

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/06/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
METALOCARBOXIPEPTIDASE RECOMBINANTE**

Gabriela Cabral Fernandes

Bióloga

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
METALOCARBOXIPEPTIDASE RECOMBINANTE**

Gabriela Cabral Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Coorientadora: Dra. Mariana Rangel Pereira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2018

Fernandes, Gabriela Cabral

F363p Produção, expressão e caracterização da metalocarboxipeptidase recombinante / Gabriela Cabral Fernandes. -- Jaboticabal, 2018

vi, 69 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Roberto da Silva, Lúcia Maria Carareto Alves, Maria Helena de Souza Goldman, João Martins Pizauro Junior

Bibliografia

1. Caracterização cinética e estrutural. 2. Carboxipeptidase. 3. Metalocarboxipeptidase. 4. Mineração genômica I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:579.84



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

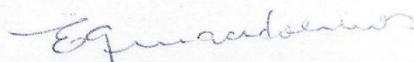


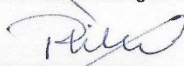
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

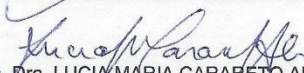
TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA METALOCARBOXIPEPTIDASE RECOMBINANTE

AUTORA: GABRIELA CABRAL FERNANDES
ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
COORIENTADOR: MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
COORIENTADORA: MARIANA RANGEL PEREIRA

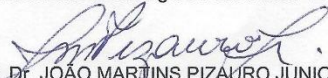
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA
Departamento de Química e Ciências Ambientais-IBILCE-UNESP / São José do Rio Preto/SP


Profa. Dra. LUCIA MÁRIA CARABETO ALVES
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV - Jaboticabal


Profa. Dra. MARIA HELENA DE SOUZA GOLDMAN
Departamento de Biologia-FFCLRP/USP / Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Cabral Fernandes – nascida em Jaboticabal, estado de São Paulo, em 14 de março de 1986. Ingressou no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado) em março de 2006 pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara – SP, obtendo o título de Bióloga em dezembro de 2009. Durante sua graduação, foi estagiária do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas, departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal, onde em 2011 esteve vinculada ao projeto temático (2008/58114-3) da FAPESP. Foi bolsista CAPES e em julho de 2014, recebeu o título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela FCAV-UNESP, onde em agosto do mesmo ano ingressou no Doutorado em Microbiologia Agropecuária. Realizou seu Doutorado Sanduiche na University of Cambridge, UK, no Department of Biochemistry, Hollfelder's group, com o financiamento do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE-CAPES), de maio a agosto de 2017.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Pai Maior e Seus Anjos protetores por toda energia, calma, paz, esperança e fé que emanaram no decorrer desses anos, pois certamente sem essa força imensa eu não teria chegado ao fim.

A minha família pela loucura, pelo estresse, pelas risadas e principalmente por ser minha base.

As minhas amoras: Daniele, Jéssica, Juliana e Suzana, por todos os momentos de descontração, risadas e desabafos. Vocês não imaginam o bem que me fazem.

Ao “Bonde da Cerveja” por toda a ajuda dentro e fora do laboratório. Como eu sempre digo: “Vocês são os presentes que a Unesp me deu”.

A minha orientadora Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos que ao longo desses anos tem me mostrado o melhor caminho a seguir. Obrigada, por não ter desistido de mim.

Aos amigos Elwi, Elis e Aliandra por me introduzirem ao “Mundo das proteínas”.

A toda a família LBMP pelo convívio e constante aprendizado.

Ao querido Dr. João Carlos Campanharo, que sempre foi um pai, amigo e excelente profissional. A ti toda minha gratidão.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária que estiveram sempre dispostos a me ajudar.

A querida amiga e co-orientadora Dra. Mariana R. Pereira, pela acolhida na Inglaterra, pelos momentos, conversas e por contribuir muito para minha formação.

Aos professores do Department of Biochemistry, da University of Cambridge - UK: Florian Hollfelder e Marko Hyvonen, pela acolhida durante meu Doutorado Sanduiche e pelos ensinamentos.

Ao Paul Brear pela paciência em me explicar acerca da Cristalografia.

Aos colegas do Hollfelder’s group pela recepção e acolhida.

Ao Programa do Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp.

A seção de Pós-graduação da FCAV-Unesp pela atenção e excelentes serviços.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E as pessoas que passaram pela minha vida contribuindo direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	iii
LISTA DE UNIDADES	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 <i>Chitinophaga</i> sp. - Generalidades e aplicações biotecnológicas	8
2.2 Mineração de genes em dados genômicos (GDM)	10
2.3 Peptidases: considerações gerais e classificação	11
2.3.1 Família M32 das metalocarboxipeptidases termofílicas.....	15
2.3.2 Inibidores de proteases	16
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Sequenciamento do genoma do isolado	18
4.1.1 Análise das Sequências e Anotação genômica	19
4.2 Mineração no genoma de <i>Chitinophaga</i> sp. para prospecção de genes de interesse	19
4.3 Análise das sequências	20
4.4 Amplificação dos genes codificadores de enzimas proteolíticas.....	20
4.4.1 Quantificação e análise do DNA	22
4.4.2 Digestão dos fragmentos amplificados	23
4.4.3 Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão	23
4.4.4 Transformação bacteriana da célula competente	24
4.4.5 Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem.....	24
4.5 Expressão e extração da proteína recombinante.....	25
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
4.7 Purificação de enzimas proteolíticas.....	26
4.7.1 Purificação por cromatografia de afinidade.....	26
4.7.2 Purificação por exclusão molecular	27
4.8 Determinação da atividade enzimática	27
4.9 Avaliação dos parâmetros cinéticos.....	28

4.10 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	28
4.11 Avaliação do efeito do pH sobre a atividade da enzima.....	29
4.12 Fluorometria de varredura diferencial	29
4.13 Ensaio de cristalização da enzima ChtCP	30
4.13.1 Coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Sequenciamento, análise das sequências e anotação genômica	31
5.2 Predição de peptidases no genoma de <i>Chitinophaga</i> sp.....	31
5.3 Identidade sequencial de aminoácidos de ChtCP com metalopeptidases termofílicas.....	32
5.4 Amplificação e clonagem do gene no vetor pHAT2	33
5.5 Ensaio de expressão e extração das proteínas recombinantes	34
5.6 Expressão e avaliação da estrutura quaternária da enzima ChtCP	36
5.7 Cinética enzimática	39
5.8 Substrato específico requerido para atividade de ChtCP	40
5.9 Avaliação do pH e temperatura requeridos pela enzima ChtCP	42
5.10 A influência dos íons metálicos e inibidores de peptidases na atividade enzimática da ChtCP	46
5.11 O efeito dos íons metálicos sob a temperatura de desnaturação enzimática	47
5.12 Estrutura geral da ChtCP e seu sítio ativo	48
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

ABREVIATURAS

CP – carboxipeptidase
MCP - metalocarboxipeptidase
CMC - carboximetilcelulose
Abs- Absorbância
DO_{600nm} – Absorbância medida a 600 nanômetros de comprimento de onda
aa- Aminoácidos
DNA- ácido desoxirribonucleico
rRNA – ácido ribonucleico ribossomal
dNTP- desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Xgal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
DMF - N,N'dimethyl-formamida
m/v – massa por volume
TEB- solução tampão Tris-ácido bórico- EDTA
Tris- tris[hidroximetil]aminometano
UV- luz ultravioleta
v/v- volume por volume
BLAST – *Basic Local Alignment Sequence Tool*
E.C. – *Enzyme Commission*
GenBank – banco de sequências de genes e proteínas do *NCBI*
Kb – mil pares de bases
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ORF – *Open Reading Frame* (Fase de leitura aberta codificadora de proteína)
pb – pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
MEROPS – Base de dados curadas para peptidases
pH – potencial hidrogeniônico log [H+]
pI – ponto isoelétrico
r.p.m. – rotações por minuto
SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
DMSO – dimetilsulfóxido
IUBMB - (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
EPS – exopolissacarídeo
Z – benziloxilcarbonil
A – aminoácido alanina
R – aminoácido arginina
W – aminoácido triptofano
N – aminoácido asparagina
E – aminoácido ácido glutâmico
D – aminoácido aspartato

LISTA DE UNIDADES

g – aceleração da gravidade

g – grama

L – litro

g-L – gramas por litro

kb – kilobase

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

U – unidades

V- volt

kDa- Quilo Daltons

h – horas

s – segundos

min – minutos

PRODUÇÃO, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA METALOCARBOXIPEPTIDASE RECOMBINANTE

RESUMO - A mineração no genoma de *Chitinophaga* sp. (8Mb), uma bactéria gram-negativa, isolada de um consórcio bacteriano degradador de biomassa, permitiu acesso ao gene Cht_4039 que possui um motivo de HEXXH característico para as carboxipeptidases (CPs) termoestáveis da família M32. O gene foi expresso em *Escherichia coli* e a enzima recombinante (ChtCP) foi purificada e caracterizada bioquimicamente em detalhes. Esta carboxipeptidase apresentou atividade máxima a 65°C, conservando 60% da atividade à 80°C. O pH ótimo foi de 7.5. Esta metaloenzima foi ativada 100% com Mn^{2+} e 150% com Co^{2+} . A estrutura cristalina da ChtCP foi determinada a uma resolução de 1,2 Å. Quando em contato com íons metálicos teve seu ponto de fusão (T_m) acrescido em até 50% mantendo sua estrutura nativa. Em resumo, este estudo mostra que a ChtCP é um membro termoestável da família M32 CP que apresenta atividade enzimática em um amplo espectro de temperatura (de 20 °C à 99 °C) e ativação na presença de íons metálicos (Co^{+2} , Cr^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ou Zn^{+2}), características importantes na aplicação industrial.

Palavras-chave: caracterização cinética e estrutural; carboxipeptidase; metalocarboxipeptidase; mineração de genoma.

PRODUCTION, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT METALOCARBOXYPEPTIDASE

ABSTRACT - Mining in the genome of *Chitinophaga* sp. (8Mb), a gram-negative bacterium, isolated from a bacterial consortium obtained from decomposable material withdrawn from the sugarcane bagasse deposit at an ethanol plant, allowed access to a predicted putative of 500 amino acids encoded by the Cht_4039 gene has a characteristic HEXXH motif for the thermostable M32 carboxypeptidases (CPs) already studied. The gene was expressed in *Escherichia coli* and the recombinant enzyme (ChtCP) was purified and characterized biochemically in detail. This carboxypeptidase showed maximum activity at 65 °C, preserving 60% of the activity at 80 °C. The optimum pH was 7.5. This metalloenzyme was activated 100% with Mn²⁺ and 150% with Co²⁺. The crystal structure of ChtCP was determined at a resolution of 1.2 Å. When in contact with metallic ions had its melting point (T_m) increased in up to 50% maintaining its native structure. In summary, this study shows that ChtCP is a thermostable member of the M32 CP family that exhibits enzymatic activity over a wide temperature range (from 20 °C to 99 °C) and activation in the presence of metal ions (Co⁺², Cr⁺², Mg⁺², Mn⁺² or Zn⁺²), important characteristics in the industrial application.

Keywords: structural and kinetic characterization; carboxypeptidase; metalocarboxypeptidase; genome mining.

1. INTRODUÇÃO

Os consórcios bacterianos são constituídos por comunidades microbianas que podem possuir um conjunto de diferentes vias metabólicas que permitem mediar a degradação das diversas moléculas fornecendo enzimas com grande utilidade em processos biotecnológicos aplicados à indústria. A importância destes consórcios se dá, em grande parte, devido à vantagens como especificidade, baixo custo, facilidade de produção em larga escala, aliadas ao aspecto de reduzir efeitos tóxicos quando comparado ao uso de xenobióticos, assim como não geram resíduos ao ambiente. Ao levarmos em consideração o potencial dos consórcios microbianos, as vantagens das enzimas microbianas em processos biotecnológicos e o fato da busca por enzimas com aplicações industriais estar centrada em um número limitado de gêneros microbianos como *Bacillus* (MARUTHIAH et al., 2013), *Pseudomonas* (MEENA et al., 2013) e *Aspergillus* (KANG et al., 2014), novas enzimas, melhoradas e / ou mais versáteis, tem sido a meta de muitos pesquisadores. Isto é facilitado com a exploração de novos genomas bacterianos isolados desses consórcios.

Assim, a fim de desenvolver processos de produção eficientes, sustentáveis e economicamente competitivos, o uso da mineração de genomas bacterianos (*microbial genome mining*) vem sendo explorado como uma abordagem que oferece uma oportunidade sem precedentes na área da biotecnologia, devido à abundância de dados de sequência pré-existentes e inexplorados acumulados, sobretudo, graças ao advento da era “NGS” (*next generation sequencing*). A mineração de genomas bacterianos, a qual é essencialmente uma metodologia de busca que utiliza como padrão sequências de enzimas da mesma família, está sendo usada na prospecção de enzimas como endoglucanases, lacases, nitrilases, redutases, xilanases (BACHMANN; VAN LANEN; BALTZ, 2014; HE et al., 2014), além de outras de grande valor industrial como as peptidases (SIERRA et al., 2017).

O genoma de *Chitinophaga* sp. CB10, uma bactéria gram-negativa, não-patogênica, filamentosa, mesófila, imóvel, não formadora de esporos (KISH et al., 2017), a qual foi isolada de um consórcio degradador de biomassa e que ainda não teve nenhuma peptidase caracterizada, mostrou em seu genoma uma promissora fonte de busca para novas enzimas.

Dentre as hidrolases, as peptidases (E.C. 3.4), são as mais importantes do ponto de vista industrial, devido a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos, reação de caráter extremamente versátil nos mais diversos processos biotecnológicos. Neste sentido, as peptidases podem ser utilizadas em diversas atividades industriais, tais como processamento de bebidas, alimentos, processamento de couro e pele, indústrias têxteis, formulação de detergentes, no amaciamento de carne e formulação de medicamentos. Os micro-organismos são a fonte mais empregada para a obtenção de proteases de uso industrial, obtidas através de processos fermentativos (RAO et al., 1998). Sendo assim, as bactérias, fungos filamentosos e leveduras são alvos crescentes de pesquisa a fim de alcançar novos genes codificadores de proteases, além de aumentar a produtividade e a estabilidade enzimática daqueles que já são admitidos como micro-organismos proteolíticos (Sierra et al., 2017). Um relatório emitido em 2017 mostra que o mercado de peptidases deverá ultrapassar US\$ 2,5 bilhões até 2022 (<https://www.businesswire.com/news/home/20170220005683/en/Global-Protease-Market-Reach-2.50-Billion-2022>).

Observando a versatilidade das proteases na indústria e a demanda pela descoberta de novas enzimas, este trabalho descreve a mineração de dados genômicos de *Chitinophaga* sp. CB10, para a prospecção e caracterização cinética e estrutural de uma enzima proteolítica.

6. CONCLUSÃO

A ChtCP apresentou atividade em um amplo espectro de temperatura que varia de 20° à 99°C. Os membros da família M32 vêm sendo estudados visando a atividade enzimática sob altas temperaturas, porém ao pensarmos em aplicação industrial essa amplitude faz com que ChtCP possa ser explorada em diferentes etapas térmicas do processo. A caracterização estrutural unida à caracterização físico-química possibilitou um delineamento racional para futuros experimentos visando à aplicação da enzima na indústria, já que constatamos que ChtCP compartilha regiões homólogas com algumas metalocarroboxipeptidases em destaque nos diferentes setores industriais.

REFERÊNCIAS

AIGLE, B.; LAUTRU, S.; SPITELLER, D.; DICKSCHAT, J. S.; CHALLIS, G. L.; LEBLOND, P.; PERNODET, J.-L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 251–263, 21 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258629>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B.; SIDDHARTHAN, N.; RANI, R. P.; SIVAKUMAR, S. Production, Purification, and Biochemical Characterization of Thermostable Metallo-Protease from Novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 Isolated from Tannery Waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 8, p. 1666–1686, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1974-7>>.

ARNDT, J. W.; HAO, B.; RAMAKRISHNAN, V.; CHENG, T.; CHAN, S. I.; CHAN, M. K. Crystal structure of a novel carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Structure (London, England : 1993)**, v. 10, n. 2, p. 215–24, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839307>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

ASHKENAZY, H.; EREZ, E.; MARTZ, E.; PUPKO, T.; BEN-TAL, N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server, p. W529–W533, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478830>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 8 fev. 2008. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

BACHMANN, B. O.; VAN LANEN, S. G.; BALTZ, R. H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 175–184, 17 fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10295-013-1389-9>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

BAIRD, I. R.; MOSI, R.; OLSEN, M.; CAMERON, B. R.; FRICKER, S. P.; SKERLJ, R. T. “3 + 1” mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 9, p. 2736–2750, 1 jun. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169305005815>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 455–77, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506599>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 727–33, 5 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517925>>. Acesso em: 26 mar. 2018.
BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2004.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.-M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C.-H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M.-A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141–147, 9 maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000953>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

BLUNDELL, T. L. Metalloproteinase superfamilies and drug design. **Nature structural biology**, v. 1, n. 2, p. 73–5, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656018>>. Acesso em: 26 mar. 2018.
CHALLIS, G. L. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 219–232, 10 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322202>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

CHENG, T. C.; RAMAKRISHNAN, V.; CHAN, S. I. Purification and characterization of a cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Protein Science**, v. 8, n. 11, p. 2474–2486, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.8.11.2474>>.

COLOMBO, S.; D'AURIA, S.; FUSI, P.; ZECCA, L.; RAIÀ, C. A.; TORTORA, P. Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase from the extreme thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 2, p. 349–357, 1992.

DE OLIVEIRA, T. B.; GOSTINČAR, C.; GUNDE-CIMERMAN, N.; RODRIGUES, A. Genome mining for peptidases in heat-tolerant and mesophilic fungi and

putative adaptations for thermostability. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 152, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29463214>>. Acesso em: 18 set. 2018.

DEL RIO, T. G.; ABT, B.; SPRING, S.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; TICE, H.; COPELAND, A.; CHENG, J. F.; CHEN, F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y. J.; JEFFRIES, C. D.; CHAIN, P.; SAUNDERS, E.; DETTER, J. C.; BRETTIN, T.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; EISEN, J. A.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P.; LUCAS, S. Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034 T). **Standards in Genomic Sciences**, v. 2, n. 1, p. 87–95, 2010.

DOI, E.; SHIBATA, D.; MATOBA, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. **Analytical biochemistry**, v. 118, n. 1, p. 173–84, 15 nov. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7039409>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. *Coot*: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 12, p. 2126–2132, 1 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572765>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

GORMAN, M. J.; ANDREEVA, O. V.; PASKEWITZ, S. M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 1, p. 35–46, jan. 2000a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646969>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

GORMAN, M. J.; ANDREEVA, O. V.; PASKEWITZ, S. M. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. **Gene**, v. 251, n. 1, p. 9–17, 13 jun. 2000b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863091>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

HAN, S. I.; LEE, H. J.; WHANG, K. S. *Chitinophaga polysaccharea* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from the rhizoplane of *Dioscorea japonica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 1, p. 55–59, 2014.

IKEDA, H.; SHIN-YA, K.; OMURA, S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 233–250, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990133>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

ISAZA, C. E.; ZHONG, X.; ROSAS, L. E.; WHITE, J. D.; CHEN, R. P.-Y.; LIANG, G. F.-C.; CHAN, S. I.; SATOSKAR, A. R.; CHAN, M. K. A proposed role for *Leishmania major* carboxypeptidase in peptide catabolism. **Biochemical and**

Biophysical Research Communications, v. 373, n. 1, p. 25–29, 15 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539138>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

KABSCH, W. XDS. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 125–32, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124692>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

KÄMPFER, P.; YOUNG, C. C.; SRIDHAR, K. R.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D. Transfer of [Flexibacter] sancti, [Flexibacter] filiformis, [Flexibacter] japonensis and [Cytophaga] arvensicola to the genus Chitinophaga and description of Chitinophaga skermanii sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2223–2228, 2006.

KAMPHUIS, I. G.; KALK, K. H.; SWARTE, M. B. A.; DRENTH, J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 179, n. 2, p. 233–256, 1984. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/0022283684904674/1-s2.0-0022283684904674-main.pdf?_tid=1726d217-6c7f-4604-a073-97dcfdcb48d5&acdnat=1522089786_792e3ead895b152fc4bdc84197bfe60f>. Acesso em: 26 mar. 2018.

KISHI, L. T.; LOPES, E. M.; FERNANDES, C. C.; FERNANDES, G. C.; SACCO, L. P.; CARARETO ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Draft Genome Sequence of a Chitinophaga Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. **Genome Announcements**, v. 5, n. 3, p. e01056-16, 19 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104646>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1–3, p. 209–216, maio 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128003000861>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/227680a0>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

LARSBRINK, J.; TUVENG, T. R.; POPE, P. B.; BULONE, V.; EIJSINK, V. G. H.; BRUMER, H.; MCKEE, L. S. Proteomic insights into mannan degradation and protein secretion by the forest floor bacterium Chitinophaga pinensis. **Journal of Proteomics**, v. 156, p. 63–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.003>>.

LEE, H. S.; KIM, Y. J.; BAE, S. S.; JEON, J. H.; LIM, J. K.; KANG, S. G.; LEE, J.-H. Overexpression and Characterization of a Carboxypeptidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus* sp. NA1. **Bioscience**,

Biotechnology, and Biochemistry, v. 70, n. 5, p. 1140–1147, 23 maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16717414>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

LEE, M. M.; ISAZA, C. E.; WHITE, J. D.; CHEN, R. P. Y.; LIANG, G. F. C.; HE, H. T. F.; CHAN, S. I.; CHAN, M. K. Insight into the substrate length restriction of M32 carboxypeptidases: Characterization of two distinct subfamilies. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 647–657, 2009.

LEE, S. H.; TAGUCHI, H.; YOSHIMURA, E.; MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; OHTA, T.; MATSUZAWA, H. Carboxypeptidase taq, a thermostable zinc enzyme, from thermus aquaticus yt-1: Molecular cloning, sequencing, and expression of the encoding gene in escherichia coli. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1490–1495, 1994.

LEE, Y.-J.; JEONG, H.; PARK, G.-S.; KWAK, Y.; LEE, S.-J.; LEE, S. J.; PARK, M.-K.; KIM, J.-Y.; KANG, H. K.; SHIN, J.-H.; LEE, D.-W. Genome sequence of a native-feather degrading extremely thermophilic Eubacterium, *Fervidobacterium islandicum* AW-1. **Standards in genomic sciences**, v. 10, p. 71, 2015a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26421103>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

LEE, Y. J.; DHANASINGH, I.; AHN, J. S.; JIN, H. S.; CHOI, J. M.; LEE, S. H.; LEE, D. W. Biochemical and structural characterization of a keratin-degrading M32 carboxypeptidase from *Fervidobacterium islandicum* AW-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 4, p. 927–933, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.058>>.

MARION, A.; GROLL, M.; SCHARF, D. H.; SCHERLACH, K.; GLASER, M.; SIEVERS, H.; SCHUSTER, M.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A.; ANTES, I.; HUBER, E. M. Gliotoxin Biosynthesis: Structure, Mechanism, and Metal Promiscuity of Carboxypeptidase GliJ. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 1874–1882, 21 jul. 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.6b00847>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210–9217, 14 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19746980>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

MITCHELL, A.; CHANG, H.-Y.; DAUGHERTY, L.; FRASER, M.; HUNTER, S.; LOPEZ, R.; MCANULLA, C.; MCMENAMIN, C.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; RATO, C.; YONG, S.-Y.; BATEMAN, A.; PUNTA, M.; ATTWOOD, T. K.; SIGRIST, C. J. A.; REDASCHI, N.; RIVOIRE, C.; XENARIOS, I.; KAHN, D.; GUYOT, D.; BORK, P.; LETUNIC, I.; GOUGH, J.; OATES, M.; HAFT, D.; HUANG, H.; NATALE, D. A.; WU, C. H.;

ORENGO, C.; SILLITOE, I.; MI, H.; THOMAS, P. D.; FINN, R. D. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D213–D221, 28 jan. 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D213/2439465/The-InterPro-protein-families-database-the>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

MURSHUDOV, G. N.; SKUBÁK, P.; LEBEDEV, A. A.; PANNU, N. S.; STEINER, R. A.; NICHOLLS, R. A.; WINN, M. D.; LONG, F.; VAGIN, A. A.; IUCR. *REFMAC 5* for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 355–367, 1 abr. 2011. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444911001314>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

NATESH, R.; SCHWAGER, S. L. U.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. **Nature**, v. 421, n. 6922, p. 551–554, 30 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540854>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

NAWRATH, T.; GERTH, K.; MÜLLER, R.; SCHULZ, S. The biosynthesis of the aroma volatile 2-methyltetrahydrothiophen-3-one in the bacterium *Chitinophaga Fx7914*. **ChemBioChem**, v. 11, n. 13, p. 1914–1919, 2010.

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B. S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 11, p. 1362, 21 out. 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b817069j>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

NIEMIROWICZ, G.; FERNÁNDEZ, D.; SOLÀ, M.; CAZZULO, J. J.; AVILÉS, F. X.; GOMIS-RÜTH, F. X. The molecular analysis of *Trypanosoma cruzi* metallo-carboxypeptidase 1 provides insight into fold and substrate specificity. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 853–866, out. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2008.06444.x>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

NIEMIROWICZ, G.; PARUSSINI, F.; AGÜERO, F.; CAZZULO, J. J. Two metallo-carboxypeptidases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. **The Biochemical journal**, v. 401, n. 2, p. 399–410, 15 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007610>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 1 set. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853878>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

NOTARIS, D. Phylogenetic position of. **Small**, v. 197, n. 1 999, p. 185–197, 2003. OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic acids**

research, v. 42, n. Database issue, p. D206-14, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293654>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7–8, p. 1220–1236, 9 abr. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-7565-9>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

PERÄNEN, J.; RIKKONEN, M.; HYVÖNEN, M.; KÄÄRIÄINEN, L. T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in Escherichia coli. **Analytical biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 371–3, 1 maio 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660525>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmeth.1701>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/pdf/mr000597.pdf>>.

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. **Handbook of proteolytic enzymes**. [s.l.] Academic, 2012.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D503–D509, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964991/pdf/gkt953.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

RAY, K.; HINES, C. S.; COLL-RODRIGUEZ, J.; RODGERS, D. W. Crystal Structure of Human Thimet Oligopeptidase Provides Insight into Substrate Recognition, Regulation, and Localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20480–20489, 7 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998993>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

ROMERO, F. J.; GARCÍA, L. A.; SALAS, J. A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507–515, 1 jan. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959200002211>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

SANGKHOBOL, V.; SKERMAN, V. B. D. Chitinophaga, a New Genus of Chitinolytic Myxobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 31, n. 3, p. 285–293, 1981. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-31->

3-285>.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 1 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597658>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

SIERRA, E. M.; PEREIRA, M. R.; MAESTER, T. C.; GOMES-PEPE, E. S.; MENDOZA, E. R.; LEMOS, E. G. D. M. Halotolerant aminopeptidase M29 from *Mesorhizobium SEMIA 3007* with biotechnological potential and its impact on biofilm synthesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

TAYYAB, M.; RASHID, N.; ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S.; AKHTAR, M. Highly active metallocooxypeptidase from newly isolated *Geobacillus* strain SBS-4S: Cloning and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 259–265, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126910>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–80, 11 nov. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

TOWLER, P.; STAKER, B.; PRASAD, S. G.; MENON, S.; TANG, J.; PARSONS, T.; RYAN, D.; FISHER, M.; WILLIAMS, D.; DALES, N. A.; PATANE, M. A.; PANTOLIANO, M. W. ACE2 X-Ray Structures Reveal a Large Hinge-bending Motion Important for Inhibitor Binding and Catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17996–18007, 23 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754895>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

UMBREIT, J. N.; STROMINGER, J. L. D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membranes. I. Purification and characterization. **The Journal of biological chemistry**, v. 248, n. 19, p. 6759–66, 10 out. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4200864>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

WILSON, I.; VOGEL, J.; SOMERVILLE, S. Signalling pathways: a common theme in plants and animals? **Current biology : CB**, v. 7, n. 3, p. R175-8, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162483>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

WINN, M. D.; BALLARD, C. C.; COWTAN, K. D.; DODSON, E. J.; EMSLEY, P.; EVANS, P. R.; KEEGAN, R. M.; KRISINEL, E. B.; LESLIE, A. G. W.; MCCOY, A.; MCNICHOLAS, S. J.; MURSHUDOV, G. N.; PANNU, N. S.; POTTERTON, E. A.; POWELL, H. R.; READ, R. J.; VAGIN, A.; WILSON, K. S. Overview of the CCP 4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 1 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460441>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

YASIR, M.; CHUNG, E. J.; SONG, G. C.; BIBI, F.; JEON, C. O.; CHUNG, Y. R. *Chitinophaga eiseniae* sp. nov., isolated from vermicompost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2373–2378, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.023028-0>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the Discovery of New Natural Products by Genome Mining. **ChemBioChem**, v. 10, n. 4, p. 625–633, 2 mar. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200800389>>. Acesso em: 18 abr. 2018.