



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

**UMA QUITINASE TERMOESTÁVEL DE *Chromobacterium violaceum* ATCC
12472 EXPRESSA EM *Escherichia coli* E QUE INIBE A GERMINAÇÃO DE
CONÍDIOS DE DOIS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO ABACAXI
ORNAMENTAL**

FORTALEZA

2018

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

UMA QUITINASE TERMOESTÁVEL DE *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472
EXPRESSA EM *Escherichia coli* E QUE INIBE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE
DOIS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO ABACAXI ORNAMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA

2018

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

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

S096q Sousa, Antônio Juscelino Sudário.

Uma quitinase termoestável de *Chromobacterium violaceum* atcc 12472 expressa em *Escherichia coli* e que inibe a germinação de conídios de dois fungos fitopatogênicos isolados do abacaxi ornamental / Antônio Juscelino Sudário Sousa. – 2018.

111 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

1. Quitinase antifúngica. 2. *Chromobacterium violaceum*. 3. *Escherichia coli*. 4. *Fusarium oxysporum*. 5. *Fusarium proliferatum*. I. Título.

CDD 572

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

UMA QUITINASE TERMOESTÁVEL DE *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 EXPRESSA EM *Escherichia coli* E QUE INIBE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE DOIS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO ABACAXI ORNAMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Carolina de Araújo Viana
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a. Dr^a. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha filha, Maria Júlia.

À minha esposa, Natalya.

Aos meus pais, Edilson e Rosa.

Às minhas irmãs, Luana e Regina.

Dedico com Amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC).

Ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC).

À Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Patologia Pós-colheita, Fortaleza, Ceará.

Ao Departamento de Física do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC).

Ao Núcleo de Biologia Experimental, Universidade de Fortaleza (Nubex-UNIFOR), Fortaleza, Ceará

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Ao professor Dr. Thalles Grangeiro Barbosa, por ter depositado sua confiança em mim, pelos preciosos ensinamentos, pela orientação, pelo compromisso como verdadeiro servidor público e, principalmente, pela paciência.

À pesquisadora da Embrapa Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva, por sua contribuição para a realização deste trabalho, pela disponibilização de seu laboratório e coleção de cepas fúngicas para a realização de alguns experimentos.

Ao professor Dr. Jeanlex Soares de Sousa, por sua contribuição para a realização deste trabalho, pela disponibilização de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro-Moreira, por sua contribuição para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Denise Cavalcante Hissa, pela sua contribuição como membro da banca examinadora deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcio Viana Ramos, pela sua contribuição como membro da banca examinadora deste trabalho.

À professora Dra. Vânia Marilande Ceccatto, pela sua contribuição como membro da banca examinadora deste trabalho.

À pesquisadora Dra. Carolina de Araújo Viana, pela sua contribuição como membro da banca examinadora deste trabalho.

Ao técnico do laboratório Dr. José Edvar Monteiro Junior, pela colaboração e sugestões nas manipulações de equipamentos, reagentes e amostras do laboratório.

A todos os professores do departamento de bioquímica que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja na disponibilização de seus laboratórios, de reagentes, ou de equipamentos.

Aos amigos e colegas do laboratório LABGEM Antônio, Ednésio, Edvar, Jéssica, Mayara, Mirelle, Paulo, Simone, Suellen, por compartilhar as bancadas, pelo companheirismo e pelo apoio.

À Dra. Marina Duarte Pinto Lobo, pelo auxílio na realização de experimentos na UNIFOR.

A todos que direta ou indiretamente deram alguma contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Antônio Edilson de Sousa e Francisca Sudário Brilhante de Sousa, pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros José Ueides Silva e Maria do Socorro Fachine Silva, pelo incentivo e apoio.

À minha avó Rita Sudário do Nascimento (*in memoriam*), que sempre acreditou que eu um dia seria doutor e que lamentavelmente partiu antes de suas palavras se concretizarem.

À minha esposa Natalya Fachine Silva Sousa, pelo apoio e incentivo.

À minha querida filha Maria Júlia Fachine Sousa, pelo carinho e motivação.

E finalmente à Deus, por ter proporcionado o alcance aos meus objetivos.

“Nenhum sistema explicará o mundo em todos os seus aspectos e detalhes. Ter ajudado na destruição da idéia de uma verdade intangível e eterna talvez seja uma das mais valiosas contribuições da metodologia científica”. (François Jacob)

RESUMO

Chromobacterium violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa, saprófita, anaeróbia facultativa e de vida livre. Essa bactéria habita vários ecossistemas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente em amostras de água ou de solo úmido. Ela caracteriza-se também por possuir um versátil metabolismo energético, fazendo uso de inúmeras enzimas que possibilitam a utilização de variadas fontes de energia. No genoma da *C. violaceum* foram identificadas diversas ORFs (*open reading frames*), codificando proteínas supostamente responsáveis por mediar a interação de *C. violaceum* com os vários elementos presentes nos ambientes em que ela habita. Entre estas proteínas, estão várias quitinases. Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar a quitina, que é um polissacarídeo composto por resíduos de *N*-acetil- β -D-glucosamina unidos por ligações O-glicosídicas do tipo β -(1,4). Neste trabalho, o objetivo foi expressar uma quitinase (CV1440) de *C. violaceum* ATCC 12472 em *E. coli*, purificar a proteína recombinante e caracterizá-la em relação a aspectos bioquímicos e biológicos. A sequência codificada pela ORF CV1440 foi amplificada por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e adicionada ao cassete de expressão do plasmídeo pET303/CT-His. O plasmídeo recombinante foi clonado em *E. coli* TOP10F' e posteriormente introduzido em *E. coli* BL21(DE3) para expressão. A proteína recombinante foi secretada para o meio de cultura, via peptídeo sinal endógeno. A quitinase foi então purificada a partir do meio livre de células por precipitação com sulfato de amônio (95% de saturação), cromatografia de afinidade a quitina, seguida de uma cromatografia de afinidade a níquel imobilizado em matriz de Sepharose. Quando submetida a eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), a proteína purificada apresentou uma única banda com massa molecular aparente de cerca de 46 kDa. A identidade dessa banda como correspondendo à quitinase CV1440 foi confirmada por espectrometria de massas. O rendimento do produto recombinante purificado foi de aproximadamente 3 mg por litro de cultura. A quitinase recombinante purificada apresentou atividade ótima em pH 5,0, e apresentou uma temperatura ótima de 60 °C, foi moderadamente estável a variação de pH e elevadamente estável a variações de temperatura, mantendo mais de 50% da atividade quitinolítica após incubação a 100 °C por 1 hora. A atividade da enzima foi afetada negativamente pelos íons Cu^{+2} , Hg^{+2} , La^{+3} e Fe^{+2} e pelos agentes químicos DTT, β -mercaptoetanol, e SDS, porém não houve aumento de atividade na presença

de outros íons, bem como, na presença do quelante EDTA, sugerindo que a enzima não possui cofator. A enzima conseguiu inibir a germinação de conídios dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *F. proliferatum*. Ensaio de microscopia de força atômica revelaram alterações mORFológicas pronunciadas na superfície de esporos incubados com CvChi47 quando comparados aos conídios não tratados com a enzima. Juntos, esses resultados indicam a possibilidade de utilização futura da quitinase codificada pela ORF CV1440 como uma potencial ferramenta no controle de fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: Quitinase antifúngica. *Chromobacterium violaceum*. *Escherichia coli*. CV1440. *Fusarium oxysporum*. *Fusarium proliferatum*. Microscopia de força atômica.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative, saprophytic, facultative anaerobic and free-living β -proteobacterium. This bacterium inhabits several ecosystems in the tropical and subtropical regions of the world, especially in samples of water or moist soil. It is also characterized by a versatile energy metabolism, using of numerous enzymes that allow the use of various energy sources. In the *C. violaceum* genome, several *ORFs* (open reading frames) were identified, coding for proteins supposedly responsible for mediating the interaction of *C. violaceum* with the various elements present in the environments in which it inhabits. Among these proteins are various chitinases. Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing chitin, which is a polysaccharide composed of residues of N-acetyl- β -D-glucosamine bound by O-glycosidic bonds of the β - (1,4) type. In this work, the objective was to express a chitinase (CV1440) of *C. violaceum* ATCC 12472 in *E. coli*, to purify the recombinant protein and to characterize it in relation to biochemical and biological aspects. The sequence encoded by the CV1440 *ORF* was amplified by DNA polymerase chain reaction (PCR) and added to the plasmid pET303/CT-His expression cassette. The recombinant plasmid was cloned into *E. coli* TOP10F 'and subsequently introduced into *E. coli* BL21 (DE3) for expression. Recombinant protein was secreted into the culture medium via the endogenous signal peptide. The chitinase was then purified from the cell free medium by ammonium sulfate precipitation (95% saturation), chitin affinity chromatography, followed by a nickel affinity chromatography immobilized on a sepharose matrix. When subjected to electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE), the purified protein had a single band with apparent molecular mass of about 46 kDa. The identity of this band as corresponding to chitinase CV1440 was confirmed by mass spectrometry. The yield of the purified recombinant product was approximately 3 mg per liter of culture. The purified recombinant chitinase presented optimum activity at pH 5.0 and had an optimum temperature of 60 °C, was moderately stable at pH variation and highly stable at temperature variations, maintaining more than 50% of the chitinolytic activity after incubation at 100 °C for 1 hour. The activity of the enzyme was negatively affected by the Cu^{2+} , Hg^{2+} , La^{3+} and Fe^{2+} ions and by the chemical agents DTT, β -mercaptoethanol, and SDS, but there was no increase in the presence of other ions, suggesting that the enzyme has no cofactor. The enzyme was able to inhibit the germination of conidia of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*

and *F. proliferatum*. Atomic force microscopy assays revealed pronounced morphological changes on the surface of spores incubated with CvChi47 when compared to conidia not treated with the enzyme. Together, these results indicate the possibility of future use of chitinase encoded by *ORF CV1440* as a potential tool in the control of phytopathogenic fungi.

Keywords: Antifungal chitinase. *Chromobacterium violaceum*. *Escherichia coli*. CV1440. *Fusarium oxysporum*. *Fusarium proliferatum*. Atomic force microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de uma placa de Petri contendo colônias de <i>Chromobacterium violaceum</i> em meio de cultura LB-agar.....	19
Figura 2 - Estrutura molecular da quitina.....	20
Figura 3 - Estrutura terciária de uma glicosídeo hidrolase da família 18.....	23
Figura 4 - Estrutura terciária de uma glicosídeo hidrolase da família 19.....	24
Figura 5 - Estrutura primária da proteína CvChi47 codificada pelo ORF CV1440 de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472...	43
Figura 6 - Gráfico gerado pelo SignalP 4.1.....	44
Figura 7 - Perfil eletroforetico do produto de PCR da CV1440.....	46
Figura 8 - Perfil eletroforetico do produto de digestão do plasmídeo recombinante pET-CV1440.....	47
Figura 9 - Atividade quitinolítica da fração subcelular de células <i>E. coli</i> BL21(DE3) contendo o vector de expressão recombinante pET303CV1440-His.....	49
Figura 10 - Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.....	50
Figura 11 - Perfil eletroforetico da purificação parcial da CvChi47.....	51
Figura 12 - Perfil cromatográfico da CvChi47 em matriz de Ni-Sepharose...	53
Figura 13 - Perfil eletroforetico da CvChi47 pura.....	54
Figura 14 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da quitinase.....	55
Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da quitinase..	56
Figura 16 - Efeito de íons metálicos na atividade da quitinase.....	57
Figura 17 - Efeito de produtos químicos na atividade quitinolítica da CvChi47.....	60
Figura 18 - Atividade endoquitinolítica e exoquitinolítica da CvChi47.....	61
Figura 19 - Análise da rCvChi47 por (LC-ESI-MS/MS).....	63
Figura 20 - Efeito da CvChi47 sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.....	64
Figura 21 - Fotomicrografia do efeito inibitório da CvChi47 sobre a germinação de conídios de <i>F. proliferatum</i> e <i>F. oxysporum</i>	65

Figura 22 - Análise de topologia de conídios de <i>F. proliferatum</i> tratados com CvChi47 por microscopia de força atômica.....	66
Figura 23 - Análise de topologia de conídios de <i>F. oxysporum</i> tratados com CvChi47 por microscopia de força atômica.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo da purificação.....	48
Tabela 2 -	Atribuição representativa de massas moleculares experimentais, conforme determinado por ESI-MS, às sequências de aminoácidos de CvChi47.....	62

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
BDA	Batata destrose agar
CAZy	<i>Carboidrate-active enzymes</i>
DMAB	<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIS	Extrato intracelular solúvel
FP	Fração periplasmática
GH	Glicosil hidrolase
GlcNac	N-acetil- <i>D</i> -Glucosamina
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MLC	Meio livre de células
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
CDD	<i>Conserved domain database</i>
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
TFA	Ácido trifloroacético
TRIS	Tris hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
1.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	17
1.2	Quitina.....	18
1.3	Quitinases.....	21
1.4	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	25
2	HIPÓTESE.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	MATERIAIS.....	30
4.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	30
4.2	Células para clonagem e expressão.....	30
4.3	Fungos filamentosos.....	30
4.4	Plasmídeo e enzimas.....	30
4.5	Reagentes e outros materiais.....	31
5	MÉTODOS.....	32
5.1	Análise da Sequência codificadora da <i>ORF CV1440</i>	32
5.2	Amplificação da sequência codificada pela <i>ORF CV1440</i>	32
5.3	Clonagem da sequência codificada pela <i>ORF CV1440</i> no vetor de expressão pET303/CT-His.....	33
5.4	Expressão proteica.....	34
5.5	Choque osmótico e lise celular.....	34
5.6	Purificação da Quitinase Recombinante.....	35
5.7	Quantificação de proteínas.....	36
5.8	Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.....	36
5.9	Análise por espectrometria de massa de CvChi47.....	36
5.10	Ensaio de atividade quitinolítica.....	37
5.11	Temperatura e pH ótimo da atividade enzimática.....	38
5.12	Efeitos do pH, temperatura e íons metálicos sobre a atividade quitinasica.....	38

5.13	Efeito de compostos químicos na estabilidade da atividade enzimática.....	39
5.14	Atividade endoquitinolítica e exoquitinolítica da CvChi47.....	39
5.15	Inibição de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por CvChi47.....	39
5.16	Inibição de esporos de fungos fitopatogênicos por CvChi47.....	40
5.17	Análises de microscopia de força atômica.....	41
6	RESULTADOS.....	42
6.1	Análises da sequência codificada pela <i>ORF</i> CV1440.....	42
6.2	Expressão proteica recombinante.....	45
6.3	Purificação da CvChi47.....	45
6.4	Caracterização, avaliação do pH, temperatura, íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade quitinásica da CvChi47.....	52
6.5	Identificação de peptídeos por espectrometria de massa (MS).....	58
6.6	Atividade antifúngica da quitinase.....	58
6.7	Análise de microscopia de força atômica.....	58
7	DISCUSSÃO.....	68
8	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE A - ARTIGO “A Novel Thermostable Chitinase from <i>Chromobacterium violaceum</i> that Inhibits the Development of Phytopathogenic Fungi”.....	80

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa, saprófita, oxidase e catalase positiva, anaeróbia facultativa, de vida livre e encontrada em variados ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes em amostras de água e solo, que se move por meio de flagelos e tem um crescimento ótimo entre 15 e 40 °C (DALL'AGNOL *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2005; DURÁN; MENCK, 2001; LIN *et al.*, 2016; PANT; SHARMA, 2015). Além disso, é caracterizada por possuir um versátil metabolismo energético, onde enzimas como as oxidases e redutases são capazes de utilizar diversas fontes de energia, tornando possível o seu desenvolvimento em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (LACERDA; NASCIMENTO; ARAÚJO, 2016).

Apesar de normalmente *C. violaceum* se mostrar como não patogênica, existem alguns raros casos de infecção em humanos, com a maioria dos casos de infecção, ocorrendo em crianças, ou indivíduos imunocomprometidos (RICHARD, 1993). No entanto, casos de infecções na pele, meningite, endocardite, doenças respiratórias, peritonite e infecção gastrointestinal, foram relatados diversas vezes, sendo comumente observado, uma rápida progressão para sepse fulminante e disfunção de múltiplos órgãos em infecções causadas por *C. violaceum* (JUSTO; DURÁN, 2017).

As colônias de *C. violaceum* são violetas e regulares (FIGURA 1), porém variantes sem pigmentação e/ou irregulares também já foram isoladas (DURÁN; MENCK, 2001). Essa bactéria é abundantemente encontrada nas margens do rio Negro, o principal afluente do rio Amazonas e devido a sua versatilidade em se adaptar a uma grande variedade de ambientes, foi alvo de um projeto envolvendo diversos grupos de pesquisa visando sequenciar seu genoma (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

O sequenciamento completo do genoma da estirpe ATCC 12472 da *C. violaceum* revelou uma vasta quantidade de ORFs (*open reading frames*) relacionadas ao metabolismo geral, codificando proteínas transportadoras de membrana, supostamente, responsáveis por mediar a interação de *C. violaceum* com

os vários elementos presentes nos ambientes em que ela habita (BEZERRA, 2008; GRANGEIRO *et al.*, 2004).

Dentre os compostos biologicamente ativos, contra microrganismos, produzidos pela *C. violaceum*, o pigmento, 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, conhecido como violaceína foi o primeiro a ser relatado (DURÁN; MENCK, 2001). A violaceína é um derivado do indol e a via catalítica responsável por sua síntese foi determinada e é composta por cinco enzimas (VioA, VioB, VioC, VioD e VioE) (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017).

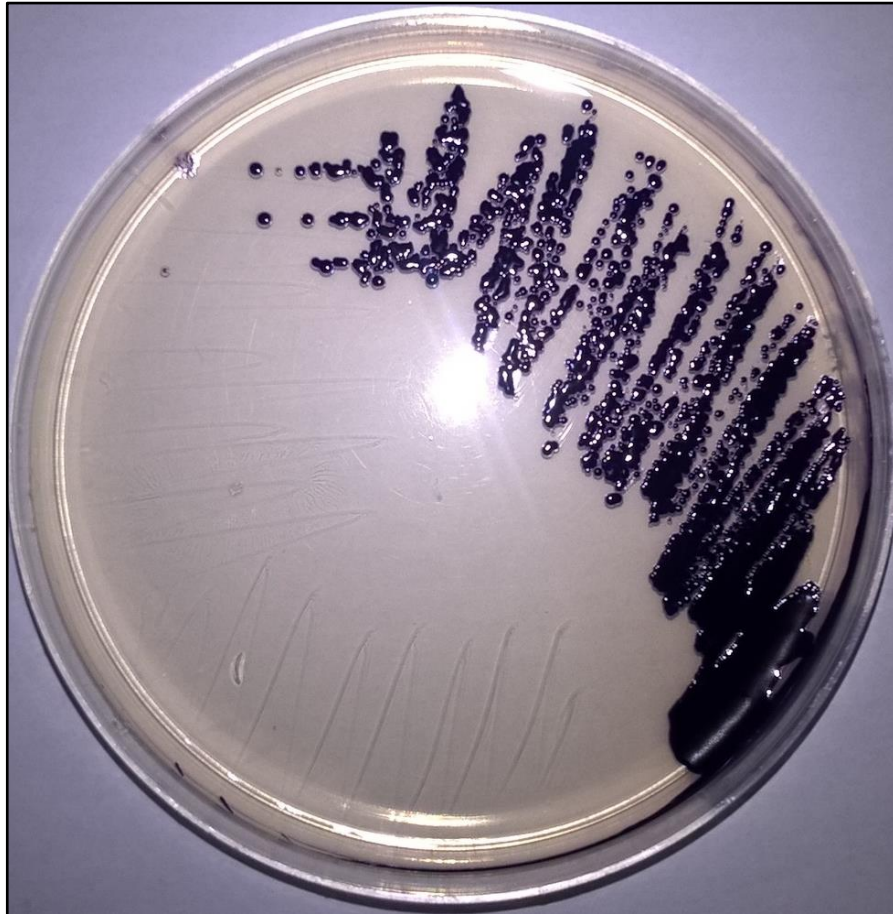
A violaceína é composto responsável pela coloração característica das colônias de *C. violaceum* (FIGURA 1), bem como, também possui diferentes atividades biológicas: atividade bactericida (ARULDASS *et al.*, 2018); atividade antifúngica (SASIDHARAN *et al.*, 2015), e efeito deletério sobre protozoários (LOPES *et al.*, 2009).

Além das *ORFs* que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da violaceína, existem muitas outras *ORFs* codificando para produtos de interesse na agricultura medicina e biotecnologia. Dentre estes, podem-se citar várias quitinases como a CvChi45 que foi caracterizada e teve a funcionalidade de seu peptídeo sinal investigada por Lobo e colaboradores (2013). Demonstrando o possível envolvimento dessa quitinase na adaptabilidade da bactéria a ambientes onde a quitina pode ser a principal, ou única fonte de carbono. Além disso as quitinases codificadas no genoma dessa bactéria podem estar relacionadas ao fato dessas proteínas serem potenciais agentes controladores dos microrganismos do ambiente em que vivem.

1.2 Quitina

A quitina é um polissacarídeo insolúvel em água, linear e não ramificado, formado por resíduos de *N*-acetil- β -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose; GlcNAc), unidos por ligações do tipo O-glicosídicas β -(1,4) [nomenclatura IUPAC: (1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano] (TANG *et al.*, 2015; THARANATHAN; KITTUR, 2003) (FIGURA 2). Esse biopolímero é extremamente abundante na natureza devido compor carapaças de crustáceos, exoesqueleto de outros artrópodes, conchas de moluscos e estar presente na parede celular de muitos fungos e de algumas algas e dos ovos de nematoides (DAHIYA *et al.*, 2005; JOLLES; MUZZARELLI, 1999; KOPPARAPU *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2010; LI; GREENE, 2010).

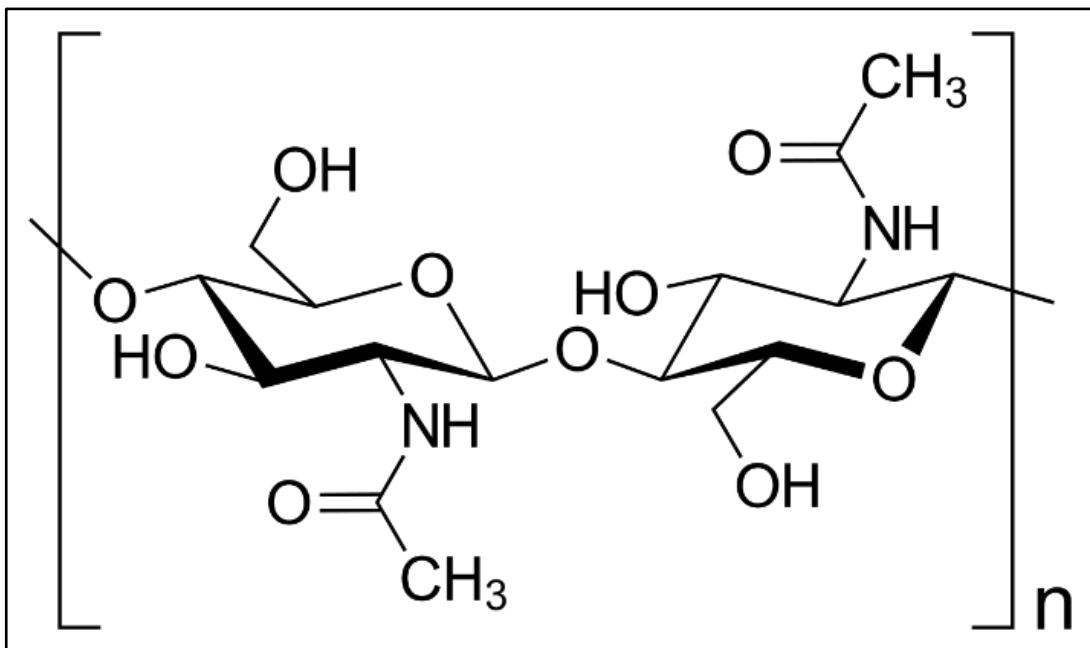
Figura 1 - Imagem de uma placa de Petri contendo colônias de *Chromobacterium violaceum* em meio de cultura LB-agar.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Placa de Petri contendo colônias de *C. violaceum* meio de cultura LB-agar.

Figura 2 - Estrutura molecular da quitina



Fonte: Dschanz.

Além disso, a quitina também está presente na matriz peritrófica, uma estrutura acelular, composta de quitina e glicoproteínas que reveste o intestino da maioria dos invertebrados, formando uma barreira que protege o epitélio do ataque de toxinas e patógenos (RODGERS *et al.*, 2017; TELLAM, 1996).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo, anualmente, sintetizadas mais de 10^{11} toneladas, nas suas diversas formas (BRIGHAM, 2017; GOODAY, 1990).

A degradação enzimática da quitina é realizada por glicosil hidrolases conhecidas genericamente como quitinases. Diversos organismos são capazes de produzir uma variedade de enzimas quitinolíticas com especificidades e propriedades catalíticas bem variadas, cujas funções fisiológicas, podem envolver parasitismo, nutrição, mORFogênese e/ou defesa (ADRANGI *et al.*, 2010; BUSBY *et al.*, 2012; GRUBER; KUBICEK; SEIDL-SEIBOTH, 2011; HOWARD *et al.*, 2003; RATHORE; GUPTA, 2015). Além disso, os oligômeros de GlcNAc liberados pela degradação da quitina possuem atividades biológicas úteis, tais como imunoestimulação e indução de respostas de defesa vegetal (HUANG *et al.*, 2012).

1.3 Quitinases

Quitinases [EC 3.2.1.14] são enzimas que realizam a catálise de ligações β -1,4 da quitina liberando resíduos de GlcNAc (CAZYPEDIA CONSORTIUM, 2017; HARA *et al.*, 2013; KOLOSOVA; BREUIL; BOHLMANN, 2014). A maior parte das quitinases caracterizadas pertencem às famílias das GH18 e GH19, sendo essa classificação baseada no grau de identidade das sequências primárias, bem como, das semelhanças estruturais (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Além disso, outras quitinases pertencentes a outras duas famílias também foram, recentemente, identificadas (GH23 e GH 48) (LANDIM *et al.*, 2017).

Pode-se observar que dentro de cada família das quitinases é usado um determinado mecanismo molecular para degradar a quitina. Na família GH18, por exemplo, o mecanismo de catalise, envolve a retenção da configuração anomérica do substrato, ocorrendo um mecanismo de duplo deslocamento, o grupo carboxila de um resíduo da enzima protona o oxigênio da ligação glicosídica e o grupo acetoamido do próprio substrato realiza um ataque nucleofílico, desta forma, é formando um íon oxazolinium intermediário (CHEN *et al.*, 2018; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; SASAKI

et al., 2002). Enquanto que na família GH19 a hidrólise se dá, por meio de catálise ácida, pela inversão do carbono anomérico, que passa de β a α (OHNO *et al.*, 1996). Então, dois resíduos de aminoácidos são requeridos para a catálise. Um deles age como ácido, doador de prótons na reação e o outro age como base, que ativa a molécula de água nucleofílica e estabiliza o composto intermediário, carregado (BRAMELD; GODDARD, 1998; ISELI *et al.*, 1996).

Quanto à estrutura terciária, as GH18 possuem um domínio catalítico composto por um barril (β/α)₈, formado por 8 α -hélices e 8 fitas- β e pelo menos, um domínio não catalítico de ligação à quitina (BANNER *et al.*, 1975; FUNKHOUSER; ARONSON, 2007) (FIGURA 3), por outro lado as GH19 possuem domínios ricos em α -hélices e uma estrutura semelhante às encontradas em lisozimas e quitosanases (CHUANG; LIN; LIN, 2008) (FIGURA 4).

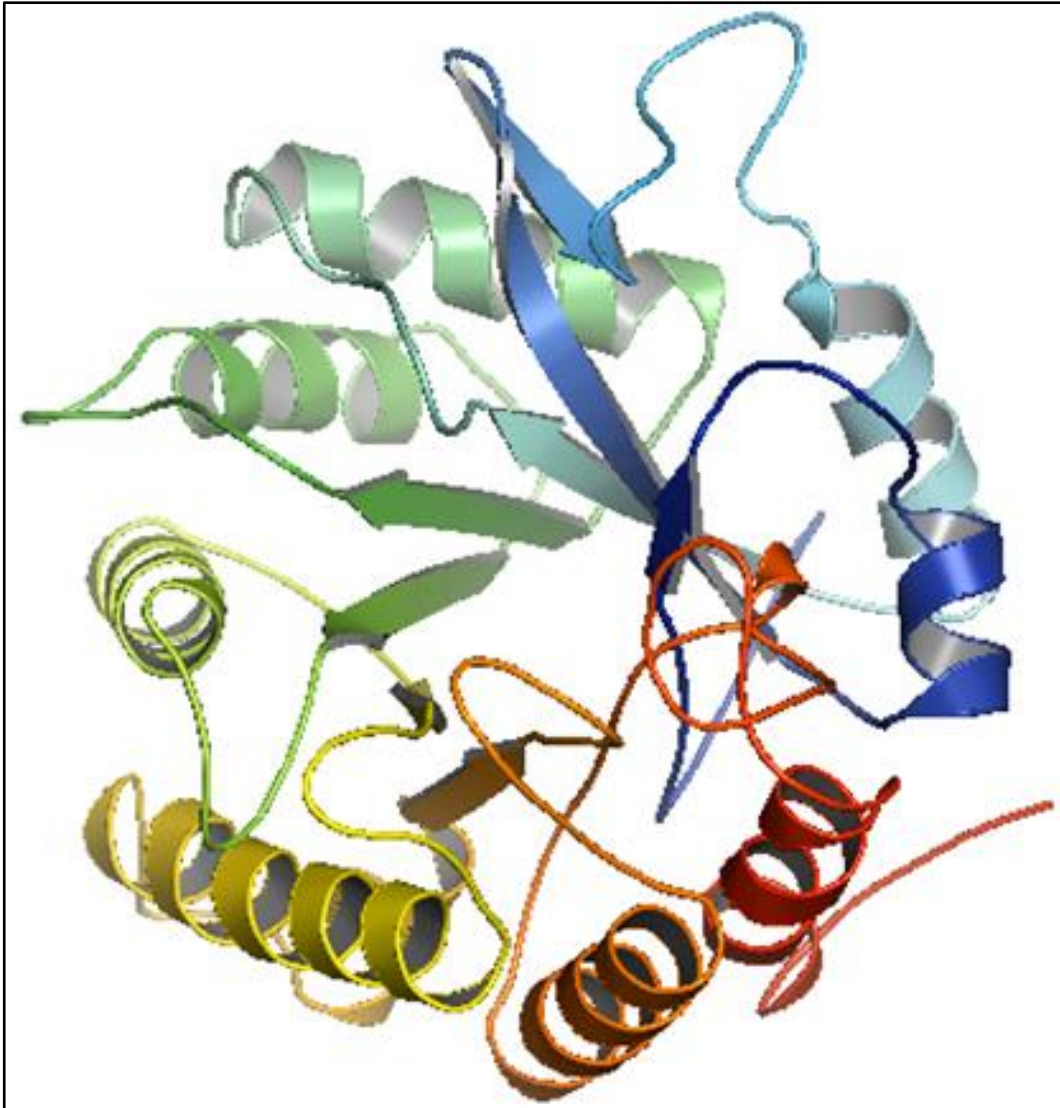
As quitinases são o segundo maior grupo de proteínas antifúngicas, sendo também amplamente difundidas na natureza, com sua distribuição ocorrendo entre diversos organismos, como: insetos, bactérias, plantas superiores, humanos e alguns vírus (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; FERREIRA *et al.*, 2007; LANDIM *et al.*, 2017).

Vários trabalhos, com as mais variadas quitinases foram publicados, ressaltando dentre diversas aplicações para as quitinases, principalmente o potencial fungistático e/ou fungicida de algumas delas. Não somente quitinases de plantas, como algumas quitinases bacterianas, possuem potencial para o controle microbiano (HAMID *et al.*, 2013). Entretanto, ainda há muito a ser investigado.

Em plantas as quitinases são expressas principalmente durante a interação da planta com o patógeno. Entretanto, também são expressas constitutivamente, proporcionando a elas maior resistência a infecções fúngicas (KÁLAI *et al.*, 2008; REGALADO *et al.*, 2000; TOBIAS *et al.*, 2017). A indução da expressão de quitinases pode ocorrer principalmente por agentes patogênicos ou substâncias químicas exógenas. Os próprios oligômeros de GlcNAc liberados pela ação dessas quitinases sobre a quitina dos agentes patogênicos atuam como indutores da expressão de quitinase (YANG *et al.*, 2011).

Em fungos, as quitinases são muito importantes para o metabolismo, *mORF*ogênese e desenvolvimento (HAMID *et al.*, 2013). Em insetos, estas enzimas são responsáveis pela degradação da quitina durante a ecdise, quebrando a cutícula em GlcNAc para que esse último seja utilizado na síntese de uma nova cutícula e pela

Figura 3 - Estrutura terciária de uma glicosil hidrolase da família 18.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Este modelo tridimensional foi criado por cálculos algorítmicos com base em homologia estrutural, usando o servidor M4T 3.0 (FERNANDEZ-FUENTES *et al.*, 2007a, 2007b; RYKUNOV *et al.*, 2009), a partir de estruturas de quitinases conhecidas depositadas no PDB (*Protein Data Base*). A imagem do modelo gerado foi obtida com o auxílio do *software* Pymol 1.7.4.5.

Figura 4 - Estrutura terciária de uma glicosil hidrolase da família 19.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Este modelo tridimensional foi criado por cálculos algorítmicos com base em homologia estrutural, usando o servidor M4T 3.0 (FERNANDEZ-FUENTES *et al.*, 2007a, 2007b; RYKUNOV *et al.*, 2009), a partir de estruturas de quitinases conhecidas depositadas no PDB (*Protein Data Base*). A imagem do modelo gerado foi obtida com o auxílio do *software* Pymol 1.7.4.5.

defesa contra seus próprios parasitas (HAMID *et al.*, 2013). Considerando a grande quantidade de quitina presente nos insetos e seu papel estrutural para eles, o uso de quitinases torna-se bastante interessante contra espécies de insetos, sendo a cutícula e a membrana peritrofica como bons alvos para essas enzimas.

Nas bactérias as quitinases podem atuar na degradação de quitina para a utilização como fonte de energia, carbono e nitrogênio, possibilitando a reciclagem da quitina (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

Com base nas propriedades das quitinases, elas poderiam ser utilizadas em diversos campos como: Agricultura, para o controle de pragas, reduzindo a necessidade do uso de agrotóxicos; na medicina, através do desenvolvimento de novas terapias; e indústria, através da utilização da quitinase para obtenção de subprodutos da quitina, ou a utilização na conservação de alimentos.

1.4 Expressão heteróloga em *E. coli*

Existe um grande número de hospedeiros que pode ser utilizado para a produção de proteínas recombinantes, como, bactérias, leveduras, plantas e animais, porém, a bactéria Gram-negativa *E. coli* tem sido, durante duas décadas, o meio mais popular de produzir proteínas recombinantes, tanto de origem procariótica, como de origem eucariótica (FROMMER; NINNEMANN, 1995; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Isso ocorre principalmente por essa bactéria ser um microrganismo muito bem caracterizado genética, fisiológica e bioquimicamente (CHOI; LEE, 2004; MAKRIDES, 1996), possuir rápido crescimento (duplicação em torno de 20 minutos), capacidade de fermentação contínua e baixo custo de seus insumos (YESILIRMAK; SAYERS, 2009; YIN *et al.*, 2007; BURGESS; DEUTSCHER, 2009). Além disso, a seleção de mutantes é fácil e as células de *E. coli* são altamente eficientes em incorporar DNA exógeno e expressar proteína recombinante com altos rendimentos (CRONAN, 2014).

E. coli pode acumular proteínas recombinantes em até 80% do seu peso seco e sobreviver em uma variedade de condições ambientais (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Apesar de todas as conveniências descritas anteriormente a *E. coli* apresenta algumas desvantagens visto que ela não é um organismo adequado para a produção de proteínas muito grandes e complexas, pois nem sempre ela é capaz de realizar algumas modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação,

acilação e formação de pontes dissulfeto, que muitas vezes são requeridas para o enovelamento apropriado das estruturas secundária, terciária e quaternária ocasionando erros durante o dobramento da proteína, o que a torna biologicamente inativa (BANEYX; GEORGIU, 1990; YIN *et al.*, 2007).

Além do mais, a estabilidade das proteínas recombinantes pode ser reduzida devido à degradação proteolítica. Os altos níveis de proteínas expressas, podem resultar no enovelamento incorreto e retenção de grande parte da proteína em corpos de inclusão, o que requer processos dispendiosos e complicados de renaturação e reenovelamento da proteína para recuperar sua funcionalidade (CHOI; LEE, 2004; MAKRIDES, 1996; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

Segundo Clark (1998), existem alguns códons cujas espécies de tRNA são limitadas em *E. coli* e caso estejam presentes em grande número na sequência da proteína de interesse poder ocasionar problemas. Outro inconveniente da expressão em *E. coli*, é sua tendência em reter a metionina amino-terminal reduzindo a estabilidade da proteína (CHAUDHURI *et al.*, 1999). Por outro lado, existe uma grande variedade de estirpes de *E. coli* com modificações que podem capacitá-la a contornar alguns dos problemas expostos anteriormente (GOMES *et al.*, 2016), como: a formação de pontes dissulfeto, expressão de proteínas a baixa temperatura, bem como, a possibilidade de utilizar distintos vetores, com diferentes promotores, ou peptídeos sinais para o endereçamento da proteína para o meio externo.

A expressão de alguns genes em sistemas heterólogos vem sendo uma excelente ferramenta na produção de insumos de maneira prática e com baixo custo processual. Além disso, é uma ferramenta bastante útil para o estudo de processos biológicos. A expressão heteróloga baseia-se na alteração das sequências em torno de um gene clonado, de modo a fazer com que o organismo hospedeiro produza o produto do gene (YESILIRMAK; SAYERS, 2009).

Existe uma variedade de sistemas de expressão que pode ser útil para diversas aplicações, entretanto a escolha do sistema de expressão ideal depende de uma série de fatores. Estes incluem a facilidade na manipulação do hospedeiro, os níveis de expressão intracelular ou extracelular, tipos de modificações pós-traducionais desejadas e a atividade biológica, bem como, outras características da proteína de interesse e questões de regulamentação na produção de proteínas terapêuticas, além do custo, conveniência, segurança do próprio sistema e destino

final da proteína expressa (BEZERRA, 2008; HODGSON, 1993; WILLIAMSON *et al.*, 2000; YIN *et al.*, 2007).

2 HIPÓTESE

Considerando que *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria de vida livre, saprófita, com ocorrência em diversos ecossistemas tropicais e subtropicais, podemos atribuir a ela grande tolerância a variabilidade de condições para o seu desenvolvimento. Além disso, analisando seu genoma podemos especular que seu sucesso em sobreviver nestes diversos tipos de ambiente, advem do arsenal de moléculas biologicamente ativas codificadas em seu genoma e entre estas biomoléculas estão as quitinases.

Tendo em vista que *C. violaceum* ATCC 12472 é uma estirpe selvagem e que muitas vezes as quitinases são expressas em pequenas quantidades neste tipo de bactéria, que o processo de purificação a partir desta bactéria pode ser dificultado pela presença de pigmentos como, a violaceína, encarecendo e dificultando o processo de purificação, que a expressão heteróloga, na maioria das vezes, é uma alternativa muito mais viável para a produção dessas proteínas e que no caso das quitinases de *C. violaceum* possibilitaria avaliar se os peptídeos sinais presentes nestas quitinases são funcionais em *E. coli*, hipotetizou-se que:

1 - A quitinase codificada pela *ORF CV1440* de *C. violaceum* ATCC 12472 pode ser expressa em *E. coli* na forma ativa e solúvel.

2 - O peptídeo sinal da quitinase codificada pela *ORF CV1440* é funcional em *E. coli* possibilitando o correto endereçamento da proteína recombinante, remoção do peptídeo sinal e a secreção da proteína pela *E. coli*, facilitando a purificação, o que permitiria a caracterização da mesma.

3 - A proteína recombinante codificada pela *ORF CV1440* é ativa contra fungos de importância agrícola.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Clonar e expressar, de forma extracelular, uma quitinase ativa de *C. violaceum* (CV1440) em *E. coli*, purificá-la e caracterizá-la bioquímica e biologicamente, visando suas aplicações para a defesa de plantas contra fungos fitopatogênicos.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência codificadora da quitinase CV1440 de *C. violaceum* no vetor pET303/CT-His;
- Expressar a proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3);
- Purificar a quitinase recombinante codificada pela ORF CV1440 expressa em *E. coli*;
- Realizar a caracterização bioquímica da proteína recombinante;
- Avaliar os efeitos da proteína recombinante sobre os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *F. proliferatum*.

4 MATERIAIS

4.1 *Chromobacterium violaceum*

A estirpe ATCC 12472 de *Chromobacterium violaceum*, foi adquirida através da distribuidora Interlabdist da ATCC (American Type Culture Collection).

4.2 Células para clonagem e expressão

A estirpe utilizada para a clonagem *E. coli* TOP10F' e a estirpe *E. coli* BL21(DE3), utilizada como hospedeiro de expressão, foram adquiridas através da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

4.3 Fungos filamentosos

Os fungos *F. oxysporum*, *F. proliferatum* utilizadoa nos ensaios de inibição de conídios, bem como, *Fusarium sp.* *Colletotrichum sp.* e *Alternaria sp.* foram obtidos da coleção mantida no Laboratório de Patologia de Pos-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical.

4.4 Plasmídeo e enzimas

O vetor de expressão pET303/CT-His, utilizado para expressão em *E. coli* foi adquirido da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Enquanto as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I foram obtidas da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá). A DNA Polimerase Phusion Hot Start, de alta fidelidade e seus tampões, foram adquiridos da Finzymes (Vantaa, Finlândia). A T4 DNA ligase foi adquirida da Promega (Madison, WI, USA). A enzima β -glucuronidase de *Helix pomatia* tipo HP-2, utilizada nos ensaios de atividade quitinásica, foi adquirida da Sigma-Aldrich (USA).

4.5 Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores complementares à sequência codificadora da *ORF CV1440* foram sintetizados pela Eurofins. O kit de purificação de DNA (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up) foi adquirido da Promega (Madison, WI, USA).

Foi utilizado como marcador de massa molecular de proteínas, em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) Low Molecular Weight (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, USA). O meio BDA (batata dextrose ágar) foi obtido da Difco (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Espanha). Os demais reagentes foram todos de grau analítico, adquiridos de empresas locais.

5 METODOS

5.1 Análise da Sequência codificadora da *ORF CV1440*

Os sítios de clivagem do peptídeo sinal pela peptidase sinal foram previstos usando SignalP versão 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011). O ponto isoelétrico teórico (PI) e o peso molecular (MW) foram preditos usando a ferramenta Compute PI / MW no servidor ExPASy Proteomics (GASTEIGER *et al.*, 2005). A busca pela presença de ligações dissulfídicas foi realizada utilizando o servidor web DiANNA 1.1 (FERRÈ; CLOTE, 2006). A presença e delimitação de domínios proteicos foram realizadas utilizando o Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015). Os domínios funcionais foram nomeados seguindo a nomenclatura adotada pelo banco de dados Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) (LOMBARD *et al.*, 2014).

5.2 Amplificação da sequência codificada pela *ORF CV1440*

O DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472 foi isolado utilizando um protocolo baseado em CTAB como descrito anteriormente (GIGOT, 1996) e a sequência de DNA completa da *ORF* de CV1440 foi amplificada por PCR utilizando esse DNA genômico como molde.

A concepção dos primers utilizados na PCR baseou-se na sequência da *ORF* correspondente, que abrange o cromossomo de *C. violaceum* da posição 1,522,798 a 1,524,150 [número de acesso do GenBank: NC_005085.1]. As sequências de primers foram 5'-CCGTCTAGAAATGATGAAAAGGTTTGCCGCC-3' (*forward*) e 5'- CCGCTCGAGGTTGGACAGCACCCACGGG-3' (*reverse*).

Os sítios de endonuclease de restrição (sublinhados) foram incorporados nos iniciadores *forward* (*Xba* I) e *reverse* (*Xho* I), respectivamente, para permitir a manipulação adicional dos produtos de PCR. As amplificações foram realizadas em um volume de reação final de 50 µL contendo 125 ng de DNA genômico, tampão 1X Phusion GC (Finnzymes, Vantaa, Finlândia), MgCl₂ 0,0015 M, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer e 1 U de DNA polimerase de alta-fidelidade Hot Start de Phusion (Finnzymes) de acordo com os seguintes parâmetros de ciclagem: uma etapa de desnaturação inicial (2 minutos a 98 °C) seguida por 33 ciclos de 10 segundos a

98 °C, 30 segundos a 67 °C e 2 minutos a 72 °C. Após o último ciclo, as reações foram incubadas por 5 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% de acordo com o método descrito por Sambrook, (1989).

5.3 Clonagem da sequência codificada pela ORF CV1440 no vetor de expressão pET303/CT-His

O produto de PCR (item 5.2) foi purificado a partir do gel de agarose logo após ser submetido a uma eletroforese, utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, Madison, WI, EUA). Após a purificação, a amostra de DNA (500 ng) amplificado foi digerida com as enzimas de restrição *Xba* I (20 unidades) e *Xho* I (10 unidades) diluídos em tampão Tango 2X [0,066 M de Tris-acetato (pH 7.9 a 37°C), 0,01 M acetato de magnésio, 0,066 M de acetato de potássio e 0.1 mg/ml de BSA] (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada) por 6 horas a 37. A reação foi inativada por aquecimento a 80 °C por 20 minutos. Após a reação de digestão o produto da digestão foi novamente submetido a uma purificação usando o mesmo kit anteriormente utilizado e em seguida o produto da digestão foi ligados ao plasmídeo pET303/CT-His que também havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase juntamente com o tampão fornecido pelo fabricante (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada), nas condições sugeridas pelo fabricante 120 ng de produto de PCR digerido e purificado) e 100 ng de DNA plasmidial (pET303/CT-His digerido e purificado) foram diluídos em tampão Tris-HCl 0,04 M, pH 7,8, contendo MgCl₂ 0,01 M, DTT 0,01 mM e ATP 0,5 mM e foram incubados a 22 °C por 40 minutos.

Os produtos da ligação foram introduzidos em células de *E. coli* TOP10F' quimicamente competentes de acordo com as instruções descritas no manual do fornecedor (Carlsbad, CA, EUA). O DNA plasmidial clonado foi isolado a partir de colônias resistentes aos antibióticos carbenicilina e streptomicina, utilizando o kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), e a presença do inserto foi confirmada por digestão de utilizando novamente as enzimas de restrição combinadas *Xba*I e *Xho*I, como descrito anteriormente, e PCR. O plasmídeo recombinante confirmado foi introduzido em células de *E. coli* BL21(DE3) por

eletroporação e os transformantes foram selecionados em LB-agar contendo 100 mg/mL de carbenicilina.

5.4 Expressão proteica

Clones de células de *E. coli* BL21(DE3) transformados com a construção pET-CV1440 foram selecionados e inoculados em 5 mL de meio 2x YT contendo 100 µg/mL de carbenicilina. Cada uma das culturas foi incubada com agitação vigorosa (180 rpm) a 37 °C por 16 h. Uma alíquota (1 mL) dessa cultura foi então inoculada em 100 mL de meio 2x YT (em um frasco erlenmeyer de 1000 mL) suplementado com 100 µg/mL de carbenicilina e incubado (180 rpm a 37 °C) até a OD⁶⁰⁰ atingir de 0,4 a 0,5. O isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado a uma concentração final de 0,4 mM para induzir a expressão da proteína recombinante. Após 24 horas a 37 °C, a cultura foi centrifugada (6.000 g, 10 minutos, 4 °C) e o sedimento celular e o sobrenadante foram guardados para posterior análise.

5.5 Choque osmótico e lise celular

As proteínas periplasmáticas expressas em células de *E. coli* contendo o plasmídeo pET-CV1440 foram obtidas pelo protocolo de choque osmótico (KOSHLAND; BOTSTEIN, 1980), com pequenas modificações. As células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,02 M (pH 8,0), contendo EDTA 0,0025 M e sacarose a 20% (p/v) até uma DO⁶⁰⁰ = 5,0 e a mistura foi incubada em gelo durante 10 minutos e centrifugada (6,000 g, 10 minutos, 4 °C). O tampão foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,02 M (pH 8,0), contendo EDTA 0,0025 M utilizando o mesmo volume que anteriormente. A suspensão celular foi novamente incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada (6.000 g, 10 minutos, 4 °C), e o sobrenadante [fração periplasmática (FP)] foi transferido para um tubo limpo e armazenado a -20 °C. As células remanescentes foram lisadas ressuspendendo em tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, EDTA 0,002 M, NaCl 0,15 M) contendo 100 µg/mL de lisozima e 0,1% de Triton X-100 (v/v). A suspensão foi incubada a 30 °C por 30 minutos em banho-maria e o DNA genômico bacteriano foi digerido a 30 °C por 30 minutos, utilizando DNase I (Promega) na presença de MgCl₂ 0,008 M e CaCl₂ 0,01

M. O lisado foi centrifugado (12.000 g por 30 minutos a 4 °C) e o sobrenadante [EIS (Extrato Intracelular Solúvel)] foi mantido a -20 °C até o momento do uso.

5.6 Purificação da Quitinase Recombinante

O meio livre de células (MLC) contendo a quitinase recombinante foi dialisado contra água destilada, adicionado sulfato de amônio a 95% de saturação e incubado à temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas. As proteínas precipitadas (F0/95) foram recuperadas por centrifugação (15.000 g, 30 minutos, 4 °C) e ressuspensas em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2) contendo NaCl 1M. A mistura foi incubada por 1 hora a 4 °C e os materiais insolúveis foram então removidos por centrifugação (15.000 g, 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante límpido foi carregado numa coluna de quitina (1,6 x 14 cm), a qual foi preparada a partir de quitina de cascas de caranguejo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A matriz de quitina foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2) contendo NaCl 1M. As proteínas não ligadas foram removidas por lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio, enquanto as proteínas adsorvidas foram eluídas com ácido acético a 0,1 M. Fracções cuja a absorbância a 280 nm fossem superior a 0,050 foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,4) contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,005 M. A mistura foi incubada por 1 hora a 4 °C e os materiais insolúveis foram então removidos por centrifugação (10.000 g, 10 minutos, 25 °C). O sobrenadante límpido foi carregado em Ni-Sepharose® 6 Fast Flow (1,0 x 3 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A matriz foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,4) contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,005 M e a amostra da proteína foi carregada na matriz. As proteínas não ligadas foram eluídas por lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas foram recuperadas por eluição com tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,4) contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,15 M. Fracções com uma absorbância a 280 nm superior a 0,050 foram reunidas e dialisadas contra água deionizada. O material dialisado foi centrifugado (12.000 g, 10 minutos, 4 °C) e concentrado por ultrafiltração utilizando uma membrana de *cut off* de 3 kDa da (Vivaspin 20, GE Healthcare).

5.7 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas solúveis da quitinase recombinante pura (CvChi47) foi estimada medindo a absorvância a 280 nm, de acordo com (GILL; VON HIPPEL, 1989). Para todas as outras amostras, a estimativa do teor de proteína solúvel foi realizada seguindo o protocolo descrito por (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

5.8 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliácrlamida (15% de acrilamida bis-acrilamida) foi realizada sob condições desnaturantes e redutoras de acordo com (LAEMMLI, 1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra [Tris-HCl 0,0625 M, pH6,8 contendo: SDS (dodecil sulfato de sódio) 2% (m/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)], aquecidas a 100 °C por 10 minutos e resfriada a temperatura ambiente.

A corrida eletroforetica foi realizada a 120 V em tampão e corrida Tris-HCl, 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Após a corrida os géis foram submetidos a um protocolo de coramento dos spots, através da metodologia descrita por descrita por Candiano e colaboradores (2004).

5.9 Análise por espectrometria de massa de CvChi47

Uma amostra de 50 µg de proteína, foi dissolvida em bicarbonato de amônio 0,05 M, desnaturado na presença de Rapigest SF a 0,2% (v/v) (Waters, Manchester, Reino Unido) a 80 °C por 15 minutos em banho seco, reduzida com 0,1 M ditioneitol (DTT) a 60 °C durante 60 minutos e alquilada com iodoacetamida a 0,3 M durante 30 minutos a 25 °C no escuro. Posteriormente, as amostras foram digeridas com tripsina (Promega, Madison, WI) durante 12 horas a 37 °C, a proporção de enzims por proteína foi de 1:100 (p/p). Para hidrolisar *Rapigest SF* e parar a digestão, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% na amostra, incubados por 90 minutos a 37 °C e centrifugados (14.000 g por 30 minutos a 6 °C), e o sobrenadante foi transferido para um frasco do tipo Waters Vial Recovery (Waters, Manchester, Reino Unido).

A cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) para separação de peptídeos trípticos foi realizada usando um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Manchester, UK) equipado com uma coluna de fase reversa HSS T3 C18 (1,8 μm , 75 μm x 20 mm) equilibrada com ácido fórmico 0,1% (v/v) diluído em água. A eluição dos peptídeos trípticos foi realizada a uma taxa de fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{minutos}$, utilizando uma solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) diluído em acetonitrila. As frações cromatográficas obtidas foram submetidas a análise de espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI-LC-MS/MS), utilizando um espectrômetro de massa Synapt G1 HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido).

Os dados do ESI-LC-MS/MS foram processados, e os peptídeos foram identificados utilizando-se o banco de dados (UniProtKB).

5.10 Ensaio de atividade quitinolítica

A atividade da quitinase foi determinada de acordo com o método descrito por Boller (1992). A quitina coloidal foi escolhida como substrato e sua preparação seguiu o método descrito por Molano e colaboradores (1977), utilizando anidrido acético não radioativo. Os oligômeros de quitina solúveis libertados pela hidrólise da quitina coloidal foram separados da quitina coloidal por centrifugação e o sobrenadante foi submetido a uma segunda reação enzimática para clivagem completa por uma β -glucuronidase (BOLLER *et al.*, 1983). A mistura reacional contendo 250 μL de quitina coloidal a 1% p/v e 250 μL de solução de amostra foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por uma hora. A reação foi interrompida fervendo por 5 minutos em banho-maria, resfriada em banho de gelo e então centrifugada (10.000 g , 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 minutos), e 300 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de microcentrífuga limpo contendo 10 μL de 10 U/mL de β -glucuronidase (EC 3.2.1.31) tipo HP-2 (Sigma-Aldrich). As reações foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h, fervidas por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo. Foram adicionados tampão acetato de sódio a 0,05 M, pH 5,2 (190 mL) e 100 mL de tetraborato de potássio a 0,6 M e a mistura reacional novamente fervida durante 5 minutos e resfriada em banho de gelo durante 5 minutos. Em seguida, 1,0 mL de p-dimetilaminobenzaldeído a 5% (p/v) (DMAB, Sigma-Aldrich) preparado em HCl 0,7 M (diluído em ácido acético a 100%) foi adicionado e a absorbância a 585 nm foi determinada.

A quantidade de GlcNAc liberada foi estimada a partir de uma curva padrão preparada com concentrações variadas (100-600 μM) de GlcNAc (REISSIG; STORMINGER; LELOIR, 1955). Uma unidade (U) da atividade da quitinase foi definida como a quantidade de amostra necessária para liberar 1 nmol de GlcNAc/mL/h a 37 °C.

5.11 Temperatura e pH ótimo da atividade enzimática

A temperatura ótima para a atividade da quitinase foi determinada pela incubação da CvChi47 purificada em quitina coloidal a 1% p/v como substrato a várias temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 1 hora em pH 5,2. O restante do ensaio foi realizado sob as condições padrão estabelecidas anteriormente. Para determinar o pH ótimo da atividade enzimática CvChi47 foi incubada em conjunto com 1% p/v de quitina coloidal em diferentes sistemas tampão: 0,05 M glicina-HCl (pH 2,0 e 3,0), 0,05 M de acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), 0,05 M fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0), Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e glicina-NaOH 0,05 M (pH 9,0 e 10,0) durante 1 hora a 60 °C. O restante do ensaio foi realizado sob condições de ensaio padrão. Para as condições de temperatura e pH, a atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em uma determinada temperatura ou valor de pH.

5.12 Efeitos do pH, temperatura e íons metálicos sobre a atividade quitinásica

Para avaliar o efeito do pH na estabilidade enzimática, o CvChi47 foi diluído nos mesmos sistemas tampão utilizados na secção anterior a uma concentração final de 100 ng/ μL e a atividade da quitinase residual foi determinada em condições de ensaio padrão. O efeito da temperatura na estabilidade enzimática foi avaliado pela incubação da proteína (100 ng/ μL em água destilada) em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 1 hora em banho-maria. Após o tratamento térmico, as amostras foram armazenadas a - 20 °C até que a atividade da quitinase remanescente fosse medida usando condições padrão de ensaio. Em ambos os casos (temperatura e pH) a atividade relativa da quitinase foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em uma determinada temperatura ou valor de pH. O efeito de íons metálicos [Al^{3+} (AlCl_3), Ba^{2+} (BaCl_4), Cd^{2+} (CdCl_2), Ca^{2+}

(CaCl₂), Cs⁺ (CsCl), Co²⁺ (CoCl₂), Cu²⁺ (CuS₂O₈), Sr²⁺ (SrCl₂), Fe²⁺ (FeSO₄), La³⁺ (LaCl₃), Li⁺ (LiOH), Mg²⁺ (MgCl₂), Mn²⁺ (MnCl₂), Hg²⁺ (HgCl₂), Ni²⁺ (NiCl₂), Ag⁺ (AgNO₃), Rb⁺ (RbCl) e Zn²⁺ (ZnSO₄)], sobre a atividade da enzima, foi testado sob condições padrão, incluindo o determinado íon metálico a ser avaliado por reação (0,025 M) a ser testado na mistura reacional. A atividade hidrolítica residual foi determinada e expressa como uma porcentagem da atividade registrada na ausência do íon.

5.13 Efeito de compostos químicos na estabilidade da atividade enzimática

Os seguintes reagentes químicos: 5% (p/v) ditiotretitol (DDT), 5% (v/v) de β-mercaptoetanol, 0,5% (p/v) SDS e 0,005 M de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) foram adicionados individualmente às misturas de reação para avaliar a atividade de quitinase, a fim de verificar os efeitos que eles podem causar sobre a ação de CvChi47 sob condições de ensaio padrão. A atividade hidrolítica residual foi determinada e expressa como uma porcentagem da atividade registrada na ausência de cada reagente.

5.14 Atividade endoquitinolítica e exoquitinolítica da CvChi74

Para mensurar a atividade endoquitinásica e a atividade exoquitinásica da quitinase CvChi47 foi realizado um ensaio de acordo com as condições padrão estabelecidas anteriormente nos itens 5.10 e 5.11. A diferença aqui, foi a omissão da utilização da enzima β-glucuronidase para a verificação da atividade exoquitinásica. Neste caso a β-glucuronidase foi primeiro inativada para depois ser adicionada a mistura reacional para a verificação da atividade exodoquitinásica.

5.15 Inibição de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por CvChi47

Este ensaio teve o objetivo de avaliar se a proteína CvChi47 possui efeito deletério sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Inicialmente, um pequeno disco de 5 mm de diâmetro de meio de cultura, contendo micélios de cada um dos fungos, foi inoculado em cada uma das placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura BDA. Após a inoculação do fungo na placa de Petri os tratamentos

[controle positivo, controle negativo e amostras da proteína CvChi47 (100 µg e 200 µg)] foram aplicados em poços que situavam-se equidistantes do disco contendo o fungo. Após 7 dias as placas foram fotografadas e as imagens foram avaliadas.

5.16 Inibição da germinação e de crescimento micelial de esporos de fungos fitopatogênicos por CvChi47

A preparação da suspensão conídial foi realizada quando o crescimento dos fungos atingiu o diâmetro total das placas, o que ocorreu 10 dias após a repicagem. Adicionou-se um volume de 10 ml de água destilada estéril às placas e depois raspou-se a cultura com o auxílio de uma espátula de Drigalski. O material obtido foi então filtrado em gaze de algodão para remover fragmentos de hifas. As contagens de conídios foram realizadas na câmara de Neubauer e diluídas até a concentração de conídios de $4,0 \times 10^5$ conídios/mL. A ação da enzima na inibição da germinação dos conídios foi testada de acordo com a metodologia descrita por Ji e Kuć (1996), com algumas modificações. Alíquotas de 10 µL da suspensão de conídios ($4,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram incubadas com 10 µL de CvChi47 (1 mg/mL) diluídas em água destilada estéril em placas tipo Rodac. Estas placas foram mantidas em câmara de Desenvolvimento de Organismos Biológicos (DBO) com fotoperíodo e temperatura controladas (28 °C, 12 horas de luz/12 horas de escuro). Como controle negativo utilizou-se água destilada estéril, sem a presença da proteína. Após o período de germinação, os conídios foram observados sob um microscópio de luz (Axio Imager A2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha). As imagens foram capturadas usando uma câmera Axio Cam AX10 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Aqueles conídios cujo tubo germinativo apresentou um tamanho superior a duas vezes o tamanho dos próprios conídios foram considerados germinados. As experiências foram realizadas em triplicata. Um ensaio similar foi conduzido no qual a suspensão de conídios ($4,0 \times 10^5$ conídios/mL) e de CvChi47 (1mg/mL) foram incubadas por duas horas a 28 °C em água destilada estéril. Os controles foram feitos por incubação de conídios com água destilada estéril sem a presença da proteína. As amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio PDA de tal forma que o lado esquerdo das placas continha a proteína e conídios, enquanto o lado direito continha os conídios e água (controle). O crescimento micelial foi monitorado por 7 dias e fotografado ao final do experimento.

5.17 Análises de microscopia de força atômica

Experimentos de microscopia de força atômica foram conduzidos para avaliar detalhadamente as possíveis alterações morfológicas causadas por CvChi47 na superfície dos conídios de *F. proliferatum* no quais a quitinase foi mais efetiva. Uma suspensão de 25 µL de conídios ajustada a 2×10^4 conídios/mL foi incubada com 25 µL de CvChi47 (10,82 µM ou 0,5 mg/mL) por 6 horas a 28 °C. Conídios do controle foram incubados com água estéril ultrapura. As células foram então lavadas três vezes com água estéril por centrifugação a 3000 g por 5 minutos a 4 °C e o sedimento de conídios resultante foi ressuscitado em 50 µL de água estéril. Um volume de 10 µL da suspensão de conídios foi colocado em uma lâmina de vidro e seco em um dessecador por 10 minutos.

6 RESULTADOS

6.1 Análises da sequência codificada pela ORF CV1440

A ORF (CV1440) de *C. violaceum* ATCC 12472 codifica uma proteína glicosídeo hidrolase transmembranar putativa [GenBank: AAQ59115.1] pertencente família GH18 com 450 resíduos de aminoácidos. A proteína tem uma estrutura modular (FIGURA 5) e é composta por um peptídeo sinal de 25 resíduos em sua extremidade N-terminal, um domínio catalítico (CatD; resíduos 26 a 331), seguido por uma região de ligação rica em Gly/Asn (resíduos 332 a 361), dois domínios de ligação a quitina [ChBD; resíduos 362 a 400 (ChBDCvChi47A) e 410 a 446 (ChBDCvChi47B) respectivamente], separados por um ligante rico em Gln/Gly (resíduos 401 a 409) na regi C-terminal e uma extensão C-terminal (resuos 447 - 450). A presença do peptídeo sinal putativo (FIGURA 6) sugere que a proteína é sintetizada como uma pré-proteína que presumivelmente é reconhecida pela via de secreção geral (Sec) de *E. coli*. A proteína é aqui referida como CvChi47 (para o precursor da quitinase de 47,4 kDa de *C. violaceum*). O pI e a massa molecular prevista foram 8,1 e 47,4 kDa, respectivamente.

O CvChi47 é composto por 6 resíduos Cys na sua sequência primária, que formam 3 ligações dissulfeto, de acordo com a previsão do servidor Web DiANNA 1.1. Os resíduos de cisteína supostamente envolvidos nestas interações são: ⁶⁵Cys-Cys⁴³⁰; ¹¹⁷Cys-Cys³¹⁶ e ³⁰⁵Cys-Cys⁴²¹.

O domínio catalítico completo (CatD) de CvChi47 abrange 68% do comprimento total de sua sequência de aminoácidos e contém seis resíduos conservados [¹³⁶**LSRIDFDIE**¹⁴⁴; os resíduos conservados são destacados em negrito] dos oito resíduos de aminoácidos conservados que constituem um padrão de assinatura do local ativo, [LIVMFY] - [DN] -G- [LIVMF] - [DN] - [LIVMF] - [DN] -XE (Número de acesso PROSITE PS01095), tipicamente encontrado em quitinases da família GH18. O domínio de ligação de quitina de CvChi47 é um membro da superfamília ChiBD tipo 3 (ChtBD3) e pertence à família e de módulos de ligação a carboidratos (CBM5), de acordo com a classificação do CAZy. Dois dos três motivos de consenso que são conservados em domínios catalíticos de GH18 quitinases foram encontrados em CvChi47 (FIGURA 5). Estes motivos estruturais estão envolvidos na

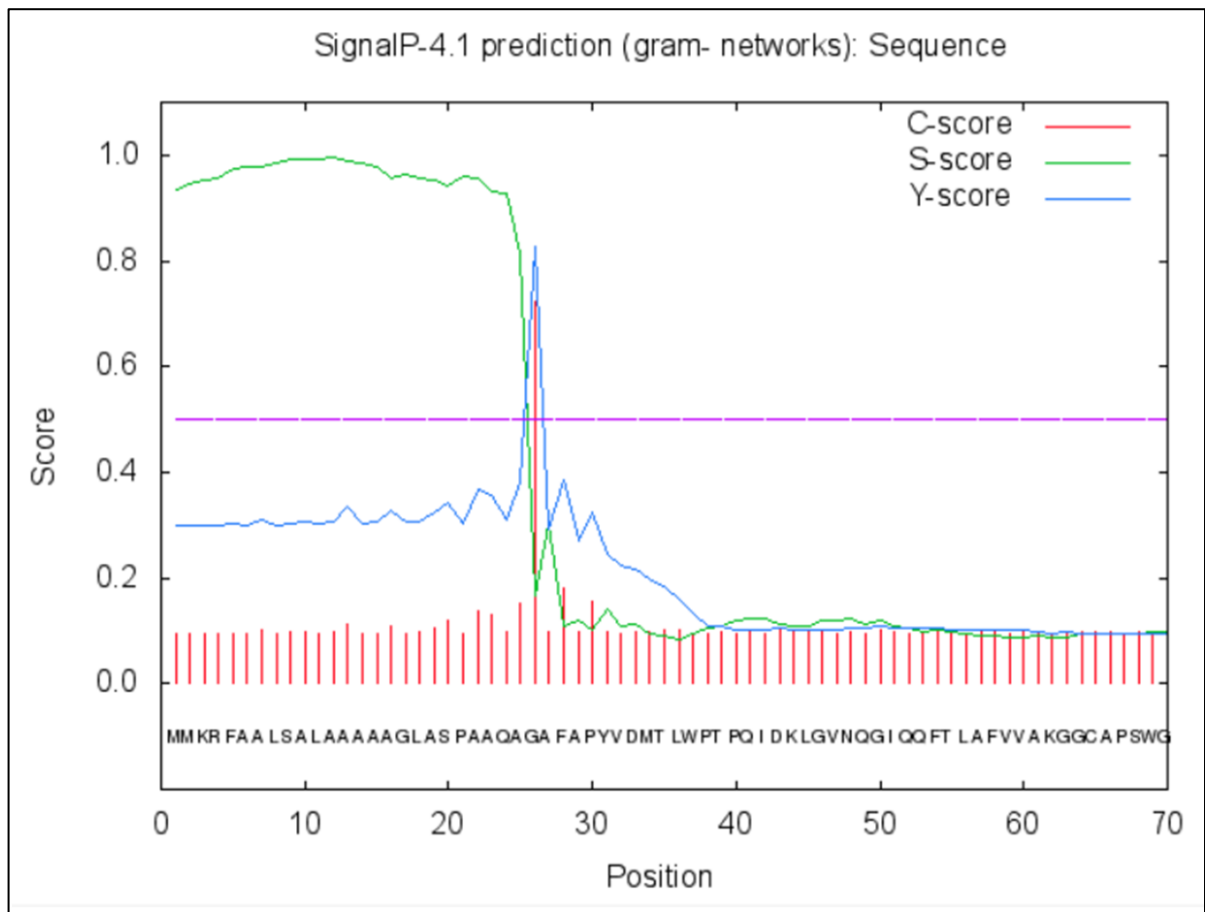
Figura 5 - Estrutura primária da proteína CvChi47 codificada pelo ORF CV1440 de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A sequência de aminoácidos de CvChi47 é mostrada, destacando o peptídeo sinal N-terminal (dentro da caixa colorida), o sítio catalítico (em azul), o ligante rico em Gly/Asn (em cinza), dois sítios de ligação a quitina (em vermelho) separados por um ligador rico em Gln/Gly (em amarelo) e a extensão em C-terminal (em preto). A região n-inicial do peptídeo sinal está destacada em caixa azul (aa 1-4), a região h-central do peptídeo sinal esta destacada em caixa laranja (aa 5-16), e a região c-terminal do peptídeo sinalo está destacada em caixa verde. Os símbolos acima da sequência do peptídeo sinal referem-se a resíduos carregados positivamente (+) na região n, aos resíduos Ala (-3 e -1) e ao sítio de clivagem para remoção do peptídeo sinal pela Spase do tipo I (seta). Os limites entre essas regiões foram determinados pelo programa SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011). Motivos estruturais do sítio catalítico que estão envolvidos na ligação do substrato são encaixotados com linha tracejada, e os motivos estruturais do sítio catalítico envolvidos na catálise estão encaixotados na linha contínua de preto.

Figura 6 - Gráfico gerado pelo SignalP 4.1.



Fonte: O gráfico foi gerado pelo servidor SignalP, através da submissão da sequência de aminoácidos da CvChi47.

ligação do substrato (⁶⁸SWGG⁷¹ e ¹⁰⁴SFGG¹⁰⁷) e na catálise (¹³⁹xD2xD3xE¹⁴⁴; os números sobrescritos referem-se à sequência de aminoácidos CvChi47).

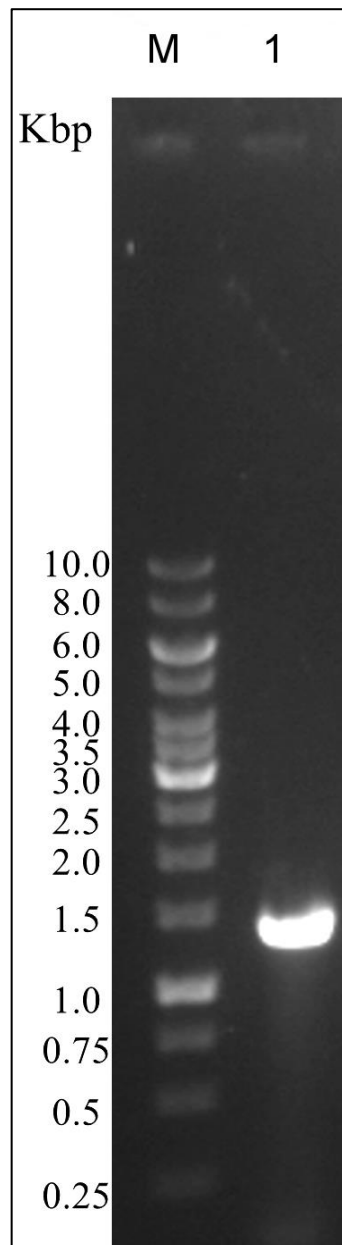
6.2 Expressão proteica recombinante

Após a amplificação e purificação da *ORF CV1440* foi obtido um produto de PCR puro com tamanho aproximado de 1350 pb (FIGURA 7), que foi ligado ao plasmídeo pET303-CT-His com sucesso como mostrou a confirmação da transformação através da digestão de uma amostra de plasmídeo extraído e purificado a partir de uma colônia transformada (FIGURA 8). Após a inoculação de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET303-Cv1440 foram observadas numerosas colônias no meio sólido após 16 horas da inoculação. A expressão da proteína recombinante CvChi47 foi conseguida adicionando-se IPTG ao meio de cultura. O maior nível de atividade quitinolítica foi detectado na fração do meio livre de células (758,0 U) (TABELA 1), após 24 horas de indução, enquanto apenas os menores níveis de atividade, 2,2% e 0,1% da atividade quitinolítica total MLC, foram observados para a fração (fração periplasmática) FP e estrato intracelular solúvel (EIS), respectivamente. Estes resultados sugerem que a secreção de CvChi47 pelas células de *E. coli* foi dirigida pelo seu peptídeo sinal nativo, estando a maior parte da proteína ativa presente na fração MLC (FIGURA 9).

6.3 Purificação da CvChi47

A aplicação da CvChi47 a partir da fração MLC numa cromatografia de afinidade com matriz de quitina resultou em dois picos, P1 e P2 correspondendo às proteínas não adsorvidas e proteínas adsorvidas, respectivamente (FIGURA 10). Quando analisado por SDS-PAGE sob condições desnaturante e redutora, observou-se que uma banda de aproximadamente 46,1 kDa, que presumimos ser a quitinase recombinante, estava predominantemente presente em P2 (FIGURA 11). Além disso, nenhuma atividade quitinolítica foi detectada em P1, mas apenas em P2 mostrando que a ligação da proteína recombinante CvChi47 à matriz de quitina foi muito efetiva. Este passo de cromatografia resultou num fator de purificação de 8,29x (Tabela 1) e aproximadamente 86,1% da atividade quitinolítica total que foi previamente detectada na fracção CFM foi recuperada. A aplicação da fração P2 numa cromatografia de

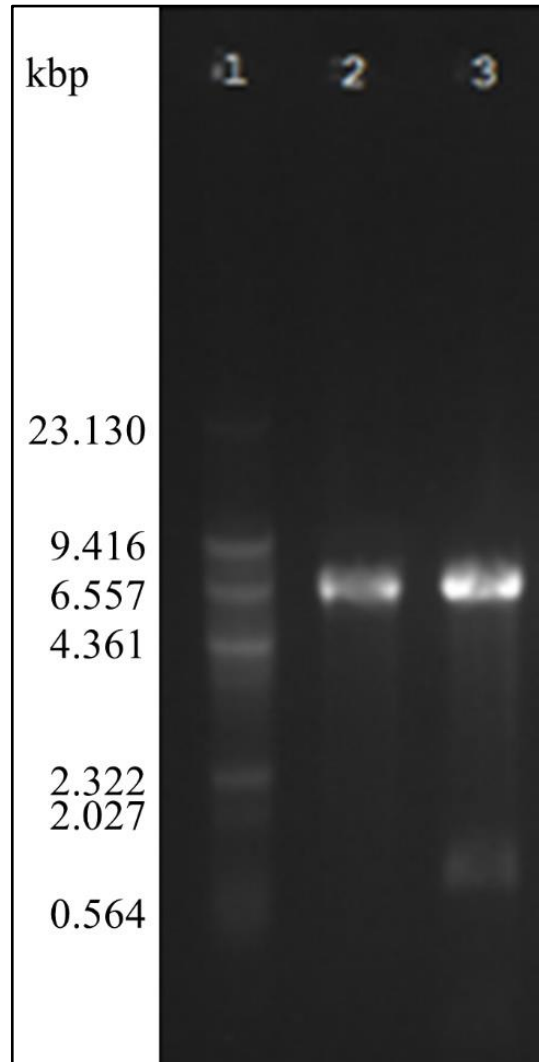
Figura 7 - Perfil eletroforetico do produto de amplificação por PCR da *ORF CV1440*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Gel de agarose 1%. O produto de PCR foi obtido pela amplificação do DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472 PCR utilizando os *primers* descritos na seção 5.2. Raia M: marcadores de tamanho de DNA; Raia 1: produto de PCR (~ 1350 pb).

Figura 8 - Perfil eletroforetico do produto de digestão do plasmídeo recombinante pET-CV1440.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O plasmídeo recombinante foi digerido pelas enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I. Raia 1: marcadores de tamanho de DNA; Raia 2: pET303/CT-His (~ 5370 pb); Raia 3: plasmídeo recombinante pET-CV1440 digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Xho* I (~ 5370 e 1350 pb, respectivamente).

TABELA 1 - Resumo da purificação.

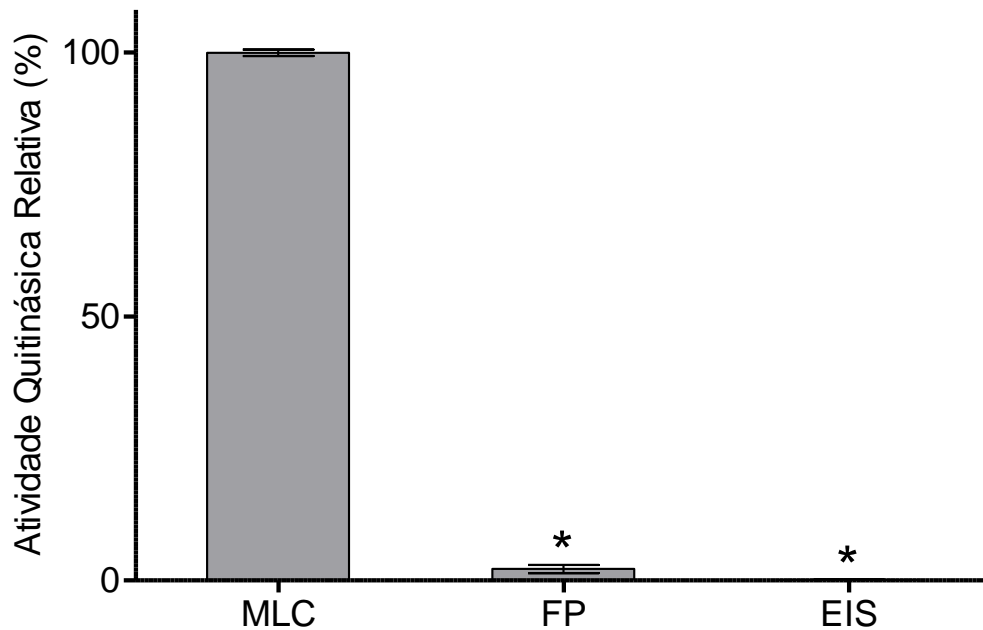
Fração	Proteína total (mg)	Atividade total (U*)	Atividade específica (U*/mg de proteína)	Fator de purificação
CFM	11.6	758.0	65.3	1
P2	1.4	652.7	466.2	8.29
P2.2	0.3	239.9	979.7	38.67

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dados obtidos a partir de 100 ml de cultura (Induzido com 0,4 mM de IPTG a 37 ° C durante 24 horas).

* 1U = a 1 nmol GlcNac / hora.

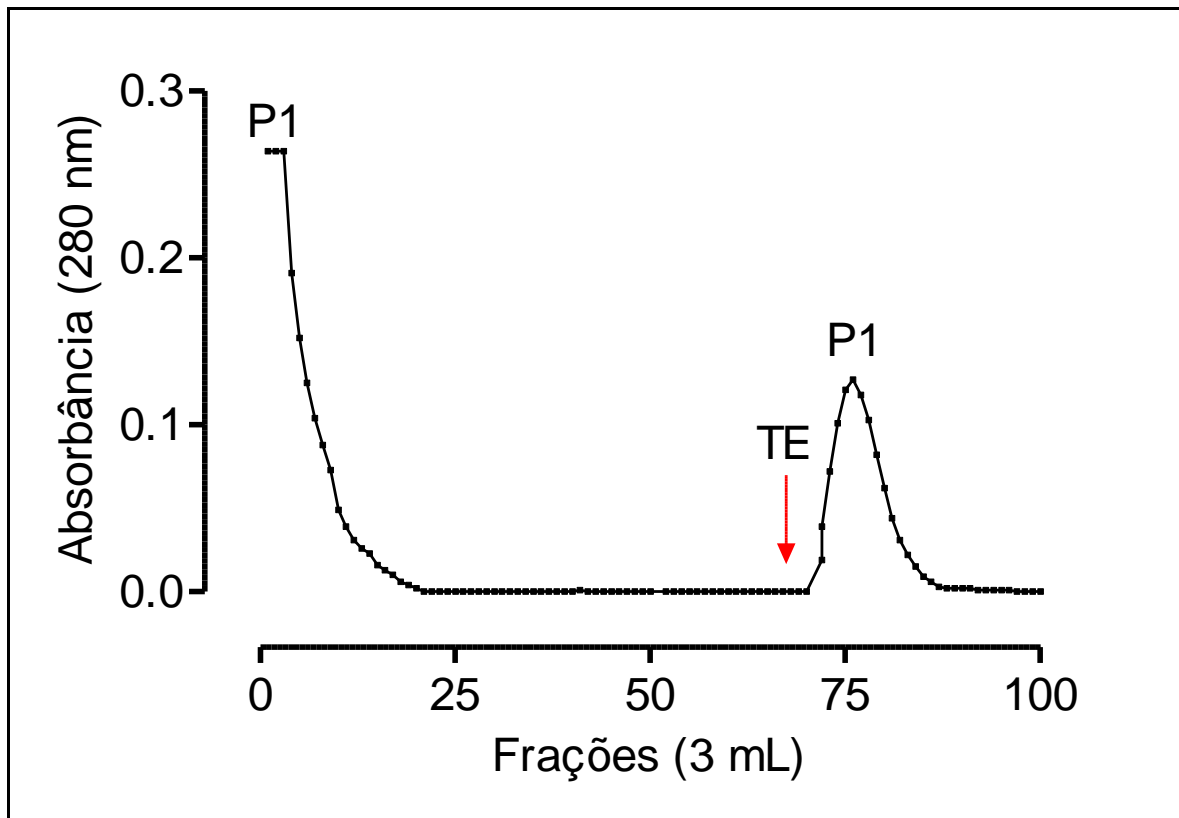
Figura 9 - Atividade quitinolítica da fração subcelular de células *E. coli* BL21(DE3) contendo o vector de expressão recombinante pET303CV1440-His.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

CFM: Cultura livre de células. FP: Fração periplasmática. SCL: Lisado celular solúvel. A obtenção das frações e a mensuração da atividade quitinolítica foram descritas na seção Métodos. Dados representam médias \pm desvio padrão ($n = 3$); As médias que não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) um do outro pelo teste de Tukey são indicados por um asterisco.

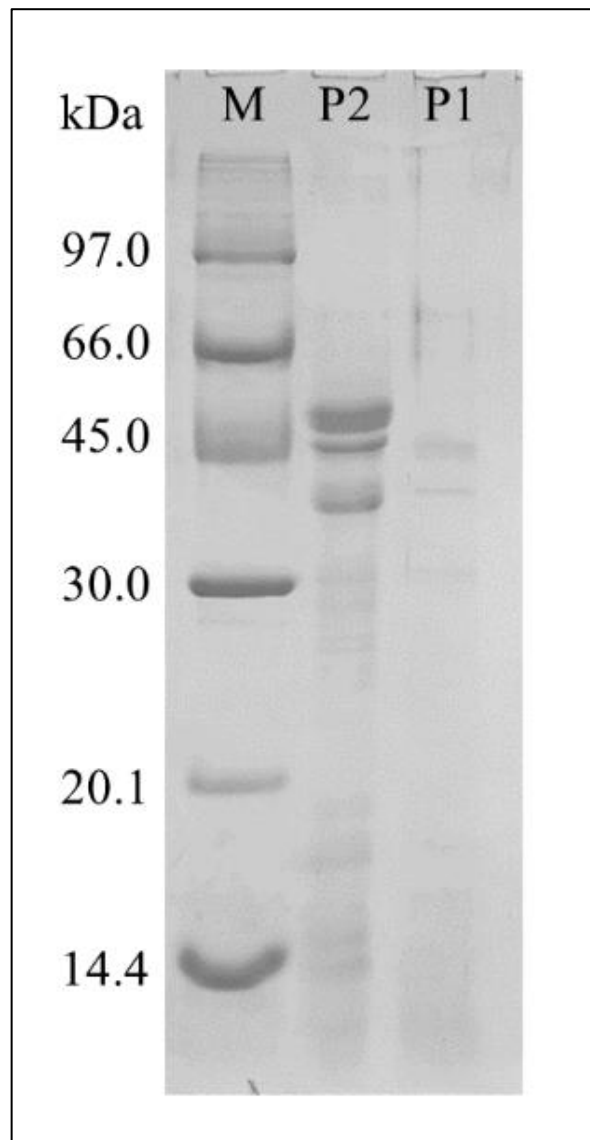
Figura 10 - Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Proteínas do meio de cultura livre de células equivalente a 500 mL de cultura foram carregadas na matriz, que foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2) contendo NaCl 1M. Após a lavagem das proteínas não ligadas (P1), a fração contendo a proteína recombinante (P2) foi eluída com ácido acético 0,1 M (TE). O fluxo da fase móvel da coluna foi de 0,5 mL/minuto.

Figura 11 - Perfil eletroforetico da purificação parcial da CvChi47.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (15%). A eletroforese foi realizada sobre condições desnaturante e redutora. Proteínas do meio de cultura livre de células equivalente a 500 mL de cultura foram carregadas na matriz, que foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2) contendo NaCl 1M. Após a lavagem das proteínas não ligadas (P1), a fração contendo a proteína recombinante (P2) foi eluída com ácido acético 0,1 M. Marcadores de peso molecular (M).

afinidade a níquel imobilizado resultou em dois picos cromatográficos, P2.1 e P2.2 correspondendo às proteínas não adsorvidas e adsorvidas, respectivamente (FIGURA 12). Quando analisado por SDS-PAGE sob condições desnaturante e redutora, observou-se a presença de uma única banda de aproximadamente 46,1 kDa, que presumimos ser a quitinase recombinante pura (FIGURA 13). Além disso a atividade quitinolítica foi detectada apenas em P2.2 (Tabela 1). Este passo de cromatografia resultou num fator de purificação de 38,67x (Tabela 1) e aproximadamente 31,6% da atividade quitinolítica total que foi previamente detectada na fracção de CFM foi recuperada.

O rendimento da proteína recombinante purificada foi de 3 mg por litro de cultura induzida, o que representa aproximadamente 2,57% do teor de proteína solúvel total no CFM (Tabela 1).

6.4 Caracterização, avaliação do pH, temperatura, íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade quitinasica da CvChi47

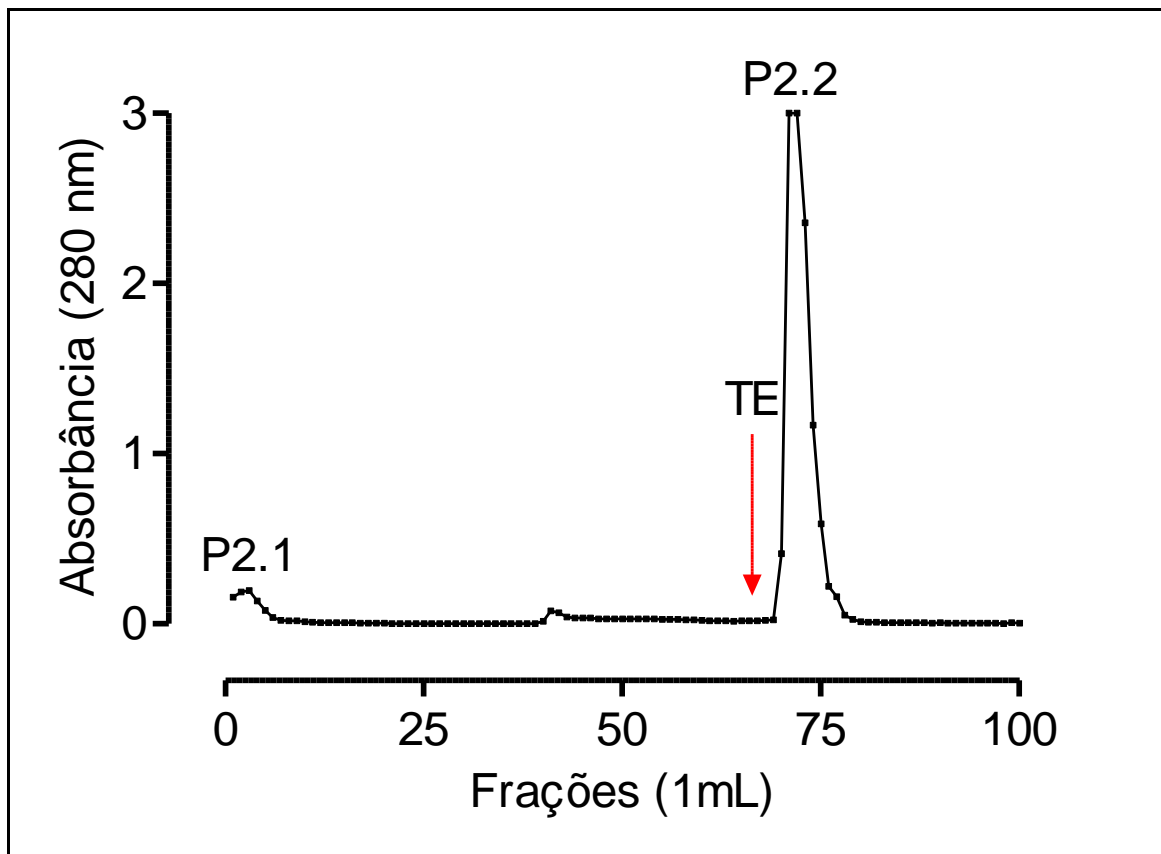
SignalP 4.1 previu a presença de um peptídeo sinal na extremidade N-terminal de CvChi47. A suposta clivagem foi caracterizada como pertencente ao tipo I e presente entre os resíduos Ala₂₅-Gly₂₆, com índice de clivagem de $D = 0,888$ (FIGURA 6).

CvChi47 apresentou atividade quitinolítica em uma ampla faixa de pH (pH 2 a 9), com uma atividade ótima registrada em pH 5. A hidrólise significativa da quitina também foi detectada em pH 4 (81,7%) e 6 (64,8%) (FIGURA 14). A enzima também foi capaz de recuperar parte de sua atividade quando incubada por 3 horas a valores de pH variando de 2-10 e então retornou a pH 5. As recuperações mais pronunciadas detectadas foram de pH 4, 5 e 6 em que CvChi47 apresentou 68,18; 97,20 e 84,16% de atividade quitinolítica, respectivamente (FIGURA 14).

A temperatura ótima detectada para o CvChi47 pura foi de 60 °C. Além disso, a enzima recombinante foi considerada uma proteína termoestável, dado que retém aproximadamente 53,7% de sua atividade mesmo após ter sido aquecida a 100 °C por 1 h (FIGURA 15).

A adição de 0,025 M dos cátions Cu²⁺, Fe²⁺, La³⁺ e Hg²⁺ causou uma diminuição de mais de 50% da atividade quitinolítica da CvChi47. Os metais Cu²⁺ e Hg²⁺ diminuíram a atividade até 99,2% e 100%, respectivamente. Não houve aumento

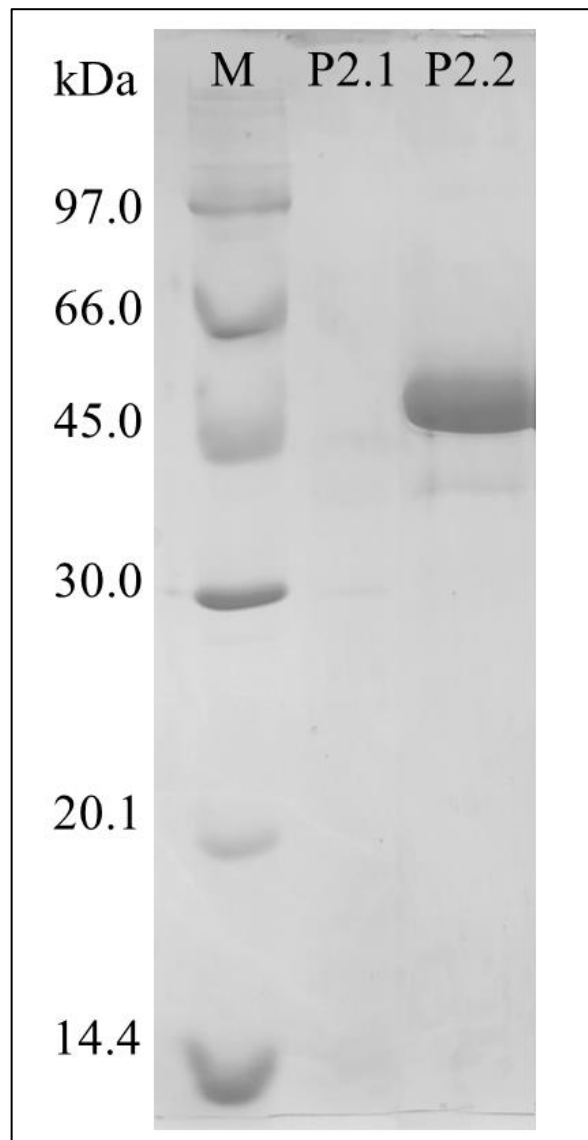
Figura 12 - Perfil cromatográfico da CvChi47 em matriz de Ni-sepharose.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Purificação de CvChi47 recombinante utilizando a fração P2 da cromatografia de matriz de quitina (120 mg). A fração P2.1 foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M, e imidazol 0,005 M e a fração P2.2 foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,15 M. Fluxo da fase móvel da coluna foi de 0,5 mL/minuto.

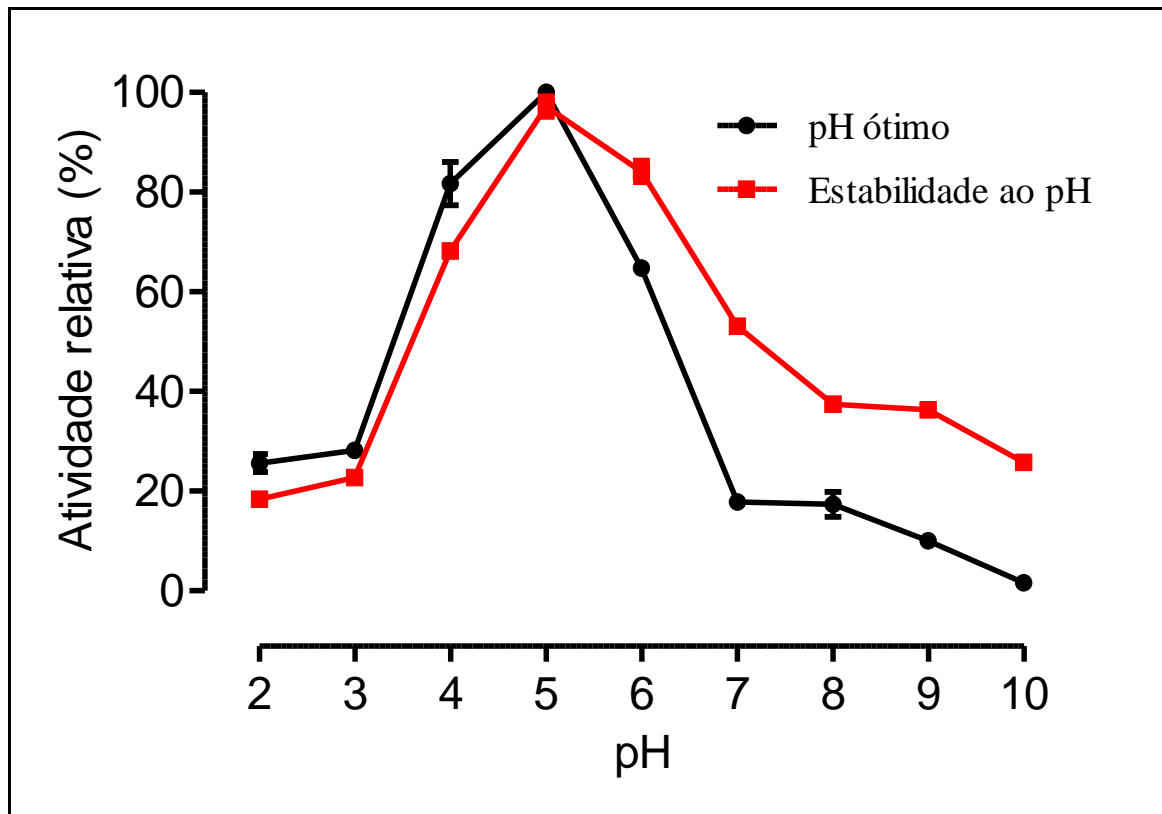
Figura 13 - Perfil eletroforetico da CvChi47 pura.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

M: marcadores de peso molecular; P2.1: proteínas que não se ligaram matriz; P2.2 CvChi47 pura (3 μ g). A fração P2 da cromatografia de matriz de quitina (120 mg). Foi submetida a uma cromatografia de afinidade a níquel imobilizado em Sephatose, a fração P2.1 foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M, e imidazol 0,005 M e a fração P2.2 foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,15 M. Fluxo da fase móvel da coluna foi de 0,5 mL/minuto. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada sob condições desnaturantes e redutoras.

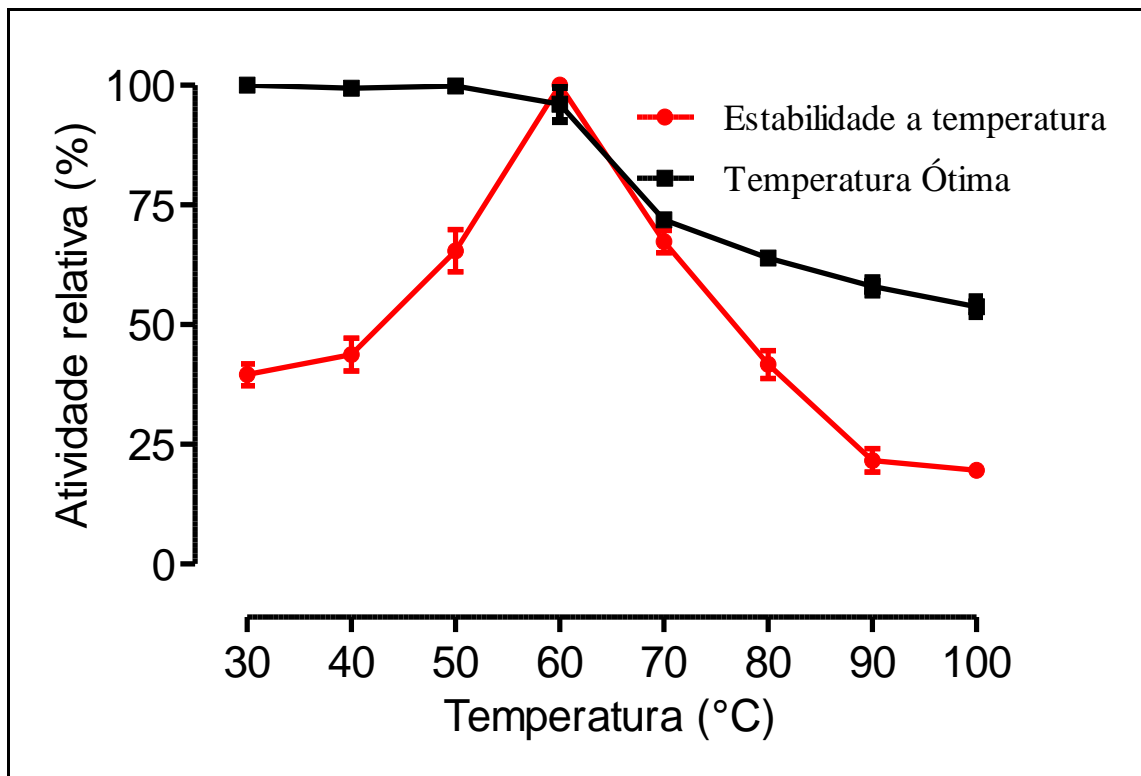
Figura 14 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da quitinase.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O efeito da variação de pH sobre a atividade quitinolítica da CvChi47 foi analisado com amostras da proteína recombinante (100 ng/ μ L), e a atividade hidrolítica foi determinada usando a quitina coloidal como substrato. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em cada experimento. Os dados representam média \pm desviopadrão (n = 3).

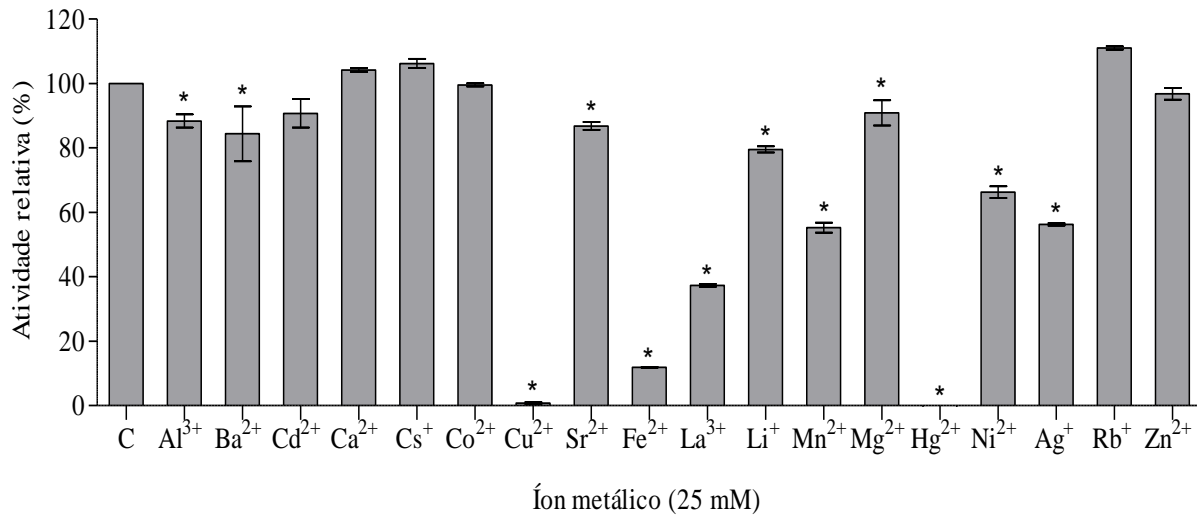
Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da quitinase.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito da variação de temperatura na atividade e estabilidade da quitinase CvChi47 foi analisado com amostras da proteína recombinante (100 ng/ μ L), e a atividade hidrolítica foi determinada usando a quitina coloidal como substrato. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em cada experimento. Os dados representam média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Figura 16 - Efeito de íons metálicos na atividade da quitinase.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O efeito dos íons metálicos sobre a atividade da quitinase CvChi47 foi analisado com amostras da proteína recombinante (100 ng/μL), e a atividade hidrolítica foi determinada usando a quitina coloidal como substrato. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em cada experimento. Os dados representam média ± desvio padrão (n = 3); Dados representam médias ± SEM (n = 3). As media significativamente diferentes ($P < 0,05$) do controle pelo teste de Dunnett são indicados por um asterisco.

significativo na atividade quitinolítica de CvChi47 devido à adição de íons metálicos (FIGURA 16). A presença de 0,005M EDTA não influenciou a atividade quitinolítica. A incubação de CvChi47 com os químicos 5% DTT, 5% β -mercaptoetanol e 0,5% SDS diminuiu a atividade quitinolítica em 50,7%, 33,3% e 100%, respectivamente (FIGURA 17)

6.5 Identificação de peptídeos por espectrometria de massa (MS)

Todos os peptídeos identificados através da espectrometria de massa (MS) foram considerados pertencentes à proteína recombinante CvChi47 (Tabela 2), uma vez que estavam em completa conformidade com a seqüência de aminoácidos deduzida do DNA genômico de *C. violaceum* (ORF CV1440). A alta pureza da proteína recombinante também foi verificada e não foram detectadas seqüências contaminantes em experimentos de MS. A porcentagem de cobertura relativa à seqüência de aminoácidos deduzida foi de 77,4% (FIGURA 19).

6.6 Atividade antifúngica da quitinase

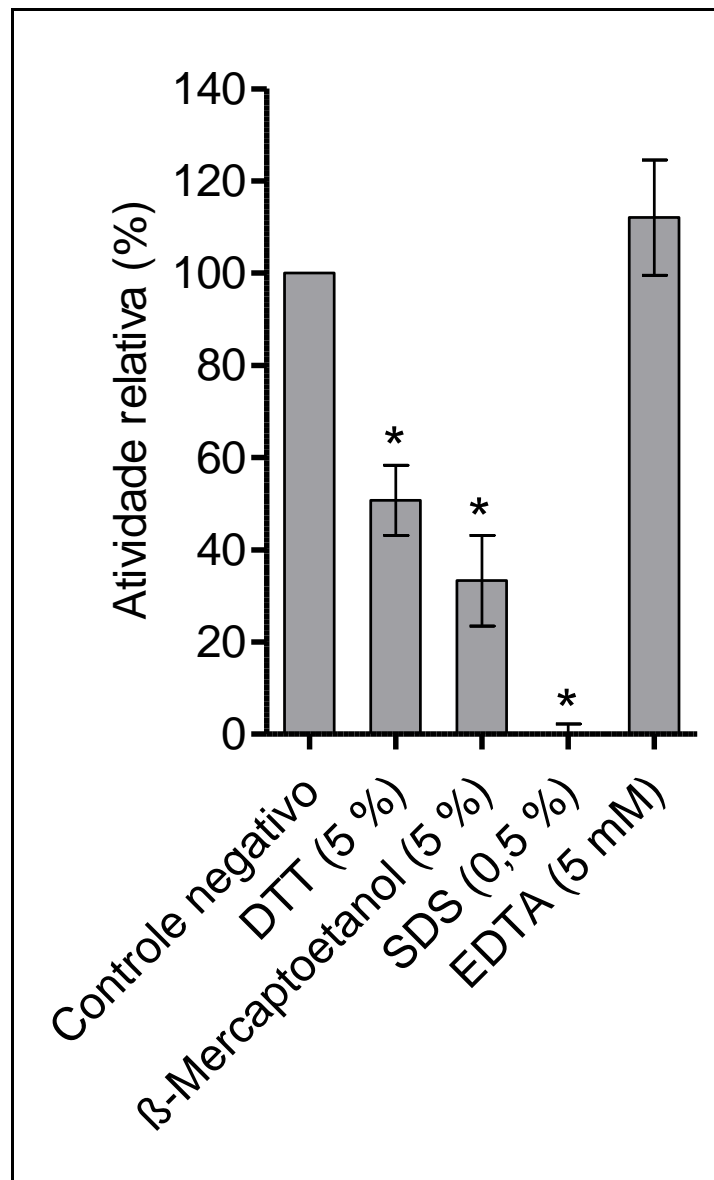
A proteína recombinante CvChi47 não foi capaz de inibir o crescimento micelial de nenhum dos fungos fitopatogênicos utilizados nos experimentos de inibição de crescimento micelial (FIGURA 20), entretanto ela teve ação deletéria contra conídios dos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *F. proliferatum* (FIGURA 21). Em uma concentração de 1 mg/mL, CvChi47 foi capaz de inibir a germinação de esporos de ambas as espécies de fungos (FIGURA 21C e 21D) quando comparado ao controle (FIGURA 21A e 21B), no qual nenhuma inibição foi verificada. Ensaio em meio sólido com *F. oxysporum* (FIGURA 21E - esquerda) e *F. proliferatum* (FIGURA 21F - esquerda), confirmaram que a germinação de ambos os fungos foi inibida na presença de CvChi47, quando comparados com os controles negativos (FIGURAS 21E - direita e 21F - direita).

6.7 Análise de microscopia de força atômica

As imagens e gráficos topológicos adquiridos a partir de experimentos de microscopia de força atômica revelaram uma diferença visível na morfologia da

superfície dos conídios de ambos os fungos *F. proliferatum* e *F. oxysporum* quando com CvChi47. Por outro lado, quando o mesmo estudo foi realizado em conídios previamente incubados somente com água ultrapura, não foram observadas alterações morfológicas. De fato, experimentos de controle revelaram conídios com uma superfície relativamente lisa, sem sinais de ruptura, além de uma parede celular bem turgida com superfície uniforme. No entanto, os conídios de *F. proliferatum* tratados com CvChi47 tinham uma superfície celular irregular (FIGURA 22 e 23) e mostram claramente sinais de perda de conteúdo interno (FIGURA 22 e 23), sugerindo a existência de danos na parede celular e conseqüentemente o extravasamento de fluido citoplasmático.

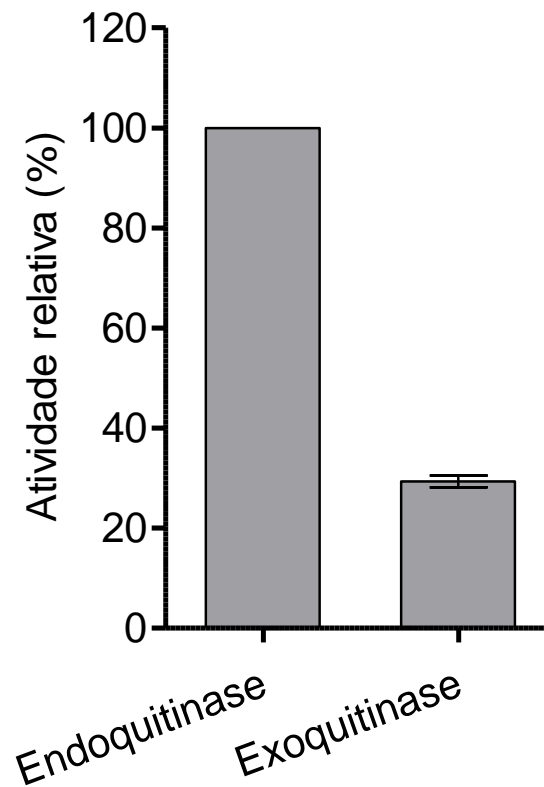
Figura 17 - Efeito de produtos químicos na atividade quitinolítica da CvChi47.



Fonte: Elaborada pelo autor.

CvChi47 foi incubado com vários reagentes à temperatura ambiente durante 60 minutos e a atividade da quitinase foi ensaiada sob condições padrão. A atividade enzimática sem qualquer aditivo foi considerada como 100%. Dados representam média \pm desvio padrão ($n = 3$). As médias significativamente diferentes ($P < 0,05$) do controle pelo teste de Dunnett são indicados por um asterisco.

Figura 18 - Atividade endoquitinolítica e exoquitinolítica da CvChi47.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando 100 ng em cada reação e utilizando quitina coloidal como substrato. Para a determinação da atividade exoquitinásica a enzima β -glucuronidase foi inativada antes de serem adicionadas a mistura reacional. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da atividade mais alta registrada em cada experimento. Os dados representam a média \pm desvio padrão.

Tabela 2. Atribuição representativa de massas moleculares experimentais, conforme determinado por ESI-MS, às sequências de aminoácidos de CvChi47.

Amino Acid Sequence	Experimental Mass	Predicted Mass	Δ (Da)
⁸⁸ RNGINNFRG ⁹⁶	834.3974	833.4144	0.9831
⁴¹⁹ KDCALYQGKK ⁴²⁸	953.4316	953.4277	0.0040
¹⁵⁶ RNFVVAALQKN ¹⁶⁷	1060.5914	1059.6077	0.9838
²⁸⁰ KDLYGMANSNRF ²⁹¹	1139.4714	1139.5029	-0.0315
²⁹⁰ RFGLLSMWSISR ³⁰²	1295.6758	1295.6696	0.0062
²⁴³ KAHGQTLTDAQLWQKV ²⁵⁸	1595.7356	1595.8056	-0.0700
²²⁸ KQAAQALYSQIDAAYKA ²⁴⁴	1639.6472	1639.8205	-0.1733
¹³⁸ RIDFDIEGGAQTDTAANNRN ¹⁵⁷	1906.8544	1906.8657	-0.0112
⁴⁴ KLGVNQGIQQFTLAFVVAKG ⁶³	1932.0984	1932.0833	0.0152
¹⁷³ KTLHVSLTLPAMPFGLTQDGQRV ¹⁹⁵	2281.1854	2281.1889	-0.0035
²⁵⁷ KVGVTPMVGLNDTQPETFVDNAKD ²⁸¹	2432.2057	2432.1894	0.0163
⁶² KGGCAPSWGVLAI PGSGSDQQLSAIRN ⁸⁹	2540.2542	2540.2442	0.0101
³⁰³ KSCPNNGHYVDAQCSGIVQTPYAFSNVFKG ³³²	3159.3754	3159.4179	-0.0425
³⁰¹ RDKSCPNNGHYVDAQCSGIVQTPYAFSNVFKG ³³²	3377.6980	3377.6417	0.0562
¹⁹⁴ RVLASALANGVALDTVNIMAMDYGQSNPNMGAAAKQ ²²⁹	3402.5653	3402.5398	0.0255
³⁸ 4KAQWWTQGDVPGQASVWQQQGGGLQQWSATAAAYSARD ⁴²⁰	3775.8253	3775.7768	0.0485
⁹⁶ KGGEVMVSFGGANGTPLQQACTTNASLQAAYQTVLDTYNLSRI ¹³⁹	4291.0657	4290.0322	1.0335

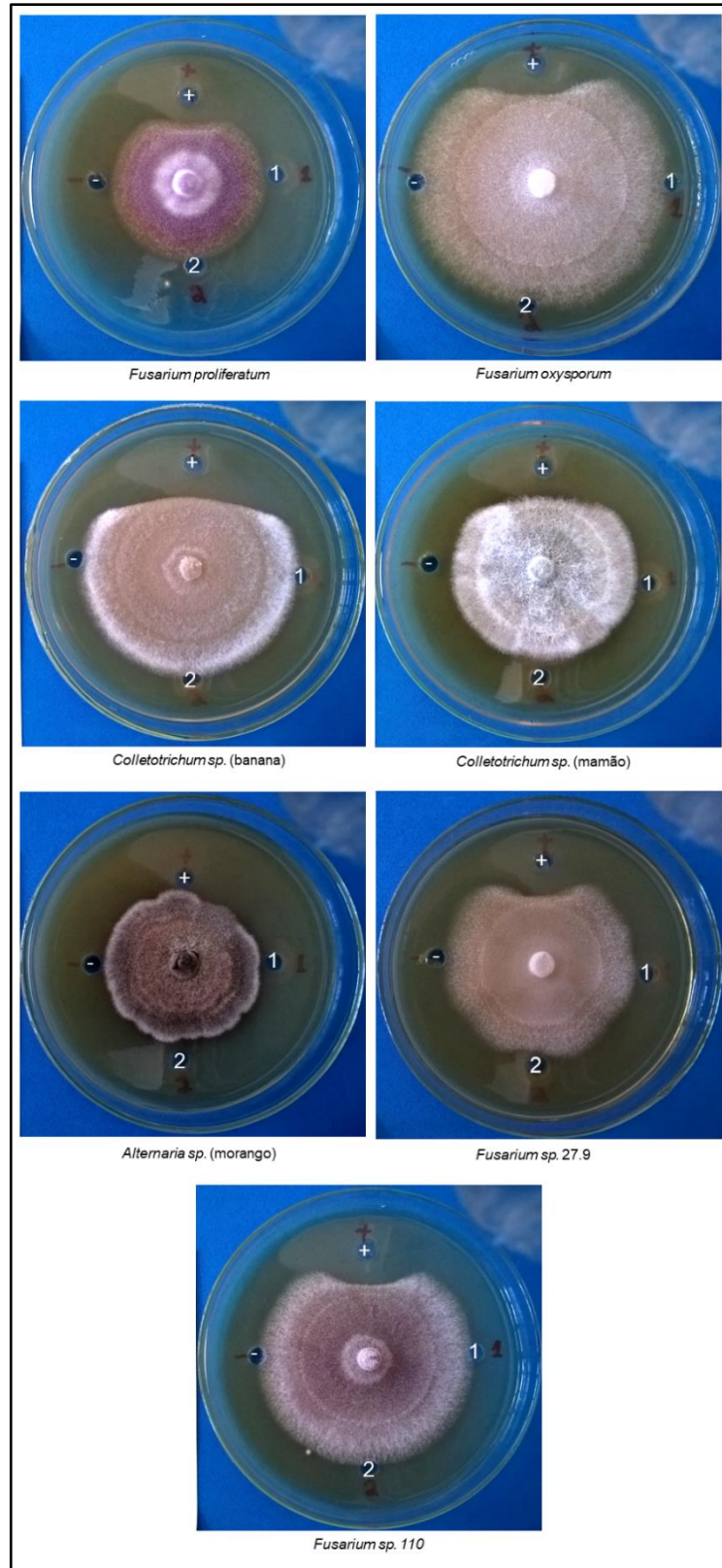
Figura 19 - Análise da rCvChi47 por (LC-ESI-MS/MS).

```
MMKRFAALSALAAAAAGLASPAAQA  
GAFAPYVDMTLWPTPQIDKLGVNQGIQQFTLAFVVAKGGCAPSWGGLAIPGSGSDQQLSAI  
RNGINNFRGKGGEVMVSFGGANGTPLQQACTTNASLQAAYQTVLDYNSRIDFDIEGGAQTD  
TAANNRNFAVVAALQKNYKAKGKT  
LHVSLTLPAMPFGLTQDGQRVLASALANGVALDTVNIMAMDYQSNPNMGAAAKQAAQALYS  
QIDAAYKAHGQTLTDAQLWQKVGVT  
PMVGLNDTQPETFTVDNAKDLYGMANSNRFGLLSMWSISRDKSCPNNGHYVDAQCSGIVQ  
TPYAFSNVFKGFKDHWGSGVTQDPNYG  
GGDNGGGGPVNGQPWSSGQVYNTGNTVTYSGATWKAQWWTQGDVPGQASVWQQGGGLQ  
QWSATAAYSAKDCALYQGKKYCAKWWT  
QGNLPAAGDPWVLSNLEHHHHHH
```

Fonte: Proprio autor:

A sobreposição de uma sequência de CvChi47 pelos peptídeos identificados na espectrometria de massa. Peptídeo sinal na área amarela e peptídeos sobrepostos em azul.

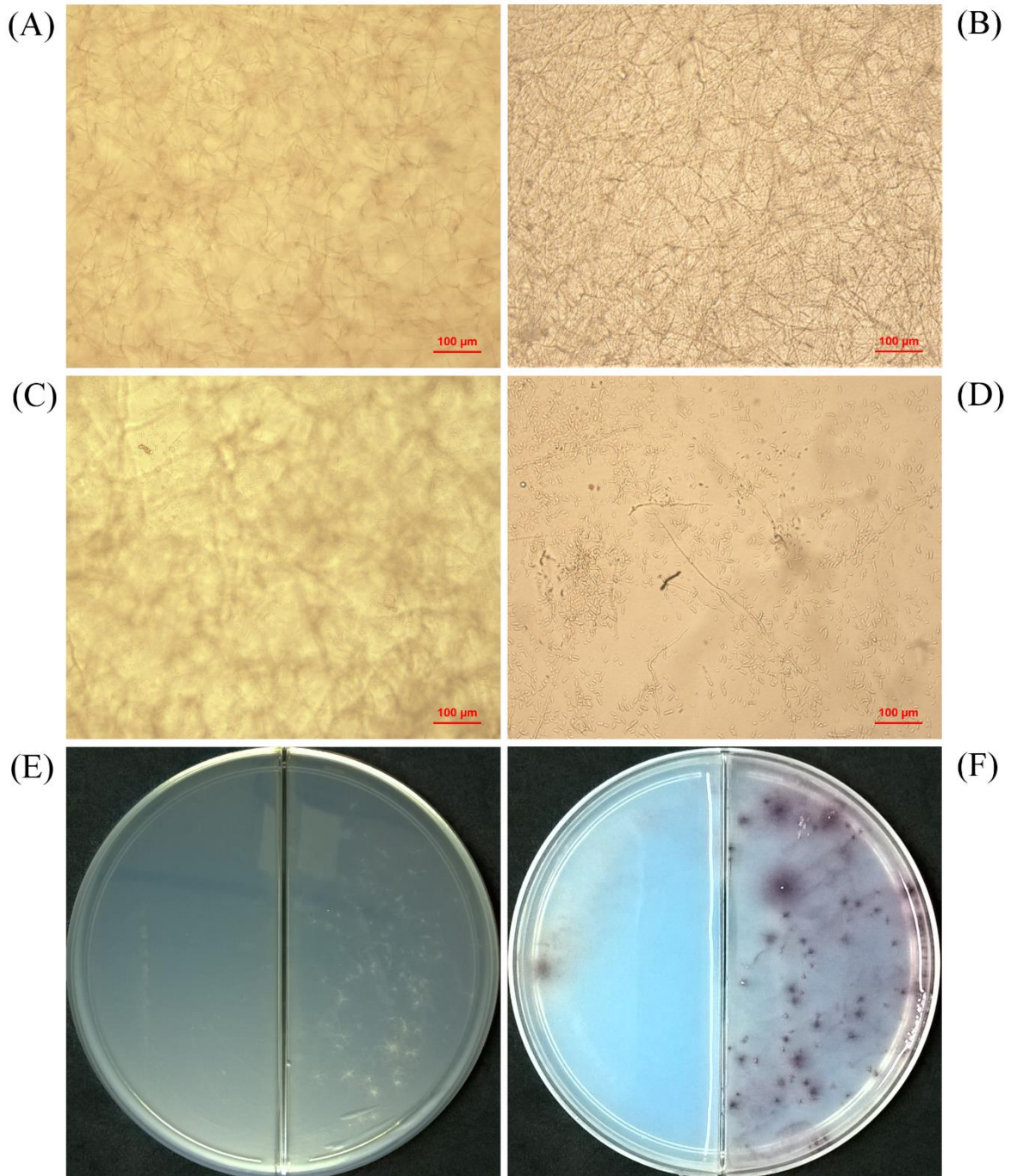
Figura 20 - Efeito da CvChi47 sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

+ Controle positivo (carbendazim); - Controle negativo (água destilada); ¹ Tratamento 1 (CvChi47 100 µg); ² Tratamento 2 (CvChi47 200 µg). Cada placa de Petri contém aproximadamente 25 mL de meio de cultura BDA.

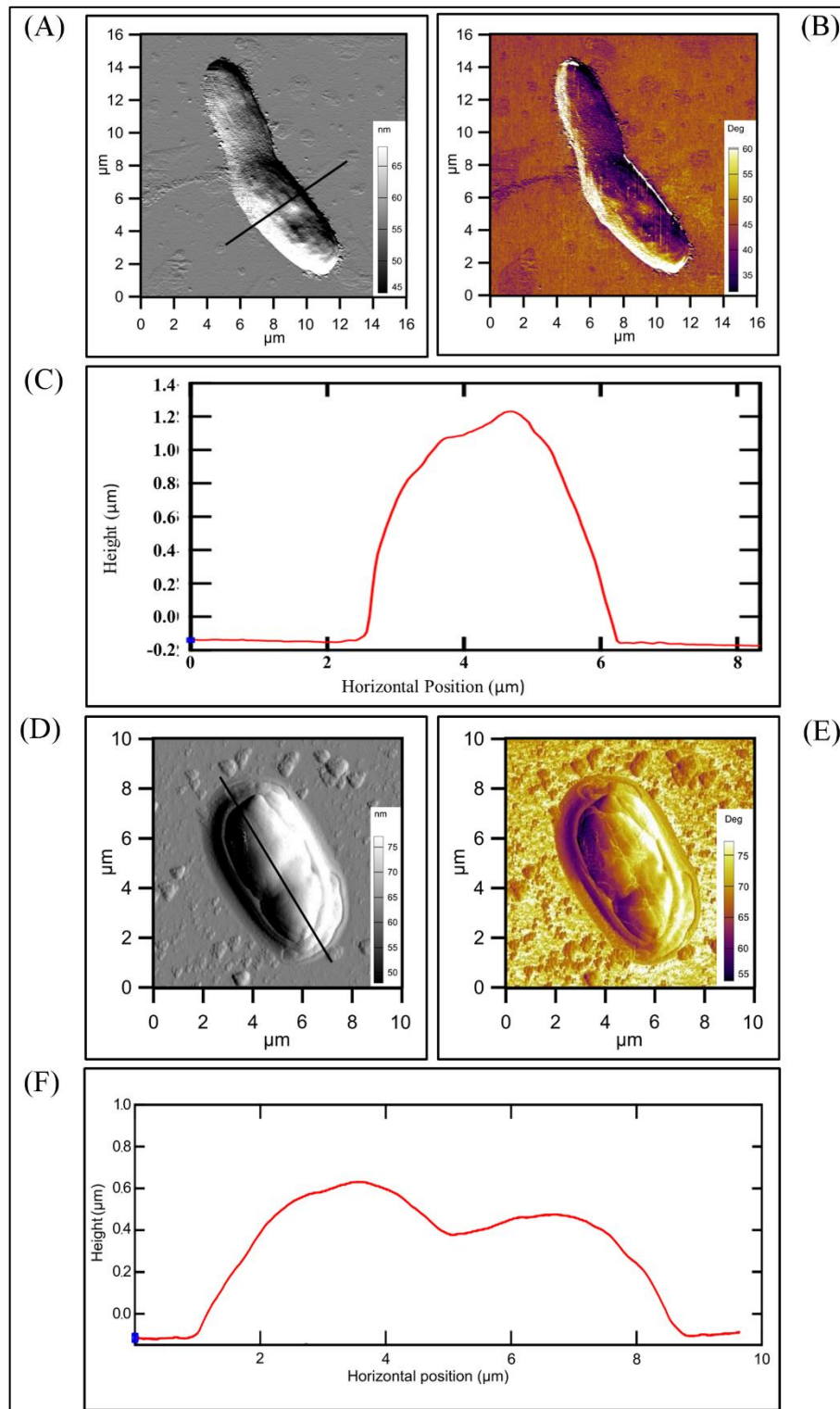
Figura 21 - Fotomicrografia do efeito inibitório da CvChi47 sobre a germinação de conídios de *F. proliferatum* e *F. oxysporum*.



Fonte: elaborada pelo autor.

Atividade inibitória da germinação de conídios: (C) *Fusarium oxysporum* x CvChi47; (A) *Fusarium oxysporum* x controle negativo; (D) *Fusarium proliferatum* x CvChi47; (B) *Fusarium proliferatum* x controle negativo. Atividade inibitória da germinação de conídios em BDA: (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *Fusarium proliferatum*. As placas de Petri são divididas em duas partes (controle negativo do lado direito e conídios tratados com CvChi47 do lado esquerdo) cada compartimento da placa de petri contém aproximadamente 12,5 ml de meio de cultura BDA.

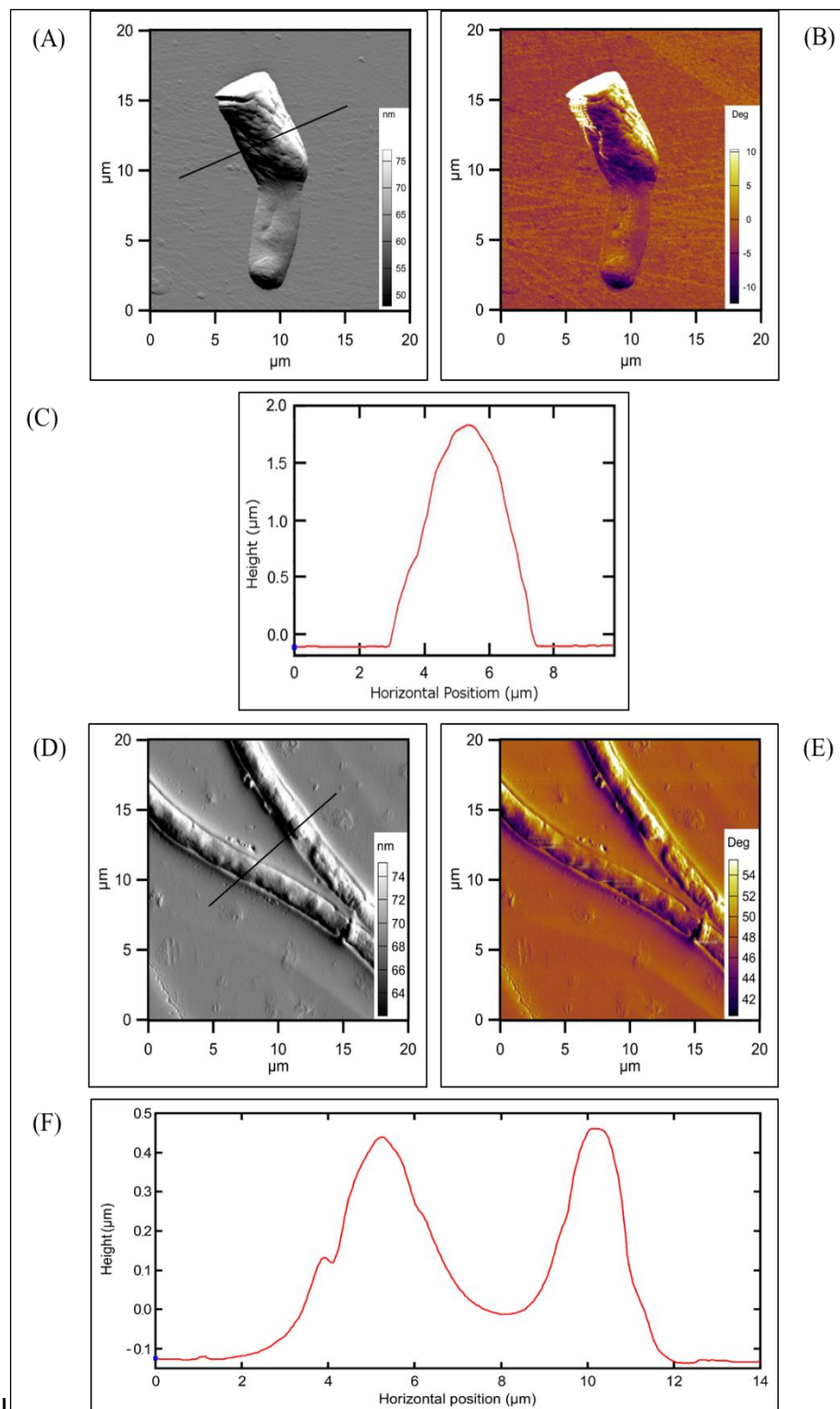
Figura 22 - Análise de topologia de conídios de *F. proliferatum* tratados com CvChi47 por microscopia de força atômica.



Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) imagem de amplitude dos conídios de *F. proliferatum* em água estéril; (B) imagem de fase de conídios de *F. proliferatum* em água estéril CvChi47; (C) mapa topológico do corte em "A". (D) imagem de amplitude dos conídios de *F. proliferatum* tratados com CvChi47; (E) imagem de fase dos conídios de *F. proliferatum* tratados com CvChi47; (F) mapa topológico do corte em "D".

Figura 23 - Análise de topologia de conídios de *F. oxysporum* tratados com CvChi47 por microscopia de força atômica.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

(A) imagem de amplitude dos conídios de *F. oxysporum* em água estéril; (B) imagem de fase de conídios de *F. oxysporum* em água estéril CvChi47; (C) mapa topológico do corte em "A". (D) imagem de amplitude dos conídios de *F. oxysporum* tratados com CvChi47; (E) imagem de fase dos conídios de *F. oxysporum* tratados com CvChi47; (F) mapa topológico do corte em "D".

7 DISCUSSÃO

A quitina é um polissacarídeo estrutural presente na maioria dos fungos, artrópodes e nematoides parasitas (BUCOLO *et al.*, 2011). Estima-se que sua produção anual somente no ambiente marinho atinja 1011 toneladas por ano (KEYHANI, 1999). Segundo Beier e Bertilsson (2013) vários trabalhos publicados nas últimas duas décadas reconhecem a importância da quitina, assim como os processos e os fatores que controlam sua degradação. Entre esses fatores, as quitinases (enzimas hidrolíticas que degradam a quitina) desempenha um papel muito importante na reciclagem desse polissacarídeo. As quitinases podem ser encontradas em uma variedade de espécies, desde microrganismos como bactérias e fungos até seres mais complexos, como animais e plantas (KEZUKA *et al.*, 2006). No entanto, as fontes preferidas de quitinases para exploração científica e econômica são os microrganismos, devido à sua disponibilidade e rápido crescimento (RICHA *et al.*, 2017).

C. violaceum é uma bactéria saprófita de vida livre que vive no solo e na água, podendo usar a quitina como fonte de carbono e nitrogênio (KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2015). Diversas *ORFs* codificando possíveis quitinases extracelulares estão presentes em seu genoma (CHERNIN *et al.*, 1998).

Neste trabalho, uma quitinase termoestável da família GH18 (CvChi47) foi produzida e secretada eficientemente no meio de cultura por células *E. coli* BL21(DE3). Esse resultado é muito semelhante ao encontrado por Lobo e colaboradores (2013), demonstrando que o peptídeo sinal predito pelo software SignalP 4.1 direcionou a proteína através do sistema de secreção do tipo I de *E. coli*. No entanto, uma porcentagem extremamente baixa de atividade quitinolítica de cerca de 2,2% e 0,1% também foi encontrada para as frações intracelulares periplasmática e solúvel, respectivamente. O perfil eletroforetico em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da proteína purificada mostrou uma massa molecular aparente de aproximadamente 46,1 kDa, em vez de 47,4 kDa, o tamanho esperado da pré-proteína de 450 resíduos codificada pela sequência de DNA clonado no vetor expressão. Esta diferença de massa molecular indica a remoção do peptídeo sinal, que no caso de CvChi47 é composto por 25 resíduos de aminoácidos bem como a adição de 8 aminoácidos oriundos do vetor de expressão. Achados semelhantes também foram observados por (LOBO *et al.*, 2013; POWER *et al.*, 1992).

Além disso, CvChi47 apresentou boa atividade quitinolítica em valores de pH levemente ácidos, como pH 4,0 e 6,0. A condição ótima para a atividade quitinolítica foi em pH 5,0. No entanto, a molécula ficou estável em uma faixa de pH mais ampla (entre 4,0 e 7,0). Esta característica pode ter significado fisiológico para *C. violaceum*, uma vez que é uma espécie bem adaptada à vida aquática, bem como locais úmidos e de pH ácido (WYNN-WILLIAMS, 1983). Além disso, esses dados estão de acordo com os encontrados por Karthik e colaboradores (2015), que mostraram que a maioria das quitinases descritas apresenta moderada a alta atividade, bem como estabilidade dentro do intervalo de pH de 4 a 10. Essa faixa ótima de pH também é muito comum para outros GH18s, como a AMCCase (BUCOLO *et al.*, 2011), CvChi45 (LOBO *et al.*, 2013), ChiA-Hh59 (BOUACEM *et al.*, 2018), quitinase de *Rhizopus stolonifer* (SONAWANE *et al.*, 2016) e Ech30 (HOELL *et al.*, 2005).

Segundo Liu e colaboradores (2015), duas quitinases de *Brevibacillus laterosporus* (ChiA e ChiC) apresentaram temperaturas ótimas de atividade quitinásica a 55 °C a 60 °C, mantendo-se estáveis até 60 °C. No entanto, nenhuma das enzimas estudadas por ele foi capaz de manter mais de 20% de sua atividade residual após a incubação a 80 °C. Enquanto isso, no presente estudo a melhor temperatura para a atividade de CvChi47 foi a 60 °C, a 70 °C a enzima ainda preserva mais de 60% de sua funcionalidade. O CvChi47 foi considerado uma enzima termoestável, uma vez que reteve 53,7% de sua atividade residual, mesmo quando aquecido a 100 °C por uma hora. Essa característica qualifica a CvChi47 como uma promissora ferramenta biotecnológica para a indústria, considerando que a maioria dos processos industriais exige enzimas com uma certa tolerância a temperaturas elevadas (ANBU *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016).

A boa estabilidade de CvChi47 a temperaturas extremas, que permite a classificação dessa enzima como quitinase termoestável, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela presença de potenciais três pontes dissulfeto, uma modificação pós-traducional que proporciona a manutenção do dobramento, estabilidade e funcionalidade de uma proteína (KONG; GUO, 2014). Em bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *C. violaceum*, essa modificação tipicamente ocorre na região periplasmática da célula (LEE; DAVEY, 2017). De fato, de acordo com Kaur e colaboradores (2018) a produção de proteínas recombinantes fundidas a um peptídeo sinal é uma estratégia para direcionar a proteína para a região periplasmática, onde

as condições e enzimas necessárias para a formação de ligações dissulfeto estão presentes.

Entre os vários sais avaliados quanto ao efeito sobre a atividade de CvChi47, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} e La^{3+} reduziram consideravelmente a atividade da quitinase, principalmente os dois primeiros. Em contraste, Bouacem *et al.* (2018) observaram perda total de atividade quando a quitinase foi incubada na presença de íons Cd_2^+ e Ni_2^+ . Observando outros trabalhos podemos ver que o efeito dos íons metálicos na quitinase são bastante diferentes e diversos.

A atividade enzimática de CvChi47 não foi inibida pelo composto EDTA, no entanto, os agentes redutores de 2-mercaptoetanol e DTT reduziram substancialmente a atividade enzimática. Sugerindo que os íons metálicos di-valentes podem não ser importantes na estabilização da molécula, por outro lado, ligações dissulfídricas parecem ser importantes para a estabilidade da enzima. Outro composto químico SDS tem mostrado ser muito prejudicial à atividade enzimática da molécula, este detergente possivelmente previne interações entre grupos químicos carregados do sítio ativo, assim como interfere nos sítios de ligação da quitina. Em Aliabadi *et al.* (2016) o SDS não causou redução significativa da atividade enzimática.

O CvChi47 foi ativo contra os fungos fitopatogenos *F. oxysporum* e *F. proliferatum*, tanto em meio líquido como em meio sólido. Além disso, a análise de AFM mostra resultados que sugerem que o CvChi47 causa um efeito deletério na parede celular, que é composto, entre outros compostos, pela quitina, evitando a germinação e conseqüentemente o crescimento micelial do fungo. Resultados relativamente semelhantes foram relatados quando esporos de *F. solani* foram tratados com CpOsm, uma proteína do látex, cujo mecanismo de ação é atribuído a alterar a permeabilidade celular dos esporos (RAMOS *et al.*, 2015). A CvChi47 também possui dois sítios de ligação à quitina, condição que facilita sua interação com substratos formados pela quitina. Além disso, apresenta atividade quitinolítica a 60 °C duas vezes e meia a mais do que a observada na temperatura dos testes antifúngicos. Os resultados sugerem fortemente a possibilidade de utilizar o CvChi47 como alternativa para o controle de fitopatogenos e para o desenvolvimento de produtos farmacológicos ou industriais.

8 CONCLUSÃO

A proteína CvChi47 codificada no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 foi validada experimentalmente como uma quitinase GH18 termoestável e funcional, sendo observado além de ser termoestável sua ação hidrolítica sobre as cadeias de quitina dos conídios de *Fusarium oxysporum* causa um efeito deletério sobre a parede celular interna, levando às alterações morfológicas observadas pela análise da AFM que causa inibição da germinação dos conídios, impedindo o crescimento micelial desse fungo que é causador de doenças importantes nas lavouras e nos humanos em todo o mundo. Isso caracteriza essa enzima como uma ótima ferramenta biotecnológica para o controle biológico de fungos, bem como, para a produção de compostos derivados de quitina.

REFERÊNCIAS

- ADRANGI, S. et al. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 3, p. 402–407, fev. 2010.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1786–1785, 2013.
- ANBU, P. et al. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–3, 2017.
- ARULDASS, C. A. et al. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5164–5180, fev. 2018.
- BANEYX, F.; GEORGIU, G. In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 491–4, jan. 1990.
- BANNER, D. W. et al. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. **Nature**, v. 255, n. 5510, p. 609–14, jun. 1975.
- BEIER, S.; BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUN, p. 1–12, 2013.
- BEZERRA, W. M. Expressão de uma proteína yd de *chromobacterium violaceum* em sistemas heterólogos : potencial no controle de pragas e fungos *Chromobacterium violaceum* em sistemas heterólogos : potencial no controle de pragas e fungos. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2008.
- BOLLER, T. et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, v. 157, n. 1, p. 22–31, 1983.
- BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and á-1,3-glucanases. In: MCPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J. (Eds.). . **Molecular Plant Pathology: a Praical Approach**. 2. ed. New York: Oxford University press, p. 23–30, 1992.
- BOUACEM, K. et al. Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 338–350, jan. 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BRAMELD, K. A; GODDARD, W. A. The role of enzyme distortion in the single

displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4276–4281, abr. 1998.

BRIGHAM, C. Chitin and Chitosan: Sustainable, Medically Relevant Biomaterials. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 6, n. 2, p. 41–47, 29 ago. 2017.

BUCOLO, C. et al. Acidic mammalian chitinase and the eye: Implications for ocular inflammatory diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. JUL, n. July, p. 1–4, 2011.

BUSBY, J. N. et al. Structural Analysis of Chi1 Chitinase from Yen-Tc: The Multisubunit Insecticidal ABC Toxin Complex of *Yersinia entomophaga*. **Journal of Molecular Biology**, v. 415, n. 2, p. 359–371, jan. 2012.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004.

CAZYPEDIA CONSORTIUM. **OUP accepted manuscript**, (Nota técnica), 2017.

CHAUDHURI, T. K. et al. Effect of the extra n-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of molecular biology**, v. 285, n. 3, p. 1179–94, jan. 1999.

CHEN, W. et al. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 8, p. 2652–2660, fev. 2018.

CHERNIN, L. S. et al. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4435–41, set. 1998.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625–635, 1 jun. 2004.

CHUANG, H.-H.; LIN, H.-Y.; LIN, F.-P. Biochemical characteristics of C-terminal region of recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis*- implication of necessity for enzyme properties. **FEBS Journal**, v. 275, n. 9, p. 2240–2254, maio 2008.

CLARK, E. Refolding of recombinant proteins. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–63, abr. 1998.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 270–7, jun. 1998.

CRONAN, J. E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

DAHIYA, N. et al. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n.

2, p. 134–145, 15 ago. 2005.

DALL'AGNOL, L. T. et al. Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 678–82, nov. 2008.

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

DIAS, J. P. et al. Cromobacteriose em Ilhéus, Bahia: investigação epidemiológica clínica e laboratorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 503–506, dez. 2005.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 29 jan. 2001.

FERNANDEZ-FUENTES, N. et al. M4T: a comparative protein structure modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W363–W368, 8 maio 2007a.

FERNANDEZ-FUENTES, N. et al. Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and optimizing sequence-to-structure alignments. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2558–2565, 1 out. 2007b.

FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W182-5, 1 jul. 2006.

FERREIRA, R. B. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 677–700, set. 2007.

FROMMER, W. B.; NINNEMANN, O. Heterologous Expression of Genes in Bacterial, Fungal, Animal, and Plant Cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 419–444, jun. 1995.

FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1–16, 2007.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.

GIGOT, C. Plant gene isolation: Principles and practice. **Plant Science**, v. 121, n. 2, p. 231–232, 1 dez. 1996.

GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 2, p. 319–326, 1989.

GOMES, A. R. et al. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the

Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 7, p. 346–356, jun. 2016.

GOODAY, G. W. The Ecology of Chitin Degradation. In: [s.l.: s.n.]. p. 387–430.

GRANGEIRO, T. B. et al. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 3, n. 1, p. 117–33, 31 mar. 2004.

GRUBER, S.; KUBICEK, C. P.; SEIDL-SEIBOTH, V. Differential Regulation of Orthologous Chitinase Genes in Mycoparasitic Trichoderma Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7217–7226, 15 out. 2011.

HAMID, R. et al. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.

HARA, M. et al. Involvement of Gln679, in addition to Trp687, in chitin-binding activity of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Biochemistry**, v. 154, n. 2, p. 185–193, 2013.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p. 781–788, ago. 1993.

HODGSON, J. Expression Systems: A User's Guide. **Bio/Technology**, v. 11, n. 8, p. 887–893, ago. 1993.

HOELL, I. A. et al. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1748, n. 2, p. 180–190, 2005.

HOWARD, M. B. et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627–635, 2003.

HUANG, L. et al. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 293–299, mar. 2012.

ISELI, B. et al. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 186–188, 11 mar. 1996.

JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and Chitinases**. Basel: Birkhäuser Basel, 1999.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N. Action and function of *Chromobacterium violaceum* in health and disease: Violacein as a promising metabolite to counteract gastroenterological diseases. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 649–656, dez. 2017.

KÁLAI, K. et al. Comparative study of constitutive and inducible promoters in tobacco. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 2, p. 313–319, 2008.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 195–201, 2015.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, n. 10, p. 803–822, jan. 2018.

KEYHANI, N. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1473, n. 1, p. 108–122, 17 dez. 1999.

KEZUKA, Y. et al. Structural Studies of a Two-domain Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n. 2, p. 472–484, 2006.

KOLOSOVA, N.; BREUIL, C.; BOHLMANN, J. Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. **Phytochemistry**, v. 101, p. 32–39, maio 2014.

KONG, B.; GUO, G. L. Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.

KOPPARAPU, N. K. et al. A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1569–1575, ago. 2011.

KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell**, v. 20, n. 3, p. 749–760, 1980.

KOTHARI, V.; SHARMA, S.; PADIA, D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 744–752, ago. 2017.

LACERDA, F. S. A.; NASCIMENTO, E. D.; ARAÚJO, M. F. F. Microbiology for environmental conservation : a systematic review of bioremediation of heavy metals by *Chromobacterium violaceum*. **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, p. 408–423, 2016.

LANDIM, P. G. C. et al. Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. **Biochimie**, v. 135, p. 89–103, 2017.

LEE, S. F.; DAVEY, L. Disulfide Bonds: A Key Modification in Bacterial Extracytoplasmic Proteins. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 13, p. 1465–1473, 10 dez. 2017.

LEE, S. G. et al. Expression of recombinant endochitinase from the *Antarctic*

bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 71, n. 1, p. 108–114, maio 2010.

LI, H.; GREENE, L. H. Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8654, 13 jan. 2010.

LIN, Y. DAN et al. The Spectrum of *Chromobacterium violaceum* Infections from a Single Geographic Location. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 710–716, 6 abr. 2016.

LIU, P.; CHENG, D.; MIAO, L. Characterization of thermotolerant chitinases encoded by a *Brevibacillus laterosporus* strain isolated from a suburban wetland. **Genes**, v. 6, n. 4, p. 1268–1282, 2015.

LOBO, M. D. P. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 13, 2013.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

LOPES, S. C. P. et al. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits Plasmodium Growth In Vitro and In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2149–2152, 1 maio 2009.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–38, set. 1996.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.

MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 648–656, 1977.

OHNO, T. et al. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5065–5070, set. 1996.

PANT, N.; SHARMA, M. Urinary tract infection caused by *Chromobacterium violaceum*. **International Journal of General Medicine**, p. 293, set. 2015.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

POWER, B. E. et al. High-level temperature-induced synthesis of an antibody VH-domain in *Escherichia coli* using the *PeB* secretion signal. **Gene**, v. 113, n. 1, p. 95–9, 1 abr. 1992.

RAMOS, M. V. et al. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from

Calotropis procera and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 119, p. 5–18, 2015.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

REGALADO, A. P. et al. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. **Planta**, v. 210, n. 4, p. 543–550, 2000.

REISSIG, J. L.; STORMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **The Journal of biological chemistry**, v. 217, n. 2, p. 959–66, dez. 1955.

RICHA, K. et al. Novel Chitinase Gene LOC_Os11g47510 from Indica Rice Tetep Provides Enhanced Resistance against Sheath Blight Pathogen *Rhizoctonia solani* in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–10, 2017.

RICHARD, C. [*Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions]. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 86, n. 3, p. 169–73, 1993.

RODGERS, F. H. et al. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006391, 17 maio 2017.

RYKUNOV, D. et al. Improved scoring function for comparative modeling using the M4T method. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 10, n. 1, p. 95–99, 5 mar. 2009.

SASAKI, C. et al. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. **Journal of biochemistry**, v. 131, n. 4, p. 557–64, abr. 2002.

SASIDHARAN, A. et al. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 694–701, 2 out. 2015.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016.

SONAWANE, K. D. et al. Intergeneric fusant development using chitinase preparation of *Rhizopus stolonifer* NCIM 880. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–28, 26 jan. 2005.

TANG, W. J. et al. Chitin Is Endogenously Produced in Vertebrates. **Current**

Biology, v. 25, n. 7, p. 897–900, mar. 2015.

TELLAM, R. L. Protein motifs in filarial chitinases: An alternative view. **Parasitology Today**, v. 12, n. 7, p. 291–292, jul. 1996.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61–87, jan. 2003.

TOBIAS, P. A. et al. Identification of the *Eucalyptus grandis* chitinase gene family and expression characterization under different biotic stress challenges. **Tree Physiology**, v. 37, n. 5, p. 565–582, maio 2017.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11660–11665, 30 set. 2003.

WILLIAMSON, P. T. et al. Expression and purification of recombinant neurotensin in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 19, n. 2, p. 271–5, jul. 2000.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Distribution and characteristics of *Chromobacterium* in the maritime and sub-antarctic. **Polar Biology**, v. 2, n. 2, p. 101–108, 1983.

YANG, H. et al. Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 68, n. 5, p. 765–76, 28 dez. 2011.

YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, p. 296482, jan. 2009.

YIN, J. et al. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 10 jan. 2007.

APÊNDICE A - ARTIGO “A Novel Thermostable Chitinase from Chromobacterium violaceum that Inhibits the Development of Phytopathogenic Fungi”

Antônio J. S. Sousa^{1,2*}, José E. Monteiro-Junior², Christiana F. B. da Silva³, Jeanlex S. Sousa⁴, Marina D. P. Lobo⁵, Ana C. O. Monteiro-Moreira⁵, Thalles B. Grangeiro^{2*}

1 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil

2 Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil

3 Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Patologia Pós-colheita, Fortaleza, CE, Brazil

4 Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil

5 Nucleo de Biologia Experimental (Nubex), Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brazil

Correspondence:

Ms. Antônio Juscelino Sudário Sousa

ajuscelinoss@gmail.com

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

tbgrangeiro@gmail.com

Keywords: antifungal chitinase, Chromobacterium violaceum, Escherichia coli, CV1440, heterologous expression, Fusarium proliferatum, Fusarium oxysporum, atomic force microscopy

Chitinases are hydrolytic enzymes capable to decompose chitin, a polymer of N-Acetyl-D-Glucosamine monosaccharide linked by O-glycosidic β -1,4 ligations. Chitin is the second most abundant carbohydrate found in nature making part as a structural component of the cell wall of a number of phytopathogenic fungi, digestive tract

(peritrophic membrane) of insects, cuticle of nematode eggs, crustaceous shells etc. Chitinases have been related as potential biotechnological tools in the control of plant pathogens and predators due to its ability to degrade chitin. These enzymes are largely widespread in animals, plants, fungi and bacteria. The aim of this work was to biochemically characterize a recombinant chitinase and investigate whether the protein is able to inhibit the spore germination of the phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*. The open reading frame CV1440 coding a chitinase from *Chromobacterium violaceum*, a free-living Gram-negative proteobacterium, was expressed in *E. coli* and purified to homogeneity. The recombinant chitinase was named CvChi47 and presented a theoretical full-length size of 458 amino acids, which includes a 25 residues signal peptide, according to SignalP 4.1 server and a His-tag hexapeptide preceded by leucine and glutamate residues. Furthermore, the protein presented the conserved catalytic domain of family 18 glycoside hydrolases, a linker region and two chitin-binding sites. High levels of chitinolytic activity were detected in the cell-free culture medium of *E. coli* cells harboring the recombinant protein, which suggests the effective secretion of the chitinase. Additionally, the purified protein has an apparent molecular mass of around 46.1 kDa, as estimated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, indicating the removal of the signal peptide. CvChi47 was considered to be a thermostable protein retaining approximately 53.7% of its activity when heated at 100 °C for 1h. The optimum activity was observed at 60 °C, pH 5. The recombinant chitinase inhibited the spore germination of the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum* and force atomic microscopy experiments revealed a pronounced morphological alteration of the surface of spores incubated with CvChi47 when compared to controls. Taken together these results rise the possibility to use CvChi47 as a potential tool in the control of phytopathogenic fungi.

1 INTRODUCTION

Chitin, a linear β -1,4-linked polymer of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), is the second-most abundant biopolymer found in nature after cellulose, widely distributed among fungi, arthropods, mollusks, coelenterates, protozoan, and green algae, and functions as a major structural polymer in many organisms (HAO *et al.*, 2012; MATROODI *et al.*, 2013; WYSOKOWSKI *et al.*, 2015). According to Tabata and

collaborators (2018), chitin exists in three polymorphs, α , β and γ , which differ in the orientation and packing of the chitin molecular chains.

Chitinases (EC 3.2.1.14) hydrolyze the β -(1,4)-linkages in chitin and chitodextrins, and they are present in organisms from all three domains of life (LOBO *et al.*, 2013) what includes: viruses, fungi, bacteria, archaea, rotifers, algae, plants, and animals (GAO *et al.*, 2003; HAMID *et al.*, 2013; KOCH; STOUGAARD; SPAINK, 2015; LANDIM *et al.*, 2017; SAIMA; ROOHI, 2013; ŠTROJISOVÁ; DYHRMAN, 2008; ŠTROJISOVÁ; VRBA, 2005). These enzymes participate in a variety of functions, such as nutrient digestion, defense mechanisms, pathogenesis and morphogenesis (UBHAYASEKERA, 2011).

Based on the amino acid sequence similarities of their catalytic domains, chitinases were first classified in two families of glycoside hydrolases (GHs) GH18 and GH19 (HENRISSAT, 1991). However, in the last years a few chitinases that belong to families GH23 and GH48 have also been identified (ARIMORI *et al.*, 2013; FUJITA *et al.*, 2006). GH18 chitinases have a generalized occurrence in nature being found in viruses, archaea, bacteria, fungi, plants and animals (classes III and V) (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007). While, GH19 chitinases have distribution restricted to viruses, nematodes, higher plants and some groups of bacteria (classes I, II and IV) (UDAYA PRAKASH *et al.*, 2010). Furthermore, GH18 and GH19 chitinases do not share similarities in their amino acid sequences and display completely different two and three-dimensional structures, suggesting that they have diverged from distinct ancestors (PERRAKIS *et al.*, 1994). In addition, GH18 and GH19 chitinases have different catalytic mechanisms. While GH18 members exert the retaining mechanism, in which the products of hydrolysis are β -anomers, GH19 members exhibit the inverting mechanism, which produces α -anomers after catalysis (ISELI *et al.*, 1996; SYNSTAD *et al.*, 2004; TEWS *et al.*, 1997).

Chitinases are gaining increasing attention due to their wide range of biotechnological applications in diverse areas such as medicine, agriculture and industry. Some of these applications include isolation of fungal protoplasts (FLEURI; KAWAGUTI; SATO, 2009), production of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and derivatives (LIN; CHEN; PENG, 2009), biocontrol of phytopathogenic fungi (KHAN *et*

al., 2017) and insects (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). For example, the properties of some chitinases were investigated as an approach to enable the use of chitin in animal feed (TABATA *et al.*, 2018), and management of shrimp (BRZEZINSKA *et al.*, 2014), and mussel residues (NAKAGAWA *et al.*, 2011). Moreover, the use of chitinases as an alternative for the defense of crops against fungi and insects that cause damage in agriculture has been proposed (ADRANGI; FARAMARZI, 2013; JOO, 2005; KHAN *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2014). However, most of the chitinases investigated are mesothermal and do not meet the diverse demands of industrial environments (BOUACEM *et al.*, 2018).

Chromobacterium violaceum Bergonzini is a Gram-negative, facultative anaerobic β -proteobacterium (family Neisseriaceae) that is commonly found as a saprophyte in the water and soil in tropical and subtropical regions of the world (KOBURGER; MAY, 1982). The complete genome sequence of *C. violaceum* ATCC 12472 has been determined, revealing important gene sequences that underpin the versatility and adaptability of this free-living microorganism (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Several chitinases and other carbohydrate-degrading enzymes genes were identified in the genome of the strain ATCC 12472. Despite the variety of chitinase coding sequences in the genome of *C. violaceum* ATCC 12472, some of which may potentially exhibit application in the fields of industry, agriculture, and/or medicine, only one chitinase encoded by ATCC 12472 genome has been subjected to experimental validation to date (LOBO *et al.*, 2013). The present work aimed to produce a putative chitinase coded by the *ORF* CV1440, belonging to the genome of *C. violaceum* ATCC 12472 using *Escherichia coli* as a heterologous expression system. The recombinant protein was purified and characterized in terms of biochemical and biological functions and its possible mechanism of action over the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum* was also investigated and discussed in this work.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial and fungal strains, plasmid and culture media

The *Escherichia coli* strains TOP 10 F' and BL21(DE3) and the expression vector pET303/CT-His plasmid were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Fusarium oxysporum and *F. proliferatum* strains were obtained from a stock collection maintained at Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) Tropical Agroindustry. The bacterial cells were cultivated in 2x YT medium (16 g/L triptone, 10 g/L Yeast Extract, 5 g/L NaCl, pH 7,0) and LB medium (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.0). Both phytopathogenic fungi were grown in PDA medium. All other reagents were of high purity and analytical grade.

2.2 Sequence analysis

Signal peptide and signal peptidase cleavage sites were predicted using SignalP version 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011). The theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight (MW) were predicted using Compute pI/MW tool on the ExPASy Proteomics Server (GASTEIGER *et al.*, 2005). The search for the presence of disulfide bonds was performed using DiANNA 1.1 web server (FERRÈ; CLOTE, 2006). The presence and delimitation of protein domains were accomplished using the Conserved Domain Database (CDD) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015). The functional domains were named following the nomenclature adopted by the Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) database (LOMBARD *et al.*, 2014).

2.3 Amplification and cloning

Genomic DNA from *C. violaceum* ATCC 12472 was isolated using a CTAB-based protocol as described previously (GIGOT, 1996) and the complete DNA sequence of the CV1440 open reading frame (*ORF*) was amplified by PCR using this genomic DNA as a template. The design of the PCR primers was based on the coding sequence of the corresponding *ORF*, which spans the *C. violaceum* chromosome from position 1,522,798 to 1,524,150 [GenBank accession number: NC_005085.1]. The primer sequences were 5'-CCGTCTAGAATGATGAAAAGGTTTGCCGCC-3' (forward) and 5'- CCGCTCGAGGTTGGACAGCACCCACGGG-3' (reverse).

Restriction endonuclease sites (underlined) were incorporated in the forward (XbaI) and reverse (XhoI) primers, respectively, to allow for further manipulation of the PCR products. Amplifications were carried out in a final reaction volume of 50 µL containing 125 ng of genomic DNA, 1X Phusion GC Buffer (Finnzymes, Vantaa, Finland), 0.0015 M MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each

primer, and 1 U of Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) according to the following cycling parameters: an initial denaturation step (2 min at 98 °C) followed by 33 cycles of 10 segundos at 98 °C, 30 segundos at 67 °C, and 2 min at 72 °C. After the last cycle, the reactions were further incubated for 5 min at 72 °C.

The amplified products were analyzed through a 1.0% agarose gel electrophoresis (SAMBROOK, 1989) (Figure S1), gel extracted and purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) and digested with the restriction enzymes XbaI and XhoI (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada). After digestion the bands corresponding to the *ORF CV1440* were purified from the agarose gel electrophoresis, as described before, and ligated into the pET303/CT-His expression vector (previously digested with XbaI and XhoI), using T4 DNA Ligase (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada). The ligation products were introduced into chemically competent TOP10F' *E. coli* cells according to the manufacturer's instructions (Carlsbad, CA, USA). Plasmid DNA was isolated from antibiotic-resistant colonies using the kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the presence of the insert was confirmed by combined restriction digestion with the endonucleases XbaI and XhoI and PCR. The confirmed recombinant plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) cells by electroporation and the transformants were selected on LB agar containing 100 µg/mL carbenicillin.

2.4 Protein expression

Positive clones of *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the construction pET-CV1440 were selected and inoculated in 5 mL of 2x YT medium containing 100 µg/mL carbenicillin. The culture was incubated with vigorous shaking (180 rpm) at 37 °C for 16 h. An aliquot (1 mL) of this culture was then inoculated into 100 mL of 2x YT medium (in a 1000 mL Erlenmeyer flask) supplemented with 100 µg/mL carbenicillin and further incubated (180 rpm at 37 °C) until the OD₆₀₀ reached 0.4-0.5. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.4 mM to induce the expression of the recombinant protein. After 24 h at 37 °C, the culture was centrifuged (6,000 g, 10 min, 4 °C) and the cell pellet and the supernatant were saved for further analysis.

2.5 Osmotic shock and cell lysis

Periplasmic proteins expressed in *E. coli* cells harboring the plasmid pET-CV1440 were obtained by the osmotic shock protocol (KOSHLAND; BOTSTEIN, 1980), with minor modifications. Briefly, the cells were resuspended in 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer, containing 0.0025 M EDTA and 20% (w/v) sucrose to an OD₅₅₀ = 5.0, and the mixture was incubated on ice for 10 min and centrifuged (6,000 g, 10 min, 4 °C). The buffer was discarded and the cells were resuspended in 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer, containing 0.0025 M EDTA using the same volume as before. The cell suspension was again incubated on ice for 10 min and centrifuged (6,000 g, 10 min, 4 °C), and the supernatant [periplasmic fraction (PF)] was transferred to a clean tube and stored at -20 °C. The remaining cells were lysed by resuspending in lysis buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.002 M EDTA, 0.15 M NaCl) containing 100 µg/mL lysozyme and 0.1% Triton X-100 (v/v). The suspension was incubated at 30 °C for 30 min in a water bath, and the bacterial genomic DNA was then digested at 30 °C for 30 min using DNase I (Promega) in the presence of 0.008 M MgCl₂ and 0.01 M CaCl₂. The lysate was centrifuged (12,000 g for 30 min at 4 °C) and the supernatant [soluble cell lysate (SCL)] was kept at -20 °C until use.

2.6 Purification of the recombinant chitinase

The cell-free medium (CFM) containing the recombinant chitinase was dialyzed against distilled water, added of ammonium sulfate at 95% saturation and incubated at room temperature for approximately 20 h. The precipitated proteins (F0/95) were recovered by centrifugation (15,000 g, 30 min, 4 °C) and resuspended in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 1 M NaCl. The mixture was incubated for 1 hora at 4 °C and the insoluble materials were then removed by centrifugation (15,000 g, 10 min, 4 °C). The clear supernatant was loaded onto a chitin column (1.6 × 14 cm), which was prepared from practical grade chitin from crab shells (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The chitin matrix was previously equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 1 M NaCl. Unbound proteins were removed by washing the column with the equilibration buffer, while the adsorbed proteins were eluted with 0.1 M acetic acid. Fractions with an A₂₈₀ greater than 0.050 were pooled and dialyzed against 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 0.005 M imidazole. The mixture was incubated for 1 h at 4 °C and the insoluble

materials were then removed by centrifugation (10,000 g, 10 min, 25 °C). The clear supernatant was loaded onto a Ni Sepharose® 6 Fast Flow (1.0 × 3 cm), (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The matrix was equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 0.005 M imidazole and the protein sample was loaded onto the matrix. Unbound proteins were eluted by washing the column with the equilibration buffer, and the adsorbed proteins were recovered by elution with 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 0.15 M imidazole. Fractions with an A280 greater than 0.050 were pooled and dialyzed against distilled water. The dialyzed material was centrifuged (12,000 g, 10 min, 4 °C) and concentrated by ultrafiltration using a 3-kDa cutoff membrane (Vivaspin 20, GE Healthcare).

2.7 Soluble protein quantification and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

The concentration of soluble proteins of the pure recombinant chitinase (CvChi47) was estimated by measuring the absorbance at 280 nm, according to (Gill and von Hippel, 1989). For all other samples the estimation of the soluble protein content was performed following the protocol described by (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard. Polyacrylamide gel electrophoresis (15% slab gels) were performed under denaturing and reducing conditions according to (LAEMMLI, 1970). The treatment of the samples was performed as previously described by Lobo *et al.*, (2013) and the staining of protein bands was as described by (CANDIANO *et al.*, 2004).

2.8 Mass spectrometry analysis of CvChi47

Protein sample, 50 µg, was dissolved in 0.05 M ammonium bicarbonate, denatured in the presence of 0.2% (v/v) RapiGEST SF (Waters, Manchester, U.K.) at 80 °C for 15 min in a dry bath, reduced with 0.1 M dithiothreitol (DTT) at 60 °C for 60 min and alkylated with 0.3 M iodoacetamide (IAA) for 30 min in the dark at 25 °C. Thereafter, the samples were digested with a modified trypsin (Promega, Madison, WI) for 12 h, at 37 °C, at a 1:100 (w/w) enzyme/protein ratio. To hydrolyze RapiGEST SF and stop digestion, was added 10 µL of 5% trifluoroacetic acid (TFA) in the sample, incubated for 90 min at 37°C, and centrifuged (14,000 g for 30 min at 6°C), and the

supernatant was transferred to a Waters Total Recovery vial (Waters, Manchester, U.K.). The ultra-performance liquid chromatography (UPLC) for separation of tryptic peptides was performed using a nanoACQUITY UPLC system (Waters, Manchester, U.K.) equipped with a HSS T3 C18 reverse-phase column (1.8 μm , 75 μm \times 20 mm) equilibrated with 0.1% (v/v) formic acid in water. Elution was carried out at 0.35 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate using 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile in a gradient program consisting of 0 – 40% for 90 min and 40 – 85% for 5 min. Aliquots of the chromatographic fractions were then subjected to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS) analysis, using a Synapt G1 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, U.K.). The ESI-LC-MS/MS data were processed, and the peptides were identified using (UniProtKB) database.

2.9 Chitinolytic activity assays

Chitinase activity was determined according to the method described by Boller (1992). Colloidal chitin was chosen as the substrate and its preparation followed the method described by (MOLANO; DURÁN; CABIB, 1977), using non-radioactive acetic anhydride. The soluble chitin oligomers released by the hydrolysis of colloidal chitin were separated from the colloidal chitin by centrifugation and the supernatant was subjected to a second enzymatic reaction for complete cleavage by a β -glucuronidase (BOLLER *et al.*, 1983). The reaction mixture containing 250 μL of 1% w/v colloidal chitin and 250 μL of sample solution was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for one hour. The reaction was stopped by boiling for 5 min in a water bath, cooled on ice and then centrifuged (10,000 g, 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min), and 300 μL of the supernatant was transferred to a clean microcentrifuge tube containing 10 μL of 10 U/mL β -glucuronidase (EC 3.2.1.31) type HP-2 (Sigma-Aldrich). Reactions were further incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, boiled for 5 min and cooled on ice. 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2 (190 μL) and 100 μL of 0.6 M potassium tetraborate were added and the reaction mixture boiled again for 5 min and cooled on ice for 5 min. Following, 1.0 mL of 5% (w/v) p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB, Sigma-Aldrich) prepared in 0.7 M HCl (diluted in 100% acetic acid) was added, and the absorbance at 585 nm was determined. The amount of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) released was estimated from a standard curve prepared with varying concentrations (100-600 μM) of GlcNAc (REISSIG;

STORMINGER; LELOIR, 1955). One unit (U) of the chitinase activity was defined as the amount of sample required to release 1 nmol of GlcNAc/mL/h at 37 °C.

2.10 Temperature and optimum pH of enzyme activity

The optimum temperature for chitinase activity was determined by incubating the purified CvChi47 in 1% w/v colloidal chitin as substrate at various temperatures (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C) for 1 hour at pH 5.2. The remainder of the assay was performed under the standard conditions stated before. To determine the optimum pH of enzymatic activity CvChi47 was incubated in conjunction with 1% w/v colloidal chitin in different buffer systems: 0.05 M glycine-HCl (pH 2.0 and 3.0), 0.05 M sodium acetate (pH 4.0 and 5.0), 0.05 M sodium phosphate (pH 6.0 and 7.0), 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) and 0.05 M glycine-NaOH (pH 9.0 and 10.0) for 1 hour at 60 °C. The remainder of the assay was performed under standard assay conditions. For both temperature and pH conditions, the relative activity was expressed as a percentage of the highest activity recorded at a certain temperature or pH value.

2.11 Effects of pH, temperature and metal ions

To evaluate the effect of pH on enzyme stability, CvChi47 was diluted in the same buffer systems used in the previous section at a final concentration of 100 ng/μL and the residual chitinase activity was determined under standard assay conditions. The effect of temperature on enzyme stability was evaluated by incubating the protein (100 ng/μL in distilled water) at different temperatures (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C) for 1 hour in a water bath. After heat treatment, the samples were stored at -20°C until the remaining chitinase activity was measured using standard assay conditions. In both cases (temperature and pH) the relative chitinase activity was expressed as a percentage of the highest activity recorded at a certain temperature or pH value. The effect of ions [Al³⁺ (AlCl₃), Ba²⁺ (BaCl₂), Cd²⁺ (CdCl₂), Ca²⁺ (CaCl₂), Cs⁺ (CsCl), Co²⁺ (CoCl₂), Cu²⁺ (CuSO₄), Sr²⁺ (SrCl₂), Fe²⁺ (FeSO₄), La³⁺ (LaCl₃), Li⁺ (LiOH), Mg²⁺ (MgCl₂), Mn²⁺ (MnCl₂), Hg²⁺ (HgCl₂), Ni²⁺ (NiCl₂), Ag⁺ (AgNO₃), Rb⁺ (RbCl), and Zn²⁺ (ZnSO₄)], on the enzymatic activity was carried out under standard conditions, including the ion (0.025 M) to be tested in the reaction mixture. The residual

hydrolytic activity was determined and expressed as a percentage of the activity recorded in the absence of ions.

2.12 Effect of chemical compounds on the stability of the enzyme activity

The following chemical reagents: 5% (w/v) dithiothreitol (DDT), 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.005M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) were individually added to the reaction mixtures for chitinase activity in order to verify the effects they can cause over the action of CvChi47 under standard assay conditions. The residual hydrolytic activity was determined and expressed as a percentage of the activity recorded in the absence of each reagent.

2.13 Antifungal activity of CvChi47

The preparation of the conidial suspension was carried out when the growth of the fungi reached the entire diameter of the dishes, which occurred 10 days after the replication. A volume of 10 ml of sterile distilled water was added to the dishes to which and then scraped the culture with the aid of a Drigalski spatula. The obtained material was then filtered on cotton gauze to remove hyphae fragments. Conidia counts were collected in the Neubauer chamber and diluted to the conidial concentration of 4.0×10^5 conidia/mL. The action of the enzyme on the inhibition of conidial germination was performed according to the methodology described by Ji and Kuć (1996), with some modifications. Aliquots of 10 μ L of the conidial suspension (4.0×10^5 conidia/mL) were incubated with 10 μ L of CvChi47 (1 mg/mL) diluted in sterile distilled water in Rodac type plates. These plates were maintained in a Biological Organism Development (BOD) chamber with controlled photoperiod and temperature (28 °C, 12 hours light/12 hours dark). As a negative control sterile distilled water, without the presence of the protein, was used. After the germination period, the conidia were observed under a light microscope (Axio Imager A2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). Images were taken using an Axio Cam AX10 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) camera. Those conidia whose germ tube presented a size superior to two times the size of the conidia itself were considered as being germinated. The experiments were performed in triplicate. A similar assay was conducted in which

the conidial suspension (4.0×10^5 conidia/mL) and CvChi47 (1 mg/mL) were incubated for two hours at 28 °C in sterile distilled water. Controls were made by incubation of conidia with sterile distilled water without the presence of the protein. These samples were inoculated in Petri dishes containing PDA medium in such a way that the left side of the plates contained the protein plus conidia, while the right side of the plate contained the conidia and water (control). Mycelial growth was monitored for 7 days and photographed.

2.14 Atomic force microscopy analysis

Atomic force microscopy experiments were conducted to evaluate in details the possible morphological alterations caused by CvChi47 on the surface of *F. proliferatum* conidia in which chitinase were most effective. A 25 μ L conidia suspension adjusted to 2×10^4 conidia/mL was incubated with 25 μ L of CvChi47 (10.82 μ M or 0.5 mg/mL) for 6 horas at 28 °C. Control conidia were incubated with ultrapure sterile water. The cells were then washed three times with sterile water by centrifugation at 3000 g for 5 min at 4 °C and the resulting conidial pellet was resuspended in 50 μ L of sterile water. A volume of 10 μ L of the conidia suspension was placed on a glass slide and dried in a desiccator for 10 min.

3 RESULTS

3.1 Sequence analysis

The *ORF* (CV1440) from *C. violaceum* ATCC 12472 encodes a putative hydrolase transmembrane protein [GenBank: AAQ59115.1] belonging to the family GH18 with 450 amino acid residues. The protein has a modular structure (Figure 1) and is composed by a 25 residues signal peptide at its N-terminal end, a catalytic domain (CatD; residues 26 to 331), followed by a Gly/Asn-rich linker region (residues 332 to 361), two chitin-binding domains [ChBD; residues 362 to 400 (ChBDCvChi47A) and 410 to 446 (ChBDCvChi47B) respectively], separated by a Gln/Gly-rich linker (residues 401 to 409) at the C-terminal region, and a C-terminal extension (residues 447 - 450). The presence of the putative signal peptide (Figure S2) suggests that the protein is synthesized as a pre-protein that is presumably targeted to the general

secretory (Sec) pathway of *C. violaceum*. The protein is herein referred to as CvChi47 (for chitinase precursor of 47.4 kDa from *C. violaceum*). The predicted pI and molecular mass of the encoded polypeptide were 8.1 and 47.4 kDa, respectively.

CvChi47 is compounded by 6 Cys residues on its primary sequence, which form 3 disulfide bonds, according to DiANNA 1.1 web server prediction. The cysteine residues putatively involved in these interactions are: 65Cys-Cys430; 117Cys-Cys316 and 305Cys-Cys421. The complete catalytic domain (CatD) of CvChi47 spans 68% of its full-length amino

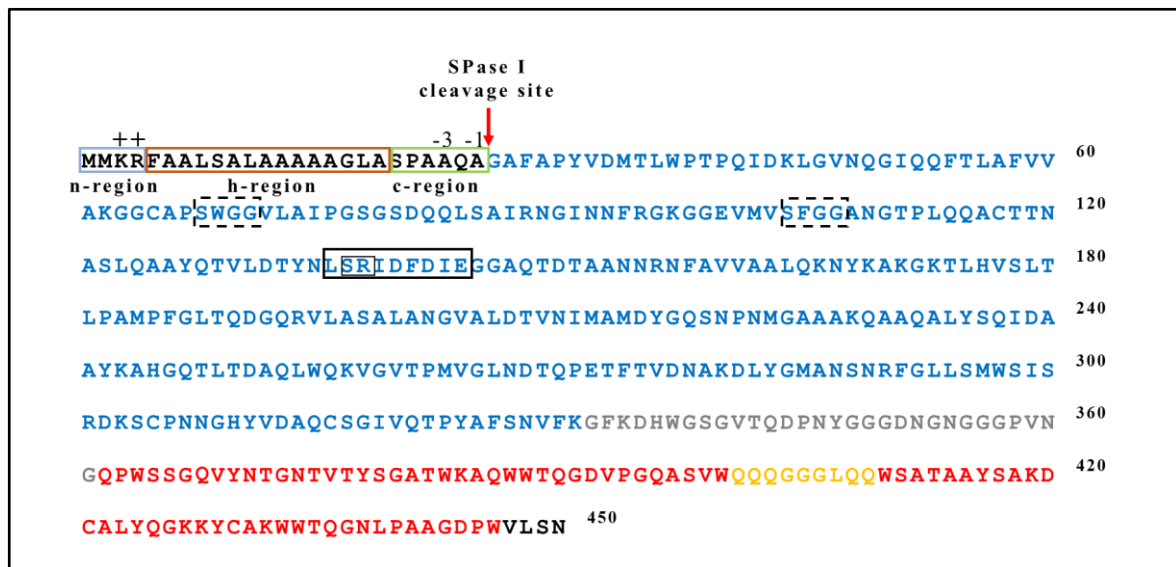


FIGURE 1. Primary structure of the CvChi47 protein encoded by the CV1440 ORF of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. The amino acid sequence of CvChi47 is shown, highlighting the N-terminal signal peptide (inside the colored box), the CatD (in blue), the Gly/Asn-rich linker (in gray), two ChBD (in red) separated by a linker Gln/Gly-rich linker (in yellow), and the C-terminal extension (in black). The initial n-region of the signal peptide are boxed in blue (aa 1-4), the central h-region of the SP are boxed in orange (aa 5-16), and final c-region of the SP are boxed in green. The symbols above SP sequence refer to positively (+)-charged residues in the n-region, Ala residues (-3, and -1), and Spase I cleavage site (arrow) in the c-region. The boundaries between these regions were determined by the SignalP 4.1 program (PETERSEN *et al.*, 2011). Structural motifs in the CatD that are involved in substrate binding are boxed in dashed line, and structural motifs in the CatD that are involved in catalysis are boxed in continuous line black, unusual residues of chitinolytic site

indicated by internal box. The numbers of the residues relative to Met1 are shown on the right side of the sequence.

Amino acid sequence and contains six [136LSRIDFDIE144; the conserved residues are highlighted in bold] of the eight conserved amino acid residues that constitute an active site signature pattern, [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]- [LIVMF]-[DN]-X-E (PROSITE accession number PS01095), typically found on GH18 family chitinases. The chitin-binding domain of CvChi47 is a member of the ChiBD type 3 (ChtBD3) superfamily and belongs to the carbohydrate-binding module family 5 (CBM5), according to its CAZy classification. Two of the three consensus motifs that are conserved in catalytic domains of GH18 chitinases were found in CvChi47 (Figure 1). These structural motifs are involved in substrate binding (68SWG71 and 104SFGG107) and catalysis (139xD2xD3xE144; superscript numbers refer to the CvChi47 amino acid sequence).

3.2 Recombinant protein expression

After inoculation of *E. coli* BL21 (DE3) cells transformed with plasmid pET303-Cv1440 numerous colonies were observed on the solid medium after incubation for 16 h. The expression of the recombinant protein CvChi47 was achieved by adding IPTG to the culture medium. The highest level of chitinolytic activity was detected in the cell free medium (CFM) fraction (758.0 U) (Table 1), after 24 h of induction, while only minor levels of activities, 2.2% and 0.1% of the total chitinolytic activity of CFM, were observed for the (periplasmic fraction) PF and soluble cell lysate (SCL) fraction, respectively (Figure 2). These results suggest that the secretion of CvChi47 by the *E. coli* cells was directed by its native signal peptide, with most of the active protein being present in the CFM fraction.

3.3 Purification, characterization and evaluation of pH, temperature, metal ions and chemicals effects over CvChi47 activity

The application of CFM fraction onto a chitin matrix affinity chromatography resulted in two peaks, P1 and P2 corresponding to non-adsorbed and adsorbed proteins, respectively (Figure 3A). When analyzed under denaturing and reducing polyacrylamide gel electrophoreses it was noted that a band of approximately 46.1

kDa, which we presume to be the recombinant chitinase, was predominantly present on P2. In addition, no chitinolytic activity was detected on P1, but only on P2 showing that the binding of the recombinant CvChi47 to the chitin matrix was very effective. This chromatography step resulted in a purification factor of 8.29x (Table 1) and approximately 86.1% of the total chitinolytic activity that was previously detected in the CFM fraction was recovered. The complete purification of CvChi47 was achieved when the retained proteins from the chitin matrix (P2) were applied to a nickel-sepharose affinity matrix. The purified chitinase was eluted at a concentration of 0.15 M imidazole, which resulted in a single and sharp protein peak (Figure 4A). The (Figure 4B) shows the electrophoretic profile of the purified recombinant CvChi47. This final chromatographic step resulted in a purification factor of around 38.67x and about 31.6% of the total chitinolytic activity that was present in the CFM fraction was recovered. The yield of the purified recombinant protein was ca. 3 mg per

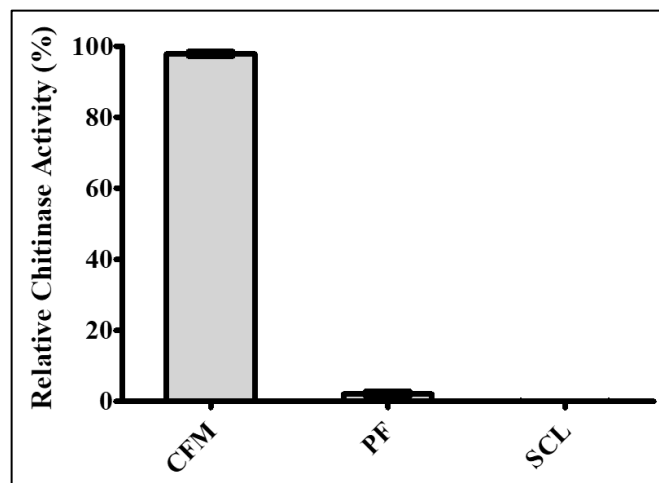


FIGURE 2. Chitinolytic activity of subcellular fraction of *E. coli* BL21(DE3) cells harboring either the recombinant expression vector pET303CV1440-His. CFM: Cell-free medium. PF: Periplasmic fraction. SCL: Soluble cell lysates. Obtaining of the fractions and measuring chitinolytic activity was described in the Methods section. Data represent mean \pm SD ($n = 3$); $P < 0.05$.

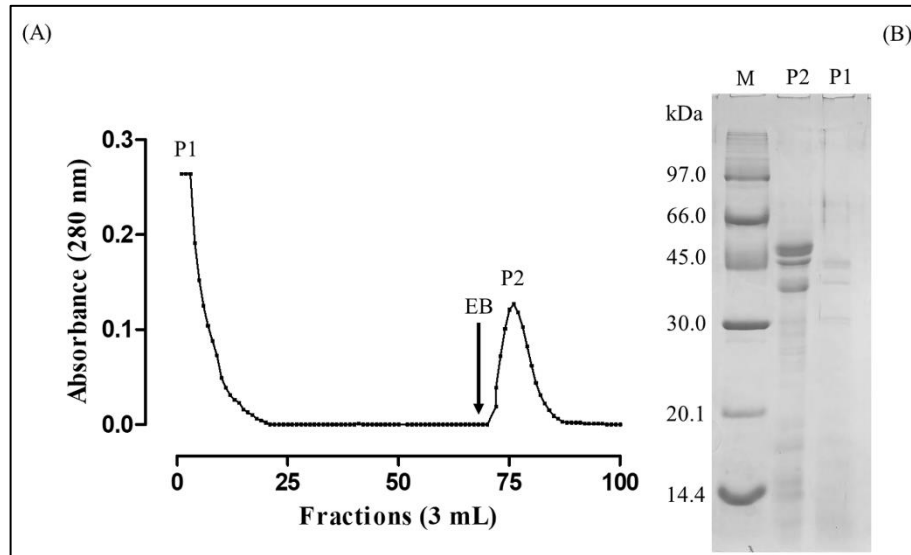


FIGURE 3. Affinity chromatography on a chitin matrix (A) and SDS-PAGE analysis (B). (A) Partial purification of recombinant CvChi47 secreted into the *E. coli* culture medium. The cell free medium containing secreted proteins were concentrated as described in the Methods section and loaded onto a chitin column that was equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.2) containing 1 M NaCl. After washing off the unbound proteins (P1), the recombinant protein was eluted with 0.1 M acetic acid (P2). (B) SDS-PAGE, the CvChi47 was identified in the P2 line. M: molecular weight markers. P1: proteins that did not bind a matrix.

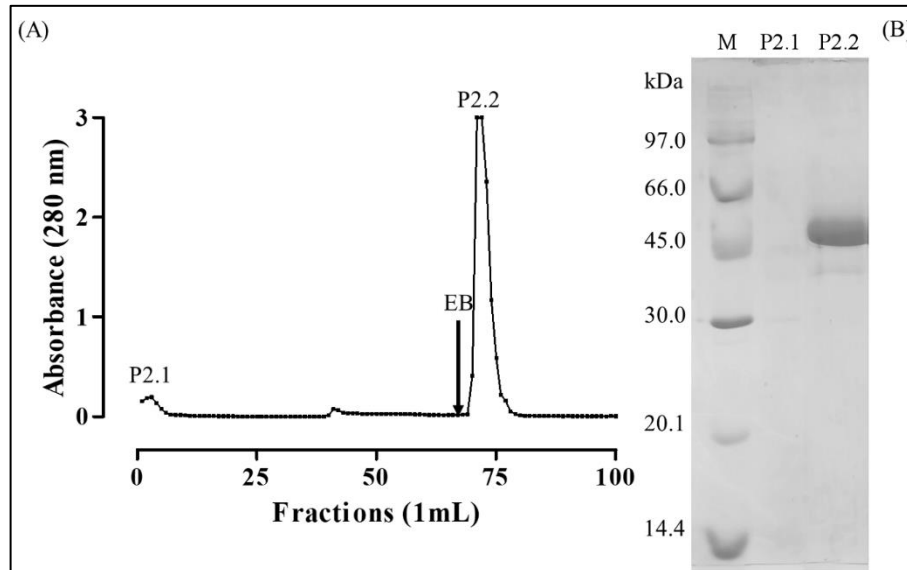


FIGURE 4. Affinity chromatography on immobilized nickel (A) and SDS-PAGE analysis (B). (A) Purification of recombinant CvChi47 using a P2 fraction from the chromatography chitin matrix (120 mg). The P2.1 fraction were washed with 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.5 M NaCl, 0.005 M imidazole and P2.2 fraction were eluted with 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.5 M NaCl, 0.15 M imidazole. (B) SDS-PAGE analysis of purified recombinant CvChi47 (P2.2). M: molecular weight markers. P2.1: proteins that did not bind a matrix.

TABLE 1. Summary of purification. Data obtained from 100 ml of culture medium (Induced with 0.4 mM IPTG at 37 ° C for 24 hours). * 1U = at 1 nmol GlcNac / hour.

Fractio n	Total Protein (mg)	Total Activity (U*)	Specific Activity (U*/mg protein)	Purificatio n Fold
CFM	11.6	758.0	65.3	1
P2	1.4	652.7	466.2	8.29
P2.2	0.3	239.9	979.7	38.67

liter of induced culture, which represents approximately 2.57% of the total soluble protein content in the CFM (Table 1). SignalP 4.1 predicted the presence of a signal

peptide at the N-terminal end of CvChi47. The putative cleavage was characterized as belonging to the type I and it was present between Ala25-Gly26 residues, with a cleavage index of $D=0.888$ (Figure S2).

CvChi47 presented chitinolytic activity in a broad range of pH (pH 2-9), with an optimum activity recorded at pH 5. Significant hydrolysis of chitin was also detected at pH 4 (81.7%) and 6 (64.8%) (Figure 5A). The enzyme was also capable to recover part of its activity when incubated for 3 hours at pH values ranging from 2-10 and then returned to pH 5. The more pronounced recoveries detected were from pH 4, 5 and 6 in which CvChi47 presented 68.18, 97.20 and 84.16% of chitinolytic activity, respectively (Figure 5A).

The optimum temperature detected for pure CvChi47 was 60°C. Furthermore, the recombinant enzyme was considered a thermostable protein given the fact that it retains approximately 53.7% of its activity even after being heated at 100°C for 1 h (Figure 5B).

Addition of 0.025 M Cu^{2+} , Fe^{2+} , La^{3+} and Hg^{2+} cations caused a decrease of more than 50% of chitinolytic activity of CvChi47. The metals Cu^{2+} and Hg^{2+} diminished the activity up to 99.2% and 100% respectively. There was no significant increase in the chitinolytic activity of CvChi47 due to the addition of metal ions (Figure 5C). The presence of 0.005M EDTA did not influence the chitinolytic activity.

The incubation of CvChi47 with the chemicals 5% DTT, 5% β -mercaptoethanol and 0.5% SDS decreased the chitinolytic activity in 50.7%, 33.3% and 100%, respectively (Figure 6).

3.4 Mass spectrometry (MS) analysis

All the peptides identified through the mass spectrometry (MS) analysis were found to be belonging to the recombinant protein CvChi47 (Table 2), once they were in complete accordance with the amino acid sequence deduced from *C. violaceum* genomic DNA (ORF CV1440). The high purity of the recombinant protein was also verified and no contaminating sequences were detected on MS experiments. The percentage of coverage relative to the deduced amino acid sequence was 77.4% (Figure S3).

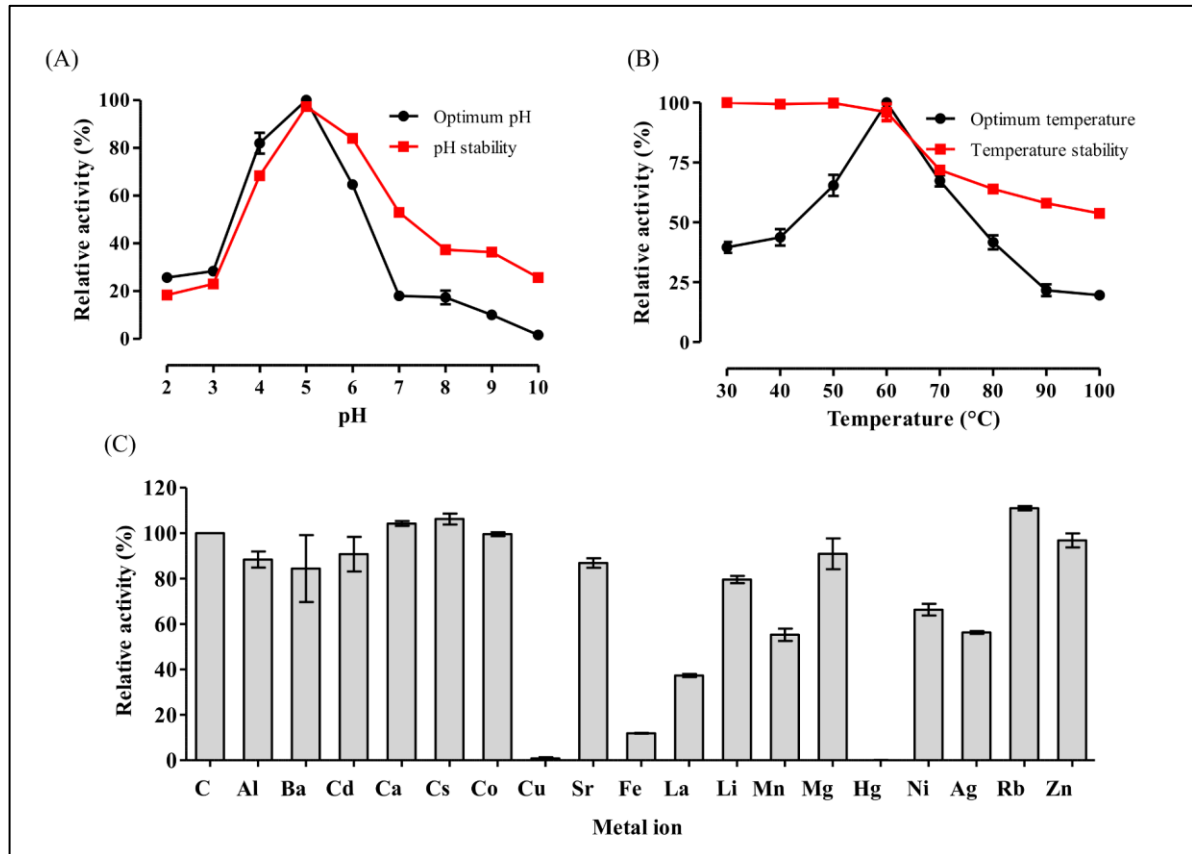


FIGURE 5. Effect of pH on chitinase activity and stability (A), effect of temperature on chitinase activity and stability (B), and effect of metal ions on residual chitinase activity (C). The effects this different conditions on chitinolytic activity of CvChi47 were analyzed with samples of the recombinant protein (100 ng/ μ L), and the hydrolytic activity was determined using colloidal chitin as a substrate. The relative activity was expressed as a percentage of the highest activity recorded in each experiment. Data represent mean \pm SD ($n = 3$); $P < 0.05$.

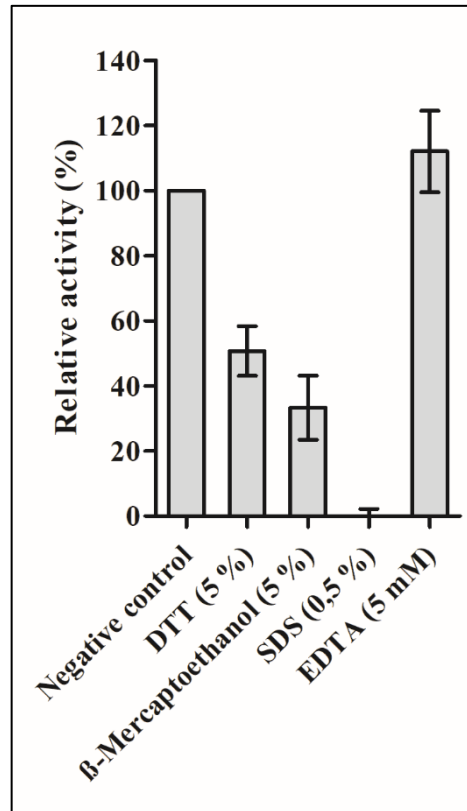


FIGURE 6. Effect of chemicals on chitinolytic activity. The CvChi47 was incubated with various ions and reagents at room temperature for 60 minutes then chitinase activity was assayed under standard conditions. The enzyme activity without any additive was considered as 100%. Data represent mean \pm SD (n = 3); $P < 0.05$.

3.5 Antifungal activity of chitinase

Initially, CvChi47 was active against the phytopathogenic fungi *F. oxysporum* and *F. proliferatum* (Figure 7). At a concentration of 1 mg/mL CvChi47 was able to inhibit the spore germination of both fungi species (Figure 7C and 7D) when compared to control (Figure 7A and 7B) in which no inhibition was verified. Assays in solid medium with *F. oxysporum* (Figure 7E - left) and *F. proliferatum* (Figure 7F - left), confirmed that the germination of both fungi was inhibited in the presence of CvChi47, when compared with the negative controls (Figures 7E - right and 7F - right).

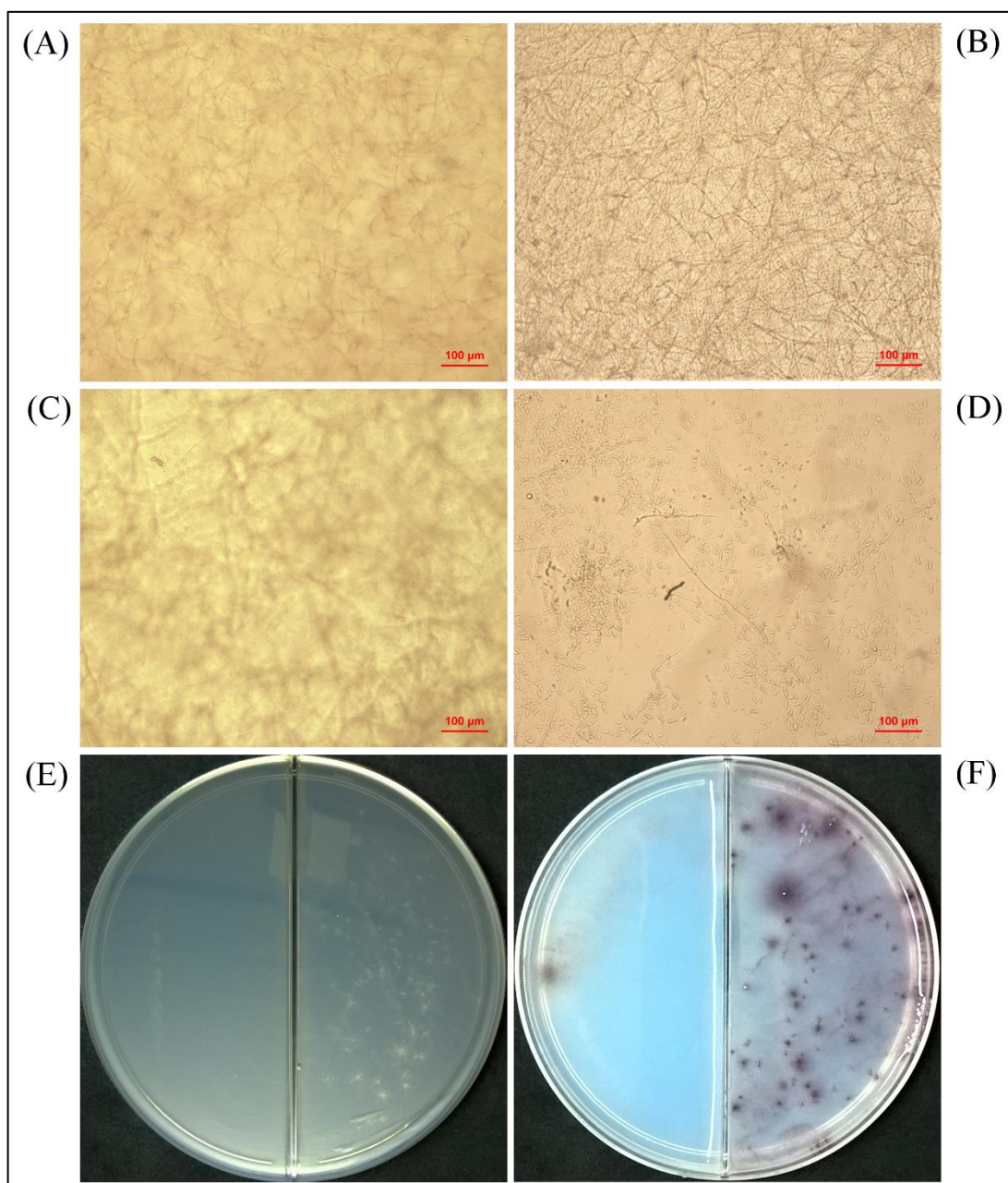


FIGURE 7. Antifungal activity of CvChi47. Inhibitory activity of conidial germination by CvChi47 (1 mg/mL): (A) *Fusarium oxysporum* x sterile water; (B) *Fusarium proliferatum* x sterile water; (C) *Fusarium oxysporum* x CvChi47; (D) *Fusarium proliferatum* x CvChi47. Inhibitory activity of conidial germination in Petri dishes. Petri dish was divided into two parts. (E - right side) negative control of *Fusarium oxysporum* (E - left side) *Fusarium oxysporum* treated with protein; (F - right side) negative control of *Fusarium proliferatum* (F - left side) *Fusarium proliferatum* treated with protein. Each part of Petri dish containing approximately 12.5 ml BDA culture medium

3.6 Atomic force microscopy analysis

The topological images and graphics acquired from atomic force microscopy experiments revealed a visible difference on the morphology of the surface of conidia of both *F. proliferatum* when with CvChi47. On the other hand, when the same study was performed on conidia previously incubated with ultrapure water alone, no morphological alterations were observed. Indeed, control experiments revealed conidia with a relatively smooth surface with no signs of rupture in addition to a well-turgid cell wall with uniform surface. However, the conidia of *F. proliferatum* treated with CvChi47 had an uneven cell surface (Figure 8) and they clearly show signs of loss of internal content (Figure 8), suggesting the existence of damage to the cell wall and consequently extravasation of cytoplasmic fluid.

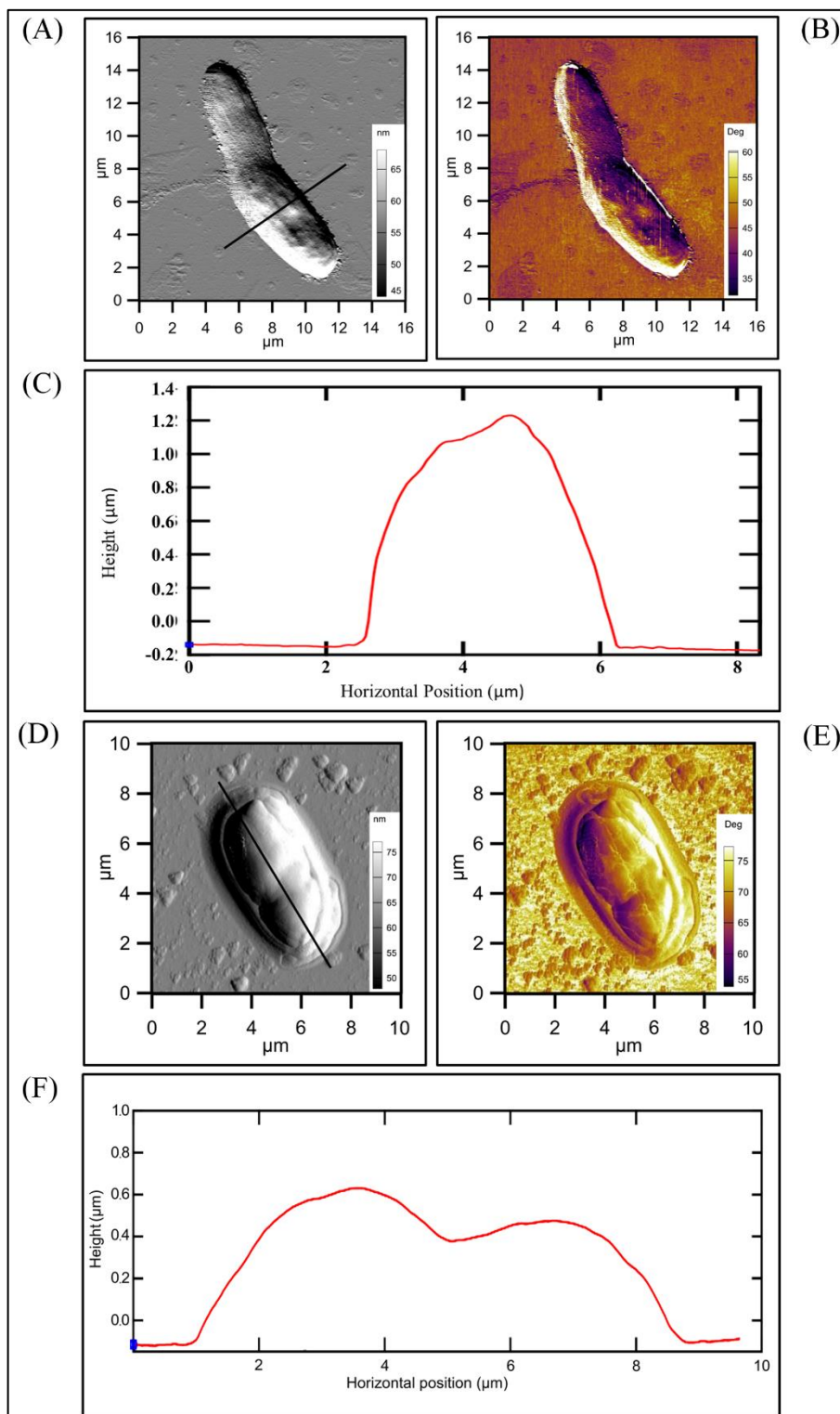


FIGURE 8. Analysis of topology of conidia treated with CvChi47 by atomic force microscopy. (A) amplitude image of conidia in sterile water; (B) phase image of conidia of *F. proliferatum* in sterile water CvChi47; (C) topological chart of the cut in "A". (D) amplitude image of conidia treated with CvChi47; (E) phase image of conidia treated with CvChi47; (F) topological chart of the cut in "D".

4 DISCUSSION

Chitin is a structural polysaccharide present in most fungi, arthropods and parasitic nematodes (BUCOLO *et al.*, 2011). It is estimated that its annual production in the marine environment alone will reach 1011 tons per year (KEYHANI, 1999). According to Beier and Bertilsson (2013) several works published over the last two decades recognize the importance of chitin, as well as the processes and the factors that control its degradation. Among these factors chitinase (hydrolytic enzymes that degrade chitin) plays a very important role in the recycling of this polysaccharide. Chitinases can be found in a variety of species, from microorganisms like bacteria and fungi to more complex beings such as animals and plants (KEZUKA *et al.*, 2006). However, the preferred sources of chitinases for scientific and economic exploration are the microorganisms, due to their availability and rapid growth (RICHA *et al.*, 2017).

C. violaceum is a free-living saprophyte bacterium that lives in soil and water, being able to use chitin as a source of carbon and nitrogen (KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2015). Several *ORFs* encoding possible extracellular chitinases are present in their genome (CHERNIN *et al.*, 1998).

In this work, a thermostable chitinase from the GH18 family (CvChi47) was produced and efficiently secreted into the culture medium by *E. coli* BL21 (DE3) cells. This result is very similar to that found by Lobo *et al.* (2013), demonstrating that the signal peptide predicted by SignalP 4.1 software directed the protein through the *E. coli* type I secretion system. However, an extremely low percentage of chitinolytic activity of about 2.2% and 0.1% was also encountered for the periplasmic and the soluble intracellular fractions, respectively. The electrophoretic profile under denaturing conditions (SDS-PAGE) of the purified protein showed an apparent molecular mass of approximately 46.1 kDa, instead of 47.4 kDa, the expected size of the 450-residues pre-protein encoded by the DNA sequence cloned into the expression vector. This difference of molecular mass indicates the removal of the signal peptide, which in the case of CvChi47 is composed by 25 amino acid residues. Similar findings were also observed by (LOBO *et al.*, 2013; POWER *et al.*, 1992).

In addition, CvChi47 presented good chitinolytic activity at slightly acidic pH values, such as pH 4 and 6. The optimum condition for chitinolytic activity was at pH 5. However, the molecule was stable at a broadest pH range (between 4 and 7). This feature may have physiological significance for *C. violaceum*, since it is a species well adapted to aquatic life, as well as wet and acidic pH sites (WYNN-WILLIAMS, 1983). Furthermore, these data are in agreement with that found by Karthik *et al.* (2015) who showed that most of the described chitinases show moderate to high activity as well as stability within the pH range of 4 to 10. This optimum pH range is also very common for other GH18s such as AMCase (BUCOLO *et al.*, 2011), CvChi45 (LOBO *et al.*, 2013), ChiA-Hh59 (BOUACEM *et al.*, 2018), *Rhizopus stolonifer* chitinase (SONAWANE *et al.*, 2016) and Ech30 (HOELL *et al.*, 2005).

According to Liu *et al.* (2015), two chitinases from *Brevibacillus laterosporus* (ChiA and ChiC) presented optimum temperatures for activity at 55 °C to 60 °C remaining stable up to 60 °C. However, none of the enzymes were able to maintain more than 20% of their residual activity after incubation at 80 °C. In the present study the best temperature for CvChi47 activity was at 60 °C, while at 70 °C the enzyme still preserves more than 60% of its functionality. CvChi47 was considered to be a thermostable enzyme, once it retained 53.7% of its residual activity even when heated at 100 °C for one hour. This characteristic qualifies CvChi47 as a promising biotechnological tool for industry, considering that most industrial processes require enzymes with a certain tolerance at elevated temperatures (ANBU *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016).

The good stability of CvChi47 to extreme temperatures, which allows the classification of this enzyme as a thermostable chitinase, may be explained, at least in part, by the presence of potential three disulfide bonds, a post-translational modification that provides the maintenance of the folding, stability and the functionality of a protein (KONG; GUO, 2014). In Gram-negative bacteria, like *E. coli* and *C. violaceum*, this modification typically occurs in the periplasmic region of the cell (LEE; DAVEY, 2017). Indeed, according to (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018) the production of recombinant proteins fused to a signal peptide is a strategy to targeting the protein to the periplasmic region, where the appropriate conditions and enzymes necessary to the formation of disulfide bonds are present.

Among the various salts evaluated for their effect on the activity of CvChi47, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} and La^{3+} reduced chitinase activity considerably, mainly the first two. In contrast, Bouacem *et al.* (2018) observed total loss of activity when chitinase was incubated in the presence of Cd^{2+} and Ni^{2+} ions. The published results on the effect of metal ions on chitinase are quite different and diverse.

The enzymatic activity of CvChi47 was not inhibited by the EDTA compound, however, the β -mercaptoethanol, and DTT reducing agents substantially reduced enzyme activity. Suggesting that metal ions may not be important in stabilizing the molecule, on the other hand, disulfide bonds appear to be important in the stability of the enzyme. Another chemical compound (SDS) has been shown to be very detrimental to the enzymatic activity of the molecule, this detergent possibly prevents interactions between chemical groups loaded from the active site, as well as interfering in the chitin binding sites. In Aliabadi *et al.* (2016) the SDS did not cause significant reduction of the enzymatic activity.

CvChi47 was active against the phytopathogens fungus *F. oxysporum* and *F. proliferatum*, both in liquid medium and in solid medium. Besides that, the AFM analysis show results with suggest that CvChi47 causes a deleterious effect on the cell wall which is composed of, among other compounds, chitin avoiding the germination and consequently the mycelial growth of the fungus. Relatively similar results were reported when spores of *F. solani* were treated with CpOsm, a latex protein, whose mechanism of action is attributed to altering their ability to alter the cellular permeability of spores (RAMOS *et al.*, 2015). This protein also has two chitin binding sites, a condition that facilitates its interaction with substrates formed by chitin. In addition, it has a chitinolytic activity at 60 °C twice and half more than that observed at the temperature of antifungal tests. The results strongly suggest the possibility of using CvChi47 as an alternative for the control of phytopathogens and for the development of pharmacological or industrial products.

5 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

6 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

AS realized the cloning experiments, the purification of the recombinant protein, and the chitinolytic activity assays, AS, AMM, JMJ and ML, characterized the recombinant protein. The experiments with fungi have conceived and designed for: AS, CS, JS and TG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMM, CS, JS and TG. TG conceived the work and coordinated the experiments. AS and JMJ prepared all of the figures. AS, JMJ and TG wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

7 FUNDING

This work was supported by research grants from Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

8 ACKNOWLEDGMENTS

Grangeiro, T. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., and Sousa, J. S. are senior researchers of CNPq. Material and intellectual contribution of Embrapa Agroindústria Tropical. Silva, C. F. B. is a researcher of Embrapa Agroindústria Tropical

9 REFERENCES

- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1786–1785, 2013.
- ALIABADI, N. *et al.* Thermostable chitinase from *Cohnella* sp. A01: isolation and product optimization. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 931–940, 2016.
- ANBU, P. *et al.* Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1–3, 2017.
- ARIMORI, T. *et al.* Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 26, p. 18696–18706, 2013.
- BEIER, S.; BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, n. JUN, p. 1–12, 2013.

- BOLLER, T. *et al.* Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, v. 157, n. 1, p. 22–31, 1983.
- BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and α -1,3-glucanases. In: MCPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J. (Eds.). *Molecular Plant Pathology: a Practical Approach*. 2. ed. New York: Oxford University press, 1992. p. 23–30.
- BOUACEM, K. *et al.* Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 338–350, 2018.
- BRZEZINSKA, M. S. *et al.* Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 71–81, 2014.
- BUCOLO, C. *et al.* Acidic mammalian chitinase and the eye: Implications for ocular inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, v. JUL, n. July, p. 1–4, 2011.
- CANDIANO, G. *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004.
- CHERNIN, L. S. *et al.* Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum* : Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum* : Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. v. 180, n. 17, p. 4435–4441, 1998.
- FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic acids research*, v. 34, n. Web Server issue, p. W182-5, 1 jul. 2006.
- FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans*. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 40, p. 623–630, 2009.
- FUJITA, K. *et al.* A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 345, n. 1, p. 502–507, 2006.
- FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 1–16, 2007.
- GAO, J. *et al.* Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3119, 2003.
- GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, p. 571–607, 2005.

GIGOT, C. Plant gene isolation: Principles and practice. *Plant Science*, v. 121, n. 2, p. 231–232, 1 dez. 1996.

HAMID, R. *et al.* Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.

HAO, Z. *et al.* Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated Chitolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 177–186, 2012.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochemical Journal*, v. 280, n. (Pt 2), p. 309–316, 1991.

HOELL, I. A. *et al.* Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1748, n. 2, p. 180–190, 2005.

ISELI, B. *et al.* Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters*, v. 382, n. 1–2, p. 186–188, 11 mar. 1996.

JI, C.; KUĆ, J. Antifungal activity of cucumber beta-1,3-glucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 49, n. 4, p. 257–265, 1996.

JOO, G. J. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, v. 27, n. 19, p. 1483–1486, 2005.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*, v. 188, p. 195–201, 2015.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, n. 10, p. 803–822, jan. 2018.

KEYHANI, N. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1473, n. 1, p. 108–122, 17 dez. 1999.

KEZUKA, Y. *et al.* Structural Studies of a Two-domain Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *Journal of Molecular Biology*, v. 358, n. 2, p. 472–484, 2006.

KHAN, M. S. *et al.* Impact of Transgenic *Brassica napus* Harboring the Antifungal Synthetic Chitinase (NiC) Gene on Rhizosphere Microbial Diversity and Enzyme Activities. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. July, p. 1–13, 2017.

KOBURGER, J. A.; MAY, S. O. Isolation of *Chromobacterium* spp. from foods, soil, and water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 1463–1465, 1982.

- KOCH, B. E.; STOUGAARD, J.; SPAINK, H. P. Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research. *Glycobiology*, v. 25, n. 5, p. 469–482, 2015.
- KONG, B.; GUO, G. L. Soluble expression of disulfide bond containing proteins FGF15 and FGF19 in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.
- KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell*, v. 20, n. 3, p. 749–760, 1980.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LANDIM, P. G. C. *et al.* Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. *Biochimie*, v. 135, p. 89–103, 2017.
- LEE, S. F.; DAVEY, L. Disulfide Bonds: A Key Modification in Bacterial Extracytoplasmic Proteins. *Journal of Dental Research*, v. 96, n. 13, p. 1465–1473, 10 dez. 2017.
- LIN, S. BIN; CHEN, S. H.; PENG, K. C. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of ??-chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, n. 2, p. 238–244, 2009.
- LIU, P.; CHENG, D.; MIAO, L. Characterization of thermotolerant chitinases encoded by a *Brevibacillus laterosporus* strain isolated from a suburban wetland. *Genes*, v. 6, n. 4, p. 1268–1282, 2015.
- LOBO, M. D. P. *et al.* Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, v. 13, 2013.
- LOMBARD, V. *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.
- MARCHLER-BAUER, A. *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.
- MATROODI, S. *et al.* Physicochemical study of a novel chimeric chitinase with enhanced binding ability. v. 45, n. 10, p. 845–856, 2013.
- MOLANO, J.; DURÁN, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 2, p. 648–656, 1977.
- NAKAGAWA, Y. S. *et al.* Development of innovative technologies to decrease the environmental burdens associated with using chitin as a biomass resource: Mechanochemical grinding and enzymatic degradation. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, n. 4, p. 1843–1849, 2011.

PERRAKIS, A. *et al.* Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, v. 2, n. 12, p. 1169–1180, 1994.

PETERSEN, T. N. *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

POWER, B. E. *et al.* High-level temperature-induced synthesis of an antibody VH-domain in *Escherichia coli* using the PelB secretion signal. *Gene*, v. 113, n. 1, p. 95–9, 1 abr. 1992.

RAMOS, M. V. *et al.* Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. *Phytochemistry*, v. 119, p. 5–18, 2015.

REISSIG, J. L.; STORMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *The Journal of biological chemistry*, v. 217, n. 2, p. 959–66, dez. 1955.

RICHA, K. *et al.* Novel Chitinase Gene LOC_Os11g47510 from Indica Rice Tetep Provides Enhanced Resistance against Sheath Blight Pathogen *Rhizoctonia solani* in Rice. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. April, p. 1–10, 2017.

SAIMA, K. M.; ROOHI, A. I. Z. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2013.

SAMBROOK. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. [s.l.] Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.

SINGH, G. *et al.* RESEARCH AND REVIEWS : JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND Potential of Chitinases as a Biopesticide against Agriculturally Harmful Fungi and. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 27–32, 2014.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, 2016.

SONAWANE, K. D. *et al.* Intergeneric fusant development using chitinase preparation of *Rhizopus stolonifer* NCIM 880. *AMB Express*, v. 6, n. 1, 2016.

ŠTROJISOVÁ, A.; DYHRMAN, S. T. Cell-specific β -N-acetylglucosaminidase activity in cultures and field populations of eukaryotic marine phytoplankton. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 64, n. 3, p. 351–361, 2008.

ŠTROJISOVÁ, M.; VRBA, J. Direct detection of digestive enzymes in planktonic rotifers using enzyme-labelled fluorescence (ELF). *Marine and Freshwater Research*, v. 56, n. 2, p. 189–195, 2005.

SYNSTAD, B. *et al.* Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 2, p. 253–262, 2004.

TABATA, E. *et al.* Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

TEWS, I. *et al.* Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 34, p. 7954–7959, 1997.

UBHAYASEKERA, W. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polymer International*, v. 60, n. 6, p. 890–896, 2011.

UDAYA PRAKASH, N. A. *et al.* Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *Journal of Molecular Evolution*, v. 70, n. 5, p. 466–478, 2010.

VASCONCELOS, A. T. R. *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 20, p. 11660–11665, 30 set. 2003.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Distribution and characteristics of *Chromobacterium* in the maritime and sub-antarctic. *Polar Biology*, v. 2, n. 2, p. 101–108, 1983.

WYSOKOWSKI, M. *et al.* Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics. *Polymers*, v. 7, n. 2, p. 235–265, 2015.