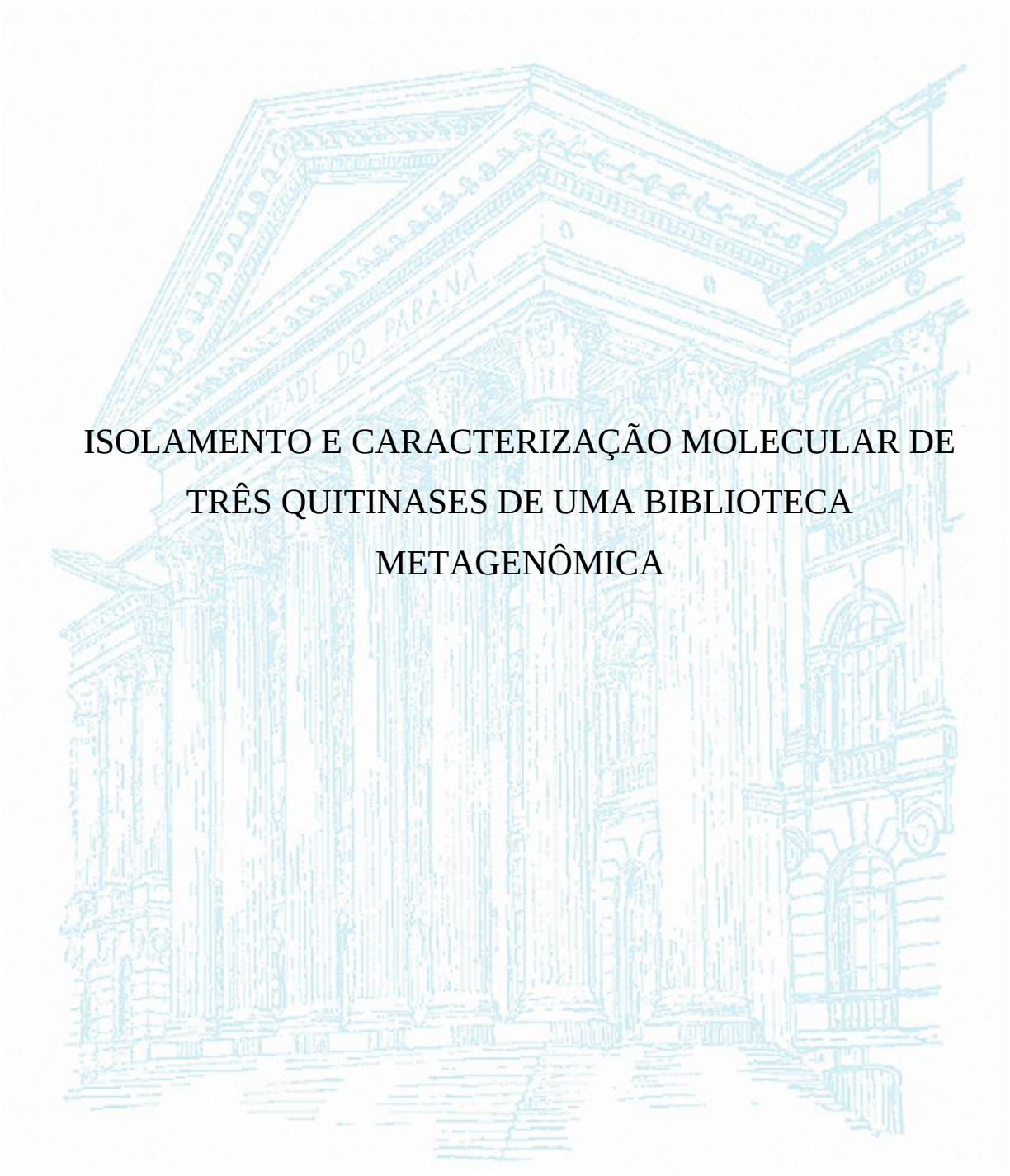
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH SACKS THIMOTEO



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRÊS QUITINASES DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

CURITIBA

2011

SARAH SACKS THIMOTEO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRÊS QUITINASES DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa
Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Luciano Fernandes Huergo pelos ensinamentos e orientações e pela confiança depositada em mim.

Aos Professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio que também participaram com sugestões, discussões e ensinamentos.

À Professora Rose Adele Monteiro pela leitura e correção do projeto.

À Professora Roseli Wassem e Helisson Faoro pela correção da disssertação.

Aos colegas de laboratório pelos dias agradáveis de convívio.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração e boas conversas.

A Arnaldo Glogauer e Helisson Faoro pela ajuda com as técnicas de biologia molecular.

A Viviane Paula Martini pela ajuda com a construção do modelo de estrutura da quitinase e pela amizade.

Aos meus pais Ademir Feltrin Thimoteo e Regina Sacks Thimoteo por me apoiarem e incentivarem.

A Daniel Giacomazzi por todos os momentos juntos, palavras de apoio e incentivo, companheirismo e bom humor. Você me traz muita força e felicidade.

A Rose Prado e Valter Baura pelo bom trabalho que desempenham contribuindo para que esse trabalho fosse executado.

À Coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica coordenada pelos Professores Miguel Daniel Noseda e Sílvia Maria Suter Correia Cadena por todo apoio prestado.

À CAPES pela bolsa de Mestrado.

“Quando encontrares oposição esforça-te

para superá-la pelo argumento, e não pela autoridade,

pois uma vitória dependente da autoridade é irreal e ilusória.”

Bertrand Russell

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ..... **I**

LISTA DE FIGURAS ..... **VI**

LISTA DE TABELAS ..... **IX**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **X**

RESUMO ..... **XII**

ABSTRACT ..... **XIII**

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **2**

2.1 IMPORTÂNCIA DA METAGENÔMICA 2

2.1.1 Identificação de Clones Ativos na Biblioteca Metagenômica *6*

2.2 IMPORTÂNCIA DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA 8

2.2.1 A Demanda Mundial por Enzimas *8*

2.2.2 Aplicações Industriais de Hidrolases *10*

2.2.2.1 Proteases 12

2.2.2.2 Amilases 13

2.2.2.3 Celulases e Hemicelulases 14

2.3 QUITINASES 17

2.3.1 Quitina e Quitosana *17*

2.3.2 Classificação das Quitinases *18*

2.3.3 Aplicações das Quitinases *21*

2.3.4 Aplicações dos Derivados de Quitina *22*

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS **24**

4. ESTRATÉGIA DE AÇÃO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA **25**

4.1 BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS 27

4.2 ESTIRPES E VETORES 27

4.3 MEIOS DE CULTIVO 28

4.4 MEIOS SELETIVOS PARA TRIAGEM DE HIDROLASES 29

4.2.1 Proteases *30*

4.2.2 Amilase *31*
4.2.3. Celulase *31*
4.2.4. Fitase *32*
4.2.5. Quitinase *33*
4.5 MANIPULAÇÃO DE DNA 34
4.5.1 Purificação de DNA plasmidial *34*
4.5.2 Purificação do DNA Fosmidial dos Clones Ativos *34*
4.5.3 Eletroforese em Gel de Agarose *35*
4.5.4 Purificação de DNA em Gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão *35*
4.5.5 Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição *35*
4.5.6 Clivagem mecânica de DNA por nebulização *35*
4.5.7 Ligação de DNA *36*
4.5.8 Inserção de Transposon *36*
4.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO 36
4.6.1 Preparo de Células Eletrocompetentes *36*
4.6.2 Eletroporação *37*
4.7 COLETA DE CLONES TRANSFORMANTES 37
4.8 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS 38
4.9. SEQUENCIAMENTO DAS EXTREMIDADES DOS INSERTOS DE DNA 38
4.10 MANIPULAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS 40
4.10.1 Alinhamento e Anotação das Sequências de Nucleotídeos *40*
4.10.2 Análise das Sequências de Aminoácidos *41*
4.10.3 Modelagem por Homologia da Estrutura da Chit 1 ..... *43*

5. RESULTADOS 44

5.1 SELEÇÃO DE CLONES COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA 44
5.1.1 Proteases *44*
5.1.2 Amilase *46*
5.1.3 Celulase *46*
5.1.4 Fitase *47*
5.1.5 Quitinase *47*
5.2 MONTAGEM DA BIBLIOTECA DE SUBCLONES DE CHI 1 49
5.3 SUBCLONES DE CHI 1 50
5.4 SEQUENCIAMENTO DOS INSERTOS DOS SUBCLONES 52

5.5 ANOTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS 52
5.6 ANÁLISE DOS GENES QUE CODIFICAM QUITINASES 56
5.6.1 Quitinase 1- Chit1 ..... *56*
5.6.2 Quitinase 2 – Chit2 ..... *62*
5.6.3 Quitinase 3 – Chit3 ..... *66*
5.7. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS TRÊS QUITINASES 71
5.8 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS QUITINASES COM AS DO PDB 73
5.8 MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA CHIT 1 76
6. DISCUSSÃO 86
7. CONCLUSÕES 96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98
9. APÊNDICES 113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ETAPAS DA METAGENÔMICA.....3
FIGURA 2 – ARTIGOS RELACIONADAS A METAGENÔMICA.....5
FIGURA 3 – ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS COM ABORDAGEM METAGENÔMICA.....6
FIGURA 4 – DEMANDA MUNDIAL POR ENZIMAS.....10
FIGURA 5 – ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS.....11
FIGURA 6 – AUMENTO DE ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS.....11
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA.....18
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA.....18
FIGURA 9 – DEGRADAÇÃO DA QUITINA EM FUNGOS E BACTÉRIAS.....21
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO PROJETO.....25
FIGURA 11 – MEIO SELETIVO PARA PROTEASE LA LEITE 1% CONTENDO CLONES POSITIVOS.....30
FIGURA 12 – MEIO SELETIVO PARA AMILASE LA AMIDO 1% CONTENDO CLONES POSITIVOS.....31
FIGURA 13 – MEIO SELETIVO PARA CELULASE LA CMC 0.2% CONTENDO CLONES POSITIVOS.....32
FIGURA 14 – MEIO SELETIVO PARA FITASE PSM CONTENDO CLONE POSITIVO.....33
FIGURA 15 – MEIO SELETIVO PARA QUITINASE LA QUITINA COLOIDAL 2% CONTENDO CLONE POSITIVO.....34
FIGURA 16 – HALOS DE HIDRÓLISE EM LA LEITE 1%.....44
FIGURA 17 – PADRÕES DE RESTRIÇÃO ENCONTRADOS NOS CLONES POSITIVOS PARA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE.....45
FIGURA 18 – HALOS DE HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE DOS CLONES COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DIFERENTES.....46
FIGURA 19 – HALO DE HIDRÓLISE EM LA QUITINA COLOIDAL 2%.....47
FIGURA 20 – PADRÕES DE RESTRIÇÃO ENCONTRADOS NOS CLONES POSITIVOS PARA HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL.....48
FIGURA 21 – HALOS DE HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL DOS CLONES COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DIFERENTES.....49

FIGURA 22 – HALO DE HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL DO CLONE CHI 1.....49
FIGURA 23 – DNA FOSMIDIAL CLIVADO DO CLONE CHI 1.....50
FIGURA 24 – SUBCLONES COM ATIVIDADE CONTRA QUITINA COLOIDAL.....51
FIGURA 25 – SUBCLONE COM PRODUÇÃO DE COMPOSTO MARROM.....52
FIGURA 26 – DISPOSIÇÃO DOS GENES NO CONTIG 1.....53
FIGURA 27 – 1ª DISPOSIÇÃO DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*.....55
FIGURA 28 – DISPOSIÇÃO DOS GENES NO CONTIG 2.....55
FIGURA 29 – 2ª DISPOSIÇÃO DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*.....55
FIGURA 30 – 3ª DISPOSIÇÃO DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*.....56
FIGURA 31 – ALINHAMENTO EM CLUSTAL DA SEQUÊNCIA DE CHIT 1 COM A QUITINASE 1 DE *AEROMONAS PUNCTATA*.....57
FIGURA 32 – DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 1.....58
FIGURA 33 – ANÁLISE DE REGIÃO TRANSMEMBRANA NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 1.....60
FIGURA 34 – PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 1.....61
FIGURA 35 – PROBABILIDADES DE CONTER PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 1.....62
FIGURA 36 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA QUITINASE 2 E DA ENDOQUITINASE BÁSICA DE *AEROMONAS HYDROPHILA*.....63
FIGURA 37 – DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 2.....64
FIGURA 38 – PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 2.....66
FIGURA 39 – ALINHAMENTO CHIT 3 E QUITODEXTRINASE DE *A. HYDROPHILA SUBSP. HYDROPHILA* ATCC 7966.....67
FIGURA 40 – DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 3.....68
FIGURA 41 – PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 3.....70
FIGURA 42 – PROBABILIDADES DE CONTER PEPTÍDEO SINAL NA

QUITINASE 3.....71
FIGURA 43 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE CHIT 1, 2 E 3.....72
FIGURA 44 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURA SECUNDÁRIAS EM ALINE PARA QUITINASE 2.....74
FIGURA 45 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURA SECUNDÁRIAS EM ALINE PARA QUITINASE 3.....75
FIGURA 46 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURA SECUNDÁRIAS EM ALINE PARA QUITINASE 1.....77
FIGURA 47 – MODELO DE ESTRUTURA POR HOMOLOGIA DA CHIT 1.....79
FIGURA 48 – GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA MODELO DA QUITINASE 1.....80
FIGURA 49 – DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA QUITINASE 1.....81
FIGURA 50 – RESÍDUOS CATALÍTICOS E PONTE DE CISTEÍNAS.....82
FIGURA 51 – PONTES DISSULFEO NA ESTRUTURA DA QUITINASE 1.....82
FIGURA 52 – RESÍDUOS CATALÍTICOS DA QUITINASE 1.....83
FIGURA 53 – MODELO DE SUPERFÍCIE DA QUITINASE 1.....83
FIGURA 54 – CHIT 1 COM A FENDA CATALÍTICA EM EVIDÊNCIA.....84
FIGURA 55 – ALINHAMENTO DA REGIÃO C-TERMINAL DA QUITINASE 1 E CHI92 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*.....85
FIGURA 56 – ALINHAMENTO DAS REGIÃO REPETIDAS NA QUITINASE 1 E CHI92 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*.....85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PUBLICAÇÕES COM ABORDAGEM METAGENÔMICA NA PROCURA POR ENZIMAS.....8
TABELA 2 – ESTIRPE E VETORES UTILIZADOS.....28
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....29
TABELA 4 – CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DO SISTEMA DE SEQUENCIAMENTO.....39
TABELA 5 – INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO.....40
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS CONTIGS 1 E 2 COM O GENBANK.....54
TABELA 7 – DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 1.....59
TABELA 8 – VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 1.....61
TABELA 9 – DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 2.....65
TABELA 10 – VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 2.....66
TABELA 11– DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 3.....69
TABELA 12 – VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 3.....70
TABELA 13 – ESTRUTURAS COM MAIOR SIMILARIDADE A CHIT 2.....73
TABELA 14 – ESTRUTURAS COM MAIOR SIMILARIDADE A CHIT 3.....75
TABELA 15 – ESTRUTURAS ESCOLHIDAS NO MHOLLINE PARA CHIT 1...77
TABELA 16 – ESTATÍSTICAS DA PLOTAGEM DE RAMACHANDRAN.....80

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: absorbância

AmpR: Ampicilina resistente

BLAST: *Basic Local Aligment Sequence Tool*

CBD: Carbohydrate Binding Domain (Domínio de ligação a carboidratos)

CDD: Conserved Domain Database (Banco de dados de domínios conservados)

ChBD: Chitin Binding Domain (Domínio de ligação a quitina)

cm: centímetros

CMC: carboximetil celulose

CmR : Cloramfenicol resistente

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxiribonucleosídeos trifosfato

$D.O._{600}$: Densidade ótica a 600 nm

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EUA: Estados Unidos da América

g: grama

GlcN: D-glucosamina

GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina

× *g*: Força Centrífuga Relativa

h: Hora

kb: quilobase

kg: quilograma

KmR : Canamicina resistente

kV: quilovolts

L: litro

LA: meio de cultivo LB agar

LB: meio de cultivo Luria-Bertani

LMP: Low Melting Point (Baixo Ponto de Fusão)

m: massa

M: molar (mol/L)

MAF: Biblioteca metagenômica da Mata Atlântica paranaense

min: Minutos

mL: mililitros

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

nm: nanômetros

nº: número

ORF: Open reading frame (Região Codificadora de Proteína)

pb: Pares de Bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Amplicação em Cadeia da Polimerase)

PDB: Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)

pI: Ponto isoelétrico

PIB: Produto Interno Bruto

PM: Peso molecular

PR: Paraná

QUOs: quito-oligossacarídeos

rpm: rotações por minuto

seg: Segundos

SLP: Biblioteca metagenômica do solo da lagoa de tratamento

SmR :Estreptomicina resistente

TB: meio de cultivo Terrific Broth

Tris: Tris hidroxi-metil-aminometano

U: unidades de enzima

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

v: Volume

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosideo

RESUMO

A Metagenômica permite a aplicação de técnicas de biologia molecular em organismos não cultiváveis e têm tido um grande impacto na descoberta de novas enzimas. Para identificação de novos genes de enzimas hidrolíticas foram analisadas duas bibliotecas metagenômicas: uma do solo da Mata Atlântica paranaense (MAF) e outra do solo contaminado por gordura de uma planta de tratamento de resíduos industriais (SLP). Essas bibliotecas foram estocadas na forma de conjuntos de clones contendo 100.000 e 500.000 clones, respectivamente, com um tamanho médio de inserto de 30 kb clonados no vetor fosmidial pCC2FOS. A triagem funcional foi realizada em meio sólido LA contendo um substrato específico para proteases (1% leite em pó desnatado), amilases (1% amido), celulases (0.2% carboximetilcelulose) ou quitinases (2% quitina coloidal). Como resultado foram encontrados 23 clones positivos para protease e 17 para quitinase pertencentes às duas bibliotecas. Análise de restrição com as endonucleases *Bam*HI e *Eco*RI revelou três padrões diferentes para os clones de protease e quatro padrões para os de quitinase. Todos os clones positivos foram retransformados e somente o clone CHI1 manteve atividade quitinolítica. Uma sub-biblioteca de CHI1 foi construída em pUC18 e os plasmídeos dos subclones com atividade foram purificados e submetidos a mutagênese por inserção de transposon. As extremidades dos insertos de DNA de todos os subclones e mutantes com inserção de transposon foram sequenciados para obtenção de sequências consenso estendidas. A comparação dessas sequências com o GenBank através da ferramenta BlastX revelou três genes de quitinase com identidades entre 78 e 93% com Chi1 de *Aeromonas punctata* (Chit1), um endoquitinase básica de *A. hydrophila* (Chit2) e uma quitodextrinase de *A. hydrophila subsp. hydrophila* (Chit3). No PDB poucas estruturas similares estão disponíveis e o programa Modeller foi utilizado para construir um modelo de estrutura por homologia somente para o gene da Chit1, que apresentou 75% de identidade com a sequência de aminoácidos da estrutura de ChiA de *Serratia marcescens*. Os outros genes apresentaram cerca de 30% de identidade com Chi2 de *Carica papaya* e ChiB de *S. marcescens*, respectivamente. Chit1 e 3 pertencem a família 18 das glicosil hidrolases e a análise de suas sequências identificou-as como exoquitinases secretadas. Chi2 pertence a família 19 das glicosil hidrolases, geralmente encontradas em plantas, e também possui um domínio de lisozima que pode fornecer uma atividade antibacteriana. Quitinases podem ter atividade antifúngica e antibacteriana, além de serem utilizadas na produção de quito-oligômeros e N-acetilglucosamina. Essas moléculas são aplicadas como promotores de crescimento em plantas, imunoestimuladores, agentes antitumorais e antibacterianos. Os três genes de quitinases são novos e possuem potencial de aplicação como agentes de biocontrole e na produção de derivados de quitina.

ABSTRACT

Metagenomics allows the application of molecular genomics to consortia of non-cultivable microbes and has had substantial impact on the discovery of novel industrial enzymes. In order to identify new genes of hidrolytic enzymes we screened two fosmid metagenomic libraries; one from Atlantic Forest soil (MAF) and another from an animal fat-contaminated soil from an industrial wastewater treatment plant (SLP). These libraries were stored as pools and have 100,000 and 500,000 clones, respectively, with an average insert size of 30 kb cloned into the pCC2FOS fosmid vector. Functional screening was carried out on LB agar plates containing specific substrates for proteases (1% skimmed milk), amylases (1% starch), cellulases (0.2% carboximethylcellulose) and chitinases (colloidal chitin). As a result, 23 protease positive and 17 chitinase positive clones were found in the SLP and MAF libraries. Restriction analysis with *Bam*HI and *Eco*RI endonucleases revealed three different restriction patterns among the protease activity bearing fosmids and four patterns among those conferring chitinase activity. All positive clones were retransformed and only clone CHI1 retained chitinase activity. A plasmid sub-library of CHI1 was constructed in pUC18 and subclone plasmids with activity were purified and submitted to transposon insertion mutagenesis. All subclones and transposon insertions mutants were sequenced. Contigs obtained were analysed with BlastX and three chitinases genes were found revealing identities between 78 and 93% with chitinase 1 from *Aeromonas punctata* (Chit1), basic endonuclease from *A. hydrophila* (Chit2) and chitodextrinase from *A. hydrophila subsp. hydrophila* (Chit3). On PDB few similar structures were available and the Modeller software was used to construct an homology structure model for Chit1 gene that presents 75% identity with ChiA from *Serratia marcescens*. Other genes had 30% similarity to structures of Chi2 from *Carica papaya* and ChiB from *S. marcescens*, respectively. Chit1 and 3 belong to glycosil hydrolases family 18, and sequence analysis identified them as secreted exochitinases. Chi2 belongs to glycosil hydrolases family 19, generally found in plants, and also have a lysozyme domain that can provide an antibacterial activity. Chitinases may have antifungal and antibacterial activity and are used on chitooligomers and GlcNAc production. These compounds are applied as growth promoters in plants, imunoenhancers, antitumoral and antibacterial agents. The three chitinases are new genes with potential application as biocontrol agents and on chitin derivatives production.

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo enzimas são utilizadas em processos biotecnológicos. A demanda por novas enzimas, para melhorar processos existentes ou estabelecer novos processos, cresce na indústria em relação aos métodos de síntese orgânica tradicionais, dado às características das reações enzimáticas como condições brandas de reação, compatibilidade com o ambiente, quimio-, regio- e enantioseletividade (SCHMID et al., 2001).

Apesar disso, a expansão da biocatálise comercial é frequentemente limitada devido à falta de enzimas para aplicações específicas ou seu baixo desempenho. Estratégias de otimização de enzimas por técnicas, tais como planejamento racional de proteínas e evolução direta, têm sido utilizadas (BORNSCHEUER e POHL, 2001; LUTZ e PATRICK, 2004; CHICA, DOUCET e PELLETIER, 2005). Outra abordagem de grande potencial é a procura de novas enzimas na diversidade natural.

A evolução através de longos períodos de tempo tornou os micro-organismos aptos a se desenvolverem em diferentes condições ambientais. Essas adaptações podem resultar em produção de enzimas e compostos bioativos úteis em diversos processos tecnológicos. Entretanto a maior parte dos micro-organismos não são cultiváveis em laboratório, assim uma gama enorme de diversidade é perdida quando apenas os métodos convencionais de isolamento são utilizados na procura de enzimas e compostos bioativos (LORENZ e SCHLEPER, 2002).

Técnicas independentes de cultivo são uma alternativa aos métodos tradicionais de bioprospecção e envolvem a extração do DNA de amostras de um ambiente e sua clonagem em vetores para construir as chamadas bibliotecas metagenômicas. Essas bibliotecas podem ser analisadas para identificação de novos genes e vias metabólicas por comparação de sequências em banco de dados ou seleção de proteínas ou fármacos produzidos pelo hospedeiro (LORENZ e SCHLEPER, 2002). Dessa forma, cerca de 99% dos micro-organismos não detectados no isolamento convencional, podem ter seus genomas analisados na procura por novas biomoléculas e na geração de conhecimento da ecologia microbiana (WOLFGANG et al., 2004).

Nesse trabalho foram selecionados clones em bibliotecas metagenômicas de solo da Mata Atlântica e da lagoa de tratamento de efluentes da Perdigão de Carambeí-PR que apresentaram atividade de hidrolases de interesse comercial como: celulases, amilases, proteases e quitinases.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da Metagenômica

Enzimas com características especiais como alta termoestabilidade, enantioseletividade e tolerância a solventes orgânicos são requeridas nos processos industriais. Devido a exigência de cada vez mais melhorar o desempenho desses processos na indústria, enzimas com novas características necessitam ser descobertas ou desenvolvidas. Nesse sentido, a metagenômica é uma ferramenta reconhecidamente eficiente na busca por genes que codifiquem hidrolases com características especiais e superiores em relação às atuais.

A metagenômica é resultante da quebra de paradigmas nos procedimentos tradicionais de seleção e cultivo de micro-organismos. Tradicionalmente, a busca por um micro-organismo que apresente características especiais é iniciada pela etapa de triagem, ou seja, pelo isolamento e seleção de micro-organismos com propriedades desejadas. Este procedimento depende de técnicas de isolamento e cultivo de micro-organismos em meios sintéticos, onde apenas micro-organismos cultiváveis em laboratório podem ser detectados e, consequentemente, somente estes têm sido explorados. É justamente nesta etapa inicial de triagem que reside a maior limitação desta metodologia, pois se a ciência atual é capaz de cultivar 3000 espécies de bactérias em meios de cultura artificiais, a vasta maioria, provavelmente mais de 99%, permanece inexplorada, pois são compostas por micro-organismos cujas condições de cultivo não são conhecidas ou são parasitas obrigatórios (SASSON et al., 2005; HANDELSMAN et al., 1998). A metagenômica pretende tornar possível o estudo destes micro-organismos.

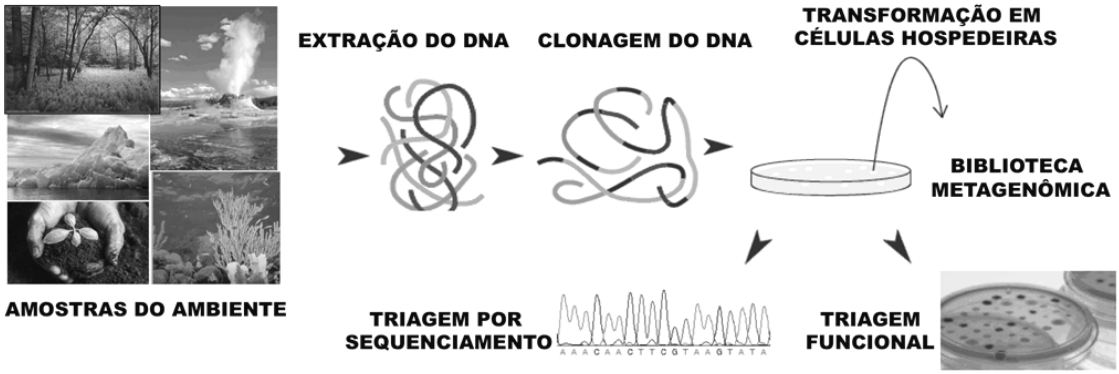
O termo Metagenômica foi primeiramente usado por Jo Handelsman (HANDELSMAN et al., 1998) e atualmente é definido como “a aplicação de técnicas de genômica moderna para o estudo de comunidades de micro-organismos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo em laboratório das espécies individuais”.

A técnica consiste na seleção e coleta de amostras do ambiente e na extração dos fragmentos de DNA. Essa extração pode ser de forma direta, quando a lise celular é feita com toda a amostra (OGRAM et al., 1987), ou de forma indireta, quando é feita a separação das células do meio e posteriormente é realizada a lise celular (HOLBEN et al., 1988). Em seguida, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a

outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA, com capacidade independente de replicação, denominada DNA recombinante, e, finalmente, essas moléculas de DNA são transformadas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, originando uma coleção de clones denominada biblioteca metagenômica. Os clones são submetidos à etapa de triagem para a propriedade desejada, como produção de antibióticos, biosurfactantes ou enzimas como proteases, celulases, amilases ou quitinases (Figura 1; SINGH, 2009a).

Mas a metagenômica não é utilizada apenas para identificar um gene funcional, também tem sido utilizada para estimar a diversidade microbiana, entender a dinâmica populacional de uma comunidade ou obter o genoma completo de um organismo não cultivável (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2008).

FIGURA 1 - ETAPAS DA METAGENÔMICA



A técnica da metagenômica envolve os seguintes passos: 1) coleta das amostras de um determinado ambiente; 2) extração do DNA das amostras; 3) clonagem do DNA em um vetor; 4) transformação do DNA recombinante em uma célula hospedeira; 5) triagem por característica expressa ou por semelhanças de sequências.

Uma biblioteca genômica é o conjunto de clones recombinantes que representam todo o DNA genômico de um organismo individual. Já na biblioteca metagenômica**,** o conjunto de clones recombinantes contém parte do DNA presente em determinado ambiente ou amostra, não sendo possível garantir que todo o DNA de todas as espécies estejam presentes na biblioteca. O objetivo da metagenômica é a obtenção de um número suficiente de clones para a identificação de genes que codifiquem enzimas que possuam uma atividade desejada. Essa abordagem pode ser utilizada, inclusive, para a

obtenção de uma via metabólica inteira. Bibliotecas metagenômicas podem ser multiplicadas e mantidas por muitos anos (BROWN, 2003).

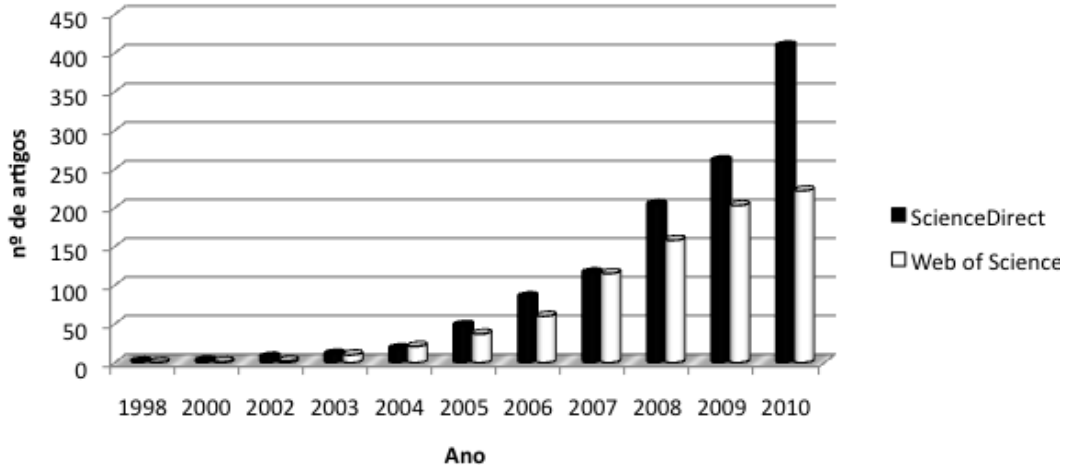
A enorme diversidade biológica e molecular que se torna acessível pela técnica da metagenômica é verdadeiramente surpreendente. Um grama de solo de floresta contém 40 milhões de células procarióticas, podendo chegar a 2 bilhões em solos cultivados, sendo o número de genomas procarióticos distintos estimado entre 2000 e 18000 por grama de solo. Estes números podem estar subestimados, pois genomas que representam espécies raras e desconhecidas podem ter sido excluídos das análises (DANIEL, 2005).

A partir da tecnologia de metagenômica e da enorme diversidade microbiológica disponível, é possível que um gene antes desconhecido, pertencente a um micro-organismo não cultivável encontrado em solo brasileiro, capaz de codificar uma importante hidrolase, seja inserido em uma bactéria como *Escherichia coli* e o clone resultante cultivado para a produção industrial de uma nova enzima. A enzima e o gene obtidos a partir da metagenômica podem ser patenteados e a tecnologia desenvolvida pode ser transferida para o setor produtivo (SHORT, 2004).

A metagenômica tem sido foco de intensa pesquisa a nível mundial, porém apenas países com forte investimento em tecnologia de ponta tem se destacado. Estados Unidos, Alemanha, França, Inglaterra, China e Coréia do Sul são os países com o maior número de publicações na área (Web of Science, 2011).

Os primeiro trabalhos sobre metagenômica surgiram no final da década de 90 (HANDELSMAN et al., 1998) e, desde então, o número de publicações sobre esse assunto tem crescido de forma exponencial (Figura 2).

FIGURA 2 - ARTIGOS RELACIONADOS À METAGENÔMICA



Número de artigos publicados por ano de 1998 a 2010 relacionados a metagenômica. A palavra-chave "metagenomic" foi utilizada para a pesquisa de artigos. Fonte: Science Direct e Web of Science.

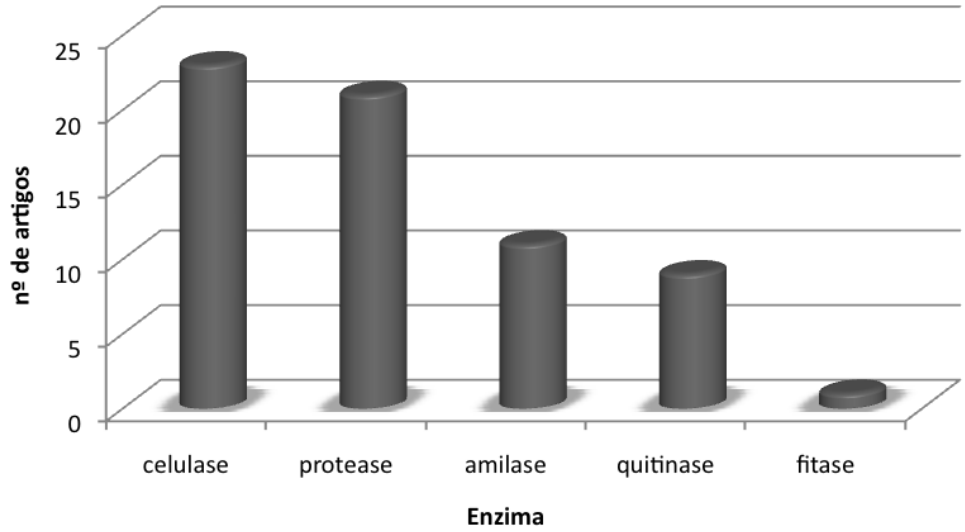
Os artigos relacionando a procura por enzimas em bibliotecas metagenômicas ainda são poucos. As carboidrases estão em evidência devido ao seu grande uso na indústria e a constante necessidade de enzimas com características peculiares para serem usadas em processo novos ou aprimorando os processos já existentes. O recente interesse na produção de biocombustíveis e a utilização de materiais celulósicos para a produção de etanol estimularam a pesquisa e busca por novas celulases (Figura 3; ZHANG et al., 2006).

A maioria dos artigos envolvendo quitinases de organismos não cultiváveis encontram novos genes em ambientes aquáticos. Cottrell et al. (1999), encontraram 23 clones com atividade quitinolítica em uma biblioteca metagenômica plasmidial de DNA da água da costa e do estuário de Delaware, EUA. Entre esses clones encontraram exoquitinases, quitobiosidases e uma endoquitinase por análise da atividade dos extratos protéicos de cada clone. Em 2006, LeCleir et al. encontraram uma nova quitinase da família 20 das glicosil hidrolases em uma biblioteca do estuário de Dean Creek, nos EUA.

Alguns estudos analisam sequências parciais de quitinases amplificadas por PCR. LeCleir et al. (2004) analisaram 108 sequências com cerca de 900 pb provenientes de diversos ambientes aquáticos dos EUA. Hjort et al. (2009) obtiveram 64 sequências que continham cerca de 240 pb e foram obtidas do DNA de solo supressivo a fitopatógenos, na Suécia. Já Terahara et al. (2009) analisaram a diversidade de

quitinases bacterianas de solo arado provenientes de diversas localidades do Japão com 501 sequências de cerca de 400 pb.

FIGURA 3 - ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS COM ABORDAGEM METAGENÔMICA



Número de artigos publicados entre 1998 e 2010 com abordagem metagenômica na procura por novas enzimas. Foram utilizadas as palavras-chave “metagenomic” ou “metagenome” ou “uncultured” e “lipase”, “cellulase”, “protease”, “amylase”, “chitinase” ou “phytase”. Fonte: Web of Science.

2.1.1 Identificação de Clones Ativos na Biblioteca Metagenômica

A metagenômica fornece duas abordagens para a triagem de novas biomoléculas: a procura na informação genética por sequenciamento e PCR e a procura por clones funcionais. Na primeira abordagem sequências conservadas homólogas para uma determinada função ou proteína são procuradas nos dados de sequenciamento, muitas enzimas foram descobertas assim, incluindo quitinases e lipases (FERRER et al., 2009; LEFEVRE et al., 2007). Mesmo assim, essa abordagem depende da disponibilidade de dados de sequências homólogas conservadas além de falhar na identificação de novas enzimas com a mesma função, mas estruturas e sequências diferentes das enzimas conhecidas (SINGH, 2009a).

A segunda abordagem consiste em testar os clones para uma atividade em particular, como reações de catálise enzimática ou propriedades atribuídas a um metabólito, como antibióticos ou agentes antitumorais. O maior inconveniente é a

triagem de milhares a milhões de clones para a função desejada. A *E. coli* é o hospedeiro escolhido quando uma biblioteca metagenômica ampla e complexa é desejada, devido a sua estabilidade genética e excelente competência de transformação. Porém a expressão de genes heterólogos pode ser ineficiente no hospedeiro utilizado, sendo outro problema na triagem funcional (SINGH, 2009a; LORENZ et al., 2002).

A maior parte dos artigos publicados abordando a procura de enzimas novas em bibliotecas genômicas utiliza o método de seleção funcional ao invés da seleção por sequências similares (Tabela 1). Com a seleção funcional, há um grande potencial em adquirir novas enzimas com sequências totalmente desconhecidas e a garantia de obter apenas enzimas ativas.

A maneira mais fácil para uma abordagem funcional é uma reação que produza cor, na qual a enzima alvo converta um substrato incolor em um colorido, ou vice-versa (SINGH, 2009b). Na triagem com placas de Petri, a degradação do substrato da enzima pode ser uma forma de selecionar os clones positivos. Quando ocorre a expressão da enzima, o seu substrato, contido no meio, é degradado formando um halo ao redor da colônia, que poderá ser visualizado utilizando um corante específico, como no caso da celulase, ou sem coloração, quando o meio é opaco como o do leite para seleção de proteases.

TABELA 1 - PUBLICAÇÕES COM ABORDAGEM METAGENÔMICA NA PROCURA POR ENZIMAS

Referência/ País	Amostra	Enzima	Vetor	Método de seleção	Nº. Clones (Tamanho do inserto)
COTTRELL et al., 1999 EUA	Água de estuário e da costa	Quitinases	Lambda ZAP II	LB/MUF-diNAG placas 96 poços	750.000 (5- 6,1 kb) 230.000 (1,8 - 4,2 kb)
LECIEIR et al., 2004 EUA	Habitats aquáticos	Quitinases	pCR2.1	PCR	160 (~550 pb)
VOGET et al., 2006 Alemanha	Solo	Celulases	Cosmídeo pWE15	LA/CMC 0,2%	1700 (~22 kb)
LÅMMLE et al., 2007 Alemanha	Solo	Proteases/ fosfatases/ amilase	Plasmídeo pJOE930	LA/Leite 2%; LA/indolil fosfato; LA/Amido 1%	560.000 (1,2 - 6,4 kb)
LEE et al., 2007 Coréia do Sul	Sedimentos oceânicos	Proteases	Fosmídeo pCC1FOS	La/Leite 1%	-
JONES et al., 2007 Irlanda	Esterco	Proteases	Fosmídeo pCC1FOS	La/Leite 1%	- (~40 kb)
LECIEIR et al., 2007 EUA	Água de estuário	Quitinases	Fosmídeo	LB/MUF-diNAG placas 96 poços	6000 (~40 kb)
HU et al., 2008 China	Solo	Xilanases	Plasmídeo pHBM803	LA/RBB-xilana 1%	24.000 (7-10 kb)
KIM et al., 2008 Coréia do Sul	Solo	Celulases	Fosmídeo (Yun et al., 2005)/ pSuperCosI	LA/CMC 0,1%	70.000 (-)
POTTKÅMPER et al., 2009 Alemanha	Água doce e Solo	Celulases	Cosmídeo pCosJP#	LA/CMC	3744 (-)
WANG et al., 2009 China	Solo	Celulases	Lambda ZAP Express	NZY agar/CMC	2–3 x10^4 partículas de fagos (6kb)
PANG et al., 2009 China	Solo	Celulases	Cosmídeo pWEB::TNC	LA/CMC 0,1%	100.000 (20- 50 kb)
HJORT et al., 2010 Suécia	Solo	Quitinases	Fosmídeo	PCR	7800 (~30 kb)

Alguns artigos publicados que utilizam bibliotecas metagenômicas para a triagem de hidrolases. Busca realizada no site do Web of Science em dezembro de 2010.

2.2 Importância das Enzimas na Indústria

2.2.1 A Demanda Mundial por Enzimas

A empresa *The Freedonia Group Inc.*, especializada em pesquisa de mercado no ramo industrial, elaborou um estudo "World Enzymes Market" no qual indica que a demanda mundial por enzimas terá um crescimento de 6,3% ao ano e alcançará a marca

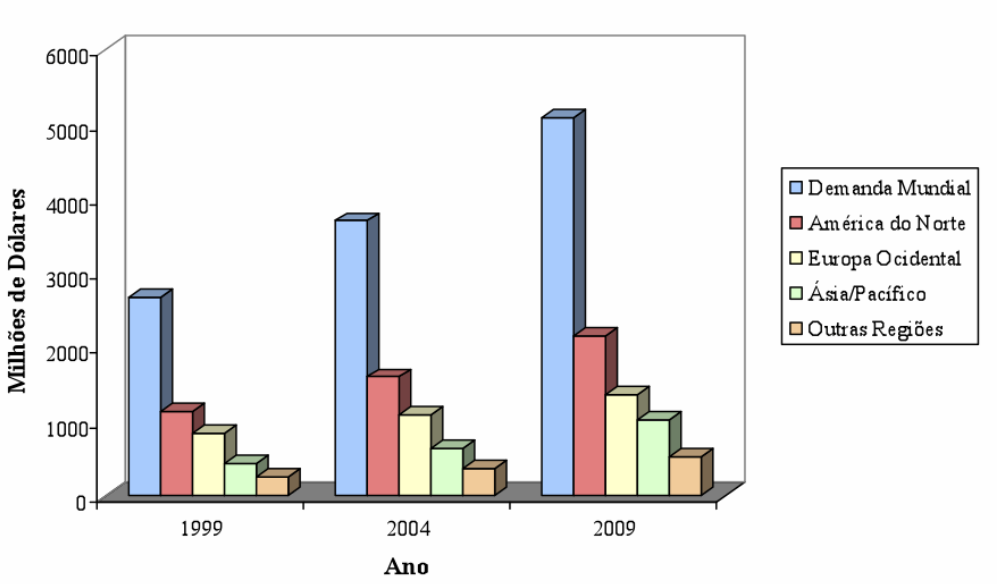
de 7 bilhões de dólares em 2013. A Figura 4 mostra a demanda mundial de enzimas de 1999 a 2009. Com a crise mundial em 2009 houve uma desaceleração em todos os campos da economia, mas já ocorre uma lenta recuperação dos países desenvolvidos. As economias emergentes serão as primeiras a lucrar com essa tecnologia devido a rápida recuperação da crise, o acelerado crescimento econômico e aumento do PIB. Nas economias mais avançadas como a dos EUA, Europa Ocidental e Japão, a maturidade de determinados mercados, como o de alimentos, bebidas e detergentes, tende a limitar os avanços nesta área, exceto para as novas oportunidades geradas pela biocatálise enzimática, sobretudo as empregadas na indústria farmacêutica. Enzimas especializadas, como os biocatalisadores empregados na produção de fármacos, devem crescer mais rapidamente do que as enzimas de aplicação industrial, embora o mercado de alimentação animal deva continuar em forte crescimento generalizado, principalmente nos países emergentes da Ásia, impulsionado em grande parte pelo aumento do uso da enzima fitase (ALLBUSINESS, 2004).

Historicamente, a demanda por enzimas tem se concentrado nas economias mais desenvolvidas devido ao alto valor agregado da natureza das enzimas e da elaborada tecnologia necessária para o seu desenvolvimento, produção e aplicação. Todavia, países como China, Índia e Coréia do Sul, os quais têm emergido como grandes centros industriais possuidores de grandes programas de pesquisa e desenvolvimento, deverão ter atuação destacada no mercado mundial neste setor (ALLBUSINESS, 2004).

A demanda mundial por enzimas teve um grande crescimento de 2003 a 2008, devido ao lançamento bem sucedido de fármacos contendo enzimas e do rápido aumento dos preços da energia mundial, que torna os processos e produtos utilizando enzimas de melhor custo efetivo (REPORTLINKER, 2009).

A Novozymes atualmente lidera o fornecimento de enzimas para o mercado alimentício. Entretanto, a Danisco tem buscado a liderança no mercado desde 2005 com a aquisição da Genencor, que passou a ser uma divisão da Danisco. A Cargil, maior fornecedora de matéria prima para indústria alimentícia e de bebidas, entrou no mercado em 2006 com a aquisição da divisão de aditivos alimentares da Degussa. Outros fornecedores de expressão no setor incluem AB Enzymes, Amano Enzyme, Chr. Hansen, DSM e ValleyResearch (FOODNAVIGATOR, 2006).

FIGURA 4 - DEMANDA MUNDIAL POR ENZIMAS



Demanda mundial por enzimas e em diferentes regiões do mundo entre os anos de 1999 e 2009. Fonte: ALLBUSINESS, 2004.

Carboidrases e proteases são as principais enzimas empregadas na alimentação animal. Proteases, amilases, lipases e celulases são frequentemente usadas em produtos para limpeza. A produção de químicos é um importante mercado tendo álcool fermentado como produto principal seguido por fármacos (esteróides e antibióticos), aminoácidos, proteínas, lipídios (triglicerídeos, fosfolipídios), têxteis e pele animal. No segmento têxtil, as celulases e amilases são as enzimas mais empregadas. No segmento de papel e celulose, que responde por 6% do mercado global, o uso mais notável é o da enzima xilanase empregada no pré-branqueamento da polpa de celulose ao invés de outros produtos químicos. A enzima amilase também é empregada neste segmento (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

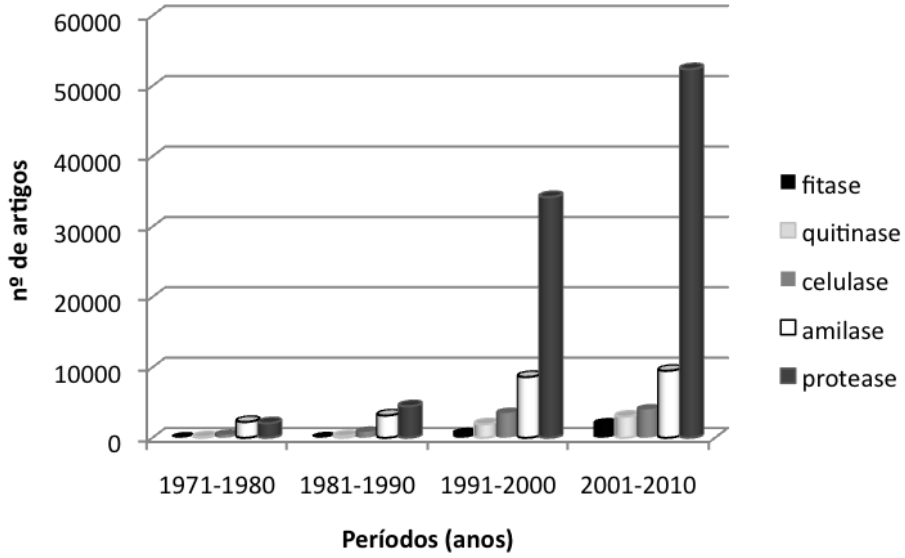
2.2.2 Aplicações Industriais de Hidrolases

A maioria das enzimas relevantes para a indústria são de origem microbiana, por isso a procura por novas enzimas microbianas é um ponto importante para o desenvolvimento dos bioprocessos industriais (UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009).

As enzimas mais utilizadas na indústria são hidrolases, enzimas que catalisam a quebra de polímeros utilizando a água. O interesse da pesquisa acadêmica com enzimas reflete o interesse da indústria, proteases e carboidrases são assuntos com grande

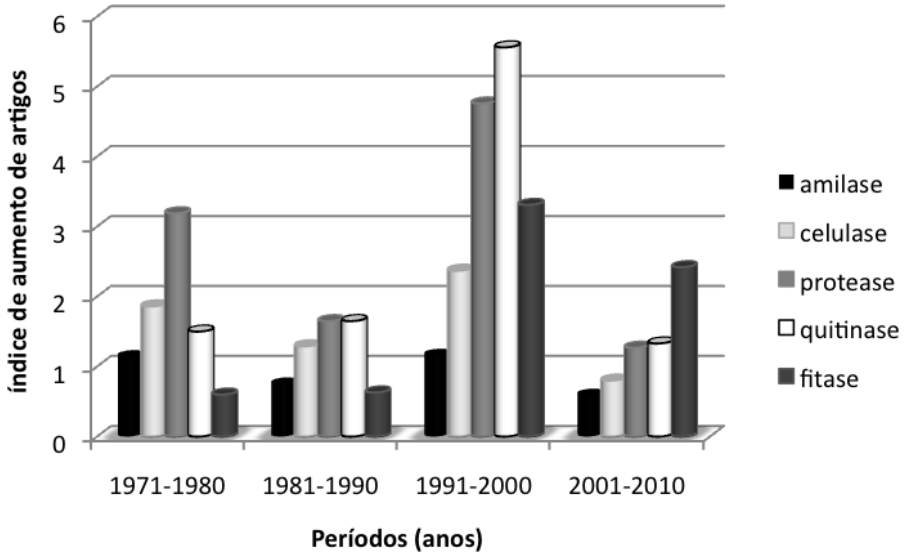
número de artigos publicados (Figura 5). Mas se nota um aumento de interesse em outras enzimas como quitinase e fitase a partir da década de 90 (Figura 6).

FIGURA 5 - ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS



Número de artigos publicados nas décadas de 70, 80, 90 e de 2010 relacionados às enzimas hidrolíticas. As palavras chaves utilizadas foram: phytase, cellulase, chitinase, amylase e protease. Fonte: Web of Science

FIGURA 6 - AUMENTO DE ARTIGOS RELACIONADOS A ENZIMAS



Índice de aumento ([X-Y]/Y; X-número de artigos publicados até o final da década representada; Y- número de artigos publicados até o final da década anterior) nas décadas de 70, 80, 90 e 2010. Fonte: Web of Science

2.2.2.1 Proteases

As proteases alcalinas bacterianas têm numerosas aplicações em diversos setores da indústria. Várias empresas em todo o mundo lançaram com sucesso produtos baseados em proteases alcalinas, como a Novo Nordisk (Dinamarca), Genencor (EUA), Solvay (Alemanha) e Nagase Biochemicals (Japão). Na indústria de alimentos e ração as proteases são utilizadas na preparação de hidrolisados de proteína derivados de caseína, soro de leite ou proteína de soja. A síntese de peptídeos e a indústria de couro utilizam-nas como alternativas a compostos químicos (GUPTA et al., 2002).

O inconveniente da utilização de enzimas é a baixa atividade enzimática em condições anidras, por isso é de importância prática descobrir maneiras de ativar enzimas em solventes orgânicos (KUMAR e TAKAGI, 1999). Alguns estudos demonstraram a capacidade de utilizar proteases em solventes orgânicos para a catálise de peptídeos e proteases imobilizadas em suportes insolúveis para a síntese de peptídeos (GOLOLOBOV et al. e WILSON et al., 1994).

Desde 1956, proteases são utilizadas em produtos detergentes retirando o material protéico de manchas. Além de seu uso em sabão em pó para roupas as proteases estão presentes na formulação de detergentes para louças, detergentes de limpeza industrial e solução de limpeza de lentes de contato. Muitos parâmetros são avaliados na escolha de uma boa protease para produtos detergentes, como a compatibilidade com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e descorantes), boa atividade no pH e temperatura de lavagem (alta atividade em temperaturas entre 10 e 20ºC), compatibilidade com a força iônica da solução detergente, degradação da mancha, potencial de remoção, estabilidade e vida útil (SHOWEL,1999; GUPTA et al., 2002). Há sempre a necessidade de novas enzimas com novas propriedades que possam aprimorar o desempenho do processo no qual ela atua.

No tratamento de couro a utilização de proteases é de fácil controle, rápida e diminui os resíduos lançados no ambiente (ANDERSEN, 1998). Outros processos que utilizam proteases são a decruagem da seda antes do tingimento, o tratamento de resíduos industriais e domésticos, a recuperação da prata de filmes fotográficos e de raio-X e a preparação de elastoterase aplicada em ferimentos (GUPTA et al., 2002).

2.2.2.2 Amilases

Amilases foram introduzidas no processo de produção de xarope de D-glucose há pouco tempo, substituindo o método de hidrólise ácida. A partir do amido podem ser produzidos xaropes de D-glucose, D-frutose e D-maltose, ciclodextrinas, utilizando as ciclodextrinas glicosiltransferases (CGTases), e açúcar cristalizado, através da cristalização do xarope de D-glucose. Um inconveniente das α-amilases é que elas não possuem atividade em pH abaixo de 5,9 e nas altas temperaturas utilizadas no processo de formação do xarope, por isso o pH natural da pasta de amido, pH 4.5, deve ser ajustado para pH 6.0 com adição de NaOH. Novas amilases com atividade em pH ácido e temperaturas altas facilitariam o processo de produção de xaropes.

Na panificação, a adição de amilases libera mais açúcares fermentáveis na massa aumentando a produção de gás carbônico pelas leveduras do fermento e aprimorando a textura do produto final (VAN DER MAAREL et al., 2002). Além disso, as α-amilases aumentam a durabilidade da maciez de produtos assados, mas, quando em grandes quantidades na massa, deixa-a com aspecto pegajoso. O responsável por esse efeito é o aumento da quantidade de maltodextrinas ramificadas e o uso de enzimas desramificadoras, como a pululanase, pode resolver esse incoveniente (DE STEFANIS e TURNER, 1981; CARROLL et al., 1987). β-amilases, enzimas ramificadoras e desramificadoras, amilases maltogênicas e amiloglucosidases são utilizadas para aumentar a vida útil de produtos de panificação.

Além do seu uso na sacarificação e liquefação do amido, as α-amilases possuem aplicações na produção de soluções de amido estáveis e viscosas para a utilização em cola de fibras têxteis, clarificação de cervejas e sucos de frutas e o pré-tratamento de ração animal para melhorar a sua digestibilidade. Amilases e amiloglucosidases, que são ativas em pH ácido, são usadas no processamento de frutas contendo amido, especialmente de maçãs durante os primeiros estágios, para prevenir a turvação do suco (GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1996).

As amilomaltases têm uma aplicação potencialmente interessante na produção de géis de amido termo-reversíveis. Um gel de amido não pode ser dissolvido em água após ter sido geleificado (retrogradado), mas um gel tratado com amilomaltase pode ser dissolvido inúmeras vezes por aquecimento. Não existem amilomaltases disponíveis comercialmente e géis termorreversíveis ainda não são produzidos industrialmente

(VAN DER MAAREL et al., 2002). Um campo de aplicação de amilases que cresce é a indústria de sabão em pó para roupas e detergente para louças.

As ciclodextrinas glicosiltransferases podem ser utilizadas na produção de ciclodextrinas que têm aplicações em química analítica, agricultura, medicamentos, alimentos e cosméticos. O principal problema é que todas as enzimas conhecidas produzem uma mistura de ciclodextrinas que devem ser separadas antes da sua utilização. Na produção de compostos glicosilados, como o adoçante steviosídeo extraído das folhas da planta *Stevia rebaudania*, as CGTases agem aumentando a solubilidade e diminuindo o amargor (PEDERSEN et al., 1995).

2.2.2.3 Celulases e Hemicelulases

O interesse por celulases e polissacaridases relacionadas tem aumentado desde o começo da década de 50 devido ao potencial de converter lignocelulose, o material biológico mais abundante no planeta, em D-glucose e açúcares solúveis. Pesquisas básicas e aplicadas, durante os anos 80 e 90, demonstraram que a bioconversão de lignocelulose em açúcares solúveis era, na verdade, difícil e inviável economicamente (COUGHLAN, 1985; MANDELS, 1985). Mesmo assim, pesquisas com celulases, hemicelulases e pectinases revelaram potencial biotecnológico em várias indústrias, como de alimentos, bebidas e vinho, ração animal, têxtil, sabão em pó, amaciante, polpa e papel, agricultura, assim como em pesquisa e desenvolvimento (BHAT, 2000).

Uma combinação de pectinases (pectina liase, pectina metilesterase, endo e exopoligalacturonases, pectina acetilesterase, ramnogalacturonase, endo e exoarabinases), celulases (endo e exoglucanases e celobiases) e hemicelulases (endo e exoxylanases, galactanases, xiloglucanases e manases), coletivamente chamadas de enzimas de maceração, são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais (GALANTE et al., 1998; GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1996). As enzimas de maceração ainda são utilizadas para melhorar a estabilidade e textura de néctares e purês diminuindo sua viscosidade rapidamente e facilitando sua concentração (GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1996; UHLIG, 1998). Algumas frutas e vegetais têm uma melhora de seu aroma e das características voláteis após tratamento com uma infusão de pectinases e β-glucosidases.

Uma maior eficiência na extração de óleo de oliva é obtida utilizando uma mistura de pectinases, celulases e hemicelulases. Nesse processo as principais vantagens da maceração e extração enzimática são o aumento do rendimento de óleo em condições de processamento a frio, cerca de 2 kg a mais de óleo por 100 kg de azeitonas, melhor fracionamento na centrifugação do mosto oleoso, óleo com altos níveis de antioxidantes e vitamina E, baixa indução de ranço e baixo conteúdo de óleo no resíduo aquoso (GALANTE et al., 1998).

Recentemente, hemicelulases, em especial as endoxilanases estão sendo utilizadas no melhoramento de produtos de panificação. O mecanismo de ação que resulta nesse melhoramento não é bem conhecido, mas se especula que a hidrólise das arabinoxilanas presentes na massa pelas endoxilanases facilitaria a redistribuição da água na massa e no pão sendo responsável pelos efeitos favoráveis observados no manuseio da massa, como volume, textura e estabilidade do pão. Além disso, a concentração de arabinoxilooligossacarídeos, que apresentam efeitos benéficos para a saúde humana, é maior (POUTANEN, 1997).

Na fabricação de cerveja, quando é utilizada cevada que não sofreu maltagem adequada, estão presentes no mosto polissacarídeos não amílicos, principalmente β-glucanas solúveis. Durante o processo, esses polissacarídeos formam géis que dificultam a filtração do mosto e desenvolvem turvação no produto final. Para resolver esse problema β-glucanases microbianas são adicionadas durante a trituração ou fermentação primária da cevada (GALANTE et al., 1998). Na produção de vinho, três enzimas são utilizadas, pectinases, β-glucanases e hemicelulases, que ajudam na maceração da casca, facilitam a clarificação e filtração do mosto e melhoram a qualidade e estabilidade do vinho. As β-glucosidases tem sido utilizadas por serem capazes de melhorar o aroma do vinho através da modificação de precursores glicosilados naturalmente presentes na bebida (GALANTE et al., 1998; CALDINI et al., 1994).

Anteriormente, o efeito desgastado de roupas jeans e de sarja de Nimes era obtido por lavagem com pedras para desgastar o fio e soltar o corante. No processo de biopolimento são utilizadas celulases que quebram a fibra do fio liberando o corante. A abrasão mecânica da lavagem elimina facilmente o corante. As vantagens do biopolimento são diminuir o desgaste das máquinas de lavar causado pelas pedras, menor tempo de tratamento, menor resíduo pois o pó do polimento com pedras não é produzido, flexibilidade para criar e reproduzir novos produtos finais e possibilidade de

automatizar o processo com controle eletrônico de doses quando utilizada uma preparação líquida de celulases (GALANTE et al., 1998).

O maior inconveniente é a tendência do corante liberado redepositar-se no tecido, o que mascara o contraste de branco e azul do produto final. Foi reportado que a deposição do corante pode ser prevenida adicionando proteases junto à preparação de celulase. A razão entre celulase e protease e o pH são críticos para obter o máximo benefício neste processo (GALANTE et al., 1998).

Outros tipos de tecido utilizados em roupas que também possuem celulose, como algodão, linho, rami, viscose e lyocell, têm a tendência de produzir felpas e bolinhas na sua superfície. O biopolimento é utilizado durante o processamento têxtil para diminuir esse efeito. Algumas vantagens são a remoção das fibras soltas na superfície do tecido, aparência mais macia e lisa, melhora o brilho e uniformidade da cor, maior permeabilidade de umidade, novos e melhores acabamentos e efeitos e menor resíduo químico (BHAT, 2000).

Lyocell é uma fibra de celulose pura da polpa de madeira obtida por centrifugação após tratamento com N-óxido-N-metilmorfolina. É uma fibra para produção de tecidos, mas deve ser tratada com celulase para obter uma textura mais macia e maleável. Novas celulases específicas para a indústria têxtil estão sendo desenvolvidas que produzem tecidos macios e sem perda de resistência (GALANTE et al., 1998).

Nos produtos para limpeza de roupas, as celulases ajudam na remoção de manchas das fibras do tecido, retiram fibras soltas na superfície restaurando a maciez e a cor original do tecido. Apesar de a adição de celulase representar cerca de 0,4% do custo do produto, é considerada cara e, por isso são necessárias preparações alternativas de celulases para atrair o mercado de sabão e amaciante para roupas.

Na produção de polpa de celulose e papel, celulases e hemicelulases são utilizadas no processo mecânico de refinação e trituração. Estudo utilizando celobiohidrolase I de *Trichoderma* detectou uma redução de 30 a 40% do consumo de energia necessária para o processo e melhora na força de tração e qualidades da fibra de celulose (PERE et al., 1996). A hidrólise da hemicelulose na polpa por hemicelulases, principalmente xilanases, aumenta a extração da lignina da polpa kraft e diminui a quantidade de cloro necessária na etapa de branqueamento (SUURNAKKI et al., 1996a). Misturas de celulases e hemicelulases são utilizadas para modificar

propriedades da fibra melhorando a drenagem e homogeneidade da polpa, o que acelera o processo de produção do papel (POMMIER et al., 1990).

O uso de enzimas na descoloração da polpa de celulose inclui a hidrólise de tintas a base de soja por lipases e a liberação da tinta da superfície das fibras por celulases, xilanases e pectinases. A principal vantagem em utilizar enzimas na descoloração é a não necessidade do uso de álcali no processo. Quando utilizado pH ácido na descoloração enzimática, é prevenido o amarelamento alcalino, simplificado o processo, modificada a distribuição de tamanho das partículas de tinta e reduzida a poluição ambiental. As enzimas ainda melhoram o brilho e resistência da fibra e a limpeza da polpa reduzindo partículas finas (PRASAD et al., 1993).

Durante a produção mecânica de polpa, compostos como resina, lignina e hemicelulose são dissolvidos e liberados na drenagem. No branqueamento pectina também é liberada. Todos esses componentes causam sérios problemas na produção do papel, incluindo deposição de resina, manchas no papel e diminuição da desidratação. Utilizando carboidrases para hidrolisar esses componentes espera-se melhorar o desempenho da produção do papel (BHAT, 2000).

2.3 Quitinases

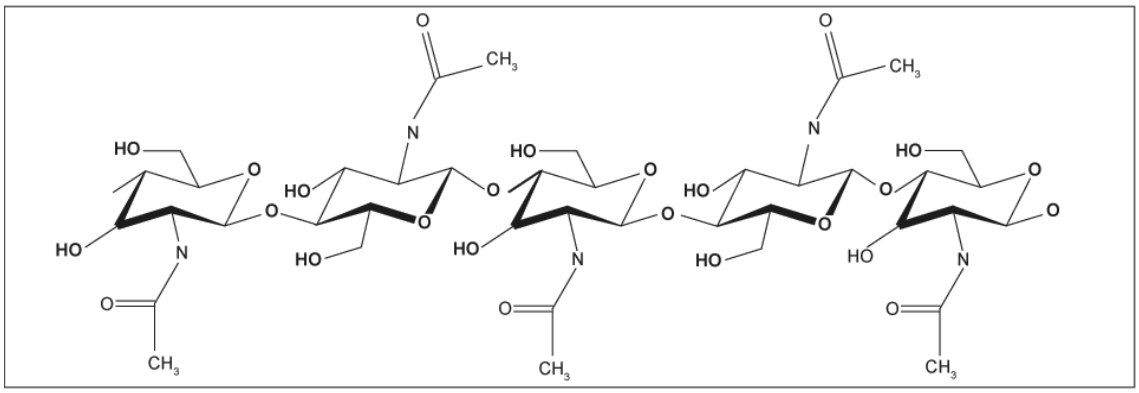
2.3.1 Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero linear composto por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) formando ligações β(1→4) (Figura 7). É o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, depois da celulose, estando presente na parede celular de fungos e leveduras e no exoesqueleto de artrópodes. É insolúvel em água e apresenta duas formas cristalinas polimórficas α e β. A α-quitina é composta por cadeias de GlcNAc paralelas e antiparalelas dispostas alternadamente, a β- quitina é menos comum e possui cadeias arranjadas em paralelo (MINKE e BLACKWELL, 1978; GARDNER e BLACKWELL, 1975; AAM et al., 2010).

A quitosana é a forma deacetilada parcial da quitina, portanto é um heteropolímero formado por resíduos de GlcNAc e D-glucosamina (GlcN) (Figura 8). Ao contrário da quitina é solúvel em soluções ácidas diluídas. Possui aplicações na agricultura, medicina, no tratamento de água e em cosméticos devido a sua não

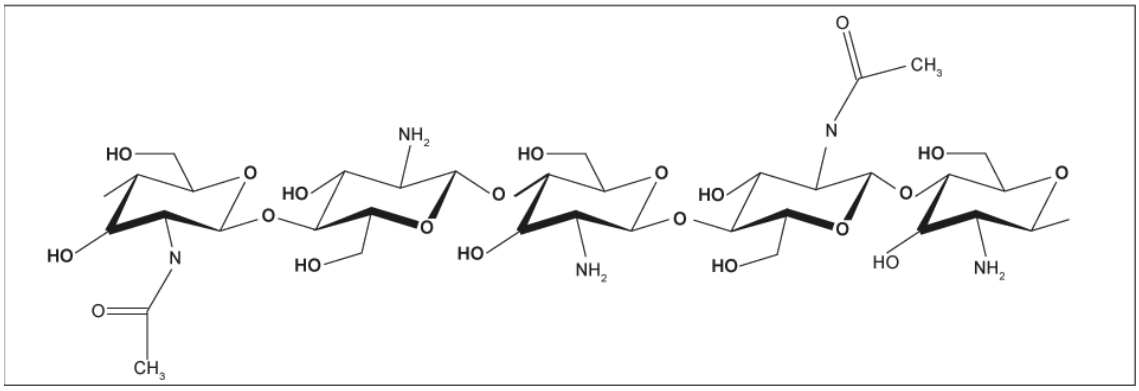
toxicidade, biocompatibilidade, biodegrabilidade e interessantes e diversas propriedades biológicas e físico químicas (HARISH PRASHNANTH e THARANATHAN, 2007; AAM et al., 2010).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA



Fonte: BORGOGNONI et al., 2006.

FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA



Fonte: BORGOGNONI et al., 2006.

Quito-oligossacarídeos (QUOs) são oligômeros produzidos pela hidrólise ácida ou enzimática de quitosana. Na hidrólise enzimática são utilizadas glicosil hidrolases como quitinases e quitosanases (AAM et al., 2010).

2.3.2 Classificação das Quitinases

Baseado na similaridade da sequência de aminoácidos as quitinases são agrupadas nas famílias 18, 19 e 20 das glicosil hidrolases (HENRISSAT e BAIROCH, 1993). A família 18 é evolutivamente diversa compreendendo quitinases de bactérias,

fungos, vírus, animais e algumas de plantas. A família 19 consiste de quitinases de plantas e algumas bactérias (HART et al., 1995). A família 20 inclui as β-N-acetilhexosaminidases de bactérias, streptomicetos e humanos (DAHIYA et al., 2006). Perakis et al. (1993) dividiram as quitinases em pertencentes à Classe I e II, que correspondem às famílias 19 e 18, respectivamente.

A aquisição de genes de quitinase da família 19 em bactérias possivelmente ocorreu por transferência horizontal dos genes de plantas para *Streptomyces*, *Aeromonas* e *Bacillus* (WATANABE et al., 1999). Prakash et al. (2010) corroboram a hipótese de transferência horizontal mostrando que a estrutura central principal das quitinases de planta e bactéria é conservada.

Essa classificação também abrange a estrutura e mecanismo de ação das quitinases, já que a conservação da sequência refletirá em estruturas similares e os mesmos resíduos catalíticos. As quitinases da família 18 possuem um domínio catalítico de barril α/β, formado por oito α-hélices e oito folhas-β e domínios não catalíticos de ligação a quitina. A reação de catálise retém a configuração anomérica do substrato, ocorrendo um mecanismo de duplo deslocamento. Primeiramente o grupo carboxila de um resíduo da enzima protona o oxigênio da ligação glicosídica, o grupo acetoamido do próprio substrato age com o ataque nucleofílico formando um íon oxazolinium intermediário (SASSAKI et al., 2002; HENRISSAT e BAIROCH, 1993). Já as quitinases da família 19 possuem domínios ricos em α-hélices e a reação catalítica produz mudança da conformação anomérica do substrato envolvendo uma única substituição nucleofílica pela molécula de água. São dois resíduos catalíticos com grupos carboxílicos, um protona o oxigênio da ligação glicosídica e o outro ativa a molécula de água (HENRISSAT e BAIROCH, 1993).

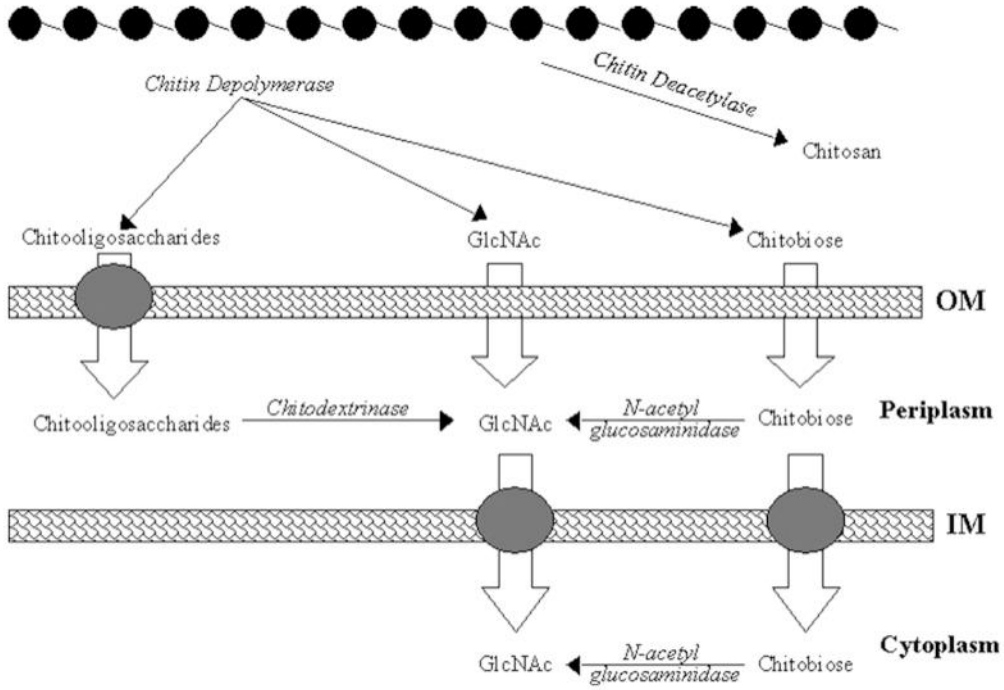
Como as quitinases de plantas são mais numerosas, elas foram dividas em 5 classes independente das famílias das glicosil hidrolases. Essas classes são determinadas pela sequência N-terminal, pI, localização da enzima, peptídeo sinal e indutores (PATIL et al., 2000). Quitinases classe I tem um domínio N-terminal de ligação a quitina rico em cisteína e um domínio catalítico C-terminal ligados por um pequeno peptídeo de 10 a 20 resíduos de aminoácidos. Já as quitinases classe II possuem apenas o domínio catalítico homólogo ao da classe I. Quitinases classe IV são homólogas a classe I mas menores. Classe III e classe V não apresentam homologia com a classe I, II e IV, mas tem sequências similares a quitinases de fungos e bactérias (SEIDL, 2008; FUNKHOUSER e ARONSON, 2007).

De acordo com a classificação das glicosil hidrolases de Henrissat e Bairoch (1993), enzimas das classes I, II e IV pertencem a família 19, enquanto as classes III e V pertencem a família 18.

Existem classificações diferentes para as quitinases de acordo com a atividade enzimática de hidrólise da quitina. Sahai e Manocha (1993) dividem em dois grandes grupos. Endoquitinases (EC 3.2.1.14) que clivam aleatoriamente em sítios internos da quitina gerando multímeros de GlcNAc de baixo peso molecular, como quitotetrose, quitotriose e diacetilquitobiose. Exoquitinases que podem ser divididas em dois subgrupos: quitobiosidases (EC 3.2.1.29) catalisam a liberação de diacetilquitobiose a partir da ponta não redutora da quitina e β(1,4) N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30) clivam os oligômeros liberados por endoquitinases e quitobiosidases gerando monômeros de GlcNAc. A quitosanase (EC 3.2.1.132) converte a quitosana a resíduos de glucosamina (DAHIYA et al., 2006).

Bassler et al. (1991) descrevem o sistema de degradação da quitina por fungos e bactérias. A degradação da quitina inicia pela secreção de quitina depolimerases {EC 3.2.14; poli[1,4-(N-acetil_β,D-glucosaminida)]glicanohidrolase} que liberam GlcNAc, quitobiose e quito-oligossacarídeos. Estes compostos entram no espaço periplasmático onde quitodextrinases (EC 3.2.14) e N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.52; β-N-acetil-D-hexosaminida N-acetilhexosaminohidroase) agem para formar GlcNAc e em menor quantidade quitobiose. Quando transportados para o citoplasma GlcNAc e quitobiose são metabolizados ou modificados para uso na parede celular. Alguns micro-organismos, na maioria fungos, possuem a capacidade de deacetilar a quitina através de quitina deacetilases (EC 3.5.1.41; quitina amidohydrolase) formando quitosana, que pode ser degradado por quitosanase (EC 3.2.1.132; quitosana N-acetilglucosaminohidrolase) e metabolizado (Figura 9; HOWARD et al., 2003).

FIGURA 9 - DEGRADAÇÃO DA QUITINA EM FUNGOS E BACTÉRIAS



Fonte: HOWARD et al., 2003.

A atividade de cada uma dessas enzimas pode ser explorada para produzir compostos derivados de quitina com interesse comercial.

2.3.3 Aplicações das Quitinases

Quitinases podem ser utilizadas como agentes de controle de fitopatógenos, já que a parede celular de muitos deles possui quitina. Há muitos estudos utilizando micro-organismos produtores de quitinases para controlar a infecção por fitopatógenos. *Enterobacter* sp. (DAHIYA et al. 2006), *Alcaligenes xylosoxydans* (VAIDYA et al. 2001), *Streptomyces lydicus* (MAHADEVAN e CRAWFORD, 1997), *Aeromonas caviae* (ORDENTILICH et. al., 1988) são alguns dos micro-organismos com ação antagonista a fungos fitopatogênicos. Horsch et al. (1997) sugerem a utilização de N-acetilhexosaminidase como marcador para produção de antifúngicos de baixo peso molecular.

Apenas a enzima purificada também foi utilizada como antifúngico ou misturada a fungicidas e inseticidas para potencializar seu efeito, além de diminuir a concentração do composto químico que será liberado no meio ambiente (BHUSHAN e HOONDAL,

1998; CHANG, CHEN e WANG, 2003; DEMARCO et al., 2000; GOVINDSAMY, GUNARATNA e BALASUBRAMANIAN, 1998). *E. coli* recombinante produzindo uma proteína inseticida Crylc, bem como quitinase, foi utilizada contra larvas de insetos. A toxicidade da Crylc teve um grande aumento com a adição da quitinase (REGEV et. al., 1996). Mendonsa et al. (1996) observaram que a larva de *Aedes aegypti* é morta utilizando uma preparação bruta de *Myrothecium verrucaria*, produtor de endoquitinase.

Outra aplicação importante das quitinases é a utilização de resíduos contendo quitina, como cascas de camarão e conchas de mariscos, para produção de produtos com maior valor agregado. O monômero da quitina, N-acetil-D-glucosamina, é utilizado na produção de intermediários químicos e farmacêuticos e em produtos alimentares como adoçantes e fatores de crescimento (GYOÈRGY e ROSE, 1955). Processos para a bioconversão de conchas em N-acetilglucosamina foram descritos, bem como para produção de proteína de leveduras (single cell protein- SCP) (REVAH-MOISEEV e CARROAD, 1981; TOM e CARROAD, 1981; COSIO et. al., 1982; VYAS e DESHPANDE, 1991). Cody et. al. (1990) sugerem a conversão enzimática de quitina em etanol. Cremes e loções antifúngicos e preparações oftalmológicas podem ser acrescidas de quitinases e outros microbicidas (DAHIYA et al., 2006).

2.3.4 Aplicações dos Derivados de Quitina

A produção de quitosana e quito-oligossacarídeos (QUOs) também é dependente de enzimas quitinolíticas. Muitas das atividades dadas à quitosana, na verdade, são devidas aos quito-oligossacarídeos que são formados com a degradação natural da quitosana. Uma das suas aplicações é como agentes antibacterianos, ligando-se a proteínas ligadoras de carboidratos, lectinas, que estão presentes na superfície de bactérias patogênicas e, dessa forma, impedindo a adesão ao epitélio intestinal e uma possível infecção bacteriana (RHOADES et al., 2006).

Os QUOs têm atividade inibitória de quitinases podendo ser aplicados na prevenção da malária e contra asma. Durante o ciclo de vida do parasita da malária, o *Plasmodium* libera quitinases para passar pela matriz periotrófica do mosquito hospedeiro, a absorção de QUOs na ingestão de sangue pelo mosquito faria a inibição dessas quitinases prevenindo a infecção do homem (SHAHABUDDIN et al., 1993;

VINETZ et al., 2000). Em um ataque asmático ocorre a super expressão de uma quitinase humana, também liberada em inflamações causadas por parasitas, que é uma das responsáveis pelo desencadeamento do ataque alérgico, a administração de drogas contendo QUOs ajudaria na atenuação da asma (ELIAS et al., 2005; ZHU et al., 2004; MUZZARELLI, 2008).

Outra forma de administração é a terapia gênica. Os QUOs formam complexos com DNA plasmidial podendo ser usados como vetores na administração de genes em mucosas como o epitélio intestinal e o pulmão (KÖPING-HÖGGÅRD et al., 2003; MACLAUGHLIN et al., 1998). Na redução do crescimento de tumores os QUOs ativam funções do sistema imune intestinal, a apoptose das células tumorais e inibem a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos nas células tumorais (MAEDA et al., 2004; HARISH PRASHANTH e THARANATHAN, 2005; WANG et al., 2007).

O aumento da força óssea na osteoporose é proporcionado por quitosana e QUOs que ativam a diferenciação de células tronco em osteoblastos, além de aumentarem a biodisponibilidade e retenção de Ca^{2+} necessário para a formação da estrutura óssea (KLOKKEVOLD et al., 1996; RATANAVARAPORN et al., 2009; JUNG et al., 2006). Ainda são usados em curativos, pois os QUOs mimetizam a estrutura ordenada do tecido facilitando a agregação de plaquetas e eritrócitos e ainda ativam a atividade inflamatória e a colagenase que aceleram a cicatrização (OKAMOTO et al., 2003; CHOU et al., 2003; MUZZARELLI, 2009). Finalmente também possuem atividade antifúngica, os QUOs ligam-se a lipídios da membrana plasmática do fungo levando a alterações morfológicas e a ruptura da célula (PALMA-GUERRERO et al., 2009; PARK et al., 2008).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Enzimas com novas características são constantemente requeridas nos processos industriais. Esse trabalho tem como objetivos encontrar novas enzimas hidrolíticas em duas bibliotecas metagenômicas construídas com DNA total extraído de solo da Mata Atlântica e da lagoa de tratamento dos efluentes da Perdigão (sede Carambeí-PR).

Objetivos específicos:

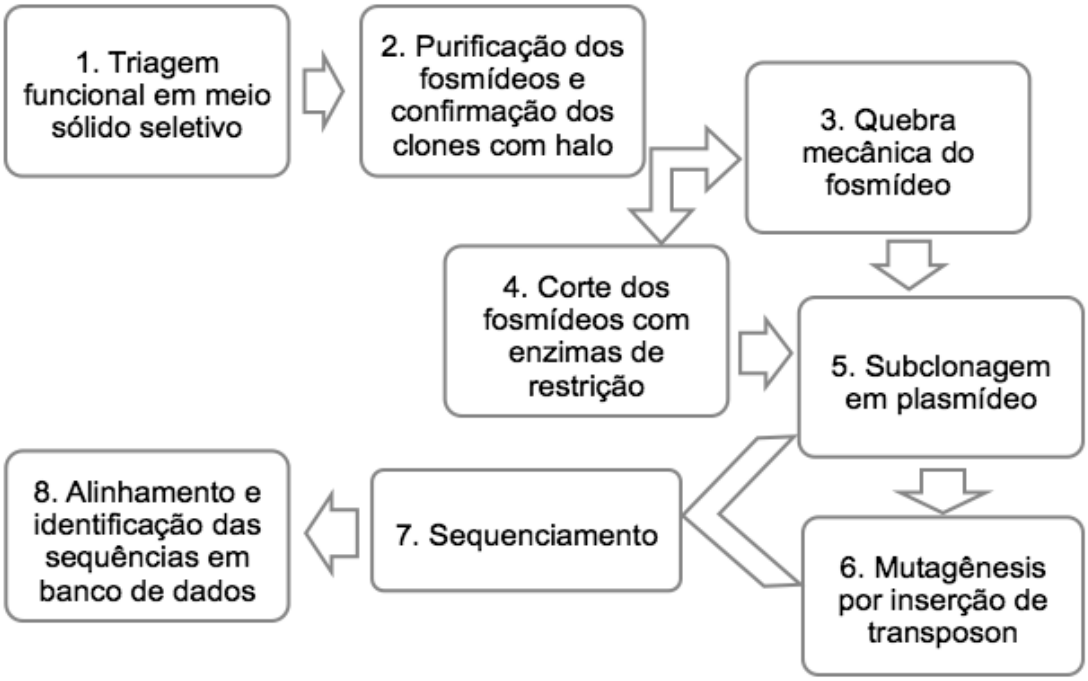
1. Realizar a triagem de duas bibliotecas metagenômicas para identificar clones com atividade de quitinase, fitase, amilase, celulase e protease.

2. Isolar e sequenciar os fosmídeos recombinantes expressando genes das hidrolases de interesse.

4. ESTRATÉGIA DE AÇÃO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA

Este projeto envolve a busca por clones contendo genes de hidrolases em duas bibliotecas metagenômicas, o sequenciamento desses genes e testes de atividade das enzimas. Na Figura 10 encontra-se um fluxograma que fornece uma visão geral das principais etapas do projeto.

FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO



Resumo dos procedimentos realizados em cada etapa:

Etapa 1- Triagem. Meios seletivos foram preparados segundo a literatura (item 4.2). Foram utilizados os conjuntos de clones das duas bibliotecas para proceder à busca (item 4.1). Colônias apresentando halo de hidrólise indicativo das atividades enzimáticas de interesse foram coletadas.

Etapa 2- Purificação e Confirmação. Os fosmídeos recombinantes extraídos das colônias positivas foram transformados em *E. coli* EPI300 para confirmação da expressão da hidrolase de interesse. Estes foram submetidos à análise de restrição por endonucleases para confirmação da presença do fosmídeo e diferenciação dos clones.

Etapa 3- Quebra mecânica ou nebulização. O fosmídeo recombinante que manteve atividade quitinolítica após retransformação foi escolhido para continuar nas etapas seguintes. O DNA extraído foi fragmentado mecanicamente e separado em gel de agarose de baixa fusão (LMP) por eletroforese. Os tamanhos de 8, 5 e 3 kb foram selecionados para seguir para subclonagem em pUC18 cortado com a enzima de restrição SmaI.

Etapa 4- Corte com enzimas de restrição. O mesmo fosmídeo também foi cortado com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos foram utilizados para subclonagem em pUC18 cortado com enzima de restrição referente à do inserto.

Etapa 5- Subclonagem em plasmídeo. As ligações do fosmídeo nebulizado ou cortado com enzimas de restrição com o vetor pUC18 ou pCR®4 foram transformados em *E. coli* DH10B. As colônias transformadas foram coletadas em placas de 96 poços e repicadas em meio seletivo. Os clones contendo insertos seguiram para as próximas etapas.

Etapa 6- Mutagênesis por inserção de transposon. Os clones que apresentaram atividade quitinolítica após a subclonagem tiveram seu plasmídeo recombinante purificado. Foi realizada reação de inserção de transposon nesses plasmídeos e as pontas do transposon inserido foram sequenciadas. Também foi realizada inserção de transposon no fosmídeo original e posterior seqüenciamento das pontas.

Etapa 7- Sequenciamento. Os subclones e clones com inserção de transposon foram sequenciados utilizando os "primers" complementares às sequências das extremidades do vetor pUC18 ou do transposon.

Etapa 8- Alinhamento e identificação das sequências em banco de dados. Os dados de sequências foram alinhados e os "contigs" gerados foram comparados ao banco de dados do “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”. Foi utilizada a ferramenta blastX que compara sequências de nucleotídeos traduzidas com o banco de dados de aminoácidos do GenBank.

4.1 Bibliotecas Metagenômicas

Foram produzidas bibliotecas metagenômicas em trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de pesquisa de Metagenômica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Uma das bibliotecas foi construída a partir de amostras do solo da Mata Atlântica paranaense (MAF) que tiveram seu DNA extraído de forma direta (FAORO, H., 2008). A outra foi construída visando encontrar grandes quantidades de lipases e esterases, por isso foi escolhido o solo da lagoa de tratamento de uma indústria de laticínios e produtos cárneos (SLP), a Perdigão, com sede no município de Carambeí (PR), e suas amostras tiveram seu DNA extraído de forma indireta, primeiramente separando as células para depois extrair o DNA (GLOGAUER, A., 2008). Insertos de cerca de 40 kb foram inseridos em vetores fosmídeos, pCC2FOS de cópia única e mantidos na célula hospedeira *E. coli* EPI300. As bibliotecas foram armazenadas em forma de conjuntos de clones em glicerol 25% a -20ºC. O conjunto de clones de MAF continha 100.000 clones e de SLP 500.000 clones. A recuperação foi feita inoculando 2 mL de cada conjunto em 50 mL de LB Cm12,5 (cloranfenicol 12,5 µg/mL). As culturas foram incubadas durante a noite a 37ºC e 150 rpm chegando à $D.O._{600}$ ~ 1,5. Foram feitas diluições sucessivas até 10^{-7} vezes que foram inoculadas nos meios seletivos.

4.2 Estirpes e Vetores

Foram utilizadas as estirpes de *E. coli* DH10B como hospedeira para os plasmídeos pUC18 e pCR®4 Blunt-TOPO e a estirpe EPI300 como hospedeira do fosmídeo pCC2FOS (Tabela 2).

TABELA 2 - ESTIRPES E VETORES UTILIZADOS

Estirpe	Genótipo e/ou Fenótipo	Referência
DH10B	F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara, leu*)7697 *gal*U *gal*K λ- *rpsL (StrR) nup*G	Invitrogen
EPI300	*F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL (StrR) nupG trfA tonA*	Epicentre

Plasmídeo/ Fosmídeo	Genótipo e/ou Fenótipo	Referência
pCR®4 Blunt-TOPO	LacZ KmR AmpR	Invitrogen
pUC18	LacZ AmpR	Fermentas
pCC2FOS	CmR F- *ori*V *cos* P1 *lox*P T7	Epicentre

4.3 Meios de Cultivo

O crescimento bacteriano foi realizado em meio liquido Terrific Broth (TB) ou Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989) contendo 250 µg/mL de ampicilina para os plasmídeos ou 12,5 µg/mL de cloranfenicol para o fosmídeos. As culturas foram incubadas em agitador a 37ºC e 180 rpm durante a noite. Para cultivo em meio sólido foi utilizado o meio LB acrescido de 15 g/L de agar denominado LA (SAMBROOK et al., 1989) contendo o antibiótico necessário. As placas foram incubadas em estufa a 37ºC.

No preparo de células eletrocompetentes foi utilizado o meio SOB (SAMBROOK et al., 1989) para o cultivo e o meio SOC para a recuperação. A Tabela 3 contem a composição dos meios citados acima.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

LB*	**g/L**
Extrato de Levedura	5
NaCl	10
Triptona	10

TB*	
Extrato de Levedura	24 g/L
Triptona	12 g/L
Glicerol	4 mL/L

*O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2M

SOB^{+}	**g/L**
Triptona	20
Extrato de Levedura	5
NaCl	0,6
KCl	0,186

SOC (SOB adicionado de:)$^{+}$	**g/L**
Glucose	3,6
$MgCl_2$	0,94
$MgSO_4$	1,2

$^{+}$O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2M

4.4 Meios Seletivos para Triagem de Hidrolases

Foram utilizados meios seletivos para identificar a produção das hidrolases selecionadas nos clones das duas bibliotecas metagenômicas. Esses meios de seleção foram baseados em trabalhos já descritos, posteriormente citados, para a procura de clones positivos em bibliotecas de *E. coli* (Tabela 1). Também foi levada em consideração a disponibilidade dos componentes no laboratório.

O meio base utilizado foi o Luria-Bertani Agar ou LA modificado (SAMBROOK et al., 1989). Foi excluído o cloreto de sódio do meio e diminuídas as concentrações de peptona e extrato de levedura para estimular a expressão das hidrolases (5 g/L Peptona; 3 g/L Extrato de Levedura; 13 g/L Agar).

Ao LA é adicionado o substrato para a enzima a ser procurada. Protease, 1% de leite em pó desnatado (m/v); amilase, 1% de amido solúvel (m/v); celulase, 0.2% de CMC (m/v) e quitinase, quitina coloidal 2% (preparo indicado no item 4.2.5). Foram adicionados também antibiótico cloranfenicol 12,5 µg/mL, correspondente à resistência do fosmídeo, e arabinose 0.01%, que induz o aumento do número de cópias do vetor por célula.

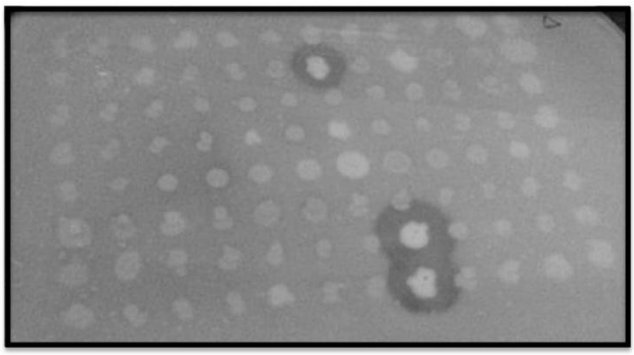
Os métodos baseiam-se na hidrólise do substrato pela enzima correspondente e visualização de um halo, ao redor da colônia capaz de expressar a enzima, que pode ser translúcido, quando o meio é opaco, ou torna-se evidente após coloração do meio.

As placas contendo os meios foram inoculadas diretamente com o conjunto de clones recuperado. A diluição do conjunto escolhida considerou o maior número de colônias que ficassem isoladas na placa, entre 1000 e 2000 UFC/placa (150 cm x 15 cm).

4.2.1 Proteases

O meio LA Leite 1% é opaco, por isso o halo é visível sem coloração após, aproximadamente, 3 dias de incubação (Figura 11). O meio é preparado como descrito por Jones et. al. (2007).

FIGURA 11 - MEIO SELETIVO PARA PROTEASE LA LEITE 1% CONTENDO CLONES POSITIVOS



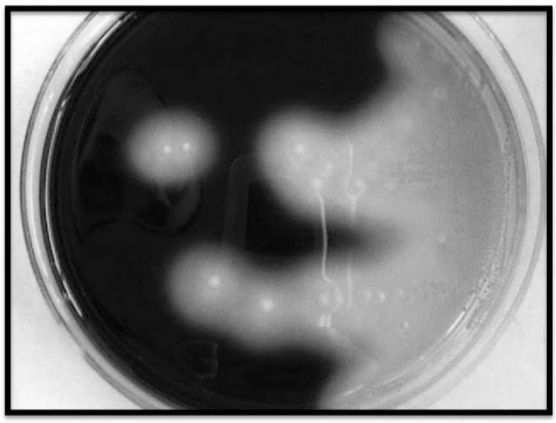
Os halos de hidrólise visíveis sem coloração. Clones positivos isolados por GLOGAUER, 2008. Foto tirada no presente trabalho.

É preparada uma solução de leite em pó desnatado 10% (m/v) homogeneizada em misturador e autoclavada separadamente do meio LA. Após autoclavagem, a solução de leite 10% é adicionada ao meio LA para concentração final de 1% (v/v) e o antibiótico necessário é adicionado. Os halos de hidrólise das proteínas do leite são visíveis sem coloração após 3 a 5 dias de incubação a 37°C.

4.2.2 Amilase

O meio LA amido 1% é corado com solução de iodo KI:I_2 (2:1) como mostrado na Figura 12. O preparo do meio foi feito como descrito por Lämmle et. al. (2007).

FIGURA 12 - MEIO SELETIVO PARA AMILASE LA AMIDO 1% CONTENDO CLONE POSITIVO



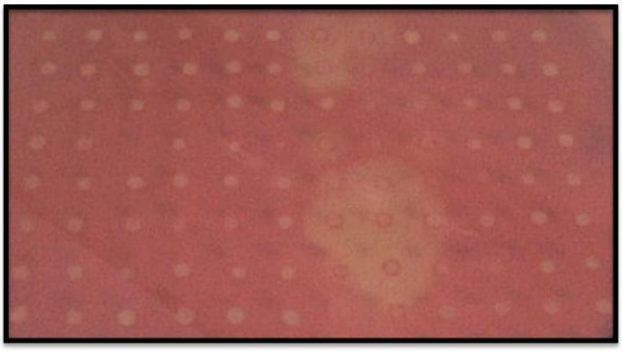
Os halos de hidrólise visíveis após coloração com solução de iodo. Clone positivo isolado por COUTO, 2010. Foto tirada no presente trabalho.

O meio LA é misturado à quantidade correspondente a 1% (m/v) de amido solúvel ou amido de milho (maizena) dissolvido em água quente com auxílio de um misturador até a mistura ficar homogênea, o meio é então autoclavado. O halo aparece entre 3 a 5 dias de incubação a 30-37°C. O meio com amido de milho é levemente mais opaco e em alguns casos o halo pode ser visto sem coloração. Para melhor visualização do halo, a placa pode ser corada com solução de iodo KI:I_2 (2:1 g/100mL de H_2O destilada) diluída 5 vezes. A placa torna-se azul em poucos segundos podendo a solução ser descartada da placa. As colônias positivas apresentam um halo sem coloração ao seu redor. *E. coli* produz amilase e por isso todas as colônias apresentam um pequeno halo. As colônias positivas apresentam um halo maior.

4.2.3. Celulase

O meio LA CMC 0,2% é corado com Vermelho Congo 0,1% por 30 min e descorado com solução de NaCl 0,1M por 10 min para melhor visualização dos halos (Figura 13). É preparado como descrito por Teather e Wood (1982).

FIGURA 13 - MEIO SELETIVO PARA CELULASE LA CMC 0.2% CONTENDO CLONES POSITIVOS



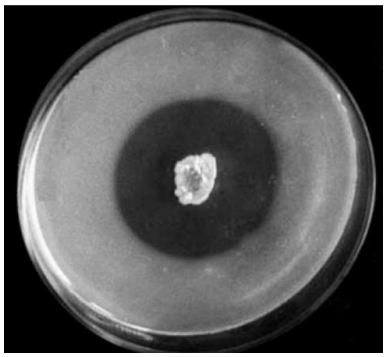
Os halos de hidrólise visíveis após coloração com solução de Vermelho Congo. Clones positivos isolados por COUTO, 2010. Foto tirada no presente trabalho.

O meio LA é misturado a 0.2% (m/v) de CMC (carboximetil celulose) com auxílio de misturador até ficar homogêneo e, então é autoclavado. Após resfriar, é adicionado o antibiótico requerido. O halo aparece entre 3 a 5 dias de incubação a 30-37°C. Para visualização do halo, a placa é corada com solução de Vermelho Congo 0.2% (0.2 g/100mL de H_2O destilada) diluída 2 vezes, por 30 minutos. A solução é descartada da placa e é adicionada a solução de NaCl 0,1 M, por 15 minutos. A placa torna-se vermelha pois o corante liga-se ao CMC e as colônias positivas apresentam um halo sem coloração ao seu redor.

4.2.4. Fitase

Os meios descritos na literatura são de visualização direta, sem a necessidade de coloração, como no caso do leite e quitina (Figura 14). Mas nas tentativas de preparação dos meios descritos por Howson e Davis (1983), Mukesh et. al. (2004), Chen (1998) e Raghavendra (2009) modificados, os meios finais não apresentaram uma opacidade desejável para poder diferenciar os halos dos clones. Então não seguimos com a procura por fitases.

FIGURA 14 - MEIO SELETIVO PARA FITASE PSM CONTENDO CLONE POSITIVO



Halo de hidrólise visível sem coloração. Fonte: MUKESH et al., 2004.

Foi utilizada a seguinte composição para o meio PSM (Phytase Screening Medium): 13 g/L Agar; 5 g/L Peptona; 3 g/L Extrato de Levedura; 5 g/L NaCl; 0,1 g/L KCl; 5 g/L fitato de sódio; 0,5 g/L $MgSO_4$. $7H_2O$ (responsável pela formação do precipitado de fitato para deixar o meio opaco, dependente de pH). A solução de fitato de sódio 5% (p/v) é preparada separadamente em água destilada pH 7,0, autoclavada e adicionada ao meio PSM. O pH do meio foi corrigido para 7,5 na primeira tentativa e 5.5 na segunda. Na terceira tentativa foi adicionado MOPS 0,1 M ao meio com pH 7,0.

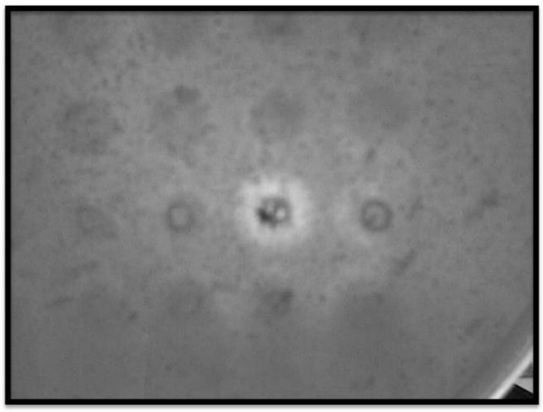
4.2.5. Quitinase

Para o meio LA quitinase foi necessário a preparação da quitina coloidal a partir de quitina em pó. Foi utilizado o protocolo descrito por Hsu e Lockwood (1975) modificado (Figura 15).

Quitina proveniente de carapaças de caranguejo (Sigma) foi triturada em moinho tipo martelo e peneirada, sendo selecionada a fração de 40 mesh de granulometria. Foram pesados 20 g da quitina triturada que foram adicionados aos poucos e dissolvidos em 200 mL de ácido fosfórico 85% sob agitação. A mistura ficou em repouso a 4ºC por aproximadamente 24 h. Após o repouso, a quitina é misturada com água de torneira em um liquidificador, centrifugada a 15000 x g por 10 minutos e descartado o sobrenadante. O processo de lavagem é repetido 4 vezes para retirar o ácido da quitina e antes da última centrifugação o pH é ajustado para 7,2. A quitina coloidal, cerca de 300 mL, é adicionada a 1 L de meio LA, que é autoclavado e, após

resfriado adicionado o antibiótico. Os halos podem ser observados cerca de 10 dias após incubação a 37ºC.

FIGURA 15 - MEIO SELETIVO PARA QUITINASE
LA QUITINA COLOIDAL 2% CONTENDO CLONE POSITIVO



Halo de hidrólise visível sem coloração. Clone positivo isolado neste trabalho pertencente à biblioteca SLP.

4.5 Manipulação de DNA

4.5.1 Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial foi executada segunda a literatura (SAMBROOK *et al.*, 1989; AUSUBEL *et al.*, 2003), ou, alternativamente, utilizando o kit "AxyPrep™ Plasmid Miniprep" da Axygen seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

4.5.2 Purificação do DNA Fosmidial dos Clones Ativos

A purificação de DNA fosmidial foi realizada de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante (EPICENTRE) ou conforme protocolos gerais disponíveis na literatura (SAMBROK *et al.*, 1989; AUSUBEL *et al.*, 2003). Alternativamente, para obter uma maior concentração de DNA fosmidial purificado foi utilizado o kit "NucleoBond® Xtra Midi Plus" da Macherey- Nagel seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

4.5.3 Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al (1989). O DNA foi visualizado, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em trans-iluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP BioImaging Systems).

4.5.4 Purificação de DNA em Gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão

Para purificação de DNA de gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) foi utilizado o kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega). Foram seguidos os protocolos sugeridos pelo fabricante.

4.5.5 Clivagem de DNA com Enzimas de Restrição

Endonucleases de restrição foram adquiridas da Invitrogen, GE Healthcare, Roche e New England Biolabs. As condições de reação foram as sugeridas pelo fabricante.

4.5.6 Clivagem mecânica de DNA por nebulização

O DNA fosmidial foi fragmentado de forma mecânica segundo para nebulização. Foram utilizados 100 µg de DNA, 100 µL de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e 600 µL de glicerol 50% completando o volume para 1 mL com água ultra pura. A mistura foi colocada no nebulizador e submetida a uma pressão de gás argônio de 100 kPa por 3 segundos duas vezes. O DNA fragmentado foi separado em 6 microtubos e precipitado com 1 volume de isopropanol a temperatura ambiente por 30 min, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 30 min. Lavado com 500 µL de etanol 70%, seco e ressuspendido em 30 µL de água ultra pura. Para a reparação das pontas produzidas pela fragmentação foram utilizados 30 µL do DNA, 1 µL de dNTP 5 mM, 1 µL ATP 100 mM, 2 µL T4 DNA polimerase 5 U/µL, 1 µL Klenow 5 U/µL, 1 µL PNK 10 U/µL e 4

µL do tampão de reação. A mistura foi submetida ao seguinte programa no termociclador: 40 min a 12ºC, 45 min a 37ºC e 15 min a 75ºC.

4.5.7 Ligação de DNA

O DNA inserto foi misturado ao DNA plasmidial linearizado numa proporção de 5:1 moles em tampão de ligação. Foi adicionado ao sistema 0,5 a 2 U de T4 DNA ligase e água ultra pura para 10 µL. A mistura foi incubada a 16ºC por pelo menos 16 horas. Alternativamente, foi utilizado o "TOPO Shotgun Cloning kit" da Invitrogen seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

4.5.8 Inserção de Transposon

Foram utilizados os kits de inserção de transposon EZ-Tn5™ <KAN-2> e <TET-1> (EPICENTRE). As reações de inserção do transposon foram feitas de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante (EPICENTRE).

No sistema de inserção de transposon foi adicionado cerca de 0,2 µg do DNA alvo, quantidade equimolar do transposon, 1 µL do tampão de reação, 1 µL da transposase e água ultra pura para 10 µL. A mistura foi incubada a 37ºC por 2 horas. Após o tempo foi adicionado 1 µL da solução de parada da reação que foi incubada a 70ºC por 10 min. A reação foi armazenada a -20ºC.

4.6 Transformação Bacteriana por Eletroporação

4.6.1 Preparo de Células Eletrocompetentes

As células de *E. coli* foram tornadas competentes segundo SAMBROK *et al.* (1989) modificado. Algumas colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5 mL de meio LB na presença do antibiótico Sm (40 µg/mL), a cultura foi incubada sob agitação por cerca de 16 horas. Dois mililitros do pré-inóculo foram transferidos para um frasco de 1 L contendo 200 mL de SOB e incubados a 37ºC até atingir densidade $D.O_{600}$ entre 0,4 e 0,6. A cultura foi transferida a tubos tipo falcon,

mantida no gelo de 15 a 30 minutos e centrifugada a 4000 rpm em centrífuga *Eppendorf 5804R* por 10 minutos a 4ºC. As células foram lavadas duas vezes em 40 mL de água destilada gelada estéril, centrifugadas, suspensas em 40 mL de glicerol 10% gelado. Após nova centrifugação (sempre sob as mesmas condições), o glicerol foi removido por inversão do tubo e as células foram suspensas no restante da solução presente no tubo. As células foram aliquotadas (100 µL) e utilizadas frescas.

4.6.2 Eletroporação

Para eletroporação foram misturados 1 µL da mistura de ligação ou 50 ng de plasmídeo íntegro com 100 µL de células eletrocompetentes frescas mantidas em gelo. A mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação de 0,2 cm (BioRad) previamente resfriada em gelo e colocada na câmara de eletroporação. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 2,5 kV utilizando o eletroporador *GenePulser II* (BioRad). Às células de *E. coli* foi adicionado 1 mL de meio SOC e incubadas por 45 minutos em agitador a 37°C e 180 rpm. Após o tempo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido adequado.

Nos casos de transformação de pUC18 as células foram plaqueados em LA contento o antibiótico ampicilina e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) como substrato para a enzima β-galactosidase nas concentrações de 250 µg/mL e 30 µg/ml, respectivamente. Em seguida as placas foram incubadas na estufa a 37ºC durante a noite.

4.7 Coleta de Clones Transformantes

As colônias transformantes (brancas) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira e inoculadas em placas tipo ELISA de 96 poços contendo 150 µL de meio TB e ampicilina 250 µg/mL. As placas foram incubadas a 37ºC durante no mínimo 16 horas. Após o crescimento dos clones foram adicionados 150 µL de glicerol 50% às culturas. As placas foram seladas com adesivos e armazenadas em congelador a -20°C.

4.8 Purificação de DNA Plasmidial em Placas de 96 poços

Para crescimento bacteriano foram utilizados blocos de 96 poços com capacidade de 2 mL por poço. Em cada poço da placa foi colocado 1,25 mL de meio TB contendo 250 µg/mL de ampicilina. As colônias foram inoculadas com o auxílio de repicador de 96 pinos e a placa foi selada com adesivo perfurado para permitir a aeração. As culturas foram incubadas durante 20 horas em agitador a 37°C e 180 rpm.

O bloco contendo as culturas crescidas foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm (centrífuga *Eppendorf 5804R*) para sedimentar as células. O meio de cultivo foi retirado por inversão da placa e ao precipitado de células foi adicionado 80 µL de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8) contendo 2,5 µg/mL de RNAse. As células foram ressuspensas por agitação e a suspensão transferida para uma microplaca (polipropileno) de 96 poços, com capacidade para 250 µL e fundo em V. A cada poço da placa foram adicionados 80 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). A placa foi selada, misturada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 5 min. A seguir acrescentou-se a cada poço 80 µL de KOAc 3 mol/L pH 5,2 gelado e misturou-se por inversão. A placa foi deixada 10 minutos a temperatura ambiente e então incubada aberta em estufa a 90ºC por 30 minutos.

Após esse tempo a placa foi resfriada em banho de gelo por 15 minutos e centrifugada mais 10 minutos (3500 rpm, 4ºC). O sobrenadante foi então coletado e transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre uma placa de fundo V de 250 µL e o conjunto centrifugado por 5 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente. Ao filtrado que passou para a microplaca adicionaram-se 85 µL de isopropanol (0,6X o volume) e em seguida centrifuga-se por 45 minutos a 3500 rpm. O precipitado de DNA foi então lavado com 150 µL de etanol 70% e secado a vácuo. O DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultra pura e armazenado a -20ºC.

4.9. Sequenciamento das Extremidades dos Insertos de DNA

O sequenciamento das extremidades dos insertos de DNA das bibliotecas metagenômicas foi realizado nos sequenciadores automáticos MegaBACE 1000 (Amersham Life Science/Molecular Dynamics) e 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) em placas de 96 poços, e em ABI PRISM 377 DNA Analyzer (Applied

Biosystems) em microtubos. O método baseia-se no princípio descrito por SANGER *et al.* (1977) utilizando didesoxinucleotídeos fluorescentes, separação por eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção do fluoróforo após excitação com *laser* no sequenciador automático (KARGER *et al*., 1991).

O sistema de reação foi constituído de aproximadamente 250 ng de DNA de fita dupla, 5 pmol de iniciador, 3 µL de reativo *ET terminador mix* (GE Health Care) e água ultra pura suficiente para 10 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Eppendorf *Master Cycler Gradient 5331* com as condições apresentadas na Tabela 4. Para o sequenciamento no equipamento 3500xL Genetic Analyzer foi utilizado o mesmo sistema, mas, ao invés de ET, foi utilizado 2 µL do reativo BigDye (Applied).

Os iniciadores utilizados no sequenciamento foram os dos transposon utilizados <KAN> e <TET> forward e reverso e do pUC18 que são os M13 universal e reverso, estão relacionados na Tabela 5.

TABELA 4 - CONDIÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DO SISTEMA DE SEQUENCIAMENTO

Iniciador	Condições
pCR®4 Blunt-TOPO pUC18	1 ciclo: 94ºC 3 min 35 ciclos: 94ºC 30 seg 60ºC 2 min
Transposon	1 ciclo: 95ºC 1 min 35 ciclos: 94ºC 45 seg 71ºC 45 seg 60ºC 1min30seg

TABELA 5 - INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO

Iniciador	Sequência	Referência
M13 Uni	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Fermentas
M13 Rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Fermentas
<KAN> For	5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3'	Epicentre
<KAN> Rev	5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3'	Epicentre
<TET> For	5' - GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT - 3'	Epicentre
<TET> Rev	5' - TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA - 3'	Epicentre

A seguir o produto das reações foi purificado adicionando-se a cada poço 10 µL de água ultra pura, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60 µL (3X volume) de etanol 96%. O DNA foi coletado por centrifugação a 3500 rpm por 45 minutos, lavado com 150 µL de etanol 80% e seco a vácuo. O DNA seco e purificado foi dissolvido na solução necessária e aplicado no sequenciador automático.

4.10 Manipulação e Análise de Sequências

4.10.1 Alinhamento e Anotação das Sequências de Nucleotídeos

As sequências obtidas nos equipamentos foram alinhadas para reconstrução do inserto original contido no fosmídeo selecionado. Foi utilizado o pacote de programas Phred-Phrap-Consed. O Phred (EWING et al., 1998a; EWING e GREEN, 1998b) é um programa que realiza a identificação de bases a partir do eletroforetograma e determina a confiabilidade de cada base, levando em conta anomalias na migração eletroforética decorrente da inserção dos terminadores e do espectro de emissão dos fluoróforos. O programa utiliza os dados de sequência contidos no arquivo do eletroforetograma processado inicialmente pelo sequenciador automático.

O programa Phrap (www.phrap.com) foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências obtidas gerando uma sequência consenso, estendida, denominada "contig". O programa usa os dados de qualidade fornecidos pelo Phred para posicionar as bases e calcular a confiabilidade do "contig".

O Consed (GORDON et al., 1998) foi utilizado para visualizar, editar e finalizar o alinhamento das sequências. Para ser executado o programa requer três tipos de

arquivos: os arquivos do eletroforetograma com o perfil de sinal fluorescente, arquivos .phd criado pelo programa Phred contendo os valores de qualidade e a posição dos picos para cada base, e os arquivos .ace criado pelo programa Phrap e que contém os dados do alinhamento incluindo o "contig" e os valores de qualidade. Todas as informações contidas nestes arquivos são compiladas pelo Consed e através da janela criada pelo programa é possível visualizar o eletroforetograma, examinar como as leituras estavam ordenadas e orientadas e analisar os valores de qualidade para cada base, tanto na sequência individual quanto no "contig".

Os "contigs" foram comparados ao banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). Foram utilizadas as ferramentas blastX, que compara sequências de nucleotídeos traduzidas com o banco de dados de aminoácidos do GenBank e blastn, que compara sequências de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos. As sequências foram anotadas utilizando o programa Artemis no qual é possível visualizar as seis fases de leitura e algumas outras características da sequência de DNA, além de fazer anotações nessa sequência (RUTHERFORD et al., 2000).

4.10.2 Análise das Sequências de Aminoácidos

A ferramenta blastp, que compara sequência de aminoácidos com o banco de dados de aminoácidos do GenBank, foi utilizada na análise das sequências de aminoácidos dos genes de quitinase obtidos. Alinhamentos de sequências de aminoácidos foram feitas utilizando o programa ClustalW2 (CHENNA et al., 2003).

Outras análises utilizaram os programas disponíveis no site expasy.org/tools. Protparam (GASTEIGER et al., 2005) determina algumas características físico-químicas para a sequência de aminoácidos da proteína. TMHMM Server v 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) avalia a presença de hélices transmembrana na proteína.

Para prever a localização das proteínas foi utilizado o programa PSORTb3.0 (YU et al., 2010). A previsão de secreção das enzimas também foi realizada nos programas SecretomeP 2.0 Server (BENDTSEN et al., 2005a), SignalP 3.0 Server (BENDTSEN et al., 2004) e TatP 1.0 Server (BENDTSEN et al., 2005b). O primeiro analisa se a proteína é secretada comparando as características de sua sequência, como estrutura secundária, pI e seu comprimento, com as características de proteínas conhecidamente secretadas. Identifica sistema de secreção convencionais, tipo Sec, e

não convencionais, como sem o endereçamento de um peptídeo sinal, em diferentes organismos. Como resultado, fornece um "score" que se for maior que 0.5 há a possibilidade de a proteína ser secretada.

O TatP 1.0 Server prediz a presença de um peptídeo sinal de dupla arginina na sequência de aminoácidos de bactérias, sistema Tat de secreção, e utiliza os mesmos mecanismos de previsão do SignalP 3.0 Server, que prediz a presença e localização de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos de diferentes organismos, sistema Sec de secreção. Os dois programas também identificam o possível sítio de clivagem do peptídeo sinal.

O gráfico gerado pelo SignalP e TatP compreende três valores C, S e Y. Dois outros valores são reportados: D e a média S somente como valores numéricos. O valor de S para a previsão do peptídeo sinal é reportado para cada posição de aminoácido da sequência, quando alto indica que o aminoácido correspondente faz parte do peptídeo sinal, e baixo indica que o aminoácido faz parte da proteína madura.

O valor de C representa o sítio de clivagem, reportado para cada posição de aminoácido e só é significantemente alto no sitio de clivagem. Y-max é derivado dos valores C e S resultando em uma melhor previsão do sitio de clivagem, isso porque muitos valores altos de C podem ser encontrados em toda sequência.

A média S compreende os valores de S do aminoácido N-terminal até o aminoácido com maior valor de Y, cobrindo todo o peptídeo sinal. O valor D é uma média dos valores de Y-max e da média S. Mostra uma melhor discriminação entre proteínas secretadas e não secretadas. Para proteínas não secretadas todos os valores obtidos devem ser baixos. A probabilidade da sequência ter ou não um peptídeo sinal é calculada e o sítio de clivagem é atribuído pelos valores de probabilidade das regiões n, h e c conterem um peptídeo sinal. Um gráfico mostrando essas probabilidades é gerado somente no programa SignalP e não no TatP.

A análise de domínios conservados foi realizada utilizando as ferramentas blastp e o CDD “Conserved Domain database” (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2011).

4.10.3 Modelagem por Homologia da Estrutura da Chit 1

Para a modelagem por homologia da quitinase foi realizada uma busca no PDB (Protein Data Bank) de estruturas de proteínas homólogas a nova quitinase. A fim de priorizar as estruturas de difração de raio-X no PDB, para a construção do modelo, além da ferramenta do blastp foi utilizado o programa MHOLLINE (disponível em http://www.mholline.lncc.br/). O programa MHOLLINE classifica as estruturas segundo LIV "Length Variation Index" (Índice de Variação de Comprimento) $\leq 0,7$, identidade ≥ 0.25 e Valor de $E \leq 10e\text{-}5$.

A construção do modelo por homologia foi realizada no programa Modeller (SALI, 2006). Esse programa utiliza restrições espaciais para construir um modelo da estrutura protéica utilizando como padrões as estruturas das proteínas selecionadas no PDB. A estrutura obtida foi visualizada e editada no programa Pymol (DELANO, 2002). Para verificar a qualidade do modelo obtido, utilizou-se o programa ProCheck (LASKOWSKI, 1993). Como resultado, fornece um gráfico de Ramachandran que indica possíveis desvios dos ângulos ψ e φ da cadeia principal, sendo, portanto, uma validação do modelo.

Ainda foi realizada uma análise comparativa de estrutura secundária da quitinase com os três diferentes modelos selecionados no PDB, e com melhor classificação. Os arquivos de coordenadas das proteínas foram baixados do PDB e alinhados com a sequência da nova quitinase utilizando o programa DSSP (KABSCH, 1983) e ALINE (BOND & SCHÜTTELKOPF, 2009). No programa gráfico ALINE as estruturas secundárias das proteínas, α-hélices e folhas β, são visualizadas e indicam se há um padrão que corresponda ao da sequência da nova.

O programa Castp foi utilizado para identificar possíveis aminoácidos presentes na fenda catalítica (DUNDAS et al., 2006). Esse programa analisa dados de cristalografia, a topologia da enzima, identificando possíveis fendas catalíticas.

5. RESULTADOS

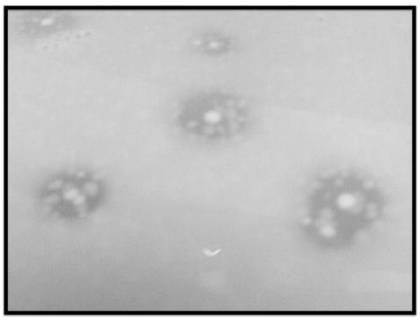
5.1 Seleção de Clones com Atividade Hidrolítica

Dois conjuntos de clones das bibliotecas metagenômicas citadas foram recuperados e plaqueados (diluição 10^{-5}) nos meios seletivos para protease, amilase, celulase, fitase e quitinase. Foram analisados 50.000 clones de cada biblioteca, 25 placas contendo cerca de 2000 colônias cada. As placas foram incubadas a 37ºC e verificada a formação de halo a partir de 3 dias de incubação.

5.1.1 Proteases

As placas foram incubadas a 37°C por 5 dias. Halos de hidrólise das proteínas do leite surgiram em colônias oriundas da biblioteca SLP após 3 a 5 dias de incubação. Dentre os 50.000 clones analisados foram encontrados 23 isolados formando halo de hidrólise para as proteínas do leite. Colônias de cada isolado foram coletadas e inoculadas em duas placas de 96 poços contendo meio TB. As placas de 96 poços foram repicadas em meio LA Leite 1% (m/v) para confirmar os clones positivos (Figura 16).

FIGURA 16 - HALOS DE HIDRÓLISE EM LA LEITE 1%

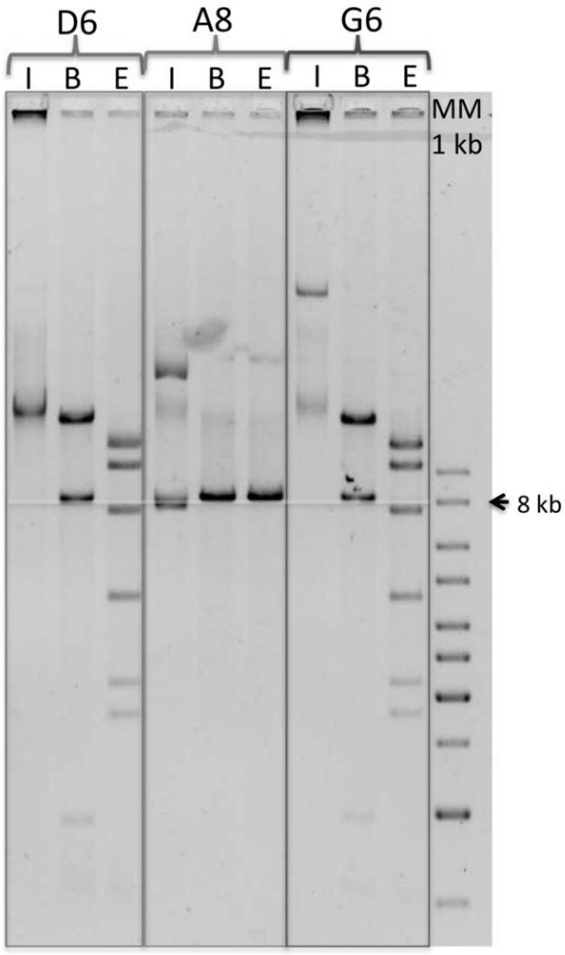


Halos de hidrólise em placas de LA Leite 1% inoculadas com o conjunto de clones da biblioteca metagenômica SLP.

Todos os clones que apresentaram halo tiveram seu DNA extraído e a presença do fosmídeo confirmada através da análise do perfil de restrição com a enzima *Bam*HI. O fosmídeo pCC2FOS de 8 kb é separado do inserto quando cortado com *Bam*HI.

Foram detectados 3 padrões diferentes de restrição com as endonucleases *Eco*RI e *Bam*HI (Figura 17).

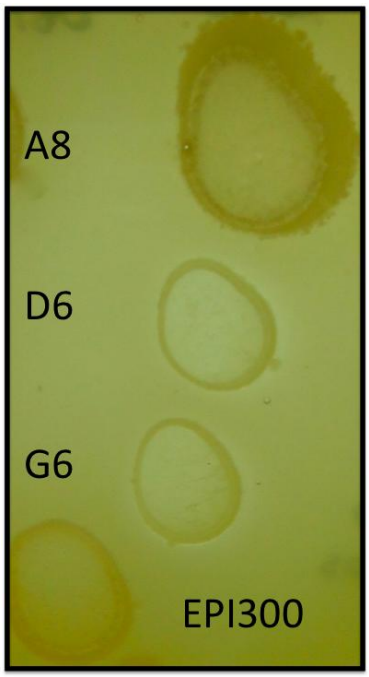
FIGURA 17 - PADRÕES DE RESTRIÇÃO ENCONTRADOS NOS CLONES POSITIVOS PARA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Padrões de restrição encontrados nos clones positivos para hidrólise de proteínas do leite da biblioteca metagenômica SLP. 1D6, 2A8 e 2G6 são as identificações dos clones da biblioteca SLP que apresentaram halo de hidrólise. I- DNA inteiro extraído do clone sem sofrer restrição; B- DNA clivado com *Bam*HI; E- DNA clivado com E*co*RI. A seta indica a linha de 8 kb , tamanho correspondente ao fosmídeo pCC2FOS liberado do inserto quando clivado com *Bam*HI. MM 1kb indica o marcador de massa molecular.

O DNA foi retransformado em EPI300 e os clones repicados em meio LA leite 1%. Os halos desses clones retransformados foram mais fracos que os detectados na triagem, o isolado A8 perdeu a atividade hidrolítica de proteínas do leite (Figura 18).

FIGURA 18 - HALOS DE HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE DOS CLONES COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DIFERENTES



Halos de hidrólise dos clones positivos para hidrólise de proteínas do leite com padrões de restrição diferentes. Os isolados A8, D6, G6 e *E. coli* EPI300, contendo o fosmídeo pCC2FOS fechado como controle negativo, foram repicados em meio LA Leite 1%. O clone A8 perdeu a atividade após retransformação do fosmídeo. Os clones D6 e G6 mostraram halos menos intensos que na triagem inicial.

5.1.2 Amilase

Não foram encontrados clones positivos para amilase. O método de detecção não foi eficiente pois exige uma coloração para visualizar o halo, não se sabe quanto tempo é necessário para aparecer o halo e a coloração espalha as colônias misturando-as. Esse método não é indicado para a procura em conjuntos de clones apenas para clones separados em placas de 96 poços.

5.1.3 Celulase

O meio LA CMC 0,2% (m/v) também possui o inconveniente da pós-coloração do meio para a visualização do halo, acarretando nos mesmos problemas do meio de

seleção de amilases. Não foram encontrados clones positivos para celulase dentro de 60 dias de incubação. Não serão feitas novas procuras nesse meio.

5.1.4 Fitase

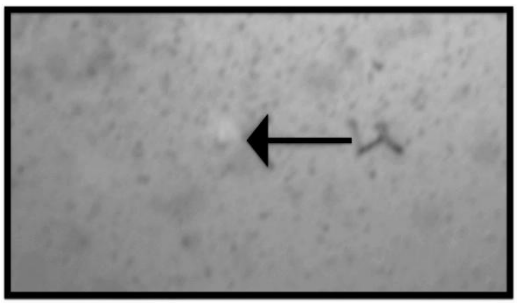
Não foi possível obter um meio opaco para visualização dos halos. BAE *et. al*. (1999) descrevem um método de coloração do meio contendo fitato, mas como os métodos de corar a placa não foram bem sucedidos para os meios de amido e CMC, o meio PSM não foi utilizado.

5.1.5 Quitinase

Esse meio tem fácil visualização de halo e permitiu a identificação de 17 clones positivos após 2 meses de incubação (7 dias a 37°C e os demais a temperatura ambiente para não ressecar o meio) das placas. Dentre os clones positivos apenas dois são provenientes da biblioteca MAF, enquanto os demais são da biblioteca SLP. Os clones foram re-isolados em meio LA e cerca de 30 colônias de cada isolado foram inoculadas em 4 placas de 96 poços.

As placas foram repicadas em meio LA quitina e foram observados halos após 20 dias de incubação (7 dias a 37°C e os demais a temperatura ambiente) nos isolados provenientes da biblioteca SLP (Figura 19).

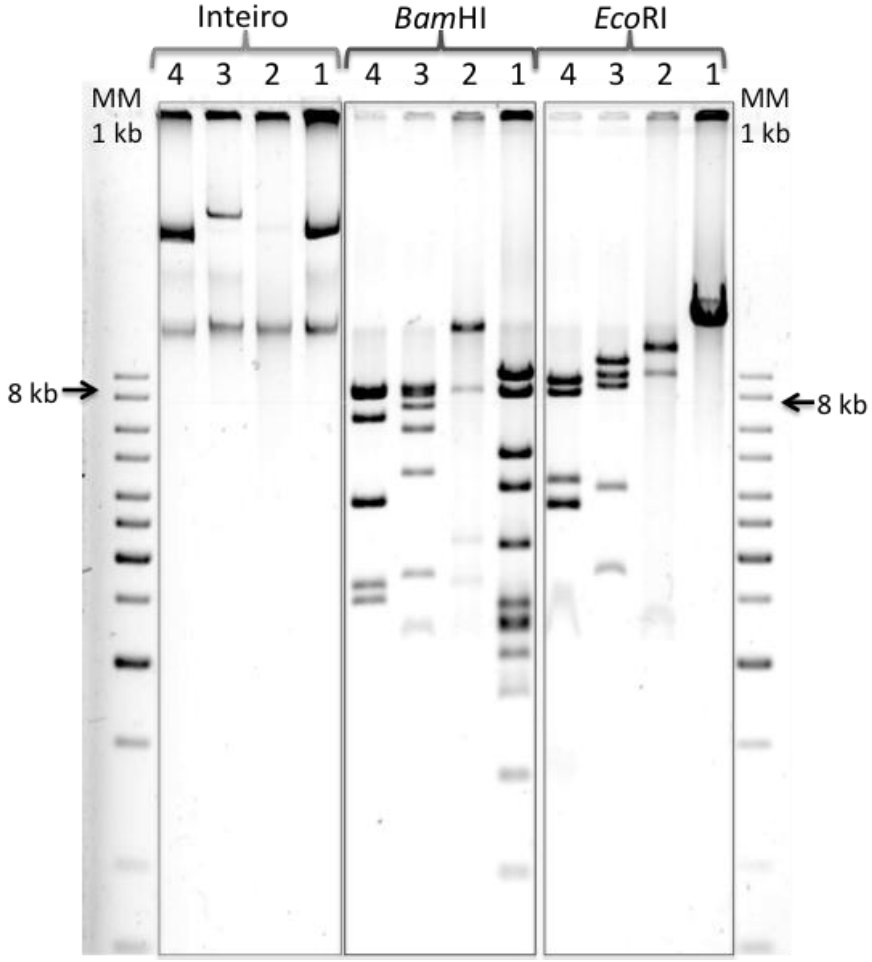
FIGURA 19 - HALO DE HIDRÓLISE EM LA QUITINA COLOIDAL 2%



A seta indica o halo de hidrólise no meio LA quitina coloidal inoculado com diluição 10^{-5} do conjunto de clones da biblioteca metagenômica SLP.

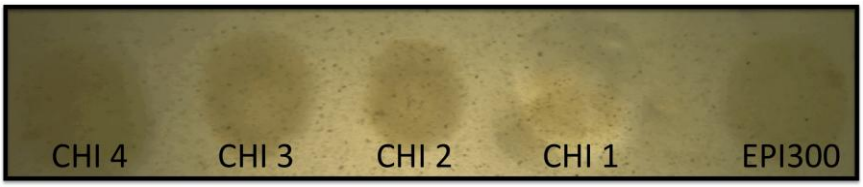
Foram encontrados quatro padrões de restrição com *Bam*HI e *Eco*RI dentre os 17 clones positivos (Figura 20). Os padrões 1 e 2 são de clones provenientes da biblioteca SLP e os padrões 3 e 4 são de clones provenientes da biblioteca MAF. O DNA foi retransformado em EPI300 e os clones repicados em meio LA quitina coloidal 2%. Apenas o clone CHI 1 manteve a atividade contra quitina coloidal após a transformação (Figura 21).

FIGURA 20 - PADRÕES DE RESTRIÇÃO ENCONTRADOS NOS CLONES POSITIVOS PARA HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL



Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Inteiro- DNA extraído dos clones sem nenhuma restrição. Padrões de restrição de *Bam*HI e *Eco*RI dos clones com atividade hidrolítica contra quitina. 4 e 3 são os isolados positivos para hidrólise de quitina coloidal da biblioteca MAF e 2 e 1 os isolados positivos da biblioteca SLP. A seta indica a linha de 8 kb , tamanho correspondente ao fosmídeo pCC2FOS liberado do inserto quando clivado com *Bam*HI. MM 1kb indica o marcador de massa molecular.

FIGURA 21 - HALOS DE HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL DOS CLONES COM PADRÕES DE RESTRIÇÃO DIFERENTES



Halos de hidrólise dos clones positivos para hidrólise de quitina coloidal com padrões de restrição diferentes. Os isolados CHI 1 a 4 e *E. coli* EPI300, contendo o fosmídeo pCC2FOS fechado como controle negativo, foram repicados em meio LA quitina coloidal 2%. Os clones CHI 2 a 4 perderam a atividade após retransformação do fosmídeo.

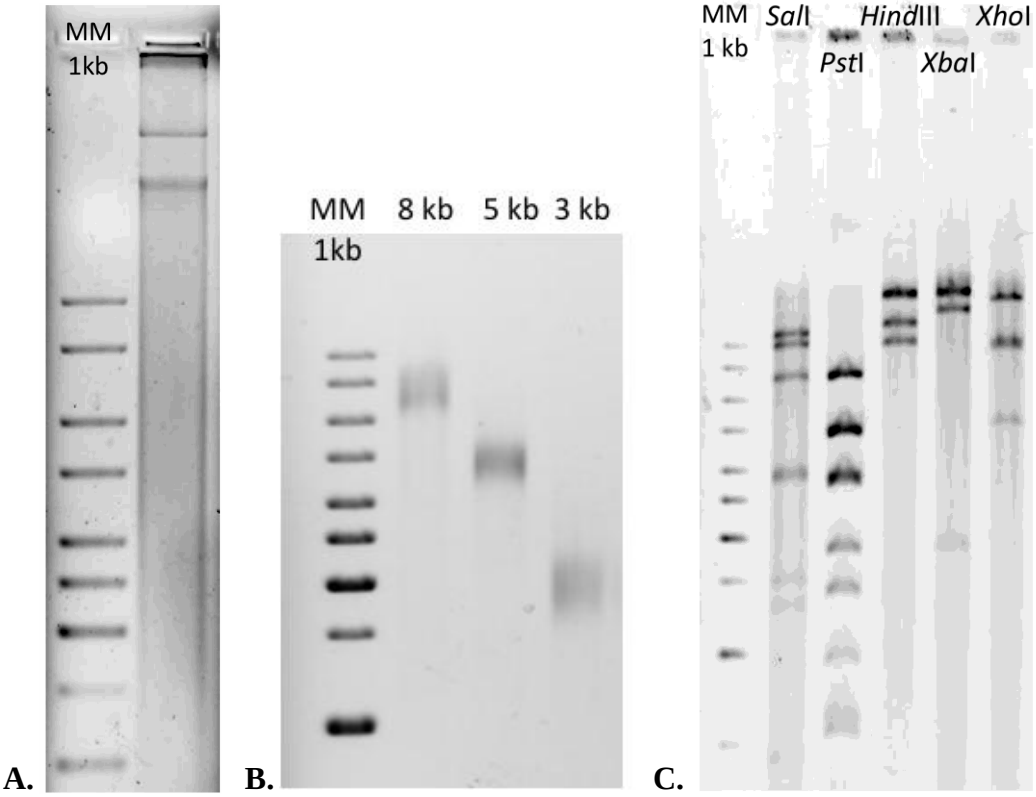
5.2 Montagem da Biblioteca de Subclones de CHI 1

O fosmídeo do clone CHI 1 (Figura 22) foi extraído e, então, nebulizado ou clivado com enzimas de restrição (Figura 23).

FIGURA 22 - HALO DE HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL DO CLONE CHI 1

Placa de 96 poços repicada em LA quitina coloidal 2% contendo o halo de hidrólise do clone CHI 1 marcado com a seta e no retângulo *E. coli* EPI300, contendo o fosmídeo pCC2FOS fechado como controle negativo.

FIGURA 23 - DNA FOSMIDIAL CLIVADO DO CLONE CHI 1



A. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. DNA fosmidial do clone CHI 1 após nebulização. B. Fatias do gel do DNA nebulizado em A. foram cortadas e seu DNA foi extraído do gel. Os fragmentos próximos a 8 kb, 5 kb e 3 kb foram selecionados e separados em eletroforese para confirmação do tamanho. C. DNA fosmidial de CHI1 clivado com as enzimas de restrição *Sal*I, *Pst*I, *Hind*III, *Xba*I e *Xho*I. MM 1kb indica o marcador de massa molecular.

As ligações dos fragmentos de 8, 5 e 3 kb nebulizados e dos fragmentos de restrição com o vetor pUC18 e pCR®4 Blunt-TOPO foram transformadas em *E. coli* DH10B e repicadas em meio LA quitina coloidal.

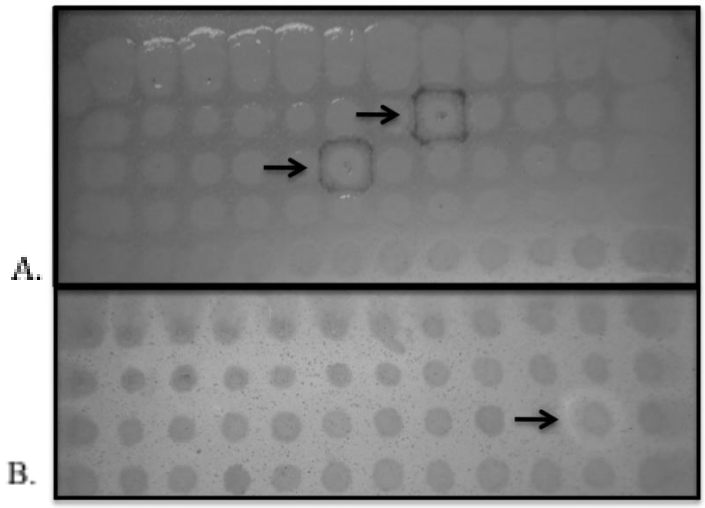
5.3 Subclones de CHI 1

Foram coletadas 7 placas com 96 colônias cada de subclones: os subclones contendo fragmentos de restrição foram coletados em 3 placas; duas 2 placas com subclones contendo DNA nebulizado de 5 kb, uma com insertos ligados ao pUC18 e a outra com insertos ligados ao pCR®4; 3 placas com subclones contendo DNA

nebulizado de 3 kb, uma com insertos ligados ao pCR®4 e as demais com insertos ligados ao pUC18; e nenhum subclone com DNA nebulizado de 8 kb.

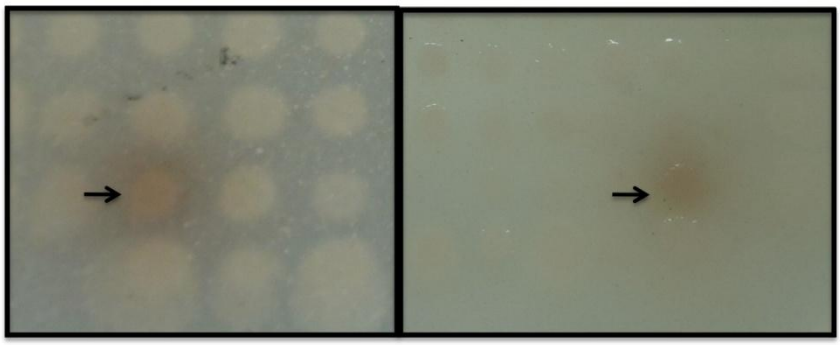
Alguns dos subclones obtidos apresentaram atividade contra quitina coloidal. Dos subclones contendo fragmentos de restrição todos os 36 coletados com fragmentos *Sal*I apresentaram atividade, 3 clones com fragmentos *Pst*I (Figura 24A) e 3 clones com fragmentos *Xho*I. Dos subclones contendo fragmentos da nebulização apresentaram atividade três clones com insertos de 3 kb, dois ligados ao pUC18 (Figura 24B) e o outro ligado ao pCR®4, e um subclone com inserto de 5 kb ligado ao pCR®4. Um subclone contendo fragmento de nebulização de 5 kb ligado ao pCR®4 apresentou um novo fenótipo, a liberação de um composto de cor marrom no meio (Figura 25).

FIGURA 24 - SUBCLONES COM ATIVIDADE CONTRA QUITINA COLOIDAL



As setas marcam os halos de hidrólise em LA quitina coloidal 2% dos subclones de CHI 1. Em A. subclones contendo fragmentos de restrição com *Pst*I e em B. subclone contendo fragmento de nebulização de 3 kb.

FIGURA 25 - SUBCLONE COM PRODUÇÃO DE COMPOSTO MARROM

A.  B.

As setas indicam o subclone de CHI 1 contendo inserto fragmentado por nebulização de 5 kb ligado ao pCR®4. Libera um composto de cor marrom no meio LA quitina coloidal 2%. Em A. foto do fundo da placa, em B. Foto da frente da placa.

5.4 Sequenciamento dos Insertos dos Subclones

O sequenciamento das pontas dos insertos dos subclones com atividade indicou que dois subclones continham sequências diferentes. Um subclone contendo um inserto de fragmento de restrição da *Xho*I de 8 kb e o outro um fragmento de nebulização de 3 kb. Nesses dois subclones foi realizada a reação de inserção de transposon.

Foram coletadas duas placas de 96 clones cada uma com inserções de transposon em um dos dois subclones com atividade. As regiões de inserção dos transposons foram sequenciadas utilizando "primers" que anelam nas pontas dos transposons. Também foram sequenciadas as pontas dos insertos dos clones sem atividade contidos nas placas de subclones coletadas.

As 1213 sequências obtidas foram alinhadas utilizando Phred Phrap para reconstruir a sequência original. Os contigs obtidos foram comparados às sequências do banco de dados do "National Center for Biotechnology Information (NCBI)". Foi utilizada a ferramenta BlastX que compara sequências de nucleotídeos traduzidas com o banco de dados de aminoácidos do GenBank.

5.5 Anotação das Sequências

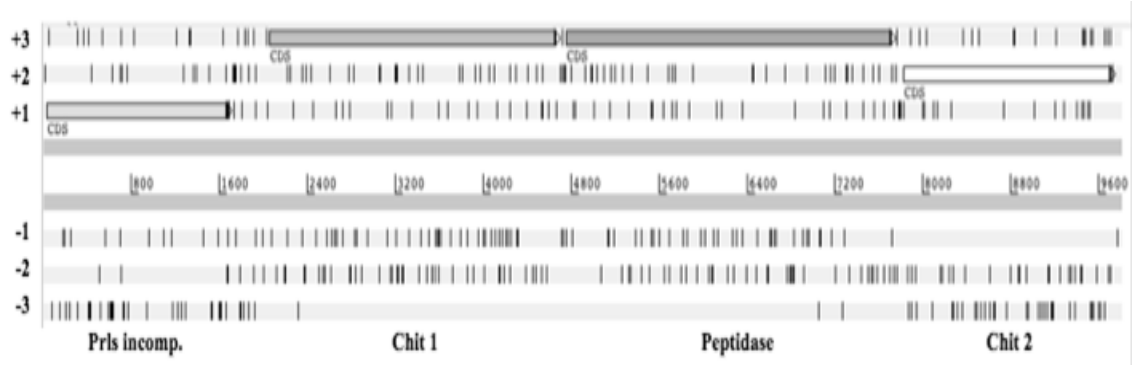
Os "contigs" obtidos foram anotados utilizando o programa Artemis (RUTHERFORD, 2000). Foram obtidos 30 "contigs", entre eles dois de maior

comprimento contendo três genes similares a genes de quitinases (Chit 1 a 3) e outros oito genes vizinhos aos genes de quitinases. A qualidade dessas sequências foi considerada boa, apresentando valores de Phred maiores que 20.

O contig 1 foi obtido dos subclones que apresentaram atividade quitinolítica e contém dois genes de quitinase (Figura 26). Foram alinhadas 306 sequências provenientes de mutantes com inserção de transposon nos subclones com atividade e 146 sequências provenientes de subclones aleatórios.

O contig 2 foi obtido de 174 sequências provenientes dos demais subclones sem atividade e contém um gene de quitinase N-truncado faltando 124 aminoácidos em comparação com a sequência de maior identidade quitodextrinase de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* (Figura 28).

FIGURA 26 - DISPOSIÇÃO DOS GENES NO CONTIG 1



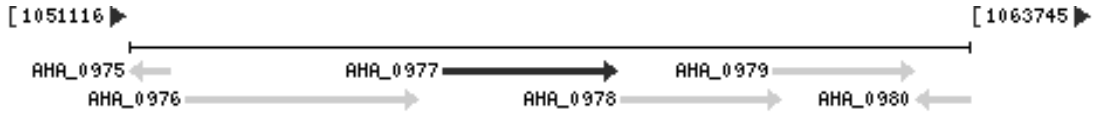
Representação das seis fases de leitura do contig obtido. Da esquerda para direita genes codificando para: sensor de prolina Prls (gene incompleto); Chit1; possível protease; e Chit2.

A disposição dos genes encontrados no contig 1 é similar a encontrada no genoma de *Aeromonas hydrophila*, apesar de alguns genes também apresentarem maior similaridade com genes de outros organismos (Figura 27 e Tabela 6).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS CONTIGS 1 E 2 COM O GENBANK

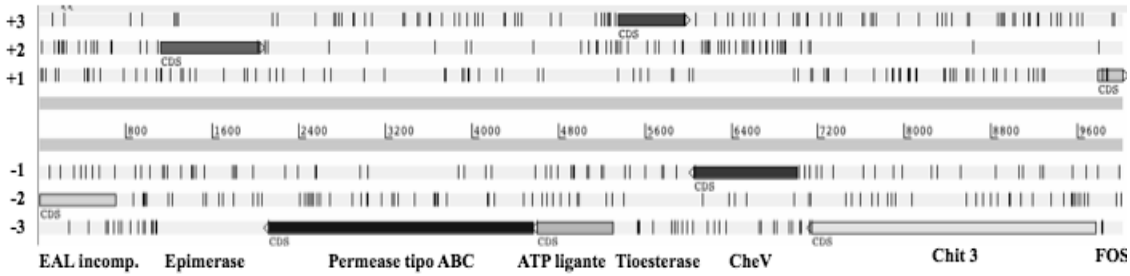
Gene	Organismos	Nº. de acesso	Identidade/ Positivos %	Valor de E	Domínio conservado
CONTIG 1					
Prls incompleto	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_855520.1	89/93	0	REC (receptor de sinal)
Chit1	*Aeromonas punctata*	CAD58828.1	83/91	0	GH18_chitinase
Hipotética conservada	*Shewanella baltica* OS678	YP_002360235.1	90/95	0	Superfamília Peptidase-M66
Endoquitinase	*Aeromonas hydrophila*	ABD59015.1	78/86	0	GH19_chitinase
CONTIG 2					
EAL incompleto	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* A449	YP_001140729.1	54/74	6,00E-65	sem
NDP açúcar Epimerase	*Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* A449	YP_001140728.1	86/93	4,00E-135	Epimerase
Permease ABC	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_857961.1	85/91	0	FtsX (pfam- permease)
ATP ligante	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_857962.1|	88/93	3,00E-89	Superfamília P-loop NTPases
AcilCoA tioesterase	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_857963.1	81/89	2,00E-78	Lisofosfolipase
CheV quimiotaxia	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_857964.1	95/99	5,00E-167	Superfamília CheW
Quitodextrinase	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966	YP_857929.1	93/95	0	GH18_chitinase

FIGURA 27 – DISPOSIÇÃO 1 DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*



Representação da disposição dos genes no genoma de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATTC 7966. Da esquerda para direita genes codificando para: AHA_0976 sensor de prolina Prls; AHA_0977 quitinase A; AHA_0978 metaloprotease putativa; e AHA_0979 endoquitinase básica.

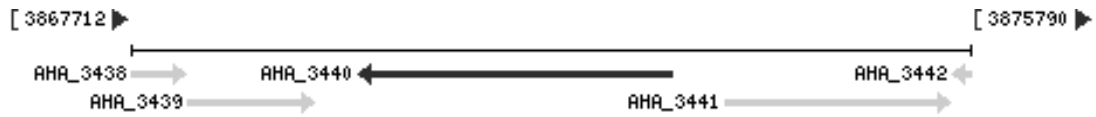
FIGURA 28 - DISPOSIÇÃO DOS GENES NO CONTIG 2



Representação das seis janelas de leitura do contig obtido. Da esquerda para direita, genes codificando para: proteína contendo domínio EAL (gene incompleto); proteína hipotética; permease de transportador tipo ABC; proteína ligadora de ATP de transportador tipo ABC; acilCoA tioesterase; proteína de quimiotaxia; Chit3 (gene incompleto); e fosmídeo.

A disposição dos genes no contig 2 é similar a de *Aeromonas hydrophila* apenas diferenciando na posição da quitinase 3. A quitinase 3 possui maior similaridade com a quitodextrinase de *Aeromonas hydrophila* que está localizada em uma região diferente do seu genoma (Figuras 29 e 30). O gene da quitinase 3 encontra-se N-truncado na ponta do fosmídeo.

FIGURA 29 – 2ª DISPOSIÇÃO DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*



Representação da disposição dos genes no genoma de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATTC 7966. Da esquerda para direita genes codificando para: AHA_03438 proteína periplasmática TonB2; AHA_3439 proteína contendo repetição TRP; AHA_3440 quitodextrinase; AHA_3441 nuclease; e AHA_3442 tRNA .

FIGURA 30 – 3ª DISPOSIÇÃO DOS GENES EM *AEROMONAS HYDROPHILA*

Representação da disposição dos genes no genoma de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATTC 7966. Da esquerda para direita, genes codificando para: AHA_3485 proteína contendo domínio EAL; AHA_3486 proteína hipotética; AHA_3487 componente permease de transporte tipo ABC; AHA_3488 proteína ligadora de ATP, transportador ABC; e AHA_3489 acil-CoA tioesterase.

O subclone com atividade quitinolítica contendo o maior inserto, aproximadamente 8kb, possui a sequência do contig 1 quase completa com apenas um fragmento do gene Prls e o restante dos genes completos. O outro subclone com atividade e menor inserto, aproximadamente 3 kb, possui apenas a sequência da quitinase 1 com um fragmento do gene Prls.

5.6 Análise dos Genes que Codificam Quitinases

Baseado no modo da hidrólise de quitina, as quitinases são classificadas como aleatórias, endo-, e exoquitinases e baseado na sequência as quitinases podem pertencer às famílias 18 e 19 das glicosil hidrolases (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; SAHAI E MANOCHA, 1993).

5.6.1 Quitinase 1- Chit1

A comparação da sequência de nucleotídeos da quitinase 1 contra o GenBank utilizando o programa BlastX detectou que o gene completo alinha com o gene CHIT1 de *Aeromonas punctata*, obtendo 83% de identidade. A Figura 31 mostra o alinhamento em ClustalW2 (CHENNA et al., 2003) das duas quitinases, as sequências diferem em apenas alguns aminoácidos aleatórios.

FIGURA 31 – ALINHAMENTO EM CLUSTAL DA SEQUÊNCIA DE CHIT 1 COM A QUITINASE 1 DE *AEROMONAS PUNCTATA*

```
Quitinase1                  MPSPKPTLLALAVGLFCTSAAYAAAPGKPTIGWGPTKFAIVEVDQAATSY 50
Chi1_Aeromonas_punctata     MLSPKLSLLALLVGGLCTTSAFAAAPGKPTIGSGPTKFAIVEVNQAASAY 50
                            * *** :**** ** :**::*:********** **********:***::*

Quitinase1                  NNLVKV-KDAADVEVSWNLWSGDVGQTAKVLLDGKEVWSGPSAAAGTAKF 99
Chi1_Aeromonas_punctata     NQLVTVHKDGAPVSVTWNLWSGDVGQTAKVLLDGKEVWSGPASAAGTANF 100
                            *:**.* **.* *.*:*************************::*****:*

Quitinase1                  KVNKGGRYQMQVALCNADGCTLSDKKEIVVADTDGSHLAPLKAALQENNK 149
Chi1_Aeromonas_punctata     KVTKGGRYQMQVALCNADGCTLSDKKELMVADTDGSHLAPLNAPLKENNK 150
                            **.************************::************:*.*:****

Quitinase1                  PYANKSGKVVGTYYVEWGVYGRKFTVDKIPAQNLTHILYGFTPICGGDGI 199
Chi1_Aeromonas_punctata     PYANKSGKVVGAYYVEWGVYGRKFTVDKIPAQNLTHILYGFTPICGGNGI 200
                            **********:************************************:**

Quitinase1                  NDSLKEIEGSFQALQRACAGRADFKVAIHDPWAAVQMPQSGLTAYDEPYK 249
Chi1_Aeromonas_punctata     NDSLKEISGSFEALQRSCAGREDFKVSIHDPWAAIQMSQGNLSAWDEPYK 250
                            *******.***:****:**** ****:*******:**.*..*:*:*****

Quitinase1                  GNFGALMALKQAYPDLKILPSVGGWTLSDPFYFLGDKSKRDTFVASVKEF 299
Chi1_Aeromonas_punctata     GNFGNLMALKQAHPDLKILPSVGGWTLSDPFYFLGDKTKRDTFVASVKEF 300
                            **** *******:************************:***********

Quitinase1                  LQTWKFFDGVDIDWEYPGGQGANPKLGSPSDGATYVTLMKELRAMLDELE 349
Chi1_Aeromonas_punctata     LQTWKFFDGVDIDWEFPGGQGANPSLGGPNDGATYVVLMKELRAMLDELE 350
                            ***************:********.**.*.******.*************

Quitinase1                  SQTGRKYELTSAVGAGYDKIEDVDYRAAQQYMSHIFMMTYDYNGAWSNTE 399
Chi1_Aeromonas_punctata     AETGRQYELTSAISAGGDKIAKVDYQAAQQYMDHIFLMSYDFSGAFDLTN 400
                            ::***:******:.** *** .***:******.***:*:**:.**:. *:

Quitinase1                  LGHQTNLYAASWDPNTKYTTDKAVNLMLAQGVDPGKLVVGAAMYGRGWTG 449
Chi1_Aeromonas_punctata     LAHQTNLFASSWDPATKYTTDKGVKALLGQGVTPGKIVVGAAMYGRGWTG 450
                            *.*****:*:**** *******.*: :*.*** ***:**************

Quitinase1                  VSGYQGNNPFTGKATGKVKGTWEDGVVDYRDIVNNRMGSGWEKSYDEVAE 499
Chi1_Aeromonas_punctata     VKNYQAGNPFTGTATGPVSGTWENGVVDYRDIVNNRMGAGWEQGYDESAE 500
                            *..**..*****.*** *.****:***************:***:.*** **

Quitinase1                  APYLFKASTGDLITYDNDRSVKAKGQYVLANKLGGLFSWEIDADNGDILN 549
Chi1_Aeromonas_punctata     APYVFKASSGDLITFDNDRSVKAKGQYVLANQLGGLFAWEIDADNGDILN 550
                            ***:****:*****:****************:*****:************

Quitinase1                  AMHEGLGHGEGTTPPANKPPVANAGSDLSVTGPTEVTLNGSASHDPENGA 599
Chi1_Aeromonas_punctata     AMHEGLGHGEGTLPPVNKPPVANAGSDLSATGPAEVTLNGSASHDPENGA 600
                            ************ **.*************.***:****************

Quitinase1                  LTYSWKQVSGPQATLLDATQAKARVVLDAVSADINLVFELAVTDDHNLTA 649
Chi1_Aeromonas_punctata     LTYSWKQVSGPQASLLDATQAKARVVLDAVSSDINLVFELTVTDDQGLSA 650
                            *************:*****************:********:****:.*:*

Quitinase1                  RDQVVVTNKAPQPNLPPLVSLPATASVESGKQVTLKATASDPNGDPLTYQ 699
Chi1_Aeromonas_punctata     KDQVVVTNKAPQPNLPPVVSVPASATVEAGKQVSIKATASDPNGDALSYQ 700
                            :*****************:**:**:*:**:****::**********.*:**

Quitinase1                  WTVPAGLTASGQNSATLVVTGPNVTSDTAYDLSLTVSDGALDASAATRLT 749
Chi1_Aeromonas_punctata     WTVPAGLSATGLDSATLVVTGSNVTSDTAYDLTLVVTDGALDATAVTRLT 750
                            *******:*:* :********.**********:*.*:******:*.****

Quitinase1                  VKPVSGGGDCSATDPDAANWPAWQASKVYNGGDKVSHNQLVWQAKYWTQG 799
Chi1_Aeromonas_punctata     VKPASTGGGCEASDPDAANHPAWSAGTVYNTNDKVSHKQLVWQAKYWTQG 800
                            ***.* **.*.*:****** ***.*..*** .*****:************
```

Continuação Figura 31

```
Quitinase1                      NEPSRTADQWTLVSKVQLGWDANVAYNGGDLTNHNGRQWKAQYWTRGDEP 849
Chi1_Aeromonas_punctata         NEPSRTADQWKLVSQVQLGWDAGVVYNGGDVTSHNGRKWKAQYWTKGDEP 850
                                **********.***:*******.*.*****:*.****:*******:****

Quitinase1                      GKAAVWQDVGAASCK 864
Chi1_Aeromonas_punctata         GKAAVWVDQGAASCN 865
                                ****** * *****:
```

Alinhamento gerado com configuração padrão do ClustalW2. Resíduos *****conservados, **:** similares, **.** pouco similares

A comparação da sequência de aminoácidos da quitinase 1 contra o banco de dados CDD (MARCHLER-BAUER et al., 2011) utilizando o programa BlastP identificou domínios conservados característicos de quitinases (Figura 32). O programa InterproScan indicou os mesmos domínios principais presentes na sequência de aminoácidos descritos na Tabela 7. Por similaridade de sequência podemos classificar a quitinase 1 como pertencente a família 18 das glicosil hidrolases.

FIGURA 32 - DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 1

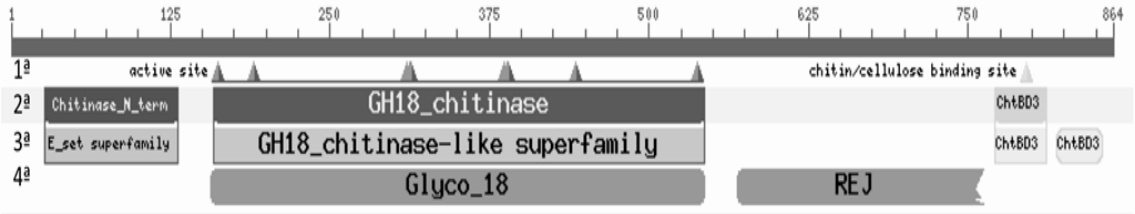


Figura gerada pela ferramenta blastp representando os domínios conservados presentes na sequência de aminoácidos da quitinase 1. 1ª. linha- sítios ativos e sítio de ligação a quitina; 2ª. linha- "hits" específicos, 3ª. linha - superfamílias; 4ª. linha- multidomínios.

O programa Protparam (GASTEIGER et al., 2005) disponível no site Expasy forneceu alguns parâmetros físico-químicos para a sequência de aminoácidos da quitinase 1: 864 aminoácidos, peso molecular de 92456.1 e pI teórico de 5.12.

A análise de domínios transmembrana foi realizada em TMHMM Server v 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) revelando que existem cerca de 9 aminoácidos em hélice, mas não sendo suficientes para formar uma região transmembrana. A probabilidade de essa região encontrar-se no citoplasma é de 0,45, sendo mais provável que essa região seja um peptídeo sinal (Figura 33).

TABELA 7 - DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 1

Domínio	Função
Catalítico	Sítio ativo no domínio conservado GH18_chitinase. Todos os 10 resíduos de aminoácidos que participam do sítio ativo foram encontrados na sequência: Y162, F179, D302, D304, L306, M383, Y385, D386 , Y443 e W538.
Ligação a quitina	Resíduos de aminoácidos aromáticos alinhados interagem com a quitina/celulose. Membros da família que não possuem esses resíduos aromáticos conservados ligam quitina/celulose de outra forma. Sítio de ligação a quitina/celulose no domínio conservado ChtBD3. Todos os 2 resíduos que participam do sítio de ligação foram encontrados na sequência: Y797 e W798
Específicos	
Quitinase N-terminal	Domínio N-terminal presente em quitinases bacterianas. Interação enzima substrato. Separado do domínio catalítico por uma região móvel.
Família 18 Glicosil hidrolase	A estrutura desse domínio é um barril de 8 fitas alfa/beta e com um sítio ativo pronunciado na extremidade C-terminal do barril β.
ChtBD3	Domínio de ligação a quitina/celulose. Domínio putativo de ligação a carboidrato encontrado em diferentes glicosil hidrolases. Pode ocorrer em arranjos repetidos em sequência, como na sequência da quitinase 1.
Superfamílias	
Superfamília E_set	Ocorre em enzimas que hidrolisam açúcares e pode estar relacionado às superfamílias de imunoglobulinas e/ou fibronectinas tipo III (interações proteína-proteína e proteína-carboidrato). Esses domínios estão associados a diferentes tipos de domínios catalíticos e também a extremidades N- e C-terminal.
Superfamília GH_18	Glicosil hidrolases família 18, quitinases tipo II. Incluem quitotriosidases, quitobiases e endo-beta-N-acetilglucosaminidases, além das quitinases de planta tipo III e tipo V.
Superfamília ChitBD3	Domínio de ligação a quitina/ celulose. Domínio putativo de ligação a carboidrato encontrado em diferentes glicosil hidrolases. Geralmente ocorre em arranjos repetidos em sequência.
Multidomínios	
Glyco_18	Pertencente à família 18 das glicosil hidrolases
REJ	REJ do inglês "Receptor for Egg Jelly" não tem função conhecido. Domínio de 600 aminoácidos, provavelmente composta por múltiplos domínios estruturais. Com 6 resíduos de cisteínas conservados que podem formar pontes dissulfeto. Essa região contem domínios tipo PKD em sequência (tandem).

FIGURA 33 – ANÁLISE DE REGIÃO TRANSMEMBRANA NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 1

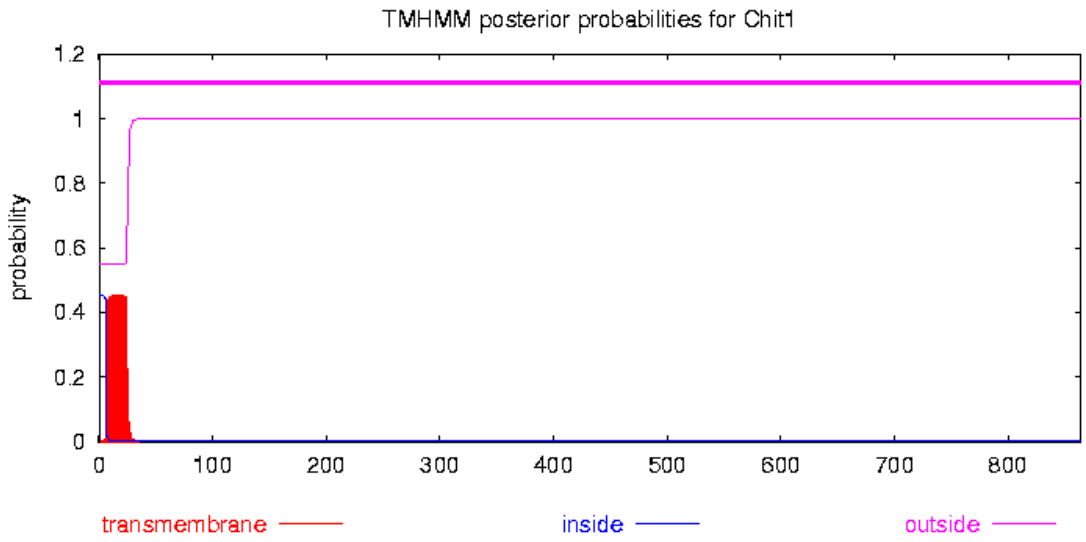


Figura gerada em TMHMM para a sequência da quitinase 1. Probabilidade de conter hélice transmembrana na região N-terminal, em vermelho. A linha azul indica a parte interna da membrana plasmática, nenhuma probabilidade, e a linha rosa indica a parte externa, 100% de probabilidade.

O programa PSORTb3.0 (YU et al., 2010) identificou a quitinase 1 como periplasmática e contendo um peptídeo sinal. A possibilidade de secreção da quitinase 1 foi analisada utilizando o programa SecretomeP 2.0 Server (BENDTSEN et al., 2005a). O "score" obtido para quitinase 1 foi de 0.949387 > 0.5, havendo a possibilidade de a proteína ser secretada. Uma análise mais detalhada de peptídeos sinais para secreção foi realizada com o programa SignalP 3.0 Server (BENDTSEN et al., 2004) e os resultados estão na Figura 34 e Tabela 8. O programa TatP 1.0 Server (BENDTSEN et al., 2005b) não indicou peptídeo sinal.

FIGURA 34 - PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 1

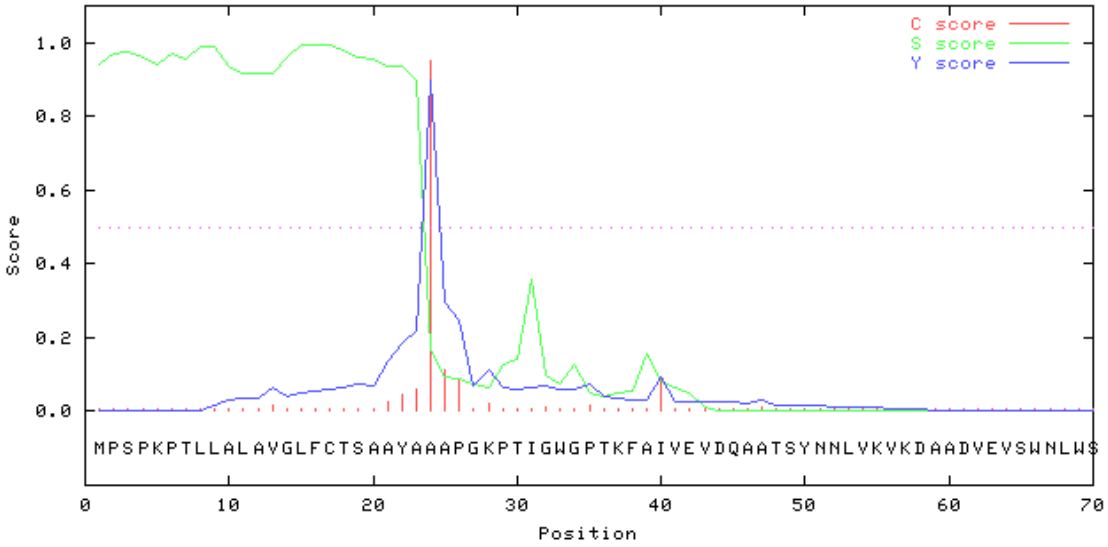


Figura gerada pelo programa SignalP3.0 para a sequência da quitinase 1. Contém os valores para o sítio de clivagem C, em vermelho, peptídeo sinal S, em verde, e Y derivado da combinação dos valores de C e S, em azul. O valor máximo de Y indica o possível sítio de clivagem.

TABELA 8 - VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 1

Quitinase 1 - 70 aminoácidos				
Parâmetro	**Posição**	**Valor**	**Corte**	**Peptídeo sinal**
Max. C	24	0.953	0.52	Sim
Max. Y	24	0.897	0.33	Sim
Max. S	16	0.995	0.92	Sim
Média S	1-23	0.956	0.49	Sim
Média D	1-23	0.926	0.44	Sim

O ponto de corte mais provável está entre as posições 23 e 24: AYA-AA (Figura 35). A probabilidade de conter peptídeo sinal é de 1 (100%) e a máxima probabilidade do sítio de clivagem estar entre as posições 23 e 24 é de 0.982.

FIGURA 35 - PROBABILIDADES DE CONTER PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 1

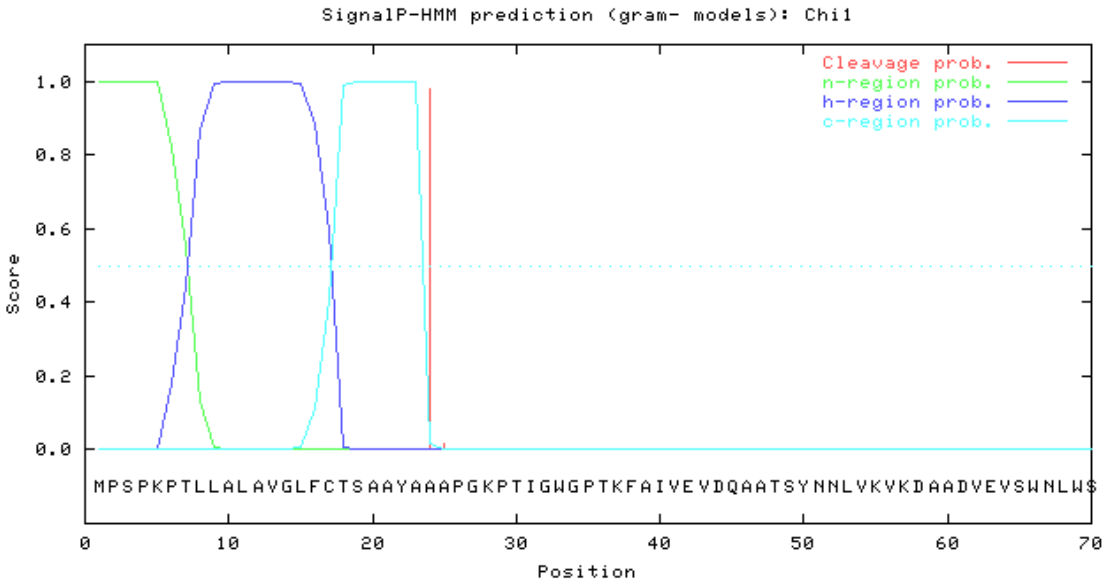


Gráfico gerado pelo programa SignalP3.0 com as probabilidades de conter peptídeo sinal na sequência da quitinase 1. A probabilidade do sitio de clivagem (em vermelho) é gerada a partir das outros três valores de probabilidade das regiões n (N-terminal em verde), h (ligação em azul escuro) e c (C-terminal em azul claro) do peptídeo sinal.

5.6.2 Quitinase 2 – Chit2

A comparação da sequência de nucleotídeos da quitinase 2 contra o GenBank utilizando o programa BlastX detectou que o gene completo alinha com o gene endoquitinase básica de *Aeromonas hydrophila*, obtendo 78% de identidade. A Figura 36 mostra o alinhamento em ClustalW2 (CHENNA et al., 2003) das duas quitinases, a sequência da quitinase 2 é mais curta que a endoquitinase e difere em alguns aminoácidos aleatórios.

FIGURA 36 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA QUITINASE 2 E DA ENDOQUITINASE BÁSICA DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

```
Quitinase2              ---------------MLSGHLWAAEAYDINKSYPGGSQVNYNGQVFEAKWWVNPGQTPGM 45
basic_endochitinase     MMTRKSSVATLLAALCLSGQLWAATPYDINQGYAGGSQVSFNGQIYEAKWYANPGQSPGV 60
                                       ***:**** .****:.*.*****.:***::****:.****:**:

Quitinase2              AAANEWDTPWKLIGEGEVTPPDTGGDDKPNPPTPTPPDGSTTLVYMSQAELDAKEKALTD 105
basic_endochitinase     QVANEWDSPWALMGEGEVTPP-AGGEGVTPPEQGGSGTADGSPVYLSQSELDAREQALTD 119
                         .*****:** *:******** :**:. . *    .  .. : **:**:****:*:****

Quitinase2              FPAMEAVKASIATRDNLVVEAVQPGRADNPGNVKRVESLLSEGQFNYLFPLRAPEYTYRG 165
basic_endochitinase     FPAMTAVKASIATRDNTVVEAVAPGLPLNPANVKRVEGLLSESQFNFLFPLRAPEYTYRG 179
                        **** ********** ***** ** . **.******.****.***:**************

Quitinase2              LLQAAAKFPALCSDYSDGRDADVICRKTLATMFAHFAQETGGHENWRPEAEWRQALVYVR 225
basic_endochitinase     FLQAVAKFPAFCGDYSDGRNAEAICRKSLATMFAHFAQETGGHENWRPEPEWRQGLVWVR 239
                        :***.*****:*.******:*:.****:**********************.****.**:**

Quitinase2              EMGWNETMRGGYNAECRPDVWQGQQWPCGTFDNGEFKSYFGRGAKQLSYNYNYGPFSEAM 285
basic_endochitinase     EMGWTEQMRGGYNAECNPEVWQGQQWPCGKFDNGEFKSYFGRGAKQLSYNYNYGPFSEAM 299
                        ****.* *********.*:**********.****************************

Quitinase2              FGTVRTLLDRPDLVADTWLNLASAVFFYTYPQPPKPSMLHVIDGTWQPNDHDKQNGLVPG 345
basic_endochitinase     FGTVRTLLDNPEKVADTWLNLASAVFFFVYPQPPKPSMLHVIDGTWQPNAHDRQNGLVPG 359
                        *********.*: **************:.******************** **:*******

Quitinase2              FGVTTQIINGGVECGGPVEHAQSQNRINYYREFANYLGVAVPSDEVLGCKNMKVFDDKGA 405
basic_endochitinase     FGVTTQIINGGVECGGAAEHAQSQNRITYYQAQAQYLGVPVPADEVLGCKNMKVFDEAGA 419
                        ***************..*********.**:  *:****.**:**************: **

Quitinase2              GALPIYWEQDWSYVAENPNGGKSYACKLVGYQTRFSAFKEGDYSRCVQHFYPEVVIEDNG 465
basic_endochitinase     GALPIYWENDWSYVPGNPNGGKSYACKLVGYQTRFSAFKERDYSRCVQHFFPEVVIEDNG 479
                        ********:*****. ********************** *********:*********

Quitinase2              GGTNLPPVANITGPAQAEGGSKVTLSGQHSSDPEGKPLTYAWTIPAGASAPALDQVTLEL 525
basic_endochitinase     GGTNLPPVASISGPSEALGGATVLLSGQGSSDPEGKPLSYAWTLPAGASASDLTQSTLSA 539
                        *********.*:**::* **:.* **** *********:****:******. * * **.

Quitinase2              TLP-KPASDTKLEIKLTVTDEGNLSRSTTHSLLVKGEEGGVTPPD-YPAYKEGTPYKAGE 583
basic_endochitinase     TLPPTPASDTRYGFVLKVTDDKGLSRSATHEILIKGS-GGTTPPDGNPPYQEGTAYKAGD 598
                        *** .*****:  : *.***: .****:**.:*:**. **.****  *.*:***.****:

Quitinase2              RVSNGGASYECKPHPYTGWCAGAAWAYEPGKGTAWSDAWIKL 625
basic_endochitinase     KVSNLGGNYQCKPHPYTGWCAGAAWAYEPGKGTAWSDAWIKL 640
                        :*** *..*:*********************************
```

Alinhamento gerado com configuração padrão do ClustalW2. Resíduos *****conservados, **:** similares, **.** pouco similares

Utilizando a ferramenta blastp o CDD (conserved domain database) gerou a Figura 37 (MARCHLER-BAUER et al., 2011). O programa InterproScan indicou os mesmos domínios principais presentes na sequência de aminoácidos descritos na Tabela 9. Por similaridade de sequências a quitinase 2 pode ser classificada como pertencente a família 19 das glicosil hidrolases.

FIGURA 37 - DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 2

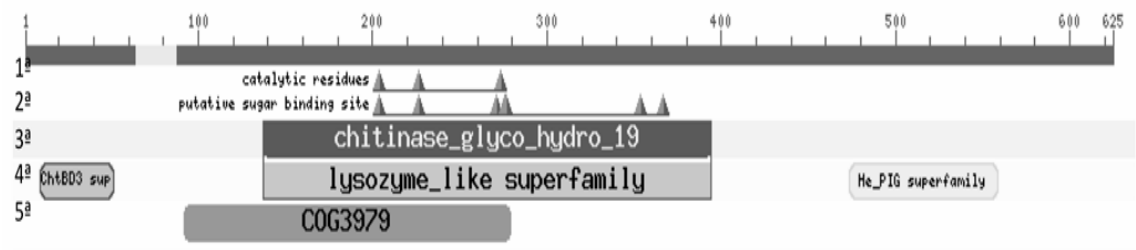


Figura gerada pela ferramenta blastp representando os domínios conservados presentes na sequência de aminoácidos da quitinase 2. Cores diferentes representam domínios diferentes. 1ª. linha- resíduos catalíticos; 2ª. linha – sítios putativos de ligação a açúcar; 3ª. linha-"hits" específicos, 4ª. linha- superfamílias; 5ª. linha- multidomínio.

O programa Protparam (GASTEIGER et al., 2005) disponível no site Expasy forneceu alguns parâmetros físico-químicos para a sequência de aminoácidos da quitinase 2: 625 aminoácidos, peso molecular de 68402.1 e pI teórico de 4,92.

A análise de região transmembrana foi realizada em TMHMM Server v 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) revelando que não possui hélices transmembrana.

O programa PSORTb3.0 (YU et al., 2010) identificou a quitinase 2 como extracelular, devido a similaridade com o precursor da proteína A ligadora de GlcNAc. Essa proteína é extracelular e além disso, a quitinase 2 não apresentou sinal para outra localização. A possibilidade de secreção da quitinase 2 foi analisada utilizando o programa SecretomeP 2.0 Server (BENDTSEN et al., 2005a). O "score" obtido para endoquitinase foi de 0.940902 > 0.5, havendo a possibilidade de a proteína ser secretada. Uma análise mais detalhada de peptídeos sinais para secreção foi realizada com o programa SignalP 3.0 Server (BENDTSEN et al., 2004) e os resultados estão na Figura 38 e Tabela 10. O programa TatP (BENDTSEN et al., 2005a) não indicou peptídeo sinal.

TABELA 9 - DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 2

Domínio	**Função**
Catalítico	Resíduos catalíticos no domínio conservado chitinase_glyco_hydro_19. Todos os 3 resíduos que participam da catálise foram encontrados na sequência: E215, E226 e S237. A catálise por glicosidases envolve um único mecanismo de desaclopamento no qual um Glu age como base para polarizar a molécula de água enquanto um segundo Glu age como ácido para protonar o O4 que participa da ligação glicosídica clivando-a.
Ligação a carboidratos	Sítio putativo de ligação a açúcares no domínio conservado chitinase_glyco_hydro_19. Todos os 7 resíduos que participam da ligação foram encontrados na sequência: E215, E226, Q235, Y240, N241, N354 e Q359. Baseado no modelo de ligação da lisozima.
Específicos	
Família 19 Glicosil hidrolase	Domínio conservado das glicosil hidrolases da família 19. Quitinases da família 19 foram encontradas primeiramente em plantas (classes I, III e IV), mas algumas são encontradas em bactérias. Quitinases das classes I e II são similares nos seus domínios catalíticos. Quitinases classe I possuem uma extremidade N-terminal rica em cisteínas, um domínio de ligação a quitina que é separado do domínio catalítico por uma região dobrável rica em prolina e glicina. Quitinases classe II não possuem nem o domínio de ligação a quitina nem a região dobrável. Quitinases classe IV são similares as de classe I mas são menores devido a algumas deleções. Análise estrutural revela que as quitinases da família 19, juntamente com as quitosanases da família 46, são semelhantes a muitas lisozimas. As estruturas revelam que os grupos diferentes de enzimas vieram de um mesmo ancestral de glicohidrolase anterior a separação de procariotos e eucariotos.
Superfamílias	
ChtBD3	Domínio de ligação a quitina/ celulose. Domínio putativo de ligação a carboidrato encontrado em diferentes glicosil hidrolases. Pode ocorrer em arranjos repetidos em sequência.
Tipo lisozima	Domínio tipo lisozima. Contem membros envolvidos na hidrólise de ligações polissacarídicas beta-1,4.
He-PIG	Domínio putativo de Imunoglobulina. Representa a região central conservada com ~90 resíduos repetidos encontrado em muitas hemaglutininase e outras proteínas de superfície. Similaridades de sequência com pfam02494 e pfam00801 sugerindo uma dobra tipo Ig. Possível ligação a íons cálcio.
Multidomínios	
COG3979	Domínio protéico não caracterizado contendo um domínio tipo 3 de ligação a quitina.

FIGURA 38 – PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 2

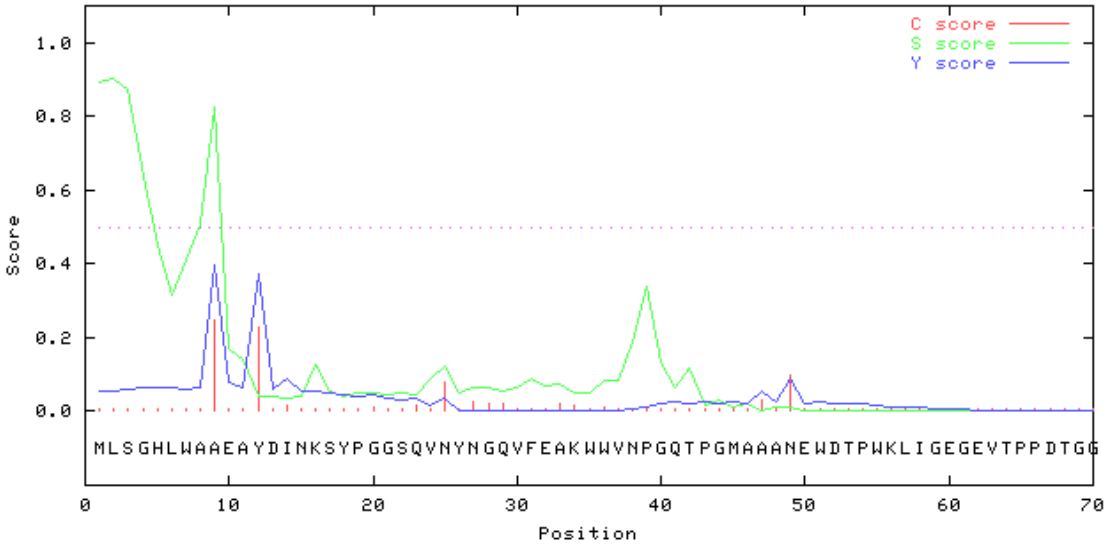


Gráfico gerado pelo programa SignalP3.0 para a sequência da quitinase 2. Contém os valores para o sítio de clivagem C, em vermelho, peptídeo sinal S, em verde e Y derivado da combinação dos valores de C e S, em azul. O valor máximo de Y indica o possível sítio de clivagem da peptidase sinal

TABELA 10 – VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 2

Quitinase 2 – 70 aminoácidos				
Medida	**Posição**	**Valor**	**Corte**	**Peptídeo sinal**
Max. C	9	0.247	0.52	Não
Max. Y	9	0.398	0.33	Sim
Max. S	2	0.901	0.92	Não
Média S	1-8	0.623	0.49	Sim
Média D	1-8	0.511	0.44	Sim

O programa gerou baixos valores para o sítio de clivagem C e para o peptídeo sinal S relatando que a probabilidade da quitinase 2 conter peptídeo sinal é nula.

5.6.3 Quitinase 3 – Chit3

A comparação da sequência de nucleotídeos da quitinase 3 contra o GenBank utilizando o programa BlastX detectou que o gene alinha com o gene quitodextrinase de

Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila, obtendo 93% de identidade. A Figura 39 mostra o alinhamento em ClustalW2 (CHENNA et al., 2003) das duas quitinases. Na sequência da quitinase 3 faltam 124 aminoácidos da região N-terminal e ainda diferem em apenas alguns aminoácidos aleatórios.

FIGURA 39 – ALINHAMENTO CHIT 3 E QUITODEXTRINASE DE *A. HYDROPHILA SUBSP. HYDROPHILA* ATCC 7966

```
Quitinase3          ------------------------------------------------------------
chitodextrinase     MLVALAAMPAWAQAAYPAYQAGTAYKAGDIVSNVGNLYECKEFPYSGWCGASPYHYAPGV 60

Quitinase3          ------------------------------------------------------------
chitodextrinase     GVVWADAWKLYGGDVPPPALGVAVSSPAAGASFNEGASVALAVTLSGPVTALVRVEYLID 120

Quitinase3          ----ATASASPWGASWSAAGVGAHPLKARALDKDGKVLSEADSSFNVAAVVAPEAPKVSI 56
chitodextrinase     GTLVATASASPWNGSWSAAGVGAHALKARALDKDGKVLSEADSSFNVAAVVAPEAPKVSI 180
                        ********..**********.**********************************

Quitinase3          SSPASGAKVTLGRSVAVSGNVTDANNDVAKVELFVDGKKVGEDNASPWQVNWTPDAKGSA 116
chitodextrinase     SSPASGAKVTLGRSVAVSGNVTDANNDVAKVELFVDGKKVGEDTSAPWQVNWTPQSKGLA 240
                    ******************************************.::********::** *

Quitinase3          ALKLVATDKTNLVGESAAVNVTVEEAALPPTGGNLSCDIRQIYRPDGYECMGDDHARRVI 176
chitodextrinase     GLKLVATDKENLSGESSQVDVQVEEAALPPTGGNLSCDIRQIYRPDGYECMGDDHARRVI 300
                    .******** ** ***: *:* ************************************

Quitinase3          GYFTSWRTGKNGLPAYLVSDIPWSKITHINYAFAAVDEQSHTIKVDDSATKMTWDGVPGA 236
chitodextrinase     GYFTSWRTGKNGLPSYLVSDIPWDKITHINYAFAAVDEQSHTIKVDDSATKMTWDGVPGA 360
                    **************:********.************************************

Quitinase3          EMDPEFAYKGHFNLLSKFKKQYPDVKTLISVGGWADTRGFYTATTKGDCSVNTDGINALA 296
chitodextrinase     EMDPEFAYKGHFNLLSKYKKQYPDVKTLISVGGWADTRGFYTATTKGDCSVNSDGINAFA 420
                    ****************:*************************************:*****:*

Quitinase3          TSAVSFIRQYGFDGVDIDYEYPTSMKDAGNPNDFPLSNQCRSKLFANYKVMMQTLRSKLD 356
chitodextrinase     NSAVSFIRQYGFDGVDVDYEYPTSMKDAGNPNDFPLSNQCRGKLFANYKVLMQALRSKLD 480
                    .***************:************************.********:**:******

Quitinase3          AAGSEDGRKYMLTIASPASAYLLRGMENFQVTQYLDYVNLMTYDFHGAWNHFVGHNAALF 416
chitodextrinase     SAGSEDGRKYMLTIASPASAYLLRGMENFQVTQYLDYVNLMTYDFHGAWNNFVGHNAALF 540
                    :************************************************:*********

Quitinase3          DNKADAELAQWGVYTQKEFGGIGYLNAAWSAHYFRGALAAGKINVGVPYYTRGWQGVSGG 476
chitodextrinase     DNKADAELAHWGVYTQSQFGGIGYLNAAWSAHYFRGALAAGKINVGVPYYTRGWQGVSGG 600
                    *********:******.:****************************************

Quitinase3          THGLGGKAALPSQSDCQPGTGGGTIPCGNGAVGIDNIWHDLDKNGKEIGGGAVPMWHAKN 536
chitodextrinase     THGLAGKAALPSQSDCQPGTGGSTIPCGNGAVGIDNIWHDLDKNGKEIGGGAVPMWHAKN 660
                    ****.****************.************************************

Quitinase3          LEHAADLGITTMPSYGQAWGLDPNNPAHVMQGKYVRYYDDKAHAPWLWNEEKKVFLSTED 596
chitodextrinase     LENAASLGITTMPSYGQAWGLDSNNPAHVMQGKYVRYYDDKAQAPWLWNEEKKVFLSTED 720
                    **:**.****************.******************:*****************

Quitinase3          EESMGHKLDYIVNRGLGGVMFWEMAGDYAYDPVKKEYGMGDTLTTLAYDKFAKATKYNAK 656
chitodextrinase     EESMGHKLDYIIKRGLGGVMFWEMAGDYAFDPAKNEYGMGSTLTTLAYEKFAKAAKYNTQ 780
                    **********::****************:**.*:*****.*******:*****:***::

Quitinase3          QNDLAAPAAQLDIAVSLSGFKEGDSNYPINPTLKLTNNSTQTIPGGARIEFLVPTSTSDT 716
chitodextrinase     QNDLAAPTAQLDIAVSLSGFKEGDSNYPINPILKLTNNSTQTIPGGTRIEFLVPTSTSDT 840
                    *******:********************** ************:*************
```

Continuação Figura 39

```
Quitinase3          ITDQSGMGLKVVESGGNQNSDGIANEKDFHKVALTLPTWKAWTPGTDVEVAMTYYLPAAG 776
chitodextrinase     ITDQSGMGLKVVESGGNQNSDGIAGEKDFHKAAFTLPTWKAWAPGSDVEVAMTYYLPAAG 900
                    ************************.******.*:********:**:**************

Quitinase3          VPSGIRIISGSQTAGLKAEFPTLPEAVLGS-GGGE--GGATCSSQNINPAAYKAYPTWPQ 833
chitodextrinase     VPSGIRIISGTQTAGLKAEFPTLPEAVLGSSGGGENPGGATCSSQNVNPAAYKAYPTWPQ 960
                    **********:******************* ****  *********:**************

Quitinase3          GDHANGGDRITHNKVVWQANWWTSSEPKATDGSWKSVCSY 873
chitodextrinase     GDHANGGDRMTNNKAVWQANWWTSSEPKAGDGSWKLVCSY 1000
                    *********:*:**.************** ***** ****
```

Alinhamento gerado com configuração padrão do ClustalW2. Resíduos *****conservados, **:** similares, **.** pouco similares

Utilizando a ferramenta blastp o CDD (conserved domain database) gerou a Figura 40 (MARCHLER-BAUER et al., 2011). O programa InterproScan indicou os mesmos domínios principais presentes na sequência de aminoácidos descritos na Tabela 11. Por similaridade de sequência a quitinase 3 pode ser classificada como pertencente a família 18 das glicosil hidrolases.

FIGURA 40 – DOMÍNIOS CONSERVADOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA DA QUITINASE 3

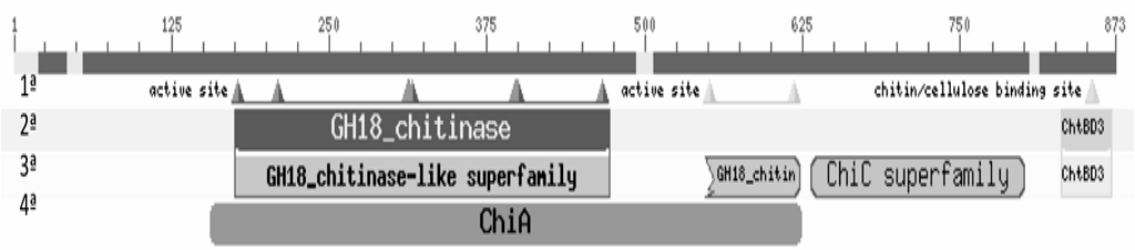


Figura gerada pela ferramenta blastp representando os domínios conservados presentes na sequência de aminoácidos da quitinase 1. Cores diferentes representam domínios diferentes. 1ª. linha- sítios ativos e sítios de ligação à quitina; 2ª. linha- "hits" específicos, 3ª. linha- superfamílias e 4ª. linha- multidomínios.

O programa Protparam (GASTEIGER et al., 2005) disponível no site Expasy forneceu alguns parâmetros físico-químicos para a sequência de aminoácidos da quitinase 3: 817 aminoácidos, peso molecular de 93595.4 e pI teórico de 5,56. A análise de região transmembrana foi realizada em TMHMM Server v 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) revelando que não possui hélices transmembrana.

TABELA 11 – DESCRIÇÃO DAS REGIÕES CONSERVADAS NA CHIT 3

Domínio	Função
Catalítico	Domínio catalítico conservado de GH18_chitinase. Dos 10 resíduos que compõem esse domínio 9 foram encontrados na sequência: Y178, F195, D297, D299, E301, M393, Y395, D396, Y466. Domínio catalítico conservado de GH18_chitinase. Dos 10 resíduos que compõem esse domínio 2 foram encontrados na sequência: Y217, W618.
Ligação a quitina	Resíduos de aminoácidos aromáticos alinhados interagem com a quitina/celulose. Membros da família que não possuem esses resíduos aromáticos conservados ligam quitina/celulose de uma outra forma. Sítio de ligação a quitina/celulose no domínio conservado ChtBD3. Todos os 2 resíduos que participam do sítio de ligação foram encontrados na sequência: W850, W851
Específicos	
Família 18 Glicosil hidrolase	A estrutura desse domínio é um barril de 8 fitas alfa/beta e com um sítio ativo pronunciado na extremidade C-terminal do barril β.
ChtBD3	Domínio de ligação a quitina/celulose. Domínio putativo de ligação a carboidrato encontrado em diferentes glicosil hidrolases. Pode ocorrer em arranjos repetidos em sequência.
Superfamílias	
GH_18	Glicosil hidrolases família 18, quitinases tipo II. Incluem quitotriosidases, quitobiases e endo–beta–N- acetilglucosaminidases, além das quitinases de planta tipo III e tipo V.
ChitB3	Domínio de ligação a quitina/ celulose. Domínio putativo de ligação a carboidrato encontrado em diferentes glicosil hidrolases. Geralmente ocorre em arranjos repetidos em sequência.
ChitC	Quitinase C. Essa região com ~170 aminoácidos é encontrada na extremidade C do domínio pfam00704.
Multidomínios	
ChiA	Domínio de 600 aminoácidos com 6 resíduos de cisteínas conservados.

O programa PSORTb3.0 (YU et al., 2010) identificou a quitinase 3 como periplasmática e não apresentou sinal para outra localização. A possibilidade de secreção da quitinase 3 foi analisada utilizando o programa SecretomeP 2.0 Server (BENDTSEN et al., 2005a). O "score" obtido foi de 0.937676 > 0.5, havendo a possibilidade de a proteína ser secretada. Uma análise mais detalhada de peptídeos sinais para secreção foi realizada com o programa SignalP 3.0 Server (BENDTSEN et al., 2004) e os resultados estão na Figura 41 e Tabela 12. O programa TatP 1.0 Server (BENDTSEN et al., 2005b) não indicou peptídeo sinal.

FIGURA 41 - PREVISÃO DE PEPTÍDEO SINAL EM QUITINASE 3

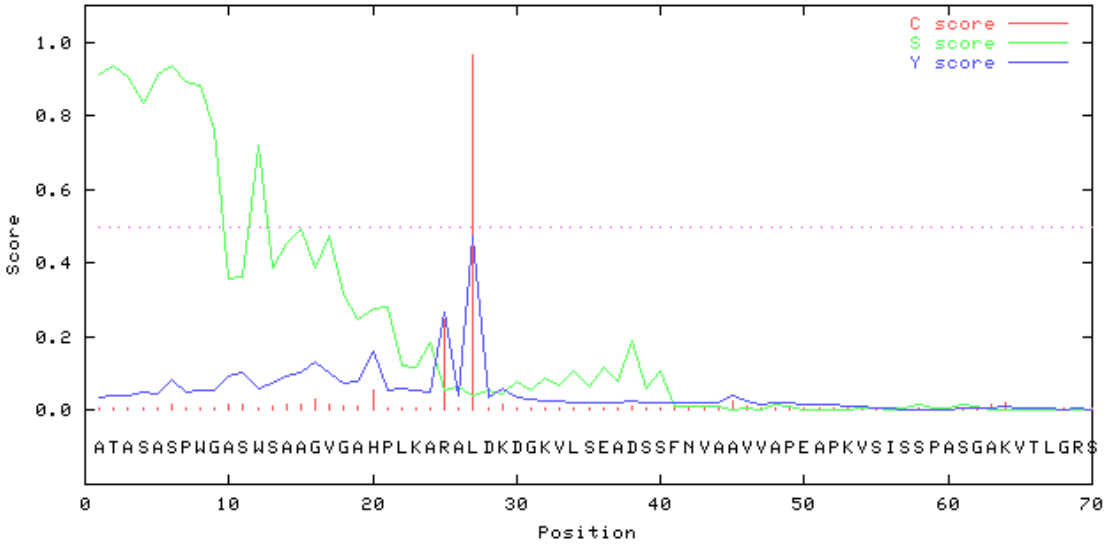


Gráfico gerado pelo programa SignalP3.0 para a sequência da quitinase 3. Contém os valores para o sítio de clivagem- C, em vermelho, peptídeo sinal- S, em verde e Y derivado da combinação dos valores de C e S, em azul. O valor máximo de Y indica o possível sítio de clivagem da peptidase sinal

TABELA 12 - VALORES ESTIMADOS PARA PEPTÍDEO SINAL EM SIGNALP3-NN PARA QUITINASE 3

Quitinase 3 - 70 aminoácidos				
Medida	**Posição**	**Valor**	**Corte**	**Peptídeo sinal**
Max. C	27	0.964	0.52	Sim
Max. Y	27	0.476	0.33	Sim
Max. S	2	0.936	0.92	Sim
Média S	1-26	0.511	0.49	Sim
Média D	1-26	0.494	0.44	Sim

O ponto de corte mais provável está entre as posições 26 e 27: ARA-LD (Figura 42). A probabilidade de conter peptídeo sinal é de 0.605 e a probabilidade do sítio de clivagem estar entre as posições 26 e 27 é de 0,255.

FIGURA 42 – PROBABILIDADES DE CONTER PEPTÍDEO SINAL NA QUITINASE 3

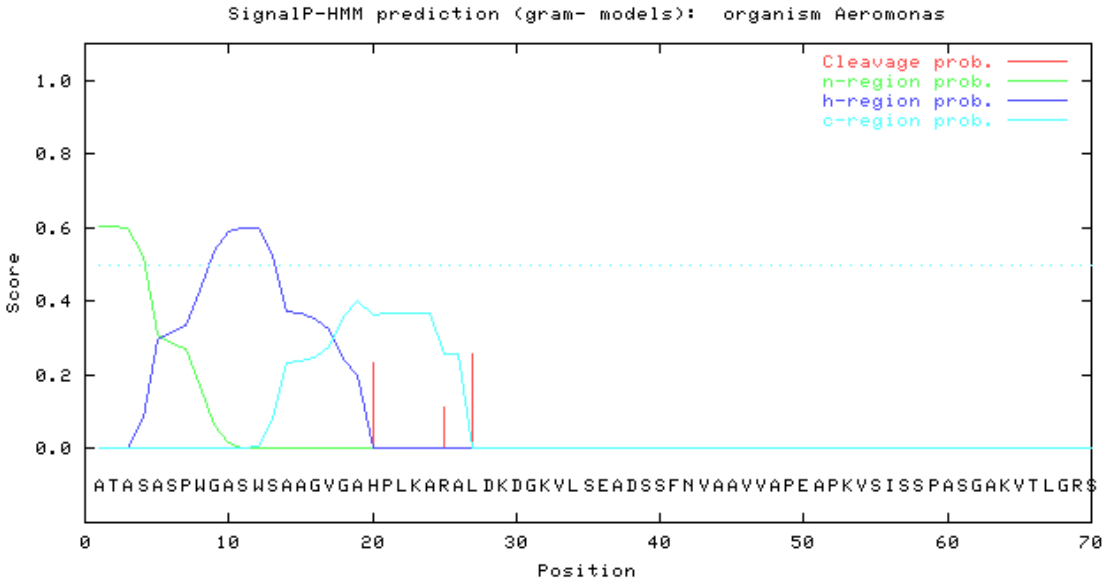


Gráfico gerado pelo programa SignalP3.0 com as probabilidades de conter peptídeo sinal na sequência da quitinase 3. A probabilidade do sitio de clivagem (em vermelho) é gerada a partir das outros três valores de probabilidade das regiões n (N-terminal em verde), h (ligação em azul escuro) e c (C-terminal em azul claro) do peptídeo sinal.

5.7. Alinhamento das Sequências de Aminoácidos das Três Quitinases

As sequências de aminoácidos dos genes das três quitinases encontradas foram alinhadas mostrando que são enzimas diferentes contendo cerca de 23% de seus aminoácidos conservados ou similares (Figura 43).

FIGURA 43 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE CHIT 1, 2 E 3.

Continuação Figura 43

```
Chit1           D-GALDASAATRLTVKPVSGGGDCSATDPDAANWPAWQASKVYNGGDKVSHNQLVWQAKY 795
Chit3           A-LTLPTWKAWTPGTDVEVAMTYYLPAAGVPSGIRIISGSQTAGLKAEFPTLPEAVLGSG 807
Chit2           DEGNLSRSTTHSLLVKGEEGG-------VTPPDYPAYKEGTPYKAGERVSNGGASYECKP 596
                    *    :    ..   .          ...    . .       ...        .

Chit1           WTQGNEPSRTADQWTLVSKVQLGWDANVAYNGGDLTNHNGRQWKAQYWTRGDEPGKAAVW 855
Chit3           GGEGGATCSSQNINPAAYKAYPTWPQGDHANGGDRITHNKVVWQANWWTSSEPKATDGSW 867
Chit2           ------------------HPYTGWCAG---------------AAWAYEPGKGTAWSDAW 622
                                  :    *  .                *  :  ..  .    *

Chit1           QDVGAASCK 864
Chit3           KSVCSY--- 873
Chit2           IKL------ 625
                 .:
```

Alinhamento gerado com configuração padrão do ClustalW2. Resíduos *****conservados, **:** similares, **.** pouco similares

5.8 Alinhamento das Sequências das Quitinases com as do PDB

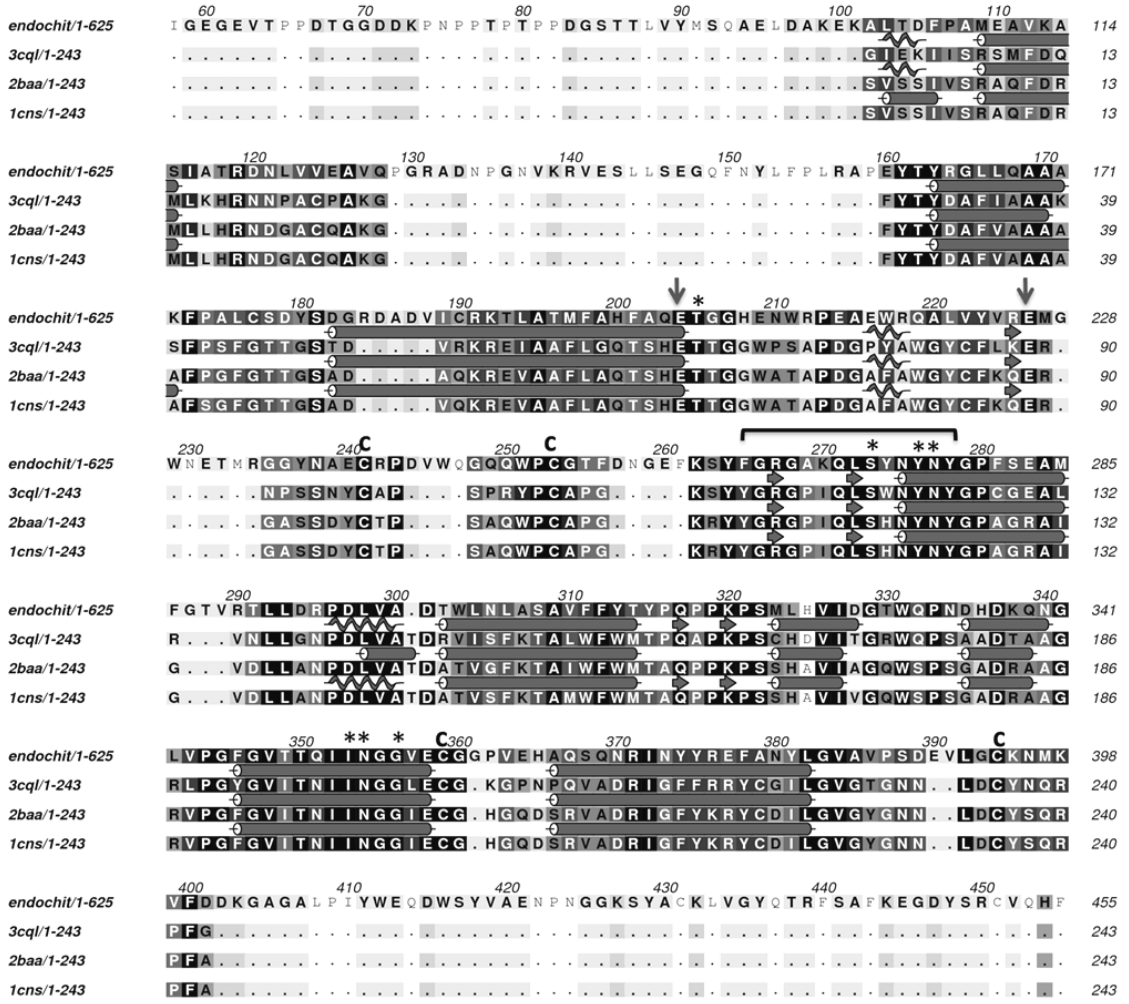
As sequências da quitinase 2 e 3 apresentaram pouca similaridade com as estruturas disponíveis no PDB. Os três melhores resultados encontram-se na Tabela 13 e 14.

TABELA 13 – ESTRUTURAS COM MAIOR SIMILARIDADE A CHIT 2

Nº de Acesso PDB/ Identidade	**Estrutura e Organismo**
3CQL A 35%	Cadeia A, Estrutura cristalográfica da Quitinase pertencente a família GH_19 de *Carica papaya*
2BAA A 36%	Cadeia A, A Estrutura cristalográfica refinada de uma endoquitinase de sementes de *Vulgare L.* Com resolução de 1.8 Angstroms
1CNS A 35%	Cadeia A, Estrutura cristalográfica de quitinase com resolução de 1.91 Angstroms – *Hordeum vulgare*

Foi feito o alinhamento das sequências de aminoácidos das quitinase 2 e 3 com as sequências das proteínas selecionadas do PDB. Alguns resíduos conservados importantes para a ligação do substrato, bem como os resíduos catalíticos foram marcados e a região conservada em quitinases de plantas correspondente a fenda de ligação ao substrato está demarcada na Figura 44 para a quitinase 2.

FIGURA 44 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PARA QUITINASE 2



Alinhadas sequências de quitinase 2, 3CQL, 2BAA e 1CNS, pontos indicam posições em que não há alinhamento. Em preto aminoácidos conservados e em cinza aminoácidos do mesmo grupo. As representações das estruturas secundárias estão acima de cada sequência. As setas indicam folhas β; os cilindros α-hélices e as espirais hélices mal definidas. Resíduos catalíticos assinalados com seta, região demarcada conservada em quitinases da família 19 das glicosil hidrolases. *resíduos conservados importantes para catálise ou ligação de substrato. **C** resíduos de cisteína possíveis de formar pontes dissulfeto.

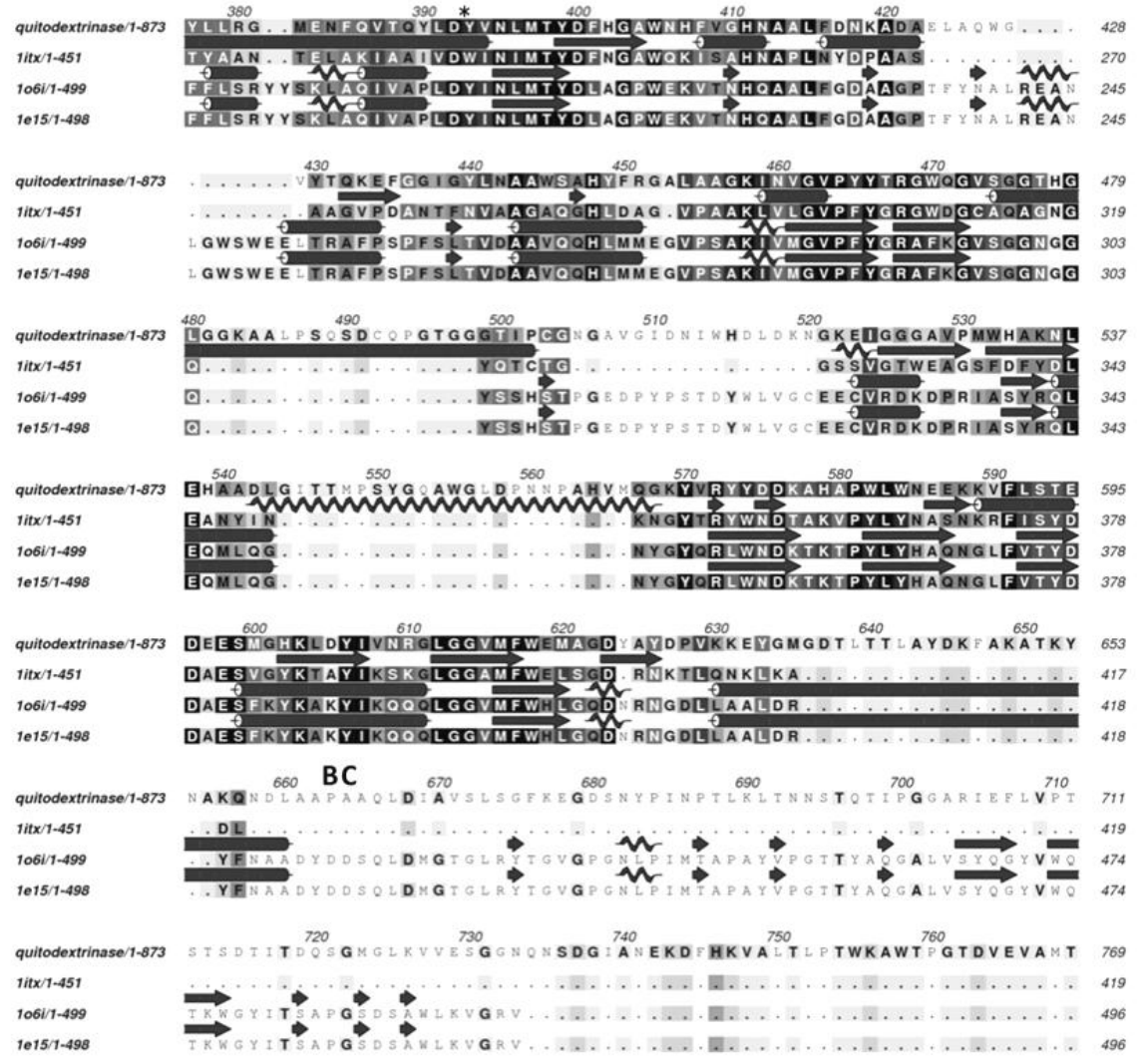
TABELA 14 – ESTRUTURAS COM MAIOR SIMILARIDADE A CHIT 3

Nº de Acesso PDB/ Identidade	Estrutura e Organismo
1ITX A 33%	Cadeia A, Domínio catalítico da Quitinase A1 de *Bacillus circulans* WI-12
1O6I A 27%	Cadeia A, Quitinase B de *Serratia marcescens* complexada com o intermediário catalítico mimetizado dipeptídeo cíclico Ci4
1E15 A 27%	Cadeia A, Quitinase B de *Serratia marcescens*

Alguns resíduos conservados importantes para a catálise foram marcados e a região conservada em glicosil hidrolases da família 18 está sublinhada na Figura 45. A quitinase 3 apresentou apenas a região do domínio catalítico conservada, os demais domínios não são conservados apresentando grandes regiões sem alinhamento.

FIGURA 45 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PARA QUITINASE 3

Continuação Figura 45



Alinhadas sequências de quitinase 3, 1ITX, 1O6I e 1E15, pontos indicam posições em que não há alinhamento. Em preto aminoácidos conservados e em cinza aminoácidos do mesmo grupo. As representações das estruturas secundárias estão acima de cada sequência. As setas indicam folhas β , os cilindros α-hélices e as espirais hélices mal definidas. Resíduo catalítico assinalado com seta, região sublinhada conservada em quitinases da família 18 das glicosil hidrolases. *resíduos conservados importantes para a catálise ou ligação do substrato. **B**-região do domínio catalítico. **C**- região C-terminal.

5.8 Modelagem por Homologia da Chit 1

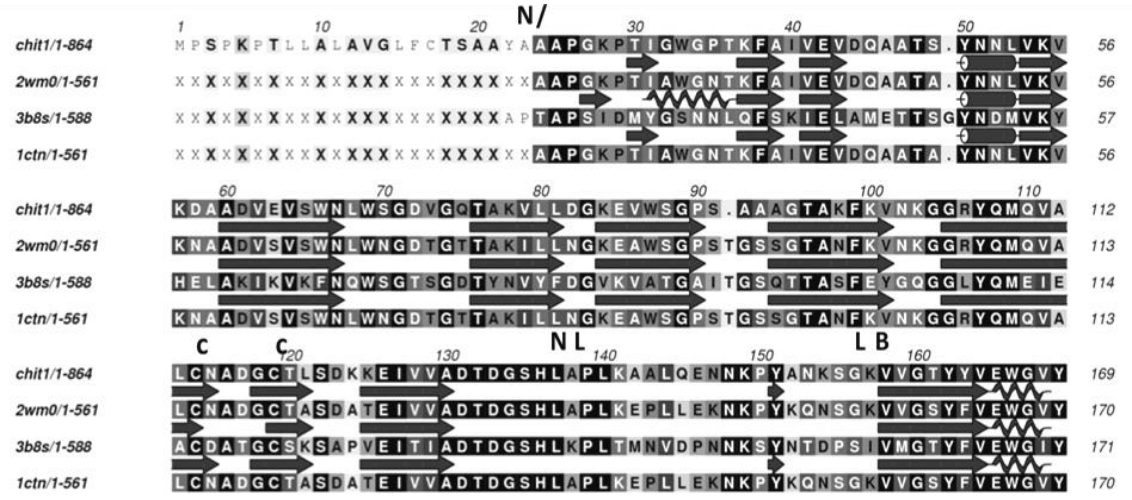
A sequência de aminoácidos da quitinase 1 foi comparada às sequências do PDB e foram escolhidas três estruturas diferentes e com melhor classificação pelos critérios do programa Mholline (Tabela 15).

TABELA 15 – ESTRUTURAS ESCOLHIDAS NO MHOLLINE PARA CHIT 1

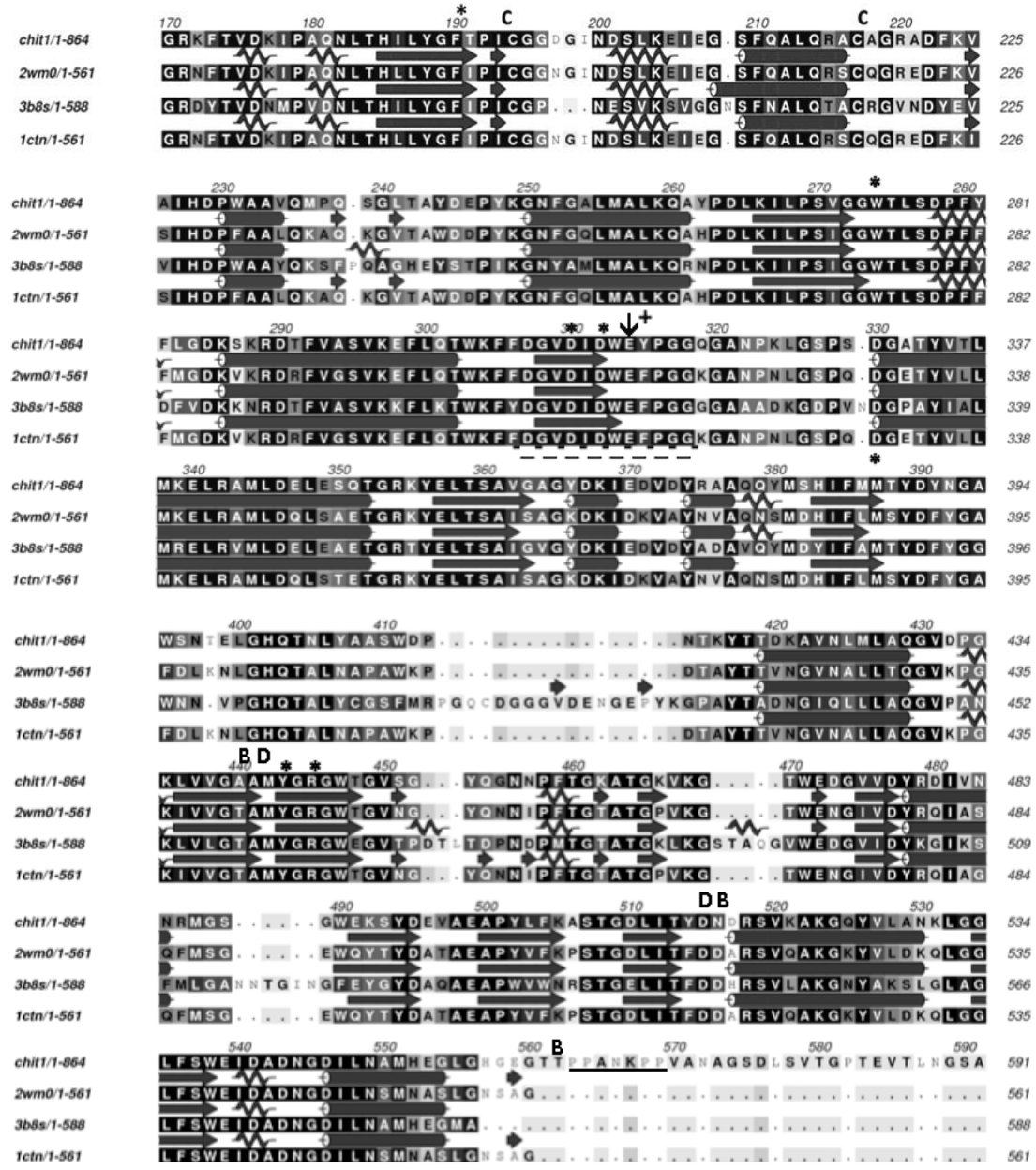
Nº de Acesso PDB/ Identidade	**Estrutura e Organismo**
1CTN A 75%	Cadeia A, Estrutura Cristalográfica de uma quitinase bacteriana com resolução de 2.3 Angstroms - *Serratia marcescens*
2WM0 A 75%	Cadeia A, Quitinase A de *Serratia marcescens* ATCC 990 em complexo com Quitobiotiazoline Tioamida
3B8S B 54%	Cadeia B, Estrutura Cristalográfica de uma Quitinase A do tipo selvagem de *Vibrio Harveyi*

O alinhamento da sequência de aminoácidos e das estruturas secundárias da quitinase 1 e das três quitinases selecionadas foi realizado com o programa DSSP e visualizado em ALINE (Figura 46). A grande similaridade na sequência de aminoácidos da quitinase 1 com as outras quitinases mostra que as estruturas secundárias das quitinases do PDB podem ser extrapoladas para a quitinase 1. Não ocorre alinhamento na região N-terminal até o aminoácido 23 corroborando para a existência do peptídeo sinal nessa região. E o alinhamento ocorre até o aminoácido 557, que é o tamanho das quitinases selecionadas. A região C-terminal com 330 aminoácidos não possui estrutura prevista, nenhuma quitinase contendo essa região possui estrutura resolvida.

FIGURA 46 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E SUAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS EM ALINE PARA QUITINASE 1



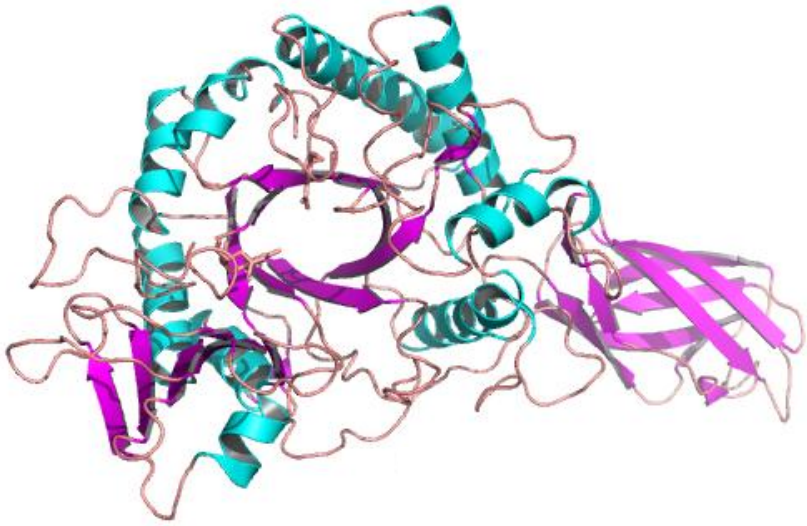
Continuação Figura 46



Alinhadas sequências de quitinase 1, 2WM0, 3B8S e 1CTN, pontos indicam posições em que não há alinhamento. Em preto aminoácidos conservados e em cinza aminoácidos do mesmo grupo. As estruturas secundárias estão representadas acima da sua respectiva sequência. As setas indicam folhas β, os cilindros α-hélices e as espirais hélices mal definidas. Delimitados domínios N-terminal; L-ligação entre N-terminal e o restante da estrutura; B- domínio catalítico motivo barril; D- dobra α+β inserida no domínio catalítico. * resíduos conservados importantes para a catálise ou ligação ao substrato. + resíduo normalmente conservado que difere na quitinase 1. A seta indica o resíduo catalítico. **C** possíveis pontes dissulfeto. / sítio de clivagem do peptídeo sinal. Sublinhada região conservada que liga o domínio catalítico com a região A da enzima. Sublinhada em pontilhado região conservada em enzimas da família 18 das glicosil hidrolases.

A partir dos arquivos de alinhamento gerados em DSSP, foi construído o modelo de estrutura para a quitinase 1 no Modeller. As regiões sem alinhamento N-terminal e C-terminal foram retiradas para a construção do modelo. A estrutura foi visualizada no Pymol (Figura 47).

FIGURA 47 – MODELO DE ESTRUTURA POR HOMOLOGIA DA CHIT 1



Modelo da estrutura da quitinase 1 diferenciando as estruturas secundárias. Em rosa folhas- β, em azul α-hélices.

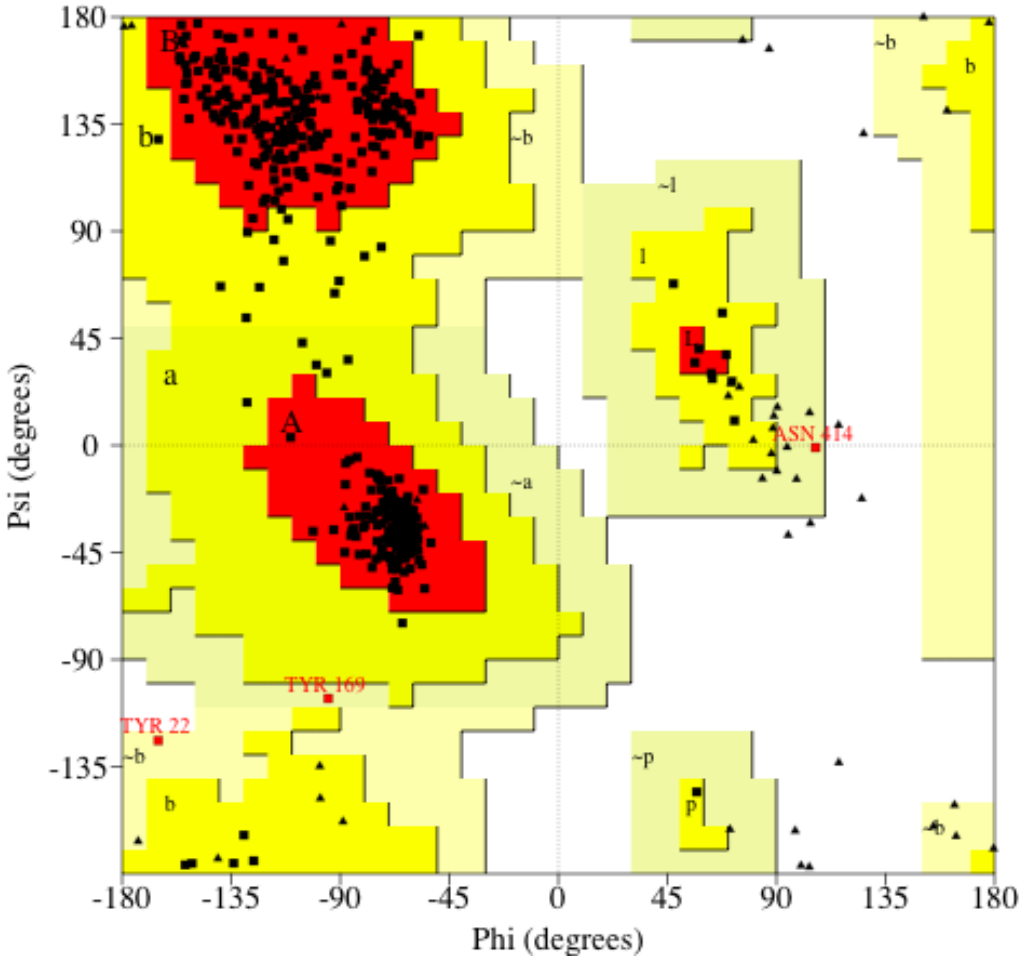
O modelo obtido para Chit1 foi analisado pelo gráfico de Ramachandran (LASKOWSKI, 1993; RAMACHANDRAN, 1968) que indicou ausência de resíduos em conformação desfavorável, ou seja, todos os ângulos ψ e φ estão dentro do permitido (Figura 48).

Baseado na análise de 118 estruturas de resolução com no mínimo 2.0 Angstroms e fator R menor que 20%, um modelo de boa qualidade deve ter mais de 90% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis (LASKOWSKI, 1993). As estatísticas da plotagem encontram-se na Tabela 16.

TABELA 16 – ESTATÍSTICAS DA PLOTAGEM DE RAMACHANDRAN

Resíduos de aminoácidos	Quantidade	Porcentagem
Em regiões favoráveis [A, B, I]	439	93.0%
Em regiões permitidas [a, b, l, p]	30	6.4%
Em regiões generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	3	0.6%
Em regiões proibidas	0	0.0%

FIGURA 48 – GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PARA MODELO DA QUITINASE 1



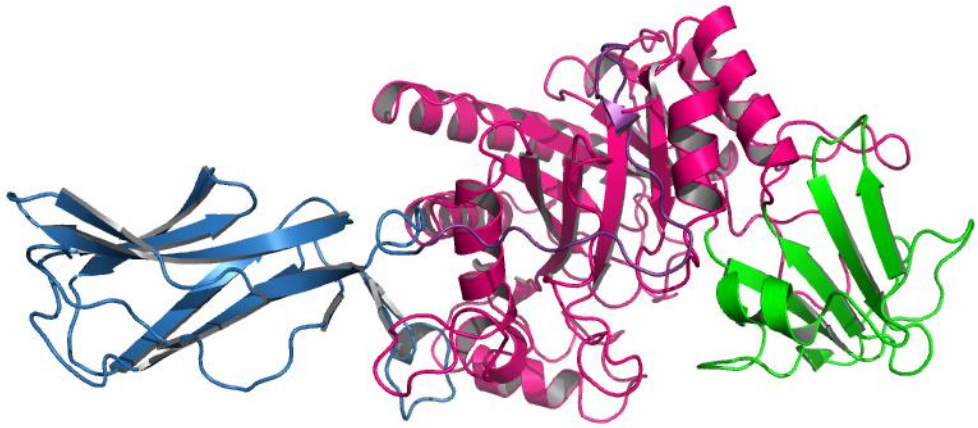
Os quadrados pretos indicam os aminoácidos, os triângulos indicam glicinas. Em vermelho as regiões favoráveis (A, B, I), em amarelo escuro regiões permitidas (a, b, l, p), em amarelo claro regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p) e em branco regiões proibidas.

A figura 49 mostra os domínios conservados presentes em quitinases da família 18 das glicosil hidrolases presentes na quitinase 1. O domínio N-terminal de folhas-β

similar ao domínio de fibronectina tipo III (resíduos 24-137), o domínio catalítico formado por barril α/β (resíduos 159-442 e 517-563) e um domínio menor de dobra α/β (resíduos 443-516), inserido no domínio catalítico.

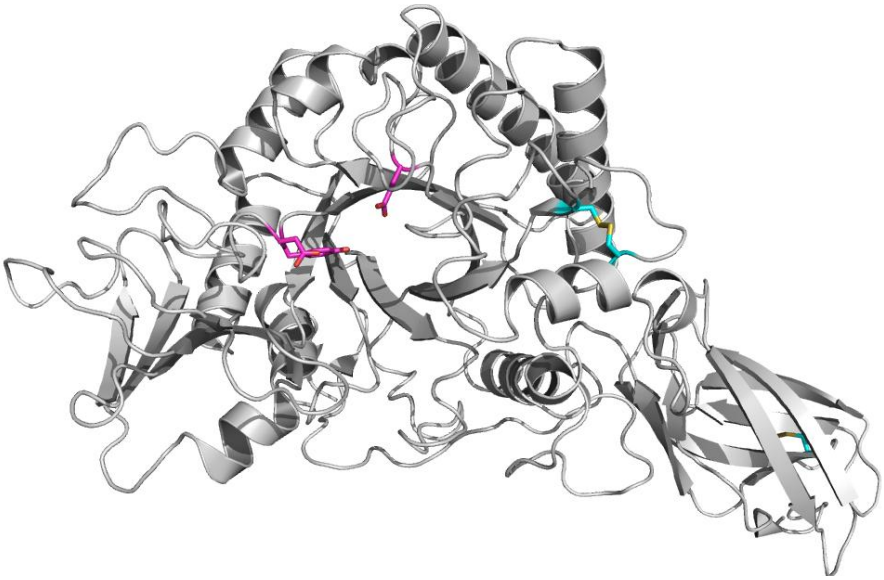
Na figura 50 são visualizadas as localizações de possíveis pontes dissulfeto e dos resíduos envolvidos na catálise. É encontrada uma ponte de cisteínas entre as folhas-β no domínio N-terminal e outra no domínio catalítico (Figura 51). A região que liga os domínios N-terminal e catalítico é composta por 21 resíduos de aminoácidos (resíduos 138-158) é uma região móvel que permite que o domínio N-terminal ocupe diferentes posições em solução.

FIGURA 49 – DOMÍNIOS PRINCIPAIS DA QUITINASE 1



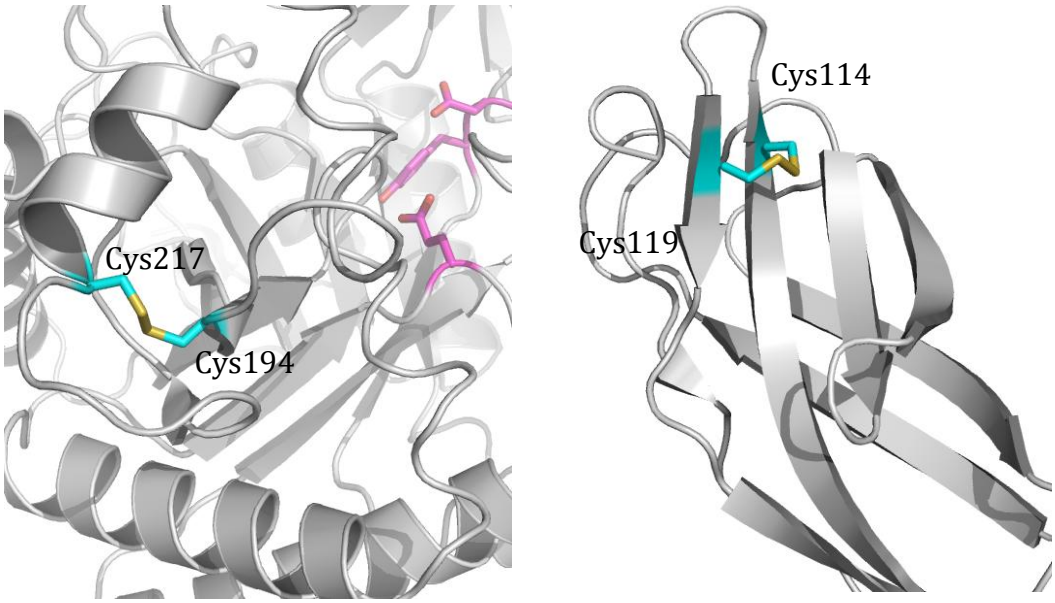
Principais domínios da estrutura da quitinase 1. Em azul domínio N-terminal; em roxo região que liga domínios N-terminal e catalítico, em rosa domínio catalítico e em verde domínio de dobra inserido no domínio catalítico.

FIGURA 50 - RESÍDUOS CATALÍTICOS E PONTE DE CISTEÍNAS



Estrutura da quitinase 1. Em destaque: resíduos envolvidos na catálise em rosa; cisteínas formando possíveis pontes dissulfeto em azul.

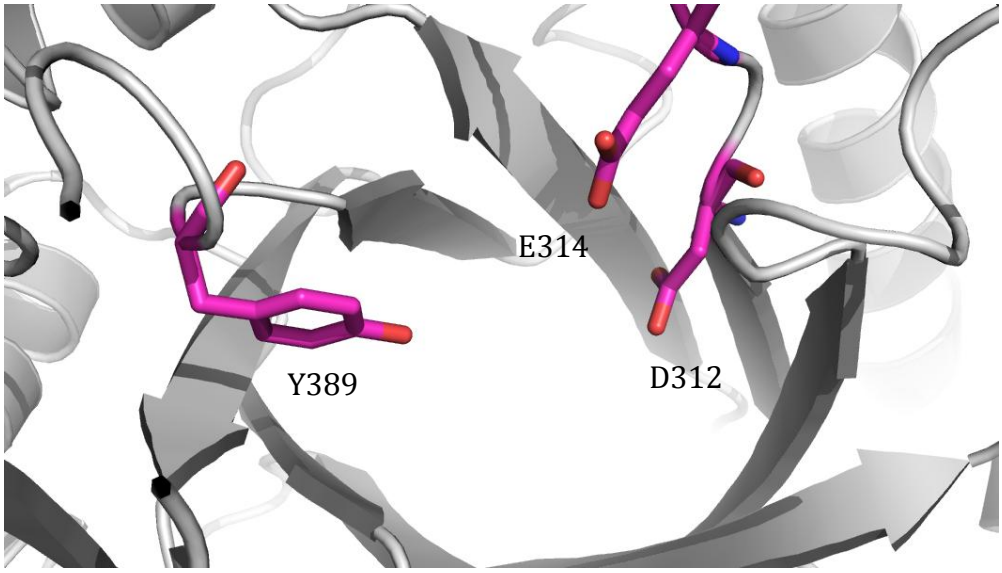
FIGURA 51 – PONTES DISSULFETO NA ESTRUTURA DA QUITINASE 1



Possíveis pontes dissulfeto formadas na estrutura da quitinase 1. A- no domínio catalítico Cys194 e 217; B- no domínio N-terminal Cys 114 e 119.

A quitinase 1 possui um motivo conservado contendo o sítio catalítico [DG]-G-[LIV]-[DG]-[IV]-[DH]-W-[EG], correspondendo às posições 308 a 314. O Glu314 atua diretamente na catálise e a Y389 e D312 atuam estabilizando o intermediário da reação (Figura 52; HOFMAN et al., 1999; PAPANIKOLAU et al., 2001).

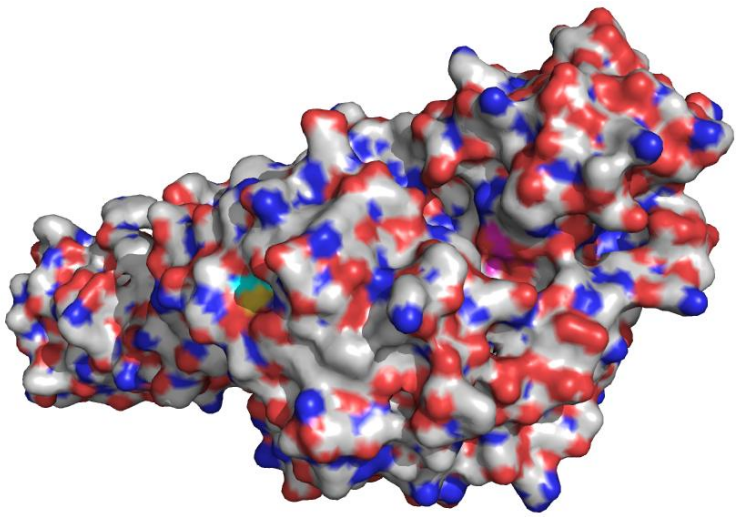
FIGURA 52 – RESÍDUOS CATALÍTICOS DA QUITINASE 1



Resíduos catalíticos da quitinase 1. Tirosina 389, Glutamato 314 e Aspartato 312 são resíduos conservados descritos na literatura como importantes para a catálise.

Os resíduos catalíticos podem ser visualizados no modelo de superfície da quitinase 1, bem como, os resíduos de cisteína que formam a ponte dissulfeto no domínio catalítico (Figura 53).

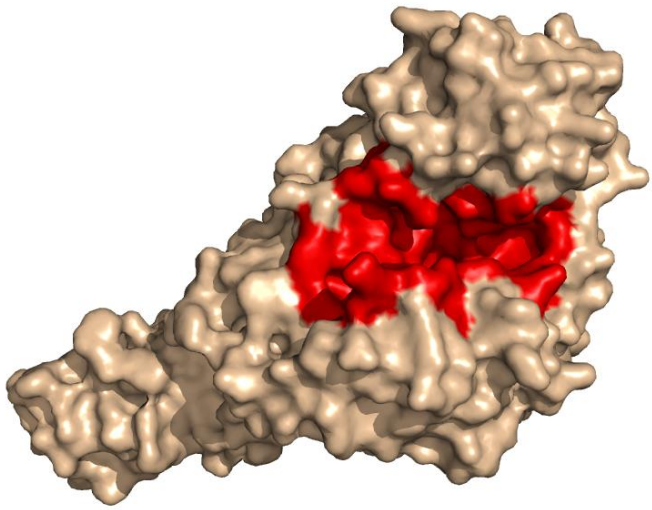
FIGURA 53 - MODELO DE SUPERFÍCIE DA QUITINASE 1



Modelo de superfície da quitinase 1. Em cinza átomos de carbono, em vermelho átomos de oxigênio, em azul átomos de nitrogênio e em amarelo átomos de enxofre. Em destaque os resíduos catalíticos em rosa e uma ponte dissulfeto em azul claro.

O programa Castp prediz quais possíveis aminoácidos estão presentes no sítio catalítico analisando dados de topologia da estrutura. Os dados obtidos para o modelo por homologia da estrutura da quitinase 1 foram rodados no programa que indicou 45 aminoácidos destacados na Figura 54.

FIGURA 54 - CHIT 1 COM A FENDA CATALÍTICA EM EVIDÊNCIA



Resíduos da fenda catalítica da quitinase 1 em vermelho. Resíduos selecionados pelo programa Castp.

Como não há estruturas para a região C-terminal de Chit1 foi feito o alinhamento da região C-terminal de Chit1 com a da Chi92 de *Aeromonas hydrophila*, a partir do aminoácido 769 e 770, respectivamente. O alinhamento mostra a semelhança de cerca de 82% entre as duas sequências (Figura 55). Essa região possui os domínios de ligação a quitina e nesse domínio ocorrem repetições intrínsicas de resíduos de aminoácidos conservados. Essas repetições foram evidenciadas pelo alinhamento das sequências de cada quitinase, Chi92 e Chit 1, separadamente. Para a Chi92 foram alinhadas as sequências do aminoácido 770 ao 816 com a sequência do aminoácido 817 até o final da sequência. Para a Chit 1 foram alinhados aminoácidos 769 ao 815 com aminoácidos 816 até o final (Figura 56).

FIGURA 55 – ALINHAMENTO DA REGIÃO C-TERMINAL DE QUITINASE 1 E CHI92 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

```
Chi92           HPAWSAGTVYNTNDKVSHKQLVWQAKYWTQGNEPSRTADQWKLVSQVQLGWDAGVVYNGG 60
Chit1           WPAWQASKVYNGGDKVSHNQLVWQAKYWTQGNEPSRTADQWTLVSKVQLGWDANVAYNGG 60
                 ***.*..*** .*****:**********************.***:*******.*.****

Chi92           DVTSHNGRKWKAQYWTKGDEPGKAAVWVDQGAASCN 96
Chit1           DLTNHNGRQWKAQYWTRGDEPGKAAVWQDVGAASCK 96
                *:*.****:*******:********** * *****:
```

Alinhamento da região C-terminal mostrando as regiões conservadas. Resíduos *****conservados; **:** similares; **.** pouco similares .

FIGURA 56 – ALINHAMENTO DAS REGIÃO REPETIDAS NA QUITINASE 1 E CHI92 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

```
Chit1/769       WPAWQASKVYNGGDKVSHNQLVWQAKYWTQGNEPSRTADQWTLVSKV--- 47
Chit1/816       QLGWDANVAYNGGDLTNHNGRQWKAQYWTRGDEPGK-AAVWQDVGAASCK 49
                  .*:*. .***** ..**   *:*:***:*:**.: *  *  *. .

Chi92/770       HPAWSAGTVYNTNDKVSHKQLVWQAKYWTQGNEPSRTA---DQWKLVSQV 47
Chi92/817       QLGWDAGVVYNGGDVTSHNGRKWKAQYWTKGDEPGKAAVWVDQGAASCN- 49
                : .*.**.*** .* .**:   *:*:***:*:**.::*   **    .:
```

Alinhamento das regiões repetidas de cada quitinase. Resíduos *****conservados; **:** similares; **.** pouco similares. Em destaque a sequência consenso AKWTQG que está relacionada a domínios conservados da família V dos domínios de ligação a quitina (CBD).

6. DISCUSSÃO

Bibliotecas metagenômicas têm sido largamente utilizadas na procura por novas enzimas (VOGET et al., 2006; LÅMMLE et al., 2007; PANG et al., 2009). Essa triagem por enzimas deve ser feita em grandes quantidades de clones para aumentar a probabilidade de encontrar o que se procura, porém demanda maior quantidade de material. Os meios mais sensíveis para encontrar enzimas são os contendo análogos sintéticos do substrato da enzima, como substratos fluorescentes ou marcados em meios líquidos (HOOD et al., 1991). No entanto, os meios sólidos permitem a triagem de uma maior quantidade de clones diminuindo o tempo e custo necessários para encontrar um clone positivo (HOWARD et al., 2003).

Nesse trabalho, foi realizada uma triagem em meio sólido para amilases, celulases, proteases e quitinases. Apenas foram encontrados clones positivos nos meios LA leite 1% e LA quitina, meios que não necessitavam de coloração. Os meios LA CMC 0,2% e LA amido 1% precisavam ser corados e por isso as colônias eram espalhadas no meio impedindo o posterior isolamento da colônia. Além disso, não foi possível identificar o tempo de incubação ideal para a visualização do halo nesses meios, já que não se podia acompanhar o aparecimento ao longo dos dias como no caso do leite e da quitina.

Foram encontrados três clones com atividade proteolítica e quatro clones com atividade quitinolítica. Todavia, apenas dois clones de protease e um de quitinase mantiveram suas atividades após isolamento do seu DNA fosmidial e transformação em *E. coli.* Os clones que perderam a atividade são prováveis falsos positivos.

O sequenciamento e análise das sequências dos subclones de CHI1 revelou três genes que codificam para prováveis quitinase. Bactérias capazes de degradar quitina normalmente produzem várias quitinases (ALAM et al. 1996; WATANABE et al. 1999; HORN et al., 2005). *Serratia marcescens* produz três quitinases: A, B e C, todas pertencendo a família 18 das glicosil hidrolases (Horn et al, 2005). A ChitC é uma endoquitinase não processiva que corta a quitina aleatoriamente liberando fragmentos longos e novas pontas que serão substratos para as exoquitinases. ChiA e ChiB são ambas enzimas processivas que primeiramente, e possivelmente exclusivamente, degradam a quitina a partir das pontas da cadeia. Em uma visão geral, estipula-se que as

duas enzimas degradam a cadeia de quitina partindo de extremidades opostas e em direções opostas (HORN et al., 2005).

As quitinases encontradas, denominadas Chit 1, 2 e 3, apresentaram maior similaridade com quitinases de *Aeromonas* spp., entre 78 a 93% de identidade. Na análise de domínios conservados identificou-se que Chit 1 e 3 pertencem à família 18 das glicosil hidrolases e Chit 2 a família 19 das glicosil hidrolases.

Membros do gênero *Aeromonas* são encontrados em muitos tipos de ambientes aquáticos, incluindo rios, lagos, esgoto doméstico e água potável (HOLMES, NICCOLLS e SARTORY, 1996). Sendo assim, a lagoa de tratamento de efluentes da qual foram encontrados os clones com atividade quitinolítica é um local esperado para encontrar organismos desse gênero.

Espécies do gênero *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus* e *Vibrio* estão entre as bactérias quitinolíticas mais estudadas (WATANABE et al, 1990; BASSLER et al., 1991). Até o descobrimento da quitinase de *Streptomyces griseus* HUT 6037 (OHNO et al., 1996) a família 19 era vista como exclusiva de quitinases de plantas. Posteriormente, outras quitinases bacterianas da família 19 foram identificadas, incluindo quitinases de *Burkholderia gladioli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas* sp. (HOELL et al., 2006; UEDA et al. 2003).

Algumas espécies de *Aeromonas* mesófilas são patógenos oportunistas de humanos, associadas a doenças gastrointestinais (JOSEPH, 1996). Apesar disso, muitas das quitinases estudadas também são de organismos patogênicos como os citados acima. A metagenômica permite a clonagem de genes de interesse, como os das quitinases, em outro organismo não patogênico.

Em contraste, as quitinases da família 18 estão distribuídas em uma grande quantidade de organismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, mamíferos e vírus (SASAKI et al., 2002). Entre as bactérias já foram relatadas quitinases de *Aeromonas caviae*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas hydrophila* (LIU et al., 2009; LIN et al., 2009; LAN et al. 2006), mas nenhuma estrutura de *Aeromonas* está depositada no "Protein Data Bank- PDB". A família 18 das glicosil hidrolase apresenta um motivo conservado [DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E compreendendo os resíduos 307 a 314 na quitinase 1 e 309 a 316 na quitinase 3 (Hofmann et al., 1999).

A quitinase 1 aparenta ser a principal responsável pela atividade em quitina coloidal encontrada neste trabalho. Isso pois o menor subclone com atividade, contendo apenas o gene da quitinase 1, manteve o tamanho do halo do clone original em

fosmídeo, ainda assim, em um menor tempo de incubação, visto que os vetores plasmidiais apresentam-se em maior quantidade no organismo hospedeiro. Foram 10 dias de incubação do clone com fosmídeo e 3 dias do subclone com plasmídeo para aparecer o halo de hidrólise.

A comparação das sequências da quitinase 1 com as do PDB mostrou uma maior similaridade a ChiA de *Serratia marcescens*, 75% de identidade. Os mesmos domínios principais são encontrados, uma região N-terminal de ligação a quitina (resíduos 24-137), um domínio catalítico em barril α/β (resíduos 159-441 e 516-562), e um menor domínio de dobra α+β (resíduos 442-515) que aumenta a fenda catalítica aumentando a estabilidade do substrato. Poucas são as estruturas de quitinases disponíveis no PDB, por isso o modelo construído da quitinase 1 não contém a região C-terminal.

A região N-terminal da ChiA de *S. marcescens* consiste de apenas folhas β e é capaz de ligar quitina através de resíduos aromáticos expostos. Esses resíduos estão presentes também na sequência de Chit92 de *A. hydrophila* e da quitinase 1. A cadeia de quitina interage com Trp33, Trp69, Trp245 e Phe231 que formam uma linha com o Trp245 do domínio catalítico (Wang et al., 2003). Na quitinase 1 a Phe231 está substituída por um Trp e o Trp245 foi substituído por uma Tyr, mantendo a característica de resíduo aromático. Os outros resíduos de triptofano mantiveram-se conservados.

O domínio amino-terminal é conectado por uma região dobrável (resíduos 138-158) ao domínio de barril α/β. Essa estrutura permite que o domínio N-terminal ocupe diferentes posições relativas em solução e possa ligar-se a cadeia de quitina da melhor forma (Perrakis et al., 1994).

O motivo de barril α/β é formado por 8 α-hélices e 8 folhas β que formam uma fenda na qual ocorre a reação enzimática. Inserido nesse domínio encontra-se o domínio α+β, composto por 5 folhas β e uma α-hélice. Esse motivo estende o comprimento de um dos lados da fenda catalítica, contribuindo para a formação da estrutura de um túnel catalítico. Zees et al. (2009) observaram que esse domínio é fortemente ácido e sua proximidade com o sítio ativo fornece um microambiente mais ácido em torno do Glu314, que age como doador de prótons ao intermediário sacarídico durante a reação de hidrólise, dessa forma ajudando a manter esse aminoácido em estado ativo protonado. Concluem que esse domínio α+β está envolvido com a estabilidade térmica, especificidade e atividade enzimática de ChiA e deleções desse domínio resultam em

um enzima similar a ChiC de *S. marcescens*, com respeito ao pH ótimo, falta de processividade e preferência catalítica de quitopolímeros maiores.

A fenda catalítica é aberta para os dois lados sugerindo que a cadeia de quitina poderia estender-se do sítio ativo para ambos os lados (Figura 54). Quitinases com alta atividade contra quitina cristalina, como ChiA1 de *Bacillus circulans* e ChiA de *S. marcescens* possuem ligações ao substrato além da fenda. Resíduos aromáticos guiam a cadeia de quitina até o centro catalítico (WATANABE et al., 2003) que é clivada a partir da ponta redutora. Os resíduos aromáticos conservados que circundam o sítio catalítico são encontrados na quitinase 1, Tyr170, Trp167, Trp539, Trp275 e Phe396 que está substituída por Trp (Figura 46). Isso sugere que a quitinase 1 deve possuir um mecanismo de reação similar ao da ChiA de *S. marcescens*, assim como a quitinase de *A. caviae* e de *A. hydrophila*.

Sobre o mecanismo catalítico de ChiA, Perrakis et al. (1994) sugeriram que o resíduo catalítico Glu315 está em um ambiente hidrofóbico, rodeado por Phe191, Phe316, Met388 e Trp275. Em pH ácido estará protonado e pode ser o doador em um mecanismo de catálise geral ácido-base. Asp391 está em um ambiente mais hidrofílico, cercado por Tyr444 e Arg446 e parece estar com carga negativa, o que permite a estabilização do intermediário carboxi-ânion. Porém, na estrutura da quitinase 1, a Phe316 está substituída por uma Tyr, o que afetará o ambiente hidrofóbico já que uma hidroxila será adicionada. Wu et al. (2001) também propõem para a Chi92 de *A. hydrophila* JP101 que Glu315 e Asp391 são os resíduos catalíticos mais importantes e Phe191, Trp275, Phe316, Met388, Tyr44 e Arg446 estão envolvidos no mecanismo.

Um novo mecanismo é proposto por Papanikolau et al. (2001). Na enzima sem o substrato, Glu314 está protonado devido a proximidade com Asp312. Quando o substrato liga ocorrem mudanças conformacionais na sua estrutura e na da enzima. O Asp312 é deslocado e o Glu314 doa seu próton ao O da ligação glicosídica ocorrendo a sua clivagem. Uma molécula de água ligada ao Tyr390, a carga negativa do Asp312 e a Met387 participam da estabilização do intermediário formado. O Glu314 retira o próton da água voltando a sua forma protonada e a hidroxila é tomada pelo C1 do açúcar completando a reação. Esse mecanismo se encaixa melhor nas características da quitinase 1 visto que todos os resíduos de aminoácidos envolvidos encontram-se conservados na sua sequência.

A ChiA de *Serratia marcescens* é uma exoquitinase e em particular, uma quitobiosidase que cliva diacetilquitobiosídeos a partir da ponta redutora da quitina.

Entretanto, a quitinase de *A. caviae* produz triacetiltrioses, hexacetilhexoses e quitina coloidal como produtos da clivagem de quitina, o que não é observado na ChiA sugerindo que as quitinases de *Aeromonas*, como as encontradas neste trabalho, podem ter um mecanismo diferente (WANG et al., 2003; VAN AALTEN et al., 2000).

As quitinases de *Aeromonas* possuem uma região C-terminal adicional a estrutura de ChiA de *S. marcescens*. A região C-terminal da ChiA de *A. caviae* possui repetições de cerca de 40 resíduos similares a domínios de ligação de quitina (ChBD) em quitinases e domínios de ligação a carboidratos (CBD) em celulases e xilanases. ChiA e Chi92 são bastante similares, sendo que Chi92 possui 208 aminoácidos denominados região A, entre o domínio catalítico e C-terminal. A quitinase 1 possui 83% de identidade com Chi92 de *A. hydrophila* e possui os mesmos domínios. Em Chi92 uma região pequena rica em prolina (PPVNKPP) está localizada entre a região A e o domínio catalítico, também encontrada na quitinase 1. Muitas polissacaridases possuem regiões de ligação entre domínios rica em prolinas e/ou hidroxiaminoácidos em Chi92 e na quitinase 1 só é encontrada nessa região (WU et al., 2001).

Os dois domínios de ligação a quitina são independentes podendo ligar especificamente quitina insolúvel e ter alguma afinidade por celulose. Em trabalho de Watanabe et al. (1990) é sugerido que uma quitinase encontrada no sobrenadante de *B. circulans* WL-12 foi gerada a partir da quitinase A1 por remoção proteolítica da porção C-terminal da enzima. A quitinase A2 não tem forte afinidade a quitina insolúvel, em contraste com a quitinase A1. Na região C-terminal da quitinase A1 são encontrados segmentos de 95 aminoácidos repetidos que mostram homologia a domínios de fibronectina do tipo III.

Uma possibilidade de função para a região A é a interação com quitinas solúveis segundo Wu et al. (2001). Em trabalho de Wang et al. (2003), a região A também mostrou não ter função da ligação de quitina insolúvel, mas tem efeitos na digestão de quitina coloidal, solúvel e em quito-oligômeros de baixo peso molecular.

Brun et al. (1997) propuseram que CBD e alguns ChBD podem formar uma nova família pois são sequências repetidas que possuem um motivo conservado AKWWTQG, como os ChBD da Chi92 de *A. hydrophila*, ChiA de *A. caviae* e da quitinase 1 (Figura 55 E 56).

ChiA e ChiB tem efeitos sinergéticos na degradação da quitina em *S. marcescens*. Portanto, a ChiA de A. *caviae*, Chit92 de *A. hydrophila* e a quitinase 1 devem possuir uma estrutura combinada de ChiA e ChiB, o que gera a possibilidade de

essas quitinases digerirem a cadeia de quitina nas duas pontas, redutora e não redutora (Wang et al., 2003).

Essas estruturas contendo os domínios de ChiA de *S. marcescens* mais domínios de ligação a quitina C-terminais, como os da ChiB de *S. marcescens* sugerem que essas enzimas são modulares. As diferentes especificidades de ligação em domínios diferentes da quitinase coincidem com o fato de existirem diferentes formas de quitina na natureza, dessa forma as bactérias evoluíram para ter sistemas quitinolíticos com quitinases diferentes que tem substratos específicos, e com uma mesma quitinase que possui diversos domínios de especificidades diferentes (WANG et al., 2003)

As análises de localização sugeriram que a quitinase 1 é secretada contendo um peptídeo sinal que é clivado entre a Ala23 e Leu24. A ChiA1 de *Bacillus circulans* que possui estrutura similar é secretada no espaço periplasmático da bactéria, possui um peptídeo sinal de 15 aminoácidos que é clivado entre Ala32 e 33 quando expressa em *E. coli* e entre Ala40 e 41 quando em *B. circulans* (WATANABE et al., 1990).

A quitinase 1 pode ser uma exoquitinase encontrada no periplasma ou ser secretada podendo degradar quitina insolúvel e quito-oligômeros menores devido à presença de diferentes domínios de ligação a quitina que tem especificidades diferentes. Por isso, tem as características necessárias para ser a única responsável pela atividade detectada em LA quitina coloidal.

A Chit 3 apresentou maior identidade com uma quitodextrinase de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*. Ela possui domínios catalíticos semelhantes a quitodextrinase da biblioteca metagenômica de um lago de Dean Creek nos EUA, que possui domínios ChiC e da família 18 (LECLEIR et al., 2006). A Chit 3 possui mais de 800 aminoácidos, faltam-lhe 124 aminoácidos comparando com a sequência de maior similaridade e ainda tem indicações de ser uma enzima secretada pois contém um possível peptídeo sinal. Além dos dois domínios acima citados possui dois domínios de ligação a quitina na região C-terminal. O alinhamento da sequência de aminoácidos da quitinase 3 apresentou maior semelhança com a estrutura do domínio catalítico da ChiA1 de *Bacillus circulans* e da ChiB de *Serratia marcescens*.

A ChiB de *S. marcescens* possui o mesmo domínio catalítico de barril α/β com inserção da dobra α+β da ChiA, assim a quitinase 3 teria os mesmos mecanismos de catálise da quitinase 1. Porém não possui a região N-terminal de ligação ao substrato, somente a região C-terminal. A quitinase 3 possui os resíduos que compõem a fenda catalítica conservados, Glu316, o resíduo que participa da catálise, Phe209, Asp314,

Ala371, Ser266, Asp312, Thr369, Asp309 e Asp 392 (VAN AALTEN et al. 2000). Assim, a quitinase 3 tem similaridades com a ChiB de *S. marcescens*, podendo ser uma exoquitinase encontrada no periplasma ou ser secretada. Não foi possível encontrar um códon de início para esse gene, por isso essa proteína não é expressa no fosmídeo ou é expressa de forma truncada. Não foi identificada atividade correspondente a ela no meio seletivo. Sua sequência poderá ser utilizada futuramente em ensaios de expressão para verificar se possui alguma atividade interessante.

A Chit 2 apresentou um domínio conservado da família 19 mas apresenta características diferentes das quitinases bacterianas já encontradas nessa família. A quitinase de *Aeromonas* sp. descrita por Ueda et al. (2003) possui várias características que a diferem das demais quitinases bacterianas da família 19, possui massa molecular de 72 kDa, sendo bem maior que as enzimas da família 19 de *Streptomyces*, e dois domínios de ligação a quitina, enquanto as quitinases de *Streptomyces* apresentam apenas um. Porém a Chit 2, que apresentou maior similaridade com a endoquitinase básica de *Aeromonas hydrophila*, não corresponde a nenhum dos dois grupos, pois tem massa teórica de 68 kDa, próxima a da *Aeromonas* sp., mas possui um domínio de ligação a quitina N-terminal e um possível sítio de ligação a cálcio C-terminal, não descrito em outras quitinases. Todas as quitinases da família 19 possuem domínios de ligação a quitina na região N-terminal (OHNO et al., 1996).

Na análise de localização, não apresentou possível peptídeo sinal, mas pode ser secretada por outros mecanismos que não envolvam a presença do peptídeo sinal já que apresentou similaridades com proteínas secretadas. Em *E. coli* a maquinaria para esse mecanismo consiste em duas proteínas na membrana interna e uma na membrana externa, que direcionam a enzima através das membranas sem parar no periplasma, como no caso da α- hemolisina (LORY, 1992; WANDERSMAN, 1992; PUGSLEY, 1993).

O alinhamento das sequências de Chit 2 e quitinase de *Carica papaya*, estrutura com maior similaridade, indicou regiões conservadas que podem conter as mesmas funções nas duas enzimas. Os resíduos catalíticos Glu 67 e Glu 89, correspondentes ao Glu204 e Glu226 em Chit 2. Na quitinase de *C. papaya* existem quatro regiões de ligação ao substrato, algumas sendo mantidas em Chit 2, resíduos em volta dos resíduos catalíticos His66-Thr69 (em Chit2 a His é substituída por uma Gln203) e Glu89-Arg90 (a Arg90 é substituída por Met227), resíduos 120 a 124, Ser120, Trp121, Tyr123 e Asn124 (o Trp121 é substituído por uma Tyr274, região 273 a 277) e segmento

helicoidal 198 a 202, Ile198, Asn199, Gly201 e Leu202 (região 353 a 357, a Leu202 é substituída por uma Val357) (HUET et al., 2008). Dessas substituições que ocorrem em Chit2, a única significativa é a de Arg a Met, as demais são alterações de aminoácidos de um mesmo grupo. Um resíduo com cadeia lateral positiva é substituído por um apolar contendo um átomo de enxofre, próximo ao provável resíduo catalítico, afetará o mecanismo de catálise da quitinase 2 que deve ser diferente do de *C. papaya.*

Existem pontes dissulfeto conservadas em quitinases de plantas entre Cys23 e Cys85, que em Chit 2 estão substituídas por Val. Cys97-Cys105 e Cys204-Cys236 podem ocorrer em Chit 2 correspondendo as Cys241, 253, 359 e 394. O motivo conservado em quitinases de plantas da família 19, [FHY]-G-R-G-[AP]-X-Q-[IL]-[ST]-[FHYW]- [HN]-[FY]-NY, presente na fenda de ligação do substrato (HUET et al., 2008) está presente na quitinase 2 (Figura 44).

Um domínio similar a lisozima está presente na Chit 2. Quitinases bifuncionais que também possuem atividade de lisozima são descritas na classe III de plantas, mas duas quitinases de *Pseudomonas aeruginosa* K-187 também possuem essas atividades. Essas enzimas possuem atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, o que é um fenômeno interessante porque quitinases isoladas de bactérias geralmente possuem atividade antifúngica enquanto essas enzimas também são capazes de antagonizar bactérias (WANG e CHANG, 1997). Poucas bactérias quitinolíticas possuem enzimas da família 19 e essas também possuem atividade antifúngica (WATANABE et al., 1999; KAWASE et al., 2006).

Portanto, a quitinase 2 teria um potencial para ser utilizada como agente antifúngico e antibacteriano. Devido a similaridade de sequências aparenta ser uma endoquitinase que pode ser secretada, mas não contém peptídeo sinal

Poucas são as estruturas disponíveis de quitinases da família 19, gêneros *Streptomyces, Serratia*, *Bacillus* e *Vibrio* possuem a maior parte das estruturas de quitinases bacterianas e nenhuma estrutura pertencente ao gênero *Aeromonas* está disponível. As quitinases 2 e 3 apresentaram menor similaridade com as estruturas disponíveis no PDB, cerca de 30% de identidade, assim não foram construídos modelos de estruturas para elas.

A disposição dos genes encontrados nos dois contigs obtidos são similares a distribuição dos genes em *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila,* com exceção do gene da Chit 3 que encontra-se em outra região do genoma da *Aeromonas*. Outros organismos possuem operons que codificam proteínas envolvidas na degradação da

quitina. *Aeromonas hydrophila* SUWA-9 e *Vibrionaceae* apresentam operon contendo genes de quitinases e transportadores tipo ABC que permitem a passagem de diacetilquitobiose do periplasma para o citoplasma (LAN et al., 2008; LI e ROSEMAN, 2004). O gene da Chit 3 encontra-se próximo a genes de transportadores ABC e a uma proteína de quimiotaxia no contig 2, podendo todos estar envolvidos na assimilação dos carboidratos da quitina. A mesma hipótese pode ser dada aos genes do contig 1, Chit 1 e 2 e protease. As quitinases são expressas e ainda podem necessitar serem clivadas pela protease para ter atividade. Em *S. marcescens*, a ChiC sofre clivagem proteolítica liberando o domínio catalítico ativo (WATANABE et al., 1997; SUZUKI et al., 1999).

As três quitinases encontradas podem ter diversas aplicações, como na produção de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetilquito-oligossacarídeos que são importantes na indústria de alimentos, agrícola e de biotecnologia, nas quais podem ser aplicados como promotores de crescimento e agentes de biocontrole de patógenos em plantas (JUNG et al., 2007), agentes antibacterianos (KOBAYASHI et al, 1990), imunoestimuladores (TOKORO et al., 1989) e agentes antitumorais (SUZUKI, 1996).

Tradicionalmente, quito-oligossacarídeos são processados por métodos químicos na indústria, porém esses processos trazem grandes problemas como a produção de oligossacarídeos de cadeia curta, baixo rendimento, alto custo na separação, além de poluição ambiental. Alternativamente, a hidrólise com quitinase tem baixo custo, reprodutibilidade e compatibilidade ambiental.

A produção de oligômeros de quitina e GlcNAc por hidrólise enzimática tem sido reportada, utilizando quitinases derivadas de *Serratia marcescens* (HAYNES et al., 1999), *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani* (THAMTHIANKUL et al., 2001), *Aeromonas hydrophila* H2330 (SASHIWA et al., 2002), *Trichoderma viride* e *Acremonium cellulolyticus* (SASHIWA et al., 2003) e *Aeromonas* sp. (KUK et al., 2005a and KUK et al., 2005b). Entretanto essas enzimas não estão disponíveis para aplicação comercial em larga escala (WANG et al., 2010).

Lertcanawanichakul et al. (2004) fizeram estudos para melhorar a eficácia do agente de biocontrole de insetos *B.t.* subsp. *israelensis* estirpe c4Q272 introduzindo plasmídeos recombinantes contendo genes de quitinases de *Aeromonas hydrophila* ou *Pseudomonas maltophilia.* Dessa forma os genes de quitinase podem ser engenheirados para serem expressos em organismos hospedeiros utilizados como agentes de biocontrole.

Além disso, as enzimas podem ser utilizadas diretamente na formulação de antifúngicos independentes da presença de um organismo de biocontrole. Para isso, é necessária a produção em larga escala de quitinases, o que pode ser um problema devido a atividade de lisozima presente em algumas dessas enzimas. A utilização de conchas de crustáceos como substrato para a produção de quitinase de *Serratia* utilizando bioreatores promete diminuir os custos da produção de quitinases (MEJIA-SAULES et al., 2006). Ainda a produção industrial de enzimas por fermentação em estado sólido pode oferecer vantagens sobre o sistema de fermentação submersa. Dahiya et al. (2005) otimizaram a produção de quitinase em fermentação em estado sólido com *Enterobacter* sp. NRG4.

Esses estudos mostram que é possível utilizar genes de quitinases com características interessantes para serem utilizados na produção industrial em grande escala. Mais estudos ainda são necessários para determinar as características bioquímicas, atividade antifúngica e antibacteriana das três quitinases encontradas e concluir se são enzimas com potencial comercial.

7. CONCLUSÕES

A utilização de bibliotecas metagenômicas para encontrar genes novos de hidrolases mostrou-se de grande valia. Foram encontrados clones com atividade proteolítica e quitinolítica na biblioteca metagenômica derivada do solo da lagoa de tratamento da indústria Perdigão.

O fosmídeo recombinante contendo atividade de quitinase foi purificado, fragmentado e subclonado em vetores plasmidiais. Os insertos dos dois subclones com atividade e alguns sem atividade foram sequenciados. Foram obtidos dois contigs maiores.

A partir dos insertos dos subclones com atividade foi obtido o contig 1 contendo dois genes codificando para enzimas quitinolíticas e mais um gene codificando para uma possível peptidase.

O contig 2 foi obtido dos clones sem atividade e contém um gene codificando para uma enzima quitinolítica e mais 5 genes completos codificando para uma epimerase, transportador tipo ABC, tioesterase e uma proteína de quimiotaxia.

A quitinase 1 apresentou identidade de 83% com a Chit1 de *Aeromonas punctata.* A análise de sua sequência de aminoácidos indicou que ela pertence a família 18 das glicosil hidrolases, possui localização periplasmática e domínios de ligação a quitina nas regiões N-terminal e C-terminal. Um dos subclones com atividade contém a sua sequência mais a sequência da peptidase indicando que a atividade observada no meio seletivo deve ser correspondente apenas a quitinase 1.

A quitinase 2 apresentou identidade de 78% com a endoquitinase básica de *A. hydrophila*. A análise da sequência de aminoácidos indicou que ela pertence a família 19 das glicosil hidrolases, possui domínio de ligação a quitina apenas na região N-terminal e um domínio de lisozima que lhe confere um potencial antibacteriano. Como não possui peptídeo sinal mas a localização indicada foi extracelular, ela pode ser secretada de maneira não convencional.

A quitinase 3 apresentou identidade de 93% com a quitodextrinase de *A. hydrophila subsp. hydrophila*. Em comparação com a essa sequência faltam-lhe 124 aminoácidos na região N-terminal, sendo por esse motivo não confirmada presença de peptídeo sinal. A análise da sua sequência primária indicou que ela pertence a família 18

das glicosil hidrolases, possui localização periplasmática e domínio de ligação a quitina apenas na região C-terminal.

Um modelo de estrutura por homologia foi construído apenas para a quitinase 1 que apresentou 75% de identidade com a estrutura da ChiA de *Serratia marcescens*. As quitinases 2 e 3 apresentaram menos de 40% de identidade com as estruturas presentes no PDB e, dessa forma, não é possível construir modelos de estrutura por homologia.

O modelo construído para a quitinase 1 foi validado e indicou que essa enzima possui os mesmos domínios principais da ChiA de *S. marcescens*, existindo a possibilidade de apresentar um mecanismo catalítico também semelhante, de exoquitinase. Ainda possui domínios C-terminais de ligação a quitina semelhantes a quitinases de *Aeromonas sp.*.

Dessa forma, as três enzimas podem ter aplicações diversas tanto na utilização como antifúngicos ou antibacterianos, como na produção de derivados de quitina que são utilizados na indústria agrícola, biotecnológica e de alimentos. Ainda são necessários mais estudos para definir as reais características bioquímicas e biológicas das três quitinases e definir se possuem potencial para serem engenheiradas e produzidas em larga escala para utilização comercial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.L.; SØRLIE, M.; VÅRUM. K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitoologosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**. v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ALAM, M.M.; MIZUTANI, T.; ISONO, M.; NIKAIDOU, N.; WATANABE, T. Three chitinase genes (chiA, chiC and chiD) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** v. 82, p. 28-36, 1996.

ALLBUSINESS. World Enzyme Demand to Approach $5.1 Billion in 2009. Disponível em: http://www.allbusiness.com/specialty-businesses/860515-2.html. Acesso em janeiro de 2010.

ANDERSEN, L.P. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. US Patent 5,834,299, 1998.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, 2003.

BAE, H.D.; YANKE, L.J.; CHENG, K.-J.; SELINGER, L.B. A novel staining method for detecting phytase activity. **J Microbiol Meth.** v. 39, p. 17-22, 1999.

BASSLER, B.; YU, C.; LEE, Y.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii***. J Biol Chem**. v. 266(36), p. 24276–24286, 1991.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G. VON; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J Mol Biol**. v. 340, p. 783-795, 2004.

BENDTSEN, J.D.; KIEMER, L.; FAUSBØLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiology**. v. 5, p. 58, 2005a.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; WIDDICK, D.; PALMER, T.; BRUNAK, S. Prediction of twin-arginine signal peptides. **BMC bioinformatics.** v. 6, p. 167, 2005b.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances.** v. 18, p. 355–383, 2000.

BHUSHAN, B.; HOONDAL, G.S. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. **Biotechnology Letters.** v. 20(2), p. 157-159, 1998.

BOND, C.S. & SCHÜTTELKOPF, A.W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallog D.** v. 65, p. 510–512, 2009.

BORGOGNONI, C.F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R.N. de M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26(3), Sept. 2006.

BORNSCHEUER, U.T. e POHL, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. **Curr Opin Chem Biol.** v. 5, p. 137–143, 2001.

BRUN, E.; MORIAUD, F.; GANS, P.; BLACKLEDGE, M.J.; BARRAS, F.; MARION, D. Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. **Biochemistry**. v. 36, p. 16074–16086, 1997.

BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma Introdução.** 4º edição. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CALDINI, C.; BONOMI, C.O.L.; WONG, T.M.; PIFFERI, P.G.; LANZARINI, G.; GALANTE, Y.M. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16(4), p. 286-291, 1994.

CARROLL, J.O.; BOYCE, C.O.L.; WONG, T.M.; STARACE, C.A. Bread antistaling method. Patent application US4654216, 1987.

CHANG, W.T.; CHEN, C.S.; WANG, S.L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Current Microbiology**. v. 47(2), p. 102-108, 2003.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Res.** v. 31(13), p. 3497-500, 2003. Programa disponível em: http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2

CHICA, R.A.; DOUCET, N.; PELLETIER, J.N. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. **Curr Opin Biotechnol.** v. 16, p. 378–384, 2005.

CHOU, T.-C.; FU, E.; WU, C.-J.; YEH, J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 302, p. 480–483,2003.

CODY, R.M.; DAVIS, N.D.; LIN, J.; SHAW, D. Screening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from aminosugars. **Biomass.** v. 21, p. 285–295, 1990.

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology.** June, p. 2553–2557, 1999.

COSIO, I.G.; FISHER, R.A.; CARROAD, P.A.: Bioconversion of shellfish chitin waste: Waste pretreatment; enzyme production; process design; and economic analysis. **J. Food. Sci.** v. 47, p. 901-905, 1982.

COUGHLAN, M.P. Cellulases: production, properties and applications. **Biochem Soc Trans**. v. 13, p. 405–6, 1985.

COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**. v. 9, p. 514-523, 2010.

DANIEL, R. The Metagenomics of Soil. **Nature Reviews**. v. 3, p. 470-478, 2005.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 71, p. 773–782, 2006.

DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web. http://wwwpymolorg, 2002.

DE MARCO, J.L; LIMA, L.H.C; DE SOUSA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 16(4), p. 383-386, 2000.

DE STEFANIS, V.A.; TURNER, E.W. Modified enzyme system to inhibit bread firming method for preparing same and use of same in bread and other bakery products. Patent application US4299848, 1981.

DUNDAS, J.; OUYANG, Z.; TSENG, J.; BINKOWSKI, A.; TURPAZ, Y.; LIANG, J. CASTp: computed atas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucl Acids Res**. v. 34, p.W116-118, 2006. Disponível em: http://sts.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php

ELIAS, J.A.; HOMER, R.J.; HAMID, Q.; LEE, C.G. Chitinases and chitinase-like proteins in Th2 inflammation and asthma. **J Allergy Clin Immunol.** v. 116, p. 497–500, 2005.

EWING, B.; HILILIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accurracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998a.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998b.

FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; COUTO, G.H.; GLOGAUER, A.; IORIS, R.M. Isolation of lipase producing clones from metagenomic libraries of Atlantic Forest soils. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 37., 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos: SBBq, 2008. H-012. Disponível em: < http://sbbq.iq.usp.br/v2//index.php?option=com_content&task=category&sectionid=4&id=25&Itemid=89>. Acesso em: fev/2010.

FERRER,M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **J Mol Microbiol Biotechnol.** v. 16, p. 109–123, 2009.

FOODNAVIGATOR. US enzyme market poised for continued growth. Disponível em < http://www.foodnavigator-usa.com/Financial-Industry/US-enzyme-market-poised-for-continued-growth > Acesso em janeiro de 2010.

FUNKHOUSER, J.D.; ARONSON, N.N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evol Biol.** v. 7, p.96, 2007.

GALANTE, Y.M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman GF, Kubicek CP, editors. ***Trichoderma* & *Gliocladium*—Enzymes, biological control and commercial applications**. Vol. 2. London: Taylor & Francis, p. 327–42, 1998.

GARDNER, K.H.; BLACKWELL, J. Refinement of structure of beta-chitin. **Biopolymers.** v. 14, p. 1581–1595, 1975.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook.** p. 571-607, Humana Press 2005.

GLOGAUER, A.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; KRIEGER, N.; FAORO, H.; MITCHELL, D.A.; COUTO, G.H.; MÜLLER-SANTOS, M. Screening for lipolytic enzymes from a metagenomic library generated from fat contaminated soil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 37, 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos: SBBq, 2008. H-092. Disponível em: < http://sbbq.iq.usp.br/v2//index.php?option=com_content&task=category&sectionid=4&id=25&Itemid=89>. Acesso em: fev/2010.

GOLOLOBOV, M.Y.; STEPANOV, V.M.; VOYUSHINA, T.L.; MOROZOVA, I.P.; ADLUEREUTZ, P. Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent and substrate concentration. **Enzyme Microb Technol.** v. 16, p. 522–28, 1994.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research.** v. 8, p. 195-202, 1998.

GOVINDSAMY, V.; GUNARATNA, K.R.; BALASUBRAMANIAN, R. Properties of extracellular chitinase from *Myrothecium verrucaria*, an antagonist to the groundnut rust *Puccinia arachidis*. **Canadian Journal of Plant Pathology.** v. 20(1), p. 62-68, 1998.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Fruit juices. In: Godfrey T, West S, editors. **Industrial enzymology**, 2nd ed. UK: Macmillan. p. 226–4, 1996.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 59, p. 15–32, 2002.

GYOÈRGY, P.; ROSE, C.S.: Microbiological studies on growth factor for *L. bifidus* var *pensylvanicus*. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 90, p. 219-223, 1995.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology.** v. 5(10), p. R245-R249, 1998.

HARISH PRASHANTH, K.V.; THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential -an overview. **Trends Food Sci Technol.** v. 18, p. 117–131, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Tecnology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

HAYNES, C. A.; ALOISE, P.; CREAGH, A. L. US Patent 5 998, 173, 1999.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J.** v. 293, p. 781–788, 1993.

HJORT, K.; BERGSTRÖM, M.; ADESINA, M.F.; JANSSON, J.K.; SMALLA, K.; SJÖLING, S. Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 71, p. 197–207, 2010.

HOOD, M.A. Comparison of four methods for measuring chitinase activity and the application of the 4-MUF assay in aquatic environments. **J Microbiol Methods.** v. 13, p.151–160, 1991.

HOELL, I.A.; DALHUS, B.; HEGGSET, E.B.; ASPMO, S.I; EIJSINK, V.G.H. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. **FEBS Journal.** v. 273, p. 4889–4900, 2006.

HOFMANN, K.; BUCHER, P.,;FALQUET, L.; BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 1999. **Nucleic Acids Res.** v. 27, p. 215-219, 1999.

HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Appl Environ Microbiol.** v.54, p.703–711, 1988.

HOLMES, P.; NICCOLLS, L.M.; SARTORY, D.P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In **The Genus Aeromonas**, p. 127–150. Edited by B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. New York: Wiley, 1996.

HORSCH, M.; MAYER, C.; SENNHAUSER, U.; RAST, D.M. beta-N-acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 76, p. 187-218, 1997.

HORN, S.J.; SØRLIE, M.; VAAJE-KOLSTAD, G.; NORBERG1, A.L.; SYNSTAD, B.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 24(1/2), p. 39-53, 2006.

HOWARD M.B.; EKBORG, N.A.; WEINER, R.M.; HUTCHESON, S.W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 30, p. 627–635, 2003.

HOWSON, S. J. e DAVIS, R. P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. **Enzyme Microb Technol.** v. 5, September 1983.

HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L.. Powdered Chtin Agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology.** p. 422-426, Mar. 1975.

HU, Y.; ZHANG. G.; LI, A.; CHEN, J.; MA, L.: Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-metagenomic library with an efficient approach. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 80, p. 823-830, 2008.

HUET, J.; RUCKTOOA, P.; CLANTIN, B.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y.; VILLERET, V.; WINTJENS, R. X-ray Structure of Papaya Chitinase Reveals the Substrate Binding Mode of Glycosyl Hydrolase Family 19 Chitinases. **Biochemistry.** v. 47, p. 8283–8291, 2008.

JONES, B.V.; SUN, F.; MARCHESI, J.R. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. **Letters in Applied Microbiology**. v. 45 p. 418–420, 2007.

JOSEPH, S. W. *Aeromonas* gastrointestinal disease : a case study in causation? In The Genus *Aeromonas*, p. 311–335. Edited by B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. New York : Wiley, 1996.

JUNG, W.K.; MOON, S.H.; KIM, S.K. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. **Life Sci.** v. 78, p. 970–976, 2006.

JUNG, W.-J.; SOULEIMANOV, A.; PARK, R.-D.; SMITH, D.L. Enzymatic production of *N*-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* KJA-424. **Carbohydrate Polymers.** v. 67(2), p. 2256-259, 2007.

KABSCH, W. e SANDER, C. DSSP. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bond and geometrical features. **Biopolymers.** v. 22, p. 2577-2637, 1983.

KARGER, A.E.; HARRIS, J.M.; GESTELAND, R.F. Multiwavelenght fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis. **Nucleic Acid Research.** v. 19(18), p. 4955-4962, 1991.

KAWASE, T.; YOKOKAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from S. coelicolor A3(2). **Biosci Biotech Biochem.** v. 70, p. 988–998, 2006.

KIM, S.-J.; LEE, C.-M; HAN, B.-R.; KIM, M.-Y.; YEO, Y.-S.; YOON, S.-H.; KOO, B.-S.; JUN, H.-K.. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiol Lett.** v. 282, p. 44–51, 2008.

KLOKKEVOLD, P.R.; VANDEMARK, L.; KENNEY, E.B.; BERNARD, G.W. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. **J Periodontol.** v. 67, p. 1170–1175, 1996.

KOBAYASHI, M.; WATANABE, T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. **Microbiol Immunol.** v. 34, p. 413–426, 1990.

KÖPING-HÖGGÅRD, M.; MEL'NIKOVA, Y.S.; VÅRUM, K.M.; LINDMAN, B.; ARTURSSON, P. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. **J Gene Med.** v. 5, p. 130–141, 2003.

KUK, J.H.; JUNG, W.J.; JO, G.H.; AHN, J.S.; KIM, K.Y.; PARK, R.D. Selective preparation of *N*-acetyl-d-glucosamine and *N*,*N*'-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp. **Biotechnology Letters.** v. 27, p. 7–11, 2005a.

KUK, J.H.; JUNG, W.J.; JO, G.H.; KIM, Y.C.; KIM, K.Y.; PARK, R.D. Production of *N*-acetyl-β-d-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 68, p. 384–389, 2005b.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 561–594, 1999.

LÄMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.;, BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology.** v. 127, p. 575–592, 2007.

LAN, X.Q.; ZHANG, X.; HU, J.H., et al. Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Biosci Biotech Biochem.** v.70 (10), p. 2437-2442, 2006.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App Cryst.** v. 26, p. 283-291, 1993.

LECLEIR, G.R.; BUCHAN, A.; HOLLIBAUGH, J.T. Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 70, p. 6977-6983, 2004.

LECLEIR, G.R.; BUCHAN, A.; MAURER, J.; MORAN, M.A.; HOLLIBAUGH, J.T. Comparison of chitinolytic enzymes from an alkaline, hypersaline lake and an estuary. **Environmental Microbiology**. v. 9(1), p. 197-205, 2007.

LEFEVRE, F.; JARRIN, C.; GINOLHAC, A.; AURIOL, D.; NALIN, R. Environmental metagenomics: an innovative resource for industrial biocatalysis. **Biocat. Biotranform. Rev**. v. 25, p. 242– 250, 2007.

LERTCANAWANICHAKUL, M.; WIWAT, C.; BHUMIRATANA, A.; DEAN, D.H. Expression of Chitinase-Encoding Genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of Engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* Toward *Lymantria dispar* Larvae. **Current Microbiology**. v. 48, p. 175–181, 2004.

LI, H.; MORIMOTO, K.; KATAGIRI, N.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; LUN, S.; OHMIYA, K. A novel beta-N-acetylglucosaminidase of *Clostridium paraputrificum* M-21 with high activity on chitobiose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 420–427, 2002.

LIN, F.P.; CHUANG, H.H.; LIU, Y.H., et al. Effects of C-terminal amino acids truncation on enzyme properties of *Aeromonas caviae* D1 chitinase. **Archives of Microbiology.** v. 191(3), p. 265-273, 2009.

LIU, C.L.; SHEN, C.R.; HSU, F.F., et al. Isolation and Identification of Two Novel SDS-Resistant Secreted Chitinases from *Aeromonas schubertii*. **Biotechnology Progress**. v. 25 (1), p. 124-131, 2009.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome—a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 19–20, p. 13–19, 2002a.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology.** v.13, p. 572–577, 2002b.

LUTZ, S.; PATRICK, W.M. Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. **Current Opinion in Biotechnology.** v.15, p. 291–297, 2004.

MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochem Soc Trans.** v. 13, p. 414–5, 1985.

MACLAUGHLIN, F.C.; MUMPER, R.J.; WANG, J.; TAGLIAFERRI, J.M.; GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; ROLLAND, A.P. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. **J Control Release.** v. 56, p. 259–272, 1998.

MAEDA, Y.; KIMURA, Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. **J Nutr.** v. 134, p. 945–950, 2004.

MAHADEVAN, B.; CRAWFORD, D.L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 20(7), p. 489-493, 1997.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res W.** v. 32, p. 327-331, 2004.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res D.** v.39, p**.** 225-9, 2011.

MEJIA-SAULES, J.E.; WALISZEWSKI, K.N.; GARCIA, M.A., CRUZ-CAMARILLO, R. The use of crude shrimp shell powder for chitinase production by *Serratia marcescens* WF. **Food Technology and Biotechnology.** v. 44(1), p. 95-100, 2006.

MENDONSA, E.S.; VARTAK, P.H.; RAO, J.U.; DESHPANDE, M.V. An enzyme from Myrothecium verrucaria that degrades insect cuticle for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnol. Lett.** v. 18, p. 373–376, 1996.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of alpha-chitin. **J Mol Biol.** v. 120, p. 167–181, 1978.

MUKESH, P.; SUMA, S.; SINGARACHARYA, M. A.; LAKSHMIPATHI, V. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 20, p. 531–534, 2004.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. **Mar. Drugs**. v. 8, p. 292–312, 2008.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em fevereiro de 2010 e janeiro de 2011.

OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J Microbiol Methods.** v. 7, p. 57–66, 1987.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 603Z. **J Bacteriol.** v. 178, p. 5065-5070, 1996.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydr Polym.** v. 53, p. 337–342, 2003.

ORDENTILICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of Serratia marcescens in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathol.** v. 78, p. 84-88, 1988.

PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I.C.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; READ, N.D. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. **Fungal Genet Biol.** v. 46, p. 585–594, 2009.

PANG, H.; ZHANG, P.; DUAN, C.-J.; MO, X.-C.; TANG, J.-L; FENG, J.-X. Identification of Cellulase Genes from the Metagenomes of Compost Soils and Functional Characterization of One Novel Endoglucanase. **Curr Microbiol.** v. 58, p. 404–408, 2009.

PAPANIKOLAU, Y.; PRAG, G.; TAVLAS, G.; VORGIAS, C.E.; OPPENHEIM, A.B.; PETRATOS, K. High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. **Biochemistry.** v. 40, p. 11338–11343, 2001.

PARK, Y.; KIM, M.H.; PARK, S.C.; CHEONG, H.; JANG, M.K.; NAH, J.W.; HAHM, K.S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. **J Microbiol Biotechnol.** v. 18, p. 1729–1734, 2008.

PATIL, R.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. Chitinolytic enzymes: an exploration **Enzyme Microb Technol**. v. 26, p. 473-483, 2000.

PEDERSEN, S.; JENSEN, B.F.; DIJKHUIZEN, L.; JØRGENSEN, S.T.; DIJKSTRA, B.W. A better enzyme for cyclodextrins. **Chemtech.** v. 12, p.19–25, 1995.

PERRAKIS, A.; WILSON, K.S.; CHET, I.; OPPENHEIM, A.B.; VORGIAS, C.E. Phylogenetic relationships of chitinases. In: Muzzarelli RAA, editor. **Chitin enzymology**. Ancona: Eur Chitin Soc. p. 217–32, 1993.

PERRAKIS, A; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A.B.; CHET, I.; WILSON, K.S.; VORGIAS, C.E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 A resolution. **Structure.** v. 2(12), p. 1169-1180, 1994.

PERE, J.; PAAVILAINEN, L.; SIIKA-AHO, M.; CHENG, Z.; VIIKARI, L. **Potential use of enzymes in drainage control of non- wood pulps.** In: Proceedings of 3rd International Non-wood fibre pulping and paper making conference, v. 2., p. 421–30, 1996.

POMMIER, J.C.; GOMA, G.; FUENTES, J.L.; ROUSSET, C.; JOKINEN, O. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 2: industrial applications. **Tappi J**. v. 73, p. 197–202, 1990.

POTTKÄMPER, J.; BARTHEN, P.; ILMBERGER, N.; SCHWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W.R. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. **Green Chem**. v. 11, p. 957–965, 2009.

POUTANEN, K. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends Food Sci Technol**. v. 8, p. 300–6, 1997.

PRAKASH, N.A.U.; JAYANTHI, M.; SABARINATHAN, R.; KANGUEANE, P.; MATHEW, L.; SEKAR, K. Evolution, Homology Conservation, and Identification of Unique Sequence Signatures in GH19 Family Chitinases. **J Mol Evol**. v. 70, p. 466–478, 2010.

PRASAD, D.Y.; HEITMANN, J.A.; JOYCE, T.W. Enzymatic de-inking of coloured offset newsprint. **Nord Pulp Pap Res. J.** v. 8, p. 284, 1993.

PUGSLEY, A.P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiol Rev.** v. 57, p. 50-108, 1993.

RAGHAVENDRA, P.; HALAMI, P.M.. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. **International Journal of Food Microbiology.** v. 133, p. 129–134, 2009.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances.** v.26, p. 576–590, 2008.

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv Protein Chem**. v. 23, p. 283–438, 1968.

RATANAVARAPORN, J.; KANOKPANONT, S.; TABATA, Y.; DAMRONGSAKKUL, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. **Carbohydr Polym.** v. 78, p. 873–878, 2009.

RDP. Ribosomal Database Project. Disponível em < http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>. Acesso em fevereiro de 2011.

REGEV, A.; KOLLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRODOVSTY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMANN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Syneristic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endo chitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **BioTechniques**. v. 62, p. 3581-3586, 1996.

REPORTLINKER. <http://www.reportlinker.com/p0148002/World-Enzymes-Market.html>. Acesso em outubro de 2009.

REVAH-MOISEEV, S.; CARROAD, P.A.: Conversion of enzymatic hidrolysate of shellfish chitin to single cell protein. **Biotechnol Bioeng.** v. 23, p. 1067-1078, 1981.

RHOADES, J.; GIBSON, G.; FORMENTIN, K.; BEER, M.; RASTALL, R. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chitooligosaccharides. **Carbohydr Polym.** v. 64, p. 57–59, 2006.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics.** v.16(10)p. 944-5, 2000.

SALI, A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, John Wiley & Sons, Inc., Suplement 15., S.6, p.1-5, v.6.30, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed**. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **PNAS USA.** v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SASAKI, C.; YOKOYAMA, A.; ITOH, Y.; HASHIMOTO, M.; WATANABE, T.; FUKAMIZO, T. Comparative Study of the Reaction Mechanism of Family 18 Chitinases from Plants and Microbes. **J Biochem.** v. 131, p. 557-564, 2002.

SASHIWA, H.; FUJISHIMA, S.; YAMANO, N.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI E. Production of *N*-acetyl-d-glucosamine from a-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. **Carbohydrate Research.** v. **337**, p. 761–763, 2002.

SASHIWA, H.; FUJISHIMA, S.; YAMANO, N.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI E. Enzymatic production of *N*-acetyl-d-glucosamine from chitin. Degradation study of *N*-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes, **Carbohydrate Polymers.** v. **51**, p. 391–395, 2003.

SASSON, A. Industrial and Environmental Biotechnology: Achievements, Prospects and Perceptions. **Institute of Advanced Studies of United Nations University UNU-IAS**. v. 21, 2005.

SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**. v. 409, p. 258–268, 2001.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biol Rev.** v. 22, p. 36–42, 2008.

SHAHABUDDIN, M.; TOYOSHIMA, T.; AIKAWA, M.; KASLOW, D.C. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **PNAS USA.** v. 90, p. 4266–4270, 1993.

SHORT, J.M. Protein activity screening of clones having DNA from uncultivated microorganisms. U.S. Patent Number 6,677,115. **Diversa Corporation**, 2004.

SHOWELL, M.S. Enzymes, detergent. In: Flickinger MC, Drew SW (eds) **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation**. v. 2. Wiley, New York, p. 958–971, 1999.

SINGH, B.K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends in Biotechnology**. v.28(3), p. 111-116, 2009a.

SINGH, B.K. Organophosphorous degrading bacteria: ecology and industrial application. **Nat Rev Microbiol.** v. 7, p.156–164, 2009b.

SONNHAMMER, E.L.L.; HEIJNE, G. VON; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on **Intelligent Systems for Molecular Biology**, p 175-182. Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998.

SUURNAKKI, A.; CLARK, T.; ALLISON, R.; VIIKARI, L.; BUCHERT, J. Xylanase-and mannanase-aided ECF and TCF bleaching. **Tappi J.** v. 79, p. 111, 1996.

SUZUKI, K.; TAIYOJI, M.; SUGAWARA, N.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; WATANABE, T. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. **Biochem J.** v. 343, p. 587-596, 1999.

SUZUKI, S. Studies on biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharides of chitin and chitosan**. Fragrance J**. v. 51, p. 61– 68, 1996.

TAKASE, K.; MIZONO, H.; YAMANE, K. NH2-terminal processing of *Bacillus subtilis* alpha-amylase. **J Biol Chem.** v. 263(23), p. 11548-11553, 1988.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo red–polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl Environ Microbiol**. v. 43, p. 777–780, 1982.

TERAHARA, T.; IKEDA, S.; NORITAKE, C.; MINAMISAWA, K.; ANDO, K.; TSUNEDA, S.; HARAYAMA, S. Molecular diversity of bacterial chitinases in arable soils and the effects of environmental factors on the chitinolytic bacterial community. **Soil Biology & Biochemistry.** v. 41, p. 473–480, 2009.

THAMTHIANKUL, S.; SUAN-NGAY, S.; TANTIMAVANICH, S.; PANBANGRED, W. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 56, p. 395–401, 2001.

TOKORO, A.; KOBAYASHI, M.; TATEWAKI, N.; SUZUKI, K.; OKAWA, Y.; MIKAMI, T.; SUZUKI, S. and SUZUKI, M. Protective effect of N-acetylchitohaexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Microbiol Immunol.** v. 33, p. 357–367, 1989.

TOM, R.A.; CARROAD, P.A. Effect of reaction on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB1466 chitinase. **J Food Sci.** v. 46, p. 646-647, 1981.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, p. 616–622, 2009.

UEDA, M.; KOJIMA, M.; YOSHIKAWA, T.; MITSUDA, N.; ARAKI, K.; KAWAGUCHI, T.; MIYATAKE, K.; ARAI, M.; FUKAMIZO, T. A novel type of

family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. **Eur J Biochem** v. 270, p. 2513– 2520, 2003.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 435, 1998.

VAIDYA, R.J.; SHAH, I.M.; VYAS, P.R.; CHHATPAR, H.S.; Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 17(7), p. 691-696, 2001.

VAN AALTEN, D.M.F.; SYNSTAD, B.; BRURBERG, M.B.; HOUGH, E.; RIISE, B.W.; EIJSINK, V.G.H.; WIERENGA, R.K. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. **PNAS USA.** v. 97(11), p. 5842-5847, 2000.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. **Journal of Biotechnology.** v. 94, p. 137–155, 2002.

VOGET, S.; STEELE, H.L.; STREIT, W.R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. **Journal of Biotechnology**. v. 126, p. 26–36, 2006.

VYAS, P.R.; DESHPANDE, M.V. Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. **J Gen Appl Microbiol** v. 37, p. 267–275, 1991.

WANDERSMAN, C. Secretion across the bacterial outer membrane. **Trends Genet**. v. 8, p. 317-322, 1992.

WANG, F.P.; LI, Q.; ZHOU, Y.; LI, M.G.; XIAO, X. The C-Terminal Module of Chi1 From *Aeromonas caviae* CB101 Has a Function in Substrate Binding and Hydrolysis. **Proteins: Structure, Function, and Genetics.** v. 53, p. 908–916, 2003.

WANG, F.; LI, F.; CHEN, G.; LIU, W. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiol. Res.** v. 164(6), p. 650-657, 2009.

WANG, S-L.; CHANG, W-T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium**. App Environ Microbiol.** v. 63, p.380-386, 1997.

WANG, S.-L.; HSU, W.-H.; LIANG, T.-W. Conversion of squid pen by *Pseudomonas aeruginosa* K187 fermentation for the production of N-acetyl chitooligosaccharides and biofertilizers. **Carbohydrate Research**. v. 345, p. 880–885, 2010.

WANG, Z.; ZHENG, L.; YANG, S.; NIU, R.; CHU, E.; LIN, X. N-acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 357, p. 26–31, 2007.

WATANABE, T.; SUZUKI, K.; OYANAGI, W.; OHMSHI, K; TANAKA, H. Gene cloning of chitinase Al from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type HI homology units of fibronectin. **J Biol Chem.** v. 265, p. 15659-15665, 1990.

WATANABE. T.; KIMURA, K.; SUMIYA, T.; NIKAIDOU, N.; SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; TAIYOJI, M.; FERRER, S.; REGUE, M. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. **J Bacteriol.** v. 179, p. 7111-7117, 1997.

WATANABE, T.; KANAI, R.; KAWASE, T.; TANABE, T.; MITSUTOMI, M.; SAKUDA, S.; MIYASHITA, K. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology.** v. 145, p. 3353-3363, 1999.

WATANABE, T.; ARIGA, Y.; SATO, U.; TORATANI, T.; HASHIMOTO, M.; NIKAIDOU, N.; KEZUKA, Y.; NONAKA, T.; SUGIYAMA, J. Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. **Biochem J.** v. 376, p. 237–244, 2003.

WEB OF SCIENCE. < isiknowledge.com>. Acesso em janeiro de 2011.

WOLFGANG, R. S.; ROLF, D.; KARL-ERICH, J. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 15, p. 285–290, 2004.

WU, M.L.; CHUANG, Y.C.; CHEN, J.P.; CHEN, C.S.; CHANG, M.C. Identification and Characterization of the Three Chitin-Binding Domains within the Multidomain Chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67(11), p. 5100–5106, 2001.

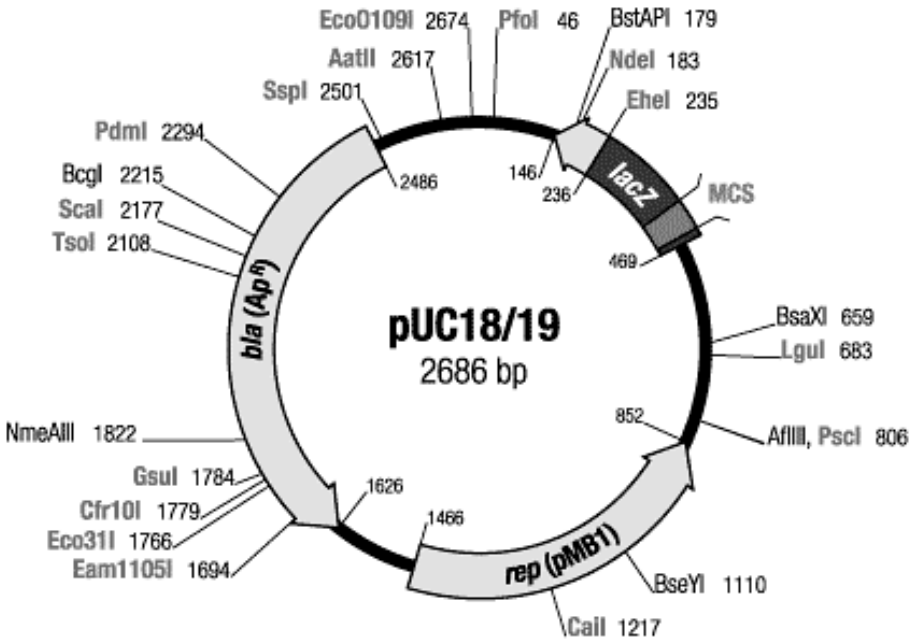
YU, N.Y.; WAGNER, J.R.; LAIRD, M.R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S.C.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**. v. 26(13), p. 1608-1615, 2010.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. v. 24 , p. 452–481, 2006.

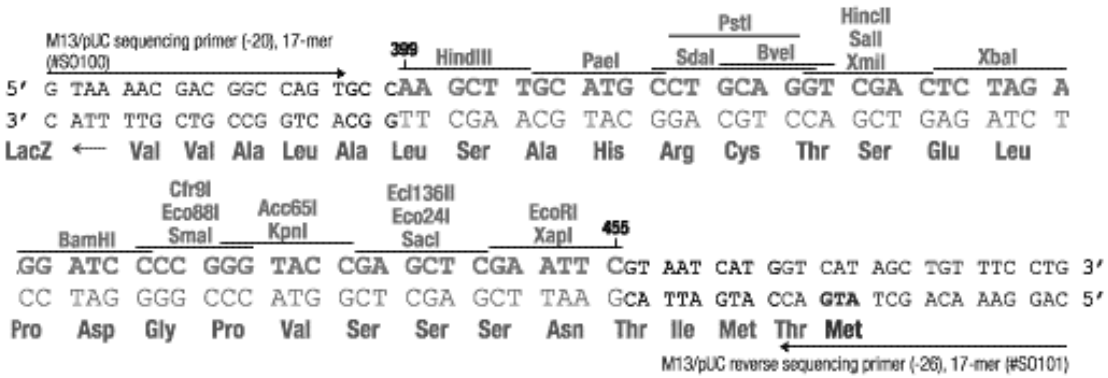
ZHU, Z.; ZHENG, T.; HOMER, R.J.; KIM, Y.K.; CHEN, N.Y.; COHN, L.; HAMID, Q.; ELIAS, J.A. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. **Science**. v. 304, p. 1678–1682, 2004.

9. APÊNDICES

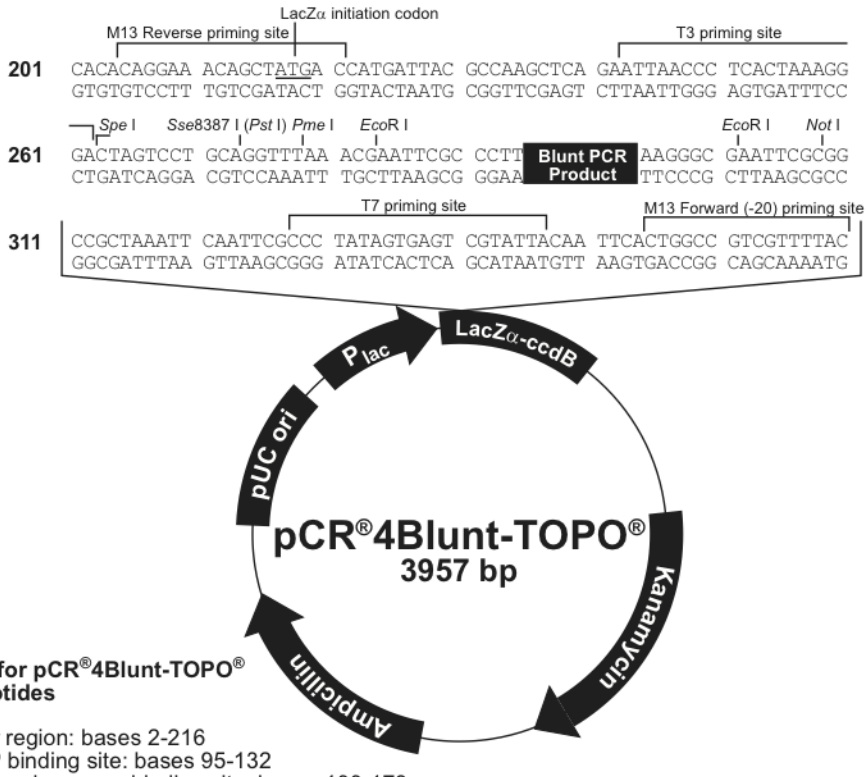
APÊNDICE 1 – VETOR pUC18



Multiple cloning sites of pUC18



APÊNDICE 2 – VETOR pCR®4 TOPO



Comments for pCR®4Blunt-TOPO®
3957 nucleotides

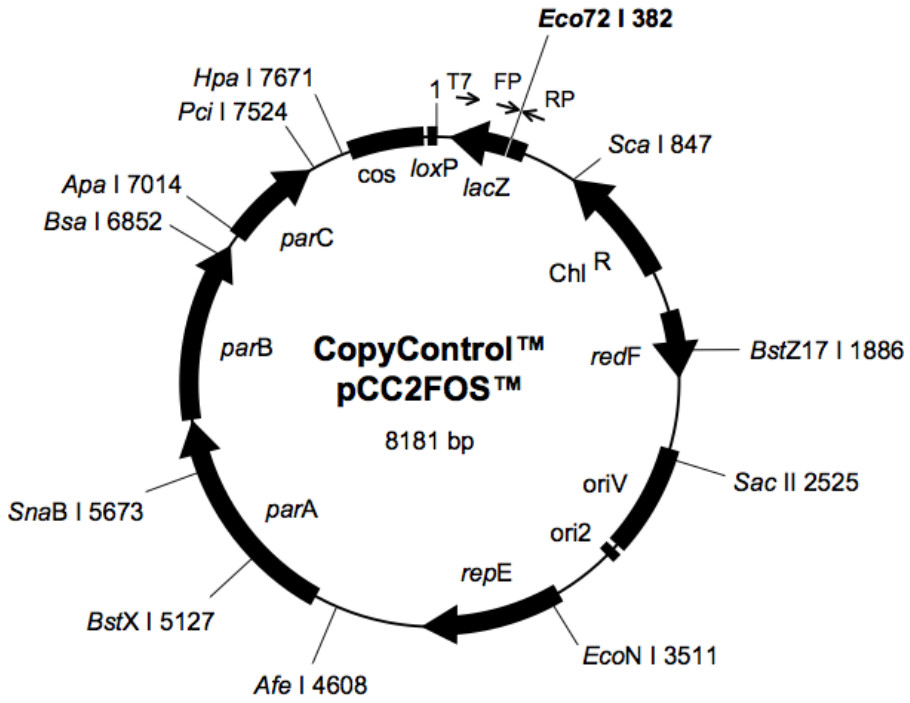
lac promoter region: bases 2-216
- CAP binding site: bases 95-132
- RNA polymerase binding site: bases 133-178
- Lac repressor binding site: bases 179-199

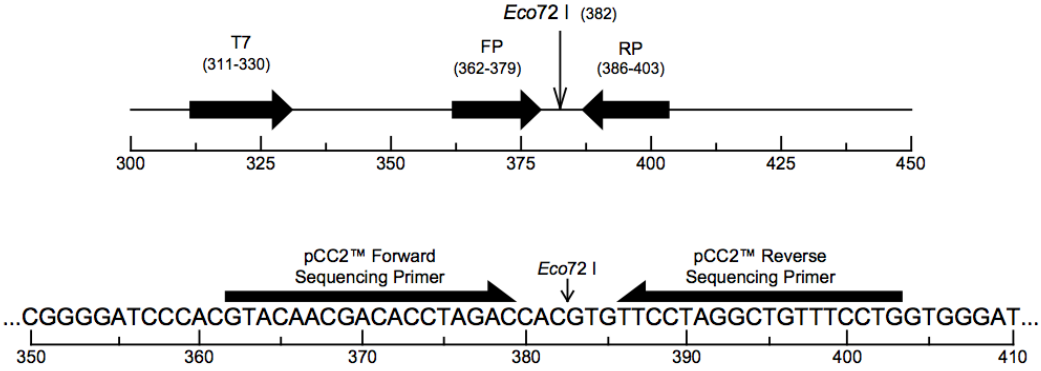
Start of transcription: base 179
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
- LacZα portion of fusion: bases 217-497
- *ccdB* portion of fusion: bases 508-810

T3 priming site: bases 243-262
Polylinker: bases 262-312
TOPO® Cloning site: bases 294-295
T7 priming site: bases 328-347
M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
neo (kanamycin) promoter region: bases 1021-1070
neo (kanamycin) resistance gene (ORF): bases 1159-1953
bla promoter region: bases 2062-2156
- RNA polymerase binding site: bases 2062-2143
- -35 region: bases 2087-2093
- *bla* promoter (P3): bases 2116-2122

Start of transcription: base 2122
Ribosome binding site: bases 2145-2149
bla (ampicillin) resistance gene (ORF): bases 2157-3017
pUC origin: bases 3162-3835

APÊNDICE 3 – VETOR pCC2FOS





FP = pCC2™ Foward Sequencing Primer 5' GTACAACGACACCTAGAC 3'
RP = pCC2™ Reverse Sequencing Primer 5' CAGGAAACAGCCTAGGAA 3'
T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'