

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO
CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES COSTEIROS DO CABO BRANCO -
PARAÍBA**

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

JOÃO PESSOA - 2017

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO
CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES COSTEIROS DO CABO BRANCO -
PARAÍBA**

Trabalho Acadêmico de Conclusão de
Curso apresentado junto ao Curso de
Ciências Biológicas como pré-requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Krystyna Gorlach-Lira

Co-orientadora:

Prof.^a Dra. Gláucia Verissimo Faheina Martins

BRUNO OLIVEIRA DE VERAS

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO
CORAL *Siderastrea stellata* DOS RECIFES COSTEIROS DO CABO BRANCO -
PARAÍBA.**

Data: **02 de Junho de 2017.**

Resultado: **Aprovado.**

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Krystyna Goralch-Lira
(Presidente) Departamento de Biologia Molecular / CCEN / UFPB – Campus I



Prof.^a Dra. Marcia Rosa de Oliveira
(Membro Interno) Departamento de Biologia Molecular / CCEN / UFPB – Campus I



Me. Yago Queiroz dos Santos
(Membro Externo) Departamento de Bioquímica / CB / UFRN

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

V476p

Veras, Bruno Oliveira de

Produção de L-Asparaginase por bactérias cultiváveis do coral
Siderastrea stellata dos recifes costeiros do Cabo Branco-Paraíba /
Bruno Oliveira de Veras. – João Pessoa, 2017.

85 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador(a): Profª. Drª. Krystyna Gorlach-Lira.

Co-orientador(a): Profª Drª. Gláucia Verissimo Faheina Martins.

1. Bactérias. 2. L-Asparaginase. 3. *AnsZ*. 4. Coral *Siderastrea
Stellata*. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 561.23(043.2)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a força durante essa longa jornada.

Aos meus pais Helbia e Benedito pelo incentivo e apoio em momentos difíceis.

A minha grande amiga e companheira Daianne Medeiros, pelo carinho, apoio e incentivo à vida acadêmica e pelos momentos de felicidade que passamos juntos.

A minha Orientadora, Prof.^a Krystyna Gorlach-Lira pelos seus ensinamentos proporcionados e confiança em meu trabalho, sempre com paciência e sorriso no rosto mesmo nas “puxadas de orelha e broncas”.

A minha Co-orientadora, Prof.^a Gláucia Verissimo pelos seus ensinamentos, sugestões e incentivo em momentos difíceis.

Aos professores Carlos Alberto Gadelha, Creusione dos Santos, Rômulo Marino pelos ensinamentos passados durante meus estágios.

Ao professor Sávio Torres de Farias, que sempre se mostrou solícito a sanar dúvidas e o pouco de conhecimento repassado.

Aos meus colegas do BIOMICRO (Yago, Daianne, Gilmara, Roberta, Giuseppe Fernandes, Giuseppe Gianini, Antônia, Iasmin, Rafaela e Adriano) pelas boas risadas.

A Priscila Anne pela atenção, carinho e auxílio durante toda minha formação.

Os técnicos de laboratório Lindolfo, Alda, Bosco, Moreira em especial Teresa Cristina pelos grandes ensinamentos repassados durante minha jornada.

A secretária do DBM Regina Emy, pela atenção e presteza.

A todos que me auxiliaram direta ou indiretamente na minha formação profissional, bem como na execução deste trabalho.

Ao CNPQ pelo financiamento nos projetos de iniciação científica que eu participei.

Obrigado!

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento. São os que sabem pouco e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”

Charles Darwin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise catalisada pela L-asparaginase.....	17
Figura 2. Estruturas tridimensionais de L-asparaginase Tipo I e II de <i>E. coli</i>	18
Figura 3. Cladograma de distribuição de bactérias produtoras de L-asparaginases, onde os ramos azuis e alaranjas correspondem a asparaginase tipo II e I, respectivamente.....	21
Figura 4. Mecanismo geral do efeito da atividade de L-asparaginase sobre células tumorais...	24
Figura 5. Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas.....	26
Figura 6. Detecção da atividade de L-asparaginase em meio Czapek Dox com L-asparagina e os indicadores vermelho fenol (A e B) ou azul de bromotimol (C e D)	37
Figura 7. Atividade total de L-asparaginase de bactérias isoladas do coral <i>S. stellata</i> , cultivadas em meio Czapek Dox com L-asparagina ou extrato de levedura.....	43
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação do gene RNAr 16S dos isolados de bactérias produtores de L-asparaginase.....	44
Figura 9. Árvore filogenética dos isolados SR41, SR60, SR21 e SS23 e de bactérias do GenBank, com base na comparação das sequências de RNAr 16S, utilizando análise Neighbourjoining e o modelo Kimura 2.....	45
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação do gene de L-asparaginase utilizando os primers AsnZ1.....	49
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação do gene de L-asparaginase utilizando os primers AsnZ2.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas, químicas e biológicas de L-asparaginases produzidas por microrganismos.....	22
Tabela 2. Isolados de bactérias provenientes do coral <i>S. stellata</i> , agrupados de acordo com as características morfofisiológicas analisadas.....	29
Tabela 3. Detecção da atividade de L-asparaginase por bactérias isoladas do coral <i>S. stellata</i> no meio Czapek Dox com L-asparagina e os indicadores vermelho fenol ou azul de bromotimol.....	38
Tabela 4. Atividade total e específica de L-asparaginase, biomassa, proteínas totais e pH inicial e final do cultivo das bactérias em meio Czapek Dox com L-asparagina.....	41
Tabela 5. Atividade total e específica de L-asparaginase, biomassa, proteínas totais e pH inicial e final do cultivo das bactérias em meio Czapek Dox com extrato de levedura.....	42
Tabela 6. Comparações das sequências parciais do gene RNAr 16S utilizando o programa Blastn (refseq_rna) de bactérias.....	45
Tabela 7. Sequências e características relevantes dos pares de primers desenhados para detecção do gene de L-asparaginase.....	47
Tabela 8. Detecção do gene de L-asparaginase nos isolados bacterianos, por técnica de PCR utilizando os primers AsnZ1 e AsnZ2.....	47
Tabela 9. Comparações das sequências parciais do gene de L-asparaginase de isolados de bactérias utilizando a plataforma Blastx.....	49
Tabela 10. Comparações das sequências parciais do gene de L-asparaginase de isolados de bactérias utilizando a plataforma Uniprot.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

A – Adenina

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

BLASTx – Basic Local Alignment Search Tool Protein

pb – Pares de Bases

C – Citosina

CaCl₂ • 2H₂O – Cloreto de Cálcio Dihidratado

CG% – Porcentagem de Citosina + Guanina

cm – Centímetros

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP– Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DO – Densidade Óptica

g – Grama

G – Guanina

G- – Gram negativas

G+ – Gram Positivas

HgCl₂ – Cloreto de Mercúrio

IU – Unidade de Atividade Enzimática

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio Monobásico

Km² – Quilômetros Quadrados

M – Molar

mg - Miligrama

MgSO₄ • 7H₂O – Sulfato de Magnésio Heptahidratado

min – Minutos

mL – Mililitro

Mm – Milimolar

Na₂HPO₄ – Fosfato de Sódio Dibásico

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

O₂ – Oxigênio

Ø – Diâmetro

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAr 16S – Ácido Ribonucleico Ribossômico 16S

rpm – Rotações Por Minuto

spp. – Várias Espécies do Gênero

T – Timina

TAE – Tris-Acetato-EDTA

Taq polimerase – DNA polimerase isolada de *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TCA – Ácido Tricloroacético

TE – Tris- EDTA

Tris-HCl – (Hidroximetil) Aminometano Hidroclorídico

U – Unidades

UV – Ultravioleta

V – Volts

µL – Microlitros

RESUMO

Uma grande variedade de substâncias tais como vitaminas, antibióticos e enzimas são produzidas por bactérias, dentre as inúmeras moléculas produzidas encontramos a enzima L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1), a qual hidrolisa o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. A L-asparaginase apresenta dois tipos estruturais (Tipo I e II), sendo que o tipo II apresenta um enorme atrativo na produção de biofármacos, devido ao amplo espectro da atividade antitumoral. A procura por novos microrganismos produtores de L-asparaginase é muito importante, uma vez que novas enzimas com diferentes características bioquímicas possam ser encontradas. Objetivou-se com o presente estudo analisar a produção de L-asparaginases por bactérias isoladas do coral *Siderastrea stellata* dos recifes de Cabo Branco, Paraíba, bem como caracterizar utilizando ferramentas moleculares, os isolados ativos na produção desta enzima. Na análise qualitativa em meio Czapek Dox com L-asparagina e vermelho fenol ou azul de bromotimol, foi evidenciado que 16 dos 69 isolados de bactérias avaliados, exibiram produção de L-asparaginase. A análise quantitativa de atividade de L-asparaginase, revelou que o meio Czapek Dox com adição de 1% L-asparagina proporcionou uma maior atividade desta enzima, comparado com o meio contendo 1% de extrato de levedura. A atividade total dos 16 isolados cultivados no meio Czapek Dox com L-asparagina variou de 113,5 a 425,1 IU/mL e a atividade específica de 151,9 a 759,3 IU/mg de biomassa. A atividade total dos 16 isolados cultivados no meio Czapek Dox com extrato de levedura variou de 5,2 a 109,8 IU/mL, e a atividade específica de 8,5 a 569,3 IU/mg de biomassa. A análise das sequências parciais do gene RNAr 16S revelou similaridade igual ou superior a 99% para três isolados do gênero *Bacillus* e para um isolado do gênero *Staphylococcus*. Para detecção do gene de L-asparaginase tipo II (*AnsZ*), foram construídos dois pares de primers, *AsnZ1* e *AsnZ2* com base no alinhamento das sequências deste gene em *Bacillus subtilis* (GenBank NC_000964.3). Ambos os primers mostraram eficácia na detecção do gene de L-asparaginase, o qual foi detectado em 11 dos 16 isolados de bactérias analisados. As sequências do gene de L-asparaginase amplificadas com os primers *AsnZ1* foram analisadas em quatro isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, utilizando as plataformas BLASTx e Uniprot, apresentando similaridade para L-asparaginase tipo II. Os dados obtidos apontam que o tecido do coral *S. stellata* demonstra ser uma fonte rica de bactérias produtoras de L-asparaginase e que alguns isolados apresentam um potencial para ser explorado para fins biotecnológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, L-Asparaginase, *AnsZ*.

ABSTRACT

A wide variety of substances such as vitamins, antibiotics and enzymes are produced by bacteria, among many molecules produced by an L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1), which hydrolyzes the amino acid L-asparagine in aspartic acid and ammonia. L-asparaginase has two structural types (Type I and II), and Type II has an important role on the in the production of biopharmaceuticals due to the broad spectrum of antitumoral activity. The search for new L-asparaginase producing microorganisms is very important, since new enzymes with different biochemical and physiological characteristics have been found. The present study aimed to analyze the production of L-asparaginases by bacteria isolated from the scleractinian coral *Siderastrea stellata* from Cabo Branco, Paraíba reefs, as well as to characterize the use of molecular tools, the active isolates in the production of the enzyme. In the qualitative analysis in Czapek Dox medium with L-asparagine and red phenol or bromothymol blue, it was evidenced that 16 of the 69 isolates of bacteria evaluated showed production of L-asparaginase. Quantitative analysis of L-asparaginase activity revealed that Czapek Dox medium with addition of 1% L-asparagine provided a higher activity of this enzyme compared to the medium containing 1% yeast extract. The total activity of the 16 isolates cultured in Czapek Dox medium with L-asparagine ranged from 113.5 to 425.1 IU / mL and the specific activity of 151.9 to 759.3 IU / mg of biomass. The total activity of the 16 isolates cultivated in Czapek Dox medium with yeast extract ranged from 5.2 to 109.8 IU / mL and the specific activity of 8.5 to 569.3 IU / mg of biomass. Analysis of the partial sequences of the 16S rRNA gene revealed similarity of 99% or higher for three isolates of the genus *Bacillus* and for one isolate of the genus *Staphylococcus*. For detection of the L-asparaginase type II gene (*AsnZ*), two primer pairs, *AsnZ1* and *AsnZ2*, were constructed based on the alignment of the sequences of this gene in *Bacillus subtilis* (GenBank NC_000964.3). Both primers showed efficacy in the detection of the L-asparaginase gene, being detected in eleven of the isolates of bacteria analyzed. The L-asparaginase gene sequences amplified with the *AsnZ1* primers were analyzed in four isolates, using as platforms BLASTx and Uniprot showed similarity to L-asparaginase type II. The data obtained indicate that *S. stellata* coral tissue is a rich source of L-asparaginase-producing bacteria and that some isolates have a potency to be exploited for biotechnological purposes.

KEYWORDS: Bacteria, L-asparaginase, *AsnZ*.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Recifes de Corais e Microbiota Associada.....	14
1.2. Enzimas Microbianas.....	16
1.3. A Enzima L-asparaginase.....	17
1.3.1. Estrutura e Função.....	17
1.3.2. Produção por Microrganismos.....	20
1.3.3. Aplicações na Indústria Farmacêutica.....	22
1.3.4. Aplicações na Indústria Alimentar.....	24
1.4. Identificação de Microrganismos	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Isolados de Bactérias do Tecido do Coral <i>S. stellata</i>	29
3.2. Detecção da Atividade de L-asparaginase das Bactérias.....	30
3.3. Análise Quantitativa da Atividade de L-asparaginase.....	30
3.3.1. Cultivo das Bactérias.....	31
3.3.2. Quantificação da Atividade de L-asparaginase.....	31
3.3.3. Quantificação de Proteínas Totais.....	32
3.3.4. Quantificação da Biomassa de Bactérias.....	32
3.4. Caracterização Molecular dos Isolados de Bactérias.....	32
3.4.1. Extração do DNA Genômico das Bactérias.....	32
3.4.2. Quantificação do DNA Genômico.....	33
3.4.3. Amplificação do Gene RNAr 16S.....	33
3.4.4. Desenho dos Primers Para Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ).....	34
3.4.5. Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ).....	34
3.4.6. Eletroforese em Gel de Agarose dos Produtos de PCR.....	34
3.4.7. Purificação e Sequenciamento dos Produtos de RNAr 16S e AsnZ.....	35
3.4.8. Análises das Sequências.....	35
3.4.9. Análise Estatística.....	36

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1.	Produção de L-asparaginase por Bactérias.....	37
4.2.	Avaliação da Atividade de L-asparaginase por Bactérias.....	40
4.3.	Caracterização Molecular e Análise Filogenética do Gene RNAr16S.....	44
4.4.	Construção dos Primers e Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ).....	46
5.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICES.....	69
	ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Recifes de Corais e Microbiota Associada

Compreendendo mais de 90% da biosfera, o ecossistema marinho é considerado o maior do planeta, apresentando inúmeras características físico-químicas e biológicas variáveis como pressão, radiação, temperatura, pH, concentração de oxigênio e nutrientes, nos diversos ambientes do ecossistema, variações estas que permitiram o desenvolvimento e adaptação de uma enorme diversidade de organismos (MUNN, 2004; BAHARUM; BENG; MOKHTAR, 2010).

Os recifes de corais são construções biogênicas de significativo valor geológico e biológico, formados por sedimentos e restos de seres marinhos que vivem fixos no fundo do mar ou através da deposição de carbonato de cálcio derivado de algas coralíneas, bem como estruturas orgânicas provenientes de outros invertebrados que se encontram presentes nas profundezas do mar (CASTRO, 1997; LIMA, 2002; CORREIA; SOVIERZOSKI, 2005).

Os corais estão distribuídos entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, sendo privilégio dos mares tropicais, encontrados em poucos países do mundo, dentre eles o Brasil, sendo o único país do Atlântico Sul Ocidental a contemplar esse ecossistema (CASTRO, 1997; CORREIA; SOVIERZOSKI, 2005; SILVA, 2007; MELO et al., 2014). No Brasil, os recifes de corais encontram-se distribuídos de maneira descontínua, em faixas estreitas localizadas nas regiões próximas à costa, sendo registrado desde o estado do Maranhão (cerca de 0°53' S, 44°16' W) até os recifes de Viçosa na área de Abrolhos (cerca de 18°01' S, 39°17' W), tendo uma ocupação de cerca de 12.000 Km² (MMA, 2006; CASTRO, 2010; MELO et al., 2014).

Nunes et al. (2011) verificaram que 23 espécies formadoras de corais estão presentes no ambiente recifal brasileiro, dentre elas: *Mussismilia braziliensis* (Verrill, 1868); *Mussismilia hispida* (Verrill, 1868), *Mussismilia hartti* (Verrill, 1868); *Favia leptophylla* (Verrill, 1868), *Favia gravida* (Verrill, 1868) e *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868). A espécie *S. stellata* é considerada como a única espécie do gênero *Siderastrea* encontrada no país, sendo endêmica dos recifes costeiros do Brasil (FERREIRA et al., 2004; NEVES et al., 2010; COSTA et al., 2011).

Devido a imensa zona de distribuição e diversidade dos corais no Brasil, diversos estudos são realizados com o objetivo de analisar a capacidade que estes possuem de se associarem a diversos microrganismos que são as entidades bióticas mais numerosas e diversas, capazes de colonizar múltiplos ambientes com sucesso. Dentre os microrganismos associados

aos corais, são encontrados eucariontes heterotróficos (fungos) e fotoautotróficos (clorofíceas e diatomáceas), procariontes (archeas e bactérias) e vírus (ROHWER et al., 2002; SANTANA, 2011).

Uma alta taxa de diversidade taxonômica de bactérias encontrada em associação com os recifes de corais foi descrita, dentre elas diferentes gêneros como: *Vibrio*, *Arcobacter*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Pseudoalteromonas* (ROHWER et al., 2001; MOUCHKA; HEWSON; HARVELL, 2010). Lins-de-Barros et al. (2010) e Castro et al. (2010) estudando o cnidário *S. stellata* nos recifes de corais brasileiros, verificaram a presença de vários gêneros de bactérias associadas ao coral, no entanto, ainda é desconhecido o papel real destes microrganismos nos corais.

A elevada diversidade de microrganismos associados aos corais contribuiu para a evolução dos vários mecanismos de defesa e/ou ataque contra agentes químicos e/ou biológicos. Supõe-se que as associações bactérias-corais podem aumentar a sobrevivência dos corais devido as importantes funções que as bactérias excedem, como o fornecimento de alimentos, e a sua atuação como probióticos no coral que promove o crescimento de bactérias benéficas com atividade antimicrobiana que impedem a infecção de agentes patogênicos no coral (RESHEF, 2006).

Estima-se que apenas uma pequena fração da biodiversidade dos microrganismos dos recifes de corais é conhecida, e desta uma porcentagem ainda menor foi testada para detecção de compostos ativos. Desta forma, os microrganismos derivados de ambientes marinhos constituem uma fonte muito importante de recursos genéticos para aplicações em biotecnologia, por pertencerem a ambientes ainda pouco explorados, podendo representar a descoberta de novas drogas ou novos compostos de interesse (ADEY, 2000).

A compreensão da ocupação e participação dos microrganismos e seus genes em diversos ambientes é um dos grandes desafios para a ciência, tendo em vista que, apenas uma pequena fração dos microrganismos pode ser cultivado em laboratório com as tecnologias disponíveis, motivado pelas complexas relações dos microrganismos com ambiente que habitam ou coabitam, bem como a influência de diversos fatores, como: disponibilidade de certos nutrientes inorgânicos e/ou orgânicos; excesso de compostos inibitórios; combinações incorretas de temperatura, pressão ou pH (SIMU; HAGSTRÖM, 2004; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Apesar de apenas uma pequena porcentagem dos microrganismos poderem ser cultivados em laboratórios, as técnicas tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos são de grande importância, pois possibilitam analisar as diversas espécies microbianas que

compõem um ambiente, a fim de se obter compostos bioativos que possam ser utilizados em diversas áreas do conhecimento (TORSVIK et al., 1990; SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

1.2. Enzimas Microbianas

Os microrganismos sem dúvida são uma inestimável fonte de recursos, pois possuem a capacidade de produzirem uma infinidade de compostos. Em meio das variadas moléculas produzidas pelos microrganismos encontramos as enzimas, que são proteínas biocatalisadoras (exceto as ribozimas) de um enorme repertório de reações, sendo essenciais para a quebra de moléculas relacionadas com o crescimento e manutenção de vida dos organismos (HOLLIDAY et al., 2009).

As enzimas há muito tempo vêm sendo utilizadas pelas ações humanas com diversas aplicações, desde o simples preparo de queijos à produção de biofármacos, provenientes de inúmeras fontes, dentre elas os microrganismos, sendo estes um dos grandes alvos da biotecnologia. As enzimas apresentam uma característica de grande valia, pois catalisam transformações sem a ocorrência de reações ou produtos em paralelo como é comum na utilização com catalisadores químicos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A utilização dos microrganismos como fungos e bactérias na produção em larga escala de enzimas, apresentam inúmeras vantagens se comparado com outros sistemas biológicos, pois estes possuem algumas peculiaridades que lhes dão destaque, como: a utilização de materiais residuais industriais como fonte de nutrientes e crescimento; alto rendimento a partir na manipulação gênica e otimização de cultivo (HAIKI; RAKSHIT, 2003; BRANDÃO; CASTRO, 2004; ORLANDELLI et al., 2012).

Diversas implicações podem ocorrer na produção de enzimas por microrganismos, dentre elas: a concentração e tipos de substratos que induzem ou inibem a síntese e atividade enzimática; tamanho do inóculo microbiano; tempo de incubação; pH do meio o qual pode afetar suas estruturas e funções devido aos seus grupos ionizáveis; temperatura, já que nem sempre a temperatura ótima da atividade enzimática coincide com temperatura ótima de crescimento dos microrganismos (SAID; PIETRO, 2002).

Algumas desvantagens podem limitar a utilização das enzimas, como o alto custo de isolamento e purificação; instabilidade de sua estrutura após o isolamento e purificação do meio natural, podendo apresentar modificações mediante sua aplicação; sensibilidade às condições reacionais (enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional);

a possibilidade de desnaturação por solventes orgânicos e/ou por temperaturas relativamente elevadas (FABER, 2001).

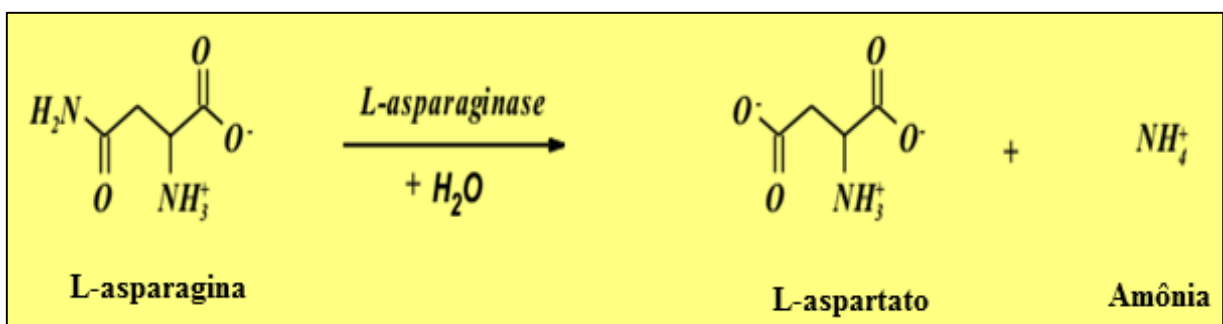
Para contornar todas limitações quanto as implicações da produção e utilização de enzimas microbianas, são necessários conhecimentos básicos quanto as características físico-químicas e biológicas da enzima de interesse, bem como o comportamento dos microrganismos produtores em determinadas condições de cultivo, almejando um aumento na sua produtividade através do processo de otimização das condições de cultivo, bem como uma maior utilização da enzima a ser produzida (HADEBALL, 1991).

1.3. A Enzima L-asparaginase

1.3.1. Estrutura e Função

A L-asparaginase é uma enzima classificada como L-asparagina amidohidrolase - E.C. 3.5.1.1. (Classificação da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica) apresentando duas formas estruturais: Tipo I e II. Ambos os tipos de L-asparaginase são responsáveis por catalisar a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Figura 1) (CAMPBELL et al., 1967; GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2011; NOMME et al., 2012).

Figura 1. Reação de hidrólise catalisada pela L-asparaginase.



Fonte: Adaptado de Borek e Jaskólski (2001).

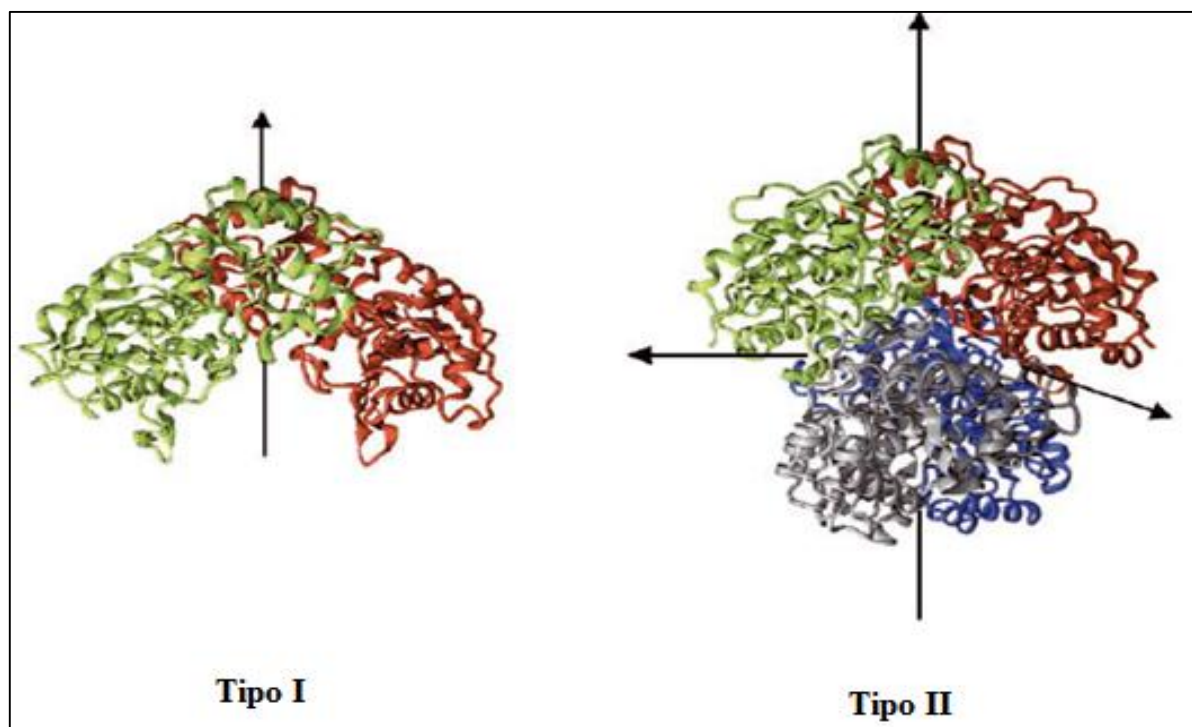
A L-asparaginase é encontrada em diversos animais, plantas e microrganismos, no entanto, os humanos não detêm a capacidade de sua síntese (PANOSYAN et al., 2004; ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2007; VERMA et al., 2007; VAN DEN BERG, 2011). A enzima ganhou notória atenção a partir de pesquisas que contribuiram para a descoberta de que a L-asparaginase poderia ser utilizada como agente antineoplásico, sendo o estudo pioneiro realizado por Clementi (1922), que estudou linfoma em mamíferos e observou que o soro de

porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) ocasionava a morte dos linfomas, apresentando um alto potencial antitumoral, sem, afirmar quais moléculas ou compostos estavam envolvidos nesta atividade. Kidd (1953) também observou a morte e inibição do crescimento de tumores induzidos em ratos e camundongos depois do tratamento com soro de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*), fato este não verificado com soro humano, cavalo ou coelhos (MÜLLER; BOOS, 1998; SOARES et al., 2002; GRAHAM, 2003).

Broome (1961, 1963), após analisar e correlacionar os resultados de Kidd (1953) e Clementi (1922), percebeu uma regressão em linfomas transplantados em camundongos, chegando à conclusão que este fato ocorria devido à dependência nutricional das células malignas em L-asparagina exógena, a qual foi disponibilizada na alimentação dos animais, concluindo que a atividade antineoplásica do soro foi causada pela enzima L-asparaginase.

Estudos posteriores a descoberta da L-asparaginase como agente antineoplásico, foram realizados, com o intuito de elucidar a estrutura da enzima, dentre eles o de Campbell et al. (1967) que verificaram a presença de duas isoformas da enzima, sendo L-asparaginase Tipo I e L-asparaginase Tipo II das quais apresentam estruturas bioquímicas e genéticas diferenciadas. A L-asparaginase Tipo I, apresenta uma estrutura quaternária dimérica com baixa afinidade por L-asparagina; a L-asparaginase Tipo II, possui uma estrutura quaternária tetramérica e alta afinidade por L-asparagina (Figura 2) (CEDAR; SCHWARTS, 1967).

Figura 2. Estruturas tridimensionais de L-asparaginase Tipo I e II de *E. coli*.



As propriedades dos dois tipos de L-asparaginase foram estudadas exaustivamente em bactérias como *Erwinia chrysanthemi* (AGHAIYPOUR et al., 2001), *Escherichia coli* (BAGERT; RÖHM, 1989) e *Erwinia carotovora* (KOTZIA; LABROU, 2005; WINK et al., 2010). Em particular, a enzima do Tipo II apresenta atividade antineoplásica e pode ser usada no tratamento de leucemia, fato este não verificado para o Tipo I, pelo fato do Tipo II ter maior processividade (DUVAL et al., 2002). Algumas bactérias como a *Escherichia coli*, apresentam os dois tipos enzimáticos independentes, o Tipo I se localiza no citoplasma e o Tipo II no espaço periplasmático (OETTGEN et al., 1967).

Wriston e Yellin (1973) ao analisarem a estrutura nativa de L-asparaginase de ambos os tipos em *E. coli*, verificaram que as enzimas apresentaram funcionalidade em uma faixa de pH de 5,50 à 10,8, perdendo sua função em pH 11,2. Soares et al. (2002) também analisando a influência do pH sobre a estrutura e função da L-asparaginase, observaram que houve uma mudança irreversível na estrutura da enzima no pH 5,00 e 11,5, enquanto que em pH 8,60 há uma renaturação de cerca de 50 a 70 % de atividade da enzima em sua forma nativa, inferindo que as subunidades da enzima podem ser renaturadas e reassociadas, com recuperação da atividade enzimática dependendo das condições experimentais (pH, tempo e temperatura), características bioquímicas e físico-químicas, bem como as características genéticas dos microrganismos produtores desta enzima.

Stecher et al. (1999) analisando a estrutura de L-asparaginase Tipo II, verificaram que a enzima é um homotetrâmero com subunidades idênticas e com peso molecular de aproximadamente 35 kDa por subunidade, conectadas principalmente por forças não-covalentes. Aghaiypour et al. (2001) também analisando a estrutura da asparaginase tipo II, verificaram que cada monômero é composto por aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos, estando organizados em dois domínios conectados por aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos.

Fisher e Wray (2002) estudando em *Bacillus subtilis* 168 a produção de L-asparaginase relatou a ocorrência e expressão de dois genes codificantes para L-asparaginase, sendo *AsnA* e *AsnZ*, chegando à conclusão que a expressão de um ou ambos os genes, é regulada de acordo com a composição do meio de cultivo e condições fornecidas a bactéria. A sequência dos aminoácidos do produto do gene *AsnA* em *Bacillus subtilis* 168 é semelhante à asparaginase Tipo I de *E. coli*, enquanto que a sequência do produto do gene *AsnZ* se assemelha a de L-asparaginase Tipo II, sendo necessários estudos afim de verificar suas propriedades enzimáticas antes da aplicação farmacológica (SUN; SETLOW, 1991; FISHER; WRAY, 2002).

1.3.2. Produção por Microrganismos

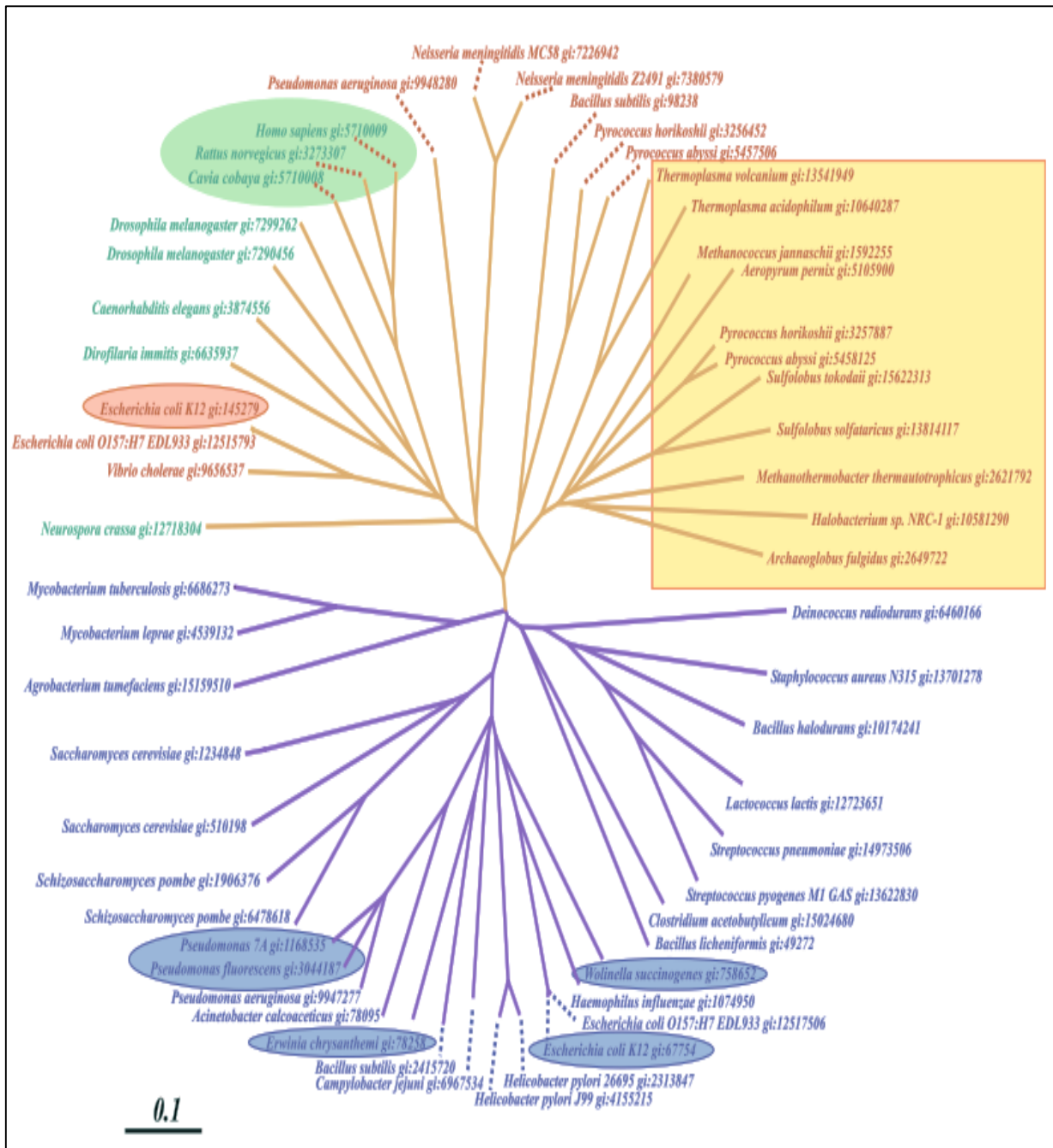
Diversos microrganismos produtores de L-asparaginase são descritos na literatura, em suma maioria provenientes de bactérias como: *Escherichia coli* (KHUSHOO et al., 2004); *Erwinia carotovora* (KAMBLE et al., 2006); *Enterobacter aerogenes* (MUKHERJEE et al., 2000); *Thermococcus kodakarensis* (HONG et al., 2014); *Bacillus licheniformis* (MAHAJAN et al., 2012); *Pseudomonas aeruginosa* (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002); *Corynebacterium glutamicum* (MESAS; GIL; MARTIN, 1990); *Staphylococcus* sp. (HAN; JUNG; PARK, 2014). Diversos fungos também apresentam a capacidade de produzir L-asparaginase como: *Rhizomucor miehei* (HUANG et al., 2014); *Cladosporium* sp. (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013); *Saccharomyces cerevisiae* (FERRARA et al., 2006); *Zymomonas mobilis* (CASOTTI et al., 2007); *Streptomyces albidoflavus* (NARAYANA; KUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008) *Acinetobacter glutaminasificans* (JONER, 1976); *Cylindrocarpon obtusisporum* (RAHA et al., 1990).

Borek e Jaskólski (2001) analisando a distribuição de L-asparaginase em diversos gêneros e espécies bacterianas, propuseram uma árvore filogenética, ficando claramente dividida em duas ramificações: os produtores de asparaginase tipo I e os produtores de asparaginase tipo II, sendo as asparaginases tipo I encontrada no citoplasma e as asparaginases tipo II secretadas no periplasma (Figura 3).

Embora diversos microrganismos possuam a capacidade de produzir L-asparaginase, as principais fontes da enzima para uso terapêutico são de *E. coli* e *E. carotovora* (DUVAL et al., 2002; KHUSHOO et al., 2004). Novas enzimas estão sendo purificadas, no entanto, os processos de produção e purificação possuem limitada eficácia e alto custo, tendo em vista que síntese da L-asparaginase nos variados microrganismos podem sofrer influência de diversos fatores (DUVAL et al., 2002; KENARI; ALEMZADEH; MAGHSODI, 2011).

Paul e Cooksey (1981) verificaram que a amônia liberada pela enzima pode estimular a produção de L-asparaginase. Verificaram também que disponibilidade de ácidos orgânicos (lactato, piruvato, fumarato, malato, succinato e oxalacetato) regulam a síntese desta enzima. Duval et al. (2002) também analisando a influência de fatores sobre a síntese e atividade de L-asparaginase em *E. coli*, verificaram que esta enzima é induzida pela presença de um grupo de aminoácidos como glutamina e o glutamato, tendo um aumento substancial na sua atividade e síntese, contudo, a síntese e atividade da L-asparaginase depende não somente das condições de cultivo fornecida aos microrganismos, como também dos genótipos dos organismos produtores (AHMAD; PANDIT; MAHESHWARI, 2012).

Figura 3. Cladograma de distribuição de bactérias produtoras de L-asparaginases, onde os ramos com cor roxa e laranja correspondem a asparaginase Tipo I e II, respectivamente.



Legenda: A cor castanha indica as seqüências homólogas para L-asparaginase tipo I; A cor azul indica as seqüências com homologia para L-asparaginase tipo II; Fonte: Borek e Jaskólski (2001).

Apesar das implicações como o alto custo de purificação e interferentes sobre síntese e atividade de L-asparaginase, pesquisas são necessárias para que sejam encontradas novas isoformas deste tipo enzimático de origem bacteriana com baixo custo de produção e purificação, bem como propriedades físico-químicas e biológicas variadas, tendo em vista que as enzimas podem variar entre os microrganismos de acordo com suas características genéticas,

e novas formas desta enzima possam ser encontrada com reduzido efeitos colaterais e alta propriedade antineoplásicas (Tabela 1). (EDEN et al., 1990; NAGARETHINAM et al., 2012).

Tabela 1. Características físicas, químicas e biológicas de L-asparaginases produzidas por microrganismos.

Origem	Massa Molecular (kDa)	Tipo	Estrutura	Temperatura (°C)	pH	Atividade Específica (U/mg)	Referência
<i>Bacillus circulans</i>	140	II	Tetrâmero	N.D.	8.6	N.D.	PRAKASHA M et al., 2010
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	70	I	Dímero	85	9.5	3300.0	CHOHAN e RASHID, 2013
<i>Vibrio succinogenes</i>	146	II	Tetrâmero	N.D.	7.3	202.0	DISTASIO et al., 1976
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	34	I	Monômero	37	9.0	723.3	MANNA et al., 1995
<i>Bacillus aryabhatai</i>	155	II	Tetrâmero	40	8.5	647.47	SINGH et al., 2013

Fonte: Autor.

1.3.3. Aplicações na Indústria Farmacêutica

Grande problemática quanto ao uso de quimioterápicos convencionais no tratamento de neoplasias se deve a capacidade de destruição não somente de células tumorais, mas também de células normais, para isto sendo necessário o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seletivos. As enzimas têm se tornado um dos grandes alvos de interesse para fins terapêutico, tendo como base, as diversas características que estas apresentam, dentre elas a capacidade de catalisar reações de várias moléculas alvos de interesse com alta especificidade e afinidade (VELLARD, 2003).

A L-asparaginase vem ganhando grande atenção em alguns tratamentos antineoplásicos, dentre eles o de melanossarcoma, leucemia mielomonocítica, linfoma de Hodgkin e linfosarcoma, no entanto, a sua utilização tem sido limitada por uma elevada taxa de hipersensibilidade a longo prazo, bem como o desenvolvimento de anticorpos que podem causar choque anafilático e/ou neutralização do efeito do fármaco (THOMAS et al., 2010; ZUO et al., 2015).

Para que uma isoforma da L-asparaginase seja utilizada com fins terapêuticos, algumas propriedades da enzima devem ser levadas em consideração, visando uma maior eficiência como: a cinética realizada pela constante de Michaelis (K_m) deve apresentar baixo valor; a capacidade de não serem inibidas por altas concentrações dos produtos (ácido aspártico e amônia); as condições ótimas de pH e temperatura da enzima deveram ser compatíveis com os parâmetros fisiológicos do organismo humano, para uma melhor ação farmacológica; baixo peso molecular (kDa) (KURTZBERG, 2000).

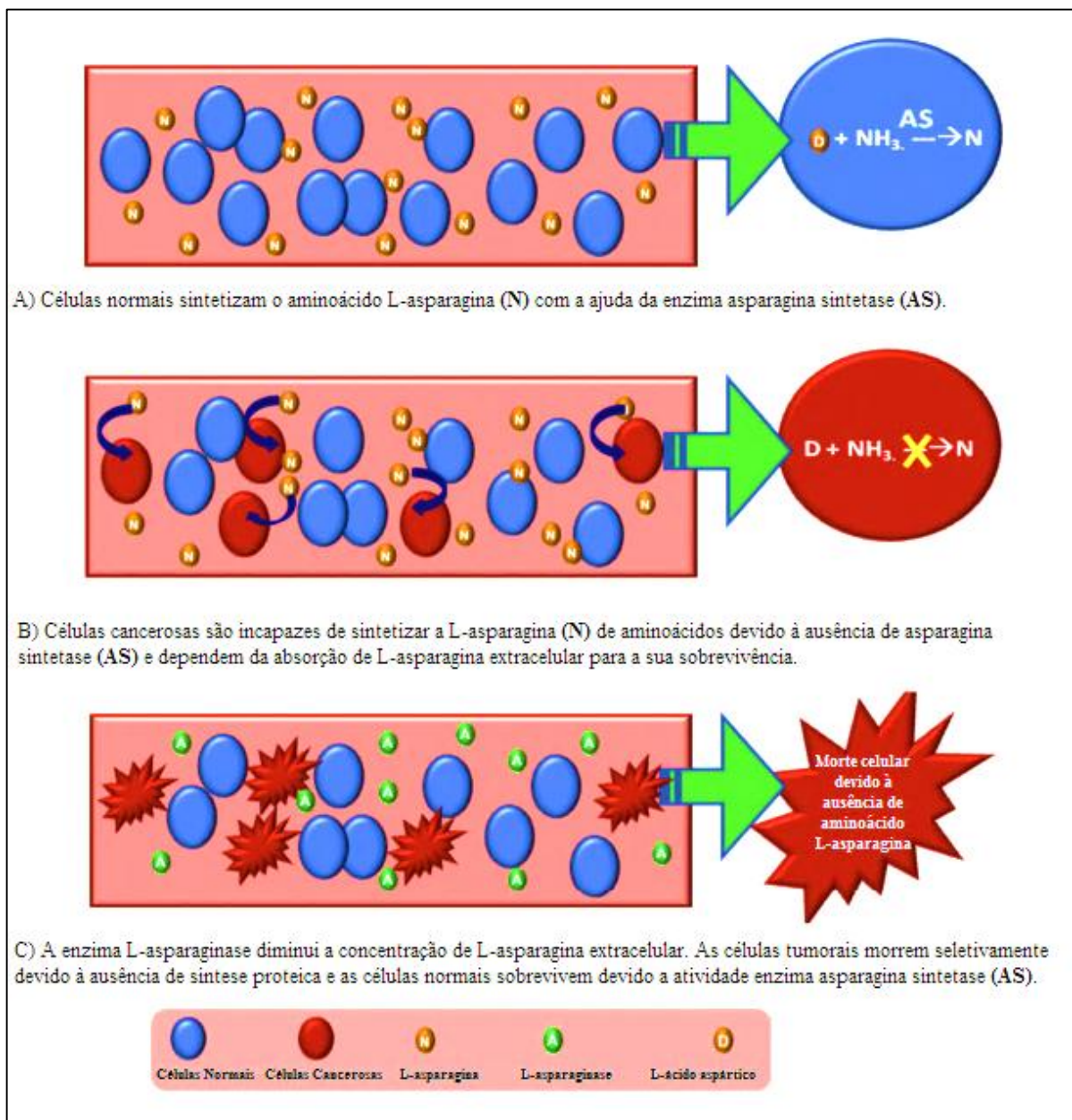
Dentre todas as indicações de tratamento com a L-asparaginase sem dúvida a maior aplicação e destaque quanto a utilização desta enzima, ocorre na terapia da leucemia linfocítica aguda (LLA). Seu mecanismo de ação tem como base o fato de que algumas células neoplásicas requerem uma fonte externa de asparagina devido à sua capacidade limitada de sintetizar este aminoácido em quantidades suficientes para o crescimento, proliferação e manutenção celular. A L-Asparaginase hidrolisa a asparagina do sangue e assim priva as células tumorais deste aminoácido ocasionando uma interferência na síntese proteica destas células, culminando consecutivamente na perda de funções vitais das células induzindo á apoptose p53-dependente (Figura 4) (OETTGEN et al., 1967; KIRIYAMA et al., 1989; MOOLA et al., 1994; BUSHMAN et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013; DHALE; MOHAN-KUMARI, 2014; SONG et al., 2015).

Capizzi (1993) afirma que o tratamento e administração continua de L-asparaginase pode causar sérios efeitos colaterais, dentre eles: edema, choque anafilático, retardo mental, urticária, alergias brandas, náuseas, entre outros. Müller e Boos (1998) verificaram que as reações de hipersensibilidade são causadas pelo acúmulo de anticorpos contra a enzima que podem ocorrer após uma semana do tratamento. Os anticorpos produzidos em resposta à administração continua de L-asparaginase além de ocasionar reações de hipersensibilidade, podem inativar a enzima, reduzindo consideravelmente seu tempo de meia-vida, mesmo sem causar efeitos adversos significativos.

Duval et al. (2002) e Kurtzber (2000) verificaram que a grande maioria das L-asparaginases produzidas por microrganismos possuem uma dupla atividade, detendo a capacidade de também hidrolisar o aminoácido L-glutamina em glutamato, já que a hidrólise da L-glutamina é bastante similar à hidrólise da L-asparagina devido à semelhança estrutural entre ambos os aminoácidos, apresentando atividade glutaminase-asparaginase, porém a enzima apresenta baixa afinidade pela L-glutamina. A atividade de glutaminase pode aumentar o potencial antitumoral da enzima, no entanto, este aumento também pode influenciar casos de toxicidade clínica pela liberação dos metabólitos da hidrólise.

Para sobrepor as implicações do uso da asparaginase, novas alternativas são propostas como: a associação da enzima com agentes quimioterápicos (prednisona, vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina, citarabina e ciclofosfamida); modificações estruturais na enzima, como L-asparaginase peguilhada (PEG-asparaginase), que possui ligação covalente com um grupo polietilenoglicol (MOOLA et al., 1994; WINK, 2010).

Figura 4. Mecanismo geral do efeito da atividade de L-asparaginase sobre células tumorais.



Fonte: Adaptado de Shrivastava et al. (2016).

Três formas comerciais de L-asparaginase são conhecidas, sendo asparaginase de *E. coli*, asparaginase peguilhada de *E. coli* e asparaginase de *E. chrysanthemi*, as quais diferenciam

entre si nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (LANVERS et al., 2002; AVRAMIS; PANOSYAN, 2005; GERVAIS et al., 2013).

No Brasil, a L-asparaginase como medicamento era formulado pelo Laboratório Bagó a partir da matéria-prima importada, sendo encontrado na forma comercial Elspar® (L-asparaginase de *E. coli*), até o ano de 2012, quando foi suspensa a sua fabricação e distribuição, culminando em uma crise de desabastecimento do fármaco (SCHMIDT, 2012; LOFTUS, 2012). Mediante a suspensão do fármaco, o Ministério da Saúde Brasileiro, através do Serviço Único de Saúde (SUS), incluiu a L-asparaginase na Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME) por fazer parte de diversos protocolos de tratamentos oncológicos, sendo prioritário a compra, aquisição e transferência de tecnologia para produção da enzima no país, no entanto, sem grande sucesso. Atualmente, para o abastecimento de L-asparaginase no Brasil, tem se utilizado o medicamento Aginasa®, produzido pela indústria Kyowa Hakko Kirin, com sede no Japão, culminando em um alto custo de importação e distribuição (MPF, 2013; PAULA, 2015; BRASIL, 2016).

1.3.4. Aplicações na Indústria Alimentar

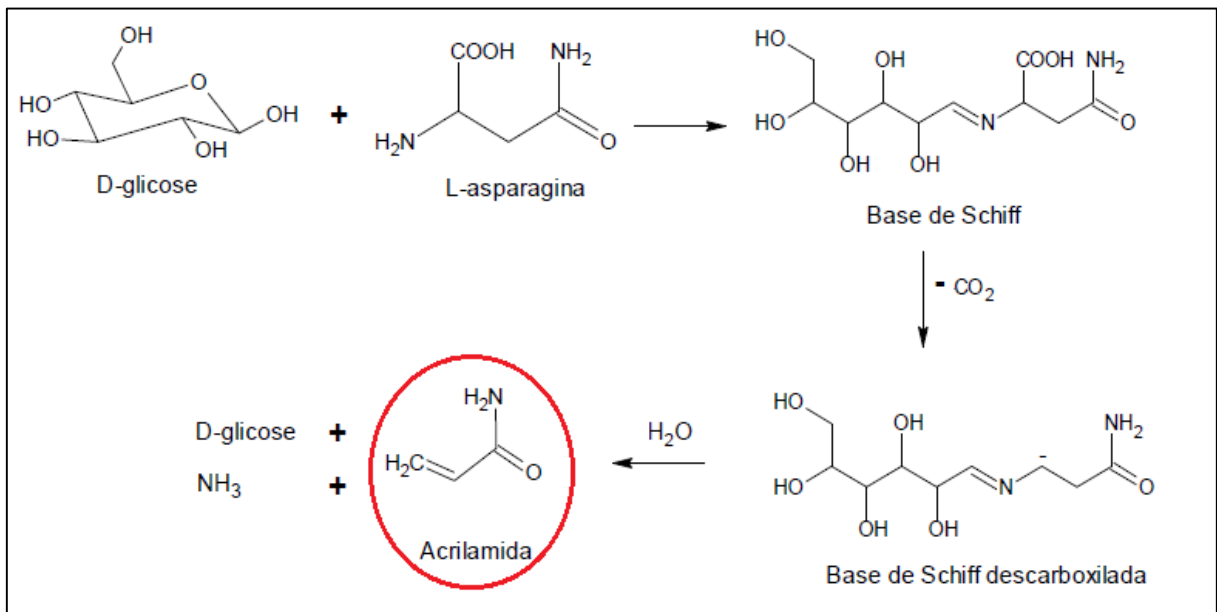
Grande parte dos alimentos industrializados antes de serem consumidos passam por diversas etapas de beneficiamento e processamento, dentre eles o processamento térmico, que tem por objetivo a degradação de compostos ou substâncias tóxicas, inativação de enzimas e microrganismos patogênicos, bem como a formação dos compostos responsáveis por oferecer cor, aroma e sabor aos alimentos, no entanto, este processo pode culminar na produção de compostos tóxicos e/ou carcinogênicos (MINTZ, 2001; NITZKE; FREELAND-GRAVES, 2007).

Durante o tratamento térmico de alimentos ricos em carboidratos, ocorrem diversas reações entre os açúcares, aminoácidos e proteínas, dentre elas a Reação de Maillard, que consiste em uma reação da carboxila reativa de um açúcar redutor com o grupamento amina de proteínas ou aminoácidos, dando a cor e sabor característico de alimentos fritos, no entanto, estudos indicam que esta reação está relacionada com a formação de acrilamida, um composto carcinogênico e com efeitos neurotóxicos (NITZKE; FREELAND-GRAVES, 2007; ARISSETO; TOLEDO, 2008; CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

A asparagina é principal aminoácido envolvido na reação de Maillard pela presença do seu grupamento amido em sua cadeia lateral (ARISSETO; TOLEDO, 2008). Diante da informação de que a asparagina é um dos aminoácidos responsáveis pela formação de

acrilamida, grande atenção vem sendo dada a essa enzima pela indústria alimentícia, utilizando amplamente a L-asparaginase durante as etapas de beneficiamento e pré-processos industriais em alimentos ricos em carboidratos e asparagina, quando estes serão submetidos a fritura ou torra (Figura 5) (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002).

Figura 5. Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas.



Fonte: Adaptado de Fennema et al. (2010).

Pedreschi et al. (2008) verificaram que a adição de L-asparaginase antes do beneficiamento e processo de fritura dos alimentos, reduz a formação de acrilamida, pois boa parte da asparagina é convertida em ácido aspártico e amônia, tendo como resultado o bloqueio da reação de Maillard e inibição de formação de acrilamida.

Dhanam e Kannan (2013) verificaram que o tratamento de alimentos com L-asparaginase submetidos a fritura reduz a formação de acrilamida em 90%. Mohan Kumar et al. (2013) verificaram que o tratamento de batatas para formulação de snacks com L-asparaginase, reduziu a formação de acrilamida em 97%, demonstrando a alta eficácia do tratamento de alimentos ricos em L-asparagina.

Devido a importância da L-asparaginase na indústria de alimentos, diversas pesquisas visam a formulação desta enzima para larga escala industrial, como por exemplo L-asparaginase fúngica do produto Acrylaway® fabricado pela empresa Novozymes®, que tem como proposta a redução dos níveis de acrilamida em diversos alimentos industrializados (HENDRIKSEN et al., 2009; NOVOZYMES, 2013).

1.4. Identificação de Microrganismos

A correta identificação e classificação dos microrganismos é de extrema importância não só quanto aos aspectos clínicos, mas também em estudos ambientais e no uso dos microrganismos na biotecnologia. Os métodos tradicionais mais utilizados que auxiliam na identificação das bactérias, consistem em levantar e analisar dados relativos as características morfológicas, constituição química, testes bioquímicos e processos fisiológicos (BALOWS et al., 1991; PROSSER, 2002), no entanto, o levantamento e análises destes dados não geram informações eficientes sobre as relações evolutivas entre os organismos, e a capacidade de identificar a nível de espécie é limitada, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e artificiais (HUGENHOLTZ; PACE, 1996).

Pesquisas na área de classificação dos organismos levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento de DNA e o descobrimento de marcadores moleculares, surgindo novas possibilidades nos campos da classificação, identificação e diagnóstico dos organismos vivos, incluindo os microrganismos, ampliando os diversos de estudos sobre a classificação, filogenia e evolução, modificando os sistemas anteriormente descritos (SANGER et al., 1977; SAIKI et al., 1988; TORSVIK et al., 1990; TORSVIK; ØVREAS, 2002; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Com base no desenvolvimento de novas técnicas e a elucidação de alguns processos no campo da genômica, descobriu-se que a classificação e identificação dos microrganismos pode ser efetuada com base molecular através da determinação das sequências nucleotídicas de genes evolutivamente conservados. Os RNAs que compõem os ribossomos (rRNAs), são essenciais para todos os organismos, estando entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas biológicos de vida, sendo considerado como um marcador molecular na identificação e construção de filogenias nos diversos organismos (WOESE, 1975; WOESE, 1977; PACE et al., 1986).

Em procariotos, a sequência do gene RNA ribossomal 16S apresenta alto grau de conservação, apresentando um conjunto de aproximadamente 1.500 pares de nucleotídeos, possuindo regiões com sequencias variáveis ou hipervariáveis (regiões de V1 a V9), entre regiões conservadas em diferentes locais da molécula, sendo úteis para inferências filogenéticas e identificação de espécies (WOESE et al., 1975; LANE et al., 1985; MACRAE, 2000; ACINAS et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a produção e atividade de L-asparaginase das bactérias cultiváveis do tecido do coral *S. stellata* dos recifes costeiros do Cabo Branco-Paraíba, bem como identificar utilizando ferramentas moleculares os isolados ativos na produção enzimática.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Detectar a atividade de L-asparaginase em bactérias isoladas do coral *S. stellata*;
- b) Analisar quantitativamente a atividade de L-asparaginase produzida por bactérias em diferentes condições de cultivo;
- c) Identificar os isolados de bactérias do tecido do coral *S. stellata* ativas na produção de L-asparaginase, com base nas sequências do gene RNAr 16S;
- d) Desenhar primers para detecção de gene de L-asparaginase Tipo II nos isolados de bactérias;
- e) Detectar o gene envolvido na produção de L-asparaginase Tipo II nos isolados de bactérias;
- f) Selecionar os isolados de bactérias mais promissores quanto à produção de L-asparaginases para uso nos processos biotecnológicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados de Bactérias do Tecido do Coral *S. stellata*

As bactérias utilizadas no presente trabalho foram isoladas do coral *S. stellata*, em diversas condições de saúde: sadias (marrom) e com alteração de pigmentação (roxo). As colônias de corais coletadas para o isolamento de bactérias, foram obtidas nos recifes costeiros da Praia de Cabo Branco, Paraíba, sendo catalogadas e depositadas na coleção de bactérias do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO/DBM/UFPB).

Foram analisados 69 isolados bacterianos com codificação “SR__” do coral com alteração de pigmentação (roxo) e “SS__” os obtidos do coral sadio.

A caracterização dos isolados foi realizado na base da morfologia celular, coloração de Gram segundo a metodologia de Huecker modificada (SMIBERT; KRIEG, 1994) e presença de endósporos com base na técnica descrita por Gerhardt et al. (1994), sendo os isolados agrupados de acordo com estes caracteres (Tabela 2) (MEDEIROS, 2014).

Tabela 2. Isolados de bactérias provenientes do coral *S. stellata*, agrupados de acordo com as características morfofisiológicas analisadas.

Coloração de Gram*	Características Morfofisiológicas	Isolados
G+	Bastonetes sem endósporos	SR01, SR09, SR17, SR19, SR24, SR25, SR27, SR30, SR39, SR50, SR51, SR54, SR55, SR62, SS10, SS11, SS13, SS14, SS15, SS16, SS19, SS20, SS21B, SS24, SS27, SS29, SS30, SS33, SS35, SS36
G+	Bastonetes com endósporos	SR02A, SR03, SR04, SR05, SR08, SR11, SR22, SR29, SR34, SR37, SR41, SR44, SR60, SR61, SS03, SS04, SS08, SS09B, SS18, SS21A, SS23, SS25

G+	Cocos	SR02B, SR21, SR26, SR38, SR45, SS09A, SS22, SS28
G+	Filamentos	SR31
G-	Bastonetes sem endósporos	SR07, SR15 SR18, SR20, SR35, SS02, SS12, SR13

Legenda: *G+ Reação positiva no teste de coloração de Gram; G- Reação negativa no teste de coloração de Gram.

Fonte: Autor; Medeiros, 2014.

3.2. Detecção da Atividade de L-asparaginase das Bactérias

Para uma seleção preliminar das bactérias com atividade de L-asparaginase, todos isolados foram analisados quanto degradação do aminoácido L-asparagina de acordo com a metodologia de Gulati et al. (1997), utilizando o meio Agar Czapek Dox com a seguinte composição: Na₂HPO₄ (Neon) – 6,0 g/L; KH₂PO₄ (Neon) – 2,0 g/L; NaCl (Neon) – 0,5 g/L; L-asparagina (Êxodo) – 10,0 g/L; Glicerol (Sigma) – 2,0 g/L; MgSO₄7H₂O (Neon) – 0,2 g/L; CaCl₂2H₂O (Neon) – 0,005 g/L; Agar (HiMedia) – 20,0 g/L, Vermelho Fenol (Sigma) 0,009% ou Azul de Bromotimol (Sigma) 0,009%, pH 5,5.

As placas com as culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, tendo como resultado positivo para produção de enzima, a formação de um halo rosa ou róseo em meio com indicador vermelho fenol, ou azul esverdeado em meio com indicador azul de bromotimol, ambos circundantes as colônias devido à liberação da amônia pela hidrólise da asparagina e alcalinização do meio.

3.3. Análise Quantitativa da Atividade de L-asparaginase

Os isolados bacterianos que apresentaram atividade de L-asparaginase em meio Czapek Dox, foram selecionados para análise quantitativa da atividade L-asparaginase.

3.3.1. Cultivo das Bactérias

A análise quantitativa da atividade de L-asparaginase dos isolados selecionados foi realizada através do cultivo em meio líquido. Os isolados foram previamente cultivados em meio Agar Nutriente (HiMedia) por 24 horas a 37 °C, em seguida uma colônia bacteriana foi transferida para um pré-inóculo em Caldo Nutriente (HiMedia), até a obtenção padrão de turvação correspondente a 3 na escala de McFarland (BioMérieux). Posteriormente, retirou-se 1,0 mL do cultivo e o centrifugou a 12.000 rpm à 25 °C por 10 minutos. As células precipitadas resultantes da centrifugação foram transferidas para dois meios de cultura, tendo como base o meio Czapek Dox, com fontes de nutrientes diferenciados:

- a) Meio I Czapek Dox: (L-asparagina (Êxodo) – 10,0 g/L; Na₂HPO₄ (Neon) – 6,0 g/L; KH₂PO₄ (Neon) – 2,0 g/L; NaCl (Neon) – 0,5 g/L; Glicerol (Sigma) – 20,0 g/L; MgSO₄7H₂O (Neon) – 0,2 g/L; CaCl₂2H₂O (Neon) – 0,005 g/L, pH 7,0.
- b) Meio II Czapek Dox: (Extrato de Levedura (HiMedia) – 10,0 g/L; Na₂HPO₄ (Neon) – 6,0 g/L; KH₂PO₄ (Neon) – 2,0 g/L; NaCl (Neon) – 0,5 g/L; Glicerol (Sigma) – 20,0 g/L; MgSO₄7H₂O (Neon) – 0,2 g/L; CaCl₂2H₂O (Neon) – 0,005 g/L), pH 7,0.

O cultivo das bactérias foi realizado em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura sob agitação a 150 rpm por 48 horas a 37 °C. As culturas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, e o precipitado utilizado para análise de atividade de L-asparaginase.

Foram mensurados os valores do pH inicial e final das culturas das bactérias através do método potenciométrico, empregando um medidor de pH (Hanna- HI2221) previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0, 7,0 e 10,0 ± 0,01.

3.3.2. Quantificação da Atividade de L-asparaginase

A análise da atividade de L-asparaginase foi realizada pelo método proposto por Mashburn e Wriston (1963), com algumas modificações.

Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando as células obtidas pela centrifugação de 1,0 mL das culturas dos meios I e II e 1,0 mL de solução contendo L-asparagina (Êxodo) (200 Mm) em Tris-HCl (Neon) (50 Mm), pH 7,0. A mistura foi agitada no vórtex (Certomat MV Biotech) por 1 minuto e incubada por 30 minutos a 37 °C em banho-maria. A reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de Ácido Tricloroacético (Dinâmica) a 1,5 M. A mistura da reação foi centrifugada (12.000 rpm por 15 minutos) e a amônia liberada

pela hidrólise de L-asparagina foi quantificada no sobrenadante como segue: uma alíquota de 100,0 µL do sobrenadante foi adicionada em 700,0 µL de água ultrapura e 200,0 µL do reagente de Nessler (Neon). Essa mistura foi incubada em microplacas de 96 poços a 25 °C durante 20 minutos para posterior leitura. A leitura da absorbância foi realizada em utilizando a leitora ELISA EL-800 (Biotek) a 450 nm, a fim de determinar a quantidade de amônia liberada no processo.

Uma unidade de atividade enzimática total (IU), foi definida como a quantidade de enzima que produz 1,0 µmol de amônia por minuto nas condições do ensaio, sendo expresso em IU/mL. Foi construída uma curva de calibração utilizando a solução padrão de sulfato de amônia, nas concentrações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mM (Apêndice A).

3.3.3. Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada a partir do sobrenadante utilizado para análise de atividade enzimática (ver item 3.3.2.), pelo método de Bradford (1976). A curva padrão de albumina sérica bovina (Bio-Rad) foi feita utilizando concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 90 µg/mL de albumina (Apêndice B).

3.3.4. Quantificação da Biomassa de Bactérias

As culturas de bactérias foram centrifugadas à 12.000 rpm por 15 minutos, e a massa celular foi transferida para placas de Petri previamente pesadas. As placas foram submetidas à secagem em estufa a 105 °C por no mínimo 24 horas, até apresentarem peso constante. A biomassa foi expressa em miligrama de células por mililitro (mg/mL).

3.4. Caracterização Molecular dos Isolados de Bactérias

3.4.1. Extração do DNA Genômico

Os isolados de bactérias que apresentaram atividade de L-asparaginase foram selecionados para extração do DNA genômico total. Inicialmente, os isolados foram cultivados em meio Caldo Marinho (HiMedia) por 24 horas a 37 °C, em seguida as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos. As células resultantes da centrifugação foram resuspensas em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M) e congeladas a -20°C. O

processo de extração do DNA foi realizado segundo o método de Cheng e Jiang (2006) com algumas modificações. As células foram descongeladas e suspensas em 200,0 μL de tampão TE, pH 8,0 e em seguida foram adicionadas as pérolas de vidro (\O 425-600 μm , 200 μL) e 200,0 μL de fenol saturado (AMRESCO) (pH 8,0). Os microtubos foram colocados no vórtex por 90 segundos e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm em 4°C. Posteriormente foi removido 160,0 μL da fase superior da amostra e adicionou-se 40,0 μL de TE e 100,0 μL de clorofórmio (Neon). Após centrifugação das amostras (5 min., 13.000 rpm, 4°C), removeu-se 160,0 μL da fase superior e adicionou 40,0 μL de TE e 5 μL de RNase (Invitrogen) (10 mg/mL) e incubou as amostras à 37 °C por 10 minutos em banho-maria. Em seguida acrescentou-se 100,0 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizou-se e centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O volume de 150,0 μL da fase superior contendo DNA foi colocado em um microtubo e congelado a -20°C.

3.4.2. Quantificação do DNA Gênomico

As amostras de DNA foram quantificadas utilizando aparelho NanoDrop (Thermo Scientific 2000C). As concentrações do DNA foram expressas em ng/ μL por meio da absorbância das bases, no comprimento de onda de 260 nm. O grau de pureza das amostras foi estabelecido pela razão dos espectros A_{260}/A_{280} nm.

3.4.3. Amplificação do Gene RNAr 16S

A amplificação do gene referente ao RNAr 16S foi realizada pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador (Biosystems 2720). Preparou-se um mix padronizado composto por 1,0 μL dos oligonucleotídeos universais 26F forward – 5'GAGTTTGATCMTGGCTCAG3' e 1492R reverse – 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3', na concentração de 50,0 pmol/ μL , 7,5 μL de tampão de PCR, 1,0 μL de dNTPs (Invitrogen®) a 100 Mm, 0,5 μL de Taq Polimerase (Invitrogen®) a 5,0 U/ μL e 2,0 μL DNA extraído com concentração padronizada em 50,0 ng/ μL para o volume final reacional de 50,0 μL . Foram utilizadas as seguintes condições para amplificação do gene RNAr 16S: temperatura de desnaturação inicial à 94° C por 5 min; 25 ciclos de 94° C por 1 min., 57° C por 2 min. e 72 °C por 2 minutos; extensão final à 72° C por 10 min..

3.4.4. Desenho dos Primers Para Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ)

Foram construídos primers com auxílio do programa Primer-BLAST e o banco de sequências do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A construção foi baseada no alinhamento da sequência de *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 (Genbank NC_000964.3) (Anexo A) com a sequência contendo 1.128 pb codificantes do gene *AsnZ* (Asparaginase tipo II- ID:938392/ NP-388151.1).

Dois pares de primers foram construídos, *AsnZ1* e *AsnZ2* de 22 e 20 nucleotídeos, respectivamente. O tamanho dos amplicons foi estimado em 1.225 pb e 769 pb para *AsnZ1* e *AsnZ2*, respectivamente. As sequências foram desenhadas visando a não formação de estruturas secundárias intramoleculares estáveis entre os primers sendo considerado como fator relevante a diferença entre as temperaturas de pareamento (T_m em °C), não superior a 10°C entre os pares de primer. Para se verificar a especificidade dos primers obtidos utilizou-se a plataforma BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para assegurar que os primers obtidos podem amplificar as sequências codificantes específicas para o gene de L-asparaginase Tipo II.

3.4.5. Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ)

O gene envolvido na produção de L-asparaginase Tipo II foi detectado a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers construídos. Foram utilizadas as seguintes condições para amplificação utilizando o par do primer *AsnZ1*: temperatura de desnaturação inicial à 94° C por 5 min; 30 ciclos de 94° C por 1 min., 62° C por 2 min. e 72 °C por 2 minutos; extensão final à 72° C por 10 min. Para os primers *AsnZ2*, foram utilizadas as seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial à 94° C por 5 min; 30 ciclos de 94° C por 1 min., 58° C por 2 min. e 72 °C por 2 minutos; extensão final à 72° C por 10 min.

3.4.6. Eletroforese em Gel de Agarose dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (BIO-RAD) de 1,5%, sob uma voltagem de 100V. As amostras foram coradas com GelRed™ (BIOTIUM) e observadas em sistema de fotodocumentação de géis (Loccus) para verificação das bandas correspondentes ao amplicon de cada gene. Para o gene de RNAr 16S o produto esperado era de 1500 pb. Para o gene de L-asparaginase *AsnZ* os produtos esperados eram de 1225 e 769 pb,

para os primers AsnZ1 e AsnZ2, respectivamente. Para análise dos tamanhos dos produtos de PCR utilizou-se um padrão de peso molecular de 100 pb (Axygen).

3.4.7. Purificação e Sequenciamento dos Produtos de RNAr 16S e AsnZ

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit *SV Gel and PCR Clean-UP System* (PROMEGA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando NanoDrop (Thermo Scientific 2000C).

Para o sequenciamento, os produtos da purificação da PCR foram padronizados nas concentrações de 30 a 40 ng com água ultrapura (Mili-Q), tendo como volume final de 20 µL. O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (Centro de Ciências Biológicas, UFPE) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 40 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos primers, com 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg., 55°C por 5 seg. e 60°C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75 % e lavagem com etanol a 60 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3} v1.mob"; BioLIMS Project "3100_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC3100SR_Seq_FASTA.saz".

3.4.8. Análises das Sequências

As sequências geradas do gene RNAr 16S e do gene *AsnZ* dos isolados de bactérias foram comparadas com as sequências depositadas no banco de sequencias do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando-se BLASTn e BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), bem como sequências depositadas no banco de sequencias do UNIPROT, disponível no site

(<http://www.uniprot.org/blast/>). Para o gene RNAr 16S, foram analisadas as similaridades das sequências obtidas com as sequências presentes no banco de dados, sendo consideradas as que apresentaram similaridade $\geq 97\%$. Para o gene *AsnZ* foram analisadas as similaridades das sequências obtidas com as sequências presentes no banco de dados. O alinhamento múltiplo das sequências e a construção de árvores filogenéticas com base no gene RNAr 16S, foram realizados através do programa MEGA versão 7.0, utilizando o método Neighbour Joining e o modelo Kimura 2 (TAMURA et al. 2015).

3.4.9. Análise Estatística

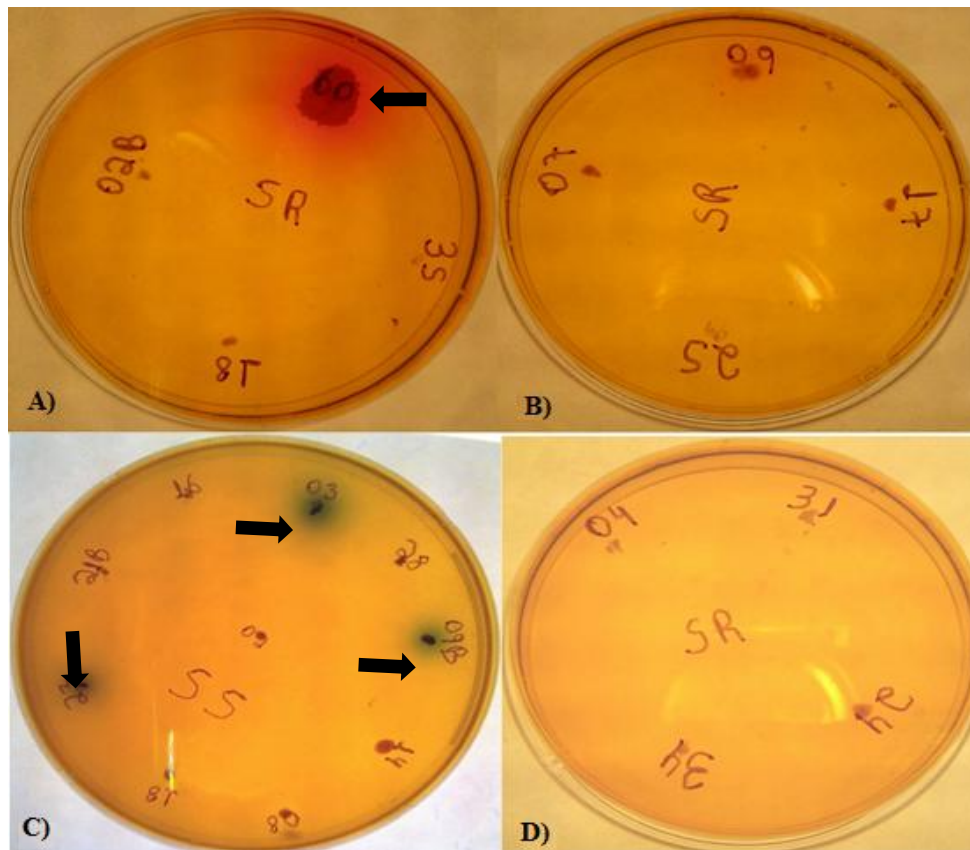
Análise estatística foi realizada pelo teste t de Student, não pareada, comparando os níveis de atividade enzimática entre os meios de cultivo para cada isolado, sendo utilizada a média de dois experimentos em triplicata, expressos em média \pm desvio padrão, considerando-se como significativos os valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de L-asparaginase por Bactérias

A detecção da atividade de L-asparaginase foi realizada em 69 isolados de bactérias provenientes do coral *S. stellata*. Destes, 16 isolados demonstraram atividade de L-asparaginase em meio Czapek Dox com L-asparagina e os indicadores vermelho fenol ou azul de bromotimol (Figura 6) (Tabela 3).

Figura 6. Detecção da atividade de L-asparaginase em meio Czapek Dox com L-asparagina e os indicadores vermelho fenol (A e B) ou azul de bromotimol (C e D).



Legenda: (A e C) As setas indicam resultado positivo pela presença de halo depleção de L-asparagina, ao redor da colônia, com os indicadores vermelho fenol e azul de bromotimol, respectivamente; (B e D) Resultado negativo ausência de halo de hidrólise de L-asparagina, com os indicadores vermelho fenol e azul de bromotimol, respectivamente.

Todas as bactérias produtoras de L-asparaginase foram Gram positivas, fato este de grande relevância pois amplia o espectro das bactérias produtoras deste tipo de enzima, visto que, a grande maioria dos trabalhos científicos indica as bactérias Gram negativas,

principalmente *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Erwinia carotovora*, como produtores de L-asparaginase (AGHAIYPOU et al., 2001; KOTZIA; LABROU, 2005; WINK et al., 2009; WINK et al., 2010).

Tabela 3. Detecção da atividade de L-asparaginase por bactérias isoladas do coral *S. stellata* no meio Czapek Dox com L-asparagina e os indicadores vermelho fenol ou azul de bromotimol.

Isolados	Vermelho Fenol	Azul de Bromotimol
SR01	—	—
SR02B	—	—
SR02A	—	—
SR03	—	—
SR04	—	—
SR05	+	+
SR07	—	—
SR08	—	—
SR09	—	—
SR11	+	+
SR13	—	—
SR15	—	—
SR17	—	—
SR18	—	—
SR19	—	—
SR20	—	—
SR21	+	+
SR22	+	+
SR24	—	—
SR25	—	—
SR26	—	—
SR27	—	—
SR29	—	—
SR30	—	—
SR31	—	—
SR34	—	—
SR35	—	—
SR37	—	—
SR38	—	—
SR39	—	—
SR41	+	+
SR44	+	+
SR45	—	—
SR50	—	—
SR51	—	—
SR54	—	—
SR55	—	—
SR60	+	+

SR61	+	+
SR62	—	—
SS02	—	—
SS03	+	+
SS04	+	+
SS08	+	+
SS09A	—	—
SS09B	+	+
SS10	—	—
SS11	—	—
SS12	—	—
SS13	—	—
SS14	—	—
SS15	—	—
SS16	—	—
SS18	+	+
SS19	—	—
SS20	—	—
SS21A	+	+
SS21B	—	—
SS22	—	—
SS23	+	+
SS24	—	—
SS25	+	+
SS27	—	—
SS28	—	—
SS29	—	—
SS30	—	—
SS33	—	—
SS35	—	—
SS36	—	—

Legenda: (+) Produção de L-asparaginase; (—) Ausência da produção de L-asparaginase.

Dhale e Mohan-Kumari (2014) em seus estudos sobre a triagem de microrganismos produtores de L-asparaginase, verificaram a influência dos indicadores vermelho fenol e azul de bromotimol na detecção da atividade enzimática, constatando que a adição do azul de bromotimol evidencia atividade de L-asparaginase mesmo que haja uma baixa concentração e atividade enzimática, sendo mais confiável que a utilização do vermelho fenol como indicador, tendo em vista que alguns microrganismos não apresentam o crescimento quando utilizado este indicador. Diferentemente, neste trabalho foi observado que ambos os indicadores revelaram a atividade enzimática, no entanto, no meio com o indicador vermelho fenol a visualização de halos de hidrólise de L-asparagina foi mais evidente.

4.2. Avaliação da Atividade de L-asparaginase por Bactérias

Os 16 isolados de bactérias que apresentaram produção de L-asparaginase em meio Czapek Dox foram selecionados para análise quantitativa da atividade enzimática. As bactérias que foram cultivadas em meio contendo L-asparagina como fonte de nitrogênio, apresentaram maior atividade enzimática total, variando de 113,5 IU/mL à 425,1 IU/mL, quando comparado com dados obtidos dos no meio com extrato de levedura, que apresentou variação de 5,2 IU/mL à 109,8 IU/mL, (Tabelas 4 e 5) (Figura 7).

Com relação a biomassa de bactérias, obteve-se melhor rendimento para os isolados SR22, SR44 e SR05, quando cultivados em meio com L-asparagina, com valores de 1,36 mg/mL, 1,31 mg/mL e 1,18 mg/mL, respectivamente. No meio com extrato de levedura, os maiores valores de biomassa foram 0,98 mg/mL, 0,90 mg/mL e 0,89 mg/mL para os isolados SR41, SR60 e SR05, respectivamente (Tabelas 4 e 5).

Em relação a atividade específica relacionada a biomassa de bactérias, obteve-se maior atividade no meio com L-asparagina com maior valor de 759,3 U/mg de células para o isolado SS21A, em comparativo com o cultivo em meio com extrato de levedura, que teve maior atividade com valor de 569,33 U/mg de células, para o mesmo isolado (Tabelas 4 e 5).

A quantidade de proteínas totais extracelulares, foi maior nos isolados cultivados em meio com extrato de levedura, em relação ao meio com L-asparagina, obtendo-se valores de 103,3 µg/mL, 84,3 µg/mL e 81,2 µg/mL de proteínas totais para os isolados SS18, SR61 e SS09B, respectivamente. Para os isolados cultivados em meio com L-asparagina foram obtidos maiores valores de 51,2 µg/mL, 41,2 µg/mL de proteínas para os isolados SR05 e SR41, respectivamente.

Quanto à atividade específica relacionada as proteínas totais, houve uma maior atividade dos isolados cultivados em meio com L-asparagina, com valores de 29,3 U/µg, 18,5 U/µg e 15,8 U/µg para os isolados SS21A, SS08 e SS18, respectivamente. O cultivo com extrato de levedura apresentou atividade variando de 0,1 U/µg à 2,5 U/µg (Tabelas 4 e 5).

Foi observado alterações do pH do meio de cultura durante o cultivo dos isolados avaliados, variando entre 6,90 e 7,60 no cultivo dos isolados no meio com L-asparagina, e entre 5,42 e 6,68 em meio com extrato de levedura (Tabela 5).

Com base nos dados obtidos quanto a atividade total, biomassa, atividade específica de proteínas e biomassa, bem como a variação do pH do meio de cultivo, o isolado SS21A foi o que obteve melhores resultados em meio de cultivo com L-asparagina, sendo este promissor na produção de deste tipo de enzima.

Tabela 4. Atividade total e específica de L-asparaginase, biomassa, proteínas totais e pH inicial e final do cultivo das bactérias em meio Czapek Dox com L-asparagina.

Isolados	Atividade total (IU/mL)	Biomassa* (mg/mL)	Proteínas totais (µg/mL)	Atividade específica (U/mg de células)	Atividade específica (U/µg de proteínas)	pH Inicial-Final
SR 05	246,8 ± 3.0	1,18	51,2 ± 1.2	209,2	4,8	7,00 - 7,43
SR 11	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **
SR 21	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **	N.D. **
SR 22	206,5 ± 5.2	1,36	13,8 ± 2.8	151,9	14,9	7,00 - 7,11
SR 41	222,7 ± 3.9	1,12	41,2 ± 2.8	198,9	5,4	7,00 - 7,21
SR 44	280,4 ± 2.2	1,31	34,8 ± 1.5	214,1	8,0	7,00 - 7,25
SR 60	139,5 ± 1.2	0,57	16,0 ± 2.7	244,9	8,7	7,00 - 7,03
SR 61	228,9 ± 4.2	1,12	26,3 ± 1.7	204,4	8,7	7,00 - 6,99
SS 03	169,9 ± 4.1	0,50	15,8 ± 2.8	339,9	10,7	7,00 - 7,60
SS 04	224,1 ± 5.1	0,52	15,8 ± 2.4	431,1	14,1	7,00 - 7,44
SS 08	300,4 ± 4.7	0,54	16,2 ± 1.7	556,4	18,5	7,00 - 6,97
SS 09B	182,5 ± 4.6	0,73	18,5 ± 1.4	250,1	9,8	7,00 - 7,51
SS 18	113,5 ± 5.2	0,29	7,1 ± 0.9	391,7	15,8	7,00 - 6,90
SS 21A	425,1 ± 5.4	0,56	14,5 ± 1.5	759,3	29,3	7,00 - 6,86
SS 23	208,4 ± 5.4	0,74	14,5 ± 1.0	281,7	14,4	7,00 - 7,54
SS 25	206,4 ± 2.4	0,47	14,0 ± 2.1	439,2	14,7	7,00 - 7,45

Legenda: SR_ e SS_ – isolados da colônia sadia e roxa, respectivamente. *Peso seco de células bacterianas; ** Não Determinado.

Tabela 5. Atividade total e específica de L-asparaginase, biomassa, proteínas totais e pH inicial e final do cultivo das bactérias em meio Czapek Dox com extrato de levedura.

Isolados	Atividade		Proteínas totais (µg/mL)	Atividade específica (U/mg de células)	Atividade específica (U/µg de proteínas)	pH Inicial- pH Final
	total (IU/mL)	Biomassa* (mg/mL)				
SR 05	48,7 ± 3.6	0,89	52,8 ± 3.1	54,8	0,9	7,00 - 6,53
SR 11	67,7 ± 3.8	0,30	48,5 ± 2.4	225,7	1,4	7,00 - 6,25
SR 21	107,0 ± 5.2	0,34	55,3 ± 3.2	314,7	1,9	7,00 - 6,65
SR 22	60,3 ± 5.4	0,35	44,1 ± 3.5	172,5	1,4	7,00 - 6,67
SR 41	65,5 ± 2.8	0,98	67,6 ± 3.6	66,8	1,0	7,00 - 6,31
SR 44	88,9 ± 5.7	0,73	35,3 ± 1.9	121,8	2,5	7,00 - 6,55
SR 60	81,5 ± 2.0	0,90	36,4 ± 2.5	90,6	2,2	7,00 - 6,68
SR 61	109,8 ± 5.4	0,6	84,3 ± 1.7	183,0	1,3	7,00 - 6,05
SS 03	5,2 ± 1.6	0,62	50,5 ± 2.0	8,5	0,1	7,00 - 6,50
SS 04	8,9 ± 2.7	0,75	48,4 ± 2.0	12,0	0,2	7,00 - 6,35
SS 08	96,8 ± 3.2	0,69	61,0 ± 1.9	140,3	1,6	7,00 - 6,50
SS 09B	27,4 ± 1.0	0,54	81,2 ± 2.9	50,7	0,3	7,00 - 6,34
SS 18	58,0 ± 5.7	0,29	103,3 ± 1.5	200,0	0,6	7,00 - 6,14
SS 21A	74,0 ± 1.4	0,13	63,6 ± 3.0	569,3	1,2	7,00 - 5,42
SS 23	24,9 ± 3.5	0,78	70,3 ± 2.6	32,0	0,4	7,00 - 6,22
SS 25	37,3 ± 3.2	0,85	54,5 ± 3.2	44,0	0,7	7,00 - 6,20

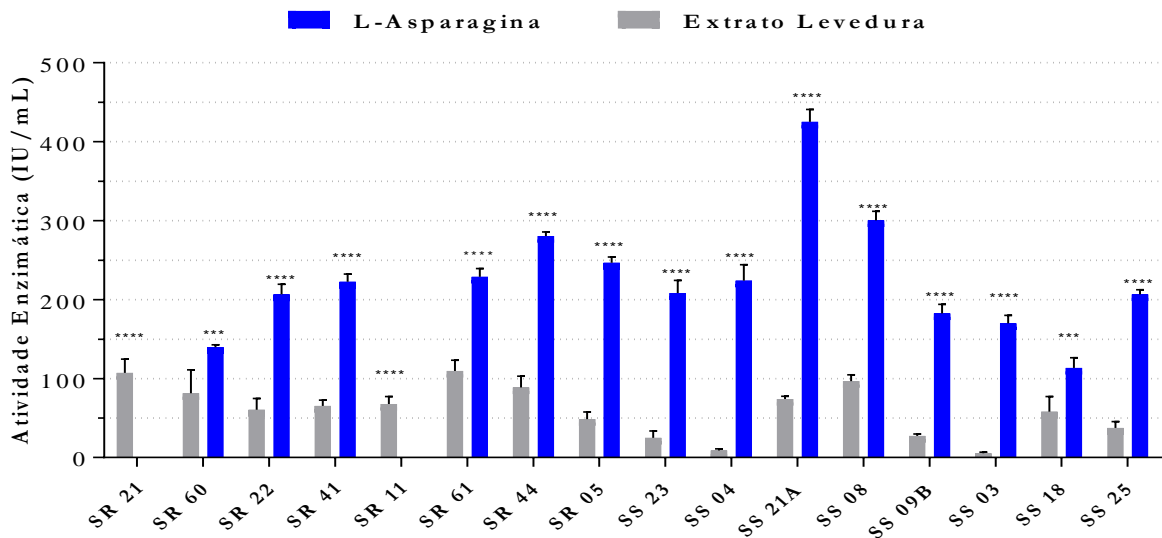
Legenda: SR_ e SS_ – isolados da colônia sadia e roxa, respectivamente. *Peso seco de células bacterianas; ** Não Determinado.

Minim e Alegre (1992) em seus estudos com *Erwinia aroideae* produtora de L-asparaginase, afirmaram que ocorre um aumento gradativo do pH durante o cultivo como resultado da ação da L-asparaginase sobre a L-asparagina, fato este observado neste trabalho, em meio de cultura com L-asparagina. De fato, as alterações do pH do cultivo encontrados neste trabalho podem ser explicadas pelo produto final da reação, que tem como resultado da atividade enzimática no meio de cultivo com consecutiva modificação do pH, o que geralmente vai na contramão dos cultivos tradicionais de bactérias que tendem à fermentação e consequentemente diminuição do pH.

Mahajan et al. (2014) em estudos sobre produção e atividade de L-asparaginases por *Bacillus licheniformis*, avaliaram a influência de vários substratos em diferentes concentrações sobre atividade enzimática, atingindo uma máxima atividade (160 IU/mL) utilizando L-asparagina na concentração de 20 g/L como fonte de nitrogênio. De fato, foi verificado neste trabalho que a L-asparagina em comparação com extrato de levedura induziu melhor atividade de L-asparaginase, visto que, na concentração de 10 g/L de L-asparagina foi possível obter o maior valor de atividade total de 425,1 IU/ml (isolado SS21A).

Verma et al. (2007) constataram em seus experimentos que o extrato de levedura é importante indutor para o crescimento celular e a síntese de L-asparaginase, porém, em alta concentração inibe síntese, produção e atividade enzimática. Os dados obtidos indicam que a concentração do extrato de levedura no meio de cultura analisada em comparação com meio de cultura contendo L-asparagina, reduziu significativamente a atividade enzimática dos isolados estudados (Figura 7).

Figura 7. Atividade total de L-asparaginase de bactérias isoladas do coral *S. stellata*, cultivadas em meio Czapek Dox com L-asparagina ou extrato de levedura.



Legenda: ***p < 0,001 e ****p < 0,0001.

Os estudos de Minim e Alegre (1992) quanto produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae* apontaram que determinados substratos em certas concentrações podem levar inibição da atividade enzimática, bem como sua síntese. Observaram também que o extrato de levedura na concentração de 16 g/L adicionado ao meio de cultura, aumentou a produção de biomassa, no entanto, inibiu a produção da enzima, fato este não observado com L-asparagina nas mesmas

condições, tendo esta induzido uma menor produção de biomassa, porém uma alta atividade de L-asparaginase. Neste trabalho foi observado uma maior produção de biomassa e atividade total em meio com L-asparagina, quando comparado com extrato de levedura.

4.3. Caracterização Molecular e Análise Filogenética do Gene RNAr 16S

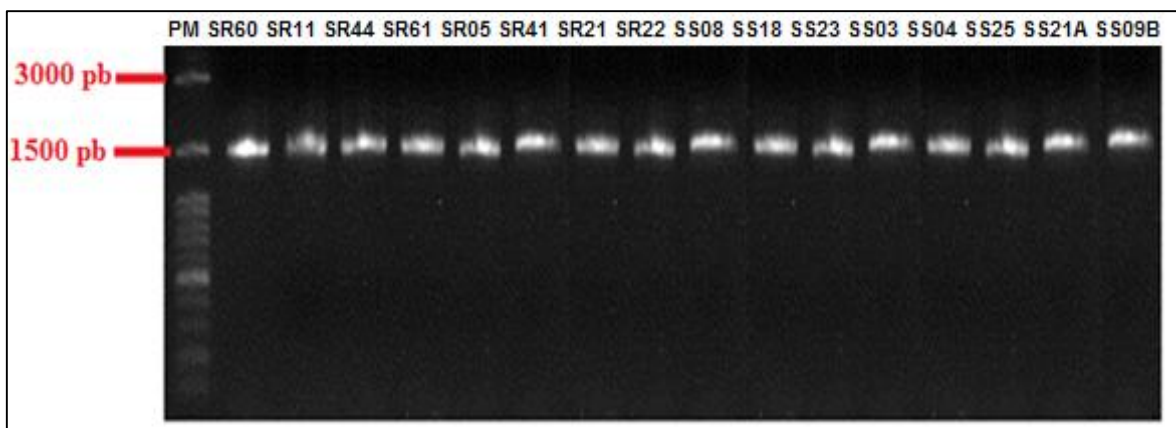
O DNA genômico extraído dos 16 isolados produtores de L-asparaginase, apresentou rendimento de 210,0 ng/μL à 530,7 ng/μL de DNA, tendo as amostras apresentado grau de pureza (DO₂₆₀₋₂₈₀) variando de 1,68 à 1,93.

Todos os isolados apresentaram amplificação por PCR do gene RNAr 16S, obtendo um fragmento de DNA de 1.500 pb, conforme esperado para os primers utilizados (Figura 8). Os produtos da PCR foram purificados e quantificados obtendo entre 21,0 ng/μL à 74,8 ng/μL de DNA e grau de pureza (DO₂₆₀₋₂₈₀) de 1,70 à 2,37, sendo o standard de 1,8 que corresponde a uma proporção acima de 30% de DNA para 70% de proteínas. Isto indica que as amostras utilizadas possuem alto grau de pureza pois estão acima de 1,8 em sua maioria.

As sequências do gene RNAr 16S de boa qualidade foram obtidas em 4 amostras, correspondente aos isolados SR21, SR41, SR60 e SS23. As sequências dos 12 isolados não puderam ser utilizadas para análise filogenética devido à baixa qualidade (alto número de bases não identificadas).

A análise das sequências do gene RNAr 16S dos isolados usando a ferramenta BLASTn apontou que três isolados apresentaram similaridade igual ou superior a 99% para o gênero *Bacillus* (SR41, SR60 e SS23) (Tabela 6, Figura 9 e Apêndices E, F e G) e um isolado (SR21) para o gênero *Staphylococcus* (Tabela 6, Figura 9 e Apêndice H).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação do gene RNAr 16S dos isolados de bactérias produtores de L-asparaginase.



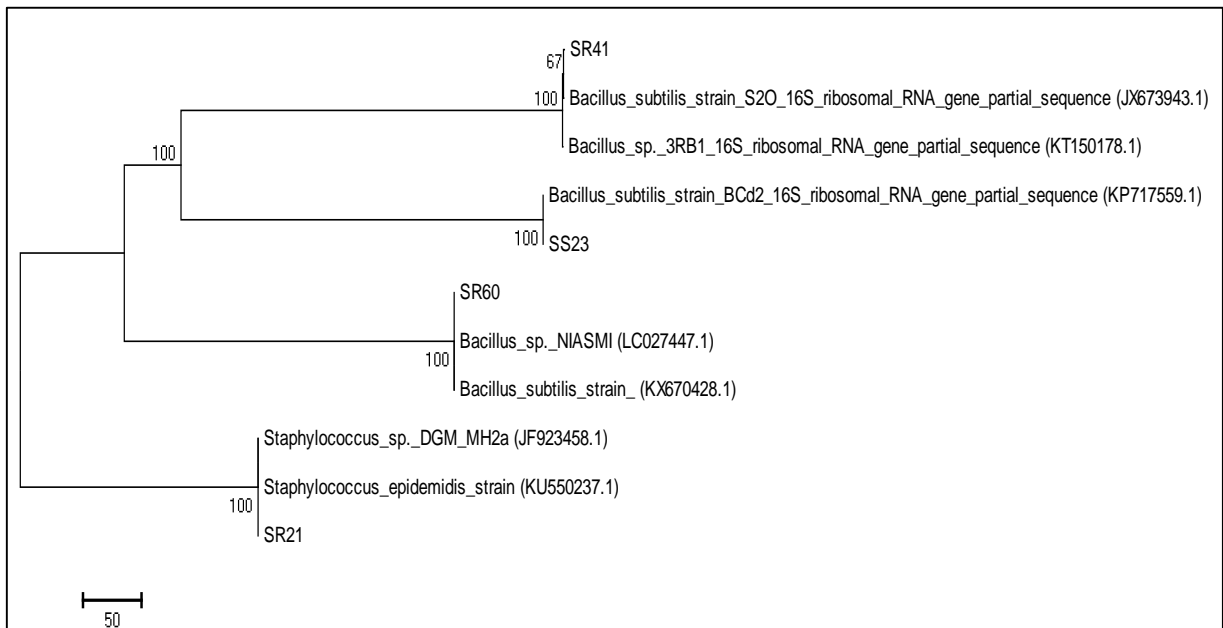
Legenda: PM - Marcador do peso molecular de 100 pares de base (pb) (Axygen); SR_ e SS_ – isolados da colônia roxa e sadia de *S. stellata*, respectivamente.

Tabela 6. Comparações das sequências parciais do gene RNAr 16S utilizando o programa Blastn (refseq_rna) de bactérias.

Isolado	Alinhamento mais significativo do Blastn (GenBank ID)	E-value	Identidade máxima	Código de acesso - NCBI
SR41	<i>Bacillus_subtilis</i>	0.0	99%	JX673943.1
SR60	<i>Bacillus_subtilis</i>	0.0	99%	KX670428.1
SS23	<i>Bacillus_subtilis</i>	0.0	99%	KP717559.1
SR21	<i>Staphylococcus_epidermidis</i>	0.0	99%	KU550237.1

Legenda: SS_ e SR_ – isolados da colônia sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

Figura 9. Árvore filogenética dos isolados SR41, SR60, SR21 e SS23 e de bactérias do GenBank, com base na comparação das sequencias de RNAr 16S.



Legenda: Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequencias do GenBank são mostradas em parênteses.

Trabalhos realizados mostram a imensa diversidade de microrganismos em ambientes marinhos, indicando a inquestionável relevância de bactérias no ecossistema marinho e o potencial biotecnológico deste ambiente (SILVA, R., 2015; RESHEF et al.2006; MEDEIROS, 2014). Gontang et al. (2007) em estudos analisando bactérias de sedimentos marinho, verificaram com base molecular no gene RNAr 16S que o ambiente marinho apresenta uma alta diversidade de bactérias Gram positivas, sendo encontrado diversos gêneros como *Halobacillus*, *Pontibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Bacillus*.

Existem poucos trabalhos sobre a diversidade de bactérias no tecido do coral *S. stellata*. Lins-de-Barros et al. (2013) e Araújo (2013) verificaram que o filo Proteobactéria foi dominante entre a microbiota associada a essa espécie de coral, sendo encontrado gêneros de bactérias Gram negativas como *Halomonas*, *Alteronas*, *Pseudoalteromonas*, *Cobetia*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Glaciacola*. Lins-de-Barros et al. (2013) verificaram que a classe dominante entre as bactérias do coral sadio e branqueado de *S. stellata* coletadas em Búzios foram predominantemente das α -Proteobactérias, enquanto que Araújo (2013) ao estudar as colônias do coral sadio e roxo dos recifes costeiros do Cabo Branco observou que a classe dominante foi a γ - Proteobactéria.

Os resultados obtidos quanto a identificação e diversidade das bactérias isoladas de *S. stellata* com base no sequenciamento do gene RNAr 16S, apresentam somente representantes do filo Firmucutes sendo eles concebidos pelos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus*.

4.4. Construção dos Primers e Detecção do Gene de L-asparaginase (AsnZ)

Para detecção do gene de L-asparaginase Tipo II, foram desenhados dois pares de primers específicos: AsnZ1 e AsnZ2. O par do primer AsnZ1 foi desenhado visando um amplicon de aproximadamente 1.225 pb, modelado na região promotora não transcrita do gene (5' – 3' UTR). O par do primer AsnZ2 foi desenhado almejando um amplicon de aproximadamente 769 pb, modelado na região codificante (CDS) do gene, posterior ao códon de iniciação e anterior ao códon de finalização (Tabela 7) (Apêndices C e D).

A detecção por PCR do gene *AsnZ* responsável pela produção de L-asparaginase tipo II utilizando os pares de primers AsnZ1 e AsnZ2, apresentou resultado positivo para ambos os iniciadores em 11 dos 16 isolados analisados (Tabela 8). Os produtos da PCR obtidos com os primers AsnZ1 foram representados por uma única banda em eletroforese com tamanho cerca de 1.300 pb (Figura 10). Nos produtos da PCR utilizando os primers AsnZ2 visualizou-se uma única banda com tamanho aproximado de 800 pb (Figura 11).

Tabela 7. Sequências e características relevantes dos pares de primers desenhados para detecção do gene de L-asparaginase.

Primer	Sequência do Primer	Tm (°C)	Bases	CG%	Tamanho do Fragmento Amplificado (pb)
AsnZ1	Forward 5'- AGCTGACTGATCTTTTACTGA- 3'	57.39	22	40.91	1225
	Reverse 5'- AGGCTTATTCGCCTTCTTTTCT-3'	58.04	22	40.91	
AsnZ2	Forward 5'- GAATCCCCGAAAGAAAAAGC-3'	55.24	20	45.50	769
	Reverse 5'- TTACAGCAGCGTCAAACAGG-3'	58.77	20	50.00	

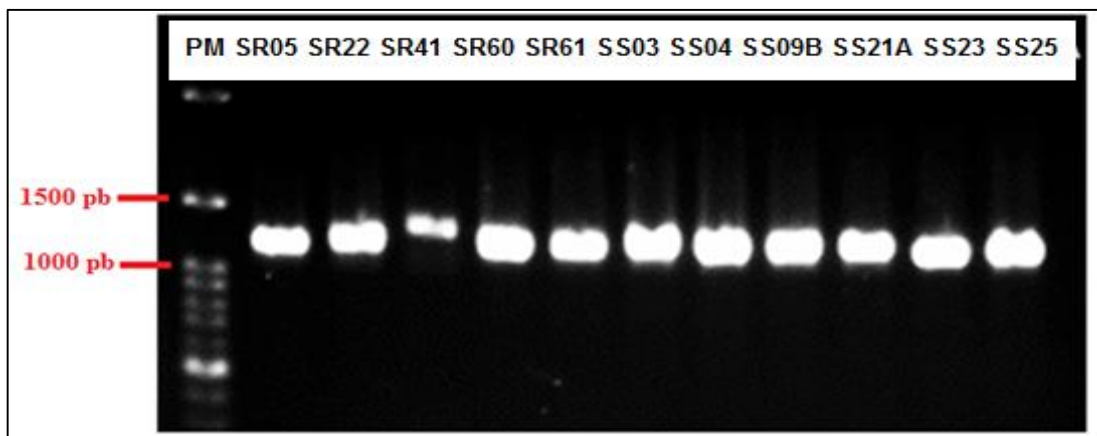
Tabela 8. Detecção do gene de L-asparaginase nos isolados bacterianos, por técnica de PCR utilizando os primers AsnZ1 e AsnZ2.

Isolado	Primers AsnZ1	Primers AsnZ2
SR05	+	+
SR11	-	-
SR21	-	-
SR22	+	+
SR41	+	+
SR44	-	-
SR60	+	+
SR61	+	+
SS03	+	+
SS04	+	+
SS08	-	-
SS09B	+	+
SS18	-	-
SS21A	+	+
SS23	+	+
SS25	+	+

Legenda: (+) Amplificado; (-) Não amplificado; SS_ e SR_ – isolados de bactérias de colônias sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

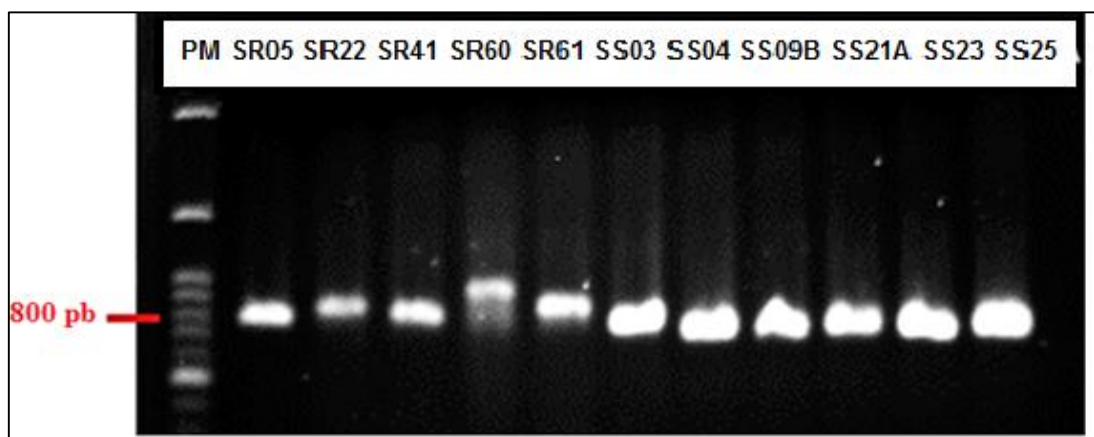
Os produtos das ampliações foram purificados e quantificados obtendo entre 10,3 ng/ μ L e 36,9 ng/ μ L de DNA com grau de pureza ($DO_{260-280}$) entre 1,60 e 2,93. De todas as amostras submetidas ao sequenciamento, foram obtidas seqüências de boa qualidade em apenas para quatro isolados, sendo SR22, SR60, SS04 e SS23, ambos produtos da amplificação com os primers AsnZ1. A análise molecular da seqüência do gene amplificado utilizando a ferramenta BLASTx, mostrou similaridade com a proteína L-asparaginase de bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 9 e Apêndices I, J, K e L). A análise das seqüências utilizando a ferramenta UNIPROT, apontou para proteína L-asparaginase de bactérias do gênero *Bacillus*, tendo como gene codificante *AsnZ* para asparaginase tipo II (Tabela 10 e Apêndices M, N, O e P).

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação do gene de L-asparaginase utilizando os primers AsnZ1.



Legenda: PM - Marcador do peso molecular em pares de base (pb) (Axygen); SS_ e SR_ – isolados de bactérias de colônias sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos da amplificação do gene de L-asparaginase utilizando os primers AsnZ2.



Legenda: PM - Marcador do peso molecular em pares de base (pb) (Axygen); SS_ e SR_ – isolados de bactérias de colônias sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

Tabela 9. Comparações das sequências parciais do gene de L-asparaginase de isolados de bactérias utilizando a plataforma Blastx.

Isolado	Alinhamento mais significativo do Blastx (GenBank ID)	E-value	Identidade máxima	Código de acesso - NCBI
SR22	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i>]	7e-25	99%	<u>WP_033883143.1</u>
SR60	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i>]	1e-43	93%	<u>CUB_26724.1</u>
SS23	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i>]	2e-50	100%	<u>WP_033883143.1</u>
SS04	L-asparaginase [<i>Bacillus tequilensis</i>]	6e-139	84%	<u>WP_046664295.1</u>

Legenda: SS_ e SR_ – isolados de bactérias de colônia sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

Tabela 10. Comparações das sequências parciais do gene de L-asparaginase de isolados de bactérias utilizando a plataforma Uniprot.

Isolado	Alinhamento mais significativo do Blast	E-value	Identidade máxima	Código de acesso
SR22	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i> XF-1]	3.3e-32	91.5%	<u>M4KPA7</u>
SR60	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i> XF-1]	4.9e-46	100%	<u>M4KPA7</u>

SS23	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i> XF-1]	5.3e-41	90.6%	<u>M4KPA7</u>
SS04	L-asparaginase [<i>Bacillus subtilis</i> XF-1]	2.9e-105	99.4%	<u>M4KPA7</u>

Legenda: SS_ e SR_ – isolados de bactérias de colônia sadia e roxa de *S. stellata*, respectivamente.

Mahajan et al. (2014) afirmam ser de extrema importância de busca por novos gêneros e espécies de bactérias produtores de L-asparaginase com a finalidade de obtenção de novas isoformas desta enzima.

Han et al. (2014) isolou uma cepa de *Staphylococcus sp.* em alimentos com atividade de L-asparaginase Tipo II e identificou o gene responsável pela produção de esta enzima. Entre os isolados de bactérias analisadas neste trabalho, um isolado do gênero *Staphylococcus* foi positivo quanto a produção da enzima L-asparaginase, confirmando a capacidade deste gênero para a produção da enzima analisada.

Na busca por novos microrganismos produtores de L-asparaginase para utilização na indústria alimentícia, grande atenção deve ser dada visando a segurança alimentar. Onishi et al (2010) e Jia et al. (2013) afirmam não ser indicado a utilização de L-asparaginase provenientes de cepas de *E. coli* selvagens ou recombinantes como é comumente utilizado para produção de L-asparaginase para fins terapêuticos. Para o tratamento de alimentos é aconselhável a utilização desta enzima proveniente de outras espécies e gêneros bacterianos, dentre eles *Bacillus*, por serem não patogênicas e livres de endo e exo toxinas (HARWOOD; WIPAT, 1996). Neste trabalho a maioria dos isolados produtores de L-asparaginase Tipo II pertencem ao gênero *Bacillus*, mostrando o grande potencial para produção de esta enzima para utilização pela indústria alimentícia.

Jia et al. (2013) conseguiu obter em *Bacillus subtilis* B11-06 o gene codificante para L-asparaginase Tipo II (*AsnZ*) obtido a partir do desenho de primers e amplificação por PCR, da sequência do gene em *Bacillus subtilis* 168. Foi montado um sistema de expressão heteróloga, onde verificaram que a atividade enzimática de L-asparaginase foi notadamente mais elevada no clone e que a enzima apresentou maior estabilidade térmica em comparação com a produzida

pela estipe selvagem, sendo significativamente promissor a utilização desta enzima pela indústria alimentícia, descrito como o primeiro sistema de expressão de *AsnZ* em *B. subtilis*.

Para detecção do gene *AsnZ* neste trabalho, foram construídos dois pares de primers, dentre eles o *AsnZ1*. As análises das sequências amplificadas pelo primer apontaram para L-asparaginase Tipo II de bactérias do gênero *Bacillus*, podendo este iniciador ser utilizado para estudos posteriores para produção desta enzima por sistema de expressão heteróloga, sendo necessário a verificação de possíveis sítios de inserção e restrição com base no sistema de expressão a ser utilizado.

5. CONCLUSÕES

- O tecido do coral *Siderastrea stellata* demonstrou ser uma fonte rica de bactérias produtoras de L-asparaginase, uma vez que dezesseis isolados apresentaram atividade enzimática.
- Os bastonetes Gram positivos formadores de endósporos, representaram o maior percentual de bactérias com atividade de L-asparaginase.
- A identificação molecular baseada no gene RNAr 16S, demonstrou que três isolados pertenceram ao gênero *Bacillus* e um isolado ao gênero *Staphylococcus*.
- A L-asparagina como fonte de nitrogênio no meio de cultivo, proporcionou uma maior atividade específica de L-asparaginase, comparado ao extrato de levedura.
- Os pares de primers AsnZ1 e AsnZ2, mostraram eficácia na detecção do gene de L-asparaginase Tipo II (*AsnZ*) em bactérias do gênero *Bacillus*, podendo ser utilizado em estudos de detecção da asparaginase tipo II.
- As bactérias obtidas do coral *Siderastrea stellata* possuem um potencial para estudos de prospecção biotecnológica. Estudos futuros mais detalhados são necessários para otimizar condições de cultivo com finalidade de obter uma alta produção de L-asparaginase pelos isolados analisados.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 115–122, 2002.
- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 9, p.2629–2635, 2004.
- ADEY, W. H. Coral reef ecosystems and human health: biodiversity counts! **Ecosystem Health**, v. 6. p. 227-236, 2000.
- AHMAD, N.; PANDIT, N. P.; MAHESHWARI, S. K. L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. **International Journal of Biosciences**, v. 2. p. 1-11, 2012.
- AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, p. 5655-5664, 2001.
- AVRAMIS, V. I.; PANOSYAN, E. H. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations. **Clinical Pharmacokinetics**, v.44. n.4, p. 367- 393, 2005.
- ARAÚJO, G.H. **Caracterização bacteriológica da água do mar e diversidade de bactérias cultiváveis associadas ao coral *Siderastrea stellata* nos recifes costeiros de Cabo Branco, João Pessoa-PB.** p. 69. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- ARISSETO, M.A.P.; TOLEDO, C. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.1, n.21, p. 9 -14. 2008.
- BAGERT, U.; RÖHM, K. H. On the role of histidine and tyrosine residues in *E. coli* asparaginase chemical modification and nuclear magnetic resonance studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 999, p. 36-41, 1989.
- BAHARUM, S. N.; BENG, E. K.; MOKHTAR, M. A. A. Marine microorganisms: potential applications and challenges. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 6, p. 555-564, 2010.

BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.JR.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHADOMY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5th Ed., **American Society for Microbiology**, Washington, DC, 1991.

BOREK, D.; JASKÓLSKI, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, v.48. p.93-902, 2001.

BOURNE, D.G., MUNN, C.B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, v.7. p. 1162–1174, 2005.

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, p.248-254, 1976.

BRANDÃO, R. L; CASTRO, I.M.C. A Biologia Molecular e a Produção de Enzimas de Interesse Comercial. In: Suraia Said; Rosemeire C.L.R. Pietro. (Org.). Enzimas como agentes biotecnológicos. 1 ed. Ribeiro Preto: **Legis Summa Ltda**, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico nº 01/2016**. Esclarecimentos em relação à prorrogação do prazo para publicação da lista de produtos estratégicos para o sistema único de Saúde (SUS) e para envio de propostas de projeto de Parceria para Desenvolvimento Produtivo (PDP) para o ano de 2016. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/12/Informe-T--cnico-012016---12-02-16.pdf>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

BROOME, J. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects its properties of the l-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **Journal of Experimental Medical Sciences**, v. 118, p. 99-117, 1963.

BROOME, J.D. Evidence that the l-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, p. 1114-1115, 1961.

BUSHMAN, J.; PALMIERI, D.; WHINNA, H.; CHURCH, F. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v. 24, n. 7, p. 559-565, 2000.

CAPIZZI, R.L. Asparaginase revisited. **Leukemia Lymphoma**, v.10. p. 147-150, 1993.

CASOTTI, J. F. et al. Uso de matérias primas da agroindústria – garapa e extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 653–658, 2007.

CASTRO, A.P.; ARAÚJO JR, S.D.; REIS, A.M.M; MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; PAPPAS JR; G., RODRIGUES, T.B.; THOMPSON, F.L.; KRÜGER, R.H. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Environmental Microbiology**. v.59, p. 658-667, 2010.

CASTRO, C. B. **Recifes de coral: avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha**. Relatório do workshop sobre os recifes de coral brasileiros, Tamandaré, Pernambuco. p. 101, 1997.

CAMPBELL, H. A.; MASHBURN, L. T.; BOYSE, E. A.; OLD, L. J. Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. their separation, purification, and antitumor activity. **Biochemistry**, v.6, p.721–730.1967.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 793–810, 2011.

CEDAR, H.; SCHWARTS, J. H. Localization of two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 3753-3755, 1967.

CHENG, H.R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacterial and yeast. **Biotechnology Letters**, v.28, n.1, p.55-59. 2006.

CHOHAN, S.M.; RASHID, N. TK1656, a thermostable Lasparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.116, p. 438-443, 2013.

CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de l-asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l organisme. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, v.19. p.369–76, 1922.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H. H.; **Ecosistemas marinhos: recifes, praias e manguezais**. Editora da Universidade Federal de Alagoas- ADUFAL f. 54 Macei, 2005.

COSTA, D.L.; GOMES, P.B.; SANTOS, A.M.; VALENCA, N.S.; VIEIRA, N.A.; PEREZ C.D. Morphological plasticity in the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum* as an adaptive strategy. **Annales Zoologici Fennici**, v. 48, p. 349–358, 2011.

DHANAM, J.G.; KANNAN, S. L-asparaginase- types, perspectives and applications. **Biotechnology Advances**, v.13 n.51. p. 1-5, 2013.

DHALE, M. A.; MOHAN-KUMARI, H. P. A comparative rapid and sensitive method to screen L-asparaginase producing fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 102, p. 66-68, 2014.

DISTASIO, J.A.; NIEDERMAN, R.A.; KAFKEWITZ, D.; GOODMAN, D. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6929-6933, 1976.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A.M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children’s Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, p. 2734–2739, 2002.

EDEN, O.B.; SHAW, M.P.; LILLEYMAN, J.S.; RICHARDS, S. Non-randomised study comparing toxicity of *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukaemia. **Medical and Pediatric Oncology**, v.18. p. 497-502. 1990.

FABER, J. M. et al. **Molecular typing and differentiation**. In: FABER, J. M. et al. (Org.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C.: APHA, Cap. 11, p. 127-158, 2001.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4° Ed. Artmed, 2010.

FERNANDEZ, C.; CAI, X.; ELOZORY, A.; LIU, C.; PANETTA, J.; JEHA, S.; MOLINELLI, A.; RELLING, M. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with

leukemia. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 7, p. 478-487, 2013.

FERRARA, M. A. et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, n. 7, p. 1457–1463, 2006.

FERREIRA, C.E.L.; FLOETER, S.R.; GASPARINI, J.L.; JOYEUX, J.C.; FERREIRA, B.P. Trophic structure patterns of Brazilian reef fishes: a latitudinal comparison. **Journal of Biogeography**, v. 31, p. 1093–1106, 2004.

FISHER, S. H.; WRAY, L. V. JR. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-Asparaginase. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p 2148-2154, 2002.

GERVAIS, D.; ALLISON, N.; JENNINGS, A.; JONES, S.; MARKS, T. Validation of a 30-year-old process for the manufacture of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.36, p. 453-460, 2013.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; HOOD, W.A.; KRIEG, N.R. Methods for general and molecular bacteriology. **ASM Press**, pp. 791, 1994.

GHOSHON, M.B.; BERENJIAN, A.; HEMMATI, S.; DABBAGH, F.; KARIMI, Z.; NEGAHDARIPOUR, M.; GHASEMI, Y. Extracellular production of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*: medium optimization using response surface methodology. **The International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.21. p.487–495. 2015.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73. p. 3272-3282, 2007.

GRAHAM, M.L. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1293-1302, 2003.

GRISI, T.C.S.L. **Diversidade de bactéria e archaea do solo do Cariri paraibano e prospecção de celulases e xilanases em clones metagenômicos e isolados bacterianos**. 190f. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

GUILLEME, C.; DELGADO, R.; NAVARRO, J.; AGUIRRE, I.; SOLA, S.; CODINA, J.; SOLER, J.; RAMIREZ, L.; GARICANO, J.; MARTINEZ, B.; LOPES, L. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **Anales de Pediatría (Barc)**, v. 79, p. 311-329, 2013.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 23-26, 1997.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Design of experiments and artificial neural network linked genetic algorithm for modeling and optimization of l-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 1, p. 50-58, 2011.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v. 11, p. 159-167, 1991.

HAIKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**. v. 89, p. 17-34, 2003.

HAN, S.; JUNG, J.; PARK, W. Biochemical characterization of l-asparaginase in NaCl-tolerant *Staphylococcus sp. OJ82* isolated from fermented seafood. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1096–1104, 2014.

HARWOOD, C.; WIPAT, A. Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. **FEBS Lett**, v.389.p. 84- 87. 1996.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; ABUL-HAMEED, A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus sp.FH5*. **Annals of Microbiology**, v.56, p. 247–52, 2006.

HENDRIKSEN, H.V.; KORNBRUST, B.A.; OSTERGAARD, P.R.; STRINGER, M.A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57. p. 4168–4176, 2009.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B. O.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. **Journal of Biology Molecular**, v. 390, p. 560-577, 2009.

HONG, S. J. et al. Cloning, expression, and characterization of thermophilic L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 500–508, 2014.

HUANG, L. et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 5, p. 1561–1569, 2014.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Tibtech**, v. 14, p. 190- 197, 1996.

JIA, M.; XU, M.; HE, B.; RAO, Z. Cloning, expression, and characterization of L-Asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61. p.9428–9434.2013.

JONER, P.E Purification and properties of L-Asparaginase by from *Acinetobacter colcoacetikus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.438, p. 287-295, 1976.

KAMBLE, V. P. et al. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 43, n. 6. p. 391–394, 2006.

KENARI, S.L.D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: optimization by response surface methodology. **Food Bioproducts Processing**, v.89, p. 315–321, 2011.

KHUSHOO, A. et al. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein Expression and Purification**, v. 38, n. 1, p. 29–36, 2004.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of norma guinea pig serum. i. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, p. 565-582, 1953.

KIRIYAMA, M. *et al.* Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. **Leukemia**, v. 3, n. 4, p. 294-297, 1989.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **Journal of Biotechnology**, v.119, p. 309-323, 2005.

KURTZBERG, J. **Asparaginase. In: Cancer Medicine**, 5 eds., sec. 14 – Chemoterapeutic Agents, cap. 51, pp. 699-705. B. C. Decker Inc, Hamilton, Ontario, 2000.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LANVERS, C.; PINHEIRO, J. P. V.; HEMPEL, G.; WUERTHWEIN, G.; BOOS, J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. **Analytical Biochemistry**. v. 309. p. 117-126, 2002.

LIMA, W.S.G. **Geologia e Geomorfologia dos Recifes de Maracajaú-RN e plataforma rasa adjacente**. 94 f. 2002. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Geodinâmica e Geofísica (PPGG). UFRN, Natal. 2002.

LINS-DE-BARROS, M.M.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; MONTEIRO, V.A.; TURQUE, A.S.; SILVEIRA, C.B.; ALBANO, R.M.; CLEMENTINO, M.M.; MARTINS, O.B. Archaea, Bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussimilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, v.59, p. 523-532, 2010.

LINS-DE-BARROS. M.M. et al. Microbial community compositional shifts in bleached colonies of the brazilian reef-building coral *Siderastrea stellata*. **Microbiology Ecology**, v. 65, p. 205–213. 2013.

LOFTUS, P. Lundbeck to halt sale of leukemia drug, citing supply problems. **Automated Trader**, 2012.

MACRAE, A. The use of 16S rRNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 77-82, 2000.

MAHAJAN, R. V.; KUMAR, V.; RAJENDRAN, V.; SARAN, S.; GHOSH, P. C.; SAXENA, R. K. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-

glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. **PLoS ONE**, v.9, p .99037-10.1371, 2014.

MAHAJAN, R. V.; KUMAR, V.; RAJENDRAN, V.; SARAN, S.; GHOSH, P. C.; SAXENA, R. K. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, v. 125. p. 11–16, 2012.

MANNA, S.; SINHA, A.; SADHUKHAN, R.; CHAKRABARTY, S.L. Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiology**, v.30, p. 291-298, 1995.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, J.C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 12, n. 1, pp. 50-55., 1963.

MEDEIROS, D. S. **Caracterização de bactérias cultiváveis isoladas do coral *Siderastrea Stellata* dos recifes costeiros do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba**. 60f. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2014.

MELO, R.S.; LINS. R.P.M.; ELOY, C.C. O impacto do turismo em ambientes recifais: caso Praia Seixas-Penha, Paraíba, Brasil. **REDE – Revista Eletrônica do Prodepa**, v. 8. p.67-83, 2014.

MESAS, J. M.; GIL, J.A.; MARTIN, J.F. Characterization and partial purification of l-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p. 515-519, 1990.

MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–40, 2006.

MINIM, L. A.; ALEGRE, R. M. Production of enzyme L-asparaginase from *Erwinia aroideae*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35. n.2. p. 277-283, 1992.

MMA: Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil Situação Atual e Perspectivas**. Disponível em :<

http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/18_introducaobr.pdf> Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 577-587, 2013.

MOOLA, Z. B. *et al.* *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. **Biochemical Journal**, v. 302, n. 3, p. 921-927, 1994.

MOTTRAM, D.S.; WEDZICHA, B.L.; DODSON, A.T. Food chemistry: acrylamide is formed in the maillard reaction. **Nature**, v.419, p. 448-449, 2002.

MOUCHKA, M. E.; HEWSON, I.; HARVELL, C.D. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, n. 4, p. 662–674. 2010.

MPF: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SÃO PAULO. **RECOMENDAÇÃO Nº 11/2013**. Disponível em: <<http://www.prsp.mpf.gov.br/sala-de-imprensa/pdfs-das-noticias/Recomendacao%20ANVISA.pdf>> Acesso em: 02 de Dezembro de 2016.

MUKHERJEE, J.; MAJUMADAR, S.; SCHEPER, T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, p. 180–184, 2000.

MÜLLER, H.J.; BOOS, J. Use of L-Asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology: Hematology**, v. 28, p. 97-113, 1998.

MUNN, C. B. **Marine Microbiology: ecology & applications**. Londres: BIOS Scientific Publishers, 2004.

MINTZ, S.W. Comida e antropologia. Uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 16 p. 12, 2001.

NAGARETHINAM, S.; NAGAPPA, A. N.; UDUPA, N.; VENKATA RAO J.; MEENASHI VANATHI, B. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**, v.1.p.159-168, 2012.

NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48. n. 3, p. 331–336, 2008.

NEVES, E. G.; SILVEIRA, F. L.; PICHON, M.; JOHNSON, R. Cnidaria, scleractinia, *Siderastreidae*, *Siderastrea siderea* (Ellis and Solander, 1786): Hartt expedition and the first record of a Caribbean *Siderastrea* in tropical Southwestern Atlantic. **Check List**, v. 6, n. 4, p. 505–510, 2010.

NOMME, J.; SU, Y.; KONRAD, M.; LAVIE, A. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**. v. 51, n. 34, p. 6816-6826, 2012.

NOVOZYMES. A low-acrylamide future beckons. **Health and nutrition information sheet**. Disponível em: <http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2013/11/new-novozymes-solution-enables-acrylamide-mitigation-in-even-more-product-categories>. Acesso em: 02 de Dezembro de 2016.

NUNES, F. L. D.; NORRIS, R. D.; KNOWLTON, N. Long distance dispersal and connectivity in Amphi-Atlantic corals at regional and basin scales. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, pp.22298, 2011.

NITZKE, S.; FREELAND-GRAVES, J. Position of the American Dietetic Association: total diet approach to communicating food and nutrition information. **Journal of the American Dietetic Association**, v.107. n.7. p.1224-32, 2007.

OETTGEN, H. F.; OLD, L. J.; BOYSE, E. A.; CAMPBELL, H. A. AND PHILIPS, F. S., Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**. v. 27, p. 2619-2631, 1967.

ONISHI, Y.; YANO, S.; THONGSANIT, J.; TAKAGI, K.; YOSHIMUNE, K.; WAKAYAMA, M. Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.517–524. 2010.

ORLANDELLI, R.; SPECIAN, V.; FELBER, A.; PAMPHILE, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; AND OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v.9, p. 1–55, 1986.

PAULA, P. Medicamentos biológicos lideram lista de novas propostas de PDP. **Ministério da Saúde**. 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/18638-medicamentos-biologicos-lideram-lista-de-novos-projetos-de-pdp>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

PANOSYAN, E. et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology and Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.

PAUL, J.H.; COOKSEY, K.E. Regulation of L-Asparaginase in a *Chlamydomonas* species in response to ambient concentrations of combined nitroge. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 1, p. 9-12, 1981.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, v.109, p. 386-392, 2008.

PRAKASHAM, R. S.; HYMAVATHI, M.; RAO, C. S.; AREPALLI, S. K.; RAO, J. V., KENNADY, P. K.; NASARUDDIN, K.; VIJAYAKUMAR, J. B.; SARMA, P. N. Evaluation of antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 72–80, 2010.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.

QUEIROZ, Q.S. **Atividade enzimática e antimicrobiana das bactérias isoladas do coral *Siderastrea stellata* dos Recifes de Cabo Branco, Paraíba**. 54f. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2014.

RAHA, S.K.; ROY, S.K.; DEY, S.K.; CHAKRABOUTY, S.L. Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpon MB-10*. **Biochemistry International**, v.21, p.977-1000, 1990.

- RESHEF, L.; KOREN, O.; LOYA, Y.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. The coral probiotic hypothesis. **Environmental Microbiology**, v.8, p.2068–2073, 2006.
- ROHWER, F.; BREITBART, M.; JARA, J.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastrea franksi*. **Coral Reefs**, v.20, p. 85–91, 2001.
- ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribuicion of coral- associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**. v. 243, p. 1-10, 2002.
- SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnologico. **Eventos Ed**, 121 f. 2002.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p. 487, 1988.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANTANA, J.K.S. **Branqueamento do coral escleractínio *Siderastrea stellata* dos recifes costeiros da Paraíba e taxonomia e cultivo dos microssimbiontes associados**.49f. 2011. Monografia (Licenciatura em Biologia), Universidade Federal de Campina Grande, Cuité. 2011.
- SCHMIDT, F. Saúde garante medicamento contra leucemia infantil. **Portal Saúde**, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/11749/162/saude-garantemedicamento-contraleucemia-infantil.html>>. Acesso em: 02/02/2014.
- SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.100. p. 1-10, 2016.
- SIDORUK, K. V.; POKROVSKY, V. S.; BORISOVA, A. A. Creation of a producent, optimization of expression, and purification of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-Asparaginase. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.152.p. 219–223, 2011.
- SILVA FILHO, G. N; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia – manual de aulas práticas**. f. 155 Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SILVA, J.V.C. **Ciclo reprodutivo do coral *Montastraea cavernosa* Linnaeus, 1767 (Cnidaria, Scleractinia) de recifes do sul da Bahia.** 25p. 2007. Monografia (Bacharelado em Biologia Marinha) - Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2007.

SILVA, R.M.S.D. **Diversidade de bactérias cultiváveis associadas às colônias sadias e necrosadas do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) dos recifes costeiros de Carapibus, Paraíba.** 57f. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2445-2451, 2004.

SINGH, Y.; GUNDAMPATI, K. R.; JAGANNADHAM, M.V.; SRIVASTAVAET, S.K. Extracellular l-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1759–1774, 2013.

SMIBERT, R. M., KRIEG, N. R. Caracterização fenotípica. Em: GERHARDT, P., MURRAY, R. G., WOOD, W. A., KRIEG, N. R., (Editores). Métodos para bacteriologia geral e molecular. **Sociedade Americana de Microbiologia**, Washington, D. C, pp. 607-654, 1994.

SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 229, 2005.

SOARES, A. L.; GUIMARÃES, G. M.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M.; ABRAHÃO-NETO, J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* l-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 163-170, 2002.

SONG, P.; YE, L.; FAN, J.; LI, Y.; ZENG, X.; WANG, Z.; WANG, S.; ZHANG, G.; YANG, P.; CAO, Z.; JU, D. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, v.6. p.3861-3873. 2015

STECHEER, A.L.; MORGANTETTI, P.; DE, D.; POLIKARPOV, I.; ABRAHÃO-NETO, J. 1999. Stability of L-asparaginase-an enzyme used in Leukemia treatment. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 74. P. 1-9.1999.

SUN, D.; P. SETLOW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* ans operon, which codes for L-asparaginase and L-aspartase. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3831–3845, 1991.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR S. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2015.

THOMAS, X.; CANNAS, G.; CHELGHOUM, Y.; GOUGOUNON, A. Therapeutic alternatives to native L-asparaginase in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Bulletin du Cancer**, v. 97, n. 9, p. 1105–17, 2010.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168–178, 2011.

VERMA, N. K; KUMAR, G; KAUR, A. S. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.45-62, 2007.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444-450, 2003.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v.25. p. 515-536, 2007.

WINK, P. L. **Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* em *Escherichia coli***. 53 p. (Dissertação de mestrado) - Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WINK, P. L.; BOGDAWA, H. M.; RENARD, G.; CHIES, J. M.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Comparison between two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II constructions: cloning,

heterologous expression, purification, and kinetic characterization. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, p. 13-19, 2010.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms. **Science**, v. 163, p. 150-163, 1969.

WOESE, C. R.; FOX, G. E.; ZABLEN, L.; UCHIDA, T.; BONEN, L.; PECHMAN, K.; LEWIS, B. J.; STAHL, D. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. **Nature**. v. 254, p 83-86, 1975.

WOESE, C. R., FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74. p. 5088-5090, 1977.

WRISTON, J.; YELLIN, T.O. "L-Asparaginase: a review" **Advances Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.39, p 185-248, 1973.

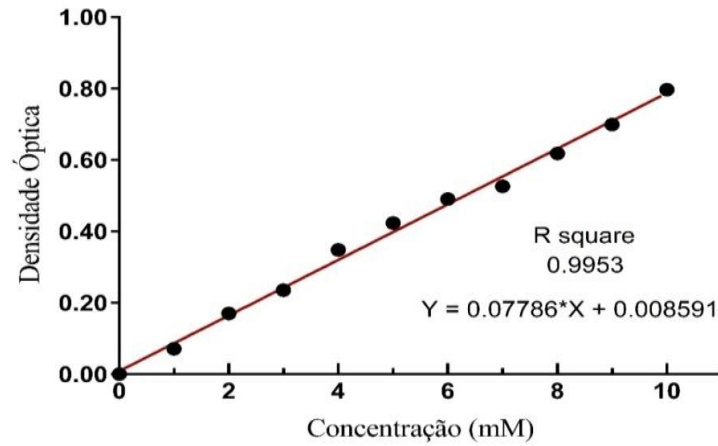
YOGENDRA, S.; SRIVASTAVA. L-asparaginase production by a new isolate *Bacillus aryabhatai* strain ITBHU02 in solid state culture, 1st International Conference on Biosciences and Bioengineering: **A collaborative Approach**, 2013.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B. et al. The anti-asparaginase antibodies correlate with L-asparaginase activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 5, p. 931–936, 2007.

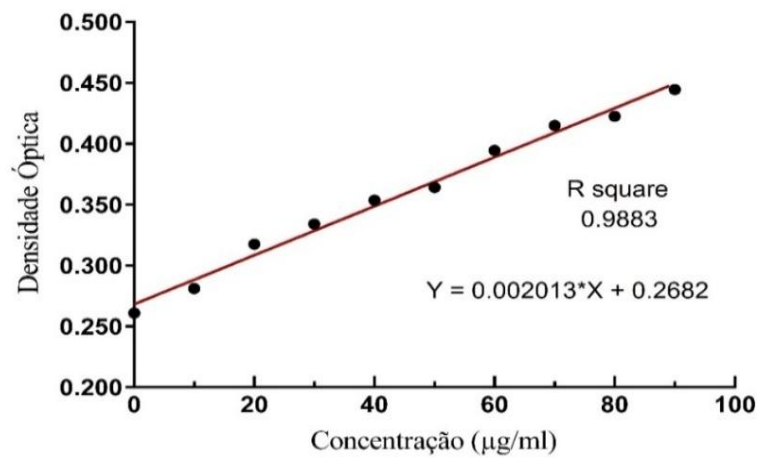
ZUO, S.H.; ZHANG, T.; JIANG, B.; WANMENG, M. Recent research progress on microbial L-Asparaginases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99. P. 1069–1079. 2015.

APÊNDICES

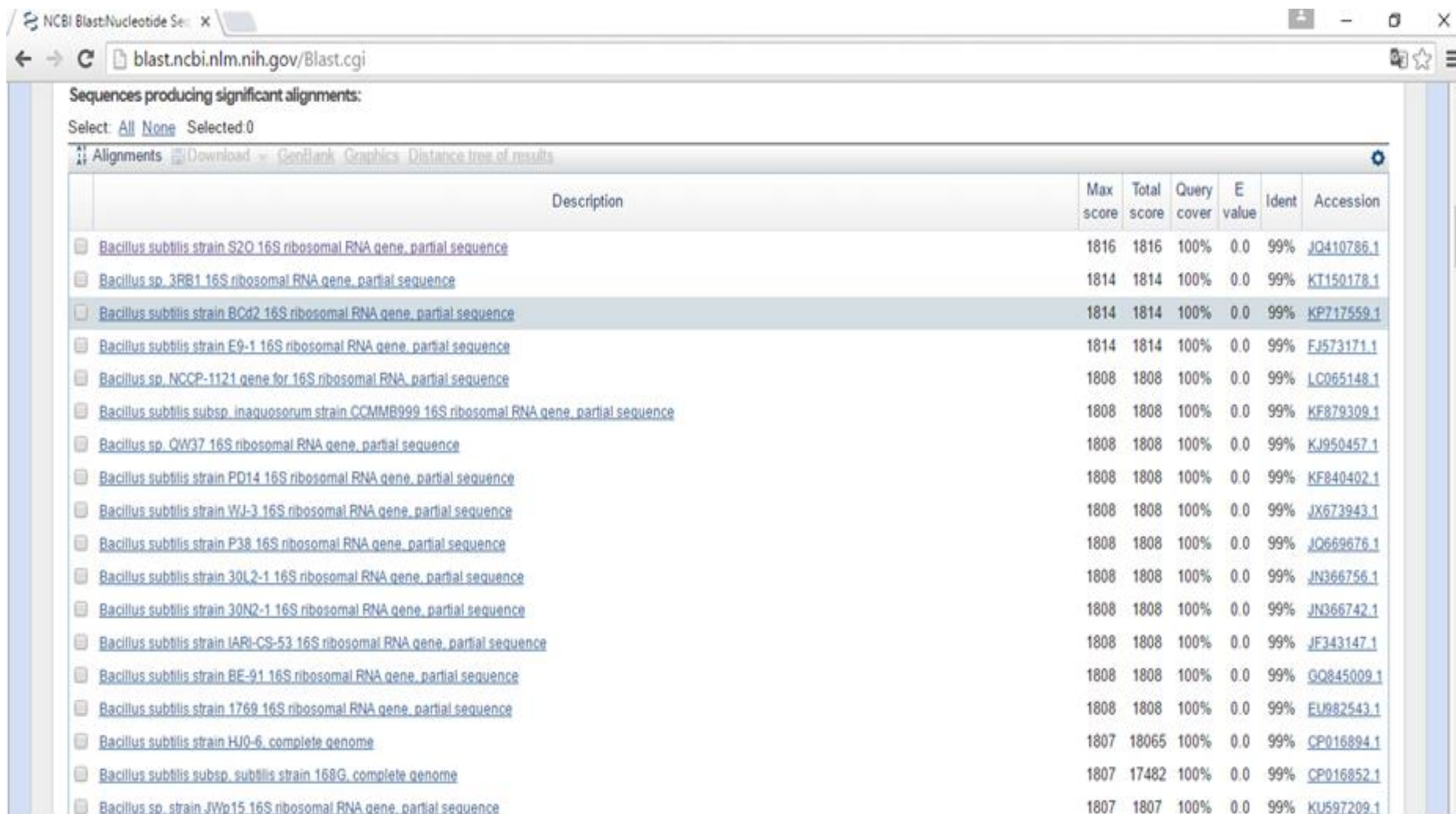
Apêndice A – Curva de calibração de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), utilizando o reagente de Nessler.



Apêndice B – Curva de calibração de albumina sérica bovina (BSA), utilizando o reagente de Bradford.



Apêndice E– Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene RNAr 16S do isolado SR41 e as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTn. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 99% com a sequência analisada



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus subtilis strain S2O 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1816	1816	100%	0.0	99%	JQ410786.1
Bacillus sp. 3RB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	100%	0.0	99%	KT150178.1
Bacillus subtilis strain BCd2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	100%	0.0	99%	KP717559.1
Bacillus subtilis strain E9-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	100%	0.0	99%	FJ573171.1
Bacillus sp. NCCP-1121 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	LC065148.1
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain CMMR999 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KF879309.1
Bacillus sp. QW37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KJ950457.1
Bacillus subtilis strain PD14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KF840402.1
Bacillus subtilis strain WJ-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	JX673943.1
Bacillus subtilis strain P38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	JQ669676.1
Bacillus subtilis strain 30L2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	JN366756.1
Bacillus subtilis strain 30N2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	JN366742.1
Bacillus subtilis strain IARI-CS-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	JF343147.1
Bacillus subtilis strain BE-91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	GQ845009.1
Bacillus subtilis strain 1769 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	EU982543.1
Bacillus subtilis strain HJ0-6, complete genome	1807	18065	100%	0.0	99%	CP016894.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G, complete genome	1807	17482	100%	0.0	99%	CP016852.1
Bacillus sp. strain JWp15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1807	1807	100%	0.0	99%	KU597209.1

Apêndice F – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene RNAr 16S do isolado SR60 e as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTn. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 99% com a sequência analisada.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. NIASMI gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1746	1746	100%	0.0	99%	LC027447.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain ANR 35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KX670428.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain HJ0-6, complete genome	1744	17428	100%	0.0	99%	CP016894.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G, complete genome	1744	16913	100%	0.0	99%	CP016852.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. strain JWp15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KU597209.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, strain RI2-6	1744	1744	100%	0.0	99%	LT604403.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, strain RI2-30	1744	1744	100%	0.0	99%	LT604375.1
<input type="checkbox"/> Bacillus tequilensis partial 16S rRNA gene, strain S2-57	1744	1744	100%	0.0	99%	LT604334.1
<input type="checkbox"/> Bacillus tequilensis partial 16S rRNA gene, strain S1-84	1744	1744	100%	0.0	99%	LT604234.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain PS38 genome	1744	17075	100%	0.0	99%	CP016789.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain PG10 genome	1744	16649	100%	0.0	99%	CP016788.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain IIG-Bs27-47-24 genome	1744	16754	100%	0.0	99%	CP016787.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain Y82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KU601297.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain Y28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KU601293.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain KCTC 3135, complete genome	1744	17410	100%	0.0	99%	CP015375.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain MdqB45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KU570452.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. strain BAB-5930 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	100%	0.0	99%	KX548947.1

Apêndice G – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene RNAr 16S do isolado SS23 e as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTn. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 99% com a sequência analisada.

	score	score	cover	value	
Bacillus subtilis strain BCd2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1740	1740	100%	0.0	99% KP717559.1
Bacillus subtilis strain UFLA FFT33.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1736	1736	100%	0.0	99% KM482851.1
Bacillus subtilis strain KPC/-0/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1736	1736	100%	0.0	99% JQ308568.1
Bacillus subtilis strain 30L2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1736	1736	100%	0.0	99% JN386756.1
Bacillus subtilis strain SSRBE23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KX673638.1
Bacillus tequilensis strain SSRAF41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KX673636.1
Bacillus subtilis strain ANR 35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KX670428.1
Bacillus subtilis strain HJ0-6, complete genome	1735	17340	100%	0.0	99% CP016894.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G, complete genome	1735	16832	100%	0.0	99% CP016852.1
Bacillus sp. strain JWp15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU597209.1
Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, strain RI2-6	1735	1735	100%	0.0	99% LT604403.1
Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, strain RI2-30	1735	1735	100%	0.0	99% LT604375.1
Bacillus tequilensis partial 16S rRNA gene, strain S2-57	1735	1735	100%	0.0	99% LT604334.1
Bacillus tequilensis partial 16S rRNA gene, strain S1-84	1735	1735	100%	0.0	99% LT604234.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain PS38 genome	1735	16999	100%	0.0	99% CP016789.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain PG10 genome	1735	16570	100%	0.0	99% CP016788.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain IIG-Bs27-47-24 genome	1735	16677	100%	0.0	99% CP016787.1
Bacillus subtilis strain Y82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU601297.1
Bacillus subtilis strain Y28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU601293.1
Bacillus tequilensis strain FR9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU587453.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain KCTC 3135, complete genome	1735	17329	100%	0.0	99% CP015375.1
Bacillus subtilis strain LR2FG15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU664837.1
Bacillus subtilis strain CC2HG6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1735	1735	100%	0.0	99% KU601353.1

Apêndice H – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene RNAr 16S do isolado SR21 e as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTn. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 99% com a sequência analisada.

NCBI Blast:Nucleotide Seq x

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 100

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. ECH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	100%	0.0	99%	KP644777.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. ECH5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	100%	0.0	99%	KP644776.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. DGM MH2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1810	1810	100%	0.0	99%	JF923458.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd732e07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1810	1810	100%	0.0	99%	HM293981.1
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nbw322f07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1810	1810	100%	0.0	99%	GQ089504.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain JRT29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU550237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain NDG19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU550214.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain MAP7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU550190.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain F2-1-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX349995.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain 18CR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX214048.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. CSC26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX289497.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain TM2-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX237940.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain NCIM5270 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX018340.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. CTI06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX344929.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. CTI05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX344928.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. 65J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU933296.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. 62J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU933295.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. 70J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU933294.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus sp. 12J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU933293.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SM5-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KX267887.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain BJ-DEBCR-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	100%	0.0	99%	KU301333.1

Apêndice I – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SR22 com as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTx. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 99% com a sequência analisada.

NCBI Blast:Nucleotide Seq

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_727788564

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	7e-25	99%	WP_033883143.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_015382677.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase 2 precursor [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	CUB26724.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_015482754.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_047182029.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. LM 4-2]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_046380761.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_029317229.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_046664295.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	111	111	24%	8e-25	99%	WP_015252898.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	110	110	24%	9e-25	99%	WP_063336003.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	110	110	24%	1e-24	97%	WP_042977297.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	109	109	24%	4e-24	97%	WP_038428321.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	108	108	24%	5e-24	97%	WP_003246337.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	108	108	24%	7e-24	97%	WP_014478726.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	108	108	24%	9e-24	97%	WP_032724846.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	108	108	24%	1e-23	97%	WP_043858188.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	108	108	24%	1e-23	97%	WP_003234769.1
<input type="checkbox"/> asparaginase [Bacillus subtilis]	108	108	24%	1e-23	97%	AIN95080.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	107	107	24%	2e-23	97%	WP_017695028.1

Apêndice J – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SR60 com as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTx. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 93% com a sequência analisada.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> L-asparaginase 2 precursor [Bacillus subtilis]	160	160	37%	1e-43	93%	CUB26724.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	160	160	37%	1e-43	93%	WP_015482754.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	160	160	37%	1e-43	93%	WP_046864295.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	160	160	37%	1e-43	93%	WP_015252898.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. LM 4-2]	160	160	37%	1e-43	93%	WP_046380761.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	160	160	37%	1e-43	93%	WP_015382677.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	160	160	37%	2e-43	93%	WP_047182029.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	159	159	37%	6e-43	92%	WP_033883143.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	159	159	37%	6e-43	92%	WP_038428321.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	159	159	37%	6e-43	92%	WP_029317229.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	159	159	37%	7e-43	92%	WP_063336003.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	159	159	37%	7e-43	91%	WP_042977297.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	159	159	37%	8e-43	92%	WP_003246337.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	158	158	37%	1e-42	92%	WP_014478726.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	157	157	37%	3e-42	92%	WP_043858188.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	157	157	37%	3e-42	92%	WP_032724846.1
<input type="checkbox"/> asparaginase [Bacillus subtilis]	157	157	37%	3e-42	92%	AIN95080.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	157	157	37%	3e-42	92%	WP_003234769.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	157	157	37%	3e-42	92%	WP_017895028.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	156	156	37%	7e-42	91%	WP_014475697.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. A053]	156	156	37%	9e-42	89%	WP_040084270.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. JS]	155	155	37%	1e-41	89%	WP_014662656.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	154	154	37%	6e-41	88%	KFF57621.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus mojavensis]	145	145	31%	1e-37	86%	WP_024120105.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	144	144	31%	3e-37	86%	WP_024715559.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	144	144	31%	4e-37	86%	WP_064815253.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus axarquiensis]	142	142	31%	2e-36	85%	WP_059353048.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus malacitensis]	142	142	31%	2e-36	85%	WP_059292027.1

Apêndice K – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SS23 com as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTx. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 100% com a sequência analisada.

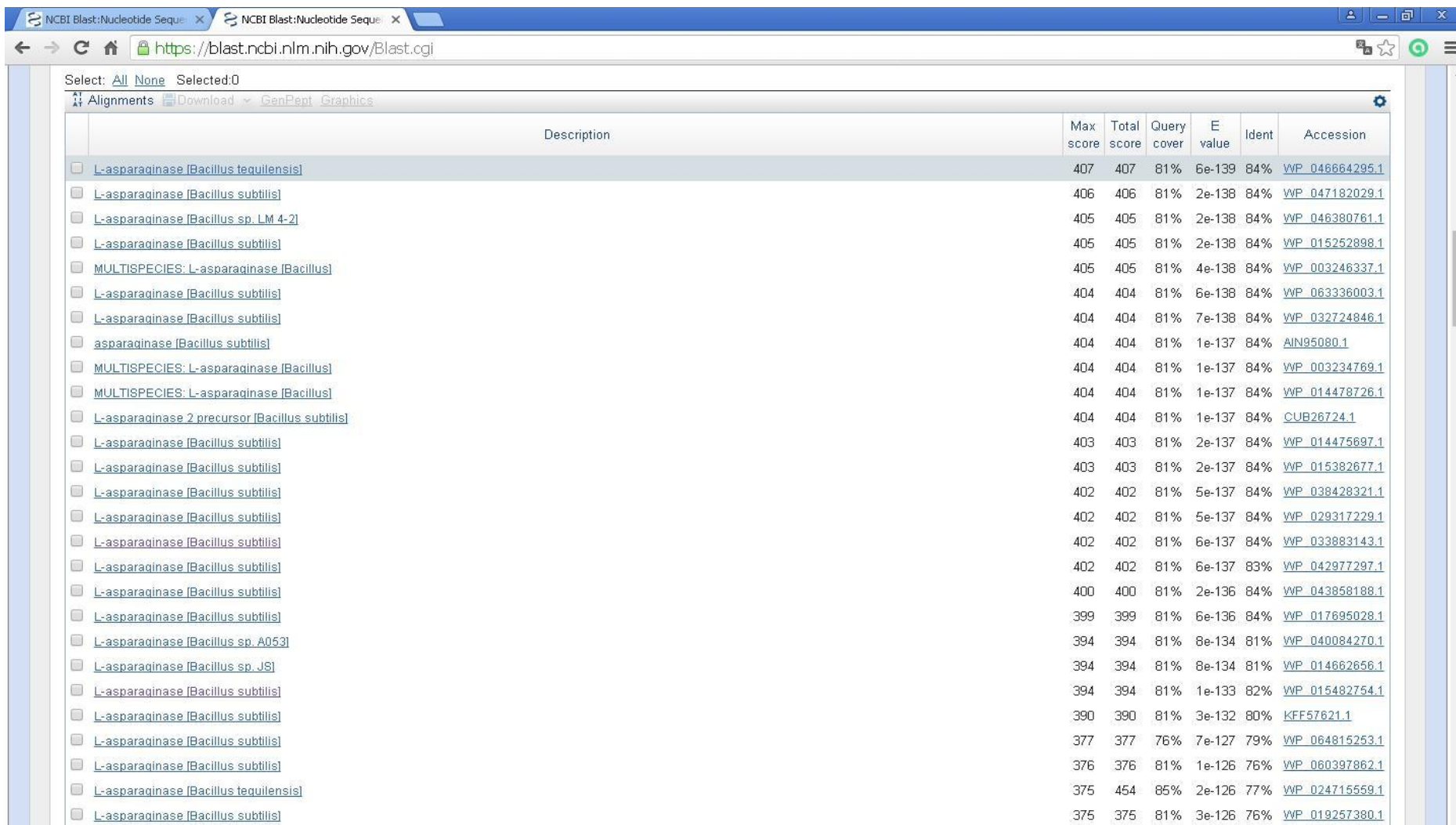
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_033883143.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. LM 4-2]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_046380761.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_046664295.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_029317229.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_015252898.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_063336003.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase 2 precursor [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	CJUB26724.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_047182029.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_015382677.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_015482754.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	177	177	34%	2e-50	100%	WP_042977297.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	176	176	34%	1e-49	99%	WP_003246337.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	176	176	34%	1e-49	99%	WP_038428321.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	175	175	34%	2e-49	99%	WP_014478726.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	174	174	34%	3e-49	99%	WP_032724846.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	174	174	34%	4e-49	99%	WP_043858188.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	174	174	34%	4e-49	99%	WP_003234769.1
<input type="checkbox"/> asparaginase [Bacillus subtilis]	174	174	34%	5e-49	99%	AIN95080.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	173	173	34%	1e-48	99%	WP_017695028.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	173	173	34%	1e-48	98%	WP_014475697.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. A053]	171	171	34%	1e-47	95%	WP_040084270.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	170	170	34%	1e-47	95%	KFF57621.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. JS]	170	170	34%	1e-47	95%	WP_014662656.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	160	160	34%	8e-44	91%	WP_024715559.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus malacitensis]	146	146	31%	3e-38	91%	WP_059292027.1

Apêndice L – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SS04 com as sequências disponibilizadas pelo GenBank através do BLASTx. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade acima de 84% com a sequência analisada.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	407	407	81%	6e-139	84%	WIP_046664295.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	406	406	81%	2e-138	84%	WIP_047182029.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. LM 4-2]	405	405	81%	2e-138	84%	WIP_046380761.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	405	405	81%	2e-138	84%	WIP_015252898.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	405	405	81%	4e-138	84%	WIP_003246337.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	404	404	81%	6e-138	84%	WIP_063336003.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	404	404	81%	7e-138	84%	WIP_032724846.1
<input type="checkbox"/> asparaginase [Bacillus subtilis]	404	404	81%	1e-137	84%	AIN95080.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	404	404	81%	1e-137	84%	WIP_003234769.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: L-asparaginase [Bacillus]	404	404	81%	1e-137	84%	WIP_014478726.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase 2 precursor [Bacillus subtilis]	404	404	81%	1e-137	84%	CUB26724.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	403	403	81%	2e-137	84%	WIP_014475697.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	403	403	81%	2e-137	84%	WIP_015382677.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	402	402	81%	5e-137	84%	WIP_038428321.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	402	402	81%	5e-137	84%	WIP_029317229.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	402	402	81%	6e-137	84%	WIP_033883143.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	402	402	81%	6e-137	83%	WIP_042977297.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	400	400	81%	2e-136	84%	WIP_043858188.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	399	399	81%	6e-136	84%	WIP_017695028.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. A053]	394	394	81%	8e-134	81%	WIP_040084270.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus sp. JS]	394	394	81%	8e-134	81%	WIP_014662656.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	394	394	81%	1e-133	82%	WIP_015482754.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	390	390	81%	3e-132	80%	KFF57621.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	377	377	76%	7e-127	79%	WIP_064815253.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	376	376	81%	1e-126	76%	WIP_060397862.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus tequilensis]	375	454	85%	2e-126	77%	WIP_024715559.1
<input type="checkbox"/> L-asparaginase [Bacillus subtilis]	375	375	81%	3e-126	76%	WIP_019257380.1

Apêndice M – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SR22 com as sequências disponibilizadas pelo UNIPROT através do Blast. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 91.5% com a sequência analisada.

Alignments

Entry	Alignment overview	Status	Gene names	Protein names	Length	Info	Organism
Query: B20170120A7434721E10EE6586998A056CCD0537E670EC74							
M4KPA7	M4KPA7_BACIU - L-asparaginase - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment		ansZ C663_0260	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i> XF-1)	375	E-value: 6.4e-36 Score: 318 Ident.: 91.5%	<i>Bacillus subtilis</i> XF-1
A0A125UF50	A0A125UF50_9BACI - Uncharacterized protein <i>Bacillus</i> sp. LM 4-2 - View alignment		B4LM_0280	Uncharacterized protein (<i>Bacillus</i> sp. LM 4-2)	375	E-value: 6.4e-36 Score: 318 Ident.: 91.5%	<i>Bacillus</i> sp. LM 4-2
A0A1D7NQM7	A0A1D7NQM7_BACIU - Asparaginase <i>Bacillus subtilis</i> - View alignment		ansA B516045_00317	Asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i>)	375	E-value: 6.4e-36 Score: 318 Ident.: 91.5%	<i>Bacillus subtilis</i>
A0A0K6KFW4	A0A0K6KFW4_BACIU - L-asparaginase 2 <i>Bacillus subtilis</i> - View alignment		ansZ BN2127_JRS5_00611	L-asparaginase 2 (<i>Bacillus subtilis</i>)	375	E-value: 6.4e-36 Score: 318 Ident.: 91.5%	<i>Bacillus subtilis</i>
A0A165B1U7	A0A165B1U7_BACIU - L-asparaginase <i>Bacillus subtilis</i> - View alignment		B4122_1080	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i>)	375	E-value: 8.7e-36 Score: 317 Ident.: 90.1%	<i>Bacillus subtilis</i>
LBABE7	LBABE7_BACIU - L-asparaginase - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment		ansZ BEST7613_0268	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i> BEST7613)	375	E-value: 3e-35 Score: 313 Ident.: 90.1%	<i>Bacillus subtilis</i> BEST7613

Apêndice N – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SR60 com as sequências disponibilizadas pelo UNIPROT através do Blast. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 100% com a sequência analisada.

Alignments

BLAST [Align](#) [Download](#) [Add to basket](#) [Columns](#) 1 to 25 of 25 Show

Entry	Alignment overview	Status	Gene names	Protein names	Length	Info	Organism
Query: B2017011983C3DD8CE55183C76102DC5D3A26728BBB97B8A							
<input type="checkbox"/> A0A1D7NQM7	A0A1D7NQM7_BACIU - Asparaginase Bacillus subtilis - View alignment		ansA BS16045_00317	Asparaginase (Bacillus subtilis)	375	E-value: 4.6e-46 Score: 414 Ident.: 100.0%	Bacillus subtilis
<input type="checkbox"/> M4KPA7	M4KPA7_BACIU - L-asparaginase - Bacillus subtili... - View alignment		ansZ C663_0260	L-asparaginase (Bacillus subtilis XF-1)	375	E-value: 4.8e-46 Score: 414 Ident.: 100.0%	Bacillus subtilis XF-1
<input type="checkbox"/> A0A125UF50	A0A125UF50_9BACI - Uncharacterized protein Bacillus sp. LM 4-2 - View alignment		BsLM_0280	Uncharacterized protein (Bacillus sp. LM 4-2)	375	E-value: 4.8e-46 Score: 414 Ident.: 100.0%	Bacillus sp. LM 4-2
<input type="checkbox"/> A0A0K6KFW4	A0A0K6KFW4_BACIU - L-asparaginase 2 Bacillus subtilis - View alignment		ansZ BN2127_JRS6_00611	L-asparaginase 2 (Bacillus subtilis)	375	E-value: 4.8e-46 Score: 414 Ident.: 100.0%	Bacillus subtilis
<input type="checkbox"/> A0A165B1U7	A0A165B1U7_BACIU - L-asparaginase Bacillus subtilis - View alignment		B4122_1080	L-asparaginase (Bacillus subtilis)	375	E-value: 6.3e-46 Score:	Bacillus subtilis

Apêndice O – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SS23 com as sequências disponibilizadas pelo UNIPROT através do Blast. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 100% com a sequência analisada.

Alignments

Entry	Alignment overview	Status	Gene names	Protein names	Length	Info	Organism
Query: B201701198A53086CA0138FAA602B97CE8C2A624BCB7850							
A0A1Z5UF50	A0A1Z5UF50_9BAC1 - Uncharacterized protein Bacillus sp. LM 4-2 - View alignment 		BsLM_0280	Uncharacterized protein (Bacillus sp. LM 4-2)	375	E-value: 1e-105 Score: 818 Ident.: 100.0%	Bacillus sp. LM 4-2
M4KPA7	M4KPA7_BACIU - L-asparaginase - Bacillus subtilis... - View alignment 		ansZ_C663_0260	L-asparaginase (Bacillus subtilis XF-1)	375	E-value: 2.9e-105 Score: 815 Ident.: 99.4%	Bacillus subtilis XF-1
L8ABE7	L8ABE7_BACIU - L-asparaginase - Bacillus subtilis... - View alignment 		ansZ_BEST7613_0268	L-asparaginase (Bacillus subtilis BEST7613)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	Bacillus subtilis BEST7613
D4G4R8	D4G4R8_BACNB - Uncharacterized protein - Bacillus subtilis... - View alignment 		yccC_BsNT_06585	Uncharacterized protein (Bacillus subtilis subsp. nat...)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	Bacillus subtilis subsp. natto (strain BEST195)
A0A1B2ATAS	A0A1B2ATAS_BACIU - L-asparaginase - Bacillus subtilis... - View alignment 		BEN36_01415, BEP06_01415, BEP07_01415, BH660_01625	L-asparaginase (Bacillus subtilis subsp. sub...)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	Bacillus subtilis subsp. subtilis
T1TDA3	T1TDA3_BACIU - L-asparaginase Bacillus subtilis - View alignment 		ansZ_B4417_1352	L-asparaginase (Bacillus subtilis)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	Bacillus subtilis

Apêndice P – Resultado da comparação e alinhamento da sequência parcial do gene de L-asparaginase gerada com primer AsnZ1, do isolado SS04 com as sequências disponibilizadas pelo UNIPROT através do Blast. As sequências visualizadas na Tabela apresentam a similaridade de 100% com a sequência analisada.

Alignments

BLAST Align Download Add to basket Columns ◀ 1 to 25 of 250 ▶ Show 2

Entry	Alignment overview	Status	Gene names	Protein names	Length	Info	Organism
Query: E201701198A530B6CA0138FAAGD2B97CE8C2A624BCB7850							
A0A125UF50	A0A125UF50_9BAC1 - Uncharacterized protein <i>Bacillus</i> sp. LM 4-2 - View alignment 		BdLM_0280	Uncharacterized protein (<i>Bacillus</i> sp. LM 4-2)	375	E-value: 1e-105 Score: 818 Ident.: 100.0%	<i>Bacillus</i> sp. LM 4-2
M4KPA7	M4KPA7_BACIU - L-asparaginase - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment 		ansZ_C663_0260	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i> XF-1)	375	E-value: 2.9e-105 Score: 815 Ident.: 99.4%	<i>Bacillus subtilis</i> XF-1
L8ABE7	L8ABE7_BACIU - L-asparaginase - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment 		ansZ_BEST7613_0268	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i> BEST7613)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	<i>Bacillus subtilis</i> BEST7613
D4G4R8	D4G4R8_BACNB - Uncharacterized protein - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment 		yccC_BSNT_06585	Uncharacterized protein (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. nst..)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. natto (strain BEST195)
A0A1B2ATA5	A0A1B2ATA5_BACIU - L-asparaginase - <i>Bacillus subtilis</i> ... - View alignment 		BEN36_01415, BEP06_01415, BEP07_01415, BH660_01625	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. sub..)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis
T1TDA3	T1TDA3_BACIU - L-asparaginase <i>Bacillus subtilis</i> - View alignment 		ansZ_B4417_1352	L-asparaginase (<i>Bacillus subtilis</i>)	375	E-value: 5.7e-105 Score: 813 Ident.: 99.4%	<i>Bacillus subtilis</i>

ANEXOS

Anexo A – Sequência do gene de L-asparaginase Tipo II (*AsnZ*), a partir do genoma de *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 (Genbank NC_000964.3).

23/11/2015

Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

FASTA

Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_000964.3

[GenBank](#) [Graphics](#)

>gi|255767013:290915-292042 Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome

```
ATGAAAAAACGAATGCTCGTACTTTTTACCGCACTATTGTTTGTGTTTTACCGGATGTTACATTCTC
CTGAAACAAAAGAATCCCCGAAAGAAAAAGCTCAGACACAAAAAGTCTCTTCGGCTTCTGCCTCTGAAAA
AAAGGATCTGCCAAACATTAGAATTTTAGCGACAGGAGGCACGATAGCTGGTGCCGATCAATCGAAAACC
TCAACAACGAATATAAAGCAGGTGTTGTCGGCGTTGAATCACTGATCGAGGCAGTTCCAGAAATGAAGG
ACATTGCAAACGTCAGCGGCGAGCAGATTGTTAACGTCGGCAGCACAAATATTGATAATAAAATATTGCT
GAAGCTGGCGAAACGCATCAACCACTTGCTCGCTTACGATGATGTAGACGGAATCGTCGTGACTCATGGA
ACAGATACATTGGAGGAAACCGCTTATTTTTGAATCTTACCGTGAAAAGTGATAAACCGGTTGTTATTG
TCGGTTCGATGAGACCTTCCACAGCCATCAGCGCTGATGGGCCTTCTAACCTGTACAATGCAGTGAAAGT
GGCAGGTGCCCTGAGGCAAAAGGGAAAGGGACGCTTGTGTTCTTAACGACCGGATTGCCTCAGCCCGA
TATGTCACCAAAACAAACACAACACAGATACATTTAAATCAGAAGAAATGGGCTTCGTCGGAACAA
TTGCAGATGATATCTATTTAATAATGAGATTACCCGTAAGCATACGAAGGACACGGATTTCTCGGTTTC
TAATCTTGATGAGCTGCCGAGGTTGACATTATCTATGGATACCAAATGACGGAAGCTACCTGTTTGAC
GCTGCTGTAAAAGCCGGAGCAAAGGGGATTGTATTTGCCGTTCTGGGAACGGGCTTTATCTGATGCAG
CCGAAAAGGGGCGGACAGCGCAGTCAAAAAGGGCGTTACAGTGGTGCCTCTACCCGCACGGGAAATGG
TGTCGTACACCAACCAAGACTATGCGGAAAAGGACTTGCTGGCATCGAACTTTAAACCCCCAAAAA
GCACGGATGTTGCTGATGCTTGCGCTTACCAAAAACAAATGATCCTCAAAAAATCCAAGCTTATTTCAATG
AGTATTGA
```

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000964.3?report=fasta&from=290915&to=292042