



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MIRELE RODRIGUES FERNANDES

**DEGRADAÇÃO DE QUITINA EM *Chromobacterium*: PROPOSIÇÃO DA VIA
CATABÓLICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA MONOOXIGENASE
LÍTICA DE POLISSACARÍDEO DE *C. violaceum* ATCC 12472**

FORTALEZA

2017

MIRELE RODRIGUES FERNANDES

DEGRADAÇÃO DE QUITINA EM *Chromobacterium*: PROPOSIÇÃO DA VIA
CATABÓLICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA MONOOXIGENASE LÍTICA
DE POLISSACARÍDEO DE *C. violaceum* ATCC 12472

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa
Grangeiro

FORTALEZA

2017

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)

- F41d Fernandes, Mirele Rodrigues.
Degradação de quitina em *Chromobacterium* : proposição da via catabólica e expressão heteróloga de uma monooxigenase lítica de polissacarídeo de *C. violaceum* ATCC 12472 / Mirele Rodrigues Fernandes. – 2017.
111 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. *Chromobacterium*. 2. Monooxigenases líticas de polissacarídeo. 3. Degradação de quitina. I. Título.
CDD 570
-

MIRELE RODRIGUES FERNANDES

DEGRADAÇÃO DE QUITINA EM *Chromobacterium*: PROPOSIÇÃO DA VIA
CATABÓLICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA MONOOXIGENASE LÍTICA
DE POLISSACARÍDEO DE *C. violaceum* ATCC 12472

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. José Edvar Monteiro Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.^a Simone Torres de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, por tudo.

Ao Ronaldo, por estar sempre aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha família. Em especial à minha mãe, por todo esforço, e à minha madrinha Leda e seu marido, Beto, por me acolherem nos meus primeiros passos como universitária.

Ao meu namorado, Ronaldo, por me manter sã nesta última etapa, e à sua mãe, D. Fátima, por toda amizade e preocupação comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela paciência, por aceitar minhas ideias, mesmo quando a aplicação parecia difícil, por me ajudar a torná-las plausíveis e por toda orientação.

Aos membros da banca examinadora e colegas de laboratório, Simone e Edvar, pela enorme ajuda, por todas as sugestões e pela paciência.

À todos os integrantes do Laboratório de Genética Molecular, que permanecem e que já partiram: Ednésio, que me mostrou os primeiros passos na Biologia Molecular e Bioinformática; Juscelino, pela co-orientação durante grande parte da minha permanência no laboratório; Suelen, sempre disposta a ajudar; Mayara e Erlane, pelos cafés com M&M; e a todos os que não foram citados, mas igualmente contribuíram nestes três anos e meio.

Aos meus amigos da graduação, João Marcos, Thaís, Átila, Nil, Mayara e Lucas, pelos momentos de risada, pão bola, castanhola e os dias no Pacheco.

Ao CNPq e à Capes, pelo financiamento.

À todos aqueles que não citei, por esquecimento, mas contribuíram nessa jornada.

“DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”
(Mário Quintana)

“Somos feitos de poeira estelar.”
(Carl Sagan)

RESUMO

O gênero *Chromobacterium* é composto por Betaproteobactérias Gram-negativas, saprofíticas e de vida livre, com alguns representantes patogênicos. O grupo apresentou significativo crescimento entre 2007 e 2017 com a descoberta de dez novas espécies. *Chromobacterium violaceum* é sua integrante mais estudada e a primeira a ser descrita. A espécie é comumente encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais como saprófita, sendo capaz de utilizar apenas quitina como fonte de energia. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e pode ser utilizado como fonte de carbono e nitrogênio por diversos organismos, incluindo bactérias. Sua degradação é iniciada por monooxigenases líticas de polissacarídeo (LPMOs), ativas em substrato cristalino. O presente trabalho teve como objetivo a construção, por análises de genômica comparativa, do catabolismo de quitina de *Chromobacterium* e a expressão de uma LPMO de *C. violaceum* ATCC 12472. Assim, foi construída uma provável via catabólica em *C. violaceum* ATCC 12472 a partir daquela descrita para a família Vibrionaceae, das informações obtidas sobre o regulon NagQ na espécie e por análises *in silico* das localizações subcelulares de cada proteína selecionada. A via foi expandida a nível de gênero pela localização de ortólogos nos 41 genomas de integrantes de *Chromobacterium* disponíveis no banco de dados do NCBI. Foram encontradas cinco sequências de LPMOs em *C. violaceum* ATCC 12472: CV0553, CV0554, CV2592, CV3323 e CV3489. Dentre essas, CV0553 e CV2592 tiveram suas sequências codificadoras sintetizadas com códons otimizados e inseridas em plasmídeos pET-Sumo modificados. Os vetores foram introduzidos nas cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3), SHuffle® T7 Express Competent e ArcticExpress (DE3). Das duas proteínas produzidas, apenas rCv2592-Sumo foi encontrada na forma solúvel na fração intracelular dos três hospedeiros analisados. A proteína recombinante foi purificada em matriz de quitina, sendo capaz de degradar α -quitina. Conclui-se que o catabolismo de quitina é conservado em *Chromobacterium*. Este é um indício da importância da quitina como fonte alternativa de energia no grupo. O gene para o regulador NagQ é bastante conservado no gênero, com sua forma plesiomórfica encontrada em *C. haemolyticum* e a mais recente em *C. violaceum*. Por fim, a produção de rCv2592 pode ser uma alternativa eficiente para a produção de derivados de quitina, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre o tema.

Palavras-chave: *Chromobacterium*. Monooxigenases líticas de polissacarídeo. Degradação de quitina. LPMO

ABSTRACT

The genus *Chromobacterium* is formed by Betaproteobacteria, Gram-negative, saprophytes, free living forms and a few of pathogenic bacteria. This group has shown significant growth between 2007 and 2017 with the discovery of ten new species. *Chromobacterium violaceum* was the first to be described and it is the most studied of the group. The species is commonly found in waters and soils of tropical and subtropical regions such as saprophytes, being able to use only chitin as an energy source. Chitin is the second most abundant biopolymer in nature and can be used as a source of carbon and nitrogen by multiple organisms, such as bacteria. Its degradation begins by lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) active in crystalline substrate. This work focuses on the construction, by comparative genomic analysis, of chitin catabolism of *Cromobacterium* and the expression of one LPMO of *C. violaceum* ATCC 12472. One likely catabolic pathway of *C. violaceum* ATCC 12472 was obtained from the one described for the family Vibrionaceae, using information gathered about the regulon NagQ from the species and from *in silico* analysis of subcelular locations of each selected protein. The pathway was extended to genus level by the localization of ortologs on the 41 genomes of *Cromobacterium* available on NCBI database. Five sequences of LPMOs were found in *Chromobacterium* ATCC 12472: CV0553, CV0554, CV2592, CV3323 e CV3489. Among those, CV0553 e CV2592 had improved codons on its synthetic coding sequences being afterwards inserted into pET-Sumo modified plasmids. The vectors were introduced into strains of *Escherichia coli* BL21(DE3), SHuffle® T7 Express Competent e ArcticExpress (DE3). Of the two proteins produced, rCv2592-Sumo was the only one to be found in the soluble way on the intracellular fraction of the three analyzed hosts. The recombinant protein was purified in chitin substrate and was able to degrade α -chitin. We conclude that chitin catabolism is conserved in *Chromobacterium*. This is an indicative of its importance on the use of chitin as an alternative source of energy. The gene for NagQ regulator its well conserved on the genus level, with its most plesiomorphic form being found on *C. haemolyticum* and the most recent on *C. violaceum*. Finally, the production of rCv2592 can be prove to be an efficient alternative for the synthesis of chitin derivatives, thus further information need to be gathered about it.

Keywords: *Chromobacterium*. Lytic polysaccharide monoxygenases. Chitin degradation. LPMO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura primária da violaceína.....	17
Figura 2	– <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 plaqueada em LB Ágar.....	18
Figura 3	– Estrutura da quitina.....	20
Figura 4	– Representação da reação catalisada por LPMOs.....	25
Figura 5	– Estrutura terciária de uma LPMO.....	26
Figura 6	– Via quitinolítica em <i>Vibrio cholerae</i>	41
Figura 7	– Degradação de quitina na fração extracelular de <i>C. violaceum</i>	47
Figura 8	– Representação dos mecanismos de transporte e degradação de quitoderivados no periplasma.....	49
Figura 9	– Etapa citoplasmática da via de degradação de quitina em <i>C. violaceum</i>	51
Figura 10	– Regulação da via de degradação de quitina em <i>C. violaceum</i>	52
Figura 11	– Árvore filogenética construída a partir do alinhamento dos genes de NagQ nos genomas de <i>Chromobacterium</i>	68
Figura 12	– Arquitetura de domínios das cinco LPMOs de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472....	71
Figura 13	– Alinhamento entre LPMOs de <i>C. violaceum</i> e CBP21 de <i>Serratia marcescens</i>	73
Figura 14	– Gel de poliacrilamida da expressão em BL21(DE3) das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.....	75
Figura 15	– Gel de poliacrilamida da expressão em SHuffle® T7 Express Competent das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.....	76
Figura 16	– Gel de poliacrilamida da expressão em ArcticExpress (DE3) das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.....	77
Figura 17	– Gel de poliacrilamida da indução da proteína codificada pela ORF CV2592.....	79

Figura 18 – Atividade quitinoclástica de ETS contra quitina coloidal.....	80
Figura 19 – Purificação da LPMO rCv2592-Sumo.....	82
Figura 20 – Ensaio de atividade quitinoclástica de rCv2592-Sumo contra quitina insolúvel.....	83
Figura 21 – Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo.....	86
Figura 21 – Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo com CV1897 e CV3316.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Volume de reagentes para o preparo de géis de poliacrilamida entre placas de vidro.....	37
Tabela 2	– Lista de ORFs que compõem a via de degradação de quitina em <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.....	42
Tabela 3	– Resultados das análises de localização subcelular nas proteínas da via de degradação de quitina em <i>C. violaceum</i>	43
Tabela 4	– Genes inclusos no regulon NagQ, de acordo com o banco de dados do RegPrecise 4.0 (http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/index.jsp).....	45
Tabela 5	– Lista de estirpes com genoma disponível no banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) em 13 de novembro de 2017.....	54
Tabela 6	– Ortólogos das proteínas envolvidas na degradação extracelular da quitina.....	57
Tabela 7	– Ortólogos das porinas de <i>C. violaceum</i>	60
Tabela 8	– Ortólogos dos transportadores da membrana interna de <i>C. violaceum</i>	61
Tabela 9	– Ortólogos de enzimas que degradam quito-oligômeros no periplasma e citosol.....	65
Tabela 10	– Ortólogas das enzimas que convertem GlcNAc em frutose-6-fostato.....	66
Tabela 11	– Ortólogos do regulador NagQ.....	67
Tabela 12	– Arquitetura de domínio predita pelo CDD.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A; Abs	Absorbância
AA	<i>Auxiliary Activity</i> (Atividades Auxiliares)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (Cassete de ligação a ATP)
ATCC	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATP	Adenosine triphosphate
BDA	Meio de cultura Batata, Dextrose, Ágar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)
CatD	<i>Catalytic Domain</i> (Domínio Catalítico)
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i> (Enzimas Ativas em Carboidratos)
CBM	<i>Carbohydrate-Binding Module</i> (Módulo de Ligação a Carboidratos)
CBP	<i>Chitin Binding Protein</i> (Proteína de Ligação à Quitina)
CDD	<i>Conserved Domains Database</i> (Banco de Dados de Domínios Conservados)
CELLO2GO	<i>Subcellular Localization Prediction with Functional Gene Ontology</i> (Predição de Localização Subcelular com Ontologia de Genes Funcionais)
ChBD	<i>Chitin Binding Domain</i> (Domínio de Ligação à Quitina)
Chi	<i>Chitinase</i> (Quitinase)
CV	<i>Chromobacterium violaceum</i> (prefixo dado à gene, ORFs e proteínas pertencentes à espécie)
ETI	Extrato Total Insolúvel
ETS	Extrato Total Solúvel
FnIII	Domínio conservado similar à fibronectina tipo III
Gbp	<i>GlcNAc-binding protein</i> (Proteína de ligação à GlcNAc)
GH	<i>Glycoside Hydrolase</i> (Hidrolases de Glicosídeo)
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-Acetil-Glucosamina
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (indutor)
LB	Caldo Luria Berthani
LPMO	<i>Lytic polysaccharide monoxygenases</i> (Monooxigenase Lítica de Polissacarídeo)

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)
DO	Densidade Óptica
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro Aberto de Leitura)
PAGE-SDS/ SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
pET-Sumo	Vetor de expressão
PKD	<i>Polycystic Kidney Disease</i> (Doença renal policística), primeiro domínio identificado na proteína de mesmo nome
pI	Ponto Isoelétrico
PTS	<i>Phosphoenolpyruvate:carbohydrate Phosphotransferase System</i> (Sistema de Fosfotransferase Fosfoenolpiruvato:Carboidrato)
rCv2592- Sumo	Proteína recombinante ligada à Sumo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i> (Ferramenta de Pesquisa de Arquitetura Modular Simples)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite Repression</i> (Caldo Super Ótimo com Repressão Catabólica)
SP	Signal Peptide (Peptídeo Sinal)
Sumo	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> (Pequeno Modificador Similar à Ubiquitina)
TFBS	<i>Transcription Factor Binding Site</i> (Sítio de Ligação do Fator de Transcrição)
TEMED	N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina
TEV	Tobacco ETCH Virus (Vírus ETCH do Tabaco); no texto, se refere a protease retirada desse organismo
TF	<i>Transcription Factor</i> (Fator de Transcrição)
VC	<i>Vibrio Cholerae</i> (prefixo dado à gene, ORFs e proteínas pertencentes à espécie)
WP_	Prefixo utilizado nos números de acesso de proteínas não redundantes do banco de dados do NCBI

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	Gênero <i>Chromobacterium</i>	16
2.1.1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	17
2.2	Quitina.....	19
2.3	Mecanismos de degradação da quitina.....	21
2.3.1	Degradação de quitina em bactérias.....	23
2.4	Monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs)	24
2.5	Bioinformática.....	27
2.5.1	Análises de homologia.....	27
2.6	Expressão heteróloga de proteínas em <i>Escherichia coli</i>	28
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	OBJETIVOS.....	30
4.1	Objetivo geral.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5	MATERIAIS	31
5.1	Cepas de bactéria e fungo.....	31
5.2	Plasmídeo e genes sintéticos.....	31
5.3	Reagentes e demais materiais.....	31
5.4	Bancos de dados, servidores e demais softwares utilizados.....	32
6	MÉTODOS.....	33
6.1	Construção da via quitinoclástica em <i>Chromobacterium violaceum</i>	33
6.1.1	Identificação das proteínas.....	33
6.1.2	Localização subcelular.....	33
6.2	Conservação da via de degradação de quitina no gênero <i>Chromobacterium</i>	34
6.2.1	Obtenção dos proteomas.....	34
6.2.2	Formação de grupos de ortólogos.....	34
6.3	Análises <i>in silico</i> das sequências de LPMOs de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.....	34
6.4	Expressão das proteínas recombinante em <i>E. coli</i>	35
6.5	Purificação da proteína recombinante.....	36

6.5.1	<i>Cromatografia em matriz de Sepharose com níquel imobilizado</i>	36
6.5.2	<i>Cromatografia em matriz de quitina</i>	36
6.6	Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS e condições redutoras (PAGE-SDS)	37
6.7	Determinação da concentração de proteínas	38
6.5.8	Atividade quitinoclástica	38
6.8.1	<i>Ensaio de atividade quitinoclástica em quitina coloidal</i>	38
6.8.2	<i>Ensaio de atividade quitinoclástica em quitina insolúvel</i>	39
6.9	Atividade antifúngica por difusão em placa	39
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7.1	Construção da via de degradação de quitina em <i>Chromobacterium violaceum</i>	40
7.1.1	<i>Catabolismo de quitina em <i>Vibrio cholerae</i></i>	40
7.1.2	<i>Regulação</i>	41
7.1.3	<i>Degradação</i>	44
7.1.4	<i>Transporte</i>	48
7.1.5	<i>Transformação de GlcNAc em frutose-6-fosfato</i>	50
7.1.6	<i>Modelo catabólico do metabolismo da quitina em <i>C. violaceum</i></i>	50
7.2	Conservação da via de degradação de quitina em <i>Chromobacterium</i>	53
7.3	Caracterização bioquímica <i>in silico</i> das sequências de LPMOs de <i>C. violaceum</i> ATCC 12472	69
7.4	Expressão de CV0553 e CV2592 em diferentes estirpes de <i>Escherichia coli</i>	70
7.5	Purificação de rCv2592-Sumo	78
7.6	Atividade quitinoclástica de rCv2592-Sumo contra quitina insolúvel	81
7.7	Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo	84
8	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES SINTÉTICOS PARA CV0553 (903 NUCLEOTÍDEOS) E CV2592 (1.089 NUCLEOTÍDEOS)	104
	ANEXO B – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS CORRESPONDENTES À CV0553 (323 AMINOÁCIDOS) E CV2592 (386 AMINOÁCIDOS), CONTENDO RESPECTIVOS PEPTÍDEOS SINAIS	105
	ANEXO C – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTE A	

PROTEÍNA RECOMBINANTE rCv2592-Sumo.....	106
ANEXO D – PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV0553.....	107
ANEXO E – PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV2592.....	108
APÊNDICE A – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO GÊNERO <i>Chromobacterium</i>.....	109

1 INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza (PURUSHOTHAM et al., 2012), sendo degradado principalmente por bactérias (GOODAY, 1990; MANUCHAROVA, 2009), que podem utilizá-la como fonte de carbono e nitrogênio (STREICHSBIER, 1983; STRUSZCZYK, 2006). Cerca de 100 bilhões de toneladas de quitina são produzidas por ano em diversos ecossistemas (GOODAY, 1990). O polímero e seus derivados apresentam diversas aplicações, tanto na medicina (AAM et al., 2010; MINAMI et al., 1998; SAN-LANG et al., 2002), quanto na área ambiental (HAKIM et al., 2008a; SAKAGUCHI; HORIKOSHI; NAKAJIMA, 1981). Entretanto, ainda são relativamente pouco utilizados na indústria, sendo considerados a fonte de biomassa mais inexplorada da natureza (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

O gênero *Chromobacterium* é composto por Betaproteobactérias, Gram-negativas, integrantes da família Chromobacteriaceae. Compreende bactérias saprófitas de vida livre e algumas patogênicas (DURÁN; MENCK, 2001; KIM et al., 2014). O grupo apresentou um significativo crescimento nos últimos anos. Entre 2007 e 2017, dez novas espécies foram descritas (BAJAJ et al., 2016; BLACKBURN et al., 2017; HAN; HAN; SEGAL, 2008b; KÄMPFER; BUSSE; SCHOLZ, 2009; MARTIN et al., 2007; MENEZES et al., 2015; SOBY et al., 2013; YOUNG et al., 2008; ZHOU et al., 2016). *C. violaceum* foi a primeira espécie descrita do gênero e por muito tempo sua única integrante. Diferencia-se pela produção de violaceína, um pigmento roxo derivado do triptofano que lhe confere sua coloração característica (DURÁN, 1990). Pode utilizar quitina como única fonte de carbono e nitrogênio, secretando diversas quitinases reguladas por *quorum sensing* (CHERNIN et al., 1998; STREICHSBIER, 1983).

As monooxigenases líticas de polissacarídeo são enzimas com atividade recentemente descrita, capazes de degradar celulose, quitina e amido através da oxidação de suas ligações O-glicosídicas (HARRIS et al., 2010; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; VU et al., 2014). De acordo com o banco de dados do CAZy (<http://www.cazy.org/>), integram as famílias AA9, AA10, AA11 e AA13 das atividades auxiliares (HEMSWORTH et al., 2014; LEVASSEUR et al., 2013; VU et al., 2014). Destas, apenas as AA10 são encontradas em bactérias, enquanto as demais ocorrem em fungos (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). Apresentam grande potencial na indústria, por sua capacidade de degradar polímeros recalcitrantes na sua forma cristalina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

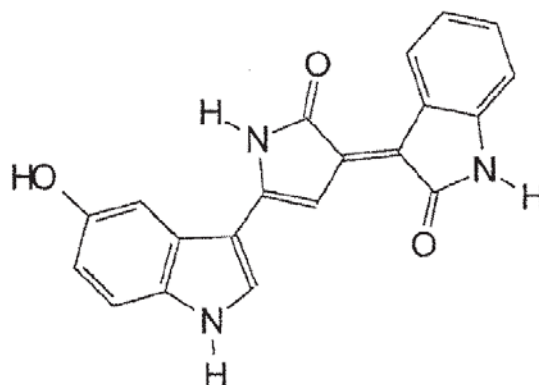
2.1 Gênero *Chromobacterium*

O Manual Bergey's (2015) define o gênero *Chromobacterium* como integrado por células Gram-negativas pequenas, individuais, em pares ou pequenas cadeias que ocorrem geralmente na forma de bacilos ou cocos, podendo apresentar cristais de poli- β -hidroxi-butilato. Sua motilidade se deve à presença de um flagelo polar e, em algumas, um ou mais flagelos laterais e subpolares. São aeróbias facultativas, podendo crescer entre temperaturas de 10 a 40 °C e pH entre 5 e 8, com ótimos de 30-35°C e pH 7-8. Muitas produzem um pigmento roxo denominado violaceína, mas podem ocorrer colônias não pigmentadas (DURÁN; MENCK, 2001; GILLIS; LOGAN, 2015). O grupo compreende comumente bactérias de vida livre e saprofíticas, que habitam a água e o solo das regiões tropicais e subtropicais (DURÁN; MENCK, 2001; LIMA-BITTENCOURT et al., 2007, 2011; MYERS et al., 2000), mas existem casos de patogenicidade em humanos e outros organismos (BATISTA; NETO; F, 2017; HAN; HAN; SEGAL, 2008a; KIM et al., 2014; MARTIN et al., 2007; SNEATH; BUCKLAND, 1959; YANG; LI, 2011).

Através de hibridização DNA-rRNA (DE LEY, 1978) e posteriormente por análise de rDNA 16S, o grupo foi caracterizado como Betaproteobacteria e inicialmente integrado à família Neisseriaceae (DEWHIRST; PASTER; BRIGHT, 1989). Entretanto, estudos recentes mostraram que o gênero pertence a uma família à parte, agora chamada Chromobacteriaceae, que também inclui os gêneros *Pseudogulbenkiania*, *Iodobacter*, e outros (ADEOLU; GUPTA, 2013).

A propriedade fundamental do grupo é a produção de violaceína (Figura 1) e desoxi-violaceína, seu metabólito secundário e hidrofóbico (DURÁN; ERAZO; CAMPOS, 1983; RETTORI; DURÁN, 1998). A violaceína é sintetizada a partir do triptofano e está relacionada com o mecanismo de *quorum sensing* (DURÁN; MENCK, 2001; KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017; LICHSTEIN; VAN DE SAND, 1945; MCCLEAN et al., 1997). Ainda hoje, é objeto de diversos estudos, principalmente por ser um composto bioativo com diversas atividades biológicas interessantes (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017), como antibiótica (DURÁN, 1990; DURÁN; ERAZO; CAMPOS, 1983; LICHSTEIN; VAN DE SAND, 1945; SOUZA et al., 1999), antitumoral (MELO et al., 2000; UEDA et al., 1994), antiviral (DURÁN; MENCK, 2001; KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017) e atividade contra protozoários (DURÁN et al., 1994; LEON et al., 2001). Entretanto, existem espécies não pigmentadas

Figura 1 – Estrutura primária da violaceína.



Fonte: Durán e Menck (2001).

(BAJAJ et al., 2016; HAN; HAN; SEGAL, 2008a; YOUNG et al., 2008; ZHOU et al., 2016) e mesmo colônias não pigmentadas em estirpes comumente roxas (GILLIS; LOGAN, 2015).

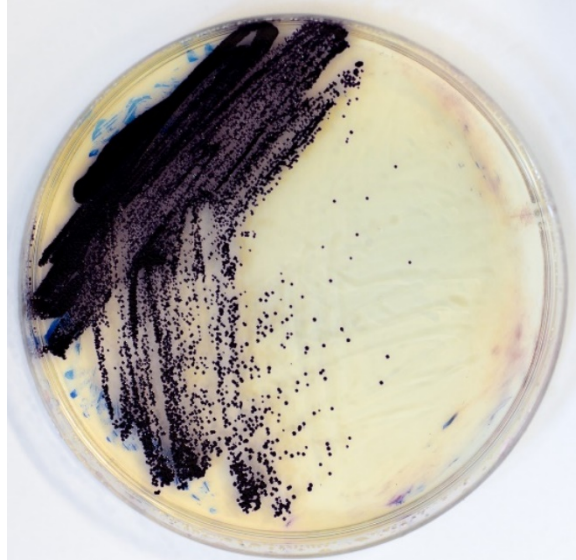
A maior parte do que se sabe hoje sobre o gênero vem de estudos realizados com sua espécie-tipo, *Chromobacterium violaceum* (GILLIS; LOGAN, 2015), por muito tempo sua única integrante. Entretanto, o grupo vem crescendo rapidamente, com a descoberta de dez novas espécies desde 2007 (BAJAJ et al., 2016; BLACKBURN et al., 2017; HAN; HAN; SEGAL, 2008b; KÄMPFER; BUSSE; SCHOLZ, 2009; MARTIN et al., 2007; MENEZES et al., 2015; SOBY et al., 2013; YOUNG et al., 2008; ZHOU et al., 2016) e de diversas estirpes (KIM et al., 2011; VÖING; HARRISON; SOBY, 2017; WANG et al., 2016). Dentre as onze espécies até o momento descritas, nove apresentam seu genoma total ou parcialmente sequenciado e depositado no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Considerando os genomas de todas as estirpes, inclusive as de espécies não elucidadas, são 41 genomas inclusos no gênero (dados de 26/11/2017).

2.1.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum (Figura 2) foi a primeira espécie descrita do gênero e, por isso mesmo, a mais estudada. Existe certa dúvida sobre quem primeiro a descreveu. Bergonzini, em 1881, publicou um trabalho denominando-a como *Cromobacterium violaceum*, nome posteriormente modificado por Zimmerman. Um ano após sua publicação, Boisbaudran publicou um artigo onde descrevia um pequeno organismo de coloração violeta. Anotações em seu caderno datam essa descoberta a 15 anos antes. Entretanto, a espécie é conhecida ainda hoje como *Chromobacterium violaceum* Bergonzini (BERGONZINI, 1881; BOISBAUDRAN,

1882; DURÁN; MENCK, 2001; ZIMMERMAN, 1881).

Figura 2 – *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472
plaqueada em LB Ágar.



Fonte: Própria autora. Imagem registrada por Edvar Monteiro.

A bactéria foi inicialmente isolada no Brasil em uma amostra de água vinda de uma estação de tratamento em Manaus, no Amazonas (CALDAS, 1990). Posteriormente, foi relatada sua ocorrência como bastante frequente em diversos rios da Amazônia Central, com destaque para o rio Negro (GUARIM, 1979; HUNGRIA et al., 2005). Ocorre também no solo de outros ecossistemas brasileiros, como o Cerrado e a Mata Atlântica (MYERS et al., 2000).

Apesar de atuar geralmente como saprófita de vida livre, existe um crescente número de casos de infecções causadas por *C. violaceum*, sendo considerada um patógeno emergente. O primeiro caso relatado em humanos foi registrado na Malásia em 1927 (SNEATH et al., 1953). Até 2017, aproximadamente 200 casos já foram reportados, com taxa de mortalidade acima de 50% , principalmente em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (CHATTOPADHYAY et al., 2002; KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017; OKADA et al., 2013; UMADEVI et al., 2013; YANG; LI, 2011). O contágio inicial geralmente ocorre pela pele em contato com água e solos contaminados, levando ao surgimento de pústulas, algumas vezes com coloração roxa, febre, vômito, etc. (BROWN; STEIN; MORRELL, 2006; YANG; LI, 2011). Muitos casos evoluem para septicemias fatais, com o desenvolvimento de múltiplos abscessos no fígado, pulmão, baço e até mesmo no cérebro (CHATTOPADHYAY et al., 2002; YANG; LI, 2011). É importante fazer-se notar ainda a ampla resistência a antibióticos e outras drogas que a bactéria apresenta (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; UMADEVI et al., 2013).

Uma característica marcante da espécie, que posteriormente foi abrangida para todo o gênero, é a secreção do pigmento violaceína, responsável pela coloração violeta do grupo (GILLIS; LOGAN, 2015). A produção de violaceína está relacionada com *quorum sensing*, permitindo fácil visualização e quantificação do processo. Isso levou a espécie, principalmente a estirpe CV026, a ser considerada modelo de estudo para o mecanismo. Desta forma, diversos inibidores de *quorum sensing* foram descobertos e podem ser utilizados como alternativas aos antibióticos atuais (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017; MCCLEAN et al., 1997).

Pela importância histórica da pesquisa sobre violaceína e *Chromobacterium violaceum* no país e pelo potencial de seus produtos secundários, ela foi escolhida pelo Projeto Genoma Brasileiro para ter seu genoma completamente sequenciado (DURÁN, 1990; DURÁN; MENCK, 2001). Em 2003, um consórcio de laboratórios brasileiros integrando o projeto foi responsável pelo sequenciamento do genoma da estirpe de *C. violaceum* ATCC 12472. Este consistia em um único cromossomo circular com 4.751.080 pares de bases, sendo 64,83% de G+C e contendo 4.431 ORFs (do inglês, *Open Reading Frames*) codificando proteínas. Dessas, muitas estão relacionadas com a capacidade de sobrevivência a diversos ambientes, incluindo oxidases e redutases, e várias vias energéticas alternativas (DE VASCONCELOS et al., 2003).

Uma fonte alternativa de carbono e nitrogênio é a quitina (STREICHSBIER, 1983). A secreção de quitinases em *C. violaceum* é regulada por *quorum sensing*, como a violaceína, e está provavelmente relacionada com parte da via quitinoclástica na espécie (CHERNIN et al., 1998). Algumas dessas quitinases já foram expressas com sucesso em *Escherichia coli*, com posterior caracterização das proteínas recombinantes (BARBOSA, 2013; LOBO et al., 2013; NEPOMUCENO, 2012; TEIXEIRA, 2011), assim como caracterização *in silico* de uma N-acetil- β -D-glucosaminidase (MOURA, 2016).

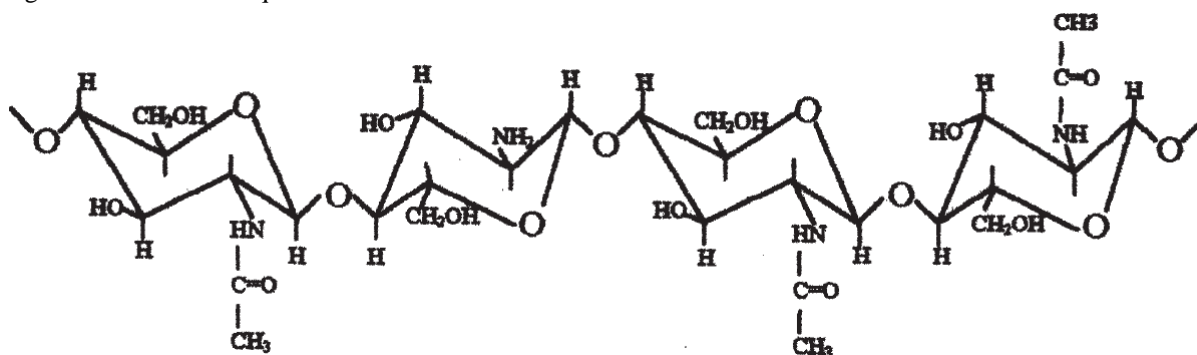
2.2 Quitina

A quitina foi inicialmente descrita como um “material particularmente resistente aos químicos usuais” por A. Hachett, em 1799 (JEUNIAUX, 1996). Entretanto, a descoberta do polímero é conferida à Henri Braconnot, em 1811, a partir de reações realizadas em materiais isolados de diversas espécies de fungos. Braconnot nomeou o novo composto como fungina (BRACONNOT, 1811; MUZZARELLI et al., 2012). Odier, em 1923, descobriu a mesma substância em insetos e plantas, modificando seu nome para *chitine* (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ODIER, 1823). A palavra deriva do grego *khitôn*, que originalmente denominava um tipo de túnica, sendo ainda hoje utilizada na França com esse propósito

(*chiton*). Após diversas derivações, o termo passou a indicar qualquer tipo de revestimento, desde armaduras de soldado, até peles de órgãos animais, cascas de frutas, etc. (AVENAS, 2012).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (PURUSHOTHAM et al., 2012), compostos por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (2-acetamino-2-desoxi- β -D-glucopiranoose; GlcNAc), unidos por ligações β -(1,4) do tipo O-glicosídica (CLARK; SMITH, 1936; HU et al., 2007; THARANATHAN; KITTUR, 2003). Apresenta estrutura similar a celulose, com um arranjo em microfibrilas. É um polissacarídeo linear, não ramificado, insolúvel, branco, elástico e rígido que apresenta nitrogênio em sua composição. Como a celulose, é um polissacarídeo estrutural (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). Compõe a epiderme e olhos de artrópodes e cefalópodes (HERRING, 1979; WAGNER et al., 1993), a parede celular de fungos (BLUMENTHAL; ROSEMAN, 1957), o exoesqueleto e tendões de artrópodes (HERRING, 1979), etc., e pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e carbono (STREICHSBIER, 1983; STRUSZCZYK, 2006). Sua estrutura é ilustrada na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura da quitina.



Fonte: Tharanathan e Kittur (2003).

São encontradas três formas de quitina, que diferem entre si pela forma como suas cadeias se arranjam. A forma α apresenta suas cadeias alinhadas de formas antiparalelas, enquanto na forma β estão arranjadas de forma paralela e a forma γ é composta dos dois tipos de cadeias intercaladas (RUDALL, 1963). α -quitina é encontrada na carapaça de caranguejos e camarões, β -quitina é extraída da “pena” (concha interna) de lulas (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010) e diatomáceas (HUNT et al., 2008) e γ -quitina no revestimento estomacal de *Loligo*, um grupo de lulas (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

Estima-se que aproximadamente 100 bilhões de toneladas de quitina sejam produzidas por ano por insetos, fungos, crustáceos e moluscos (GOODAY, 1990), sendo a maior

parte produzida no ambiente marinho (KEYHANI, 1999). Existem diversas aplicações para o biopolímero e seus derivados, desde propriedades imunológicas (AAM et al., 2010; PAPPAS; GUERINI, 2010), anti-inflamatórias (MINAMI et al., 1998), antioxidantes (JE; KIM, 2006; NGO et al., 2009; XIE; XU; LIU, 2001), antimicrobianas (EL GHAOUTH et al., 1992; LI et al., 2008; SAN-LANG et al., 2002; TSAI; SU, 1999), na remoção de metais pesados (FRANCO et al., 2004; HAKIM et al., 2008b, 2008a; HOSOBATA et al., 2009; JIANLONG et al., 2001; OSHITA et al., 2008; SAKAGUCHI; HORIKOSHI; NAKAJIMA, 1981) e muitas outras (AKSU, 2005; DA SILVA, 2004; HAKIM et al., 2007; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; KUMAR, 2000; MUZZARELLI et al., 2012; MUZZARELLI; MUZZARELLI, 2009; THARANATHAN; KITTUR, 2003; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). Por suas diversas vantagens, que incluem ainda biodegradabilidade e biocompatibilidade, essa é uma das fontes de biomassa mais inexploradas no planeta (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; THARANATHAN; KITTUR, 2003).

2.3 Mecanismos de degradação da quitina

Apesar da grande produção anual, não há acumulação significativa de quitina na natureza. Isso indica a existência de mecanismos constantes e eficientes de degradação (BEIER; BERTILSSON, 2013; GOODAY, 1990; TRACEY, 1955). Esses mecanismos variam bastante entre si e não necessariamente iniciam com a quebra da estrutura polimérica (BEIER; BERTILSSON, 2013). Dá-se o nome de quitinoclástico a qualquer processo em que se degrade a quitina. Caso essa degradação envolva a hidrólise inicial das ligações O-glicosídicas, ele então é dito quitinolítico (BEIER; BERTILSSON, 2013). Outra alternativa é sua desacetilação, dando origem à quitosana, um polímero solúvel de β -D-glucosamina, que pode ser seguida por desaminação e originar carboidratos similares à celulose (CAMPBELL; WILLIAMS, 1951; ZOBELL; RITTENBERG, 1938).

A hidrólise de quitina é um processo fortemente regulado, geralmente envolvendo retroalimentação positiva, ou seja, a presença de quitina leva a expressão de proteínas quitinolíticas (MEIBOM et al., 2004; TECHKARNJANARUK; PONGPATTANAKITSHOTE; GOODMAN, 1997). A disponibilidade de nutrientes também pode ser um fator importante na expressão dessas enzimas (DELPIN; GOODMAN, 2009a, 2009b; KEYHANI, 1999; TECHKARNJANARUK; PONGPATTANAKITSHOTE; GOODMAN, 1997). Em *Chromobacterium violaceum*, por exemplo, a secreção de quitinases está relacionada com *quorum sensing* (CHERNIN et al., 1998).

A ciclagem de quitina do polímero insolúvel até monômeros de GlcNAc tipicamente envolve três etapas: clivagem em oligômeros solúveis em água, divisão dos oligômeros em dímeros e sua separação em monômeros (BEIER; BERTILSSON, 2013). Caso haja a desacetilação da quitina em quitosana, esta será hidrolisada por quitosanases em dímeros e, por último, dividida em monômeros (GOODAY, 1990). Entretanto, esses monômeros precisam ser convertidos em acetato, NH_3 ou frutose-6-fosfato para serem utilizados como fonte de carbono ou nitrogênio (KEYHANI, 1999).

A etapa inicial da degradação de quitina geralmente envolve o uso de quitinases e ocorre no meio extracelular (BEIER; BERTILSSON, 2013; MEIBOM et al., 2004; VAAJE-KOLSTAD et al., 2013). Entretanto, a recente descoberta de monooxigenases líticas de polissacarídeos (do inglês “*Lytic Polysaccharide Monooxygenases*” – LPMOs) e sua atividade em substrato cristalino (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010), além de evidências de sua ação sinérgica com quitinases (GUTIÉRREZ-ROMÁN et al., 2014; PURUSHOTHAM et al., 2012), as colocam como principais candidatas a iniciarem a degradação (HAMRE et al., 2015). As LPMOs produzem oligômeros grandes e ainda insolúveis em água (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). As quitinases então hidrolisariam esses substratos, transformando-os em oligômeros menores e hidrossolúveis, que podem ser transportados para o interior da célula por transportadores específicos (KEYHANI; LI; ROSEMAN, 2000; POSTMA; LENGELER; JACOBSON, 1993; SUGINTA et al., 2013). Intracelularmente, outras proteínas com diferentes especificidades para quitto-oligossacarídeos, como quitodextrinases (KEYHANI, 1999; KEYHANI; ROSEMAN, 1996), β -N-acetil-hexosaminidases (KEYHANI, 1999; MAYER et al., 2006; SCIGELOVA; CROUT, 1999; VRBA et al., 1996) ou quitobiases dariam continuidade ao processo (DE LA CRUZ et al., 1993; KEYHANI, 1999). As enzimas utilizadas dependerão do organismo em estudo e do tamanho do oligômero anteriormente formado (BEIER; BERTILSSON, 2013; DE LA CRUZ et al., 1993; GOODAY, 1990; MEIBOM et al., 2004; RODIONOV et al., 2010). Os dímeros serão clivados por β -N-acetil-glucosaminidases ou β -N-glucosaminidases, formando monômeros de GlcNAc (DE LA CRUZ et al., 1993; MEIBOM et al., 2004). Por último, esses monômeros irão ser convertidos em compostos úteis para o organismo, como a frutose-6-fosfato, que participa da glicólise. Para isso, passam por desacetilação, desaminação e fosforilação, caso já não tenham passado anteriormente por estes processos (COMB; ROSEMAN, 1958, 1956; GEISSELER et al., 2010; MEIBOM et al., 2004).

2.3.1 Degradação de quitina em bactérias

Diversos organismos são capazes de degradar a quitina: arqueias (GAO et al., 2003; HUBER et al., 1995; MANUCHAROVA, 2009; MINE et al., 2012), fungos (EL-SAYED et al., 1989; HARMAN et al., 1993; HODGE; ALEXANDER; GOODAY, 1995; KELLNER; VANDENBOL, 2010; ST LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986), bactérias (GOODAY, 1990; KEYHANI, 1999; MANUCHAROVA, 2009; SAN-LANG et al., 2002), plantas carnívoras (EILENBERG et al., 2006; HATANO; HAMADA, 2008) e alguns animais (GOODAY, 1990; JEUNIAUX; CORNELIUS, 1997). Destes, as bactérias são os principais responsáveis pela reintrodução do nitrogênio e carbono do polissacarídeo no ambiente, e por isso tendo o mecanismo de degradação melhor compreendido (BEIER; BERTILSSON, 2013; GOODAY, 1990).

A via quitinolítica é a forma de degradação da quitina mais estudada em bactérias (BEIER; BERTILSSON, 2013; GOODAY, 1990), com especial atenção para a via de *Serratia marcescens*, considerado organismo modelo nesse sistema (VAAJE-KOLSTAD et al., 2013). *S. marcescens* é um bacilo Gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae e encontrado como saprófita aquático, mas também associado a infecções hospitalares e urinárias humanas (HEJAZI; FALKINER, 1997). Sua maquinaria enzimática é tida como a mais eficiente na degradação de quitina (MONREAL; REESE, 1969). Apresenta três quitinases, sendo ChiA e ChiB exoquitinases e ChiC uma endoquitinase, e uma monooxigenase lítica de polissacarídeos, CBP21. As quatro enzimas agem de maneira sinérgica e apresentam afinidade por diferentes tipos de quitina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2013).

Outras bactérias com vias bastante conhecidas são as integrantes do gênero *Vibrio*, com destaque para *V. furnissii* e *V. cholerae*. *V. furnissii* é uma bactéria marinha, cuja maquinaria quitinolítica é descrita em uma série de artigos publicados por Keyhani e diversos autores entre 1996 e 2000 (KEYHANI, 1999; KEYHANI; LI; ROSEMAN, 2000; KEYHANI; ROSEMAN, 1996; PARK; KEYHANI; ROSEMAN, 2000). O ecossistema marinho é responsável pela produção de grande parte da quitina encontrada na natureza. *V. cholerae* é um patógeno humano causador da cólera. A sua capacidade de interagir com quitina permite que ele se disperse mais facilmente, ligando-se a zooplânctons quitinosos, além da quitina ser seu indutor natural de competência (MEIBOM et al., 2004, 2005; PRUZZO; VEZZULLI; COLWELL, 2008; ZAMPINI et al., 2005). Hunt *et. al.* (2008), através de métodos computacionais, determinaram uma possível via para a família Vibrionaceae, baseada na via de *V. cholerae* (MEIBOM et al., 2004) e parcialmente confirmada por análises experimentais filogenéticas do gene *chiA* no

grupo. As análises indicaram que a utilização de quitina é uma característica ancestral do grupo, apesar de possíveis eventos de duplicação e transferência horizontal de genes.

2.4 Monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs)

Em 1986, Fuchs, McPherson e Drahos purificaram cinco quitinases de *Serratia marcescens*. Posteriormente elas foram caracterizadas como ChiA, ChiB, ChiC1, ChiC2 e CBP21. Esta última foi inicialmente descrita como uma proteína de ligação à quitina não catalítica, que potencializava a atividade de quitinases em quitina cristalina (SUZUKI et al., 1998; VAAJE-KOLSTAD et al., 2005).

Em 2010, Gustav Vaaje-Kolstad e colaboradores descreveram um novo mecanismo catalítico em CBP21. Os autores mostraram que a proteína conseguiu degradar quitina cristalina por oxidação, ou seja, o mecanismo de catálise envolvia a transferência de uma molécula de oxigênio. Essa atividade foi inicialmente descrita em integrantes das famílias GH61, quitinases de fungos, e CBM33, que incluía proteínas de ligação à quitina, como CBP21. Atualmente as GH61 e CBM33 foram reclassificadas como AA9 e AA10, respectivamente (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; LEVASSEUR et al., 2013).

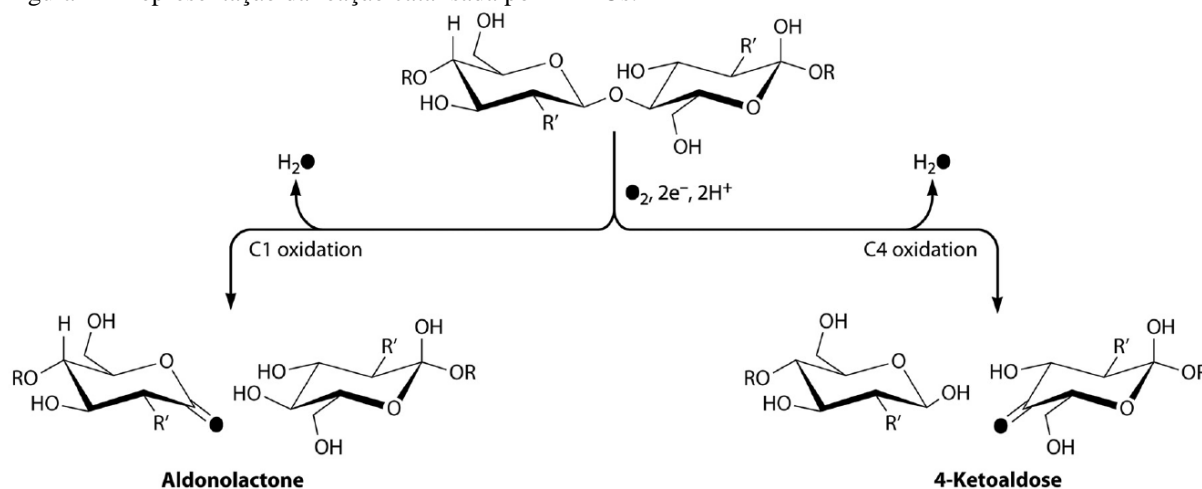
Antes da descoberta das LPMOs, creditava-se apenas à hidrólise a capacidade de clivar ligações O-glicosídicas. Esta consiste em uma reação de dupla decomposição, onde a água é um dos reagentes envolvidos. Em compostos orgânicos, o processo contém diversas etapas, iniciando com a ligação covalente do átomo de oxigênio da água à um carbono do segundo reagente envolvido e geralmente termina com a quebra deste composto (“Hydrolysis”, 2016). Na quitina, a reação é catalisada por quitinases.

O CAZy (em inglês, *Carbohydrate-Active Enzymes*; LOMBARD et al., 2014) classifica as LPMOs em quatro famílias das atividades auxiliares (em inglês, “*Auxiliary Activity*”). As famílias AA9, AA11 e AA13 são encontradas em fungos, oxidando celulose, quitina e amido, respectivamente (HARRIS et al., 2010; HEMSWORTH et al., 2014; VU et al., 2014). A família AA10 compreende proteínas encontradas em bactérias, com atividade sobre quitina ou celulose (FORSBERG et al., 2014; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). As famílias AA10 e AA9 apresentam um distante ancestral comum, sendo que provavelmente a oxidação de quitina surgiu antes da atividade oxidativa de celulose no grupo (BOOK et al., 2014).

As LPMOs são metaloproteínas dependentes de cobre (Cu^{+2}) (AACHMANN et al., 2012) que hidroxilam os carbonos C-1 ou C-4 das ligações glicosídicas, dando origem a intermediários instáveis que se decompõem, causando a quebra dessas ligações. O grupo

hemiacetal do C-1 hidroxilado produz ácidos aldônicos, enquanto o C-4 hidroxilado gera cetoaldoses através de um hemiacetal intermediário (Figura 4) (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). A hidroxilação utiliza oxigênio molecular (O_2), que precisa ser ativado por dois elétrons e dois prótons (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Por isso, a reação é inibida na presença de cianeto. Quelantes, como o EDTA, também são fortes inibidores, pois roubam os átomos de Cu^{+2} do sítio ativo (BEESON et al., 2015; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Sabe-se que seu mecanismo de hidroxilação envolve uma etapa catalítica e a ativação do sítio ativo oxidante, mas os detalhes de cada uma ainda são desconhecidos (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; WALTON; DAVIES, 2016). Alguns autores discutem o uso do termo “líticas”, já que não existem até o momento evidências que a enzima atua diretamente na quebra das ligações, utilizando o nome alternativo monooxigenases de polissacarídeo (em inglês, *polysaccharide monooxygenases*; PMOs) (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; BEESON et al., 2015).

Figura 4 – Representação da reação catalisada por LPMOs.



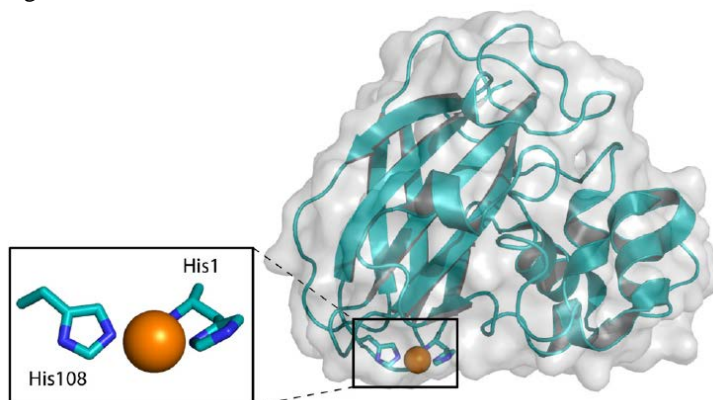
Fonte: Agostoni, Hangasky e Marletta, (2017). Oxidação na posição C-1 produzindo aldonolactona e de C-4 originando 4-cetoaldoses. Em quitina, R indica GlcNAc e R' $NHCH_3CO$.

A maioria das LPMOs contém um domínio único, mas existem proteínas com domínios alternativos, como módulos de ligação à carboidratos (CBMs), domínios similares a fibronectina tipo III (FnIIIs), hidrolases e domínios da doença renal policística (PKDs) (HORN et al., 2012). CBMs são classificados em diversas famílias e aumentam a especificidade, facilitando a ligação aos polissacarídeos (CROUCH et al., 2016). FnIII e PKDs normalmente mediam a adesão celular e interações proteína-proteína (POTTS; CAMPBELL, 1996; SANDFORD; MULROY; FOGGENSTEINER, 1999). Em *V. cholerae*, a AA10 GbpA é uma proteína multidomínio, com um domínio catalítico LPMO, dois domínios FnIII e um domínio

de ligação à quitina. Os domínios FnIII e LPMO são responsáveis pela interação com a mucina do epitélio intestinal do hospedeiro (WONG et al., 2012). O domínio catalítico e o de ligação à quitina também são importantes pela permanência da bactéria no ambiente aquático, permitindo a ligação ao exoesqueleto de pequenos crustáceos (STAUDER et al., 2012).

Os domínios catalíticos de monooxigenases bacterianas apresentam um “ β -sanduíche”, com um sítio ativo composto por um complexo mononuclear de $\text{Cu}^{+2}(\text{II})$ com duas histidinas e uma amina N-terminal em uma “braçadeira” de histidina em forma de T, como ilustra a Figura 5 (AACHMANN et al., 2012; GUDMUNDSSON et al., 2014; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). A superfície de interação é plana, permitindo que a proteína clive as ligações glicosídicas sem separar o polímero da matriz cristalina (AACHMANN et al., 2012; AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). LPMOs de quitina apresentam um local específico para acomodar o grupo acetil (FORSBERG et al., 2014).

Figura 5 – Estrutura terciária de uma LPMO.



Fonte: Agostoni, Hangasky e Marletta, (2017). Na parte inferior da estrutura, encontra-se a superfície de interação com substrato, plana. Em destaque, a “braçadeira” de histidinas ligadas à um Cu^{+2} , indicado na ilustração como uma esfera alaranjada.

Funcionalmente, as LPMOs criam uma nova terminação na cadeia polissacarídica, onde as quitinases seriam mais ativas que na matriz cristalina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). De maneira alternativa, algumas proteínas no grupo foram descritas com atividade antifúngica (MEHMOOD et al., 2011) e como fatores de virulência, como em *V. cholerae* (WONG et al., 2012). Existem diversos estudos sobre a utilização de LPMOs na indústria. Segundo Harris *et al.* (2010), a adição de monooxigenases em coquetéis de celulase reduz em duas vezes a quantidade de enzima necessária para a conversão de farinha de milho pré-tratada. Outra possibilidade é seu uso na captura de O_2 para a produção de etanol celulósico (BEESON et al., 2015). As LPMOs podem ser também fundamentais para a conversão enzimática de biomassa,

como, por exemplo, na produção de derivados de quitina (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). A adição dessas proteínas às reações com quitinases poderia aumentar sua eficiência, diminuindo os custos de produção.

2.5 Bioinformática

O rápido crescimento da Biologia Molecular nas últimas décadas criou a necessidade de técnicas para a análise de grandes quantidades de dados (CAMPOS et al., 2009). Dados biológicos são geralmente mais complexos, pela sua diversidade e inter-relacionamento (SANTOS; ORTEGA, 2003). Segundo Santos e Ortega (2003), a bioinformática é “[...] uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica.”

Dentro de décadas, é provável que milhões de genomas integrem banco de dados, principalmente se considerarmos técnicas de metagenômica (MEDEMA; FISCHBACH, 2015). Apesar disso, estudos experimentais não conseguem acompanhar a velocidade com que essas informações estão sendo criadas. Assim, muitas proteínas não são caracterizadas e vias metabólicas inteiras são desconhecidas. A descoberta dos componentes funcionais das células e suas interações é um dos maiores desafios da biologia moderna (KENSCHKE et al., 2008).

Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* é provavelmente um dos organismos mais estudados, com grande importância econômica e científica, sendo utilizado pela humanidade desde à Pré-História. Entretanto, dos 6.604 genes incluídos no *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>; CHERRY et al., 2011), aproximadamente 11,4% (756 ORFs) ainda não foram caracterizados. Dentre as proteínas caracterizadas, apenas certos aspectos funcionais são conhecidos, como sua localização subcelular ou seu fenótipo sem modificações pós-traducionais (KENSCHKE et al., 2008).

2.5.1 Análises de homologia

Homólogos são definidos como genes que apresentam ancestralidade comum. Dentre estes, geralmente se distinguem ortólogos e parálogos. São considerados ortólogos genes originados de um único gene ancestral que pertencia ao último antepassado comum dos genomas comparados. Já parálogos se originaram por eventos de duplicação (KOONIN, 2005).

Apesar do desenvolvimento de técnicas experimentais de alto rendimento, análises funcionais de genes evolutivamente relacionados ainda são consideradas as formas mais rápidas

e confiáveis compreender essa enorme quantidade de informações (ALTENHOFF et al., 2012; RENTZSCH; ORENGO, 2009). Um dos métodos utilizados considera que a função é conservada entre homólogos, ou seja, similaridade entre sequências implica também em similaridade funcional (ALTENHOFF et al., 2012). Isso é possível porque proteínas ortólogas retêm aspectos funcionais ao longo da evolução, principalmente se o evento de especiação for recente (KONIN, 2005).

2.7 Expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*

A grande vantagem na produção de proteínas recombinantes é a capacidade de expressar e purificar a molécula desejada em grandes quantidades. Essa facilidade agiliza a caracterização bioquímica, tornando mais rápida sua possível implementação e melhorando o custo-benefício de todo processo industrial (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Um importante passo na expressão de proteínas é a escolha da célula hospedeira (ROSANO; CECCARELLI, 2014). *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados e provavelmente o organismo mais estudado (BECKER; WITTMANN, 2016). Suas vantagens incluem um rápido crescimento, fácil cultivo, metabolismo primário bem compreendido, baixo custo e transformação com material genético exógeno rápida e fácil (POPE; KENT, 1996; ROSANO; CECCARELLI, 2014; SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007; VANDOVA et al., 2017).

3 JUSTIFICATIVA

O crescimento acelerado da Biologia Molecular e o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento, como a metagenômica, criaram uma demanda por análises rápidas e precisas de grandes quantidades de informação. Métodos computacionais, como a genômica comparativa, são uma alternativa viável às técnicas experimentais, mais custosas e demoradas (ALTENHOFF et al., 2012).

O gênero *Chromobacterium* ilustra o abismo existente entre a expansão dos bancos de dados de seqüências e o real conhecimento biológico sobre os organismos cujo genoma foi sequenciado. Apesar do rápido aumento do número de espécies e dos diversos genomas disponíveis no NCBI, a maior parte do que sabe sobre o grupo vêm de estudos experimentais com sua espécie-tipo, *C. violaceum*. Sabe-se que *C. violaceum* apresenta a capacidade de utilizar apenas quitina como fonte de carbono e nitrogênio (STREICHSBIER, 1983) e várias enzimas quitinolíticas da estirpe ATCC 12472 já foram caracterizadas (BARBOSA, 2013; LOBO et al., 2013; NEPOMUCENO, 2012; TEIXEIRA, 2011; MOURA, 2016), mas sua via de degradação de quitina ainda não é conhecida.

A completa caracterização do mecanismo de degradação da quitina no grupo pode fornecer subsídios para a produção industrial de quito-oligossacarídeos, ajudar no desenvolvimento de técnicas que combatam pragas agrícolas, como fungos, insetos e nematoides, e auxiliar na compreensão dos mecanismos de ciclagem de carbono e nitrogênio em ecossistemas terrestres e de águas doce.

Recentemente, as LPMOs foram descritas como potenciais iniciadoras do catabolismo de quitina em diversos organismos (HAMRE et al., 2015). Estas enzimas são capazes de degradar biopolímeros insolúveis e alguns estudos mostram seu potencial uso industrial (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; BEESON et al., 2015). Algumas LPMOs foram descritas, ainda, como fatores de virulência em algumas bactérias (SHUTINOSKI; SCHMIDT; HEUSIPP, 2010; WONG et al., 2012). Assim, a caracterização dessas enzimas em *C. violaceum* podem não apenas auxiliar na produção produtos da quitina em escala industrial, como indicar o provável mecanismo de virulência da bactéria, hoje considerada um patógeno emergente.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Expressar e caracterizar uma LPMO de *Chromobacterium*, sugerindo a provável via de degradação de quitina no gênero.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a provável via de degradação de quitina de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 por análises comparativas com vias já caracterizadas;
- Verificar conservação das proteínas relacionadas à via de degradação de quitina no gênero *Chromobacterium* usando métodos de genômica comparativa;
- Identificar e caracterizar *in silico* as monooxigenases líticas de polissacarídeo presentes no genoma de *C. violaceum* ATCC 12472;
- Expressar uma monooxigenase lítica de polissacarídeo recombinante de *C. violaceum* ATCC 12472 em *Escherichia coli*;
- Analisar a atividade de uma monooxigenase lítica de polissacarídeo na degradação quitina insolúvel;
- Investigar a atividade antifúngica de uma monooxigenase lítica de polissacarídeo isolada e na presença de quitinases recombinantes de *C. violaceum* ATCC 12472 contra o fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae*.

5 MATERIAIS

5.1 Cepas de bactéria e fungo

As células utilizadas para análise da expressão das proteínas recombinantes foram *Escherichia coli* BL21(DE3), *Escherichia coli* SHuffle® T7 Express Competent e *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3).

O fungo utilizado nos ensaios de atividade antifúngica foi o isolado de *Lasiodiplodia theobromae* CNPAT CCJ-127, obtido da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical.

5.2 Plasmídeo e sequência codificadoras

Sequências codificadoras sintéticas foram produzidas com códons otimizados para as ORFs CV0553 e CV2592, com as respectivas sequências correspondentes aos peptídeos sinais retiradas (Anexos A e B). Os insertos foram introduzidos em plasmídeos pET-Sumo (Invitrogen™), com o sítio para protease Sumo trocado para um sítio para a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*). Todo o processo de síntese dos genes sintéticos e produção dos plasmídeos de expressão foi realizado pela empresa GenOne Biotechnologies (<http://www.genone.com.br/>).

5.3 Reagentes e demais materiais

O marcador de massa molecular de proteínas utilizado nas eletroforeses em gel de poliacrilamida foi o *Low Molecular Weight* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Para as atividades com quitina em sua forma insolúvel, foi utilizada a quitina de cascas de caranguejo, na forma de pó purificado (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

As matrizes cromatográficas utilizadas foram *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA), para a cromatografia de afinidade à níquel, e *Chitin Poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamine, Practical Grade From Crab Shells C-7170* (Sigma, USA), para cromatografia de afinidade à quitina.

Os demais reagentes utilizados no presente trabalho apresentavam grau analítico e alto nível de pureza.

5.4 Bancos de dados, servidores e demais softwares utilizados

Todas as sequências biológicas foram obtidas do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Proteínas integrantes do regulon NagQ de *C. violaceum* foram identificadas através do banco de dados de regulons do RegPrecise 4.0 (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/index.jsp>). O servidor CAZy (<http://www.cazy.org/>) foi utilizado para identificar quitinases e monooxigenases líticas.

Os alinhamentos foram realizados através do programa BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999), utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON; GIBSON; HIGGINS, 2002), BLAST+ (CAMACHO et al., 2009) e do servidor BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A distinção entre grupos de ortólogos foi feita através do programa OrthoMCL (LI; STOECKERT; ROOS, 2003). O software Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013) foi utilizado para a construção da árvore filogenética.

A localização subcelular das proteínas analisadas foi predita através dos servidores CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>) e Psortb 3.0 (<http://www.psort.org/psortb/>). Os servidores SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) foram utilizados para prever a presença de peptídeo sinal. SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) foi utilizado para prever a secreção pela via não clássica.

O servidor *Compute pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/), integrante da plataforma ExPASy, foi utilizado para prever a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI). A solubilidade de proteínas no ambiente intracelular de *Escherichia coli* foi predita pelo servidor *Recombinant Protein Solubility Prediction*, da University of Oklahoma (<http://www.biotech.ou.edu/>). A arquitetura de domínios foi analisada através dos servidores CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) e SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) foi utilizado para a predição de pontes dissulfeto.

6 MÉTODOS

6.1 Construção da via de degradação de quitina em *Chromobacterium violaceum*

6.1.1 Identificação das proteínas

A via quitinolítica de *Vibrio cholerae* (LI; ROSEMAN, 2004; MEIBOM et al., 2004), posteriormente expandida para a família Vibrionaceae (HUNT et al., 2008), foi utilizada como modelo. A pesquisa por proteínas funcionalmente similares em *C. violaceum* foi feita com o Blastp (ALTSCHUL et al., 1990), sendo escolhidas as que apresentassem as maiores pontuações. Resultados com pontuações abaixo de 80 foram desconsiderados. Quando nenhuma correspondência era encontrada, realizava-se uma busca textual no banco de dados do NCBI (NCBI, 2017) por proteínas com atividade similar. Foram utilizadas também proteínas integrantes no regulon NagQ de *C. violaceum*, que regula a utilização de N-acetil-glucosamina, retiradas do banco de dados do RegPrecise 4.0 (NOVICHKOV et al., 2013), sendo dada preferência a estas quando houvesse divergências com as demais análises. As proteínas integrantes da família AA10 e as quitinases (famílias GH18 e GH19) foram identificadas pelo CAZy (LEVASSEUR et al., 2013). As sequências de todas as proteínas foram obtidas do banco de dados do NCBI.

6.1.2 Localização subcelular e secreção

Os programas CELLO2GO (YU et al., 2014), Psortb 3.0 (YU et al., 2010), SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011) e SecretomeP 2.0 (BENDTSEN et al., 2005) foram utilizados para identificar a localização subcelular das proteínas. CELLO2GO faz a predição da localização subcelular através do alinhamento da proteína desejada com uma proteína similar com modelo experimental mais recente e da funcionalidade das proteínas através de análises das sequências e alinhamentos contra os bancos de dados do UniProtKB/SwissProt e UniProtKB/TrEMBL. Psortb 3.0 também prediz a localização subcelular, sendo usado quando o resultado de CELLO2GO era ambíguo (duas ou mais localizações para uma mesma proteína). SignalP 4.1 e SecretomeP 2.0 analisam a secreção pela presença de peptídeo sinal ou pela via não clássica, respectivamente.

6.2 Conservação da via de degradação de quitina no gênero *Chromobacterium*

6.2.1 Obtenção dos proteomas

Os proteomas de todas as estirpes contidas no gênero *Chromobacterium* e disponíveis no banco de dados do NCBI no dia 13 de novembro de 2017 foram salvas no formato fasta.

6.2.2 Formação de grupos de ortólogos

Para a criação de grupos de ortólogos, foi utilizado OrthoMCL, seguindo o protocolo de Fischer *et al.* (2011). O programa usa como entrada alinhamentos múltiplos realizados por BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) entre todas as sequências dos proteomas analisados e os classifica em ortólogos, in-parálogos e co-ortólogos baseado nos alinhamentos com melhores pontuações. In-parálogos são definidos como parálogos recentes (evento de duplicação recente) e co-ortólogos como ortólogos que sofreram duplicação recente (LI; STOECKERT; ROOS, 2003). A partir das sequências de DNA dos genes dos reguladores da via quitinoclástica, identificados em OrthoMCL, foi construída a árvore filogenética da via utilizando o método Neighbor-Joining no software Mega 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013), com *Burkholderia ambifaria* como grupo externo. Durante o alinhamento, os gaps foram arranjados de forma a considerar os códons correspondentes nas sequências proteicas. O valor de *bootstrap* utilizado foi 1000.

6.3 Análises *in silico* das sequências de LPMOs de *C. violaceum* ATCC 12472

A identificação das LPMOs de *C. violaceum* foi feita através do CAZy (LEVASSEUR *et al.*, 2013), utilizando a palavra-chave “chromobacterium violaceum”, na busca pelo nome do organismo (*Organism name*). Todas as proteínas pertencentes à família AA10 foram obtidas do banco de dados do NCBI.

A presença de peptídeo sinal foi predita através do SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011) e Phobius (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007). SecretomeP 2.0 (BENDTSEN *et al.*, 2005) foi usado para prever a secreção pela via não tradicional e suas localizações subcelulares foram estimadas através do CELLO2GO (YU *et al.*, 2014). O servidor *Compute pI/Mw tool* da plataforma ExpASY (GASTEIGER *et al.*, 2005) foi utilizado para calcular o pI e

massa molecular estimadas. A solubilidade das proteínas intracelularmente em *Escherichia coli* foi predita através do *Recombinant Protein Solubility Prediction*, da University of Oklahoma (WILKINSON; HARRISON, 1991). As posições dos domínios foram analisadas pelo CDD (MARCHLER-BAUER et al., 2010) e SMART (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015).

A escolha das sequências para síntese dos plasmídeos considerou os resultados da solubilidade intracelular e configuração dos domínios das proteínas.

6.4 Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Os plasmídeos pET-Sumo contendo as ORFs CV0553 e CV2592 (Anexos D e E) foram inseridos separadamente em células de *E. coli* das estirpes BL21(DE3), SHuffle® T7 Express Competent e ArcticExpress (DE3) pelo tratamento com cloreto cálcio, como descrito por Sambrook *et. al.* (1989). Após, as células foram recuperadas em 800 µL de meio SOC pré-aquecido à 37°C e mantidas à mesma temperatura por 1 h 30 min. Então, 100 µL das transformações foram aplicados em placas contendo meio LB Ágar suplementado com canamicina (50 µg/mL) para *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* SHuffle® T7 Express Competent, e gentamicina (20 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) para ArcticExpress (DE3). As seis placas foram incubadas a 37°C por 16 h. Alguns clones transformados foram selecionados e mantidos em estoque glicerol 15%, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. As proteínas recombinantes originadas dos plasmídios pET-Sumo-CV0553 e pET-Sumo-CV2592 foram denominadas rCv0553-Sumo e rCv2592-Sumo, respectivamente.

Dois clones transformados das três células com os plasmídeos pET-Sumo-CV0553 e pET-Sumo-CV2592 foram inoculados em 5 mL de meio LB caldo, cada um, com os antibióticos apropriados para cada estirpe, e mantidos por 2 h a 37°C, sob agitação orbital de 180 rpm. Após, a temperatura foi reduzida para 20°C e a agitação para 130 rpm e mantidos dessa forma até que as culturas atingissem a densidade óptica à 600 nm entre aproximadamente 0,5 e 0,6. Em um dos inóculos de cada célula contendo os plasmídeos, a expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG em uma concentração final de 0,3 mM, enquanto o outro foi mantido como controle negativo. Todos foram incubados sob agitação orbital de 130 rpm, a 20°C, por 16 h (DE SOUSA et al., 2017).

Ao término do período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 4°C, 6.000 x g, por 10 min. Seu sobrenadante foi descartado e as células submetidas a lise celular, segundo o protocolo de Sambrook *et. al.* (1989). As frações obtidas foram denominadas Extrato Total Solúvel (ETS) e Extrato Total Insolúvel (ETI), sendo dialisadas exaustivamente contra água

destilada. Os extratos de todas as culturas foram analisados por SDS-PAGE.

A célula que apresentou o melhor nível de expressão foi, então, plaqueada em LB Ágar com os antibióticos apropriados e cultivada por 16 h a 37°C. Duas colônias isoladas foram selecionadas, cada uma inoculada em 20 mL de caldo LB com os antibióticos apropriados, e incubada sob agitação orbital de 180 rpm, por 16 h, a 37°C. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi reinoculada em 200 mL de caldo LB com os antibióticos apropriados e mantida a 37°C, 180 rpm por 2 h, quando as condições foram alteradas para 20°C e agitação orbital de 130 rpm, até que atingissem uma densidade óptica a 600 nm entre 0,5 e 0,6. Então, as culturas foram centrifugadas nas condições anteriormente descritas, o meio foi descartado e as células ressuspensas em 200 mL do mesmo meio de cultura com antibióticos apropriados. Em uma das culturas, foi adicionado IPTG em uma concentração final de 0,3 mM, enquanto a outra foi utilizada com controle negativo, sem adição do indutor. As induções foram mantidas por 16 h a 20°C, sob agitação orbital de 130 rpm. Após, seguiu-se o procedimento anteriormente descrito para obtenção do ETS e ETI, dialisados exaustivamente contra água destilada.

6.5 Purificação da proteína recombinante

6.5.1 Cromatografia em matriz de Sepharose com níquel imobilizado

Parte do ETS foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e glicerol 10% e centrifugada (5.000 x g, 10 min) para retirar qualquer material insolúvel que restasse. O sobrenadante foi aplicado em uma matriz *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA) no volume de 1 mL e já equilibrada com o mesmo tampão. A cromatografia iniciou com fluxo de 1 mL/min. Proteínas que não foram retidas na matriz (Pico I.a; PI.a) foram eluídas no tampão de equilíbrio até leituras em $A_{280} < 0,005$. Proteínas que interagiram foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 com NaCl 500 mM e imidazol nas concentrações de 25, 40, 100 e 500 mM, formando quatro picos (PII.a; PIII.a; PIV.a; PV.a). A partir da adição do tampão com imidazol 25mM o fluxo foi modificado para 750 μ L/min. Os tubos com maiores leituras em cada pico foram analisados por SDS-PAGE. Os picos onde a proteína foi identificada tiveram as frações com $A_{280} > 0,040$ reunidas e dialisadas exaustivamente contra água.

6.5.2 Cromatografia em matriz de quitina

ETS, PII.a e PIV.a da cromatografia anterior reunidos foram submetidos a cromatografia em matriz de quitina, seguindo o mesmo protocolo. As amostras foram dialisadas contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo NaCl 1 mM centrifugadas (5.000 x g, 10 min) para remoção de qualquer produto insolúvel. O sobrenadante foi aplicado em matriz de quitina (*Chitin Poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamine, Practical Grade From Crab Shells C-7170*, Sigma, USA), previamente equilibrada com o mesmo tampão, e permaneceu em contato com a mesma por aproximadamente 16 h, a 25°C. Durante a cromatografia, o fluxo foi mantido em 1 mL/min e todas as alíquotas analisadas a 280 nm (A_{280}). As proteínas que não interagiram com a matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio, até $A_{280} < 0,010$. Proteínas retidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M. As frações de PI e PII com $A_{280} > 0,060$ foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra água destilada.

6.6 Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS e condições redutoras (PAGE-SDS)

O protocolo de Laemmli (1970) para géis de poliacrilamida na presença de SDS e β-Mercaptoetanol com géis montados entre placas de vidro foi utilizado. Os géis de empilhamento, na concentração final de 5% de acrilamida, e de separação, na concentração final de 15% de acrilamida, foram preparados de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1 – Volume de reagentes para o preparo de géis de poliacrilamida entre placas de vidro

Reagentes	Gel de Empilhamento	Gel de Separação
	5%	15%
H ₂ O destilada	1,7 mL	1,15 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8%)	415 mL	2,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,25 mL
Tris-HCl 1,0 M pH6,8	315 μL	-
SDS 10%	25 μL	50 μL
Persulfato de Amônio 10% (p/v)	25 μL	50 μL
TEMED	2,5 μL	2 μL

Fonte: Laemmli (1970)

As amostras analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra [água; Tris-HCl (pH 6,8) 50 mM; β-Mercaptoetanol 1% (v/v); SDS 2% (m/v); glicerol 10% (v/v); azul de

bromofel 0,1% (m/v)], aquecidas a 100°C por 10 min e imediatamente utilizadas.

A corrida eletroforética foi feita na voltagem de 120 V em tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3 e SDS 0,1%. Os géis foram corados com Blue Silver (Coomassie G-250 coloidal) (CANDIANO et al., 2004), por no mínimo 24 h.

6.7 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas solúveis foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), com base em curva padrão previamente utilizada com albumina sérica bovina (BSA). A uma alíquota de 100 µL de amostra adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Bradford, a mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente. As leituras de absorbâncias foram feitas a 595 nm. O experimento foi realizado com amostras em triplicata.

6.8 Atividade quitinoclástica

6.8.1 Ensaio de atividade quitinoclástica em quitina coloidal

O ensaio de atividade quitinoclástica em quitina coloidal foi feito seguindo o protocolo de Boller modificado (BOLLER, 1992; MARTINS-MIRANDA, 2002; REISSIG; STROMINGER; LELOIR, 1955), que quantifica a liberação de GlcNAc pela ação de uma proteína sob a quitina. A atividade da fração ETS foi analisada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, tendo como controle negativo tampão acetato e como controle positivo a quitinase recombinante de *C. violaceum* CV2935.

Amostras de 250 µL em triplicata foram incubadas por 1 h, 24 h, e 72 h com 250 µL de quitina coloidal 1% (m/v), sob agitação orbital de 180 rpm. As reações foram interrompidas por aquecimento a 100°C em banho-maria por 5 min e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Após, foram centrifugadas (10.000 x g, 10 min) e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, onde foram adicionados 10 µL de β-glucuronidase (13,2 U/mL). A mistura foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida após esse período por aquecimento a 100°C e imediato resfriamento em banho de gelo. 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 190 µL de tetraborato de potássio 600 mM foram adicionados à mistura. A mistura foi novamente aquecida a 100°C por 5 min e resfriada em banho de gelo pelo mesmo tempo. Então, adicionou-se 1 mL de uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído [DMAB 10% (m/v) em ácido acético com 12,5% de HCl 11,5 M] duas vezes diluída em ácido acético glacial.

A mistura foi incubada a 37°C por 20 min. As reações foram analisadas qualitativamente, pela presença da coloração rosa, e quantitativamente, pelas leituras das absorbâncias a 585 nm.

6.8.2 Ensaio de atividade quitinoclástica em quitina insolúvel

O ensaio de atividade quitinoclástica em quitina insolúvel foi feito utilizando o protocolo descrito no item anterior com algumas modificações. A reação foi feita em triplicata em água destilada, Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e acetato de sódio 50 mM pH 5,2. Todas as reações continham 2,5 mg de quitina de casca de caraquejo (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Foram preparadas reações de 250 µL com 100 µL da proteína recombinante coletadas no PII obtido na cromatografia de afinidade em quitina e uma reação controle, todas mantidas a 37°C, sob agitação orbital de 180 rpm por 24 h. A reação foi parada por aquecimento a 100°C por 5 min e imediato resfriamento em banho de gelo. Após foi adicionado 250 µL da quitinase de cajueiro (*Anacardium occidentale*) rAoChi4849. A reação foi mantida sob leve agitação por 1 h a 37°C e interrompida sendo fervida a 100°C por 5 min e resfriada em banho de gelo. Então, o protocolo foi seguido como descrito no item acima.

6.9 Atividade antifúngica por difusão em placa

O ensaio de atividade antifúngica por difusão em placa buscou observar a formação de halos de inibição do crescimento do fungo filamentosso *Lasiodiplodia theobromae* pelo uso de 50 µL da amostra de PII sozinha, 50 µL de PII com 50 µL da quitinase recombinante rCV3316 de *C. violaceum* e 50 µL de PII com 50 µL da quitinase recombinante rCV1897 de *C. violaceum*. Água destilada estéril foi utilizada como controle negativo e o fungicida Carbendazim® estéril como controle positivo.

O fungo foi repicado em placa contendo meio BDA na concentração de 39 g/L e incubado a 28°C por 7 dias, com fotoperíodo de 10 h de claro e 14 h de escuro. Então, os isolados foram novamente repicados em placas contendo o mesmo meio. As amostras foram aplicadas em poços de 0,8 cm feitos no meio do perímetro das placas. As placas foram mantidas em incubadoras a 28°C, com umidade relativa de 33%.

Imagens dos cultivos após 24 h, 48 h e 72 h de crescimento foram retiradas para posterior análise dos halos de inibição.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Construção da via de degradação de quitina em *Chromobacterium violaceum*

O catabolismo de quitina pode ser separado em 4 etapas: ativação do regulador e síntese proteica, degradação do polissacarídeo cristalino em monômeros de GlcNAc, transporte dos quitoligossacarídeos entre os diferentes compartimentos celulares e transformação dos monômeros de GlcNAc em frutose-6-fosfato no citoplasma. A última etapa envolve proteínas como cinases, deacetilases e deaminases (GOODAY, 1990; HUNT et al., 2008). No total, foram identificadas 30 proteínas candidatas a integrarem a via quitinoclástica de *C. violaceum*. Destas, uma é um regulador de transcrição, quatorze estavam envolvidas na degradação de quitina, nove se relacionavam com transporte de quito-oligômeros e seis catalisavam em processos envolvidos no metabolismo de GlcNAc para frutose-6-fosfato.

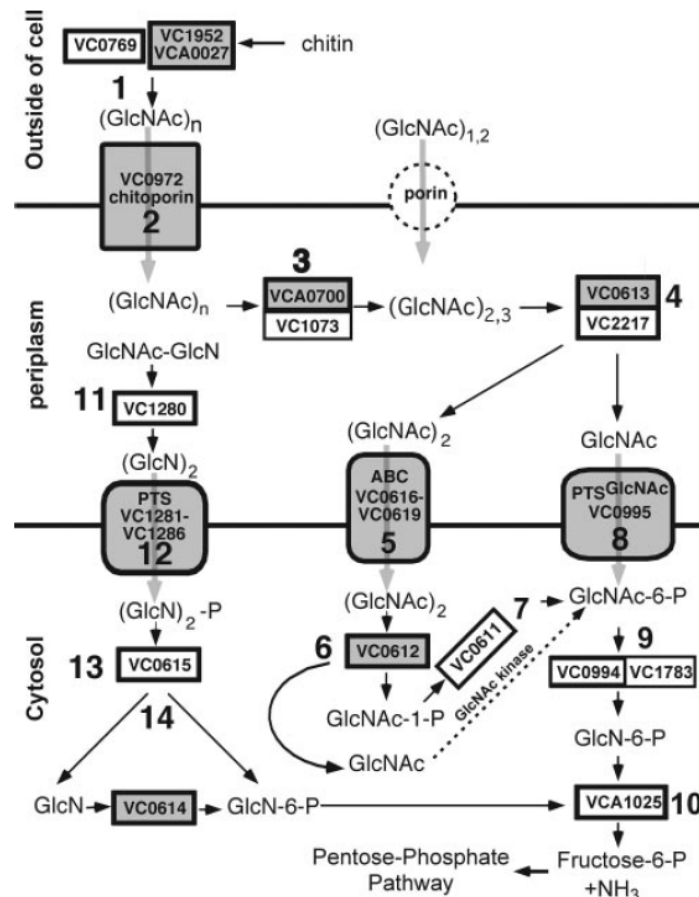
7.1.1 Catabolismo de quitina em *Vibrio cholerae*

Em *Vibrio cholerae*, a via inicia com a hidrólise de quitina por quitinases (Figura 6). Os oligômeros são então transportados para o periplasma de duas formas: por quitoporinas, canais específicos para quitoligossacarídeos que permitem a passagem de oligômeros maiores, ou outras porinas inespecíficas, que permitiriam a passagem de dímeros e monômeros apenas (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; HUNT et al., 2008). No periplasma, quitodextrinases e N-acetil- β -hexosaminidases (também denominadas N-acetil- β -glucosaminidases e quitobiasas) degradariam esses oligômeros em monômeros e dímeros. Os monômeros seriam transportados por um sistema de fosfotransferases PTS (*Phosphoenolpyruvate:carbohydrate Phosphotransferase System*), específico para GlcNAc, que também seria fosforilado (DEUTSCHER et al., 2014; HUNT et al., 2008). Os dímeros seriam translocados por transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) sem modificações, clivados por N-acetil-glucosaminidases citoplasmáticas e fosforilados por cinases específicas. Então, os monômeros de GlcNAc fosforilados seriam deacetilados e deaminados, formando frutose-6-fosfato (GOODAY, 1990; HUNT et al., 2008). Uma via alternativa envolveria o transporte de GlcNAc-GlcN por PTS inespecífico e a catálise por duas enzimas específicas para o substrato parcialmente deacetilado (HUNT et al., 2008; PARK; WANG; ROSEMAN, 2002).

Em *C. violaceum* a enzima envolvida na clivagem de GlcNAc-GlcN não foi encontrada, assim as três proteínas relacionadas com essa via alternativa foram

desconsideradas. As 25 sequências restantes (Tabela 2), incluindo outras duas exclusões descritas abaixo, tiveram sua localização subcelular pesquisada através dos programas descritos no item 5.1.2. Os resultados foram resumidos na Tabela 3.

Figura 6 – Via quitinolítica em *Vibrio cholerae*.



Fonte: Hunt *et. al.* (2008). Na imagem, VC1952 e VCA0027 são quitinases; VC0769 é uma flavodoxina; VC0972 é uma quitoporina; VCA0700 e VC1073 são quitodextrinases; VC0613, VC2217, VC0994 e VC1783 são β -N-acetil-hexosaminidases; VC1281 à VC1286 são proteínas integrantes do PTS de glicose; VC0616 à VC0619 integram o sistema ABC; VC0995 é uma PTS específica para GlcNAc; VC0615 é uma glucanase; VC0612 e VC0614 são fosfotransferases; VC0611 é uma fosfoglicosaminamutase; VCA1025 é uma deaminase. As cores das caixas ao redor dos nomes dos genes indicam a forma como sua função foi prevista: preenchimento cinza indicam evidências bioquímicas; bordas em negrito denotam dados de análises de microarranjo; bordas finas mostram previsões por bioinformática e linhas tracejadas, evidências experimentais (HUNT et al., 2008).

7.1.2 Regulação

Um regulon pode ser definido como o conjunto de genes cuja transcrição é controlada por uma mesma molécula reguladora (NOVICHKOV et al., 2013). O servidor RegPrecise 4.0 (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/index.jsp>) apresenta um banco de dados

Tabela 2 – Lista de ORFs que compõem a via de degradação de quitina em *C. violaceum* ATCC 12472.

Gene	ID Proteínas	Tipo de Proteína	Ação
CV0555	WP_011134110.1	Regulador	Regulação
CV0553	WP_011134108.1	LPMO	Degradação
CV0554	WP_011134109.1	LPMO	Degradação
CV2592	WP_011136139.1	LPMO	Degradação
CV3323	WP_011136870.1	LPMO	Degradação
CV1897	WP_011135449.1	Quitinase	Degradação
CV2935	WP_011136482.1	Quitinase	Degradação
CV4240	WP_011137786.1	Quitinase	Degradação
CV1493	WP_011135045.1	N-Acetil- β -hexosaminidase	Degradação
CV1646	WP_011135198.1	Porina	Transporte
CV3829	WP_011137376.1	Porina	Transporte
CV0263	WP_080508889.1	Quitoporina	Transporte
CV3316	WP_080509133.1	Quitodextrinase	Degradação
CV1440	WP_011134992.1	Quitodextrinase	Degradação
CV0558	WP_011134113.1	Subunidade PTS	Transporte
CV0980	WP_011134535.1	Subunidade PTS	Transporte
CV0559	WP_011134114.1	Subunidade PTS	Transporte
CV0258	WP_011133813.1	Sistema ABC	Transporte
CV0260	WP_011133815.1	Sistema ABC	Transporte
CV0261	WP_011133816.1	Sistema ABC	Transporte
CV0262	WP_011133817.1	Sistema ABC	Transporte
CV0259	WP_011133814.1	N-Acetil- β -hexosaminidase	Degradação
CV2073	WP_043597790.1	N-Acetil- β -hexosaminidase	Degradação
CV2896	WP_011136443.1	Cinase	Fosforilação
CV0556	WP_011134111.1	Deacetilase	Deacetilação
CV0557	WP_011134112.1	Deaminase (Isomerase)	Deaminação

Fonte: Própria autora. CV0980 foi incluída posteriormente, como paróloga de CV0558. Os IDs das proteínas são dados de acordo com informado pelo banco de dados do NCBI para sequências não redundantes.

Tabela 3 – Resultados das análises de localização subcelular nas proteínas da via de degradação de quitina em *C. violaceum*.

Gene	SignalP 4.1	SecretomeP 2.0	CELLO2GO	Psortb 3.0
CV0555	-	0.093046	Citoplasma	Citoplasma
CV0553	-	0.945008	Extracelular	Extracelular
CV0554	22-23	0.926967	Extracelular	Extracelular
CV2592	23-24	0.938601	Extracelular	Extracelular
CV3323	20-21	0.926559	Extracelular	Extracelular
CV1897	25-26	0.944223	Extracelular	Extracelular
CV2935	23-24	0.952709	Extracelular	Extracelular
CV4240	24-25	0.956851	Extracelular	Extracelular
CV1493	21-22	0.885543	Periplasma, extracelular	Membrana externa
CV1646	20-21	0.960646	Membrana externa	Membrana externa
CV3829	19-20	0.957344	Membrana externa	Membrana externa
CV0263	-	0.956727	Membrana externa	Desconhecida
CV3316	18-19	0.935956	Extracelular; membrana externa	Periplasma
CV1440	18-19	0.957710	Periplasma	Desconhecida
CV0558	-	0.096913	Citoplasma	Citoplasma
CV0559	-	0.092289	Membrana interna	Membrana citoplasmática
CV0258	-	0.076139	Citoplasma	Membrana citoplasmática
CV0260	-	0.096390	Membrana interna	Membrana citoplasmática
CV0261	-	0.119729	Membrana interna	Citoplasma
CV0262	21-22	0.937027	Periplasma	Periplasma
CV0259	-	0.113553	Citoplasma	Citoplasma
CV2073	-	0.093918	Citoplasma	Citoplasma
CV2896	-	0.599168	Membrana interna	Desconhecida
CV0556	-	0.090545	Citoplasma	Citoplasma
CV0557	-	0.109389	Citoplasma	Citoplasma

Fonte: Própria autora. Os resultados em SignalP 4.1 indicam a ausência ou presença de peptídeo sinal, indicando seu local de clivagem, caso presente. SecretomeP 2.0 dá como resultado pontuações de 0 a 1, onde valores 0.5 indicam secreção pela via não clássica; este software deve ser utilizado em conjunto com SignalP 4.1, já que a presença de peptídeo sinal é refletida no resultado. Os resultados de CELLO2GO indicam a localização subcelular. Psortb 3.0 também indica localização subcelular, sendo utilizado para validar ou não CELLO2GO.

de regulons, reconstruídos a partir de genômica comparativa. O banco de dados reúne fatores de transcrição de DNA (*Transcription Factor*; TFs) que reconhecem sítios de ligação de fator (*Transcription Factor Binding Sites*; TFBSs) específicos. A partir de predições de TFs e seus respectivos TFBSs, são identificados os genes regulados pelas primeiras. Segundo o RegPrecise 4.0, *C. violaceum* apresenta um regulon relacionado com a utilização de N-acetil-glucosamina, denominado NagQ (Tabela 4), contendo dezoito genes e nove operons. Seu TF é a proteína CV0555, predita em CELLO2GO como um fator de transcrição com ligação à DNA. *dasR*, de *Streptomyces griseus*, codifica uma proteína de ligação ao substrato do transportador ABC com o domínio GntR e foi descrita por Chi (2017) como responsável pela regulação do metabolismo de N-acetil-glucosamina. Domínios GntR geralmente são compostos por um motivo HTH (*Helix-turn-helix*) N-terminal de ligação à DNA (RIGALI et al., 2002). CV0555 também apresenta um domínio GntR, corroborando ainda mais a hipótese de que atuaria como regulador em *C. violaceum*. A proteína provavelmente atua de maneira similar a DasR, como repressor. A ligação de GlcNAc a CV0555 liberaria o sítio operador e permitindo a transcrição. Os monômeros de GlcNAc poderiam vir de degradação de quitina por quitinases expressas em baixos níveis, assim CV0553 seria um repressor fraco.

7.1.3 Degradação

Durante muito tempo acreditava-se que as únicas proteínas envolvidas no catabolismo da quitina fossem as quitinases. Entretanto, sua atividade em quitina cristalina é muita baixa. A descoberta das monooxigenases líticas de polissacarídeo permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação de polímeros recalcitrantes, como celulose e quitina (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Atualmente, acredita-se que as LPMOs atuam na degradação inicial da matriz cristalina do polímero, gerando novos finais de cadeia onde as quitinases atuariam. Em *C. violaceum* foram encontradas cinco monooxigenases integrantes da família AA10 (CV0553, CV0554, CV2592, CV3323 e CV3489), todas provavelmente secretadas para o meio extracelular. Não foi identificada a presença de peptídeo sinal em CV0553, entretanto sua pontuação em SecretomeP 2.0 indica que possa ser secretada pela via não clássica. Análises dos domínios das LPMOs revelou que CV3489 apresenta o domínio catalítico truncado e uma mutação em um dos dois principais aminoácidos envolvido na catálise. A enzima é provavelmente inativa e foi desconsiderada na construção da via.

Tabela 4 – Genes incluídos no regulon NagQ, de acordo com o banco de dados do RegPrecise 4.0 (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/index.jsp>).

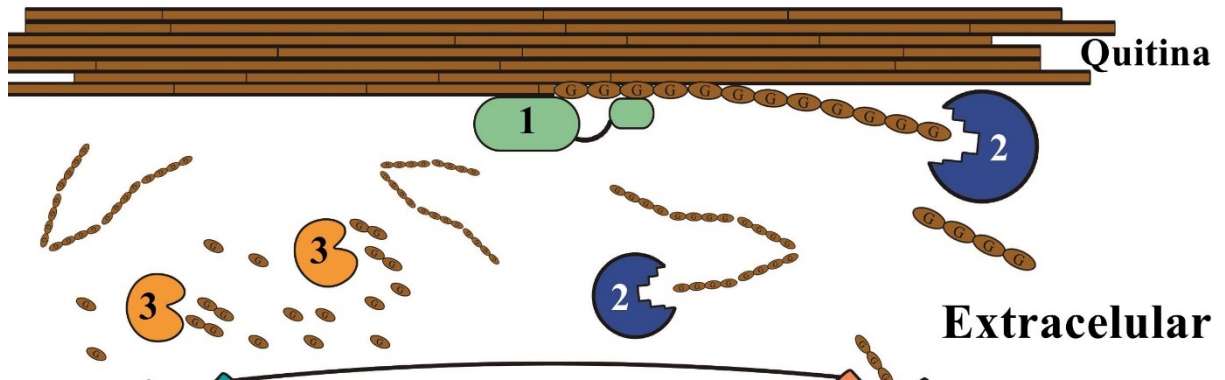
Operon	Gene	Função
1582486	CV3316	Precursor de quitodextrinase (EC 3.2.1.14)
88345	CV3490	Glucoamilase (EC 3.2.1.3)
1582830	CV4240	Quitinase (EC 3.2.1.14)
1581915	CV1897	Quitinase (EC 3.2.1.14)
87795	CV0555	Regulador transcricional da utilização de GlcNAc, família GntR
87795	CV0556	N-acetil-glucosamina-6-fosfato deacetilase (EC 3.5.1.25)
87795	CV0557	Glucosamina-6-fosfato deaminase (isomerase), alternativa (EC 3.5.99.6)
87795	CV0558	Sistema PTS, componente IIA glicose-específico (EC 2.7.1.69) / Proteína do sistema PTS fosfocarreadora / Proteína fosfopiruvato fosfotransferase do sistema PTS (EC 2.7.3.9)
87795	CV0559	Sistema PTS, componente IIA N-acetil-glucosamina específico (EC 2.7.1.69) / Sistema PTS, componente IIB N-acetil-glucosamina específico (EC 2.7.1.69) / Sistema PTS, componente IIC N-acetil-glucosamina específico (EC 2.7.1.69)
1582558	CV3489	Proteína de ligação à quitina
1581730	CV1493	β -hexosaminidase (EC 3.2.1.52)
1582336	CV2935	Quitinase (EC 3.2.1.14)
1581198	CV0263	Porina da membrana externa regulada por N-acetil-glucosamina
87735	CV0262	Sistema ABC de transporte de N-acetil-glucosamina, proteína de ligação ao carboidrato
87735	CV0261	Sistema ABC de transporte de N-acetil-glucosamina, proteína permease 1
87735	CV0260	Sistema ABC de transporte de N-acetil-glucosamina, proteína permease 2
87735	CV0259	β -N-acetil-glucosaminidase (EC 3.2.1.52)
87735	CV0258	Sistema ABC de transporte de N-acetil-glucosamina, proteína de ligação à ATP

Fonte: RegPrecise 4.0 (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/index.jsp>). A numeração dos operons é dada de acordo com a fornecida pelo servidor DMINDA². Em RegPrecise 4.0, CV0262 é incluída no mesmo operon que CV0258-CV0262, apesar de estarem em operons distintos em DMINDA². A função de cada gene é mostrada de acordo com o descrito em RegPrecise 4.0.

Seis quitinases foram encontradas, algumas já descritas experimentalmente (BARBOSA, 2013; DE VASCONCELOS et al., 2003; LOBO et al., 2013; MEDEIROS, 2012; NEPOMUCENO, 2012; TEIXEIRA, 2011). CV2736, integrante da família GH18, foi expressa com sucesso por Medeiros (2012). Apesar de estar ativa, sua atividade contra quitina coloidal foi muita baixa, sendo por isso excluída da via. CV3316, uma GH18, apesar da atividade quitinolítica já descrita (TEIXEIRA, 2011), apresenta grande similaridade com as quitodextrinases de *V. cholerae* VCA0700 e VC2217, com pontuações de 780 e 628 no Blastp (NCBI), respectivamente. Além disso, sua localização subcelular, segundo Psortb 3.0, é periplasmática. Assim, CV3316 foi considerada como provável quitodextrinase na via. CV1440 também pode atuar como quitodextrinase no periplasma, sendo identificada como periplasmática por Psortb 3.0 e CELLO2GO. CV1897 foi a única GH19 encontrada e apresenta um domínio catalítico similar ao de lisozimas, sendo ativa em quitina (NEPOMUCENO, 2012). Todos os servidores utilizados predizem sua secreção. Curiosamente, CELLO2GO não encontrou nenhuma homologia nos bancos de dados pesquisados. CV2935 (também denominada CvChi45) e CV4240 também apresentam secreção predita e atividade quitinolítica confirmada (BARBOSA, 2013; LOBO et al., 2013). Assim, dentre as seis, CV1897, CV2935 e CV4240 agiriam extracelularmente degradando as cadeias de quitina abertas pelas LPMOs. O mecanismo de degradação extracelular é ilustrado na Figura 7.

No periplasma, oligômeros de GlcNAc seriam degradados pelas quitodextrinases CV3316 e CV1440, como descrito anteriormente, formando dímeros e monômeros. Alguns dímeros seriam degradados ainda no periplasma por uma N-acetil- β -hexosaminidase. Três proteínas foram encontradas com essa atividade, CV0259 (descrita em regulon NagQ), CV1493 (em busca por similaridade com VC0613 e VC2217 de *V. cholerae*) e CV2073 (por busca textual). Não foi predito peptídeo sinal em CV0259 e CV2073 e suas pontuações em SecretomeP 2.0 ficaram abaixo da que indicaria secreção. Os dois programas utilizados para predição de localização subcelular indicavam as duas proteínas como citoplasmáticas. Desta forma, seria pouco provável que atuassem como quitobiases periplasmáticas. Entretanto, existe certa incerteza sobre a real localização de CV1493. Suas pontuações em CELLO2GO indicam sua posição no periplasma ou extracelular, enquanto Psortb 3.0 indica a membrana externa. Moura (2016) argumenta que existem poucas chances de CV1493 ser uma proteína de membrana. Segundo a autora, a proteína apresenta grande similaridade com a quitobiase de *Serratia marcescens*, secretada para o meio extracelular, e provavelmente apresentaria a mesma localização. A quitobiase de *S. marcescens* também é apontada em CELLO2GO ontóloga de CV1493.

Figura 7 – Degradação de quitina na fração extracelular de *C. violaceum*.



Fonte: Própria autora e Ronaldo Moura. Catabolismo extracelular de quitina. Na imagem, : monômero de GlcNAC; 1. LPMO; 2. Quitinase; 3. β -hexosaminidase. LPMO se liga à quitina cristalina, oxigenando as microfibrilas e gerando a quebra das cadeias. O surgimento de um fim de cadeia facilita a interação por uma quitinase. Alguns dímeros originados da degradação por quitinases podem ser digeridos pela β -hexosaminidase extracelular CV1493. O esquema foi construído utilizando o programa Photoshop 6.0.

7.1.4 Transporte

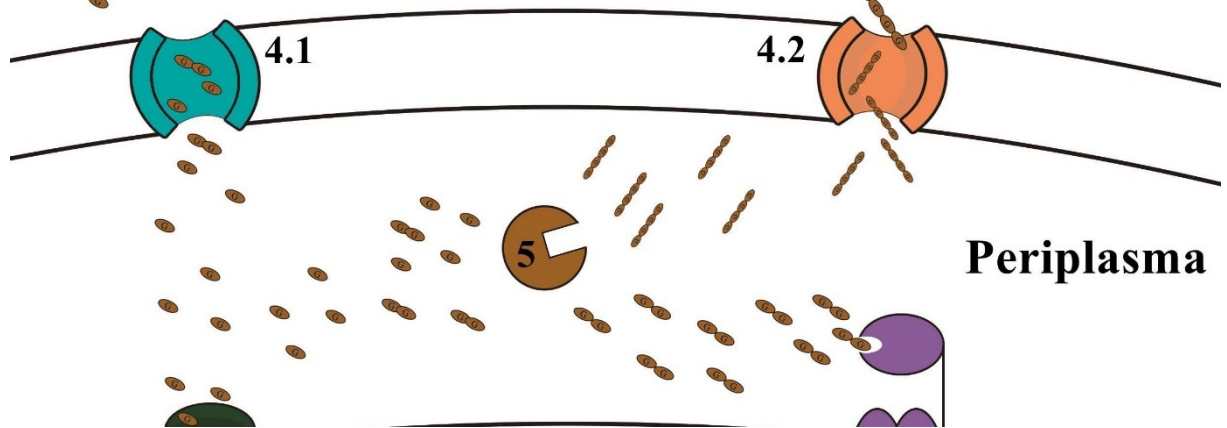
Três porinas foram encontradas, duas por análise de similaridade com a quitoporina VC0972 de *V. cholerae* (CV3829 e CV1646) e a última descrita por RegPrecise 4.0 como integrante do regulon NagQ (CV0263). Todas tiveram sua localização subcelular predita para a membrana externa. CV0263 foi selecionada como potencial quitoporina, sendo ontóloga a quitoporinas de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, segundo CELLO2GO. A proteína não apresentou peptídeo sinal predito, mas pode ser secretada pela via não clássica. CV3829 e CV1646 podem estar envolvidas no transporte de dímeros e monômeros de GlcNAc para o periplasma, assim como outras porinas de *C. violaceum*. O mecanismo periplasmático da via é descrito na Figura 8.


Na membrana interna, dois sistemas mediarão o transporte de GlcNAc e GlcNAc₂ do periplasma para o citosol: o sistema de fosfotransferases PTS e de transportadores da família ABC, respectivamente. Os dois sistemas são dependentes de ATP, ou seja, há gasto ativo de energia no transporte.

PTS é descrito como um sistema de transporte e fosforilação de carboidratos e é classificado em diversas famílias, de acordo com o substrato sob o qual atua. Usualmente é composto por cinco subunidades, uma proteína integral de membrana e quatro proteínas solúveis (DEUTSCHER et al., 2014). Em *C. violaceum*, duas proteínas integrantes do regulon NagQ são descritas como PTS com especificidade para GlcNAc (PTS-GlcNAc), CV0558 e CV0559. Em *V. cholerae*, PTS-GlcNAc é composto apenas pela proteína VC0995, similar a CV0559. CV0558 foi predita como integrante citoplasmático e provavelmente envolvida no mecanismo de absorção de carboidratos (DEUTSCHER et al., 2014). O componente responsável pela especificidade seria a proteína de membrana CV0559. CELLO2GO aponta que sua atividade seria similar ao do componente IIA de PTS específico para N-acetilglucosamina em *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.

Transportadores ABC integram proteínas transmembrana amplamente distribuídas na natureza (HIGGINS; LINTON, 2003). Geralmente estão associados a porinas na membrana externa de Gram-negativas e apresentam cinco subunidades: uma proteína periplasmática de ligação ao substrato, duas proteínas transmembrana que formam o canal de passagem do substrato e duas proteínas citoplasmáticas que hidrolisam o ATP. No regulon NagQ de *C. violaceum* são descritas apenas quatro subunidades para o sistema ABC: uma proteína de ligação ao substrato periplasmática (CV0262), duas proteínas transmembrana (CV0260 e CV0261) e uma proteína citoplasmática que faria a hidrólise do ATP (CV0258). Em RegPrecise

Figura 8. Representação dos mecanismos de transporte e degradação de quitoderivados no periplasma.



Fonte: Própria autora e Ronaldo Moura. Na imagem,  :monômero de GlcNAC; 4.1. porina comum; 4.2. quitoporina; 5. quitodextrinase. Dímeros e monômeros de GlcNac chegam ao periplasma por porinas comuns. Oligômeros maiores são transportados pela quitoporina CV0263. No periplasma, oligômeros maiores são degradados por quitodextrinases, como CV1440 e CV3316, em dímeros e monômeros. O esquema foi construído utilizando o programa Photoshop 6.0.

4.0, os genes que correspondem ao transportador ABC pertencem ao mesmo operon que CV0263 e CV0259, uma quitoporina e uma N-acetil-glucosaminidase, respectivamente. Isso pode indicar que o transporte de quitto-oligômeros pela quitoporina e o sistema ABC estejam integrados. Esse tipo de transportador faz o transporte de GlcNAc₂ do periplasma para o citoplasma, onde os mesmos seriam hidrolisados por CV0259.

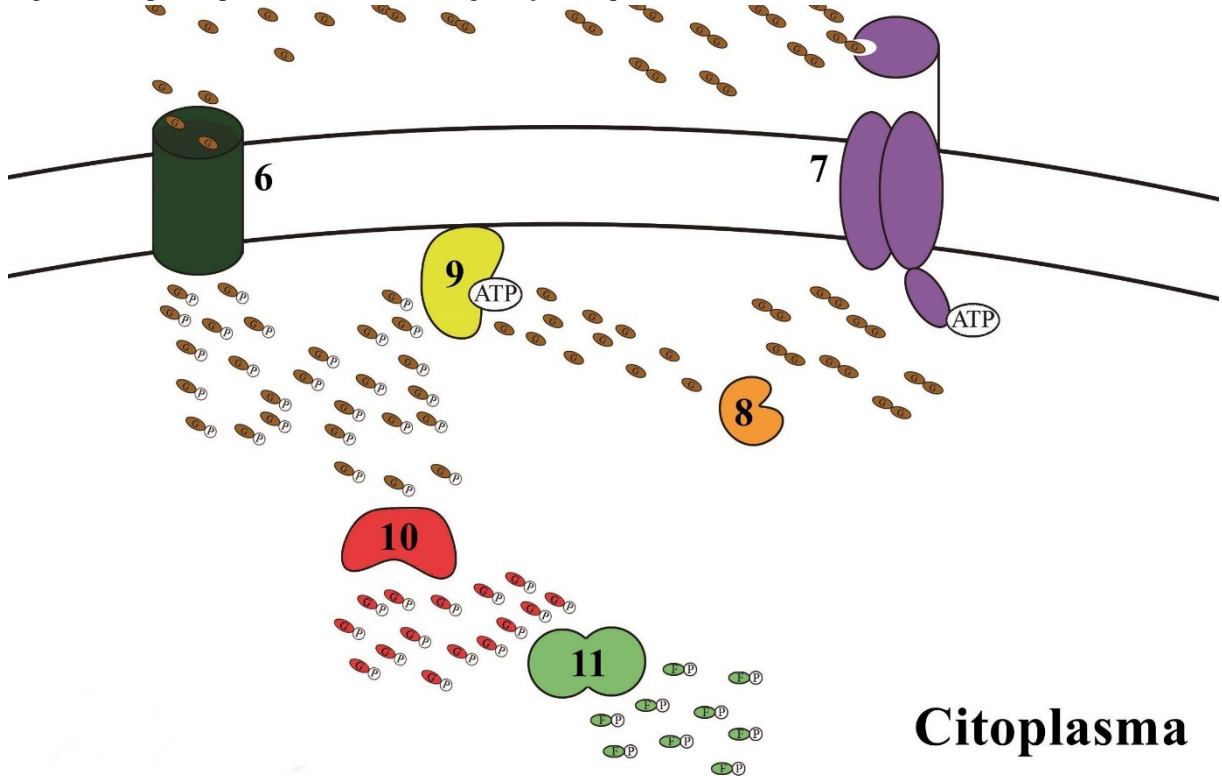
7.1.5 Transformação de GlcNAc em frutose-6-fosfato

Com a completa degradação de quitina em monômeros de GlcNAc e seu transporte para o citoplasma, os monômeros precisam ser fosforilados, deacetilados e deaminados para integrar a glicólise ou a via das pentoses-fosfato. Um GlcNAc-6-fosfato (GlcNAc-6-P) pode ser formado quando o GlcNAc chegar ao citosol através do sistema de fosfotransferases, descrito anteriormente. No caso dos dímeros, que atravessam pelo sistema ABC e são hidrolisados no citoplasma por β -N-acetil-D-glucosaminidases, a fosforilação ocorre mediada por uma cinase, que seria CV2896 em *C. violaceum*. A localização celular da proteína é incerta. A predição por CELLO2GO indica que a mesma seria uma proteína da membrana interna. Entretanto, CV2896 é similar a N-acetil-glucosamina-cinase de *V. cholerae* VC0614, uma proteína intracelular. Sua localização em Psortb 3.0 foi descrita como desconhecida. Após a fosforilação, deacetilases, como VC0994 e VC1783 em *V. cholerae*, retirariam o grupamento acetil transformando a N-acetil-glucosamina-6-fosfato em glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P). Em *C. violaceum*, essa enzima seria CV0556, uma N-acetil-glucosamina-6-fosfato deacetilase citoplasmática similar a deacetilases de *V. cholerae* e *V. furnissii* e integrante do regulon NagQ. O último passo seria a deaminação, mediada por CV0557 em *C. violaceum*, que também atuaria como isomerase. Sua sequência é similar à de aminotransferases-isomerases, como a de *Aquifex aeolicus* e *Symbiobacterium thermophilum*. CV0555, CV0556, CV0557, CV0558 e CV0559 integram o mesmo operon, corroborando a participação de CV0556 e CV0557 na via. O componente citoplasmático da via é descrito na Figura 9.

7.1.6 Modelo catabólico do metabolismo da quitina em *C. violaceum*

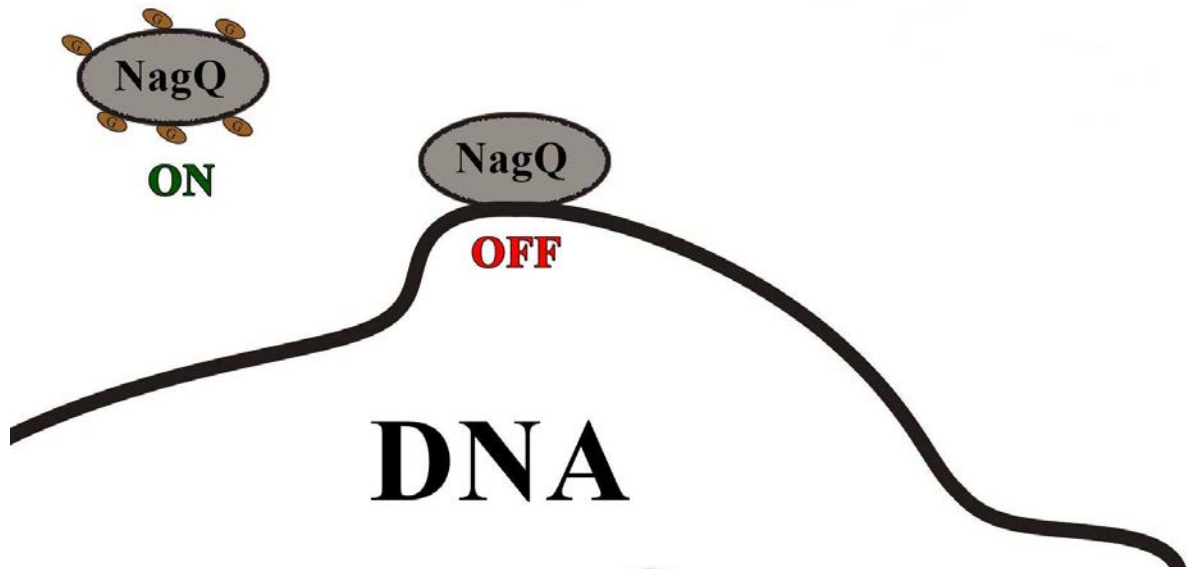
Assim, o catabolismo da quitina em *C. violaceum* iniciaria com a ativação do operador, a partir da interação do repressor CV0555 com GlcNAc, levando a expressão das proteínas relacionadas à degradação da quitina (Figura 10). Extracelularmente, monooxigenases líticas de polissacarídeo (CV0553, CV0554, CV2592 e CV3323) abririam a


Figura 9. Etapa citoplasmática da via de degradação de quitina em *C. violaceum*.



Fonte: Própria autora e Ronaldo Moura. Na imagem: **G** representa GlcNAc; **GP** representa GlcNAc-6-P; **GP** indica GlcN-6P; **FP** significa frutose-6-fosfato; 6. PTS; 7. Sistema ABC; 8. β-hexosaminidase; 9. Cinase; 10. Deacetilase; 11. Deaminase. Monômeros de GlcNAc encontrados no periplasma são transportados e fosforilados por PTS. A imagem ilustra apenas um dos dois domínios da fosfotransferase. Dímeros são transportados através do sistema ABC, com quatro subunidades, duas intermembrana, uma periplasmática de ligação ao substrato e outra citoplasmática de ligação a ATP. No citoplasma, os dímeros são digeridos por quitobiasas intracelulares e fosforilados por uma cinase de membrana. Após, os GlcNAc-6-P serão deacetilados e deaminados para integrarem uma das vias energéticas como frutose-6-fosfato. O esquema foi construído utilizando o programa Photoshop 6.0.

Figura 10 – Regulação da via de degradação de quitina em *C. violaceum*.



Fonte: Própria autora e Ronaldo Moura. Na imagem,  representa monômeros de GlcNAc. NagQ atua como repressor da expressão. Sua interação com resíduos de GlcNAc libera o operador, permitindo a expressão das proteínas da via. O esquema foi construído utilizando o programa Photoshop 6.0.

matriz cristalina do polímero, permitindo a atuação das quitinases (CV1897, CV2935 e CV4240), que formariam oligômeros de GlcNAc e alguns dímeros. Alguns desses dímeros seriam hidrolisados pela β -hexosaminidase CV1493 ainda fora da célula, formando monômeros de GlcNAc. Dímeros e monômeros do polímero atravessariam a membrana externa através de porinas, como CV1646 e CV3829. Oligômeros maiores, formados por três ou mais unidades do açúcar, seriam transportados em um canal específico, a quitoporina CV0263. No periplasma, esses oligômeros seriam clivados por quitodextrinases (CV3316 e CV1440) em dímeros e monômeros. Os monômeros originados da degradação extracelular e do periplasma atravessariam a membrana interna pelo sistema de fosfotransferases (CV0558 e CV0559), que também os fosforilariam, formando GlcNAc-6-P. Os dímeros seriam translocados por sistemas de transportadores ABC (CV0258, CV0260, CV0261, CV0262) e sofreriam a última etapa degradativa no citoplasma por β -hexosaminidase (CV0259 e CV2073). Os monômeros resultantes seriam fosforilados por uma N-acetil-glucosamina cinase provavelmente ligada a membrana interna (CV2896). As GlcNAc-6-P seriam deacetiladas (CV0556) e deaminadas (CV0557), resultando em frutose-6-P, que entraria na glicólise ou na via das pentoses-fosfato, fornecendo energia para a bactéria. O grupamento amina resultante da deaminação originará amônia (NH_3), secretada por *C. violaceum* (STREICHSBIER, 1983). O esquema da via completa pode ser encontrado no Apêndice A.

7.2 Conservação da via de degradação de quitina em *Chromobacterium*

Até o dia 13 de novembro de 2017 havia 41 genomas de diferentes estirpes de bactérias inclusas no gênero *Chromobacterium*. A grande maioria encontra-se ainda no formato de *contigs*, três estavam na etapa de *scaffold*, um como cromossomo e três tinham o genoma completamente anotado. *C. piscinae* ainda não apresenta seu genoma completo, apenas alguns *contigs*. *C. violaceum* é a espécie com mais genomas, com dezesseis estirpes em diferentes processos de anotações, originadas de fontes diversas, como o solo, a água do Rio Negro, sangue humano e solo contaminado com hidrocarbonetos (Tabela 5).

Em OrthoMCL (LI; STOECKERT; ROOS, 2003) foram identificados 23 grupos de ortólogos, a partir das 25 sequências analisadas. Em 21 desses grupos não foram encontradas ortólogas em *C. piscinae*, provavelmente pelo genoma incompleto. As estirpes de *C. violaceum* LK15, LK17, LK30 e LK6 apresentaram todas as proteínas idênticas em todos os grupos analisados. As quatro estirpes foram isoladas de fontes vegetais em Malacca, na Malásia, sendo assim evolutivamente bastante próximas entre si.

Tabela 5 – Lista de estirpes com genoma disponível no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) em 13 de novembro de 2017.

Espécie	Estirpe	Etapa da Anotação	Fonte de Isolamento	Local de Isolamento
<i>Chromobacterium sp.</i>	LK1	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium sp.</i>	LK11	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium sp.</i>	F49	Contigs	Lagoa de águas quentes	Perak, Malásia
<i>Chromobacterium sp.</i>	C-61	Scaffold	-	-
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	DSM 19808	Scaffold	-	Houston, Texas, USA
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	T124	Contigs	<i>Homo sapiens</i>	Kōriyama, Fukushima, Japão
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	H3973	Contigs	Sangue humano	Indiana, USA
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	H4137	Contigs	Dedo humano	Ohio, USA
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	H5244	Contigs	Traqueia humana	Alabama, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	ATCC 12472	Completo	-	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CV1192	Completo	Rio Negro	Manaus, Brasil
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CV1197	Cromossomo	Rio Negro	Manaus, Brasil
<i>Chromobacterium violaceum</i>	GN5	Contigs	Água de fazenda	Selangor, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	L_1B5_1	Contigs	Lago artificial	Selangor, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	LK6	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	LK17	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	LK15	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	LK30	Contigs	Vegetal	Malacca, Malásia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	16-419A	Contigs	Traqueia humana	Louisiana, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	16-419B	Contigs	Traqueia humana	Louisiana, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	16-454	Contigs	Solo	Louisiana, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	H5524	Contigs	Sangue humano	Louisiana, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	H5525	Contigs	Sangue humano	Louisiana, USA
<i>Chromobacterium violaceum</i>	GHPS1	Contigs	Solo contaminado com hidrocarbonetos	Guiana Francesa
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Cv017	Scaffold	Pinheiro estéril	Nova Jersey, USA
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	PRAA4-1	Contigs	Solo, floresta decídua	Catoctin Mountain, Maryland, USA
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	F49	Contigs	Solo	França
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	MWU3525	Contigs	Plantação de cranberry (pântano)	East Wareham, MA, USA

Espécie	Estirpe	Etapa da Anotação	Fonte de Isolamento	Local de Isolamento
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	MWU2576	Contigs	Cranberry nativo (pântano)	Provincetown, MA, USA
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	MWU2387	Contigs	Cranberry nativo (pântano)	Truro, MA, USA
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	MWU2920	Contigs	Cranberry nativo (pântano)	Truro, MA, USA
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	MWU12-2387	Contigs	Pântano úmidos (solo)	Cape Cod National Seashore, USA
<i>Chromobacterium sphagni</i>	IIBBL 14B-1	Contigs	Pântanos	Laneville, West Virginia, USA
<i>Chromobacterium sphagni</i>	IIBBL 37-2	Contigs	Pântanos	Poland, Maine, USA
<i>Chromobacterium pseudoviolaceum</i>	LMG 3953	Contigs	-	-
<i>Chromobacterium aquaticum</i>	CC-SEYA-1	Contigs	Mistura de águas do desgelo da primavera	Yang-Ming Mountain, Taipei County, Taiwan
<i>Chromobacterium amazonense</i>	DSM 26508	Contigs	Pântano	Rio Negro, Brasil
<i>Chromobacterium vaccinii</i>	21-1	Completo	Pântano	Beltsville, Maryland, USA
<i>Chromobacterium vaccinii</i>	MWU205	Contigs	Solo de cranberry (pântano)	Truro, MA, USA
<i>Chromobacterium vaccinii</i>	MWU328	Contigs	Solo de pântano	Carver, MA, USA
<i>Chromobacterium piscinae</i>	ND17	Contigs	Cachoeira	Malásia

Fonte: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na tabela, - indica que a informação não estava disponível no NCBI. Em destaque, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

As monooxigenases líticas em *C. violaceum* ATCC 12472, CV0554, CV2592 e CV3323, provavelmente se devem a eventos de duplicação, sendo consideradas parálogas recentes. Parálogos similares são achados em todas as estirpes da espécie, com exceção de *C. violaceum* Cv017, em *C. sphagni* IIBBL 14-B-1 e em *C. pseudoviolaceum* LMG 3953. Entretanto, apenas ATCC 12472 apresenta três LPMOs parálogas, em todos os outros grupos apenas duas proteínas foram encontradas. Isso pode significar um segundo evento de duplicação na estirpe. Ortólogas de CV0553 estão restritas a *C. violaceum*, com exceção das estirpes 16-419A, 16-419B e Cv017, e a *C. pseudoviolaceum*. Nas espécies *C. piscinae* e *C. vaccinii* MWU205 não foram encontrados ortólogos de nenhuma LPMO (Tabela 6).

As três quitinases secretadas (CV1897, CV2935 e CV4240) são bem conservadas no grupo. Ortólogas de CV4240 foram encontradas em todos os proteomas analisados. *C. piscinae* e *Chromobacterium* sp. C-61 não apresentaram ortólogas para CV1897 e *C. piscinae* e *C. haemolyticum* DSM 19808 para CV2935. A β -hexosaminidase secretada (CV1493) apresentou ortólogas em todos os proteomas, menos em *C. piscinae*. Não foram encontradas ortólogas de CV1440 em *C. subtsugae*, *C. violaceum* Cv017, *C. haemolyticum*, *C. piscinae*, *C. aquaticum* e nas quatro estirpes sem espécie definida. Ortólogas de CV3316, CV0259 e CV2073 foram encontradas em todos os grupos, com exceção do *C. piscinae* (Tabela 7).

Dentre as três porinas analisadas, CV0263 foi a mais conservada. *C. piscinae*, *C. haemolyticum*, *C. piscinae*, *Chromobacterium* sp. C-61, *Chromobacterium* sp. LK1 e *Chromobacterium* sp. LK11 não apresentavam ortólogas para CV1646. Já CV3829 não teve ortólogas em *C. piscinae*, *C. pseudoviolaceum*, *C. subtsugae* MWU2387 e *Chromobacterium* sp. C-61. A conservação de CV0263 no gênero pode indicar que a mesma dê à bactéria alguma vantagem evolutiva. Outro evento de duplicação foi observado em CV0558, classificando-a como paróloga de CV0980, outra proteína também envolvida no sistema das fosfotransferases, provavelmente com a mesma função. A maioria dos grupos analisados apresentava a mesma característica, com exceção de *C. piscinae*, onde não foi encontrada ortóloga para CV0558, e *C. amazonense*, *C. haemolyticum* H5244, *C. sphagni* IIBBL 14B-1 e *C. violaceum* Cv017, onde foi encontrada apenas uma proteína ortóloga a CV0558. Como a ausência de parálogos dentro do grupo de ortólogos a CV0558 ocorre apenas em algumas estirpes, é possível que a perda ou mudança de função da proteína correspondente ao gene duplicado seja secundária e ocorreu de forma separada em cada um. Entretanto, análise genômica mais aprofundadas são necessárias. As demais proteínas integrantes do transporte de GlcNAc e quito-oligômeros eram conservadas em todos os proteomas analisados, com exceção de *C. piscinae*, onde nenhuma foi encontrada (Tabelas 7 e 8).

Tabela 6 – Ortólogos das proteínas envolvidas na degradação extracelular da quitina.

Espécies	CV2592 (CV0554)					
	CV0553	(CV3323)	CV1897	CV2935	CV4240	CV1493
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	-	WP_071109757.1	WP_083340732.1	WP_071108352.1	WP_071108626.1	WP_071110189.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	-	WP_047237101.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_047243112.1	WP_053006886.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	-	WP_043636802.1	WP_081862564.1	-	WP_043635665.1	WP_043633963.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	-	WP_081574772.1	WP_081575793.1	WP_081574973.1	WP_081574326.1	WP_081576322.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	-	WP_081550824.1	WP_081545631.1	WP_081546693.1	WP_081546836.1	WP_081547676.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	-	WP_081554423.1	WP_081556227.1	WP_081554948.1	WP_043592313.1	WP_081556315.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	-	WP_043589502.1	WP_081950330.1	WP_081950427.1	WP_043592313.1	WP_043591705.1
<i>C. piscinae</i> ND17	-	-	-	-	WP_052246719.1	-
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_076226073.1	WP_076226074.1 WP_076226189.1 WP_071111435.1	WP_076228239.1	WP_076227201.1	WP_076226734.1	WP_076227076.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	-	WP_071113852.1	WP_083370179.1	WP_071113284.1	WP_043571949.1	WP_071114871.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	-	WP_071111435.1	WP_083338904.1	WP_071116608.1	WP_047243112.1	WP_071116042.1
<i>C. subtsugae</i> F49	-	WP_043578230.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_047236199.1	WP_043575749.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	-	WP_047237101.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_047258141.1	WP_053006886.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	-	WP_047237101.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_043571949.1	WP_053006886.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	-	WP_047257773.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_047243112.1	WP_043575749.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	-	WP_047249992.1	WP_043577554.1	WP_080962452.1	WP_047243112.1	WP_052941480.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	-	WP_047244066.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_046167235.1	WP_052878104.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	-	WP_065202168.1	WP_043577554.1	WP_099049674.1	WP_046158091.1	WP_065202457.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	-	WP_046167791.1	WP_083340644.1	WP_046168738.1	WP_046167235.1	WP_070981160.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	-	-	WP_046155879.1	WP_046156581.1	WP_052278921.1	WP_046158731.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	-	WP_046167791.1 WP_081542067.1	WP_046167987.1	WP_046168738.1	WP_052278921.1	WP_046168558.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	-	WP_081542274.1	WP_081541723.1	WP_081543254.1	WP_081572963.1	WP_081543461.1

Espécies	CV0553	CV2592 (CV0554) (CV3323)	CV1897	CV2935	CV4240	CV1493
<i>C. violaceum</i> 16-419B	-	WP_081542067.1 WP_081542274.1 WP_081542067.1	WP_081541723.1	WP_081543254.1	WP_011137786.1	WP_081543461.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_081573139.1	WP_081542274.1	WP_081572393.1	WP_081572657.1	WP_043571949.1	WP_081573333.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	-	WP_043578230.1 WP_081542274.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_011137786.1	WP_043575749.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_099426387.1	WP_099426388.1 WP_081542274.1	WP_045051466.1	WP_099427283.1	WP_087697200.1	WP_043616693.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_099426387.1	WP_099426388.1 WP_011134109.1	WP_045051466.1	WP_099427283.1	WP_048403669.1	WP_043616693.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_087697111.1	WP_087697864.1 WP_043614972.1	WP_087698351.1	WP_087697290.1	WP_081526190.1	WP_087698690.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_043616448.1	WP_043616451.1 WP_081526420.1	WP_043612279.1	WP_043615248.1	WP_081526190.1	WP_043616693.1
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_081527442.1	WP_081527441.1 WP_081526420.1	WP_081526024.1	WP_081526994.1	WP_045050078.1	WP_081527540.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_081527442.1	WP_081527441.1 WP_045051632.1	WP_081526024.1	WP_081526994.1	WP_048403669.1	WP_081527540.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_045051827.1	WP_045051828.1 WP_043614972.1	WP_045051466.1	WP_045050597.1	WP_048403669.1	WP_045050658.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_053073575.1	WP_048404375.1 WP_043614972.1	WP_048403718.1	WP_048404233.1	WP_048403669.1	WP_048404994.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_053073575.1	WP_048404375.1 WP_043614972.1	WP_048403718.1	WP_048404233.1	WP_048403669.1	WP_048404994.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_053073575.1	WP_048404375.1	WP_048403718.1	WP_048404233.1	WP_039753940.1	WP_048404994.1

Espécies	CV2592 (CV0554)					
	CV0553	(CV3323)	CV1897	CV2935	CV4240	CV1493
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_053073575.1	WP_043614972.1				
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	-	WP_048404375.1	WP_048403718.1	WP_048404233.1	WP_043571949.1	WP_048404994.1
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	-	WP_019101074.1	-	WP_083860757.1	WP_048408274.1	WP_083860769.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	-	WP_043578230.1	WP_043577554.1	WP_043575934.1	WP_048413500.1	WP_043575749.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	-	WP_048407973.1	WP_048409172.1	WP_082151071.1	WP_071114237.1	WP_048409126.1
	-	WP_048412948.1	WP_082159035.1	WP_082158890.1	WP_071114237.1	WP_048412375.1

Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. Na tabela, o prefixo WP_ indica proteínas com sequências não redundantes, de acordo com o ID das proteínas fornecido pelo NCBI. O traço indica que não foram encontrados ortólogos na estirpe em questão. CV0553, CV2592, CV0554 e CV3323 são monooxigenases líticas de polissacarídeo extracelulares, que iniciariam o catabolismo da quitina. CV1897, CV2935 e CV4240 são quitinases extracelulares, que atuam nos finais de cadeia gerados pelas monooxigenases líticas de polissacarídeo, degradando o polímero de quitina em oligômeros de GlcNAc. CV1493 é uma β -hexosaminidase extracelular, que degradaria os dímeros gerados pelas quitinases em monômeros de GlcNAc.

Tabela 7 – Ortólogos das porinas de *C. violaceum*.

Espécies	CV1646	CV3829	CV0263
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	WP_071109383.1	WP_071109609.1	WP_083341057.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	WP_076098265.1	WP_043578577.1	WP_080509640.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	-	WP_043637934.1	WP_043636561.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	-	WP_081575320.1	WP_081575062.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	-	WP_081545234.1	WP_081547527.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	-	WP_081555556.1	WP_081556417.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	-	WP_043591364.1	WP_052051841.1
<i>C. piscinae</i> ND17	-	-	-
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_076225790.1	-	WP_080762216.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	WP_071112987.1	WP_071113086.1	WP_071111641.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	WP_071116112.1	WP_071113086.1	WP_071115118.1
<i>C. subtsugae</i> F49	WP_052257992.1	WP_043578577.1	WP_080770220.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	WP_076098265.1	WP_043578577.1	WP_080509640.1
	WP_053006926.1		
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	WP_047239118.1	-	WP_080509640.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	WP_052257992.1	WP_043578577.1	WP_080770220.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	WP_052257992.1	WP_047248856.1	WP_080962414.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	WP_052257992.1	WP_043578577.1	WP_080509640.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	WP_065202036.1	WP_043578577.1	WP_080509640.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	WP_052717610.1	WP_046155587.1	WP_046155993.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	WP_052717610.1	WP_046155587.1	WP_046155993.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	WP_052717610.1	WP_046168365.1	WP_046166988.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	WP_081541604.1	WP_081541796.1	WP_080762216.1
<i>C. violaceum</i> 16-419B	WP_081541604.1	WP_081541796.1	WP_080762216.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_081572262.1	WP_081571930.1	WP_081572807.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	WP_052257992.1	WP_043578577.1	WP_080770220.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_099426770.1	WP_099427577.1	WP_099426280.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_099426770.1	WP_099427577.1	WP_099426280.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_087698282.1	WP_087697585.1	WP_087697910.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_043611987.1	WP_043612599.1	WP_080762216.1
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_081525890.1	WP_081526327.1	WP_080939828.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_081525890.1	WP_081526327.1	WP_080939828.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_045050348.1	WP_043612599.1	WP_080939828.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_048403921.1	WP_048404725.1	WP_080969135.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_048403921.1	WP_048404725.1	WP_080969135.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_048403921.1	WP_048404725.1	WP_080969135.1
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_048403921.1	WP_048404725.1	WP_080969135.1
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	-	-	WP_019104224.1
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	WP_052257992.1	WP_043578577.1	WP_080770220.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	-	WP_082150992.1	WP_048408533.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	-	WP_048414183.1	WP_082158745.1

Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. Na tabela, o prefixo WP_ indica proteínas com sequências não redundantes, de acordo com o ID das proteínas fornecido pelo NCBI. O traço indica que não foram encontrados ortólogos na estirpe em questão. CV1646 e CV3829 são porinas, por onde monômeros e dímeros de GlcNAc entrariam no periplasma. CV0263 é uma provável quitoporina, por onde oligômeros de GlcNAc maiores entrariam.

Tabela 8 – Ortólogos dos transportadores da membrana interna de *C. violaceum*.

Espécies	CV0558 (CV0980)	CV0559	CV0258	CV0260	CV0261	CV0262
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	WP_071110003.1 WP_047237713.1	WP_071109760.1	WP_071110722.1	WP_071110720.1	WP_043626969.1	WP_071110807.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	WP_076098000.1 WP_043636805.1	WP_076098001.1	WP_047237462.1	WP_047237464.1	WP_047237465.1	WP_043574946.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	WP_043642227.1 WP_081574206.1	WP_043589508.1	WP_052370483.1	WP_043636554.1	WP_043636682.1	WP_043636557.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	WP_081574773.1 WP_081544933.1	WP_043589508.1	WP_043589122.1	WP_081575060.1	WP_043636682.1	WP_081575061.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	WP_081545397.1	WP_081544932.1	WP_081547537.1	WP_081547533.1	WP_081547531.1	WP_081547529.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	WP_081554830.1 WP_043589506.1	WP_043589508.1	WP_081556414.1	WP_081556416.1	WP_081556434.1	WP_043636557.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	WP_043590782.1	WP_043589508.1	WP_043589122.1	WP_019102572.1	WP_043589131.1	WP_043589132.1
<i>C. piscinae</i> ND17	- WP_076226075.1	-	-	-	-	-
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_076227925.1	WP_076226076.1	WP_076226010.1	WP_043613478.1	WP_076226012.1	WP_076226013.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	WP_071112575.1 WP_071115205.1	WP_071111431.1	WP_071111645.1	WP_071111643.1	WP_071112061.1	WP_071111642.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	WP_071115869.1 WP_043578244.1	WP_071111431.1	WP_071116308.1	WP_071115117.1	WP_071116309.1	WP_071111642.1
<i>C. subtsugae</i> F49	WP_043580329.1 WP_047237713.1	WP_043578247.1	WP_043574936.1	WP_043574942.1	WP_043574944.1	WP_043574946.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	WP_076098000.1 WP_047237713.1	WP_076098001.1	WP_047237462.1	WP_047237464.1	WP_047237465.1	WP_043574946.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	WP_047236566.1 WP_043580329.1	WP_080964057.1	WP_047237462.1	WP_047237464.1	WP_047237465.1	WP_043574946.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	WP_047257771.1	WP_043578247.1	WP_047243654.1	WP_047258294.1	WP_047243656.1	WP_047248166.1

Espécies	CV0558 (CV0980)	CV0559	CV0258	CV0260	CV0261	CV0262
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	WP_047249316.1 WP_080962610.1 WP_047243515.1	WP_043578247.1	WP_047248162.1	WP_047248164.1	WP_047248165.1	WP_047248166.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	WP_047244067.1 WP_065202638.1	WP_080964057.1	WP_047243654.1	WP_043574942.1	WP_047243656.1	WP_043574946.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	WP_081284640.1 WP_070980056.1	WP_043578247.1	WP_047237462.1	WP_047237464.1	WP_047237465.1	WP_043574946.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	WP_070980778.1 WP_046155422.1	WP_082107195.1	WP_070980310.1	WP_070980307.1	WP_070980305.1	WP_046155994.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	WP_046156291.1 WP_046166365.1	WP_082113658.1	WP_046155998.1	WP_046155996.1	WP_046155995.1	WP_046155994.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	WP_046167788.1 WP_081542065.1	WP_082107195.1	WP_046166985.1	WP_046155996.1	WP_046155995.1	WP_046166987.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	WP_081542941.1 WP_081542065.1	WP_081542064.1	WP_081542443.1	WP_043613478.1	WP_081542445.1	WP_081542446.1
<i>C. violaceum</i> 16-419B	WP_081542941.1 WP_081571733.1	WP_081542064.1	WP_081542443.1	WP_043613478.1	WP_081542445.1	WP_081542446.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_081573135.1	WP_081573134.1	WP_081572810.1	WP_043613478.1	WP_076226012.1	WP_081572808.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	WP_043580329.1 WP_099426389.1	WP_043578247.1	WP_081050418.1	WP_043574942.1	WP_043574944.1	WP_043574946.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_099426526.1 WP_099426389.1	WP_081527438.1	WP_099426275.1	WP_099426277.1	WP_099426278.1	WP_099426279.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_099426526.1 WP_087697109.1	WP_081527438.1	WP_099426275.1	WP_099426277.1	WP_099426278.1	WP_099426279.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_087697726.1 WP_043613014.1	WP_087697108.1	WP_087697914.1	WP_043613478.1	WP_087697912.1	WP_087697911.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_043616454.1	WP_011134114.1	WP_043613473.1	WP_043613478.1	WP_043613480.1	WP_043613482.1

Espécies	CV0558 (CV0980)	CV0559	CV0258	CV0260	CV0261	CV0262
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_081526680.1 WP_081527439.1	WP_081527438.1	WP_081527398.1	WP_081527400.1	WP_076226012.1	WP_011133817.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_081526680.1 WP_081527439.1	WP_081527438.1	WP_081527398.1	WP_081527400.1	WP_076226012.1	WP_011133817.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_045051184.1 WP_045051830.1	WP_080939991.1	WP_045050723.1	WP_045050721.1	WP_045050720.1	WP_011133817.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_048404377.1 WP_048405373.1	WP_080939991.1	WP_048403807.1	WP_048403809.1	WP_048403810.1	WP_048403811.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_048404377.1 WP_048405373.1	WP_080939991.1	WP_048403807.1	WP_048403809.1	WP_048403810.1	WP_048403811.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_048404377.1 WP_048405373.1	WP_080939991.1	WP_048403807.1	WP_048403809.1	WP_048403810.1	WP_048403811.1
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_048404377.1 WP_048405373.1	WP_080939991.1	WP_048403807.1	WP_048403809.1	WP_048403810.1	WP_048403811.1
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	WP_039756260.1 WP_083860571.1	WP_083860567.1	WP_019101044.1	WP_019102572.1	WP_019102573.1	WP_019102574.1
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	WP_043578244.1 WP_043580329.1	WP_043578247.1	WP_043574936.1	WP_043574942.1	WP_043574944.1	WP_043574946.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	WP_048407976.1 WP_048408787.1	WP_082150818.1	WP_048408538.1	WP_048408536.1	WP_048408535.1	WP_048408534.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	WP_048412950.1 WP_048413427.1	WP_082158756.1	WP_048412862.1	WP_048412864.1	WP_048412865.1	WP_048412866.1

Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. Na tabela, o prefixo WP_ indica proteínas com sequências não redundantes, de acordo com o ID das proteínas fornecido pelo NCBI. O traço indica que não foram encontrados ortólogos na estirpe em questão. CV0558, CV0980 e CV0559 integram o sistema de fosfotransferases PTS específico para GlcNAc, que transportaria monômeros de GlcNAc do periplasma para o citoplasma, fosforilando-os. CV0258, CV0260, CV0261 e CV0262 integram o sistema ABC, que transportaria dímeros de GlcNAc do periplasma para o citoplasma.

Considerando as enzimas extracelulares com atividade em quitto-oligossacarídeos, todas são bastante conservadas, com exceção de CV1440. A quitodextrinase não foi encontrada em *C. haemolyticum*, *C. piscinae* e nas *Chromobacterium* sp. C-61, LK1 e LK11 (Tabela 9).

As enzimas relacionadas com a metabolização de GlcNAc em frutose-6-P (CV2896, CV0556 e CV0557) também apresentaram ortólogas em todos os grupos analisados, excluindo-se *C. piscinae*, onde não foi encontrado ortólogo para nenhuma das três proteínas, *C. sphagni* IIBBL 37-2, sem ortólogo para CV2896, e *Chromobacterium* sp. C-61, sem ortólogo para CV0557 (Tabela 10).

Todos os genomas apresentavam ortólogos à proteína reguladora CV0555. O grupo de ortólogos a CV0555 era integrado por oito diferentes proteínas responsáveis pela regulação do metabolismo de quitina nos 41 organismos estudados (Tabela 11). Os oito reguladores foram denominados: NagQ1, encontrado em *C. violaceum*, com exceção da estirpe Cv017, e *C. pseudoviolaceum*; NagQ2, visto em *C. aquaticum*, *C. subtsugae*, *C. violaceum* Cv017 e *Chromobacterium* sp. F49; NagQ3, observado em *C. haemolyticum*, exceto a estirpe H4137, *Chromobacterium* sp. C-61 e *Chromobacterium* sp. LK11; NagQ4, constatado apenas na espécie *C. vaccinii*; NagQ5, único de *C. sphagni*; NagQ6, de *C. amazonense* e *C. piscinae*, e NagQ7 e NagQ8, encontrados em *C. haemolyticum* H4137 e *Chromobacterium* sp. LK1, respectivamente. Cada grupo foi formado por proteínas com sequências de aminoácidos idênticas. A conservação do regulador pode também indicar a conservação da via no gênero e sua presença em *C. piscinae* é um indício de que a espécie pode apresentar a via, ainda que poucos ortólogos tenham sido observados na espécie. Entretanto, como dito anteriormente, seu genoma ainda não está completamente disponível, dificultando a análise de seu proteoma. Considerando a importância do regulador no catabolismo de quitina e sua conservação no grupo, o gene NagQ foi selecionado para a construção de uma árvore filogenética.

A árvore filogenética construída a partir das sequências do gene do regulador NagQ (Figura 11) da via indica que o NagQ3, de *C. haemolyticum*, foi provavelmente o primeiro a surgir no grupo. Apesar da estirpe H4137 apresentar um regulador diferente dos demais da espécie, este ainda se assemelha bastante a NagQ3. NagQ8, de *Chromobacterium* sp. LK1 também se aproxima bastante de NagQ3. Adentrando um pouco mais a árvore NagQ6 se separa dos demais reguladores, externo a NagQ2 e NagQ5, que formam um grupo distinto. NagQ2 de *C. violaceum* Cv017 é igual ao de *Chromobacterium* sp. F49 e *C. subtsugae* F49. A proximidade entre os reguladores dessas estirpes é notável. Suas fontes de isolamento são bastante diferentes, *C. violaceum* Cv017 foi isolada de um pinheiro em Nova Jersey, USA; *C. subtsugae* F49 veio de uma amostra de solo da França; e *Chromobacterium* sp. F49 habita lagoas de águas quente

Tabela 9 – Ortólogos de enzimas que degradam quitto-oligômeros no periplasma e citosol.

Espécies	CV1440	CV3316	CV0259	CV2073
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	WP_071110234.1	WP_071109026.1	WP_071110721.1	WP_071110440.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	-	WP_047237793.1	WP_047237463.1	WP_047237026.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	-	WP_043633832.1	WP_043636549.1	WP_081862780.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	-	WP_081575783.1	WP_081575059.1	WP_081574116.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	-	WP_081545615.1	WP_081547535.1	WP_081544633.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	-	WP_081556237.1	WP_081556415.1	WP_081556199.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	-	WP_043591630.1	WP_043589125.1	WP_081574116.1
<i>C. piscinae</i> ND17	-	-	-	-
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_076227297.1	WP_076227874.1	WP_076226011.1	WP_076225509.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	WP_095210855.1	WP_071114603.1	WP_071111644.1	WP_095210854.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	WP_071116021.1	WP_071115586.1	WP_071115116.1	WP_071116268.1
<i>C. subtsugae</i> F49	-	WP_043574511.1	WP_043574940.1	WP_043580061.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	-	WP_047237793.1	WP_047237463.1	WP_047237026.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	-	WP_047237793.1	WP_047237463.1	WP_047237026.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	-	WP_047237793.1	WP_047243655.1	WP_047237026.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	-	WP_047248684.1	WP_047248163.1	WP_047249908.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	-	WP_047237793.1	WP_047243655.1	WP_047237026.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	-	WP_047237793.1	WP_047237463.1	WP_065202589.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	WP_070981079.1	WP_070979377.1	WP_070980308.1	WP_070981601.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	WP_046157239.1	WP_052729087.1	WP_046155997.1	WP_046156422.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	WP_046168787.1	WP_052717266.1	WP_046166986.1	WP_046167117.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	WP_043618162.1	WP_081542277.1	WP_081542444.1	WP_081543379.1
<i>C. violaceum</i> 16-419B	WP_043618162.1	WP_081542277.1	WP_081542444.1	WP_081543379.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_043618162.1	WP_081572514.1	WP_081572809.1	WP_081573080.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	-	WP_043574511.1	WP_043574940.1	WP_043580061.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_099426683.1	WP_099427417.1	WP_099426276.1	WP_099427793.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_099426683.1	WP_099427417.1	WP_099426276.1	WP_099427793.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_087698780.1	WP_087697861.1	WP_087697913.1	WP_043597790.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_043618162.1	WP_052262856.1	WP_043613475.1	WP_043613942.1
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_081527561.1	WP_081526425.1	WP_081527399.1	WP_081527687.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_081527561.1	WP_081526425.1	WP_081527399.1	WP_081527687.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_045052421.1	WP_052942222.1	WP_045050722.1	WP_045052047.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_043618162.1	WP_048405023.1	WP_048403808.1	WP_048405423.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_043618162.1	WP_048405023.1	WP_048403808.1	WP_048405423.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_043618162.1	WP_048405023.1	WP_048403808.1	WP_048405423.1
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_043618162.1	WP_048405023.1	WP_048403808.1	WP_048405423.1
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	-	WP_019103229.1	WP_019102571.1	WP_085951907.1
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	-	WP_043574511.1	WP_043574940.1	WP_043580061.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	-	WP_048407842.1	WP_048408537.1	WP_082151114.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	-	WP_048414693.1	WP_048412863.1	WP_082158699.1

Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. Na tabela, o prefixo WP_ indica proteínas com sequências não redundantes, de acordo com o ID das proteínas fornecido pelo NCBI. CV1440 e CV3316 são prováveis quitodextrinases periplasmáticas que degradaria quitto-oligômeros em dímeros e monômeros de GlcNAc. CV0259 e CV2073 são β -hexosaminidases citoplasmáticas que degradariam dímeros de GlcNAc em monômeros.

Tabela 10 – Ortólogas das enzimas que convertem GlcNAc em frutose-6-fostato.

Espécies	CV2896	CV0556	CV0557
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	WP_071108323.1	WP_071109758.1	WP_071109759.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	WP_081862494.1	WP_043636906.1	WP_043589504.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	WP_081574963.1	WP_043636906.1	WP_043589504.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	WP_081546737.1	WP_081544988.1	WP_081544934.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	WP_081554958.1	WP_081554592.1	WP_043589504.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	WP_081950425.1	WP_043589961.1	WP_043589504.1
<i>C. piscinae</i> ND17	-	-	-
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_084194101.1	WP_011134111.1	WP_011134112.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	-	WP_071111433.1	WP_071111432.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	WP_083339030.1	WP_071111433.1	WP_071111432.1
<i>C. subtsugae</i> F49	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	WP_043581125.1	WP_047257772.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	WP_047248488.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_065202167.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	WP_070979009.1	WP_046167790.1	WP_070980058.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	WP_046156612.1	WP_046156293.1	WP_046156292.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	WP_046156612.1	WP_046167790.1	WP_046167789.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	WP_081543236.1	WP_011134111.1	WP_081542066.1
<i>C. violaceum</i> 16-419B	WP_081543236.1	WP_011134111.1	WP_081542066.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_081543236.1	WP_081573137.1	WP_081573136.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_011136443.1	WP_011134111.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_011136443.1	WP_011134111.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_011136443.1	WP_011134111.1	WP_087697110.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_011136443.1	WP_011134111.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_081527867.1	WP_081527440.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_081527867.1	WP_081527440.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_080939815.1	WP_045051829.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_080968941.1	WP_048404376.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_080968941.1	WP_048404376.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_080968941.1	WP_048404376.1	WP_011134112.1
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_080968941.1	WP_048404376.1	WP_011134112.1
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	WP_081574963.1	WP_019101072.1	-
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	WP_043581125.1	WP_043578235.1	WP_043578237.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	WP_082151059.1	WP_048408035.1	WP_048407975.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	WP_048414028.1	WP_048413197.1	WP_048412949.1

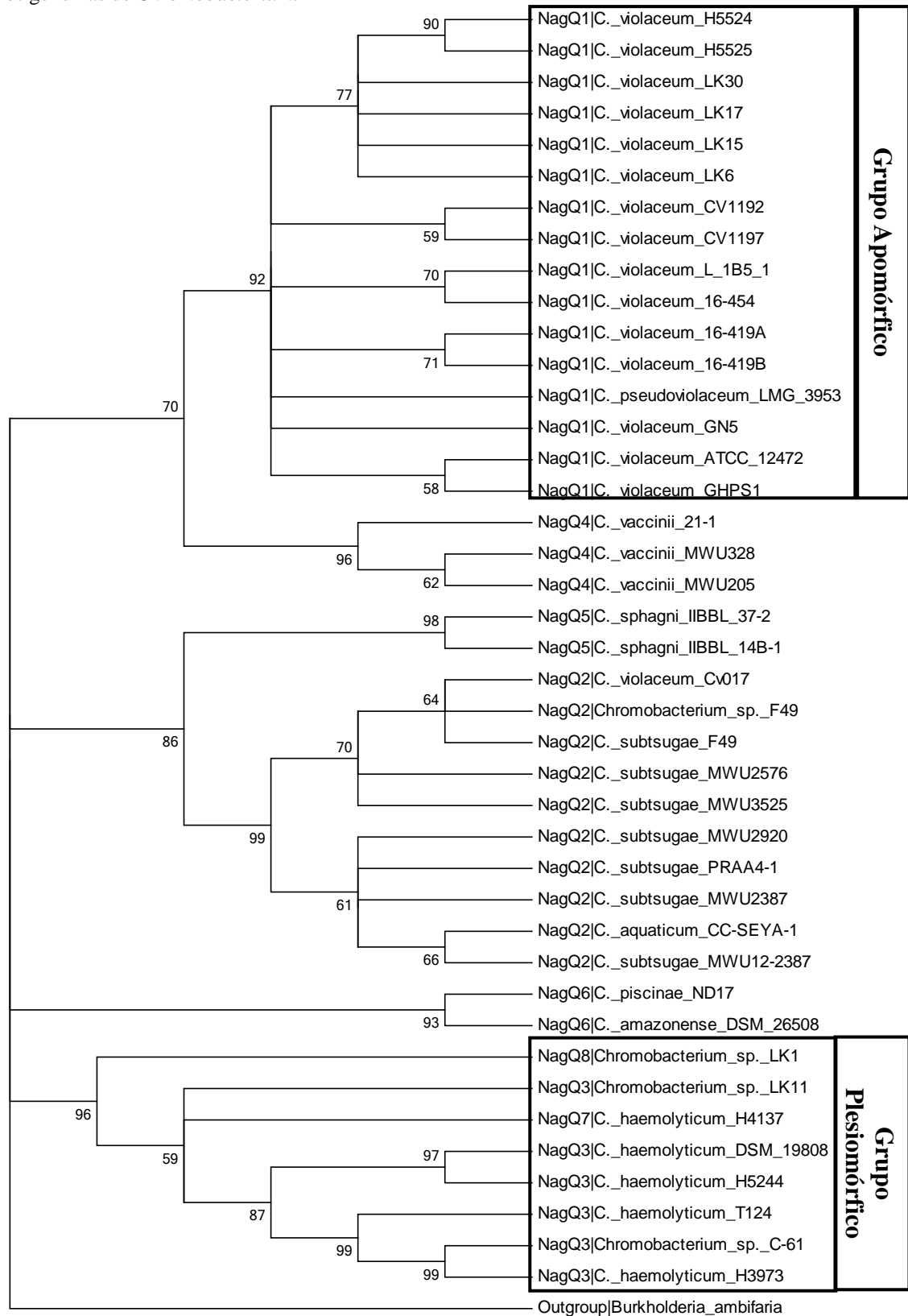
Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. Na tabela, o prefixo WP_ indica proteínas com sequências não redundantes, de acordo com o ID das proteínas fornecido pelo NCBI. CV2896 seria uma cinase ligada à membrana interna que fosforilaria os monômeros de GlcNAc. CV0556 é uma deacetilase, que transformaria GlcNAc-6-fosfato em GlcN-6-fosfato. CV0557 é uma deaminase, que transformaria GlcN-6-fosfato em frutose-6-fosfato.

Tabela 11 – Ortólogos do regulador NagQ

Espécies	CV0555
<i>C. amazonense</i> DSM 26508	WP_043629116.1
<i>C. aquaticum</i> CC-SEYA-1	WP_043578231.1
<i>C. haemolyticum</i> DSM 19808	WP_019101073.1
<i>C. haemolyticum</i> H3973	WP_019101073.1
<i>C. haemolyticum</i> H4137	WP_081544935.1
<i>C. haemolyticum</i> H5244	WP_019101073.1
<i>C. haemolyticum</i> T124	WP_019101073.1
<i>C. piscinae</i> ND17	WP_043629116.1
<i>C. pseudoviolaceum</i> LMG 3953	WP_011134110.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 14B-1	WP_071111434.1
<i>C. sphagni</i> IIBBL 37-2	WP_071111434.1
<i>C. subtsugae</i> F49	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> MWU12-2387	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2387	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2576	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> MWU2920	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> MWU3525	WP_043578231.1
<i>C. subtsugae</i> PRAA4-1	WP_043578231.1
<i>C. vaccinii</i> 21-1	WP_021475838.1
<i>C. vaccinii</i> MWU205	WP_021475838.1
<i>C. vaccinii</i> MWU328	WP_021475838.1
<i>C. violaceum</i> 16-419A	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> 16-419B	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> 16-454	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> Cv017	WP_043578231.1
<i>C. violaceum</i> CV1192	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> CV1197	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> GHPS1	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> GN5	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> H5524	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> H5525	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> L_1B5_1	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> LK15	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> LK17	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> LK30	WP_011134110.1
<i>C. violaceum</i> LK6	WP_011134110.1
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	WP_019101073.1
<i>Chromobacterium</i> sp. F49	WP_043578231.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK1	WP_048407974.1
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	WP_019101073.1

Fonte: Resultados obtidos em análises com OrthoMCL. As cores mostram os grupos de reguladores formados, onde cada grupo é composto por proteínas com sequências de aminoácidos idênticas. Em amarelo, NagQ1; em azul, NagQ2; em cinza, NagQ3; em verde, NagQ4; em roxo, NagQ5; em vermelho, NagQ6; em azul escuro, NagQ7 e sem destaque, NagQ8.

Figura 11 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências do gene de NagQ nos genomas de *Chromobacterium*.



Fonte: Própria autora. Construção utilizando o programa Mega 6.06 com genes obtidos do banco de dados do NCBI e valor de *bootstrap* de 1000. O alinhamento dos genes considerou os códons das sequências proteicas ao formar gaps. Na figura, os números indicam o valor de *bootstrap* obtido, em porcentagem. Os grupos plesiomórfico (NagQ 3, 7 e 8) e apomórfico (NagQ1) estão indicados na figura.

em Perak, na Malásia. NagQ4, de *C. vaccinii*, é o regulador mais próximo de NagQ1, que engloba as espécies *C. violaceum* e *C. pseudoviolaceum*. Os reguladores de LK6, LK15, LK17, LK30 são idênticos e próximo aos de H5524 e H5525. O regulador de *C. violaceum* é o mais recente evolutivamente dentre os analisados.

7.3 Caracterização bioquímica *in silico* das sequências de LPMOs de *C. violaceum* ATCC 12472

Cinco proteínas pertencentes a família AA10 foram encontradas: CV0553, com 323 aminoácidos; CV0554, com 359 aminoácidos; CV2592, com 363 aminoácidos; CV3323, com 362 aminoácidos, e CV3489, com 192 aminoácidos. Destas, CV0554, CV2592 e CV3323 apresentaram peptídeo sinal SP predito por SignalP 4.1. A análise pelo servidor Phobius confirmou os resultados de SignalP 4.1 e indicou um peptídeo sinal em CV0553. Em SecretomeP 2.0, CV3489 apresentou pontuação de 0.901793. Pontuações acima de 0.5 indicam secreção pela via não clássica, indicando provável secreção de CV3489 por essa direção. O servidor CELLO2GO caracteriza as enzimas CV0554, CV2592 e CV3323 como extracelulares e CV0553 e CV3489 como periplasmáticas nas análises onde considera apenas as sequências de aminoácidos. Quando a função é considerada, as cinco proteínas são classificadas como componentes extracelulares. A atividade dessas enzimas está diretamente relacionada com sua secreção, já que atuam sobre um polímero grande demais para entrar na célula. Em *Serratia marcescens*, por exemplo, a monooxigenase lítica CBP21 atua fora da bactéria (VAAJE-KOLSTAD et al., 2013). CELLO2GO aponta ainda que as cinco proteínas são similares a ChiY de *Yersinia enterocolitica* e GbpA de *Vibrio cholerae*. As duas foram caracterizadas como proteínas de ligação à quitina, mas atualmente a atividade de monooxigenase de polissacarídeo de GbpA é reconhecida (LOOSE et al., 2014). GbpA é secretada e atua como fator de virulência em *Vibrio*, mediando adesão à células humanas intestinais (KIRN; JUDE; TAYLOR, 2005). Análises em ChiY mostram sua similaridade com GbpA e indicam que a mesma tenha função parecida (IWOBI et al., 2003; SHUTINOSKI; SCHMIDT; HEUSIPP, 2010).

Os pIs e massas moleculares teóricas, preditos em *Compute pI/Mw tool* após as retiradas dos respectivos peptídeos sinais, apresentaram os valores de 8,80 e 33,1 kDa, em CV0553; 8,91 e 38,9 kDa, em CV0554; 9,03 e 40,1 kDa, em CV2592; 8,91 e 40,1 kDa, em CV3323, e 9,25 e 21,4 em CV3489. Análises da solubilidade das proteínas no ambiente intracelular de *Escherichia coli* (www.biotech.ou.edu) indicaram 96,9% de solubilidade para CV0553, 100% para CV0554, 100% para CV2592, 96,9% para CV3323 e 100% para CV3489.

As arquiteturas dos domínios apresentaram as mesmas configurações no CDD e SMART, com pequenas alterações em seus comprimentos (Figura 12). CV0553 é constituída apenas pelo domínio catalítico LPMO. CV0554, CV2592 e CV3323 apresentam o mesmo domínio catalítico e um domínio de ligação à quitina CBM12 C-terminal. Os dois servidores indicaram que CV3489 apresentava apenas o domínio catalítico truncado (Tabela 12). GbpA, *V. cholerae*, é uma proteína modular com quatro domínios, um domínio catalítico LPMO, dois domínios similares a fibronectina FnIII e um domínio de ligação a quitina (WONG et al., 2012). Alinhamentos posteriores mostraram que CV0553, CV0554, CV2592 e CV3323 também apresentam um domínio FnIII. Em GbpA, os domínios FnIII estão relacionados com adesão ao hospedeiro. A similaridade entre LPMOs de *C. violaceum* e GbpA de *Vibrio* e a presença de um FnIII poderia indicar a relação dessas proteínas com a patogenicidade na primeira.

Em CBP21, duas histidinas são fundamentais na catálise de quitina, His28 e His114. His28 representa o N-terminal da proteína após a clivagem do peptídeo sinal (VAAJEKOLSTAD et al., 2010). Todas as proteínas apresentam os dois resíduos, com exceção de CV3489, onde His28 foi substituída por uma glicina (Figura 13). Considerando o domínio catalítico truncando e a mutação em um resíduo dos principais resíduos no domínio catalítico, CV3498 é muito provavelmente uma enzima inativa.

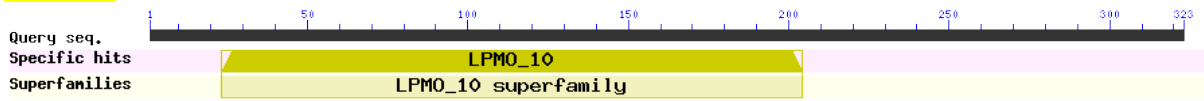
Das cinco monooxigenases líticas de polissacarídeo de *C. violaceum* ATCC 12472, restaram quatro candidatas para a construção do plasmídeo sintético. CV0554, CV2592 e CV3323 são parálogas recentes, como dito anteriormente, e sua atividade provavelmente é bastante similar. Assim, CV2592 foi selecionada dentre as três para ser expressa. CV0553 não apresenta o domínio de ligação a quitina, sendo por isso também selecionada.

7.4 Expressão de CV0553 e CV2592 em diferentes estirpes de *Escherichia coli*

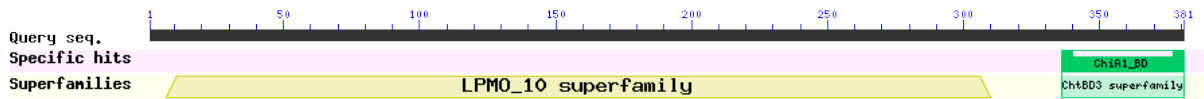
Uma indução piloto de 5 mL foi realizada nas estirpes de *E. coli* BL21(DE3), SHuffle® T7 Express Competent e ArcticExpress (DE3) contendo os plasmídeos pET-Sumo-CV0553 e pET-Sumo-CV2592. As induções foram realizadas a 20°C, 130 rpm por 16 h, após a adição de 0,3 mM de IPTG. Culturas sem IPTG contendo estirpes com os mesmos plasmídeos foram utilizadas como controle. Passado o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação (4°C, 6.000 x g, 10 min) e lisadas utilizando o protocolo descrito em Sambrook et al. (1989). As frações intracelulares solúveis (ETS) e insolúveis (ETI) foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. Doravante, CV0553 será denominada como rCv0553-Sumo e CV2592 como rCv2592-Sumo.

Figura 12 – Arquitetura de domínios das cinco LPMOs de *C. violaceum* ATCC 12472.

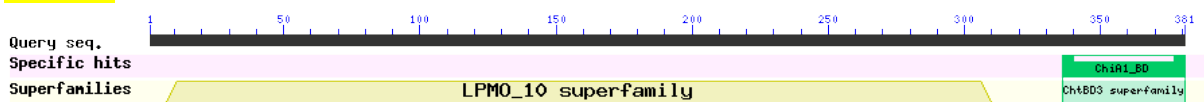
CV0553



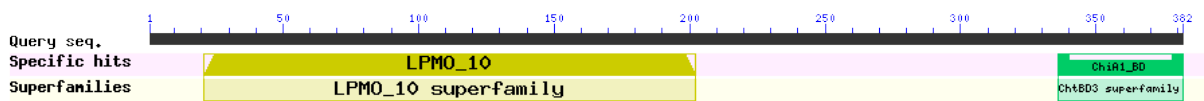
CV0554



CV2592



CV3323



CV3489



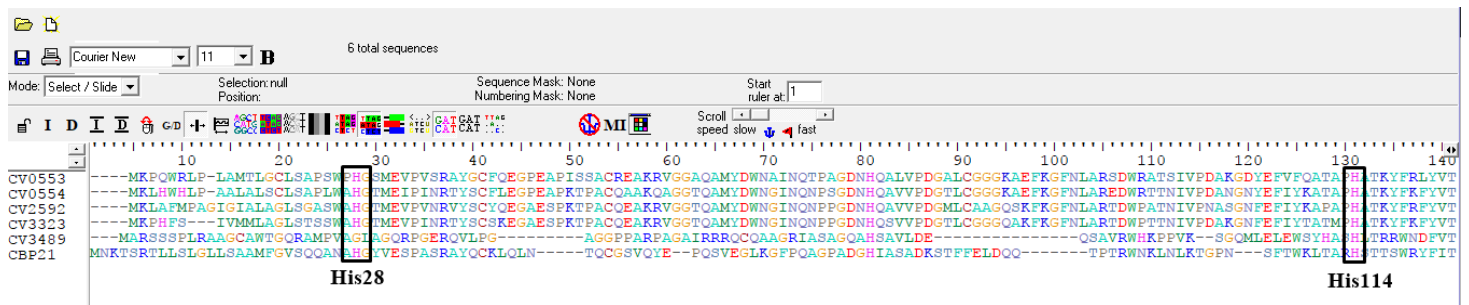
Fonte: imagens retidas do servidor CDD. CV0553 e CV3489 não apresentam o domínio de ligação à quitina C-terminal. Segundo análises pelo software OrthoMCL, CV0554, CV2592 e CV3323 são parálogas. CV3489 apresenta o domínio catalítico truncado, sendo muito provavelmente inativa. Em destaque, as duas proteínas selecionadas para serem expressas em *Escherichia coli*.

Tabela 12 – Arquitetura de domínio predita pelo CDD.

Proteína	Peptídeo Sinal (SignalP)	CatD (LPM10)	ChBD
CV_0553	-	23-204	-
CV_0554	1-22	23-310	336-381
CV_2592	1-23	24-205	340-386
CV_3323	1-20	21-202	336-382
CV_3489	-	60-192	-

Fonte: Dado obtido de análise em SignalP 4.1 e CDD. Os valores ilustram a posição dos aminoácidos nas sequências proteicas. Em destaque, as duas proteínas selecionadas para serem expressas em *Escherichia coli*.

Figura 13 – Alinhamento entre LPMOs de *C. violaceum* e CBP21 de *Serratia marcescens*.



Fonte: Própria autora. O alinhamento foi realizado no software BioEdit 7.2.5 utilizando o algoritmo de ClustalW. Foram utilizadas as seqüências das cinco LPMOs de *C. violaceum* ATCC 12472 (CV0553, CV0554, CV2592, CV3323 e CV3489) e de CBP21 de *Serratia marcescens* contendo as seqüências correspondentes aos respectivos peptídeos sinais. As posições das histidinas destacadas correspondem às de CBP21. Em His28 vemos a mutação de CV3489. His114 é conservada nas seis proteínas.

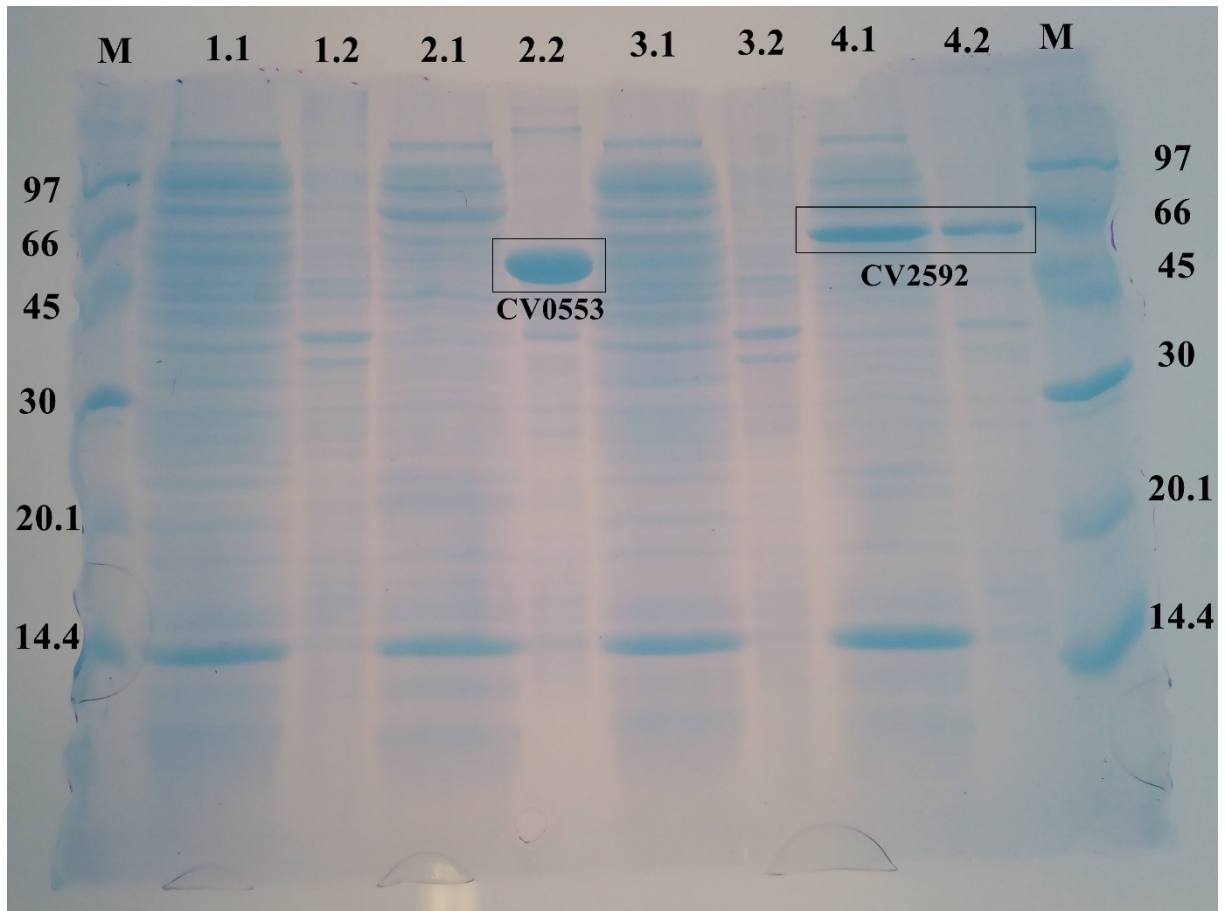
As imagens correspondentes as frações ETS e ETI de rCv0553-Sumo mostraram uma banda aparente em torno de 45 kDa no ETI das três estirpes. O tamanho predito de rCv0553-Sumo é de 46,57 kDa, pois além da sequência para CV0553 a proteína apresenta uma calda de histidina com seis resíduos de His, um sítio de clivagem para a protease TEV e a proteína Sumo. As frações ETS e ETI correspondentes a induções com pET-Sumo-CV2592 apresentaram uma banda de cerca de 60 kDa em ETS e ETI nas três células. A sequência de rCv2592-Sumo tem massa molecular de aproximadamente 51,06 kDa. Assim, rCv0553-Sumo foi expressa nas três células analisadas, mas ficou insolúvel, provavelmente em corpos de inclusão. rCv2592-Sumo também foi expressa e ficou parcialmente solúvel. Em ArcticExpress (DE3) não foi possível observar a banda referente a rCv2592-Sumo, pois seu tamanho correspondia ao de chaperoninas presentes na estirpe. As imagens apontam que *E. coli* BL21(DE3) produziu uma porcentagem maior de rCv2592-Sumo quando comparada com as duas outras cepas. As imagens dos géis de poliacrilamida são mostradas nas Figuras 14, 15 e 16.

Os plasmídeos pET-Sumo utilizam a proteína de fusão Sumo (*Small Ubiquitin-like Modifier*) que pode aumentar a expressão e solubilidade de proteínas em *E. coli* (MOSSISSOVA; LIMA, 2000; SAITOH; PU; DASSO, 1997). O plasmídeo foi selecionado por possivelmente aumentar a produção das proteínas recombinante em sua forma solúvel. Entretanto, análise da solubilidade realizada após expressão das proteínas rCv0553-Sumo e rCv2592-Sumo indicam porcentagem de 0% e 4,4%, respectivamente. A porcentagem aumentaria para 72,8% em rCv2592-Sumo caso a calda de histidina fosse retirada. A sequência de aminoácidos de rCv2592-Sumo é descrita no Anexo C.

A construção dos plasmídeos sintéticos envolveu a retirada dos peptídeos sinais das duas sequências. A produção de proteínas intracelularmente apresenta uma série de vantagens, como o maior rendimento e a possibilidade de construção de plasmídeos mais simples, entretanto há um desfavorecimento na formação de pontes dissulfeto e as proteínas inativas podem ser agregadas em corpos de inclusão (HANNIG; MAKRIDES, 1998).

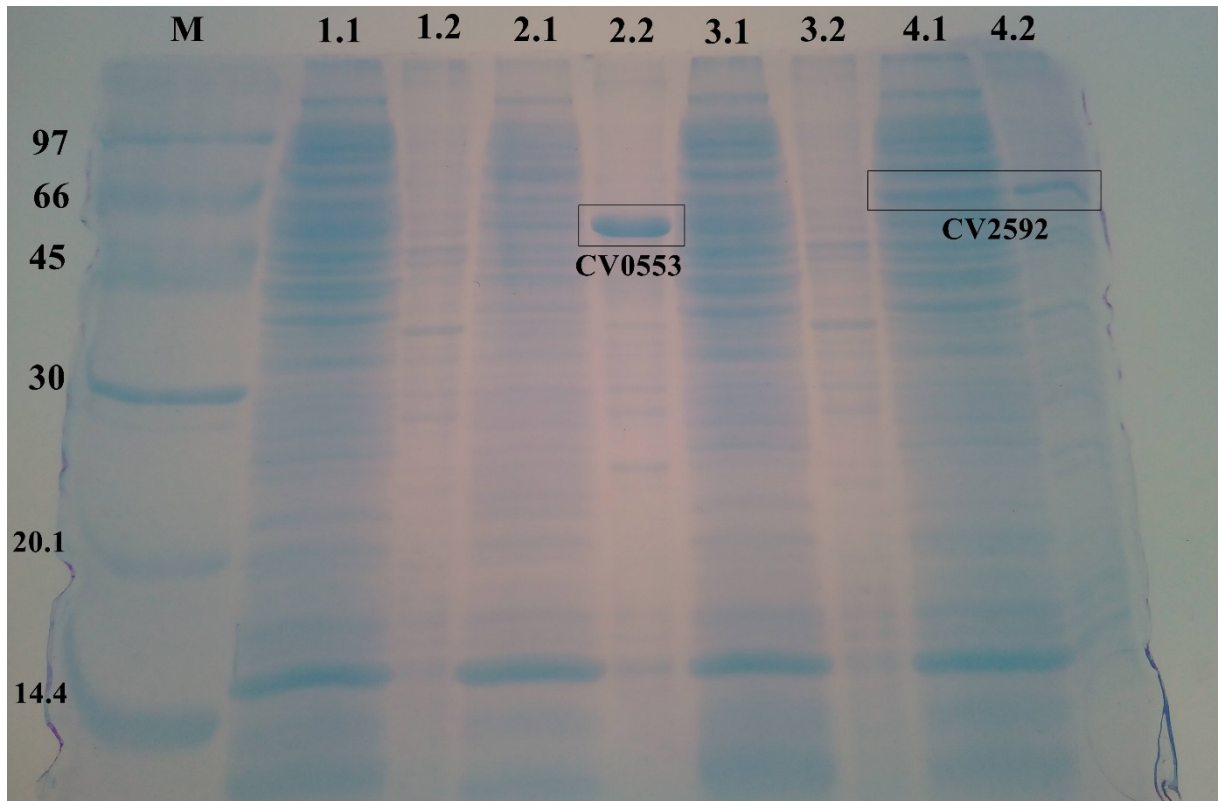
LPMOs geralmente apresentam de uma a duas pontes dissulfeto (AGOSTONI; HANGASKY; MARLETTA, 2017). Uma análise utilizando o servidor DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) prediz duas pontes dissulfeto em CV0553, entre as cisteínas nas posições 36 e 179 e as cisteínas nas posições 49 e 86, e duas em CV2592, entre as cisteínas nas posições 37 e 202 e entre as cisteínas 87 e 362. É provável que a expressão intracelular, além da adição da proteína Sumo e calda de histidina, tenham impedido a formação dessas pontes ou interferido no correto dobramento das proteínas de outras maneiras não com-

Figura 14 – Gel de poliacrilamida da expressão em BL21(DE3) das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.



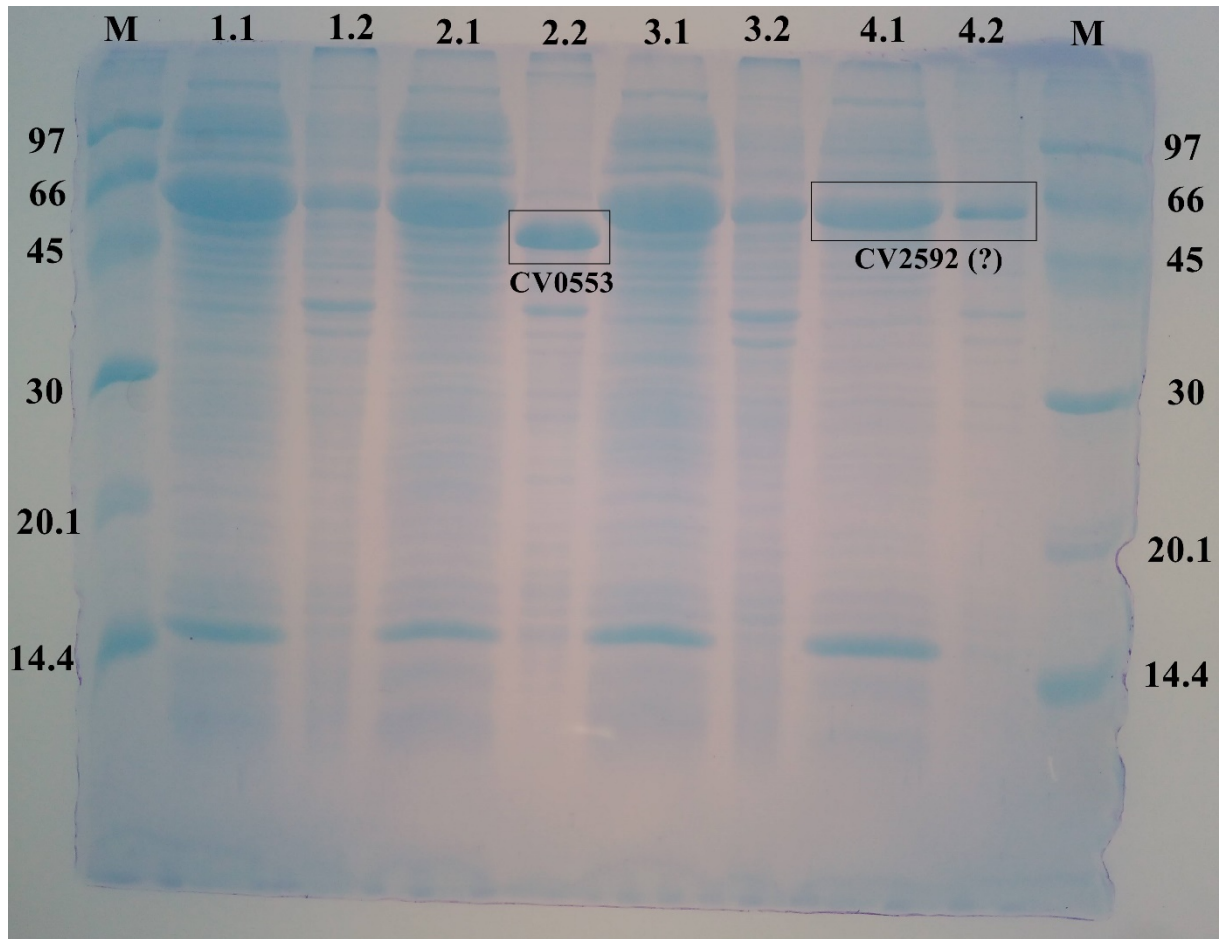
Fonte: Própria autora. M: marcador; 1.1: ETS do controle de CV0553; 1.2: ETI do controle de CV0553; 2.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV0553; 2.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV0553; 3.1: ETS do controle de CV2592; 3.2: ETI do controle de CV2592; 4.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV2592; 4.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV2592. 25 μ L das amostras de ETS e 5 μ L das amostras de ETI foram aplicados. No marcador, a banda de 97 kDa é referente à fosforilase b; 66 kDa à albumina; 45 kDa referente à ovalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20.1 ao inibidor de tripsina, e 14.4 kDa à α -lactoalbumina.

Figura 15 – Gel de poliacrilamida da expressão em SHuffle® T7 Express Competent das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.



Fonte: Própria autora. M: marcador; 1.1: ETS do controle de CV0553; 1.2: ETI do controle de CV0553; 2.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV0553; 2.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV0553; 3.1: ETS do controle de CV2592; 3.2: ETI do controle de CV2592; 4.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV2592; 4.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV2592. 25 μ L das amostras de ETS e 5 μ L das amostras de ETI foram aplicados. No marcador, a banda de 97 kDa é referente à fosforilase b; 66 kDa à albumina; 45 kDa referente à ovalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20.1 ao inibidor de tripsina, e 14.4 kDa à α -lactoalbumina.

Figura 16 – Gel de poliacrilamida da expressão em ArcticExpress (DE3) das proteínas codificadas pelas ORFs CV0553 e CV2592.



Fonte: Própria autora. M: marcador; 1.1: ETS do controle de CV0553; 1.2: ETI do controle de CV0553; 2.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV0553; 2.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV0553; 3.1: ETS do controle de CV2592; 3.2: ETI do controle de CV2592; 4.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV2592; 4.2: ETI da cultura induzida com IPTG de CV2592. 25 μ L das amostras de ETS e 5 μ L das amostras de ETI foram aplicados. No marcador, a banda de 97 kDa é referente à fosforilase b; 66 kDa à albumina; 45 kDa referente à ovalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20.1 ao inibidor de tripsina, e 14.4 kDa à α -lactoalbumina. A banda correspondente a CV2592 não pôde ser observada, pos seu tamanho coincidem com uma chaperonina naturalmente produzida pela bactéria.

preendidas.

Rodrigues *et. al.* (2017) expressaram eficientemente uma LPMO ativa de *Thermobifida fusca* na fração extracelular de *E. coli* e *Pichia pastoris*. Apesar da proteína ser proveniente de um hospedeiro procariótico, a levedura a produziu em sua forma ativa em uma quantidade maior que a bactéria. Muitos estudos mostram também a produção de LPMOs ativas na fração periplasmática de *E. coli* (COURTADE *et al.*, 2017; FORSBERG *et al.*, 2014; HAMRE *et al.*, 2015; LOOSE *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2012). A produção de proteínas heterólogas no periplasma facilita seu dobramento na estrutura terciária e simplifica a purificação, entretanto o processo de exportação nem sempre é fácil e pode causar instabilidade no hospedeiro (HANNIG; MAKRIDES, 1998; KLESS *et al.*, 1989). Manjeet *et. al.* (2013) produziram LPMOs de *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* e *B. licheniformis* DSM13 em vetores contendo as sequências sem a porção codificadora do peptídeo sinal. As proteínas foram expressas com sucesso em *E. coli* BL21(DE3) utilizando meio para autoindução.

rCv2592-Sumo, parcialmente solúvel, foi produzida em *E. coli* BL21(DE3) em 200 mL de LB Broth. A imagem do gel mostra a proteína nas frações ETS e ETI dessa nova indução (Figura 17). A fração ETS foi dialisada exaustivamente contra água destilada, ficando em um volume final de 40 mL.

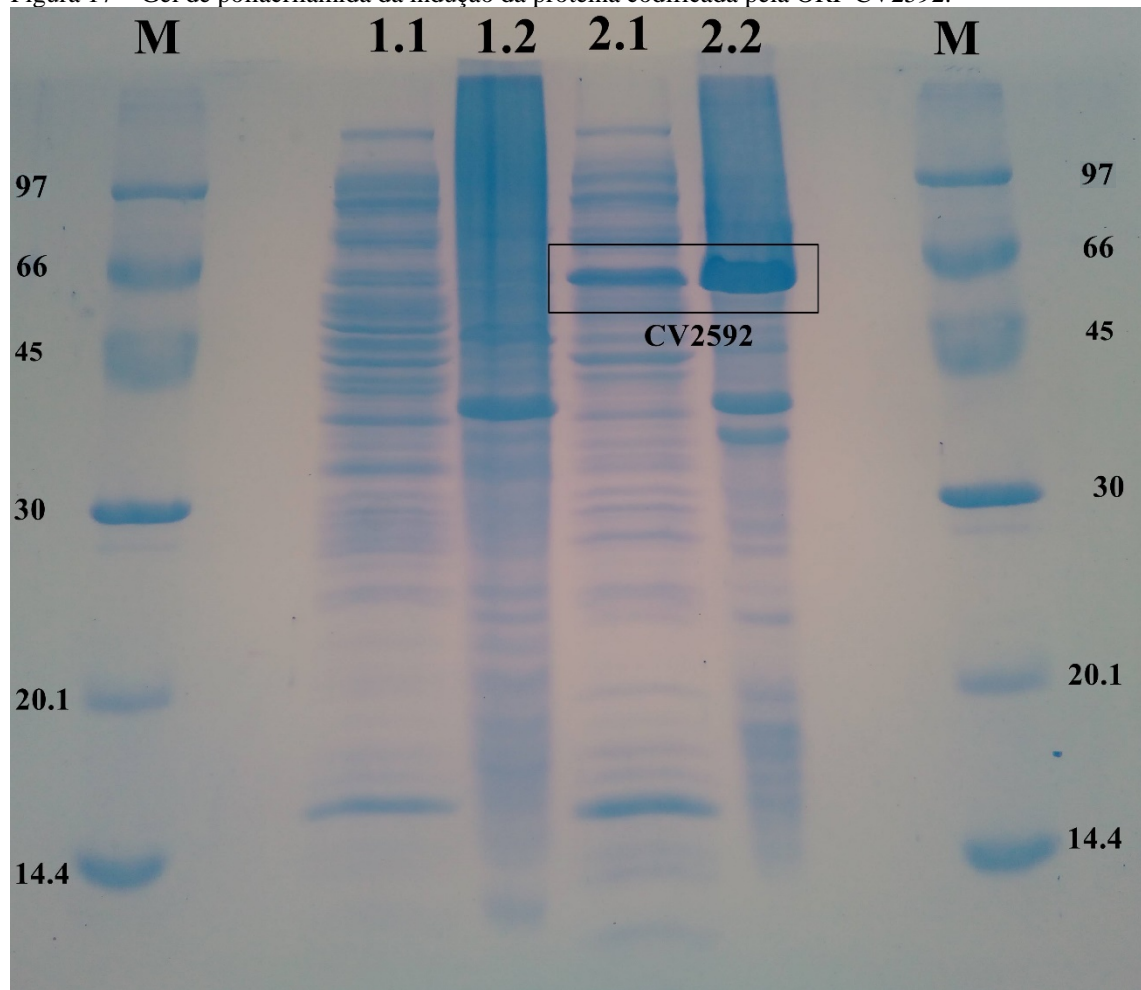
Ensaio da atividade quitinolástica do ETS foram realizados com incubação de 1 h, 24 h e 72 h. O extrato apresentou atividade proporcional ao tempo de incubação, mostrando que rCv2592-Sumo está ativa. Em comparação com a atividade apresentada por CV2935 nas mesmas condições, ETS apresentou atividade mais baixa, com tendência de crescimento linear ao longo do tempo. CV2935 foi mais ativa em quitina coloidal, com tendência de crescimento exponencial de sua atividade ao longo do tempo (Figura 18).

7.5 Purificação de rCv2592-Sumo

Duas estratégias foram utilizadas para a purificação da proteína recombinante. A primeira foi a cromatografia em matriz de afinidade em níquel, seguida por cromatografia em matriz de quitina, e a segunda utilizou apenas a cromatografia em matriz de quitina. Foram utilizados 30 mL do ETS na primeira estratégia e 9 mL na segunda.

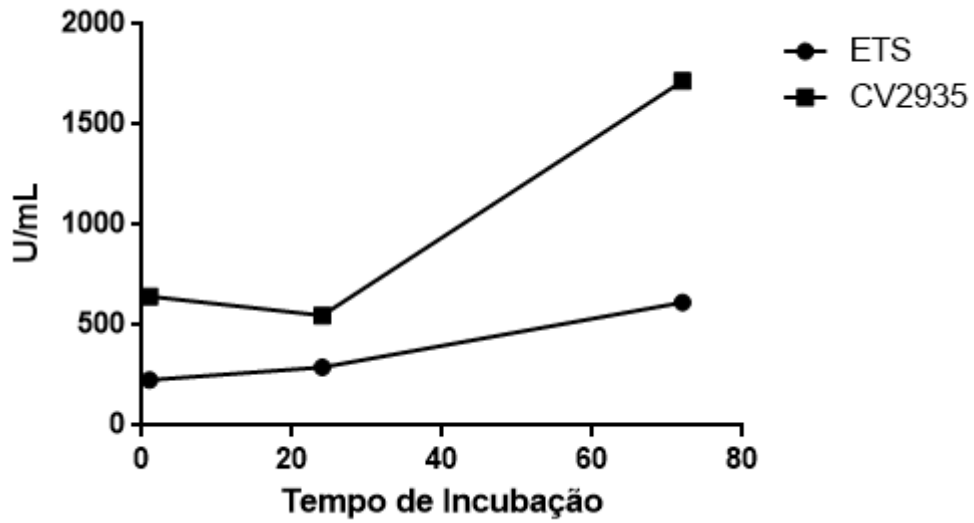
A matriz de *Sepharose* com níquel imobilizado foi utilizada como estratégia inicial, já que a proteína recombinante foi produzida com uma calda de histidina N-terminal. O material retido foi eluído com concentrações crescentes de imidazol (25 a 500 mM). rCv2592 foi encontrada no PII, eluído com tampão contendo imidazol 25 mM, e PIV, eluído com tampão

Figura 17 – Gel de poliacrilamida da indução da proteína codificada pela ORF CV2592.



Fonte: Própria autora. M: marcador; 1.1: ETS do controle de CV2592; 1.2: ETI do controle de CV2592; 2.1: ETS da cultura induzida com IPTG de CV2592; 2.2: ETS da cultura induzida com IPTG de CV2592. 25 μ L das amostras de ETS e 5 μ L das amostras de ETI foram aplicados. No marcador, a banda de 97 kDa é referente à fosforilase b; 66 kDa à albumina; 45 kDa referente à ovalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20.1 ao inibidor de tripsina, e 14.4 kDa à α -lactoalbumina.

Figura 18 – Atividade quitinoclástica de ETS contra quitina coloidal.



Fonte: Própria autora. O gráfico foi construído utilizando o software *GraphPad Prism 6*. O tempo de incubação é dado em horas. No gráfico, a atividade quitinoclástica do extrato total solúvel (ETS) é comparada com a atividade da quitinase CV2935, nos tempos de 1 h, 24 h e 72 h. As atividades foram realizadas contra quitina coloidal.

com imidazol 100 mM. Nos dois picos foram encontrados contaminantes, principalmente em PII, onde havia uma fração maior da proteína. Assim, amostras nesses dois picos com leituras $A_{280} > 0,025$ foram reunidas, dialisadas contra tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo NaCl 1M, e submetidas a cromatografia em matriz de quitina equilibrada com o mesmo tampão. O material aderido à coluna foi eluído com ácido acético 0,1 M. Após a adição de ácido acético o pico máximo observado teve leitura a 280 nm de 0,024. Assim, caso a proteína estivesse presente nesse pico, sua concentração seria muito baixa.

Tendo em vista a baixa produtividade na metodologia utilizada anteriormente, foi realizada uma cromatografia em matriz de quitina com 9 mL do ETS. A amostra foi dialisada contra tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo NaCl 1 M, atingindo o volume final de 8,5 mL. Então, foi aplicada na matriz equilibrada com o mesmo tampão. O material retido foi eluído com ácido acético 0,1 M. Foi observado um pico, denominado PII.1 (Figura 19), e as alíquotas com leituras $A_{280} > 0,050$ foram reunidas e dialisadas exaustivamente contra água destilada, atingindo um volume final de 26 mL. Então, a amostra foi concentrada em concentradores tipo Vivaspin® de 2 mL da Sartorius até o volume de 1 mL e analisada por SDS-PAGE, mostrando uma única banda na altura esperada para rCv2592-Sumo. Assim, a proteína foi purificada com sucesso.

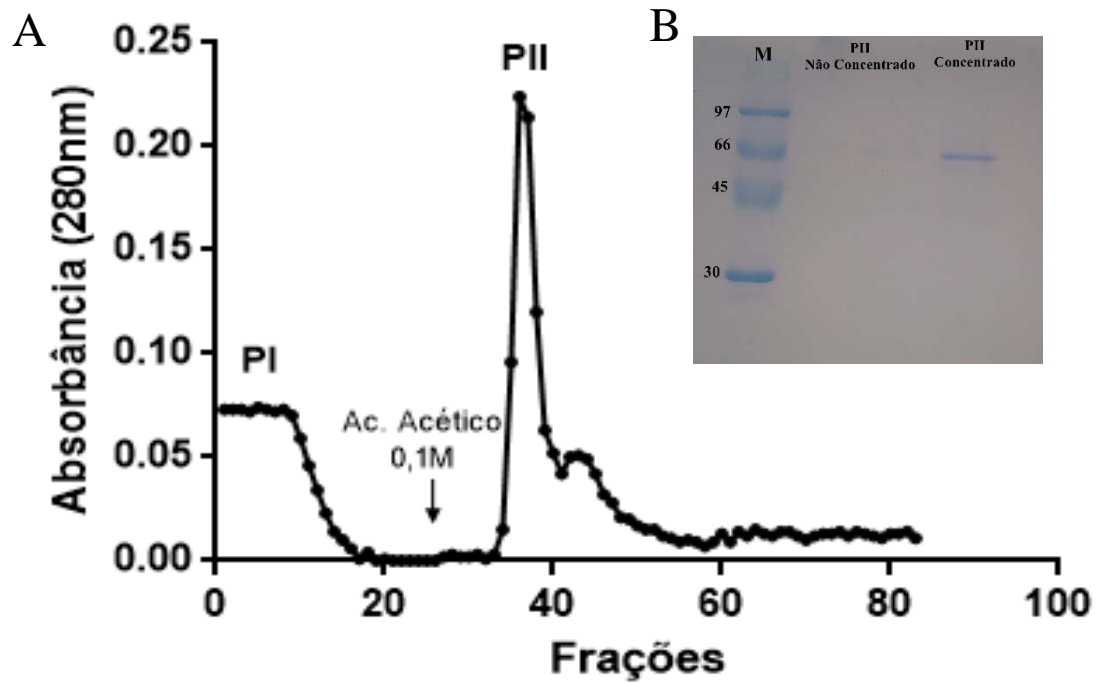
A quantificação de proteínas totais solúveis mostrou uma redução de aproximadamente dez vezes na concentração de proteínas totais entre ETS (0,73 mgP/mL) e PII.1 (0,07 mgP/mL). Quanto às proteínas totais, a redução foi de 90 vezes. A baixa concentração de PII.1, mesmo concentrado, se deve ao pouco volume de amostra aplicado.

7.6 Atividade quitinoclástica de rCv2592-Sumo contra quitina insolúvel

Não foi possível quantificar a atividade de rCv2592-Sumo contra quitina insolúvel, pois as leituras obtidas ultrapassaram as obtidas na curva dos reagentes. Acima da curva, as leituras deixam de se comportar de forma linear, impedindo que se faça a relação entre a Abs_{585} e a concentração de GlcNAc formada na reação. Entretanto, uma análise qualitativa da coloração obtida nas reações com rCv2592-Sumo e sem ela mostram que a enzima foi capaz de degradar quitina insolúvel (Figura 20). O resultado confirma que a proteína recombinante está ativa, validando parcialmente a via catabólica da quitina em *C. violaceum* ATCC 12472.

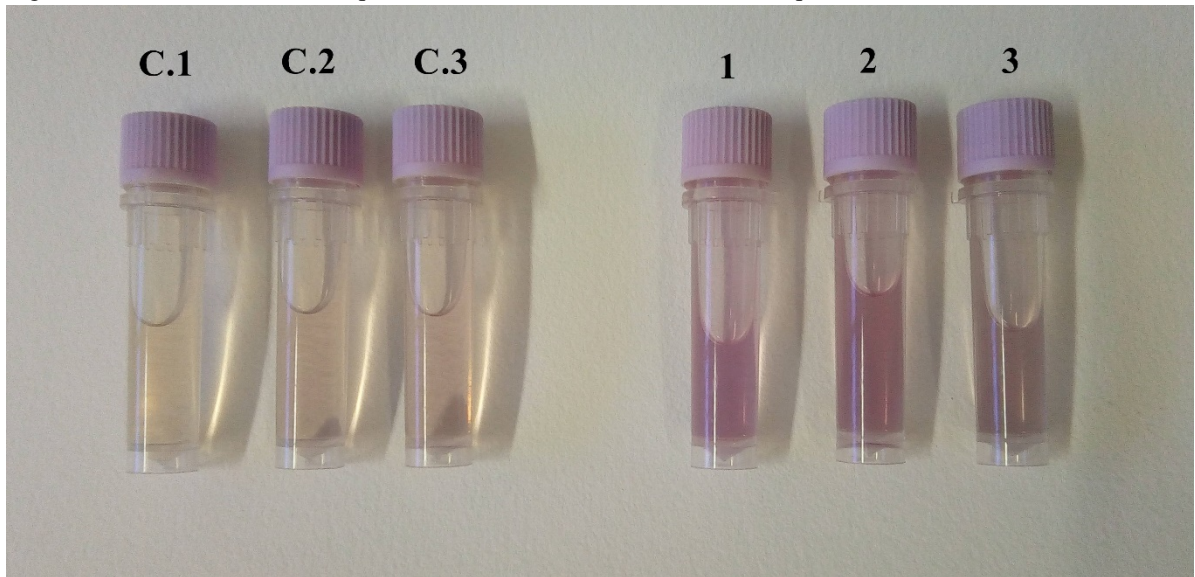
A quitinase rAoChi4849 foi inserida nas reações com o objetivo de reduzir o tamanho dos oligômeros produzidos pela LPMO, baseando-se no ensaio realizado por Vaaje-Kolstad *et. al.* (2010). O ensaio colorimétrico aqui utilizado quantifica monômeros GlcNAc

Figura 19 – Purificação da LPMO rCv2592.



Fonte: Própria autora. (A) Perfil cromatográfica da purificação de rCv2592-Sumo em matriz de quitina. (B) SDS-PAGE do pico retido (PII) não concentrado e após a concentração com concentradores tipo Vivaspin® de 2 mL da Sartorius. PI (pico não retido) foi eluído com acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e PII (pico retido) com ácido acético 0,1 M.

Figura 20 – Ensaio de atividade quitinoclástica de rCv2592-Sumo contra quitina insolúvel.



Fonte: Própria autora. Na imagem, C.1, controle em água destilada; C.2, controle em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0; C.3, controle em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2; 1, reação de rCv2592-Sumo em água destilada; 2, reação de rCv2592-Sumo em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 3, reação de rCv2592-Sumo controle em tampão acetato de sódio pH 5,2. A coloração rosa indica a presença de monômeros de GlcNAc, ou seja, que a quitina foi degradada. Em todas as reações a quitinase de cajueiro rAoChi4849 foi adicionada. A quitinase atuaria provavelmente reduzindo o tamanho dos oligômeros insolúveis formados pela monooxigenase lítica de polissacarídeo rCv2592.

formados na reação. Assim, a atividade da LPMO por si só resultaria em produtos ainda insolúveis e o resultado obtido seria negativo. Com a adição da quitinase após a inativação de rCv2592-Sumo, AoChi4849 atuaria nos oligômeros formados sem a participação direta da monooxigenase. A reação sem a LPMO apresentou baixa atividade, resultados da degradação da quitina cristalina pela quitinase de cajueiro ou de β -glucoronidase em resíduos que restaram no sobrenadante após a etapa de centrifugação no sobrenadante. Entretanto é visível que as reações com rCv2592-Sumo apresentaram coloração rosa mais intensa nos três pHs analisados. A diferença entre as reações com e sem rCv2592-Sumo em água apresentaram uma diferença maior de tonalidade. Isso pode indicar que a proteína atua melhor pHs neutros, entretanto análises quantitativas são necessárias.

A quitina utilizada nas reações é originada da carapaça de caranguejo, composta prioritariamente por α -quitina. CBP21, de *S. marcescens*, apresentou atividade apenas em β -quitina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010), assim como a maioria das integrantes da família AA10 (FORSBERG et al., 2014; LOOSE et al., 2014). Entretanto, rCv2592-Sumo parece ser ativa em α -quitina. Polímeros de quitina apresentam uma série de funções em diversas áreas, desde a medicina até a biorremediação, e sua produção geralmente envolve o uso de produtos químicos. Industrialmente, a α -quitina é a isoforma mais utilizada, sendo obtida das carapaças de crustáceos, como o camarão e caranguejo. Isso seria um indicativo de que rCv2592-Sumo tem potencial para uso industrial na degradação enzimática da quitina.

7.7 Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo

Não foi observada atividade antifúngica de rCv2592-Sumo em *Lasiodiplodia theobromae*, tanto isolada quanto em conjunto com as duas quitinases recombinantes de *C. violaceum* ATCC 12472. Em 48 h, observa-se apenas um pequeno retardo no crescimento do fungo próximo ao poço contendo rCv2592-Sumo e CV3316, quando comparado com o controle negativo (Figuras 21 e 22).

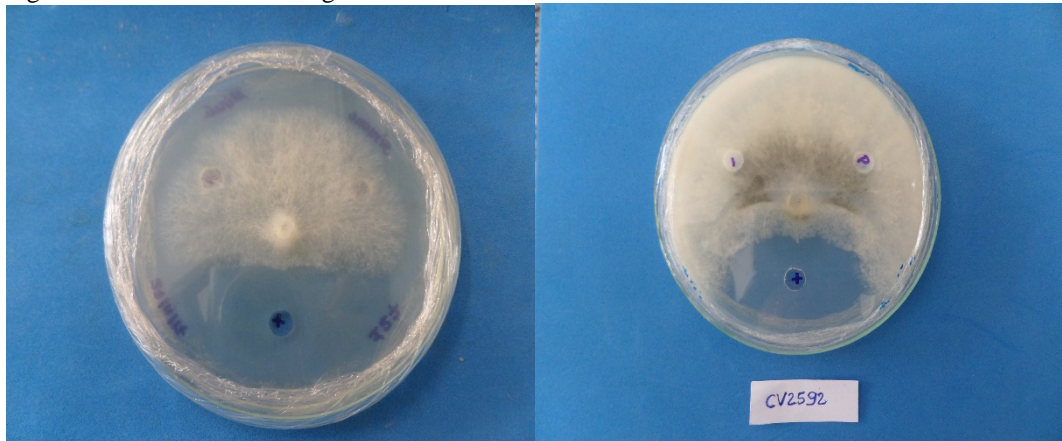
A falta de atividade de rCv2592-Sumo pode ter ocorrido pela baixa concentração da proteína. A solução contendo a proteína recombinante estava na concentração de 0,07 mgP/mL, assim apenas 0,004 mgP foram aplicados. Outra possibilidade é a do esqueleto de quitina que forma a parede celular do fungos ser mais internalizada na matriz de glucanos, deixando as microfibrilas de quitina inacessíveis (YAN et al., 2008).

Apesar da potencial atividade antifúngica das LPMOs, apenas Cbp50, de *Bacillus thuringiensis* (MEHMOOD et al., 2011) foi encontrada com essa atividade. Manjeet *et. al.*

(2013) realizaram diversos ensaios de sinergia entre quitinases e LPMOs, na época ainda denominadas CBPs. Apesar das LPMOs agirem sinergicamente com as quitinases nos ensaios contra quitina insolúvel, o mesmo efeito não foi observado nas atividades antifúngicas. Os autores sugerem que a arquitetura das paredes dos fungos poderia dificultar a ação das enzimas.

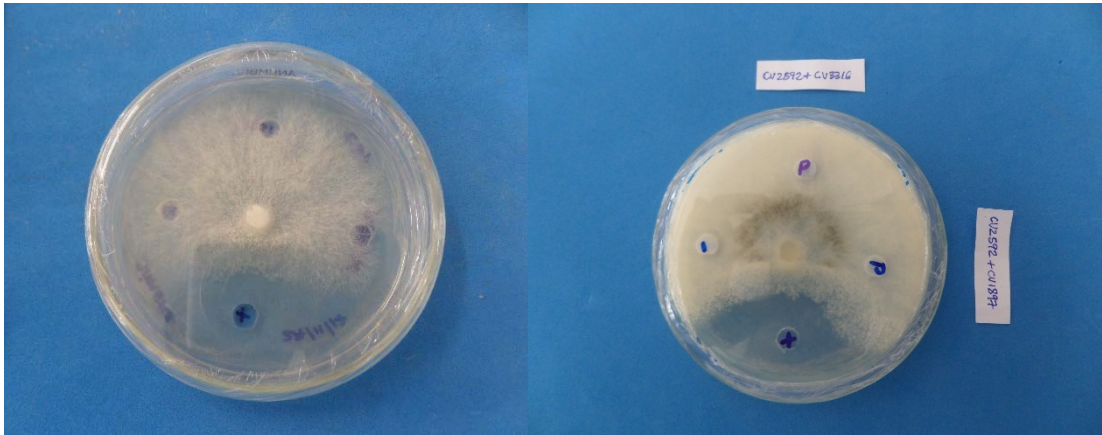
Assim, análises posteriores com concentrações maiores de rCv2592-Sumo são necessárias para confirmar se possui ou não atividade antifúngica. Outras cepas de fungos, contendo a quitina de sua parede mais exposta, poderiam ser utilizadas com o objetivo de validar ou não o papel da arquitetura da parede na inibição da atividade destas enzimas.

Figura 21 – Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo.



Fonte: Simone Torres. A foto da esquerda representa o ensaio após 48 h e a da direita representa 72 h. Na imagem, o poço inferior contém o controle positivo Carbendazim® estéril. O poço superior esquerdo contém água destilada estéril como controle negativa. A amostra de 0,004 mgP de rCv2592-Sumo está no poço superior direito, nas duas imagens.

Figura 22 – Atividade antifúngica de rCv2592-Sumo com CV1897 e CV3316



Fonte: Simone Torres. A foto da esquerda representa o ensaio após 48 h e a da direita representa 72 h. Na imagem, o poço inferior contém o controle positivo Carbendazim® estéril. O poço esquerdo contém água destilada estéril como controle negativo. A amostra de 0,004 mgP de rCv2592-Sumo com CV1897 no poço superior e rCv2592-Sumo com CV3316 no poço direito, na imagem à esquerda, e rCv2592-Sumo com CV1897 no poço direito e rCv2592-Sumo com CV3316 no poço superior, na imagem à direita.

8 CONCLUSÃO

A via quitinoclástica de *C. violaceum* ATCC 12472 compreende 26 proteínas, incluindo um regulador, quatro monooxigenases líticas de polissacarídeo, três quitinases, uma β -hexosaminidase extracelular, uma quitoporina, duas quitodextrinases periplasmáticas, três proteínas do sistema de fosfotransferase, quatro proteínas do sistema ABC, duas β -hexosaminidases citoplasmáticas, uma cinase, uma deacetilase e uma deaminase. De maneira geral, a via é bem conservada no gênero *Chromobacterium*. Foram encontrados eventos de duplicação nas LPMOs e em um dos componentes do sistema de fosfotransferase. Análises do gene NagQ no grupo mostraram que *C. haemolyticum* apresenta sua forma mais plesiomórfica e *C. violaceum* a mais apomórfica.

Foram identificadas cinco LPMOs em *C. violaceum* ATCC 12472, sendo uma provavelmente inativa, uma deficiente no sítio de ligação à quitina e três parálogas entre si. Destas, duas foram expressas em três estirpes de *Escherichia coli*, mas apenas rCv2592-Sumo foi encontrada na forma solúvel. rCv2592-Sumo apresentou atividade em quitina insolúvel, mas não foi observada atividade antifúngica da enzima atuando com quitinases de *C. violaceum* ATCC 12472 ou isolada.

A via catabólica da quitina em *C. violaceum* ATCC 12472 foi parcialmente confirmada com a demonstração de que uma de suas LPMOs é ativa contra quitina insolúvel. A presença de proteínas similares a ela nos demais integrantes do gênero é um indício de que a via inicie de forma similar em todos.

rCv2592 pode ter potencial uso industrial na produção de derivados de quitina, principalmente considerando sua atividade contra α -quitinas. Entretanto, são necessários mais estudos sobre sua atividade enzimática, incluindo a própria otimização das condições de ensaio. Considerando a baixa concentração da solução utilizado no ensaio de atividade antifúngica, análises posteriores também se mostram necessárias para confirmar se a enzima apresenta ou não atividade contra fungos.

REFERÊNCIAS

- AACHMANN, F. L. et al. NMR structure of a lytic polysaccharide monoxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18779–18784, 13 nov. 2012.
- AAM, B. B. et al. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine drugs**, v. 8, n. 5, p. 1482–1517, 2010.
- ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and molecular signatures for the order Neisseriales: proposal for division of the order Neisseriales into the emended family Neisseriaceae and Chromobacteriaceae fam. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 1, p. 1–24, 1 jul. 2013.
- AGOSTONI, M.; HANGASKY, J. A.; MARLETTA, M. A. Physiological and Molecular Understanding of Bacterial Polysaccharide Monoxygenases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 3, p. e00015–17, 2017.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 997–1026, 2005.
- ALTENHOFF, A. M. et al. Resolving the Ortholog Conjecture: Orthologs Tend to Be Weakly, but Significantly, More Similar in Function than Paralogs. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 5, 17 maio 2012.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- AVENAS, P. Etymology of Main Polysaccharide Names. In: NAVARD, P. (Ed.). **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)**. Vienna: Springer Vienna, 2012. p. 13–21.
- BAJAJ, A. et al. Isolation and characterization of a novel Gram-negative bacterium *Chromobacterium alkanivorans* sp. nov., strain IITR-71T degrading halogenated alkanes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5228–5235, 2016.
- BARBOSA. Validação experimental da quitinase codificada pela ORF CV4240 de *Chromobacterium violaceum*. 2013.
- BATISTA, J. H.; NETO, DA S.; F, J. *Chromobacterium violaceum* Pathogenicity: Updates and Insights from Genome Sequencing of Novel *Chromobacterium* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- BECKER, J.; WITTMANN, C. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules—a veteran at new shores. **Current Opinion in Biotechnology**, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology. v. 42, n. Supplement C, p. 178–188, 1 dez. 2016.
- BEESON, W. T. et al. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monoxygenases. **Annual**

Review of Biochemistry, v. 84, n. 1, p. 923–946, 2 jun. 2015.

BEIER, S.; BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 14 jun. 2013.

BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 58, 2005.

BERGONZINI, C. Um nuovo bacterio colorato. **Ann Soc Nat Modena Ser**, v. 2, p. 149–158, 1881.

BLACKBURN, M. B. et al. *Chromobacterium sphagni* sp. nov., an insecticidal bacterium isolated from Sphagnum bogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3417–3422, 2017.

BLUMENTHAL, H. J.; ROSEMAN, S. Quantitative estimation of chitin in fungi. **Journal of bacteriology**, v. 74, n. 2, p. 222, 1957.

BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Compt. rend**, v. 94, p. 562, 1882.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1, 3-glucanases. **Molecular plant pathology: a practical approach**, v. 2, p. 23–30, 1992.

BOOK, A. J. et al. Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monoxygenases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 109, 6 ago. 2014.

BRACONNOT, H. Sur la nature des champignons. **Ann Chim Phys**, v. 79, p. 265–304, 1811.

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, 1976.

BROWN, K. L.; STEIN, A.; MORRELL, D. S. Ecthyma gangrenosum and septic shock syndrome secondary to *Chromobacterium violaceum*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, Supplement, p. S224–S228, 1 maio 2006.

CALDAS, L. Um pigmento nas águas negras. **Cienc. Hoje**, v. 11, p. 55–57, 1990.

CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. 421, 15 dez. 2009.

CAMPBELL, L.; WILLIAMS, O. A study of chitin-decomposing micro-organisms of marine origin. **Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 894–905, 1951.

CAMPOS, M. L. DE A. et al. Aspectos metodológicos no reuso de ontologias: um estudo a partir das anotações genômicas no domínio dos tripanosomatídeos. 2009.

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.

CHATTOPADHYAY, A. et al. *Chromobacterium violaceum* infection: A rare but frequently

fatal disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, n. 1, p. 108–110, jan. 2002.

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. 4435–4441, 1998.

CHERRY, J. M. et al. *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D700–D705, 2011.

CHI, W.-J. DasR, a GntR-family global regulator, regulates N-acetylglucosamine metabolism in *Streptomyces griseus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25 out. 2017.

CLARK, G. L.; SMITH, A. F. X-ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 863–879, 1936.

COMB, D. G.; ROSEMAN, S. Glucosamine metabolism IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 807–828, 1958.

COMB, D.; ROSEMAN, S. Glucosamine-6-phosphate deaminase. 1956.

COURTADE, G. et al. A novel expression system for lytic polysaccharide monooxygenases. **Carbohydrate Research**, 2017.

CROUCH, L. I. et al. The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monooxygenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7439–7449, 2016.

DA SILVA, K. P. Copper sorption from diesel oil on chitin and chitosan polymers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 237, n. 1, p. 15–21, 2004.

DE LA CRUZ, J. et al. Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, v. 159, n. 4, p. 316–322, 1993.

DE LEY, J. **Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects**. . In: PROCEEDINGS OF THE 4TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA. 1978

DE SOUSA, F. D. et al. Frutapin, a lectin from *Artocarpus incisa* (breadfruit): cloning, expression and molecular insights. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 4, p. BSR20170969, 31 ago. 2017.

DE 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 of the United States of America**, p. 11660–11665, 2003.

DELPIN, M. W.; GOODMAN, A. E. Nitrogen regulates chitinase gene expression in a marine bacterium. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1064–1069, 2009a.

DELPIN, M. W.; GOODMAN, A. E. Nutrient regime regulates complex transcriptional start site usage within a *Pseudoalteromonas* chitinase gene cluster. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1053–1063, 2009b.

DEUTSCHER, J. et al. The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 231–256, 6 jan. 2014.

DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; BRIGHT, P. L. Chromobacterium, Eikenella, Kingella, Neisseria, Simonsiella, and Vitreoscilla species comprise a major branch of the beta group Proteobacteria by 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparison: transfer of Eikenella and Simonsiella to the family Neisseriaceae (emend.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 258–266, 1989.

DURÁN, N. Violaceína: a descoberta de um antibiótico. **Cienc. Hoje**, v. 11, p. 58–60, 1990.

DURÁN, N. et al. Biosynthesis of a trypanocide by Chromobacterium violaceum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 686–690, 1994.

DURÁN, N.; ERAZO, S.; CAMPOS, V. Bacterial Chemistry-Ii-Anti-Microbial Photoproduct from Pigment of Chromobacterium-Violaceum. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1983.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. Chromobacterium violaceum: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical reviews in microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.

EILENBERG, H. et al. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant Nepenthes khasiana. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2775–2784, 2006.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in Rhizopus stolonifer. **Mycological research**, v. 96, n. 9, p. 769–779, 1992.

EL-SAYED, G. et al. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, Nomuraea rileyi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 54, n. 3, p. 394–403, 1989.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F. et al. Drug resistance in Chromobacterium violaceum. **Genetics and molecular research: GMR**, 2004.

FISCHER, S. et al. Using OrthoMCL to Assign Proteins to OrthoMCL-DB Groups or to Cluster Proteomes Into New Ortholog Groups. In: GOODSELL, D. S. (Ed.). **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

FORSBERG, Z. et al. Comparative Study of Two Chitin-Active and Two Cellulose-Active AA10-Type Lytic Polysaccharide Monooxygenases. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1647–1656, 18 mar. 2014.

FRANCO, L. DE O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from Cunninghamella elegans (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243–247, 2004.

GAO, J. et al. Growth of hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus on chitin involves two family 18 chitinases. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3119–

3128, 2003.

GASTEIGER, E. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. [s.l.] Springer, 2005.

GEISSELER, D. et al. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058–2067, dez. 2010.

GILLIS, M.; LOGAN, N. A. *Chromobacterium*. In: WHITMAN, W. B. et al. (Eds.). . **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–9.

GOODAY, G. W. The ecology of chitin degradation. In: **Advances in microbial ecology**. [s.l.] Springer, 1990. p. 387–430.

GUARIM, S. Ocorrência e distribuição de *Chromobacterium violaceum* (Schroeter) Bergonzini 1881, na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 3, p. 501–506, 1979.

GUDMUNDSSON, M. et al. Structural and electronic snapshots during the transition from a Cu (II) to Cu (I) metal center of a lytic polysaccharide monooxygenase by X-ray photoreduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 18782–18792, 2014.

GUTIÉRREZ-ROMÁN, M. I. et al. Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 33–42, 1 jan. 2014.

HAKIM, L. et al. Synthesis of novel chitosan resin derivatized with serine diacetic acid moiety and its application to on-line collection/concentration of trace elements and their determination using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 588, n. 1, p. 73–81, 2007.

HAKIM, L. et al. Synthesis of cross-linked chitosan functionalized with threonine moiety and its application to on-line collection/concentration and determination of Mo, V and Cu. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 977–985, 2008a.

HAKIM, L. et al. Synthesis of chitosan-based resins modified with tris (2-aminoethyl) amine moiety and its application to collection/concentration and determination of trace mercury by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 1256–1260, 2008b.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. . In: NUCLEIC ACIDS SYMPOSIUM SERIES. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 551–560, 1999.

HAMRE, A. G. et al. Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase. **Carbohydrate Research**, v. 407, p. 166–169, abr. 2015.

- HAN, X. Y.; HAN, F. S.; SEGAL, J. *Chromobacterium haemolyticum* sp. nov., a strongly haemolytic species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1398–1403, 2008a.
- HAN, X. Y.; HAN, F. S.; SEGAL, J. *Chromobacterium haemolyticum* sp. nov., a strongly haemolytic species. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 58, n. 6, p. 1398–1403, 1 jun. 2008b.
- HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998.
- HARMAN, G. et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 313–318, 1993.
- HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 2010.
- HATANO, N.; HAMADA, T. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. **The Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 2, p. 809–816, 2008.
- HEJAZI, A.; FALKINER, F. *Serratia marcescens*. **Journal of medical microbiology**, v. 46, n. 11, p. 903–912, 1997.
- HEMSWORTH, G. R. et al. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide mono-oxygenases. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 122–126, fev. 2014.
- HERRING, P. J. Marine Ecology and natural products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1901–1911, 1979.
- HIGGINS, C. F.; LINTON, K. J. ABC transporters: An introduction and overview. **ABC Transporters, From Bacteria to Man**, v. 1, 2003.
- HODGE, A.; ALEXANDER, I. J.; GOODAY, G. W. Chitinolytic enzymes of pathogenic and ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 99, n. 8, p. 935–941, 1995.
- HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2 jul. 2012.
- HOSOBA, M. et al. Synthesis of novel chitosan resin possessing histidine moiety and its application to the determination of trace silver by ICP-AES coupled with triplet automated-pretreatment system. **Analytica chimica acta**, v. 639, n. 1, p. 51–56, 2009.
- HU, X. et al. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 451–458, nov. 2007.
- HUBER, R. et al. *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal vent environment. **Archives of microbiology**, v. 164, n. 4, p. 255–264, 1995.
- HUNGRIA, M. et al. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water

environments in the Brazilian Amazon. **Letters in applied microbiology**, v. 41, n. 1, p. 17–23, 2005.

HUNT, D. E. et al. Conservation of the Chitin Utilization Pathway in the Vibrionaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 44–51, 1 jan. 2008.

Hydrolysis. Encyclopædia Britannica, inc., , 16 nov. 2016. (Nota técnica).

IWOBI, A. et al. Novel Virulence-Associated Type II Secretion System Unique to High-Pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1872–1879, abr. 2003.

JE, J.-Y.; KIM, S.-K. Antioxidant activity of novel chitin derivative. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 7, p. 1884–1887, 2006.

JEUNIAUX, C. A brief survey of the early contribution of European scientists to chitin knowledge. **Advances in Chitin Sciences**, p. 1–9, 1996.

JEUNIAUX, C.; CORNELIUS, C. Distribution and activity of chitinolytic enzymes in the digestive tract of birds and mammals. 1997.

JIANLONG, W. et al. Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 273–277, 2001.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W429–W432, 2007.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; SCHOLZ, H. C. *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2486–2490, 2009.

KELLNER, H.; VANDENBOL, M. Fungi unearthed: transcripts encoding lignocellulolytic and chitinolytic enzymes in forest soil. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10971, 2010.

KENSCHE, P. R. et al. Practical and theoretical advances in predicting the function of a protein by its phylogenetic distribution. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 19, p. 151–170, 6 fev. 2008.

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.

KEYHANI, N. O.; LI, X.-B.; ROSEMAN, S. Chitin Catabolism in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii* IDENTIFICATION AND MOLECULAR CLONING OF A CHITOPORIN. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33068–33076, 2000.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. The Chitin Catabolic Cascade in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii* MOLECULAR CLONING, ISOLATION, AND CHARACTERIZATION OF A PERIPLASMIC CHITODEXTRINASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33414–33424, 1996.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p.

1988–2012, 28 jun. 2010.

KIM, H. J. et al. Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Chromobacterium* sp. strain C-61. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6803–6804, 2011.

KIM, H. J. et al. Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 2, p. 122–132, 2014.

KIRN, T. J.; JUDE, B. A.; TAYLOR, R. K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 863–866, 8 dez. 2005.

KLESS, H. et al. Cloning of the gene coding for chitobiase of *Serratia marcescens*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 217, n. 2, p. 471–473, 1989.

KOONIN, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 309–338, 2005.

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, 1 ago. 2017.

KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

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.

LEON, L. et al. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 449–450, 2001.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D257–260, jan. 2015.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.

LI, B. et al. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 287–292, 2008.

LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome research**, v. 13, n. 9, p. 2178–2189, 2003.

LI, X.; ROSEMAN, S. The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 627–631, 2004.

LICHSTEIN, H. C.; VAN DE SAND, V. F. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 76, n. 1, p. 47–51, 1945.

- LIMA-BITTENCOURT, C. I. et al. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 58, 2007.
- LIMA-BITTENCOURT, C. I. et al. Comparative biogeography of *Chromobacterium* from the neotropics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 2, p. 355–370, 2011.
- LOBO, M. D. P. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 46, 2013.
- LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490–D495, jan. 2014.
- LOOSE, J. S. M. et al. A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. **FEBS Letters**, v. 588, n. 18, p. 3435–3440, 17 set. 2014.
- MANJEET, K. et al. Bacterial chitin binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. **Microbiological Research**, v. 168, n. 7, p. 461–468, ago. 2013.
- MANUCHAROVA, N. A. The microbial destruction of chitin, pectin, and cellulose in soils. **Eurasian Soil Science**, v. 42, n. 13, p. 1526–1532, dez. 2009.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_1, p. D225–D229, 2010.
- MARTIN, P. A. W. et al. *Chromobacterium subsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 57, n. 5, p. 993–999, 1 maio 2007.
- MARTINS-MIRANDA, A. Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] exposta à salinidade e deficiência hídrica. 2002.
- MAYER, C. et al. Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase and a β -N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **The FEBS journal**, v. 273, n. 13, p. 2929–2941, 2006.
- MCCLEAN, K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 12, p. 3703–3711, 1997.
- MEDEIROS, S. C. DE. Expressão heteróloga de uma glicosil hidrolase da Família 18 (cv2736) de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris* com potencial antibacteriano. 2012.
- MEDEMA, M. H.; FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 9, p. 639–648, set. 2015.
- MEHMOOD, M. A. et al. Molecular characterization of the modular chitin binding protein Cbp50 from *Bacillus thuringiensis* serovar konkukian. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 100, n.

3, p. 445–453, 2011.

MEIBOM, K. L. et al. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2524–2529, 2004.

MEIBOM, K. L. et al. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1824–1827, 2005.

MELO, P. DA S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, n. 8, p. 539–543, 2000.

MENEZES, C. B. A. et al. *Chromobacterium amazonense* sp. nov. isolated from water samples from the Rio Negro, Amazon, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 1057–1063, 2015.

MINAMI, S. et al. Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2–3, p. 151–155, 1998.

MINE, S. et al. Expression, refolding, and purification of active diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*. **Protein expression and purification**, v. 84, n. 2, p. 265–269, 2012.

MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 689–696, 1969.

MOSSESSOVA, E.; LIMA, C. D. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. **Molecular cell**, v. 5, n. 5, p. 865–876, 2000.

MOURA. Caracterização in silico e docking molecular de uma N-acetil-β-D-glicosaminidase de *Chromobacterium violaceum*: estudos preliminares para o design de um bioprocesso. 2016.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995–1012, jan. 2012.

MUZZARELLI, R.; MUZZARELLI, C. Chitin and chitosan hydrogels. **Handbook of hydrocolloids**, p. 849–888, 2009.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NCBI, R. C. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D12, 2017.

NEPOMUCENO, D. R. **Expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* de uma quitinase antifúngica da família 19 das glicosídeo hidrolases de *Chromobacterium violaceum***. Thesis—[s.l: s.n.].

NGO, D.-N. et al. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and

their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 188–198, 2009.

NOVICHKOV, P. S. et al. RegPrecise 3.0--a resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. **BMC genomics**, v. 14, p. 745, 1 nov. 2013.

ODIER, A. **Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes**. [s.l: s.n.].

OKADA, M. et al. Chromobacterium haemolyticum-induced bacteremia in a healthy young man. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 406, 3 set. 2013.

OSHITA, K. et al. Synthesis of chitosan resin possessing a phenylarsonic acid moiety for collection/concentration of uranium and its determination by ICP-AES. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, n. 7, p. 1927–1932, 2008.

PAPPA, A.; GUERINI, D. Immune Regulation by the Posttranslational Modification O-GlcNAc. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 5, n. 1, p. 41–48, 2010.

PARK, J. K.; KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Chitin Catabolism in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii* IDENTIFICATION, MOLECULAR CLONING, AND CHARACTERIZATION OF AN, N'-DIACETYLCHITOBIOSE PHOSPHORYLASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33077–33083, 2000.

PARK, J. K.; WANG, L.-X.; ROSEMAN, S. Isolation of a Glucosamine-specific Kinase, a Unique Enzyme of *Vibrio cholerae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15573–15578, 3 maio 2002.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473–483, 2000.

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

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 3, p. 536–537, 1 fev. 1996.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 3, p. 543–594, 1993.

POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Structure and function of fibronectin modules. **Matrix Biology**, v. 15, n. 5, p. 313–320, 1996.

PRUZZO, C.; VEZZULLI, L.; COLWELL, R. R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1400–1410, 2008.

PURUSHOTHAM, P. et al. Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36714, 9 maio 2012.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, n. 2, p. 959–

966, 1955.

RENTZSCH, R.; ORENCO, C. A. Protein function prediction – the power of multiplicity. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 210–219, abr. 2009.

RETTORI, D.; DURÁN, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 685–688, 1998.

RIGALI, S. et al. Subdivision of the Helix-Turn-Helix GntR Family of Bacterial Regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA Subfamilies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12507–12515, 4 dez. 2002.

RODIONOV, D. A. et al. Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 494, 2010.

RODRIGUES, K. B. et al. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. **Carbohydrate Research**, 2017.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 17 abr. 2014.

RUDALL, K. The chitin/protein complexes of insect cuticles. **Advances in insect physiology**, v. 1, p. 257–313, 1963.

SAITOH, H.; PU, R. T.; DASSO, M. SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 10, p. 374–376, 1997.

SAKAGUCHI, T.; HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A. Adsorption of uranium by chitin phosphate and chitosan phosphate. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 2191–2195, 1981.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANDFORD, R.; MULROY, S.; FOGGENSTEINER, L. The polycystins: a novel class of membrane-associated proteins involved in renal cystic disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 7, p. 567–579, 1999.

SAN-LANG, W. et al. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 321–328, 2002.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. Bioinformática aplicada à Genômica. **Melhoramento Genômico, Minas Gerais: UFV**, 2003.

SCIGELOVA, M.; CROUT, D. H. G. Microbial β -N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1, p. 3–14, 15 jul. 1999.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, dez. 2007.

- SHUTINOSKI, B.; SCHMIDT, M. A.; HEUSIPP, G. Transcriptional regulation of the Yts1 type II secretion system of *Yersinia enterocolitica* and identification of secretion substrates. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 676–691, 1 fev. 2010.
- SNEATH, P. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, v. 262, n. 6780, p. 276–277, 1953.
- SNEATH, P. H. A.; BUCKLAND, F. E. The serology and pathogenicity of the genus *Chromobacterium*. **Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 414–425, 1959.
- SOBY, S. D. et al. *Chromobacterium vaccinii* sp. nov., isolated from native and cultivated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bogs and irrigation ponds. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 63, n. Pt 5, p. 1840–1846, 1 maio 2013.
- SOUZA, A. O. DE et al. Atividade da violaceína in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 59–62, 1999.
- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 1509–1517, 1986.
- STAUDER, M. et al. Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment. **Environmental microbiology reports**, v. 4, n. 4, p. 439–445, 2012.
- STREICHSBIER, F. Utilization of chitin as sole carbon and nitrogen source by *Chromobacterium violaceum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 19, n. 1, p. 129–132, 1983.
- STRUSZCZYK, M. H. 12. Global Requirements for Medical Applications of Chitin and its Derivatives. 2006.
- SUGINTA, W. et al. Chitoporin from *Vibrio harveyi*, a channel with exceptional sugar specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 16, p. 11038–11046, 2013.
- SUZUKI, K. et al. Chitin Binding Protein (CBP21) in the Culture Supernatant of *Serratia marcescens* 2170. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 128–135, jan. 1998.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.
- TECHKARNJANARUK, S.; PONGPATTANAKITSHOTE, S.; GOODMAN, A. E. Use of a promoterless lacZ gene insertion to investigate chitinase gene expression in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S9. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 8, p. 2989–2996, 1997.
- TEIXEIRA, C. S. Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium Violaceum* em *Pichia Pastoris*: purificação e caracterização parcial da proteína recombinante. 2011.
- 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.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.; HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Current protocols in bioinformatics**, p. 2–3, 2002.

TRACEY, M. Chitin. In: **Modern Methods of Plant Analysis/Moderne Methoden der Pflanzenanalyse**. [s.l.] Springer, 1955. p. 264–274.

TSAI, G.-J.; SU, W.-H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of food protection**, v. 62, n. 3, p. 239–243, 1999.

UEDA, H. et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968. **The Journal of antibiotics**, v. 47, n. 3, p. 301–310, 1994.

UMADEVI, S. et al. *Chromobacterium violaceum*: A potential nosocomial pathogen. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 4, p. 386, abr. 2013.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28492–28497, 5 ago. 2005.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219–222, 8 out. 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. **FEBS Journal**, v. 280, n. 13, p. 3028–3049, jul. 2013.

VANDOVA, G. A. et al. Heterologous expression of diverse propionyl-CoA carboxylases affects polyketide production in *Escherichia coli*. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 7, p. 859, jul. 2017.

VÖING, K.; HARRISON, A.; SOBY, S. D. Draft Genome Sequence of *Chromobacterium subtsugae* MWU12-2387 Isolated from a Wild Cranberry Bog in Truro, Massachusetts. **Genome announcements**, v. 5, n. 12, p. e01633-16, 2017.

VRBA, J. et al. Different sources of extracellular β -N-acetylhexosaminidase-like activities in freshwaters. **Chitin enzymology**, v. 2, p. 293–301, 1996.

VU, V. V. et al. A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13822–13827, 2014.

WAGNER, G. et al. Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, Blenniidae, Teleostei). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 49, n. 4, p. 317–319, 1993.

WALTON, P. H.; DAVIES, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. **Current opinion in chemical biology**, v. 31, p. 195–207, 2016.

WANG, X. et al. Draft genome sequence of *Chromobacterium violaceum* strain CV017. **Genome announcements**, v. 4, n. 2, p. e00080-16, 2016.

WILKINSON, D. L.; HARRISON, R. G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Bio/Technology (Nature Publishing Company)**, v. 9, n. 5, p. 443–448,

maio 1991.

WONG, E. et al. The *Vibrio cholerae* Colonization Factor GbpA Possesses a Modular Structure that Governs Binding to Different Host Surfaces. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002373, 12 jan. 2012.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 13, p. 1699–1701, 2001.

YAN, R. et al. In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 4, p. 293–301, 2008.

YANG, C.-H.; LI, Y.-H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435–441, 1 out. 2011.

YOUNG, C.-C. et al. *Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 4, p. 877–880, 2008.

YU, C.-S. et al. CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99368, 2014.

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608–1615, 2010.

ZAMPINI, M. et al. *Vibrio cholerae* persistence in aquatic environments and colonization of intestinal cells: involvement of a common adhesion mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 267–273, 1 mar. 2005.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, jun. 2015.

ZHOU, S. et al. *Chromobacterium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 10, p. 3890–3896, 2016.

ZIMMERMAN, B. Review of Bergonzini on *Chromobacterium*, Bot. 1881.

ZOBELL, C. E.; RITTENBERG, S. C. The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. **Journal of bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 275, 1938.

**ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES SINTÉTICOS PARA
CV0553 (903 NUCLEOTÍDEOS) E CV2592 (1.089 NUCLEOTÍDEOS)**

>CV0553_sintético

```

ggaacgctcgttcagatcaatctggtagcgataaccacgatagccatcgttcaggtacacacgattgg
cagcgtcatgaaactgggaatacagacacggttacgacgctgctggctgataacaccaatacggatcgct
ttgctggctgcttaaccttacgtgccagttcgtatggccagttcgcagcctgtgctggaggctgcgtt
cagtgccacggtgtgagtttcagcgtcgcgaccaggtgtcgaatacacgcagagtagcggagctac
ctgctggcaggttctggtgtgcgataacagaaccgatttctttccacgggttgtcagatcggcagtgca
gtggtatggccaaaggacacatcagaacaagcgtagaatgcttcttcgctgtcagagcgtttccaaac
ggagtagatgatgtgacgaccagtccttgctgtggcagacgcaggtcatgcggtaacgattacca
cgtccagcgggtgattaccggttaggcaccgaacagggtcagatcagaccatttcagcggagtggt
gggttccaaccatcgcgagtaacatacagacggaagtacttgggtggcatgcggtgtagtagcctggaa
taciaaactcgtaatcacctttcgcgtctggaacgatagaagtggcagccagtcagaacgagccaggt
tgaaacctttgaaactcggcttaccaccaccacacagcgcaccgtccggaaccagagcctgggtggtta
tcgccagctggagctggttgatggcgttccaatcatacattgcctgtgcaccaccaaacgcctttgc
ttcacgacatgcagaagagattggtgcttccggaccctcctggaagcaaccgtaagcacggctcactg
gtacttccatagagccgtg

```

>CV2592_sintético

```

cactggagtcacagtgccggagtagtagatggagtcacaaccagcaccacccatgcgggtgtgagcct
gcaggcaacgatagcagcggttctgataagaaaccacctgaccactgcataagcaacaccttcacgc
catgcatcaccagctgggtgggtggagtcacaccgctcgtcacccttcttgatctgatcagataacgata
gccagagtagcgttcgttcagccaaacacgattagcggtagcggagcgtaccggattgatggtaacgg
tgcgctggttagagctgattacgccaatacgaaccaatctggctggaggcgtttactttcacaccagct
tcgtatggccagttcgcagcctggccagtagttgcagacaggtctactttgtggctctcaacgtcacg
accagaaccgctcgaagatacgcagggtcacagaagatttgttcggcaggttctcatgtgcggtaacgg
agccacttctttccacgggttagagattgggtgggtggctccgggtgcggaccaccggtaccgaagttt
acgtcggaaacaggagtagaacgcttcttcggaatcagaacggtttccaaacggtttagatgatgtgacg
accagctctgccagttggcagtttcatggctcatgtggttaacgctgggacgcgtccagcgggtggattgc
cgttgtaagtgcgaacaggttcagggtcagaccacttcagcgggtgggacggattccaaccgcttctta
gttacatagaaacggaagtacttggtagcatgcggagctggagcctttagatgaactcgaagttacc
agacgcggttcggaacgatgttgggtgctggccagtcggtagcagccaggttgaaaccttgaaacttgg
actgacctgcagcacacagcatgccgtccggaactacggcttgatgggtgtcacctgggtgggttctgg
ttgatgccattccaatcgtacatagcctgggtgccaccaacgcgttttagcttctggcaagctggaggt
cttcggagattcggcaccttctggtagcagctgtaaacacgggttaaccggaacctccatggtaccgt
g

```

**ANEXO B – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS
CORRESPONDENTES À CV0553 (323 AMINOÁCIDOS) E CV2592 (386
AMINOÁCIDOS), CONTENDO RESPECTIVOS PEPTÍDEOS SINAIS**

```
>AAQ58229.1 (CV0553)_C. violaceum ATCC 12472  
MKPQWRLPLAMTLGCLSAPSWPHGSMEVPVSRAYGCFQEGPEAPISSACREAKRVG  
GAQAMYDWNAINQTPAGDNHQALVPDGALCGGGKAEFKGFNLARSDWRATSIVPDA  
KGDYEFVVFQATAPHATKYFRFLYVTRDGWNPSTPLKWSDLTLFGAYNGNPPLDVGNR  
YRMTMRLPAGKTGRHIIYSVWKRSDSEEFYACSDVSFGHTTALPIDNPWKEIGSV  
IAHQNLPAAGSSATLRVFDLGRDAETHHTVALNAASAQAANWPYELARKVNAASKAI  
RIGVISQQRNVSVFPVHDAANRVYLNDGYRGYRYQIDLNERS
```

```
>AAQ60262.1 (CV2592)_C. violaceum ATCC 12472  
MKLAFMPAGIGIALAGLSGASWAHGTMEVPVNRVYSCYQEGAESP KTPACQEAKRV  
GGTQAMYDWNGINQNPPGDNHQAVVPDGMLCAAGQSKFKGFNLARTDWPATNIVPN  
ASGNFEFIYKAPAPHATKYFRFYVTKNGWNP SQPLKWSDLLELFGTYNGNPPLDASQ  
RYHMTMKLPTGKTGRHIIYNVWKRSDSEEFYSCSDVNFNGGPPQPEPPPISNPWK  
EVGSVTAHENLPNKSSVTLRIFDGSGRDVESHKVDLSATTGQAANWPYELGVKVN  
SSQIGRIGVISSKQRTVTINPVRSATANRVWLNERYSGYRYQIDIKKGDDGVTPPP  
AGDAWREGVAYAVGQVVS YQNRRYRCLQAHTAWVGAGWTPSTTPALWTPV
```

**ANEXO C – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CORRESPONDENTE À PROTEÍNA
RECOMBINANTE rCv2592-Sumo**

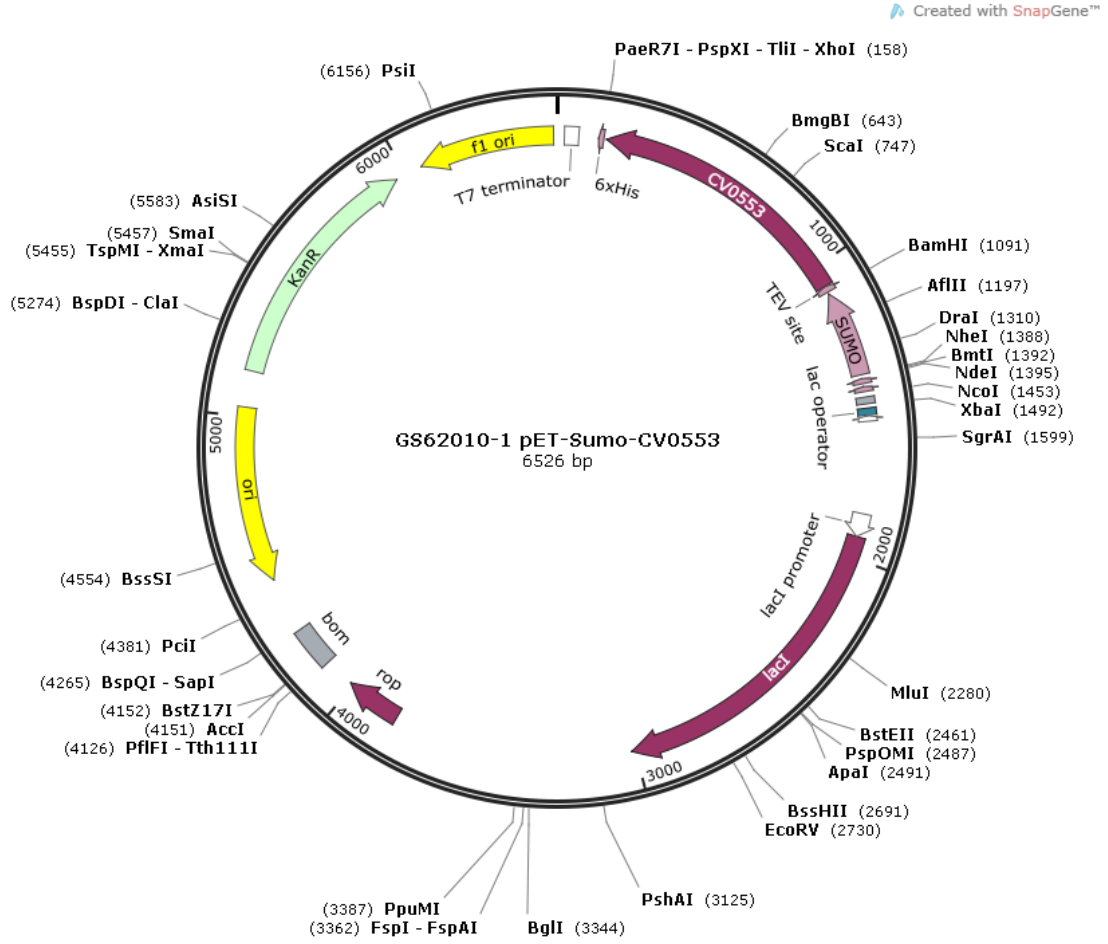
```

>rCv2592-Sumo
HHHHHHHGTMEVPVNRVYSCYQEGAESP KTPACQEAKRVGGTQAMYDWNGINQNPP
GDNHQAVVPDGMLCAAGQSKFKGFNLARTDWPATNIVPNASGNFEFIYKAPAPHAT
KYFRFYVTKNGWNP SQPLKWS DLELFGTYNGNPPLDASQRYHMTMKLPTGKTGRHI
IYNVWKRSDSEEFYSCSDVNFNGGGPQPEPPPISNPWKEVGSVTAHENLPNKSSV
TLRIFDGSGRDVESHKVDLSATTGQAANWPYELGVKVNASSQIGRIGVISSKQRTV
TINPVRSATANRVWLNERYSGYRYQIDIKKGDDGVT PPPAGDAWREGVAYAVGQVV
SYQNR RYRCLQAHTAWVGAGWTPSTTPALWTPVENLYFQGMSDSEVNQEAKPEVKP
EVK PETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAF AKRQ GKEMDSL RFLYDGIRI
QADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIG

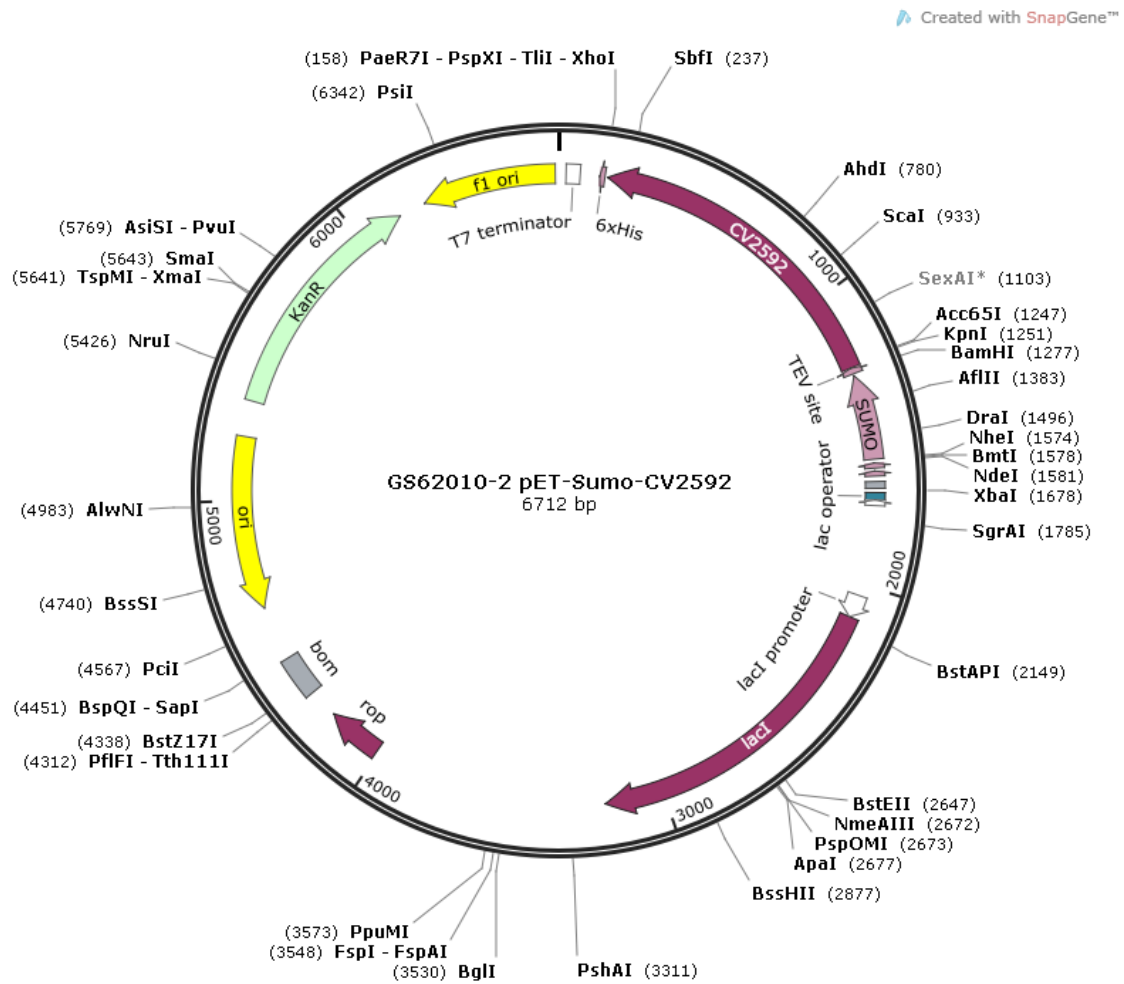
```

As cores ilustram as diferentes porções da proteína rCv2592-Sumo. Em verde, a calda de histidina; em amarelo, a sequência correspondente a ORF CV2935, sem o peptídeo sinal; em cinza, o sítio de clivagem da protease TEV; e em azul, a proteína Sumo.

ANEXO D – PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV0553




ANEXO E – PLASMÍDEO SINTÉTICO pET-SUMO-CV2592



APÊNDICE A – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE DEGRADAÇÃO DE QUITINA NO GÊNERO *Chromobacterium*

LEGENDA:

- | | |
|---|---|
|  <p>1 – Monooxigenase lítica de polissacarídeo (LPMO)</p> <p>2 – Quitinase</p> <p>3 – β-hexosaminidase extracelular</p> <p>4.1 – Porina</p> | <p>4.2 – Quitoporina</p> <p>5 – Quitodextrinase</p> <p>6 – PTS-GlcNAc</p> <p>7 – Sistema ABC de transporte de GlcNAc</p> <p>8 – β-hexosaminidase citoplasmática</p> <p>9 – GlcNAc-cinase (ligada a membrana interna)</p> <p>10 – GlcNAc-6-fosfato deacetilase</p> <p>11 – GlcN-6-fosfato deaminase</p> <p>NagQ – Molécula regulador</p> |
|---|---|

DESCRIÇÃO:

Uma LPMO (1) se liga a matriz cristalina da quitina, hidroxilando as ligações O-glicosídicas. A hidroxilação leva a quebra dessas ligações, criando um final de cadeia onde uma quitinase extracelular (2) preferencialmente atua. A quitinase hidrolisa a cadeia polissacarídica, formando oligômeros de GlcNAc de diferentes comprimentos. Alguns dos dímeros formados são hidrolisados em monômeros por β -hexosaminidases extracelulares (3). Esses monômeros formados, juntamente com os dímeros gerados pela ação das quitinases, adentram na bactéria através de porinas (4.1). Oligômeros, como GlcNAc₃ ou maiores, utilizam porinas com especificidade para quitoligômeros, as quitoporinas (4.2). No periplasma, estes oligômeros serão hidrolisados por quitodextrinases (5) em dímeros e monômeros. Os monômeros, dessa reação que entraram no periplasma, através de porinas, são transportados para citoplasma por sistemas de fosfotransferases (PTS) (6) com especificidade para GlcNAc, sendo fosforilados durante o transporte. Os dímeros restantes adentram o citoplasma através do sistema ABC específico para GlcNAc (7). No citosol, são digeridos por β -hexosaminidases (8) citoplasmáticas e fosforilados por GlcNAc-cinase ligada a membrana interna (9). As moléculas de GlcNAc-6-fosfato geradas nos dois processos são então deacetiladas (10) e deaminadas (11), gerando frutose-6-fosfato e NH₃, este último não ilustrado. A produção das proteínas envolvidas nesse processo é regulada por NagQ, um repressor. Sua interação com GlcNAc libera o operador, permitindo a expressão.

