



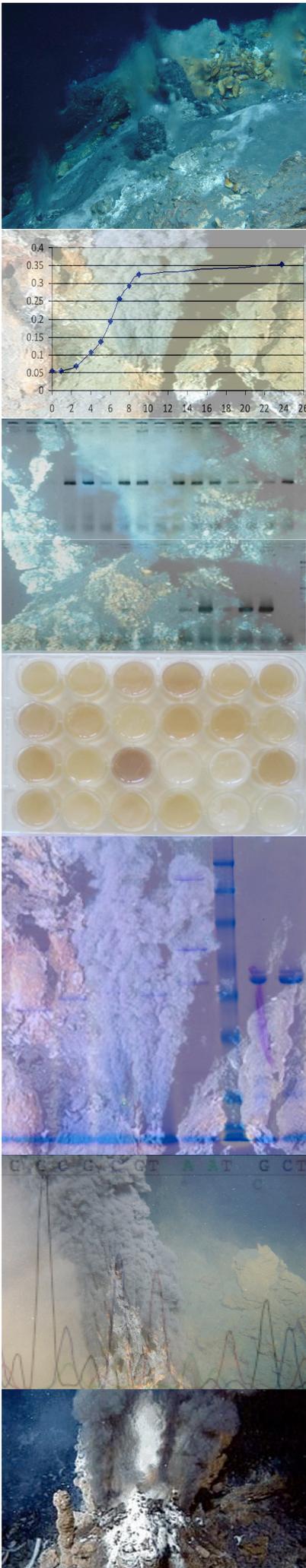
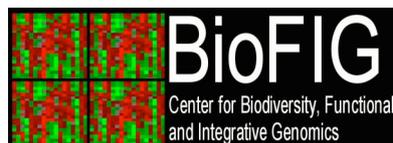
FACULDADE DE CIÊNCIAS UNIVERSIDADE DE LISBOA

## Pesquisa de quitinases com potencial biotecnológico: da caracterização enzimática ao isolamento de genes

Sofia Isabel Fernandes Gomes

Lisboa 2009

Relatório do estágio científico realizado no âmbito do  
protocolo Universidade de Lisboa/Fundação Amadeus Dias



## **INTRODUÇÃO:**

A maioria das enzimas com aplicação em processos de biotransformação tem sido pesquisada em organismos mesófilos, apesar das condições restritas da sua utilização. A estabilidade das enzimas é fortemente afectada e é limitada pela temperatura, pH, força iónica, entre outros factores, o que representa enormes desvantagens na sua aplicação industrial. Atendendo a estas desvantagens, o estudo dos microrganismos extremófilos tem-se tornado, cada vez mais frequentemente, o alvo de pesquisa para novas extremozimas, as quais apresentam uma estabilidade acrescida. Como tal, tornam possível a sua aplicação como biocatalisadores em condições anteriormente consideradas incompatíveis com os sistemas biológicos (Hough & Danson, 1999). O interesse nas extremozimas tem vindo também a aumentar devido aos novos desenvolvimentos na cultura de extremófilos e ao sucesso de clonagem e expressão dos seus genes em hospedeiros não extremófilos (Gomes & Steiner, 2004; Synnes, 2007).

O termo 'extremófilos' foi inicialmente proposto por MacElroy, em 1974, referindo-se a organismos que sobrevivem em condições letais para a maioria dos organismos sendo que, muitos deles, não sobrevivem em ambientes antropogénicos. Há que ter em conta que a extremofilia é um conceito relativo, uma vez que condições extremas para um determinado organismo podem ser essenciais para a sobrevivência de outro (Gomes & Steiner, 2004).

O estudo dos microrganismos extremófilos tem incidido mais fortemente sobre os termófilos (a maioria pertencentes ao domínio *Archaea*), cuja temperatura óptima de crescimento é superior a 60°C, intolerante para a maioria dos organismos. As hidrolases extracelulares produzidas pelos termófilos (e.g. celulases, manases, amilases, pululanases, xilanases, quitinases, e pectinases) têm um carácter não termolábil e conferem a vantagem de poderem ser utilizadas em processos industriais, em condições de temperatura muito elevada, o que aumenta a solubilidade de muitos polímeros, reduz a viscosidade, aumenta a taxa de velocidade da reacção e também diminui o risco de contaminação (Gomes & Steiner, 2004).

As quitinases (EC 3.2.14) são enzimas que pertencem à família das glicosil hidrolases e catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 do polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc), denominado quitina. A quitina é o segundo composto orgânico mais abundante, a seguir à celulose, encontrando-se vastamente distribuído na natureza, nomeadamente em conchas de crustáceos, no exoesqueleto de insectos e na parede celular de inúmeros fungos (Dahiya *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007). A quitina e a sua forma desacetilada, o quitosano, têm diversas aplicações não só nas indústrias bioquímica, alimentar e química, mas também apresentam actividade antimicrobiana. As quitinases podem ser classificadas em duas categorias: endoquitinases e exoquitinases; de acordo com a semelhança entre os seus aminoácidos são agrupadas em dois grupos: as famílias 18 e 19. As quitinases bacterianas pertencem à família 18, sendo raras as da família 19 (Dahiya *et al.*, 2006).

Relativamente aos ambientes extremos destacam-se as fontes hidrotermais localizadas no fundo dos oceanos (>200 m de profundidade). As correntes hidrotermais encontram-se ao longo das fendas do fundo oceânico, formando-se onde o magma emerge para a superfície. As comunidades únicas que aqui vivem suportam condições elevadas de pressão e substâncias tóxicas, para além de temperaturas da água bastante elevadas (que podem ultrapassar os 300°C). Também se encontram organismos psicrotolerantes, ou seja, que se adaptaram e toleram temperaturas muito baixas, devido às bruscas variações de temperatura nestes locais (Synnes, 2007).

O estudo efectuado enquadra-se no âmbito do projecto 'SEAVENTzymes'. Tem como principal objectivo a exploração do potencial biotecnológico da colecção de procariontas extremófilos isolados de fontes hidrotermais submarinas, conservada no ICAT, representando um estudo para a pesquisa de novas extremozimas.

A colecção 'SEAVENTbugs' foi isolada de amostras recolhidas em campos hidrotermais localizados ao longo da Crista Média Atlântica (MAR), próximo do arquipélago dos Açores. Consiste em 246 isolados iniciais, dos quais 200 são representativos e classificados em três grupos: A (aeróbios ou anaeróbios facultativos e psicrotolerantes), B (anaeróbios estritos ou facultativos e psicrotolerantes) e C (anaeróbios estritos, mesófilos ou termófilos). Anteriormente, procedeu-se ao 'screening' dos isolados aeróbios e à definição/selecção de 'primers' degenerados dirigidos para regiões flanqueantes de sequências conservadas no interior dos genes correspondentes, disponíveis nas bases de dados públicas. Pretende-se sequenciar os produtos de amplificação, de modo a permitir a identificação de novas termozimas putativas com aplicação industrial, por comparação com as sequências disponíveis nessas bases de dados.

No presente trabalho, procedeu-se à pesquisa de enzimas hidrolíticas extracelulares com aplicação industrial, especificamente de quitinases.

## **OBJECTIVOS:**

Num contexto de pesquisa de novas quitinases com potencial biotecnológico, foram definidos os seguintes objectivos: (i) o 'screening' da colecção de extremófilos para a produção de quitinases extracelulares; (ii) a sequenciação dos produtos de amplificação, com os 'primers' previamente definidos; (iii) a confirmação dos resultados positivos por ensaios enzimáticos com substratos cromogénicos; (iv) a identificação e caracterização de novas enzimas com aplicação industrial.

Atendendo aos objectivos propostos, executaram-se as tarefas a seguir descritas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **ANÁLISE FENOTÍPICA:**

#### **- 'Screening' da actividade quitinolítica**

Com o intuito de detectar a actividade quitinolítica dos 35 isolados previamente testados e confirmados positivos, foram realizados ensaios em microplaca com 24 poços, em meio com duas camadas, uma inferior composta de meio de crescimento sem fonte de carbono, para fornecer suporte à camada superior que continha quitina como única fonte de carbono. A temperatura de incubação foi de 22°C e utilizaram-se dois controlos, um positivo - os isolados foram cultivados em meio com fonte carbono solúvel e facilmente assimilável, e um controlo negativo, na ausência de fonte de carbono.

Numa etapa mais adiantada do trabalho, voltou-se a realizar um 'screening' fenotípico da actividade quitinolítica dos isolados, mas numa perspectiva de análise da actividade da enzima extraída. Utilizou-se meio contendo agarose 'Low Melting' e 'Chitin Azure' em placas de Petri, onde se cortaram poços com a pipeta de Pasteur invertida, preenchendo-os com 75 µl dos extractos proteicos a testar.

### **ANÁLISE DO DNA:**

#### **- PCR e Electroforese em Gel de Agarose**

A técnica de reacção de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar uma região conservada do gene da quitinase nos isolados seleccionados. Foi desenhado um par de 'primers' degenerados, designados de GH18for e GH18rev, de acordo com as regiões conservadas da sequência descrita (Hobel et al, 2005). O principal alvo dos 'primers' definidos eram os isolados aeróbios. Atendendo à dificuldade de cultivo dos isolados anaeróbios estritos, o 'screening' molecular destes isolados foi também testado com os mesmos 'primers'.

A reacção de PCR foi realizada em 25 µl de volume de reacção, contendo 5-10 ng/µl de DNA molde, 1 pmol/µl de cada 'primer', 200 µM de dNTP, tampão de electroforese concentrado 1x, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U/µl de polimerase Taq, num termociclador, de acordo com a seguinte sequência de ciclos: (i) um ciclo de desnaturação inicial a 94°C, 3 minutos; (ii) 30 ciclos que incluem uma fase de desnaturação a 94°C, uma fase de 'annealing' variável e uma fase de extensão a 72°C; Todas as fases de cada ciclo têm a duração de 30 segundos; (iii) um ciclo de extensão final a 72°C durante 3 minutos. Há que ter em atenção que a temperatura de 'annealing' nos ciclos da 2ª fase pode ser ajustada consoante haja necessidade de se proporcionar diferentes condições de restringência. O amplicão esperado tem 250 pb.

Os isolados que não amplificaram com os 'primers' GH18, foram submetidos a nova reacção de amplificação com um segundo par de 'primers'

degenerados, designados de GH19for e GH19rev e previamente desenhados no âmbito da execução do projecto SEAVENTzymes, e cujo amplicão esperado tem 500-600 pb. Os produtos da amplificação foram visualizados por electroforese em gel de agarose 2% (em TBE) nas seguintes condições experimentais: 100 V (3.4 V/cm), durante 1h30 em tampão de corrida TBE 0.5%, aplicando-se 10 µl de produto de PCR e 5 µl de marcador molecular de 100 pb.

#### **- Perfis de restrição**

Para diferenciação dos amplicões obtidos, procedeu-se à análise dos perfis de restrição usando a enzima de restrição *Alu I* (sequência: AG<sup>^</sup>CT). A reacção foi realizada em 20 µl de volume de reacção, contendo 1 U de enzima de restrição e tampão L concentrado 1x, durante 14h a 37°C. Os produtos de digestão foram aplicados em gel 3% agarose-1000, em tampão TAE, nas condições de 100 V (3.4 V/cm), durante 2h em tampão de corrida TAE 1X, aplicando-se 20 µl de produto de digestão e 5 µl de marcador molecular de 100 pb.

#### **- Sequenciação**

Os isolados com resultado positivo na amplificação com o par de 'primers' GH18, foram submetidos a nova reacção de PCR, agora num volume de 50 µl, de modo a que o volume de reacção fosse suficiente para se proceder à purificação do DNA e consequente sequenciação. Os produtos de reamplificação foram purificados utilizando um kit comercial (Jetquick, Genomed) e sequenciados no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos do ICAT-FFCUL utilizando o 'primer' GH18for seleccionado devido ao menor grau de degeneração. As sequências foram editadas utilizando o 'software' do sequenciador e procedeu-se à sua identificação por comparação com as sequências disponíveis no GenBank (NCBI) utilizando o algoritmo BLASTN.

### ANÁLISE DE PROTEÍNAS:

#### **- Doseamento de proteínas**

Os extractos celulares foram obtidos a partir de culturas em meio contendo quitina (indutor) após 18 a 22 horas de incubação, em banho termostaticado a 22 °C, com agitação (pré-inóculo de 12 horas no mínimo). Como controlo realizou-se o mesmo procedimento para culturas inoculadas em meio com fonte de carbono facilmente assimilável, de modo a avaliar a quantidade relativa de proteínas que são excretadas, quando se altera a fonte de carbono para quitina.

A concentração de proteína nos extractos foi determinada em microplaca num fluorímetro Zenyth 3100 (Anthos Labtec) pelo método de Bradford (1976), sendo medida a absorvância a 595 nm. Utilizou-se uma curva padrão de albumina preparada a partir de uma solução stock de 2 mg/ml BSA (soro de

albumina bovino), diluída 1:10. Para este método utilizou-se a proporção 4:1 (amostra : reagente de Bradford): 20 µl de extracto + 140 µl de tampão PBS + 40 µl de Reagente de Bradford.

Também se procedeu à quantificação de proteína solúvel com o Reagente Coomassie Plus, utilizando a proporção 1:1 (20 µl de extracto + 80 µl de tampão PBS + 100 µl de Reagente Coomassie Plus).

#### **- Electroforese em Gel de Poliacrilamida**

A análise das proteínas presentes nos extractos em condições nativas foi efectuada em sistema descontínuo com gel de concentração de 4% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) em tampão 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8 e gel de resolução de 10% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) em tampão 3 M, pH 8.9, ambos com sacarose 50%, APS 10% e TEMED 1%. Quando em condições desnaturantes, adicionou-se SDS 10%. A electroforese em condições nativas foi realizada com o tampão de electroforese (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glicina) e em condições desnaturantes adicionou-se SDS (0.1%). O marcador molecular utilizado para os géis nativos foi o 'HMW electrophoresis Calibration Kit (67-669 KDa)' (Pharmacia) e para os géis desnaturantes foi o 'LMW Electrophoresis Calibration Kit (14-94 KDa)' (Pharmacia). Estas foram as condições iniciais utilizadas, estando prevista uma optimização da metodologia.

Após a electroforese, procedeu-se à coloração dos géis (solução de coloração - 0.1% Coomassie G250, 40% etanol e 10% ácido acético) aquecendo durante 1 minuto no microondas e deixando a incubar com agitação suave durante 15 minutos; seguidamente procedeu-se à descoloração (solução de descoloração - 10% etanol e 7.5% ácido acético) aquecendo novamente no microondas durante um minuto e diluindo 1:2 para incubar 'overnight', com agitação suave. Posteriormente, os géis foram colocados em solução de conservação (3% glicerol e 25% etanol). A captura de imagem foi feita num 'scanner' Mustek Paragon 1200 A3 Pro por digitalização dos géis entre duas folhas de papel celofane embebidas na solução de conservação. O 'software' para tratamento de imagem foi o GIMPshop.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

#### **ANÁLISE FENOTÍPICA:**

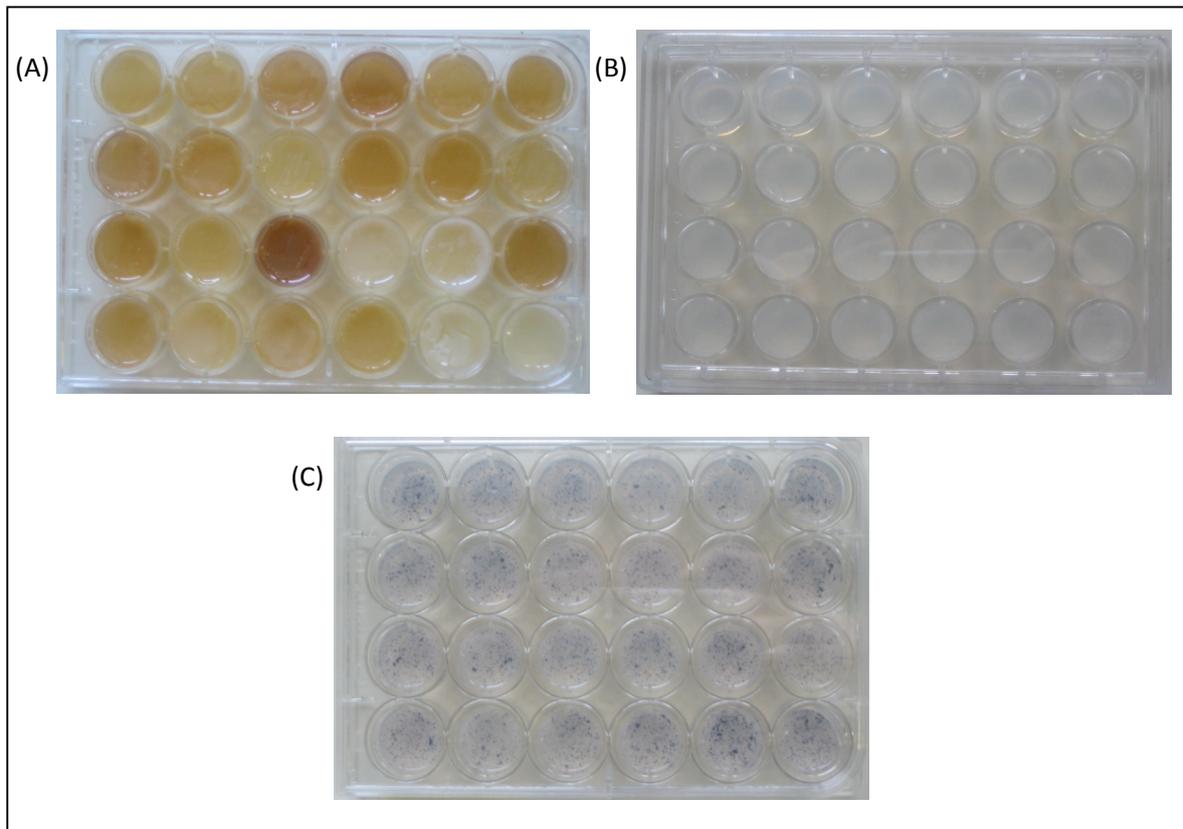
##### **- 'Screening' da actividade quitinolítica**

Por acção da quitinase, a hidrólise da 'Chitin Azure' produz fragmentos corados hidrossolúveis, que se difundem no meio conferindo uma coloração azul característica, permitindo visualizar as reacções positivas, que correspondem à libertação para o meio de cultura das enzimas hidrolíticas correspondentes.

No rastreio fenotípico dos isolados aeróbios não foi observada coloração azul nas que foram suplementadas com 'Chitin Azure', tal como pode ser

observado na Figura 1. Contudo, houve crescimento em todas as placas do controlo positivo, e ausência de crescimento nas placas de controlo negativo, tal como seria de esperar. No controlo positivo forneceram-se fontes de carbono e azoto, propiciando o crescimento de todas as bactérias; no controlo negativo, a ausência de fonte carbono levaria a uma inibição de qualquer crescimento, tal como se verificou.

Sugere-se, por um lado, que a percentagem de agarose pudesse ser muito elevada, dificultando a difusão da enzima para aceder ao substrato, e por outro, que a concentração da enzima produzida fosse muito baixa.



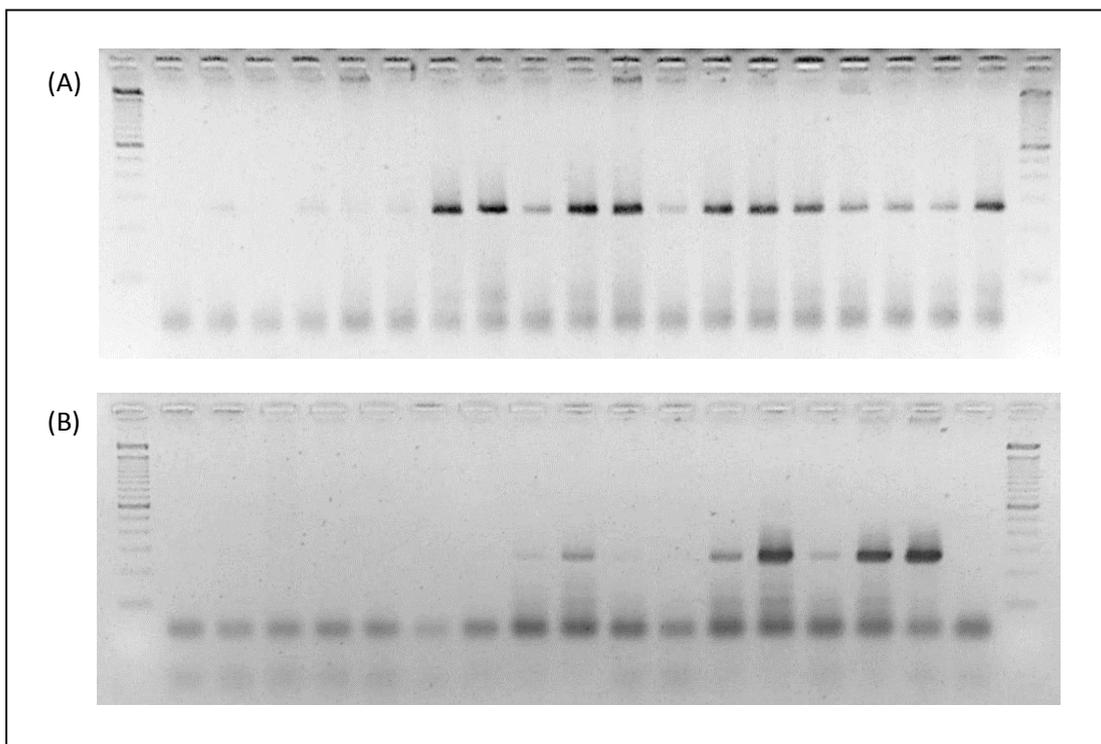
**Figura 1:** Ensaio em Microplaca 24P com as estirpes previamente seleccionadas como produtoras de quitinasas. Controlo positivo (A), controlo negativo (B), placa com substrato de 'Chitin Azure' (C).

## ANÁLISE DO DNA:

### **- PCR e Electroforese em Gel de Agarose**

A amplificação do DNA através da técnica de PCR e posterior visualização em gel de agarose dos fragmentos obtidos, permitiu detectar **54** isolados com o perfil esperado, que amplificaram com os 'primers' GH18.

A título exemplificativo apresenta-se na Figura 2 fotografias de géis de agarose, onde as bandas observadas correspondem ao amplicão de 250 pb esperado pela amplificação do DNA a partir dos 'primers' referidos.



**Figura 2:** Exemplos de géis de agarose resultantes da amplificação por PCR com o par de 'primers' GH18, obtidos utilizando temperaturas de 'annealing' constantes (A) e variando em gradiente (B); amplificação com 250pb. Marcador de massa molecular: 100 bp (Invitrogen).

Os isolados, cuja amplificação foi negativa para GH18 foram posteriormente amplificados com o par de 'primers' GH19, observando-se apenas **5** perfis de amplificação, diferentes do esperado, pelo que não se considerou nenhum resultado positivo. Por isso, prosseguiu-se o estudo restringindo-nos apenas aos isolados que apresentaram um resultado de amplificação positivo para o GH18. Uma das estirpes foi usada como controlo positivo nas reacções de PCR realizadas.

No total dos ensaios de amplificação do fragmento de DNA esperado com os 'primers' GH18, obtiveram-se **54** isolados com resultado positivo, dos quais **10** foram seleccionados aleatoriamente, para através da sua sequenciação, tentar confirmar que se tratavam de sequências correspondentes ao gene em pesquisa, e portanto poder prosseguir o estudo. Com as sequências resultantes fizeram-se alinhamentos por comparação com as sequências disponíveis no GenBank (NCBI) utilizando o algoritmo BLASTN. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sugerindo tratar-se de um gene putativo para quitinase nos isolados analisados.

De forma a identificar as extremozimas putativas, procedeu-se à comparação das sequências obtidas com sequências previamente descritas, disponíveis nas bases de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>). A recolha dos dados está descrita no Anexo A e foi feita com o intuito de conhecer as condições óptimas a que são produzidas, para amplificar a sua produção (informação não disponível), bem como a massa molecular média das enzimas em estudo, para selecção e optimização dos parâmetros experimentais e selecção do marcador molecular a usar, uma

vez que as quitinases bacterianas estão descritas como podendo variar a sua massa molecular entre 20 a 60 kDa (Bhattacharya *et al.*, 2007).

#### - Perfis de restrição

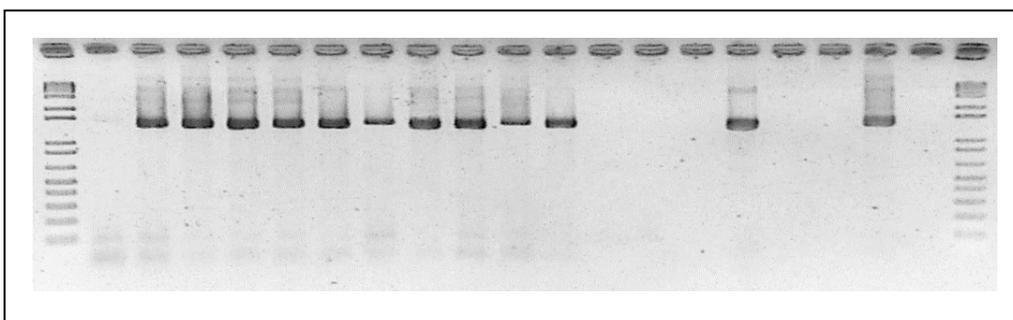
Procedeu-se à análise dos perfis de restrição desses isolados. Tal teste não foi bem sucedido, pois o gel não apresentava resolução suficiente para se estabelecerem os perfis de restrição claramente. Com o intuito de identificação das estirpes prosseguiu-se então, à amplificação do DNA ribossomal 16S (rDNA). A amplificação do DNA por PCR desta sequência do genoma foi feita utilizando o par de 'primers' universais:

PA (27f): 5' AGAGTTTGATCCTGGTCAG 3'  
PH (153v): 5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'

A reacção de PCR foi realizada em 50 µl de volume de reacção, contendo 5 a 10 ng/µl de DNA molde, 10 pmol/µl de cada 'primer', 200 µM de dNTP, tampão de electroforese concentrado 1x, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U/µl de polimerase Taq, num termociclador, nas seguintes condições de reacção: (i) um ciclo de desnaturação inicial a 94°C, 5 minutos; (ii) 35 ciclos que incluem uma fase de desnaturação a 94°C, 30 segundos, uma fase de 'annealing' a 55°C, 30 segundos e uma fase de extensão final a 72°C, um minuto; (iii) um ciclo de extensão a 72°C, 5 minutos.

A electroforese em gel de agarose 1.2% (em TBE), para visualização dos produtos de amplificação, foi realizada nas seguintes condições experimentais: 115 V [2.6(6) V/cm], durante 1h30 em tampão de corrida TBE 0.5%, aplicando-se 3 µl de produto de PCR e 5 µl de marcador molecular de 1 kb Plus.

A amplificação do fragmento do rDNA foi bem sucedida para **17** dos **25** isolados analisados, ilustrando-se na Figura 3 o tipo de resultado obtido.



**Figura 3:** Exemplo de um gel de agarose resultante da amplificação por PCR da região 16S rDNA com o par de 'primers' PA e PH. Marcador de massa molecular: 1 kb Plus (Invitrogen).

## ANÁLISE DE PROTEÍNAS:

Com base na selecção, ao nível molecular, dos isolados potencialmente produtores de quitinases, realizou-se uma abordagem ao nível das proteínas produzidas.

Para tal abordagem, seleccionou-se uma série de isolados, os quais (i) apresentaram o perfil esperado na amplificação com GH18, (ii) amplificaram a sequência 16S de rDNA e (iii) simultaneamente foram cultivadas em meio geral apropriado.

Tendo em conta que apenas as estirpes pertencentes ao Grupo A conseguem sobreviver em condições de aerobiose, os ensaios posteriores não contemplaram as estirpes dos Grupos B e C. Das estirpes seleccionadas, excluíram-se quatro nas quais, apesar de apresentarem o perfil esperado, a banda obtida em gel de agarose era muito ténue; incluíram-se mais duas estirpes por terem apresentado, numa análise anterior do trabalho, um perfil de amplificação diferente, porém com a banda esperada evidentemente observada.

O passo seguinte à identificação das estirpes produtoras de quitinases é a sequenciação dos amplicões correspondentes ao gene em causa. Já tinham sido seleccionadas **25** estirpes em que se confirmou a existência da sequência conservada para o gene da quitinase amplificada com os 'primers' GH18. Seguiu-se o passo da sequenciação. Contudo, sequenciar **25** amostras é um processo relativamente dispendioso. Deste modo, optou-se por averiguar quais dessas estirpes produziam quitinase extracelular. Para isso, cultivaram-se os isolados em meio indutor da produção de quitinases e os extractos das proteínas em solução foram analisados por electroforese em gel de poliacrilamida.

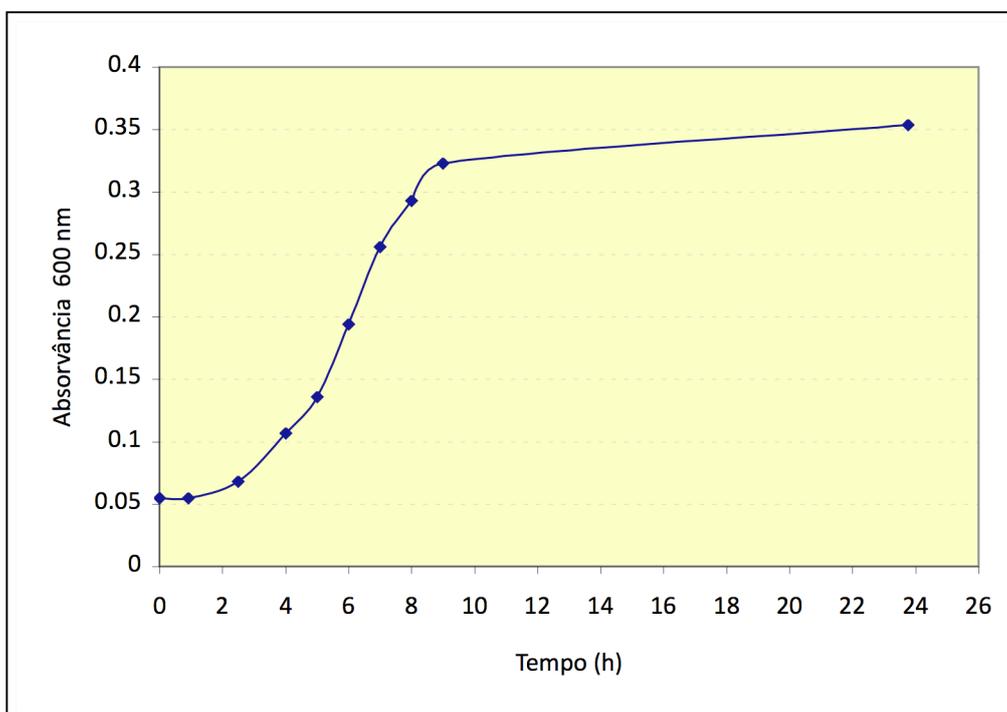
Como tentativa de determinar o tempo de incubação adequado para se poder recolher os extractos proteicos no final da fase exponencial, isto é, no momento em que se considera haver uma maior produtividade, escolheram-se três estirpes.

Tentou-se elaborar a curva de crescimento de cada uma individualmente, através da leitura da densidade óptica no espectrofotómetro, durante 24 horas. As estirpes seleccionadas foram cultivadas, em (i) meio geral com glucose, como controlo positivo, (ii) meio geral com quitina, como meio indutor da produção de quitinases, e (iii) meio geral com glucose (diluída 1/20) e quitina, de modo a inferir se existia alguma influência no crescimento diáuxico.

Ao longo da realização da presente etapa surgiram alguns problemas. Por um lado, a quitina, como substrato insolúvel, impossibilitou as leituras no espectrofotómetro, uma vez que, ao estar em suspensão causava uma turvação no meio. Por outro lado, uma das estirpes não evidenciou crescimento e outra não apresentou crescimento em meio com glucose (meio controlo). Pelo que, apenas se obteve curva de crescimento exequível para uma única

estirpe em meio só com glucose como fonte de carbono, tal como demonstra a Figura 4.

Ainda assim, tentou-se prosseguir com a elaboração da curva de crescimento através da determinação do número de unidades formadoras de colónias (cfu/ml) em função do tempo, em meio sólido utilizando o plaqueamento pelo método das gotas. Foram testados os mesmos três meios de cultura supra descritos, para as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  com duas réplicas, numa primeira abordagem. Tendo em conta que a maioria das estirpes apresentava um número de cfu incontável, procedeu-se a uma segunda abordagem, testando-se as diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ . Porém, duas estirpes manifestaram um crescimento invulgar, na medida em que não formavam colónias isoladas, impossibilitando a sua contagem. Com todas as limitações inerentes a esta etapa decidimos desistir da elaboração da curva de crescimento, como forma de averiguação do tempo de cultura necessário para que as estirpes atingissem a fase exponencial do seu crescimento. O tempo de incubação das estirpes foi então estabelecido empiricamente.



**Figura 4** Representação gráfica da curva de crescimento em glucose durante 25 horas de incubação.

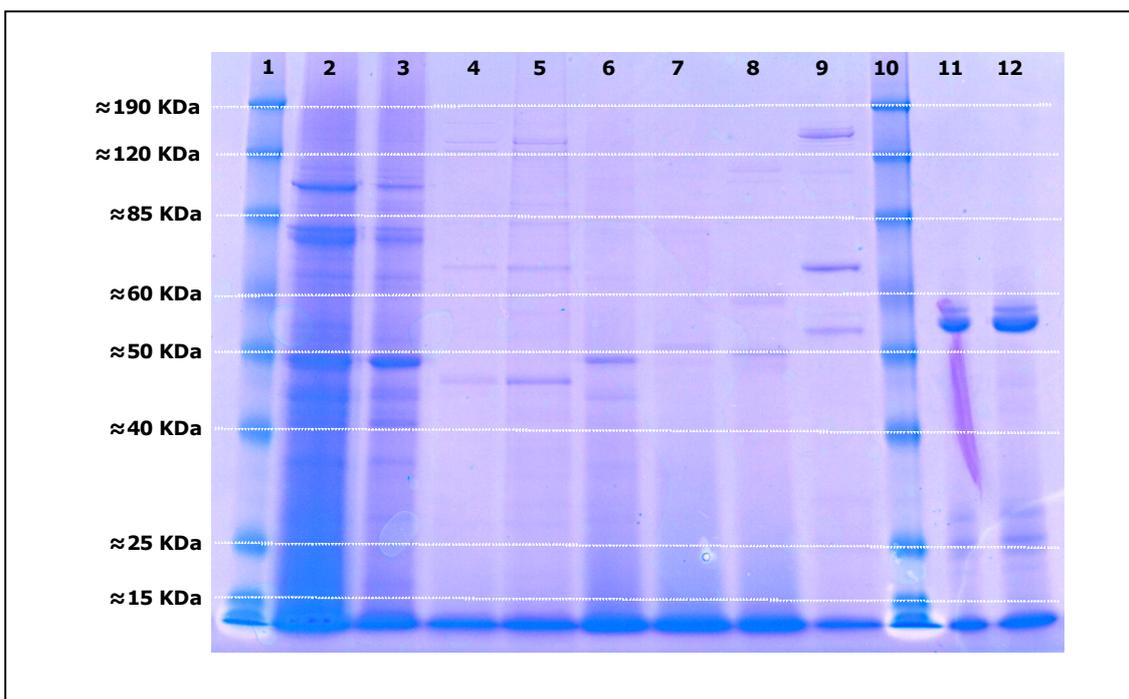
#### - Doseamento de proteínas

O método de Bradford foi inicialmente descrito por Marion Bradford em 1976 e consiste num ensaio colorimétrico, que se baseia na ligação do reagente Coomassie Blue G250 às proteínas, mudando de cor vermelha para cor azul (com um máximo de absorvância a 595 nm). O corante estabelece ligações com resíduos de arginina e lisina, pelo que se entende como um método muito sensível, dependendo contudo da composição de aminoácidos

da respectiva proteína, não sendo assim um método muito fiável aquando da comparação entre diferentes proteínas (Kruger, 2002).

O método de Coomassie Plus consiste num método em tudo semelhante ao método de Bradford original, mas melhorado, no sentido em que é menos sensível a interferências presentes nas amostras em solução, tais como sais, solventes, tióis, agentes redutores e quelantes.

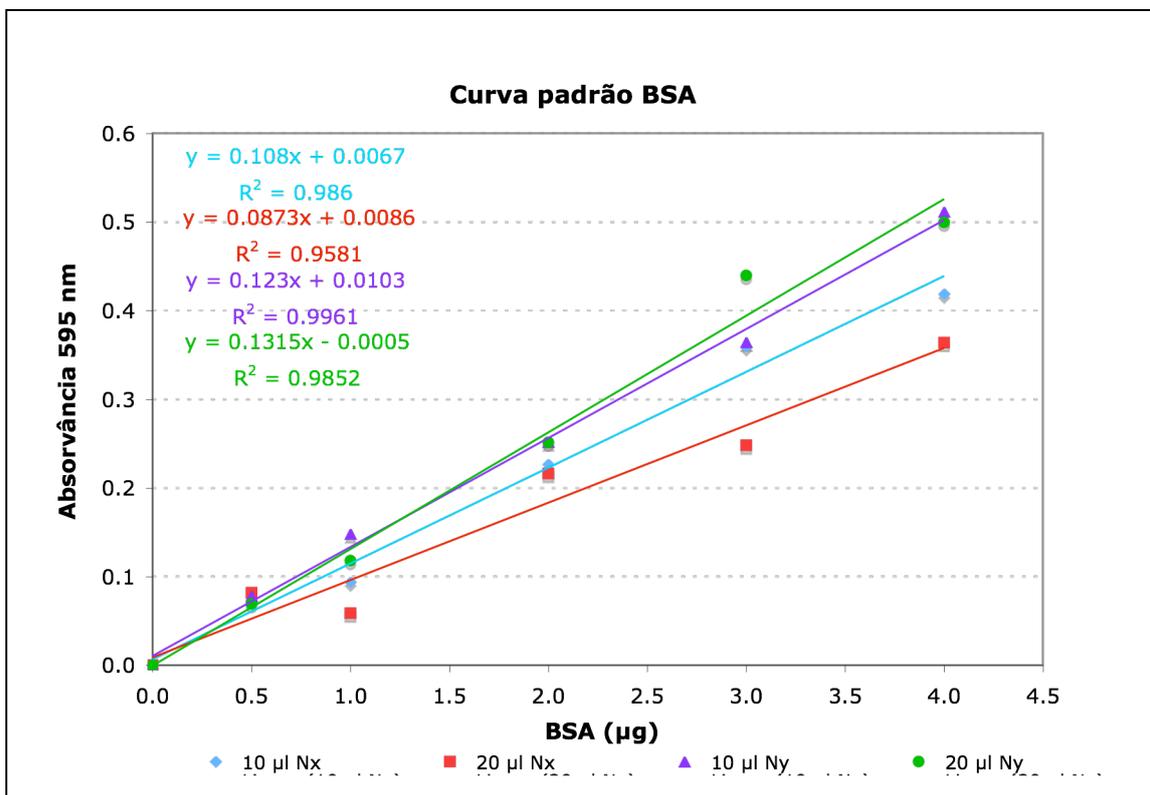
Para a obtenção de um extracto de proteínas solúveis procedeu-se à deposição das células, por centrifugação a 4000 rpm durante 30 minutos; a não visualização das bandas nos geis de poliacrilamida evidenciou uma elevada diluição dos extractos, pelo que foi necessário proceder-se à sua concentração. Testaram-se colunas de concentração Macrosep de 10K (concentra 30x), 30K (concentra 10x) e Milipore Ultra-15 de 10K (concentra 50x) e 30K (concentra 30x). Tendo as colunas Milipore Ultra-15 (visualização em gel de poliacrilamida na Figura 5, poços 2 e 3) uma maior capacidade de concentração optou-se pelo uso continuado destas.



**Figura 5:** Exemplo de Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes com gel de concentração 4% e gel de resolução 7%. 1 – MW; 2 - 10 µl estirpe 1 @ 10K Milipore; 3 - 10 µl estirpe 1 @ 30K Milipore; 4 - 10 µl estirpe 2 @ 10K Macrosep; 5 - 10 µl estirpe 2 @ 10K Macrosep; 6 - 10 µl estirpe 1 @ 30K Macrosep; 7 - 10 µl estirpe 3 @ 10K Macrosep; 8 - 10 µl estirpe 4 @ 10K Macrosep; 9 - 10 µl estirpe 5 @ 10K Macrosep; 10 – MW; 11 – 5 µl Quitinase comercial; 12 – 10 µl Quitinase comercial.

Para a quantificação das proteínas solúveis, elaborou-se uma curva padrão, utilizando a proteína BSA, permitindo assim calcular a concentração da proteína em análise. Tendo em conta que os isolados estavam a ser cultivados em meios de cultura com diferente fonte de azoto, foram feitas duas curvas padrão correspondentes (ver Figura 6).

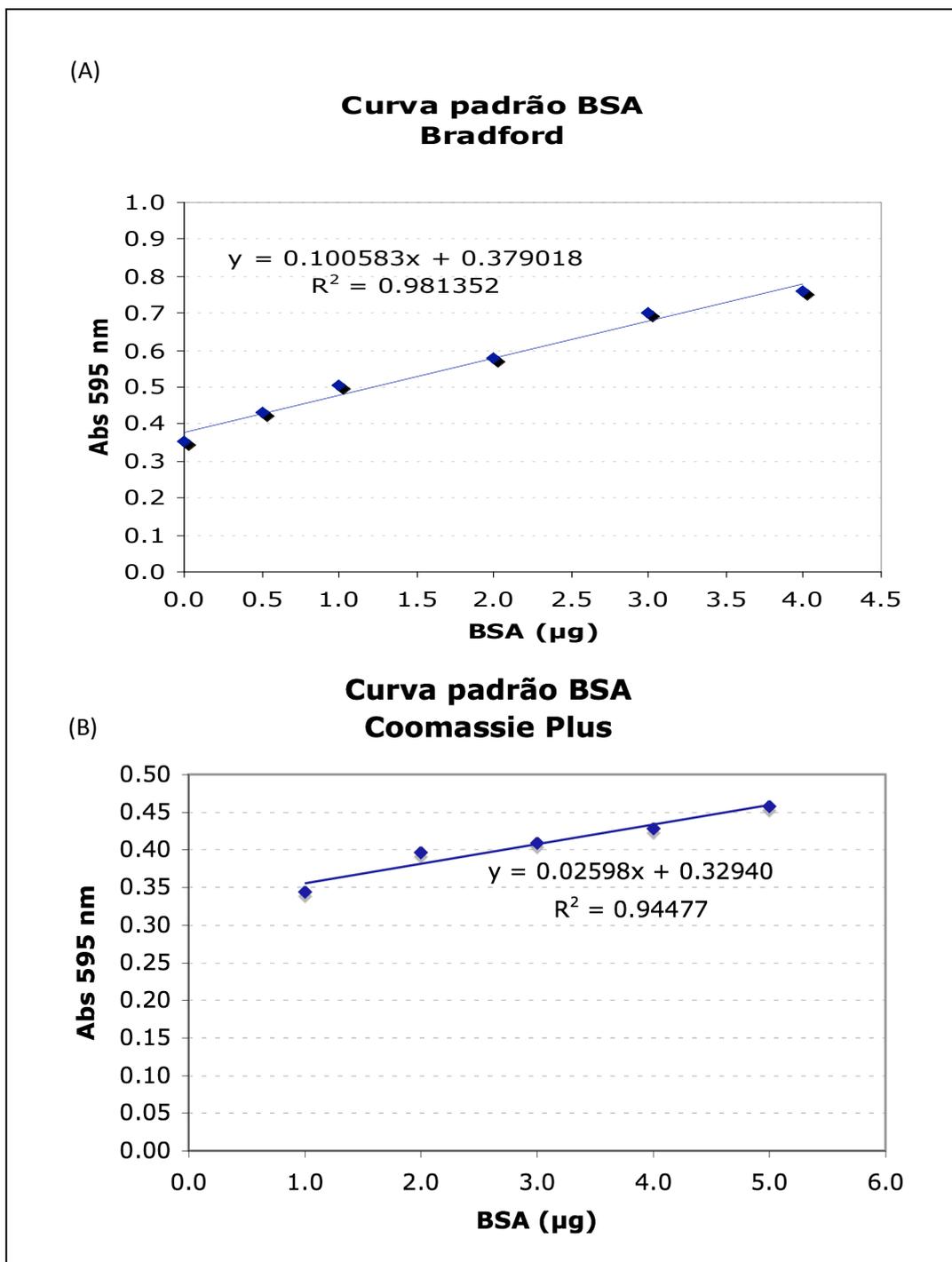
Tendo sido feita uma análise comparativa do doseamento de proteínas utilizando os Reagentes de Bradford e Coomassie Plus, fizeram-se duas curvas padrão para poder calcular a concentração de proteínas com ambos. Utilizou-se novamente a BSA mas adicionada unicamente a tampão PBS. A Figura 7 tem representadas as curvas padrão referidas.



**Figura 6:** Representação gráfica de curvas padrão, seguindo o método de Bradford e utilizando a BSA como proteína padrão, em meios com diferente fonte de azoto (Nx e Ny). O volume de Reagente de Bradford é 40 µl; perfazendo-se o volume final de 160 µl por adição de tampão PBS.

Da quantificação de proteínas obtida pelos dois métodos não se obteve uma relação coerente entre ambos, não podendo considerar os valores como absolutos. Ao invés disso, são úteis como resultados relativos.

Foi realizado um novo 'screening' fenotípico mas ao nível da actividade hidrolítica da enzima, num ensaio em placa com agarose 'Low Melting' e 'Chitin Azure'. Testaram-se os extractos contemplando diferentes valores de pH (5,0, 6,0 e 7,0), e reduzindo-se a percentagem de agarose em relação ao 'screening' feito inicialmente, na tentativa de abordar diferentes condições experimentais para averiguar a que melhor se adequa. As placas foram incubadas a 30°C. Porém, ao fim de uma semana não se obteve qualquer resultado.



**Figura 7:** Representação gráfica de curvas padrão, utilizando a BSA como proteína padrão, em tampão PBS. Os Reagentes utilizados foram Bradford (A) e Coomassie Plus(B).

## - Electroforese em Gel de Poliacrilamida

A técnica de Electroforese em Gel de PoliAcrilamida (PAGE) permite a separação de proteínas solúveis baseada na migração das proteínas carregadas num campo eléctrico. É um processo de electroforese que pode ser realizado em condições nativas ou desnaturantes.

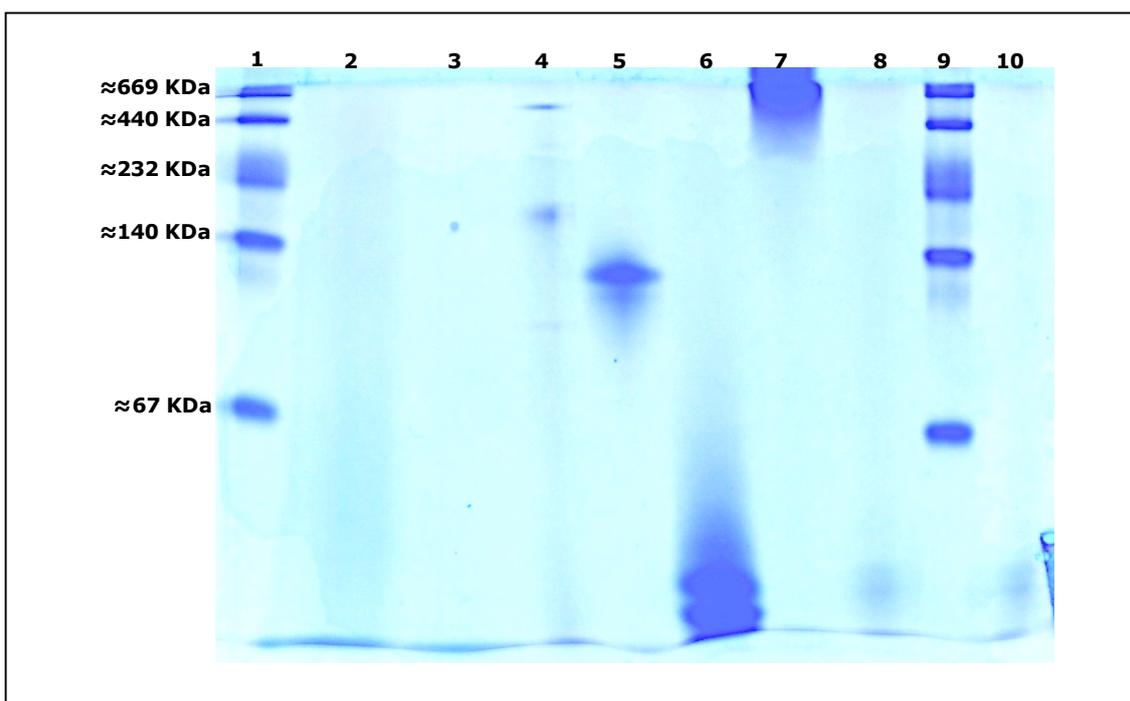
A análise do estado oligomérico das proteínas e da sua actividade é realizada por electroforese em condições nativas, na qual as moléculas são separadas em função da sua massa molecular, carga eléctrica e conformação. Os extractos hidrossolúveis são analisados, sem a adição de qualquer agente desnaturante ou tratamento térmico, de modo a manter a conformação e actividade enzimáticas. A pesquisa da actividade hidrolítica da quitinase foi realizada incorporando 'Chitin Azure' no gel nativo, de modo a revelar posteriormente a banda correspondente à quitinase, após incubação em tampão adequado.

Na electroforese em condições desnaturantes, a adição de agentes desnaturantes (ex. SDS – dodecilsulfato de sódio, LDS – dodecilsulfato de lítio), que se ligam à maioria das proteínas por interacções hidrofóbicas, confere às proteínas uma carga global negativa, anulando o efeito das suas cargas intrínsecas; assim a separação é realizada quase exclusivamente em função da sua massa molecular relativa, que pode ser estimada com acuidade. A electroforese em condições desnaturantes é habitualmente realizada em sistema descontínuo, utilizando um gel de concentração (poro maior, tampão menos concentrado e pH inferior), o qual permite concentrar as amostras antes de migrarem para o gel de resolução (poro menor, tampão mais concentrado e pH superior), o qual permite a separação das diferentes proteínas de acordo com a sua massa molecular. Atendendo a que se promove a desnaturação das amostras, quer pela adição de detergentes, quer pela desnaturação térmica, a técnica de SDS-PAGE permite averiguar o número de subunidades da enzima.

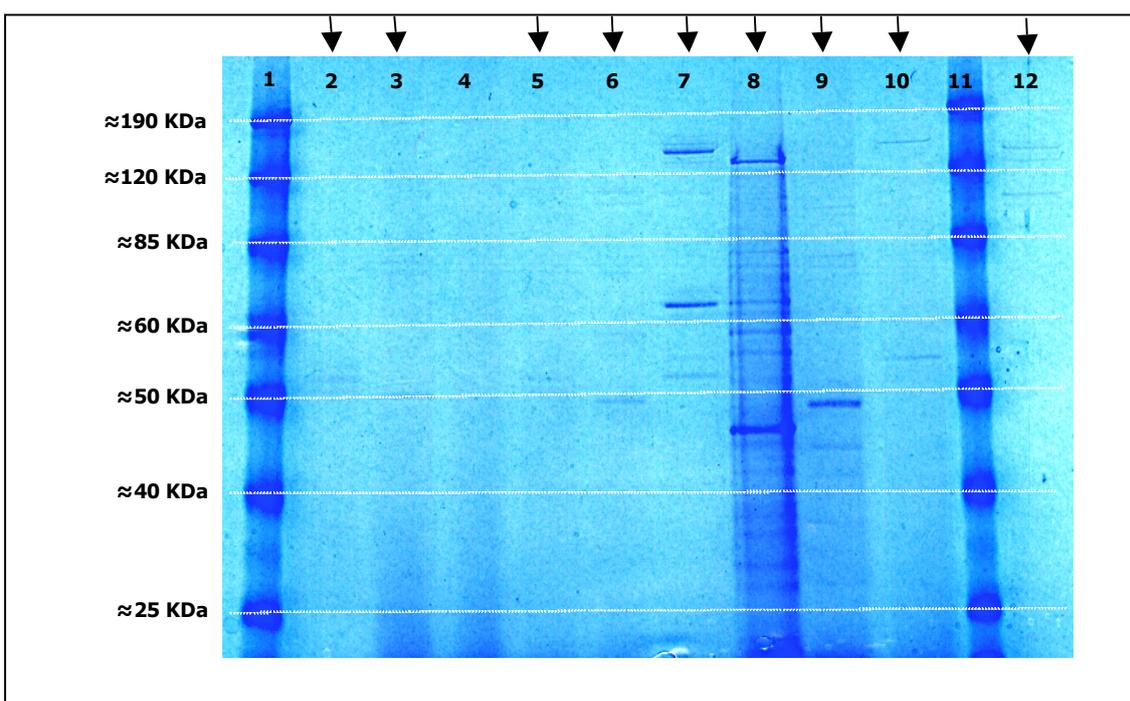
As condições inicialmente descritas para a electroforese das proteínas não foram as mais indicadas, na medida em que o gel tinha uma percentagem de acrilamida muito elevada, o que originou uma separação pouco nítida das bandas. Reduziu-se então a percentagem de acrilamida no gel de resolução para 8% e mais tarde para 7%. Considerou-se o gel de resolução com 7% de acrilamida o mais adequado para uma melhor separação.

Inicialmente, tanto os géis nativos como os desnaturantes foram realizados como descrito em material e métodos devido ao objectivo posterior de incorporar o substrato cromogénico 'Chitin Azure' no gel nativo de modo a permitir revelar a actividade da quitinase. Contudo, estes ensaios de actividade não foram conclusivos, em virtude do substrato se depositar na base do gel, ao invés de ficar homogeneamente distribuído, e das amostras se encontrarem muito diluídas, tendo sido excluída tal abordagem. Para efeitos comparativos os géis desnaturantes foram inicialmente elaborados seguindo a mesma metodologia. Posteriormente, foram substituídos por géis pré-feitos 'NuPAGE 10% Bis-Tris 1.0 mm x 12 well' (Invitrogen), de modo a obter-se uma melhor resolução dos géis, melhor definição das bandas e maior reprodutibilidade.

Na Figura 8 apresenta-se uma imagem de um gel nativo.



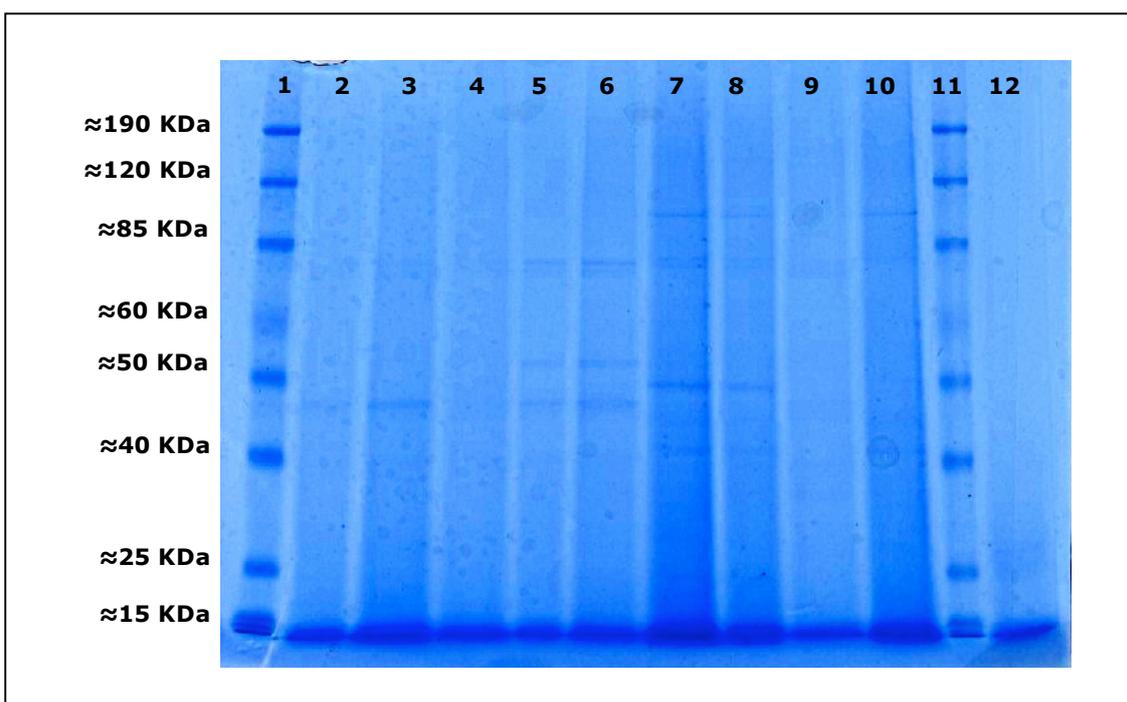
**Figura 8** Exemplo de Gel de Poliacrilamida em condições nativas com gel de concentração 4% e gel de resolução 7% para visualização de proteínas comerciais. 1 – MW; 2 - 20  $\mu$ l stirpe 6; 3 -20  $\mu$ l stirpe 7; 4 - Pullulanase; 5 –  $\alpha$ -amilase; 6 – Lactoglobulina; 7 – Lactoferrina; 8 – Xilanase; 9 – MW; 10 – Xilanase+CHAPS.



**Figura 9:** Exemplo de Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes com gel de concentração 4% e gel de resolução 7%. 1 – MW; 2 - 20  $\mu$ l stirpe 8; 3 -20  $\mu$ l stirpe 3; 4 - 20  $\mu$ l stirpe 9; 5 - 20  $\mu$ l stirpe 10; 6 - 20  $\mu$ l stirpe 4; 7 - 20  $\mu$ l stirpe 5; 8 - 20  $\mu$ l stirpe 2; 9 - 20  $\mu$ l stirpe 12; 10 - 20  $\mu$ l stirpe 6 11 – MW; 12 - 20  $\mu$ l stirpe 7 As setas representam os resultados positivos.

Na Figura 9 apresenta-se uma imagem de um gel desnaturante (em gel de concentração 4% e gel de resolução 7%) e na Figura 10 um gel desnaturante comercial, onde se visualizam várias bandas correspondentes às proteínas solúveis extracelulares de cada amostra, não se podendo identificar as que são características das quitinases, por ausência de amostras controlo, obtidas após crescimento em presença de glucose. Porém, os resultados obtidos sugerem que o conteúdo proteico das amostras difere entre si, devendo corresponder a proteínas diferentes.

Relativamente à solução de coloração dos géis após electroforese, foi ainda testado o corante Sypro por comparação ao Coomassie Brilliant Blue. O 'background' observado nos géis corados com o corante azul dificultava a identificação das bandas, daí a tentativa de utilizar um corante com maior poder de resolução. Constatou-se que o Sypro não apresentava vantagens nítidas em relação ao Coomassie Brilliant Blue (ver Anexo B).



**Figura 10:** Exemplo de Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes com gel comercial: Gel 10% Bis-Tris. 1 – MW; 2 - 10 µl estirpe 2 Quitina 1.16 µg; 3 - 20 µl estirpe 2 Quitina 2.63 µg; 4 - 20 µl estirpe 2 Quitina (LDS adicionado após congelação); 5 - 10 µl estirpe 2 Quitina + Glucose 0.9 µg; 6 - 20 µl estirpe 2 Quitina + Glucose 2.1 µg; 7 - 20 µl estirpe 1 Quitina 3.9 µg; 8 - 10 µl estirpe 1 Quitina 1.68 µg; 9 - 20 µl estirpe 1 Quitina + Glucose (LDS adicionado após congelação); 10 - 20 µl estirpe 1 Quitina (LDS adicionado após congelação); 11 – MW; 12 - 10 µl Quitinase.

No final do trabalho foi possível seleccionar 10 estirpes com resultado positivo para a produção de quitinase, permitindo assim reduzir o número de amostras seleccionadas para sequenciar.

Atendendo aos resultados descritos, deverá seguir-se uma fase de estudos de caracterização detalhada, de modo a identificar as quitinases putativas com potencial económico em processos industriais, tal como foi proposto num dos objectivos principais do presente projecto.

## **Bibliografia:**

Bhattacharya D, Nagpure A & Gupta RK (2007). Bacterial Chitinases: Properties and Potencial. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27:21-28.

Dahiya N, Tewari R & Hoondal GS (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:773-782.

Gomes, J & Steiner, W (2004). Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4):223-235.

Hobel CF, Marteinson VT, Hauksdóttir S, Gudmundur O, Hreggvidsson GO & Kristjánsson JK (2005). Investigation of the Microbial Ecology of Intertidal Hot Springs by Using Diversity Analysis of 16s rRNA and Chitinase Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5):2771-2776.

Hough, D & Danson, MJ (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 39-46.

Kruger NJ (2002). The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook, 2<sup>nd</sup> edition, Part I: 15-21. *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ.

Synnes, M (2007). Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. *Clean Technology Environmental Policy*, 9:53-59.