



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS E
ANTÁRTICOS DA CENTRAL DE RECURSOS MICROBIANOS DA
UNESP (CRM-UNESP)**

Rio Claro - SP
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS E
ANTÁRTICOS DA CENTRAL DE RECURSOS MICROBIANOS DA
UNESP (CRM-UNESP)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Rio Claro - SP
2015

589.2 Santos, Juliana Aparecida dos
S237p Potencial biotecnológico de fungos marinhos e antárticos da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) / Juliana Aparecida dos Santos. - Rio Claro, 2015
90 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette

1. Fungos. 2. Fungos filamentosos. 3. Asparaginase. 4. Xilanase. 5. Coleção de culturas. 6. Micro-organismos. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS E ANTÁRTICOS DA
CENTRAL DE RECURSOS MICROBIANOS DA UNESP (CRM-UNESP)

AUTORA: JULIANA APARECIDA DOS SANTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro

Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro

Profa. Dra. RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / Universidade Federal da
Integração Latino-Americana

Data da realização: 30 de abril de 2015.

Dedico

Aos meus pais Silvana e João,
aos meus irmãos Danielle e Ryan
por todo exemplo de vida.
Ao meu marido Thiago por todo amor
e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Lara D. Sette orientadora deste trabalho, por toda confiança depositada em mim, por todo apoio, dedicação, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. André Rodrigues por todo apoio e atenção para com laboratório LAMAI.

Ao Prof. Fernando C. Pagnocca, por toda sua dedicação ao programa de Pós Graduação.

Ao Prof. Adalberto Pessoa Jr. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP) por todo suporte nos estudos relacionados a enzima L-ASPase.

Ao Dr. André Moreni (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP) por toda contribuição e ensinamento para desenvolvimento deste trabalho.

A minha grande amiga Gabriela Vieira, por toda amizade, ensinamentos, ajuda e pelo companherismo nas mais diversas situações da vida.

Ao Julio Osti, por sua essencial ajuda na organização da coleção de culturas.

A Cárol Terrone, Juliana Montesino e Daniela Turati pela amizade, e por sempre estarem de portas abertas para solucionar minhas dúvidas.

A Juliana Vieira (Juzinha) pela amizade, por todas as risadas e por toda ajuda nos experimentos.

Aos Amigos do LAMAI: Gabriela, Viviane, Pedro, Marina, Igor, Lídia, Juzinha, Aline, Vitor, Lia e Fábio por todos os momentos vividos juntos.

Aos amigos ex- LAMAI: Ramon, Alexandre, Mariana Barato, Mariana J. e Otávio.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Bioquímica: Lilian, José Rubens, Danilo, Ana Paula, Eduardo, Jaqueline, Grazi, Márcio, Quimi, Lucas, Lorena, Tássio, Dilza, Fátima, Roberto, Carmem e Adriano.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

A todo corpo docente, técnicos e colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e demais setores da UNESP – Rio Claro.

Aos meus amigos e familiares, por toda a ajuda, compreensão, paciência e incentivo recebido.

Ao meu marido Thiago, por sempre me apoiar em decisões, por sempre caminhar ao meu lado, compartilhando de todos momentos e crescendo juntos.

*"Nós nos conhecemos por alguma razão;
você é uma bênção ou uma lição para mim."
Meus sinceros agradecimentos.*

O acaso é talvez, o pseudônimo
que Deus usa quando não quer
assinar suas obras.

T. Gauthier

RESUMO

As coleções de culturas de micro-organismos apresentam importante contribuição para a preservação, manutenção e disponibilização de material microbiológico para uso acadêmico e em pesquisa. A Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) tem como missão dar suporte ao conhecimento da biodiversidade microbiana, bem como ao desenvolvimento científico e tecnológico, apoiando projetos de relevância. A CRM-UNESP possui um acervo associado de fungos filamentosos e leveduras de ambientes incomuns e/ou extremos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo reorganizar o acervo de fungos marinhos da costa brasileira, marinhos e terrestres da Antártica e prospectar as enzimas xilanase e L-asparaginase. Para tanto, cerca de 696 fungos marinhos oriundos da costa brasileira e 185 fungos isolados de ambientes antárticos foram avaliados quanto à viabilidade e pureza, fotografados e preservados por dois métodos distintos: criopreservação e Castellani. Destes, 71% dos isolados foram considerados puros e viáveis e submetidos às triagens quantitativas e qualitativas para enzima xilanase e L-asparaginase. Na triagem qualitativa (meio sólido) 112 fungos produtores de xilanase foram isolados de ambiente marinho da costa brasileira e 19 de ambiente antártico. Estes foram submetidos à triagem quantitativa (meio líquido), na qual, o fungo LAMAI 31 identificado como *Aspergillus tubingensis* apresentou o melhor resultado de produção enzimática (49,41 U/mL). Para a enzima L-asparaginase além dos 622 isolados, 17 fungos filamentosos adicionais foram analisados na triagem qualitativa, totalizando 510 de origem marinha da costa brasileira e 129 de origem Antártica. Dentre estes, 407 fungos foram positivos para L-asparaginase em meio sólido e foram submetidos à triagem em meio líquido. A L-asparaginase foi produzida na faixa de 0,02 a 1,65 U/mL por 103 isolados. Delineamentos experimentais foram aplicados aos isolados que apresentaram melhores valores de atividade enzimática. O isolado LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) foi selecionado para otimização da produção da enzima xilanase. No primeiro planejamento do tipo Plackett & Burman (PB com 10 variáveis) o melhor resultado foi de 501,9 U/mL (ensaio 12). No segundo PB (5 variáveis) a produção da enzima aumentou para 629,6 U/mL (ensaio 2). A partir do terceiro planejamento a produção diminuiu consideravelmente (137,3 e 180,0 U/mL). Desta forma, o ensaio 2 do segundo PB foi validado, sendo a maior produção da enzima obtida após 96 horas de incubação (561,50 U/mL). No ensaio de validação a atividade específica foi maior após 72 horas de cultivo (209,26 mg/mL). A enzima xilanase bruta apresentou pH e temperatura ótimos de 5,0 e 55°C, respectivamente. A enzima se mostrou estável na faixa de temperatura de 40°C a 50°C e apresentou maior estabilidade em pH 7,0. Para a otimização da produção de L-

asparaginase dois isolados foram selecionados: LAMAI 505 (antártico) e LAMAI 297 (marinho da costa brasileira). Entretanto, após a condução de dois planejamentos experimentais do tipo PB foi verificado que a seleção das variáveis foi insuficiente para a otimização da produção da enzima. Os resultados obtidos no presente estudo podem ser considerados promissores para a pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico, visto que o acervo estudado foi organizado, devidamente preservado e teve um valor agregado relacionado ao potencial de produção de enzimas de interesse ambiental e/ou industrial.

ABSTRACT

Microbial culture collections have an important contribution to the preservation, maintenance, and availability of the microbial material for academic and research purpose. The mission of the Central of Microbial Resources of the UNESP (CRM-UNESP) is to provide support for the knowledge of the microbial biodiversity, as well as for the scientific and technological development, supporting relevant projects. CRM-UNESP has an associated collection of filamentous fungi and yeast from uncommon and/or extreme environments. In this context, the present study aims to reorganize the marine-derived fungal collection from brasilian coast and the marine and terrestrial collection from Antarctica and to prospect the enzymes xylanase and L-asparaginase. For that end, about 696 marine fungi originating from brasilian coast and 185 isolated from antarctic environments had their viability and purity assessed and were photographed and preserved by two different methods: criopreservation and Castellani. Among them, 71% isolated were considered pure and viable and were submitted to the quantitative and qualitative screening for the production of xylanase and L-asparaginase. In the qualitative quantitative screening (solid medium) 112 filamentous fungi able to produce xylanases were isolated from marine environment (brasilian coast) and 19 from the antarctic environment. These isolates were submitted to quantitative screening (liquid medium), in which, the fungus LAMAI 31 identified as *Aspergillus tubingensis* presented the best result of enzymatic production (49.41 U/mL). For L-asparaginase besides the 622 isolates, 17 additional filamentous fungi were analysed, being 510 originated from the brasilian marine coast and 129 from Antarctica. Among them, 407 fungi were positive for L-asparaginase in solid medium and were submitted to the screening in liquid medium. L-asparaginase was produced in a range of 0.02 to 1.65 U/mL by 103 isolated. Experimental designs were applied to the isolates that presented the best enzymatic activities. The fungus LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) was selected for the optimization of xylanase production. In the first Plackett and Burman experimental design (PB with 10 variables) the best result was 501.9 U/mL (assay 12). In the second PB (5 variables) the enzymatic production increased to 629.6 U/mL (assay 2). From the third experimental design the production decreased considerably (137.3 and 180.0 U/mL). Thus, the assay 2 of the second PB was validated, being the best production of the enzyme obtained after 96 hours of incubation (561.50 U/mL). In the validation assay, the higher specific activity was obtained after 72 h (209.26 mg/mL). Crude xylanase from *A. tubingensis* LAMAI 31 presented optimum pH and temperature of 5.0 and 55 °C, respectively. This enzyme showed to be stable in a range of 40 to 50 °C, and presented higher stability at pH 7.0. For the optimization of L-asparaginase

two isolated were selected: LAMAI 505 (Antarctica) and LAMAI 297 (brasillian marine coast). However, after two PB experimental designs, the data showed that the strategy used was insufficient for optimizing the enzyme. Results from the present study can be considered promising for scientific research and technological development, once the fungal collection studied was organized, properly preserved and got an added value related to the potential for the production of enzymes with environmental and/or industrial interest.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. A atividade enzimática em relação a temperatura. A atividade da enzima psicrófila (linha azul) e mesófila (linha preta). Gráfico esquerdo, amilases; gráfico direito, celulases. Ambas as enzimas são psicrófilas, produzidas pela bactéria <i>Pseudoalteromonas antarctica</i> (adaptado de STRUVAY e FELLER, 2012)	28
Figura 2. Enzimas constituintes do complexo xilanolítico (SUN et al., 2012)	29
Figura 3. Reação catalisada pela L-asparaginase (modificado de Narta et al., 2007)	31
Figura 4. Esquema da disposição dos canudos para triagem enzimática de xilanases	38
Figura 5. Representação do número de isolados recuperados (preservados) frente aos contaminados e inativos	46
Figura 6. Fotodocumentação isolado antártico M4D cultivado em meio de cultura PDA durante 7-14 dias a 20 °C	47
Figura 7. Triagem qualitativa de fungos filamentosos marinhos em meio sólido (ágar e xilana) incubados durante 48 horas a 28 °C para avaliação de produção de xilanases	48
Figura 8. Triagem em meio sólido da enzima L-asparaginase em meio de cultura Czapek Dox' modifico, à esquerda controle positivo à direita controle negativo	53
Figura 9. Curva de atividade enzimática por 168 horas do isolado LAMAI 31 (<i>Aspergillus tubingensis</i>) para validação do ensaio 2 do PB16)	67
Figura 10. Efeito do pH de reação sobre a atividade xilanase de <i>Aspergillus tubingensis</i> LAMAI 31. As reações foram realizadas a 40 °C nos tampões: (preto) McIlvaine 0,1 mol/L; (cinza claro) acetato de sódio 0,1 mol/L; (cinza escuro) Tris-HCl 0,1 mol/L	69
Figura 11. Efeito da temperatura de reação sobre a atividade xilanase de <i>Aspergillus tubingensis</i> LAMAI 31 (as reações foram realizadas com McIlvaine 0,1 mol/L)	70
Figura 12. Estabilidade ao pH da atividade xilanase de <i>Aspergillus tubingensis</i> LAMAI 31. As amostras foram incubadas por 24 horas a 4 °C, na ausência de substrato, com os tampões: McIlvaine 0,1 mol/L (azul) ; acetato e sódio 0,1 mol/L (vermelho)	71
Figura 13. Estabilidade térmica do extrato enzimático de xilanase de <i>Aspergillus tubingensis</i> LAMAI 31. As amostras foram incubadas a 40 °C, 45 °C, 50 °C e 55 °C na ausência de substrato	72

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental <i>Plackett-Burman</i> (PB20) com 10 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado LAMAI 31	42
Tabela 2. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental <i>Plackett-Burman</i> (PB16) com 5 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado LAMAI 31	42
Tabela 3. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Fatorial Fracionado 2^{4-1} (FF12) com 4 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado LAMAI 31 ...	43
Tabela 4. Faixa dos valores estudados no segundo planejamento experimental Fatorial Fracionado 2^{4-1} (FF12) com 4 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado LAMAI 31	43
Tabela 5. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental <i>Plackett-Burman</i> com 12 variáveis para estudo da produção de L-asparaginase pelo isolado LAMAI 505 e LAMAI 297	45
Tabela 6. Produção de xilanases por fungos marinhos da costa brasileira (valores maiores do que 10 U/mL) após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.....	50
Tabela 7. Produção de xilanases por fungos marinhos e terrestres da Antártica após 7 dias de cultivo a 20°C e 140 rpm	52
Tabela 8. Produção de L-asparaginase pelos fungos de origem marinha da costa brasileira (após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm)	55
Tabela 9. Produção de L-Asparaginase pelos 18 fungos com atividade negativa para L-glutaminase na triagem em meio sólido	55
Tabela 10. Produção de L-asparaginase por fungos marinhos e terrestres da Antártica após 7 dias de cultivo a 20°C e 140 rpm.....	56
Tabela 11. Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm.....	59
Tabela 12. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento <i>Plackett-Burman</i> (PB20)	60

Tabela 13. Matriz do planejamento experimental PB16 (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm.....	62
Tabela 14. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento <i>Plackett-Burman</i> (PB16).	63
Tabela 15. Matriz do planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado 2^{4-1} (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm	64
Tabela 16. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1}	64
Tabela 17. Matriz do planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado 2^{4-1} (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm	65
Tabela 18. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1}	65
Tabela 19. Atividade específica do caldo enzimático de xilanases de <i>Aspergillus tubingensis</i> (lamai 31).....	68
Tabela 20. Matriz do planejamento experimental do tipo pb (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) para enzima l-asparaginase. Os ensaios foram conduzidos a 28°C(isolado marinho) 20°C (antártico) e 140 rpm	74
Tabela 21. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento <i>Plackett-Burman</i> com 12 variáveis para isolado LAMAI 505	75
Tabela 22. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento <i>Plackett-Burman</i> com 12 variáveis para isolado LAMAI 297	76
Tabela 23. Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) para enzima L-asparaginase testes realizado com isolado LAMAI 297.....	77
Tabela 24. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento <i>Plackett-Burman</i> com 7 variáveis para isolado LAMAI 297	77

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. Coleções de Culturas Microbianas.....	19
2.2. Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).....	21
2.3. Potencial biotecnológico de fungos derivados de ambiente marinho.....	23
2.4. Potencial biotecnológico de fungos derivados de ambiente Antártico.....	24
2.5. Enzimas produzidas por fungos de origem marinha.....	26
2.6. Enzimas produzidas por fungos adaptados ao frio.....	27
2.7. Xilanases.....	29
2.8. Asparaginases.....	31
2.9. Otimização por Planejamento Experimental.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivo específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Fungos filamentosos.....	36
4.2. Organização do acervo.....	36
4.2.1. Avaliação de pureza e viabilidade.....	36
4.2.2. Banco de imagens.....	36
4.2.3. Preservação: Criopreservação e Castellani.....	37
4.3. Seleção de fungos produtores de xilanases.....	37
4.3.1. Triagem qualitativa (meio sólido).....	37
4.3.2. Triagem quantitativa (meio líquido).....	38
4.3.3. Atividade de xilanase.....	39
4.4. Seleção de fungos produtores de L-asparaginase.....	39
4.4.1. Triagem qualitativa (meio sólido).....	39
4.4.2. Triagem quantitativa (meio líquido).....	40
4.4.3. Atividade de L-asparaginase.....	40
4.5. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima xilanase (planejamento experimental).....	41
4.5.1. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 10 variáveis.....	41

4.5.2. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 5 variáveis.....	42
4.5.3. Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 24-1.....	43
4.6. Determinação de proteínas totais	44
4.7. Caracterização da enzima xilanase bruta totais	44
4.7.1. Influência do pH sobre a atividade xilanase	44
4.7.2. Influência da temperatura sobre a atividade xilanase	44
4.7.3. Estabilidade térmica da atividade xilanase	44
4.7.4. Estabilidade da atividade xilanase em diferentes pHs	45
4.8. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima L- asparaginase (planejamento experimental)	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Organização do acervo da Coleção CRM-UNESP.....	46
5.2. Seleção de fungos produtores de xilanases.....	48
5.2.1. Triagem qualitativa (meio sólido)	48
5.2.2. Triagem quantitativa (meio líquido)	49
5.3. Seleção de fungos produtores de L-asparaginase.....	53
5.3.1. Triagem qualitativa (meio sólido)	53
5.3.2. Triagem quantitativa (meio líquido)	54
5.4. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção de xilanases (Planejamento Experimental).	56
5.4.1. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 10 variáveis.....	57
5.4.2. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 5 variáveis.....	61
5.4.3. Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 24-1 (FF)	63
5.4.3.1. Segundo planejamento experimental: Fatorial Fracionado 24-1 (FF)	65
5.4.4. Validação do planejamento experimental	66
5.5. Determinação proteínas totais	67
5.6. Caracterização da enzima xilanase no caldo enzimático	68
5.6.1. Influência do pH sobre a atividade da xilanase	68
5.6.2. Influência da temperatura sobre a atividade da xilanase	69
5.6.3. Estabilidade da xilanases em diferentes pH	70
5.6.4. Estabilidade da xilanases em diferentes temperaturas	71
5.7. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima L- asparaginase (Planejamento Experimental)	72
5.7.1. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 12 variáveis	72

5.7.2. Planejamento experimental: <i>Plackett-Burman</i> com 7 variáveis	76
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

As coleções de culturas de micro-organismos possuem como função principal a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de micro-organismos autenticados. Como provedores de serviços especializados e centros de informação (VAZOLLER; CANHOS, 2005) são responsáveis pela conservação *ex-situ* da biodiversidade e dos recursos genéticos. Assim, a preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua viabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando as características genótípicas e fenotípicas. Quando devidamente preservado, o material microbiano pertencente aos acervos das coleções de culturas pode ser alvo de prospecção de compostos de interesse sócio econômico nas áreas ambiental, industrial, saúde e agronegócio.

A Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biociências da UNESP (CRM-UNESP) tem como missão dar suporte ao conhecimento da biodiversidade microbiana, bem como ao desenvolvimento científico e tecnológico, apoiando projetos de relevância, os quais fazem uso da biodiversidade e do patrimônio genético nacional. A CRM-UNESP possui um acervo de fungos filamentosos e leveduras associados a ambientes incomuns e/ou extremos, incluindo principalmente: i) fungos associados a formigas e seus ninhos (~4.000 isolados); ii) fungos associados a invertebrados e sedimentos marinhos (~770 isolados); e iii) fungos marinhos e terrestres da Antártica (~1.100 isolados).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo reorganizar o acervo de pesquisa de fungos marinhos (costa brasileira) e marinhos e terrestres (Antártica) associados CRM-UNESP que está alocado no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) e realizar prospecção das enzimas xilanase e L-asparaginase, as quais são de interesse industrial para os setores de papel/biocombustível e farmacêutico, respectivamente.

Os estudos envolvendo as enzimas xilanasas e parte do estudo envolvendo a enzima L-asparaginase estão vinculados ao projeto Fapesp 2013/19486-0 (Auxílio Regular) intitulado “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações”, coordenado pela Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro). A presente dissertação de mestrado está também associada ao projeto Temático Fapesp 2013/08617-7 intitulado “Produção de L-Asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco antileucêmico” coordenado pelo Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior (FCF/USP, São Paulo), o qual propõe a união de diversas competências científicas e tecnológicas para a obtenção de um processo industrialmente viável de produção de L-Asparaginase, um biofármaco amplamente utilizado no tratamento de leucemias.

O presente projeto contribuiu para aumento do conhecimento da diversidade microbiana associada ao ambiente marinho da costa brasileira e Antártico; na agregação de valor ao acervo de fungos mantidos na CRM-UNESP por meio da incorporação de dados referentes ao potencial biotecnológico dos mesmos. E ainda, disponibilização ao acesso público de informações referentes à biodiversidade e ao potencial biotecnológico de micro-organismos associados a nichos ecológicos pouco conhecidos e explorados; bem como na obtenção de novos recursos genéticos com potencial para aplicação industrial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Coleções de Culturas Microbianas

As coleções de culturas vão desde pequenos até grandes centros de serviço dentro de organizações, compondo parte essencial da infraestrutura de apoio às ciências da vida e biotecnologia, possuindo como principal objetivo prover ao usuário os produtos e/ou serviços oferecidos, utilizando técnicas adequadas e processos que certifiquem a qualidade e que estejam de acordo com as leis, regulamentos e políticas nacionais (SMITH *et al.*, 2008). O desenvolvimento de coleções de culturas microbianas em todo o mundo foi impulsionado por interesses científicos e o rápido crescimento da bio-indústria. Neste contexto, novas empresas de biotecnologia estão buscando coleções para selecionar micro-organismos com potenciais para aplicações industriais (IVSHINA, 2012).

A conservação dos recursos genéticos e da biodiversidade fornece a base essencial para os produtos e indústrias eco-eficientes baseados em biotecnologia emergente, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (OECD, 2001); um elemento essencial para o desenvolvimento de uma bio-economia baseada no conhecimento (OECD, 2009). Coleções de culturas desempenham um papel vital na conservação e o uso sustentável dos recursos microbianos (DANIEL, 2010, SETTE *et al.*, 2013), fornecendo material biológico autêntico (de alta qualidade) para o desenvolvimento científico e tecnológico, bem como para as atividades de ensino (SMITH, 2003).

As coleções de culturas podem ser classificadas em três categorias com base em suas especialidades e funções: (i) coleção de cultura privada: normalmente mantida por indivíduos, laboratórios, institutos, hospitais e empresas comerciais e onde o número de explorações pode variar de pequeno a grande porte; (ii) coleção especializada: frequentemente surge no decurso de um estudo taxonômico em um grupo específico de micro-organismo e em áreas

especializadas e abrigam um número considerável de linhagens; (iii) coleção pública: estabelecida com a finalidade de oferecimento de serviço público e abriga um grande número de culturas.

A operação e o gerenciamento de coleções microbiológicas requerem capacitação técnica especializada e infraestrutura específica, além de cuidados especiais com relação às práticas de controle de qualidade, biossegurança e autenticação de seus acervos (SETTE, 2005).

As culturas microbianas são preservadas e mantidas pelas coleções de culturas de forma a garantir a sua viabilidade, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, empregando métodos de preservação adequados (KIRSOP e DOYLE, 1991). Por medidas de segurança e para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos (OCDE, 2007). Os métodos indicados pelas diretrizes da OCDE para a preservação de longo tempo de culturas microbianas incluem o congelamento em nitrogênio líquido, o ultracongelamento a -80°C e a liofilização ou desidratação (OECD, 2007). É recomendável que pelo menos um dos métodos utilizados seja a criopreservação ou a liofilização, pois para muitas linhagens esses métodos apresentam menos riscos de alterações genéticas, além de garantir um alto índice de recuperação da cultura (viabilidade celular) após a preservação por longo período de tempo (SETTE *et al.*, 2007).

De acordo com *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM, www.wfcc.info/ccinfo/statistics/), até o momento existem 673 coleções de culturas em 70 países e regiões registradas no WDCM. Estão depositadas nestas coleções um total de 2.433,815 culturas de fungos, bactérias, vírus e células, sendo 708.264 depósitos referentes aos fungos. Entre estas coleções, 264 são governamentais, 264 ligadas a universidades, 59 semi-governamentais, 43 são privadas e 24 industriais.

O Brasil possui 71 coleções de culturas registradas no WDCM (constituindo 103.140 culturas depositadas), e entre elas se encontra a CRM-UNESP (WDCM). Os dados obtidos no WDCM revelam que o Brasil é o sexto colocado entre os países com maior número de culturas depositadas, se destacando também mundialmente no número de coleções de culturas microbianas registradas no WDCM. De acordo com Sette e colaboradores (2013), o número de coleções de culturas nacionais deve ser bem maior ao que aparece no WDCM, considerando o fato de que muitas das coleções credenciadas no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) como fiéis depositárias (credenciamento de instituição pública nacional de pesquisa e desenvolvimento para receber subamostras de componentes do patrimônio genético como requisito a ser cumprido para obtenção de autorização de acesso e remessa de patrimônio genético), não encontram-se registradas no WDCM.

Considerando o desenvolvimento da biotecnologia e bio-economia, a OCDE propôs o estabelecimento de uma rede mundial de Centros de Recursos Biológicos - CRBs (OCDE, 2001), a ser consolidada a partir de coleções de serviços reconhecidas como CRBs pelos seus países. De acordo com as Diretrizes de Boas Práticas para CRBs (OCDE, 2007), esses Centros são definidos como sendo *“partes essenciais da infraestrutura de apoio às ciências da vida e biotecnologia, atuando como provedores de serviços e repositórios de células vivas e genomas de organismos e informação relacionada à hereditariedade e funções de sistemas biológicos... Os CRBs devem possuir padrões elevados de qualidade e de experiência exigidos pela comunidade científica internacional e pelo setor industrial para a distribuição de materiais biológicos e informações associadas.”*

Em adição, como repositórios e provedores da diversidade microbiana e informações associadas, as coleções de culturas (e CRBs) possuem um papel relevante no sentido de promover a Convenção sobre Diversidade Biológica, especialmente o protocolo de Nagoya referente ao Acesso e a Repartição de Benefícios (Sette *et al.*, 2013).

2.2. Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP)

A Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) está alocada no Instituto de Biociências do campus Rio Claro possui um acervo direcionado para linhagens microbianas de aplicação biotecnológica, educacional, taxonômica (linhagens de referência e linhagens tipo) que contém micro-organismos restritos aos grupos de risco 1 e 2 (de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde – OMS), incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Atualmente, o número de micro-organismo do acervo da CRM-UNESP totaliza aproximadamente 6.000 culturas, sendo constituído por: 4.000 leveduras e fungos filamentosos derivados de amostras de formigas e de seus ninhos; 770 fungos filamentosos associados a ambientes marinhos da costa brasileira (invertebrados e sedimentos); 1.100 fungos filamentosos e leveduras de ambientes marinhos e terrestres da Antártica; além de cerca de 100 bactérias utilizadas como linhagens de referência. O acervo foi constituído a partir de projetos de pesquisas coordenados ou com a participação de docentes da UNESP – Rio Claro e vem sendo utilizado para estudos de diversidade taxonômica e de prospecção de compostos/atividades de interesse biotecnológico, tais como enzimas, antimicrobianos, produção de biocombustíveis, biorremediação, entre outros.

A CRM-UNESP é composta por dois tipos de acervos: 1) Acervo principal: isolados taxonomicamente identificados que apresentam potencial biotecnológico ou são representantes da biodiversidade de um determinado ambiente; 2) Acervo de pesquisa: isolados que foram recuperados de diferentes amostras ambientais e que estão sendo estudados. As linhagens contidas no acervo de pesquisa são potenciais candidatas a serem incorporadas ao acervo principal da CRM-UNESP, sendo necessária a realização de estudos preliminares de bioprospecção, diferenciação e caracterização taxonômica, para certificação da importância biotecnológica e/ou da representação da biodiversidade de ambientes específicos e do enquadramento das mesmas no escopo do acervo principal da CRM-UNESP.

A maior parte do acervo da CRM-UNESP está relacionada com a diversidade de micro-organismos associados a insetos (formigas), a sedimentos e invertebrados marinhos da costa brasileira (esponjas, ascídias, estrela do mar, entre outros) e derivados de ambientes marinhos e terrestres da Antártica (invertebrados, sedimentos, macroalgas, solos, entre outros). Por serem estes ambientes incomuns ou extremos, o acervo da coleção pode possuir recursos genéticos com propriedades específicas para aplicações em diferentes setores de importância sócio-econômica, incluindo, entre outros, o setor farmacêutico, têxtil, papelero, de biocombustível e ambiental.

Cabe ressaltar que os fungos mantidos na CRM-UNESP e que já foram taxonomicamente identificados, são registrados no sistema de gerenciamento informatizado de acervos microbianos denominado μ Sicol. O *software* μ Sicol foi desenvolvido pelo Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) e permite a inserção de diversas informações associadas ao acervo, tais como: dados de origem, propriedades, dados taxonômicos, coletor, depositante, além da inserção de fotos, sequências gênicas e mapa de preservação. Parte das informações associadas ao acervo principal da CRM-UNESP (base de dados do μ Sicol) está disponibilizada na Rede *speciesLink* (CRIA) e será também disponibilizada no Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR), uma iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) que visa integrar informações sobre a biodiversidade e os ecossistemas.

2.3. Potencial biotecnológico de fungos derivados de ambiente marinho

Os oceanos correspondem a 71% da superfície da Terra sendo considerados grandes reservatórios de recursos naturais (KARL, 2007). Contudo, a extensão da biodiversidade marinha, especialmente de micro-organismos, é ainda pouco conhecida. As comunidades microbianas marinhas são consideradas nichos ecológicos importantes no ambiente marinho devido ao desempenho nos processos biogeoquímicos na ciclagem de carbono e outros nutrientes necessários nos oceanos (SOWELL *et al.*, 2008). Sendo estas compostas por micro-organismos que podem ser encontrados não só nas águas superficiais, mas também em profundezas abissais, nas regiões litorâneas e oceânicas, associados a uma variedade de substratos, incluindo esponjas, algas, madeiras, sedimentos, moluscos, plantas, peixes e corais (HILL, 2005; SURAJIT *et al.*, 2006).

Os fungos filamentosos derivados de ambiente marinho, têm sido foco de grande interesse de estudo devido principalmente, ao fato de pouco se conhecer sobre a biodiversidade e recursos genéticos dos micro-organismos que habitam esse ecossistema. Acredita-se que as características físico-químicas únicas do ambiente marinho propiciaram aos fungos adaptações fisiológicas especiais, as quais podem ser exploradas do ponto de vista biotecnológico. Fungos marinhos formam um grupo ecológico, não relacionados taxonomicamente (HYDE *et al.*, 2000), sendo estes classificados em dois grupos principais: i) fungos marinhos obrigatórios, são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambientes marinhos ou em *habitats* estuarinos, e ii) fungos marinhos facultativos, aqueles obtidos a partir de água doce ou *habitats* terrestres que são capazes de crescer em ambientes marinhos (KOHLMEYER e KOHLMEYER, 1979). Devido à dificuldade de certificar se um fungo de origem marinha é obrigatório, foi criada a expressão “fungos derivados de ambiente marinho” (*marine-derived fungi*), englobando todos os fungos isolados de amostras marinhas (OSTERHEGE, 2001).

Os fungos derivados de ambiente marinhos são organismos heterotróficos, responsáveis pela decomposição do tecido vegetal e animal (celulose, lignina, queratina, entre outros) e na reciclagem de nutrientes (BUGNI e IRELAND 2004). Desta forma, esses fungos são capazes de produzir compostos diferentes dos produzidos pelos seus homólogos terrestres, pois estão adaptados à salinidade encontrada nestes ambientes (BUGNI e IRELAND, 2004; SALEEM *et al.*, 2007), podendo suportar, e muitas vezes exigir a salinidade do oceano, que está perto de 3,5% de sais totais (EL-KADY, 1986). Vários outros fatores podem afetar o metabolismo dos fungos marinhos, como temperatura, pH e concentrações de íons de sódio (RAGHUKUMAR *et al.*, 2004, DAMARE *et al.*, 2006).

Dentre as principais atividades biológicas relacionadas aos fungos derivados marinhos podemos listar: propriedades antimicrobianas e antitumorais, inibição de ciclo celular, antagonistas de fatores de ativação, atividade antiviral, inibição de fosfatase e quinase (BUGNI e IRELAND, 2004). Contudo, seu potencial pode ser explorado em diversas áreas, como na produção de enzimas (WANG, 2006; MENEZES *et al.*, 2009) e na degradação de poluentes ambientais (LEAHY e COLWELL, 1990; JACKSON; PARDUE, 1999; TOLEDO *et al.*, 2014).

Os estudos sobre micro-organismos marinhos ao longo da costa Brasileira são escassos. Dentre os fungos filamentosos caracterizados em estudos envolvendo o ambiente marinho os gêneros com maior incidência são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Cladosporium* e *Acremonium* (DA SILVA *et al.*, 2008, MENEZES *et al.*, 2009).

Considerando o fato de que os micro-organismos marinhos são pouco estudados quanto às suas funções ecológicas, origem evolutiva e como fontes de metabólitos úteis à agricultura, indústria, ambiente e saúde (OSTERHAGE, 2002; KLEMKE, 2004), estudos sobre a diversidade, ecologia e potencial biotecnológico desses organismos devem ser estimulados.

2.4. Potencial biotecnológico de fungos derivados de ambiente Antártico

A Antártica é um continente remoto e inóspito. Sendo o clima o mais frio e o mais seco dos conhecidos na Terra (HOLDGATE, 1977; ONOFRI *et al.*, 1999; ØVSTEDAL *et al.*, 2001).

As condições que prevalecem na Antártica constituem fatores limitantes para a vida das plantas e animais e incluem: baixa temperatura, baixa disponibilidade de água, ciclos de congelamento e descongelamento frequentes, baixa precipitação anual, ventos fortes, alta sublimação e evaporação e alta incidência de radiação ultravioleta.

Apesar das condições extremas encontradas, diferentes formas de vida estão presentes no continente Antártico como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos (RUISI *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009; SHIVAJI e PRASAD, 2009).

Em um ambiente tão inóspito, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares podem ser exclusivamente formados por micro-organismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial (VINCENT, 2000). Dessa forma, os micro-organismos possuem um papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica, e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica (CLARKE, 2003). A microbiota encontrada nessa região é composta essencialmente por depósitos de micro-organismos precipitados pela neve ou transportados pelo vento

(MARSHALL, 1996), por correntes oceânicas (MURRAY *et al.*, 1999) e por animais (SCHLICHTING *et al.*, 1978). Embora muitos destes micro-organismos sejam mortos ou inviabilizados pelas características extremas do ambiente, parte permanece em estado de latência (esporulados) ou viáveis sob condições basais de metabolismo. A viabilidade celular nestas condições é possível não apenas devido à capacidade de metabolismo em baixas temperaturas, mas também pela disponibilidade de matéria orgânica (ou inorgânica, no caso de quimio-autotrófico) no interior das veias líquidas no gelo. Price (2000) propôs que o interior das veias de gelo contém água, sais e carbono orgânico disponíveis para manter uma pequena população (10 a 100 bactérias/mL) por até 400.000 anos.

Nas últimas décadas as regiões antárticas foram investigadas quanto à presença de bactérias e arqueias psicrófilas, ocasionalmente de algas e, mais raramente de fungos (GUNDE-CIMERMAN *et al.* 2003). Comunidades de fungos na Antártica são ainda pouco investigadas e existe carência de informações fisiológicas necessárias para explicar os papéis ecológicos dos fungos nestes habitats (RUISI *et al.*, 2007).

A partir de amostras da Antártica micro-organismos adaptados ao frio de importância biotecnológica em diversos setores sócio-econômicos podem ser obtidos. Tais micro-organismos são fontes potenciais de enzimas com atividade em baixas e médias temperaturas (JOSEPH *et al.*, 2007).

Os micro-organismos capazes de crescer sob baixas temperaturas são classificados como psicrófilos e psicrotróficos. Os fungos psicrófilos são aqueles capazes de crescer a 0°C, possuem ótimo crescimento a $\leq 15^{\circ}\text{C}$ e temperatura máxima de crescimento de $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Já os psicrotróficos (ou psicrotolerantes) são aqueles que podem crescer a 0°C e cuja máxima temperatura de crescimento pode estar acima de 20°C. A maioria dos micro-organismos recuperados de amostras da região Antártica são psicrotolerantes (RUISI *et al.*, 2007) e essa predominância pode ser explicada pelo fato de que em alguns períodos do ano a temperatura do solo pode chegar a 15°C (MÖLLER e DREYFUSS, 1996).

Considerando as condições extremas da Antártica, os micro-organismos que habitam esses ambientes precisam se adaptar ao frio, a escassez de nutrientes e de água no estado líquido, aos repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, aos altos índices de radiação ultravioleta e altas concentrações de salinidade, estresse osmótico e dessecação (COWAN *et al.*, 2004; RUISI *et al.*, 2007). Contudo, estes fatores contribuem para que nesta região existam micro-organismos extremófilos, com adaptações únicas, que os tornam relevantes como fontes potenciais de recursos genéticos para aplicações biotecnológicas e que por pertencerem a um ambiente pouco explorado podem representar novas espécies para a ciência.

2.5. Enzimas produzidas por fungos de origem marinha

De acordo com Bugni & Ireland (2004) e Saleem e colaboradores (2007), os compostos bioativos produzidos por fungos derivados de ambiente marinho podem apresentar diferenças estruturais consideráveis quando comparados com os isolados terrestres, devido ao fato daqueles micro-organismos estarem adaptados a altas pressões e salinidade do ambiente. Estudos têm revelado que estes micro-organismos podem produzir enzimas com características únicas que são responsáveis pela adaptação no ambiente marinho (VERBIST *et al.*, 2000; ZHANG e KIM, 2010). Os micro-organismos adaptados a esses ambientes produzem enzimas com maior flexibilidade em relação a faixa de atuação de pH e temperatura, mantendo alta atividade específica (DEBASHISH *et al.*, 2005; HUNTER-CEVERA *et al.*, 2005; TRINCONE, 2010, 2011; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015).

Devido as propriedades das enzimas produzidas por fungos de origem marinha, tais como estabilidade térmica, tolerância a altas concentrações de sal e pressão, elas estão aptas a catalisar reações químicas que suas homólogas terrestres geralmente não podem realizar (BAHARUM *et al.*, 2010; SALAMEH *et al.*, 2007b; ZHANG; KIM, 2010). O interesse associado a estas enzimas está relacionado com a sua atividade e estabilidade sob condições extremas (KIN, 2006 ; BULL, 2000). Segundo Bull (2000) a exposição de micro-organismos aos "fatores marinhos" pode provocar grande alterações metabólicas e a síntese de metabólitos biotecnologicamente exploráveis.

Como decompositores da matéria orgânica no ambiente marinhos, os fungos de origem marinha são fontes potenciais de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Neste contexto, enzimas como amilases, celulasas, lipases, ligninases, xilanases, proteases e glucosidases foram reportadas como produzidas esses fungos (RAGHUKUMAR *et al.*, 1994, RAGHUKUMAR *et al.*, 2004a, CHI *et al.*, BAKER *et al.*, 2009, VERMA *et al.* 2010; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010a, 2010b e 2012, DEL-CID *et al.*, 2014).

Arfi (2013) analisou efeito de salinidade sobre a produção de enzimas ligninocelulolíticas sugerindo que a presença do sal modifica a composição da enzima, com um aumento na produção de xilanases e celulasas e uma diminuição na produção de oxidases. Como resultado, a celulose e hidrólise de hemicelulose são aumentadas, mas é reduzida a decomposição de lignina. Este estudo destaca a adaptação ao sal de fungos de manguezais e seu potencial para aplicações biotecnológicas.

Kato (1995) descreveu pela primeira vez as propriedades de uma protease ativa por alta pressão produzida pelo fungo *Sporosarcina* sp. DSK25, o qual foi isolado de sedimento do

fundo do mar. Raghukumar *et al.* (2004) relataram a produção de xilanases por fungos marinhos. Bonugli-Santos *et al.*, (2010a) reportaram a produção de ligninases sob diferentes fontes de carbono e salinidade pelos fungos de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 e *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, isolados respectivamente dos zoantídeos *Mussismilia hispida*, *Palythoa variabilis* e *Palythoa caribaeorum* coletados no litoral norte do Estado de São Paulo.

2.6. Enzimas produzidas por fungos adaptados ao frio

A vida em ambientes frios requer uma vasta gama de características adaptativas em quase todos os níveis celulares e funções. No entanto, um fator determinante dessas adaptações está na função das proteínas que dirigem o metabolismo microbiano e ciclo celular. As enzimas adaptadas ao frio foram consideradas como pré-requisito para adaptação nestes ambientes (STRUVAY e FELLER, 2012).

Uma importante característica das enzimas adaptadas ao frio é a correlação da alta atividade catalítica e a estabilidade térmica a temperaturas baixas/médias, que pode ser parcialmente explicado pelo aumento da faixa de atuação da enzima, em comparação com enzimas mesófilas e termófilas (GEORLETTE *et al.*, 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). O efeito da temperatura sobre a atividade de enzimas psicofílicas e mesofílicas está ilustrado na Figura 1. Estes gráficos revelam características básicas com relação à adaptação ao frio. Para compensar a velocidade de reação lenta a baixas temperaturas, os organismos psicofílicos sintetizam enzimas com atividade específica de uma até dez vezes maior do que as mesofílicas, sendo esta a principal adaptação fisiológica do ponto de vista enzimático. Em adição, a temperatura para uma atividade máxima aparente para enzimas adaptadas ao frio é deslocada para temperaturas baixas, o que reflete a fraca estabilidade destas proteínas e seus desdobramentos e inativação a temperaturas moderadas (STRUVAY e FELLER, 2012).

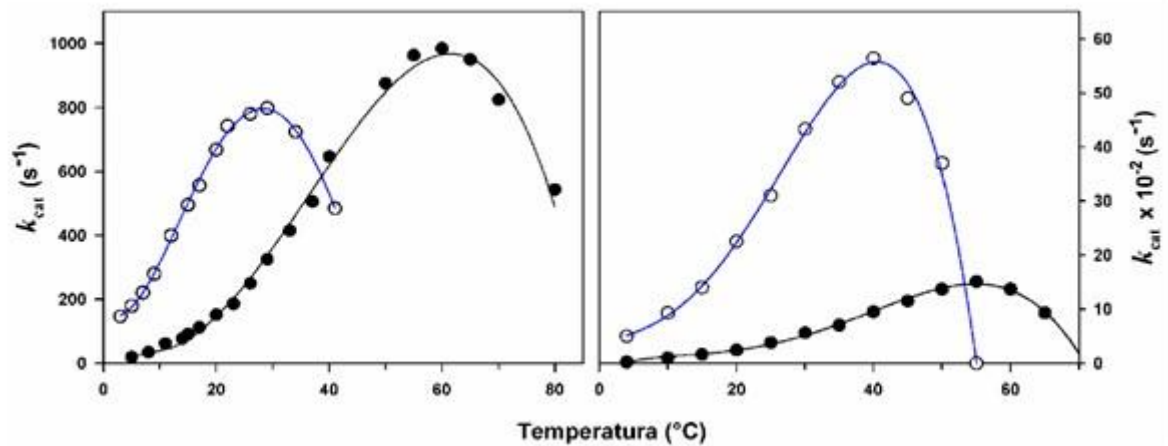


Figura 1. A atividade enzimática em relação a temperatura. A atividade da enzima psicrófila (linha azul) e mesófila (linha preta). Gráfico esquerdo, amilases; gráfico direito, celulasas. Ambas as enzimas são psicrófilas, produzidas pela bactéria *Pseudoalteromonas antarctica* (adaptado de STRUVAY e FELLER, 2012).

Essas propriedades fazem com que as enzimas adaptadas ao frio sejam altamente promissoras do ponto de vista biotecnológico, pois aceleram o tempo de processos realizados a baixas temperaturas, reduzem a concentração enzimática requerida, resultam em alta produtividade nas reações com componentes termo-sensíveis, previnem transformações químicas indesejáveis e a perda de compostos voláteis e ainda diminuem os gastos com energia elétrica (MARGESIN *et al.*, 2002).

Essas enzimas possuem estruturas terciárias e quaternárias arranjadas de forma mais aberta e flexível, devido à menor quantidade de ligações dissulfeto e estruturas secundárias rígidas, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo. Além disso, a presença de grupos de glicinas ao redor do sítio ativo, assim como um conteúdo maior de hidroxilas nos seus resíduos de serina e treonina auxiliam na solvatação da proteína, possibilitando o acesso do substrato ao sítio ativo em temperaturas baixas. Esses fatores resultam ainda em uma maior termolabilidade, o que permite a sua inativação em temperaturas mais baixas, sem o comprometimento das características do produto e a inativação seletiva de compostos em misturas complexas (GERDAY e GLANSBORFF, 2007; FELLER e GERDAY, 2003; FELLER *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, foi relatada uma variedade de enzimas como queratinases, pectinases, proteases, amilases, quitinases, oriundas de micro-organismos antárticos, no entanto, a grande maioria é produzida por bactérias (KRISHNAN *et al.*, 2011). Duarte *et al.*, (2013), descreveu a produção das enzimas xilanases, lipases e proteases em temperaturas baixas e moderadas por leveduras da Antártica. Os fungos filamentosos antárticos possuem grande potencial para produção de diversas enzimas com aplicação biotecnológica. DEL-CID *et al.*, (2013), relatou pela primeira vez produção de xilanases por fungos antárticos em temperaturas baixas, sendo o

melhor produtor um fungo isolado de esponja marinha identificado como *Cladosporium* sp. Contudo, muito pouco se sabe sobre a atividade xilanolítica de fungos de climas frios como o da Antártica (COLLINS *et al.*, 2005).

2.7. Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal da xilana (COLLINS *et al.*, 2005). Xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, sendo maior constituinte da hemicelulose presente na parede celular de plantas, representando um importante componente estrutural de biomassa vegetal que compõe os resíduos agrícolas. Devido à sua estrutura heterogênea, a degradação da xilana requer um complexo de enzimas para sua total degradação conforme demonstrado na Figura 2.

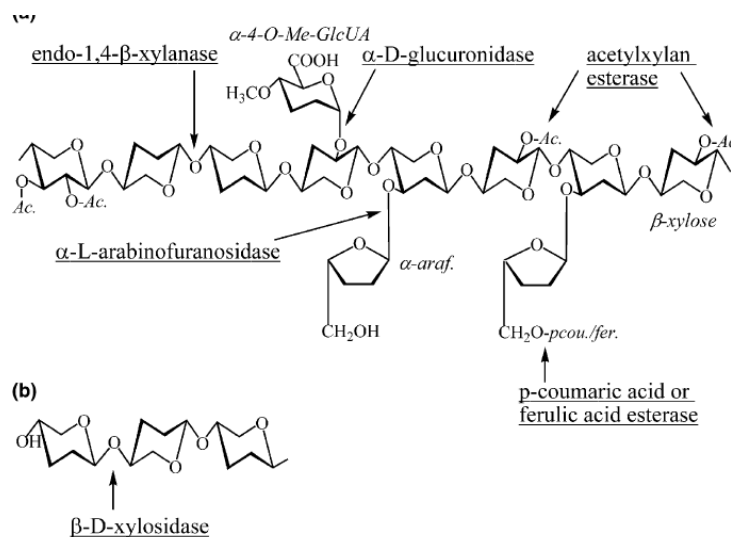


Figura 2. Enzimas constituintes do complexo xilanolítico (SUN *et al.*, 2012).

As xilanases (EC 3.2.1.8) catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal da xilana (COLLINS *et al.*, 2005). Estudos mostram que efeitos sinérgicos entre as enzimas xilanolíticas aumentam a suscetibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Da mesma forma, as xilanases provenientes de micro-organismos crescidos sobre diferentes fontes de carbono também atuam em sinergia sobre a xilana, aumentando a quantidade de açúcares liberados durante a hidrólise (MOREIRA; MATTOS *et al.*, 2008).

As xilanases, juntamente com outras hidrolases são produzidas principalmente por micro-organismos para quebra de paredes celulares vegetais. Estas podem também ser

encontradas em crustáceos, insetos, algas marinhas, caramujos e sementes de plantas terrestres (BIELY *et al.*, 1985; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; FILHO, 2004; COLLINS *et al.*, 2005).

Os fungos filamentosos se destacam por secretar essas enzimas em meio extracelular e os níveis de xilanases apresentam valores mais altos do que aqueles encontrados em leveduras e bactérias (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; FILHO, 2004; HALTRICH *et al.*, 1996; POLIZELI *et al.*, 2005). Os fungos também possuem a vantagem de produzir a enzima em pH relativamente baixo. Estudos tem demonstrado que os fungos produzem xilanases com diferentes propriedades (MEDEIROS, 2007). Em adição, esses micro-organismos possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também as suas ramificações (HALTRICH *et al.*, 1996; KULKARNI *et al.*, 1999). Exemplos típicos de produtores de enzimas xilanases são: *Aspergillus niger*, que produz 15 xilanases extracelulares e cinco endo-xilanases (APERL-BIRKHOOLD; WALTON, 1996); *Trichoderma viride*, que produz 13 xilanases (BIELY *et al.*, 1985) e *Cochliobolus carbonum*, produtor de 3 endo-xilanases (APERL-BIRKHOOLD; WALTON, 1996).

As xilanases apresentam grande diversidade de características bioquímicas e esta variedade permite a aplicação destas enzimas em diferentes processos biotecnológicos. As potenciais aplicações de xilanases incluem a bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agroindustriais em produtos de fermentação, clarificação de sucos, bem como a melhoria da consistência da cerveja e da digestibilidade de matérias-primas de origem animal (WONG, 1988). Uma das principais aplicações biotecnológicas da xilanase é a sua utilização em operações de branqueamento da polpa (VIAKARI *et al.*, 1994). A importância da xilanase nas indústrias de papel e celulose está relacionada com a hidrólise de xilana, o que facilita a liberação da lignina e, conseqüentemente, reduz o uso de cloro como agente de branqueamento (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; BETINI *et al.*, 2008). Os micro-organismos capazes de produzir xilanases (para hidrolisar o xilana) e de fermentar a xilose têm sido alvo de pesquisas, já que apresentam grande potencial de reduzir os custos de produção de etanol em biorrefinarias (DODD, CANN, 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

2.8. Asparaginase

A enzima L-asparaginase (L-ASPases) (E.C.3.5.1.1) é responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido não essencial L-asparagina, resultando em ácido aspártico e amônia como demonstrado na Figura 3 (NARTA, 2007; VERNA, 2007).

Em células normais o aminoácido L-asparagina, necessário para síntese proteica é produzido no citoplasma pela enzima asparagina sintetase, esta não é sintetizada pelas células tumorais, devido a um silenciamento genético, forçando assim a célula tumoral a obter o aminoácido da corrente sanguínea. Este fato permitiu o desenvolvimento da enzima L-asparaginase como uma droga anti-tumoral e anti-leucêmica (SAVITRI *et al.*, 2002). Quando injetada na corrente sanguínea, a enzima causa depleção das reservas de L-asparagina do plasma, impedindo que as células tumorais absorvam o aminoácido levando as mesmas à falência. Esta deficiência de asparagina em células tumorais interfere rapidamente na síntese de proteínas, levando a uma inibição na síntese de DNA e RNA, com conseqüente deterioração da função celular e morte da célula tumoral (GRAHAM, 2003; BUSHMAN *et al.*, 2000, MÜLLER; BOOS, 1998). L-asparaginase tem sido utilizada como um anti-tumoral clinicamente satisfatório para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (ALL) e sarcoma linfático (PIETERS *et al.*, 2011).

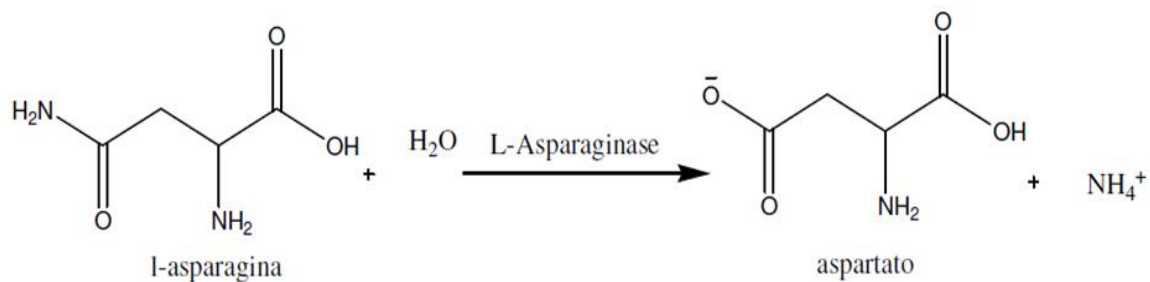


Figura 3. Reação catalisada pela L-asparaginase (modificado de Narta et al., 2007).

Segundo Sinha (2013), os micro-organismos podem ser considerados como fontes vantajosas de L-asparaginase devido: i) a capacidade de produção em massa; ii) ao processo ser relativamente econômico; iii) a facilidade de manipulação para obtenção de enzimas com as características desejadas e de preservação; iv) a facilidade de extração e de purificação da enzima.

L-asparaginase pode ser encontrada em plantas, tecidos de animais e em micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os principais representantes de bactérias reportados como produtores de L-asparaginase são *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus* sp., *Thermus aquaticus*, *Pseudomonas ovalis* e *Serratia marcescens*. Quanto às leveduras, representantes dos gêneros *Rhodotorula* e *Candida* têm sido reportados como produtores de L-asparaginase. Para os fungos filamentosos, a produção de asparaginase foi associada com as espécies *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans* e com os gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Entretanto, existem poucos estudos sobre a produção de L-asparaginase por fungos (LAPMAK, 2010).

As preparações de L-asparaginase disponíveis no mercado atualmente são derivadas de *E. coli* (Asparaginase®; Medac, Kidrolase®; EUSA Pharma, Elspar®; Merck) na sua forma nativa ou como enzima peguilada (fusionada a uma molécula de polietilenoglicol para aumento da sua biodisponibilidade - Oncaspar®; Sigma-Tau) e de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®; EUSA Pharma). As formulações de L-asparaginase nativas de *E. coli* disponíveis foram desenvolvidas entre 20 e 30 anos atrás, fazendo com que seu processo de produção seja ineficiente e desatualizado, restringindo o fornecimento do medicamento (PIETERS, 2008).

Apesar de ser um biofármaco amplamente utilizado, L-asparaginase possuem uma atividade de L-glutaminase e vários efeitos secundários associados com o tratamento à base de L-ASPases foram reportados, incluindo reações imunológicas, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, alterações da coagulação, entre outros. Como relatado por Imada e colaboradores (1973), muitos micro-organismos mostraram ser produtores de L-ASPases e também produzem L-glutaminase. A L-asparaginase pode contribuir para a atividade da L-glutaminase, reduzindo rapidamente as concentrações de glutamina circulante no plasma dos pacientes, porque esta é convertida em ácido glutâmico e amônia (OLLENSCHLÄGER *et al.*, 1988). Neste contexto, algumas pesquisas sugerem que a toxicidade da L-asparaginase é parcialmente atribuível à atividade da L-glutaminase.

Considerando a importância da L-ASPases como fármaco anti-leucêmico e os problemas de efeito colateral do biofármaco atualmente utilizado (origem bacteriana), a busca por novos recursos genéticos microbianos potencialmente produtores desta enzima poderá resultar na obtenção de uma droga mais eficiente.

2.9. Otimização por Planejamento Experimental

A produção enzimática pode ser influenciada por diferentes fatores incluindo: pH, salinidade, fontes de carbono e nitrogênio entre outros. Uma das formas de aumentar a produção enzimática pode ser o estímulo através da suplementação do meio nutriente com uma variedade de substratos indutores. O procedimento mais utilizado em estudos de produção de enzimas é o procedimento experimental “*one-at-a-time*”, que envolve o estudo de uma variável por vez, fixando-se as demais variáveis envolvidas no processo. Este método não avalia as possíveis interações e os efeitos sinérgicos entre as variáveis estudadas.

Para determinar a influência das variáveis sobre respostas desejadas e quantificar o efeito das variáveis no processo produtivo, o planejamento experimental deve ser realizado. Em adição, o planejamento experimental reduz o número de experiências ou repetições, melhorando a qualidade da informação obtida através dos resultados e permitindo análises estatísticas consistentes (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Várias estratégias podem ser adotadas para execução de um planejamento de experimentos. Cada uma dessas estratégias possui suas particularidades, tornando-as mais adequadas do que outras, dependendo da situação problema que se pretende avaliar (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O planejamento experimental pode partir de uma situação na qual existem poucas ou até nenhuma informação sobre o efeito da variável no sistema em estudo ou o conhecimento se limita apenas a informação bibliográfica. Nessas condições, deve-se fazer uma triagem e descartar as variáveis não significativas. O método proposto por *Plackett e Burman* (1946) permite estimar todos os efeitos principais com variância mínima. Esta abordagem é muito utilizada em ensaio de *screening* das variáveis importantes no sistema, quando existe pouco conhecimento a respeito dos principais fatores que interferem no processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005). O planejamento *Plackett-Burman* é classificado como delineamento fatorial fracionado de dois níveis, seus arranjos são criados em tamanhos múltiplos de quatro, compostos de sinais positivos para os níveis superiores, e sinais negativos para os níveis inferiores (MONTGOMERY, 2001; PLACKETT; BURMAN, 1946).

Os planejamentos experimentais fatoriais completos, estudam todas as variáveis experimentais que afetam a resposta do sistema, utilizando pelo menos dois níveis (valores) para cada um dos fatores e podem dar origem a um grande número de ensaios. Isto acontece porque até mesmo processos simples podem ser afetados por um grande número de fatores. Além disso, estes fatores podem afetar a resposta do sistema interativamente, ou seja, o efeito de um fator pode depender dos níveis de outros. Quaisquer interações também devem ser

diferenciadas aleatoriamente de erros de medição (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2013). Muitas vezes é necessário mais de um planejamento experimental para se atingir o objetivo desejado (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

O presente estudo teve como objetivo principal organizar e prospectar o acervo de fungos marinhos e de fungos da Antártica mantidos na CRM-UNESP.

3.2. Objetivos específicos:

- Reativação dos fungos derivados de ambientes marinhos da costa brasileira e marinhos e terrestres da Antártica visando verificação de viabilidade e pureza;
- Estruturação de um banco de imagens dos fungos puros e viáveis;
- Estruturação de novos lotes de preservação por dois métodos distintos (criopreservação e Castellani);
- Triagem qualitativa (meio sólido) dos fungos produtores de xilanase e L-asparaginase;
- Triagem quantitativa (meio líquido) dos fungos produtores de xilanase e L-asparaginase;
- Avaliação de diferentes fatores na produção de xilanase e/ou L-asparaginase pelo melhor fungo produtor, visando otimização do processo.
- Caracterização parcial da enzima xilanase produzida pelo isolado selecionado, cultivado em condições otimizadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fungos filamentosos

Para a condução do presente estudo foram utilizados 881 fungos filamentosos mantidos na coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos UNESP (CRM-UNESP), sendo 696 isolados de diferentes amostras marinhas da costa brasileira e 185 isolados de amostras marinhas e terrestres da Antártica. Os fungos filamentosos marinhos da costa brasileira e os da Antártica estudados foram isolados no CPQBA/UNICAMP no âmbito dos Projetos Fapesp 2005/51213-8, 2005/60175-2, 2010/50190-2 e no âmbito do Programa Antártico Brasileiro – PROANTAR do CNPq (Projeto: “A vida microbiana na criosfera antártica: Mudanças climáticas e bioprospecção”), sob a orientação da Profa. Dra. Lara Sette.

4.2. Organização do acervo

4.2.1. Avaliação de pureza e viabilidade

Após a reativação, os fungos foram submetidos a testes de pureza e de viabilidade celular. A pureza foi avaliada por meio de exames macro e microscópicos. A viabilidade do isolado foi avaliada por meio da verificação do desenvolvimento do micélio e da esporulação da colônia cultivada no meio de cultura Batata Dextrose Agar - PDA (fungos da Antártica) e Ágar Malte 2% - MA2 (fungos marinhos da costa brasileira). Com relação aos isolados contaminados, algumas culturas foram retiradas do acervo e inativadas (devido à incerteza de qual seria a cultura original) assegurando autenticidade da coleção, enquanto outras passaram por uma etapa de purificação.

4.2.2. Banco de imagens

Após o crescimento das colônias, os fungos puros e viáveis foram fotografados para montagem de um banco de imagens que está disponível no laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) para futuras comparações destas colônias e cujos dados estão sendo introduzidos no sistema informatizado da CRM-UNESP, o software μ SICol.

4.2.3. Preservação: Criopreservação e Castellani

Os fungos filamentosos puros e viáveis foram preservados por dois métodos distintos: criopreservação (-80°C) e Castellani (4°C). Os isolados derivados de ambiente antártico foram cultivados em meio de cultura PDA a 15°C por 7-14 dias, enquanto que os isolados marinhos da costa brasileira foram cultivados em meio MA2 a 28°C por 7 dias. Após o crescimento da colônia, cerca de 4 cubos de ágar (0,5 cm x 0,5 cm) + micélios foram utilizados para cada método de preservação. Para o ultracongelamento, os cubos de ágar + micélio foram colocados em criotubos contendo glicerol 10% depositados no ultrafreezer a -80°C. No método de Castellani, os 4 cubos foram adicionados a tubos (2 mL) contendo água esterilizada, e armazenados em geladeira a 4°C (CASLELLANI, 1967). Cabe ressaltar que, para assegurar a viabilidade do acervo, a utilização de ao menos dois métodos distintos para a preservação dos recursos genéticos microbianos é uma recomendação das Diretrizes da OCDE para Boas Práticas de Centros de Recursos Biológicos (OCDE, 2007).

Os fungos preservados foram organizados no ultrafreezer -80°C e na geladeira (Castellani) em caixas específicas, com letras e números nas posições de cada criotubo. Para cada caixa foi dado um número e esta foi organizada em um lugar específico no ultrafreezer ou geladeira visando facilitação da localização de cada isolado preservado. Os registros das posições dos criotubos, bem como das caixas (mapeamento) estão documentados em planilha excel no computador do laboratório LAMAI e estão sendo transferidos para o sistema informatizado de gerenciamento do acervo da CRM-UNESP, o software μ SICol.

4.3. Seleção de fungos produtores de xilanases

Para seleção inicial de fungos produtores da enzima xilanase os isolados foram cultivados no mesmo meio de cultivo utilizado no isolamento: MA2 por 7 dias a 28°C (isolados de origem marinha da costa brasileira) e PDA de 7-14 dias a 20°C (isolados de origem Antártica).

4.3.1. Triagem qualitativa (meio sólido)

Os isolados foram inoculados separadamente em tubos tipo Eppendorf (2 mL) contendo 1 mL de meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) contendo xilana como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 28°C (marinhos brasileiros) e a 20°C (marinhos e terrestres da

Antártica) a 120 rpm por 7 dias. Em seguida, foi realizada a centrifugação (15 min a 3000 rpm), onde foi retirado o extrato enzimático (sobrenadante). Uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foi depositada em canudos dispostos em placa de Petri contendo meio de cultura ágar-xilana. As placas foram incubadas por 48 h (Figura 4). Decorrido o tempo de incubação, os canudos foram retirados e o meio corado com lugol para revelação. A presença de halo de degradação da xilana presente no meio de cultivo foi o indicativo da presença da enzima (COSTA, 2014).

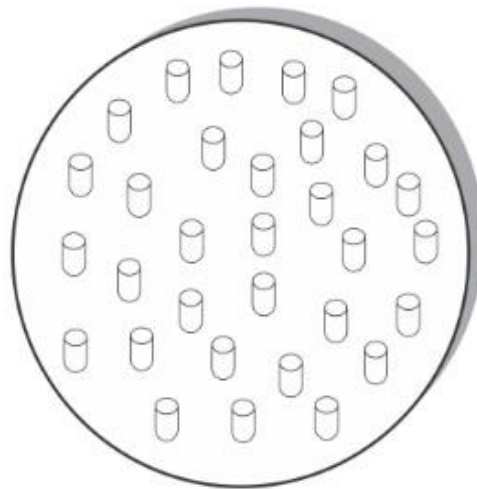


Figura 4. Esquema da disposição dos canudos para triagem enzimática de xilanases.

4.3.2. Triagem quantitativa (meio líquido)

Os fungos filamentosos selecionados pela presença do halo de degradação foram cultivados em PDA (fungos da Antártica) e MA2 (fungos marinhos da costa brasileira). Após o crescimento, cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias dos isolados foram transferidos para Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio Mandels e Sternburg's (MS) contendo (g/L): peptona, 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4; KH_2PO_4 , 2,0; ureia, 0,3; CaCl_2 , 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4; CoCl_2 , 2,0; pH 6,0 e xilana *birchwood* 10,0 (Sigma-Aldrich) como substrato indutor. Os ensaios foram incubados a 20°C (fungos da Antártica) e 28°C (fungos marinhos da costa brasileira) por 7 dias a 140 rpm. Os extratos foram obtidos por centrifugação dos meios líquidos de cultivo a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e utilizados para determinação da atividade enzimática (em triplicata) de acordo com a metodologia abaixo descrita.

4.3.3. Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pelo método de Miller (1959) através da quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana *birchwood* (Sigma-Aldrich) conforme descrito por Bailey *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico, também chamado Reagente de Summer (MARTINELLI; PANEK, 1968). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto nas condições de ensaio. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, e calculados conforme a equação abaixo.

$$U/mL = \frac{1 * v_f * \frac{1}{v_i} * 10^3 * \text{média Abs.} * d}{\epsilon}$$

Onde:

Vf = volume final (substrato + tampão + extrato)

Vi = volume de amostra (extrato)

1/5 = tempo (5 minutos)

10³ = mg para μg

d = diluição

ϵ : absorvidade da xilose: a (coeficiente obtido da reta padrão da xilose) x M (massa molecular da xilose)

4.4. Seleção de fungos produtores de L-asparaginase

4.4.1. Triagem qualitativa (meio sólido)

Os fungos estudados foram cultivados em meio de cultura PDA durante 7 dias a 28 °C (fungos marinhos da costa brasileira) e durante 7-14 dias a 20 °C (fungos da Antártica). Em seguida foi cortado um disco de ágar + micélio (5 mm de diâmetro) da margem de crescimento da colônia, o qual foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo meio de cultivo ágar Czapek Dox's modificado composto por (g/L): glicose 2,0 , L-asparagina 10,0 , KH₂PO₄ 1,52 , KCl 0,52, MgSO₄.7H₂O 0,52, CuNO₃.3H₂O 0,001, ZnSO₄.7H₂O 0,001, FeSO₄.7H₂O 0,001, pH 6,2, suplementado com vermelho de fenol (0,009% concentração final) que foi

utilizado como indicador de produção de L-asparaginase. Para ensaios controle, o meio de cultivo não foi constituído do aminoácido L-asparagina. As placas foram incubadas por 5 dias a 28° C (fungos marinhos da costa brasileira) e 20 °C (fungos da Antártica). O aparecimento de uma zona rosa em torno da colônia foi utilizado como indicativo de produção de L-asparaginase (GULATI *et al.*, 1997).

4.4.2. Triagem quantitativa (meio líquido)

Os isolados que apresentaram coloração rosa intensa em torno da colônia foram cultivados no meio PDA, sendo um disco de ágar + micélio (5 mm de diâmetro) retirado das margens das culturas de fungos utilizado para inocular frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de Czapek Dox's modificado. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 28 °C (fungos marinhos da costa brasileira) e 20 °C (fungos da Antártica) durante 7 dias 140 rpm. Após esse período, os caldos enzimáticos foram obtidos por filtração em papel de filtro Whatman nº 1 seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e utilizados para determinação da atividade enzimática (em triplicata) de acordo com a metodologia abaixo descrita.

4.4.3. Atividade de L-asparaginase

A atividade da enzima L-asparaginase foi determinada pelo método padrão Sigma. O método é dividido em duas etapas. Etapa 1: foi constituída da mistura de 1,0 mL tampão Tris (50 mM) pH 8,6 em 37°C; 0,1 mL asparagina (189 mM); 0,9 mL de água Mili-Q; 0,1mL amostra. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. Para cada amostra analisada foi realizado um branco, diferenciado da amostra teste pela adição de 0,1 mL de TCA (1,5 Mm) antes de a amostra ser adicionada. Os tubos foram centrifugados (XG) por 2 min e os sobrenadantes foram utilizados na Etapa 2 que foi constituída de: 0,2 mL sobrenadante; 4,3 mL água Mili-Q e 0,5 mL de reagente Nessler. A leitura foi conduzida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 436 nm. A concentração de amônia produzida na reação é determinada com base numa curva padrão previamente obtida, utilizando sulfato de amônia como padrão. Uma unidade de L-asparaginase foi considerada como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de amônia por min a 37 °C foi expressa em U/mL (GULATI *et al.*, 1997; THEANTANA *et al.*, 2007) e calculada conforme equação abaixo.

$$U/mL = \frac{(\text{umols de amônia da amostra}) \times (\text{volume etapa 1})}{(\text{volume de etapa 1 para etapa 2}) \times (\text{tempo de reação etapa 1}) \times (\text{volume de amostra})}$$

4.5. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima xilanase (planejamento experimental).

O planejamento de experimento e otimização de processos através do delineamento experimental para a enzima xilanase foi realizado para o isolado marinho LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) que apresentou o melhor resultado nos experimentos de produção enzimática na triagem quantitativa. Visando otimização da produção de xilanases e a avaliação da influência de diferentes fatores na atividade enzimática o isolado selecionado foi cultivado em meio sólido MA2 por 7 dias a 28° C. Experimentos e análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA 8 (2300 East 14 th Street Tusla, OK 74 104, USA), como apresentado abaixo.

4.5.1. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 10 variáveis

No primeiro planejamento experimental foi utilizada a matriz *Plackett-Burman* (PB) de 16 ensaios, para avaliação de 10 variáveis independentes: quantidade de inóculo, pH, salinidade (água do mar artificial), concentrações de (NH₄)₂SO₄, peptona, sacarose, xilana e os resíduos agroindustriais bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e palha de arroz (Tabela 1). As variáveis agitação e temperatura foram fixadas em 140 rpm e 28 °C, respectivamente. Para a salinidade foi utilizada água do mar artificial, contendo (em g L⁻¹ de água destilada): NaCl (23,93), Na₂SO₄ (4), KCl (0,68), NaHCO₃ (0,19), KBr (0,098), H₃BO₃ (0,026), NaF (0,003), MgCl₂·6H₂O (10,83), CaCl₂·2H₂O (1,51) e SrCl₂·6H₂O (0,02) (KESTER *et al.*, 1967). Todas as diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior (Tabela 1). Quatro ensaios no ponto central foram acrescentados à matriz para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados, totalizando 20 ensaios (PB16) e permitindo a avaliação do efeito das 10 variáveis sobre produção de xilanases.

Tabela 1. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental *Plackett-Burman* (PB16) com 10 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado *A. tubingensis* LAMAI 31.

Variáveis	-1	0	1
pH	5	6	7
ASW (%)	0	50	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/50mL)	0	0,1	0,2
Peptona (g/50mL)	0	0,5	1
Bagaço de cana (g/50mL)	0	1,5	3
Farelo de trigo (g/50mL)	0	1,5	3
Palha de arroz(g/50mL)	0	1,5	3
Sacarose (g/50mL)	0	0,5	1
Inóculo (<i>pellet</i>)	1	2	3
Xilana (g/50mL)	0	0,5	1

4.5.2. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 5 variáveis

Os resultados obtidos no PB16 foram utilizados como parâmetros para a estruturação de um segundo planejamento experimental PB de 12 ensaios, sendo 4 ensaios no ponto central, totalizando 16 ensaios (PB12). As variáveis utilizadas no PB12 foram pH, peptona, palha de arroz, xilana, quantidade de inóculo, como pode ser observado com mais detalhe na Tabela 2. A variável bagaço de cana por ter apresentado resultado significativo foi fixada em 3g/50ml.

Tabela 2. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental *Plackett-Burman* (PB12) com 5 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado *A. tubingensis* LAMAI 31.

Variáveis	-1	0	1
pH	6	7	8
Peptona (g/50mL)	0	1	2
Palha de arroz(g/50mL)	1,5	3	4,5
Xilana (g/50mL)	0	1	2
Inóculo (<i>pellet</i>)	3	4	5

4.5.3. Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹

Com base nos resultados do segundo PB foi estruturado um novo planejamento experimental, utilizando a matriz fatorial fracionado 2⁴⁻¹ de 12 ensaios. Para esse experimento foram utilizadas quatro variáveis: pH, quantidade de inóculo, peptona e palha de arroz. Para esse ensaio foi mantido o bagaço de cana já fixado no ensaio anterior em 3g/50ml. As variáveis junto com os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentadas na Tabela 3. O experimento constituiu de 8 ensaios mais 4 repetições do ponto central totalizando 12 ensaios (FF2⁴⁻¹).

Tabela 3. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹ (FF2⁴⁻¹) com 4 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado *A. tubingensis* LAMAI 31.

Variáveis	-1	0	1
pH	6	7	8
Inóculo (<i>pellet</i>)	5	6	7
Peptona (g/50mL)	0	2	4
Palha de arroz(g/50mL)	3,5	4,5	5,5

Os resultados derivados do FF2⁴⁻¹ foram mais baixos do que os que vinham sendo obtidos. Em função disso, um novo planejamento foi estruturado. Foram utilizadas as mesmas variáveis, porém, os valores dos pontos -1, 0 e 1 foram alterados.

Tabela 4. Faixa dos valores estudados no segundo planejamento experimental Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹ (FF2⁴⁻¹) com 4 variáveis para estudo da produção de xilanases pelo isolado *A. tubingensis* LAMAI 31.

Variáveis	-1	0	1
pH	5	6	7
Inóculo (<i>pellet</i>)	4	5	6
Peptona (g/50mL)	0	1	2
Palha de arroz(g/50mL)	2,5	3,5	4,5

4.6. Determinação de proteínas totais e atividade específica

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.*, (1951), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata.

Atividade específica (U/mg de proteína) foi determinada pela razão da atividade da enzima (U/mL) e o teor de proteína total (mg/mL).

4.7. Caracterização da enzima xilanase bruta

4.7.1. Influência do pH sobre a atividade xilanase

O pH ótimo de atividade foi determinado incubando-se a amostra do caldo enzimático bruto, com o substrato em tampões com diferentes valores de pH, variando de 3,0 a 9,0 com intervalos de 0,6 unidade. Os tampões utilizados foram: Mcilvaine (3,0 a 7,0), acetato de sódio (4,0 a 5,6), tris HCl (8,0 a 9,0).

4.7.2. Influência da temperatura sobre a atividade xilanase

As amostras da enzima foram incubadas com substrato em tampão Mcilvaine 0,1 mol/L pH 5,0, em banho-maria com temperaturas de 30 a 70 °C, com intervalos de 5 °C, para determinação da temperatura ótima de atividade da xilanase.

4.7.3. Estabilidade térmica da atividade xilanase

Para determinar a estabilidade térmica da xilanase, o caldo enzimático (obtido por filtração e centrifugação) foi incubado a 40, 45, 50 e 55°C por 60 minutos na ausência de substrato. Alíquotas das amostras foram retiradas em intervalos de 10 minutos, e foram mantidas em banho de gelo para análise da atividade xilanase em tampão Mcilvaine 0,1 mol/L, pH 5,0 a 50 °C.

4.7.4. Estabilidade da atividade xilanase em diferentes pHs

Para determinação da estabilidade ao pH, as amostras foram incubadas por 24 horas a 4 °C na ausência de substrato em tampões com valores de pH variando de 3,0 a 9,0, utilizando os mesmos tampões Mcilvaine e acetato de sódio citados no item 4.7.1. Após o período de incubação, foi determinada a atividade xilanase, a qual foi realizada em tampão Mcilvaine 0,1 mol/L, pH 5,0 a 50 °C.

4.8. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima L-asparaginase (planejamento experimental)

O planejamento experimental visando a otimização da produção da enzima L-asparaginase foi realizado com os dois isolados que se destacaram na produção da enzima, sendo um de origem Antártica (LAMAI 505) e outro de origem marinha da costa brasileira (LAMAI 297). Para ambos foi realizado um planejamento PB, constituído de 12 variáveis independentes e 4 pontos centrais (PB16). As variáveis independentes foram: pH, quantidade de inóculo (*pellets*) e concentração inicial de fonte de nitrogênio e carbono (L-prolina, L-asparagina, L-glutamina, ureia e extrato de levedura, glicose, sacarose, MgSO₄.7H₂O e KH₂PO₄) (Tabela 5).

Tabela 5. Faixa dos valores estudados no planejamento experimental *Plackett-Burman* com 12 variáveis para estudo da produção de L-asparaginase pelo isolado LAMAI 505 e LAMAI 297.

Variável	-1	0	1
L-prolina (g/50mL)	0	1	2
L-asparagina (g/50mL)	0	1	2
L- glutamina (g/50mL)	0	1	2
Ureia (g/50mL)	0	0,03	0,06
Glicose (g/50mL)	0	0,1	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/50mL)	0	0,02	0,04
Extrato de levedura (g/50mL)	0	0,5	1
pH	7	8	9
KH ₂ PO ₄ (g/50mL)	0	0,3	0,6
Sacarose (g/50mL)	0	0,1	0,2
Inóculo (<i>pellet</i>)	1	2	3

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Organização do acervo da Coleção CRM-UNESP

A coleção inicial era constituída de 881 fungos filamentosos, sendo 696 isolados de amostras marinhas da costa brasileira e 185 isolados de amostras marinhas e terrestres da Antártica. Após o procedimento de reativação visando verificação de viabilidade e pureza, 622 isolados foram considerados puros e viáveis, 88 foram considerados inviáveis devido a contaminação e 171 estavam inativos, não apresentaram crescimento. A inatividade pode ser atribuída ao tempo de preservação, já que muitos isolados estavam preservados desde 2007 (Figura 5). A taxa de recuperação do acervo foi de 71%. Este número pode ser considerado satisfatório, visto que esta foi a primeira avaliação do acervo após o isolamento dos fungos.

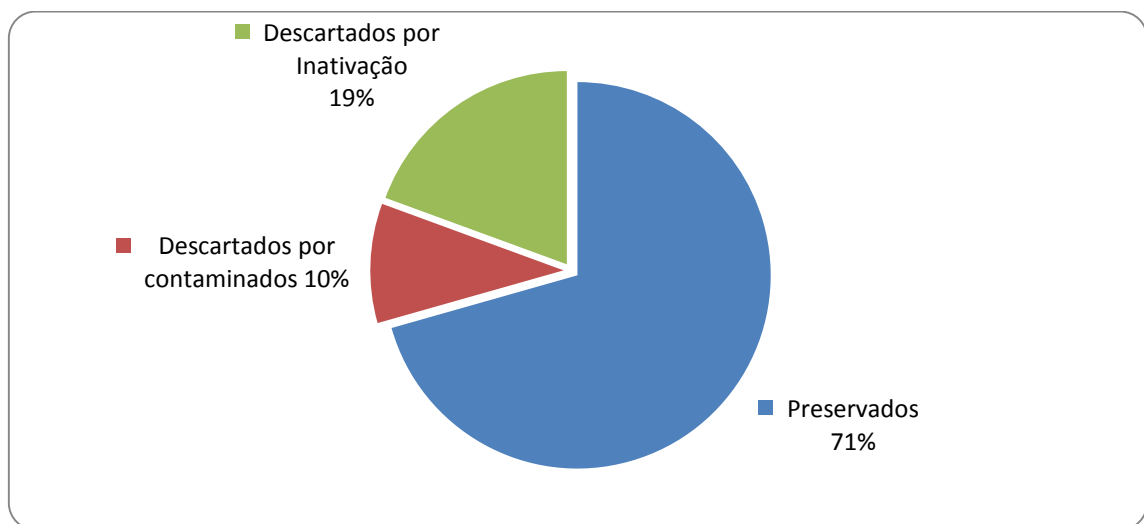


Figura 5. Representação do número de isolados recuperados, preservados (azul) frente aos contaminados (vermelho) e inativos (verde).

Todos os 622 isolados de fungos filamentosos puros e viáveis, foram fotodocumentados e submetidos a novos lotes de preservação, sendo 2 novas cópias mantidas pelo método de Castellani e 2 outras cópias pelo método de criopreservação utilizando os procedimentos de preservação da CRM-UNESP.

Um dos principais problemas relacionados ao uso de micro-organismos de um mesmo acervo por diversos alunos ou grupos de pesquisa é a contaminação da cultura original. Desta forma, destacamos a importância da estruturação do banco de imagens (Figura 6) e descrição macromorfológica do acervo de fungos filamentosos para futuras comparações.

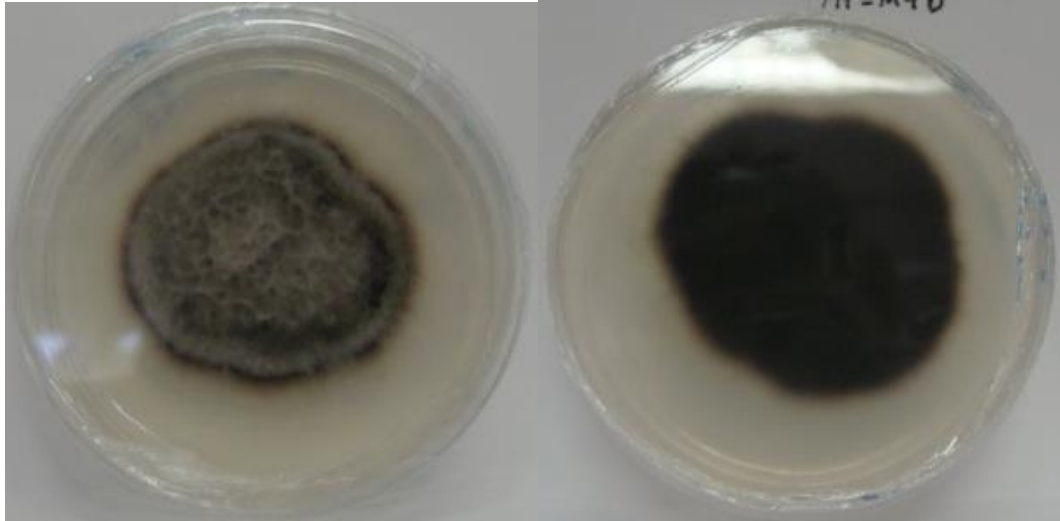


Figura 6. Fotodocumentação isolado antártico M4D cultivado em meio de cultura PDA durante 7-14 dias a 20 °C.

Cabe ressaltar que, duas cópias de cada fungo do acervo estudado (fungos marinhos da costa brasileira e fungos da Antártica), foram enviadas para a Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP (acervo original) visando renovação dos isolados puros e viáveis.

Todos os dados gerados sobre o acervo (fotos, mapeamento, produção de enzimas) estão documentados em planilha excel ou arquivos específicos e estão sendo transferidos para o sistema informatizado de gerenciamento do acervo da CRM-UNESP, o software μ SICol.

O μ SICol é um sistema de gerenciamento de coleções de culturas microbianas desenvolvido pelo Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) com o apoio do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). O objetivo do sistema é dar suporte às boas práticas de gerenciamento e documentação de processos e produtos garantindo a rastreabilidade e facilitando acesso livre e aberto aos dados por meio da internet (speciesLink, SIColNet, catálogos). O sistema contém diferentes módulos onde podem ser introduzidas informações diversificadas tais como dados sobre coleta, isolamento, identificação, depósito, cultivo, características, propriedades, estoque e controle de qualidade, além de informações sobre as instituições, pessoas, documentos, referências, preservação e distribuição e é capaz ainda de gerar relatórios diversificados. Em adição, o sistema é protegido por senha e contém filtro de acesso específico para os diferentes membros da equipe da coleção. Desta forma, algumas informações sigilosas são acessadas apenas pelo Gerente e/ou Curador da Coleção.

Os dados do acervo da CRM-UNESP introduzidos no μ SICol estão disponibilizados online na Rede *speciesLink* e podem ser acessados no endereço <http://splink.cria.org.br/manager/detail?setlang=pt&resource=CRM-UNESP>. Em adição os

dados do acervo principal da CRM-UNESP serão transferidos também para o Sistema de Informações sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr) (Projeto Edital MCTI/CNPq 45/2012). O SiBBr é uma plataforma online desenvolvida pelo MCTI com o objetivo de estimular e facilitar a publicação, integração, acesso e uso da informação sobre a biodiversidade brasileira, subsidiando pesquisas e apoiando o processo de formulação de políticas públicas e tomada de decisões associadas à conservação e ao seu uso sustentável. O SiBBr é também o nodo brasileiro do *Global Biodiversity Information Facility (GBIF)*, a rede global de sistemas de informação em biodiversidade.

5.2. Seleção de fungos produtores de xilanases

5.2.1. Triagem qualitativa (meio sólido)

Os 622 fungos filamentosos puros e viáveis foram submetidos a uma triagem inicial para produção xilanases (qualitativa em meio sólido), sendo o parâmetro utilizado para avaliar a produção da enzima a presença de halo de degradação em torno do canudo contendo os extratos enzimáticos dos isolados estudados, os quais foram previamente cultivados em meio contendo xilana como fonte de carbono (Figura 7).

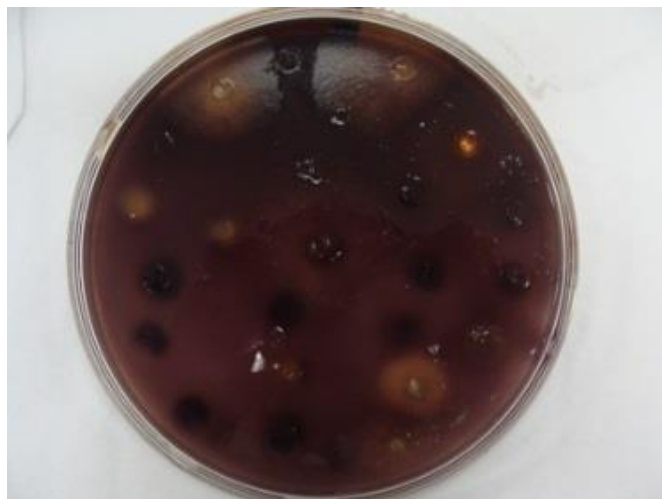


Figura 7. Triagem qualitativa de fungos filamentosos marinhos em meio sólido (ágar e xilana) incubados durante 48 horas a 28 °C para avaliação de produção de xilanases.

Dentre os 493 isolados derivados de ambiente marinho da costa brasileira e 129 de ambiente antártico (marinhos e terrestres), 131 foram considerados positivos para xilanases, representando 21% do acervo estudado. Entre os fungos considerados positivos para produção

de xilanases em meio sólido, 112 foram isolados de ambiente marinho da costa brasileira e 19 de ambientes antárticos.

5.2.2. Triagem quantitativa (meio líquido)

Os resultados da triagem inicial revelaram que 131 isolados foram capazes de degradar a xilana no meio sólido, os quais foram submetidos a uma segunda triagem em meio líquido mínimo contendo xilana como única fonte de carbono para quantificação da atividade enzimática.

Dos 112 fungos marinhos (da costa brasileira) selecionados e avaliados no presente estudo, apenas cinco não apresentaram atividade de xilanase em meio líquido. Para os 107 produtores de xilanase em meio líquido, a atividade enzimática variou de 0,25 a 49,41 U/mL. Na Tabela 6 estão apresentados os dados de 31 dos fungos de origem marinha (costa brasileira), os quais apresentaram resultados superiores a 10 U/mL de xilanase. Dentre estes, o isolado LAMAI 31 de origem marinha identificado como *Aspergillus tubingensis* apresentou o melhor resultado de produção da enzima (49,41 U/mL), seguido pelo isolado não identificado LAMAI 155 (30,65 U/mL) e pelo isolado LAMAI 67 identificado como *Trichoderma* sp. (25,20 U/mL). Um fungo de origem marinha identificado como *Aspergillus niger* foi reportado como produtor de xilanase (580 U/L enzima bruta) com propriedades únicas, sendo estas atividades em pH alcalino, livre de celulase e termoestável, com potencial aplicação em biobranqueamento de polpa de papel. Testes realizados com polpa de papel durante 60 minutos a 55 °C resultou em um decréscimo de 10 kappa e redução de 30% no consumo de ácido clorídrico usado no processo de branqueamento da polpa de papel (RAGHUKUMAR, 2004).

Tabela 6. Produção de xilanases por fungos marinhos da costa brasileira (valores maiores do que 10 U/mL) após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.

Isolado	U/mL	Táxon	Substrato de origem
LAMAI 31	49,41	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 155	30,65	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 67	25,20	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 452	23,39	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 74	21,48	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 12	20,58	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Didemnum</i> sp.
LAMAI 288	19,22	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 414	19,06	NI	<i>Petromica citrina</i>
LAMAI 694	18,70	<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	Esponja
LAMAI 684	17,69	<i>Xylaria</i> sp.	Esponja
LAMAI 22	17,49	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 463	16,55	NI	<i>Palythoa variabilis</i>
LAMAI 121	16,09	NI	<i>Didemnum</i> sp.
LAMAI 306	15,85	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 176	15,43	NI	<i>Mycale laxissima</i>
LAMAI 269	15,21	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 3	15,17	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Didemnum</i> sp.
LAMAI 239	15,01	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
M6 8.1	14,97	NI	Esponja
LAMAI 344	14,34	NI	<i>Amphimedon viridis</i>
LAMAI 37	14,06	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Mycale laxissima</i>
4.2 ALGA	14,04	NI	Alga
LAMAI 112	13,86	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
M7 8.2	13,78	NI	Esponja
LAMAI 160	13,62	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
M1 1.3	13,00	NI	Esponja
LAMAI 423	12,80	NI	<i>Petromica citrina</i>
LAMAI 301	12,60	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>
LAMAI 42	11,96	NI	<i>Mycale laxissima</i>
LAMAI 439	11,68	NI	<i>Palythoa variabilis</i>
LAMAI 17	11,37	NI	<i>Dragmacidon reticulatum</i>

*NI= não identificado.

Entre os isolados identificados podemos observar que os melhores produtores da enzima pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. Fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* de origem marinha se destacaram em outros estudos envolvendo a produção de xilanase (RAGHUKUMAR, 2004). Representantes de origem terrestre deste gênero também foram reportados como bons produtores de xilanase (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 1999; GHANEM *et al.*, 2000; De SOUZA *et al.*, 2001). De acordo com dados de literatura, fungos do gênero *Trichoderma* vêm demonstrando potencial para produção de xilanases (SEYIS; AKSOZ, 2004; CHEN *et al.*, 1997; DESGRANGES; DURAND, 1990). Entretanto, até aonde vai o nosso conhecimento, não há relatos em literatura sobre representantes de *Trichoderma* de origem marinha produtores de xilanase.

Em relação aos substratos de origem dos fungos marinhos (da costa brasileira) que apresentaram as melhores atividades de xilanase (Tabela 6), notamos a predominância de isolados provenientes de esponjas marinhas, principalmente *D. reticulatum*. Considerando o fato de que as esponjas têm como característica a captura de alimentos (e.g. fitoplâncton, algas e outros organismos planctônicos) pela filtração, é razoável inferir que os micro-organismos encontrados nas esponjas sejam produtores de enzimas hidrolíticas e/ou oxidativas capazes de converter a matéria orgânica em nutrientes (WANG *et al.*, 2006).

Com relação às análises da quantificação de xilanases pelos 19 fungos isolados de ambientes antárticos (marinhos e terrestres), o isolado sem identificação LAMAI 558 apresentou a melhor produção da enzima (40,08 U/mL), seguido pelo isolado LAMAI 587 identificado como *Penicillium* sp. (35,45 U/mL) (Tabela 7). Cabe destacar que, os dois isolados da antártica com melhor produção de xilanase são provenientes de ambiente marinho da Antártica: *Nacella* sp. (LAMAI 558) e estrela do mar (LAMAI 587).

Tabela 7. Produção de xilanases por fungos marinhos e terrestres da Antártica após 7 dias de cultivo a 20°C e 140 rpm.

Isolado	U/mL	Táxon	Substrato de origem / amostra
LAMAI 558	40,08	NI	<i>Nacella</i> sp./Marinha
LAMAI 587	35,45	<i>Penicillium</i> sp.	Estrela do mar/Marinha
LAMAI 505	27,04	NI	Caramujo/Marinha
LAMAI 610	25,58	NI	Líquen/Terrestre
LAMAI 600	24,65	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Nacella</i> sp. /Marinha
LAMAI 606	22,90	<i>Penicillium</i> sp.	Estrela do mar/Marinha
LAMAI 571	11,33	NI	Estrela do mar/Marinha
LAMAI 528	0,66	NI	Anfípode/Marinha
LAMAI 513	0,56	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Sedimento/Marinha
LAMAI 583	0,54	NI	Anfípode/Marinha
LAMAI 556	0,46	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Madeira/Terrestre
LAMAI 499	0,34	NI	<i>Salpa</i> sp. /Marinha
LAMAI 550	0,35	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Ascídia/Marinha
LAMAI 613	0,25	NI	Solo pinguineira/Terrestre
LAMAI 506	0,24	<i>Penicillium</i> sp.	Osso de baleia/Terrestre
LAMAI 565	0,22	NI	Madeira/Terrestre
LAMAI 497	0,14	NI	Madeira/Terrestre

*NI= não identificado

Dentre os fungos Antárticos produtores de xilanase, destacam-se os representantes do gênero *Penicillium*, como demonstrado na Tabela 7. Estudos anteriores reportaram que representantes desse gênero são altamente promissores para produção de xilanase (TERRASAN *et al.*, 2013; SIMÕES, 2006). Hou *et al.*, (2006), descreveu que a xilanase adaptada ao frio produzida por *Penicillium chrysogenum* mostrou atividades hidrolíticas elevadas a baixa temperatura (2-15 °C) e alta sensibilidade em temperatura elevada (> 50 °C)

Os resultados obtidos no presente estudo revelam o potencial dos fungos de origem marinha, tanto os da costa brasileira quanto os da Antártica, para produção da enzima xilanase.

5.3. Seleção de fungos produtores de L-asparaginase

5.3.1. Triagem qualitativa (meio sólido)

Além dos 622 isolados utilizados no presente estudo, foram adicionados mais 17 isolados para os testes de produção de L-asparaginase. Dentre os 639 fungos filamentosos analisados, 510 são de origem marinha da costa brasileira e 129 de origem Antártica. O parâmetro para seleção dos fungos foi a presença do halo colorimétrico rosa (*pink*) formando em torno na colônia (Figura 8I). De acordo com De Jong (1972) a produção de L-asparaginase é geralmente acompanhada por um aumento do pH das culturas dos filtrados. O ensaio de placa incorporou este princípio e usa indicador de pH vermelho de fenol em meio contendo asparagina como única fonte de nitrogênio. Vermelho de fenol em condições ácidas é amarelo e no estado alcalino fica rosa (*pink*) (GULATI *et al.*, 1997).

Dentre os isolados analisados 407 (63,7%) foram considerados positivos para produção da enzima em meio sólido e 232 foram negativos devido à ausência de halo ou a presença de halos considerados não satisfatórios (fracos). Para todos os ensaios foram realizados teste controle, utilizando o mesmo meio de cultivo sem a presença do aminoácido asparagina. Em relação aos fungos positivos, 333 foram isolados de ambiente marinho (costa brasileira) e 74 de ambiente marinho e terrestre da Antártica.



Figura 8. Triagem em meio sólido da enzima L-asparaginase em meio de cultura Czapek Dox'sa modificado, à esquerda controle positivo à direita controle negativo.

Thirunavukkarasu *et al.*, (2011) relataram a presença de L-asparaginase em fungos endofíticos isolados de ambiente marinho, onde dentre os 82 isolados estudados, 64 foram

positivos para esta enzima. Nageswara *et al.*, (2014) descreveram a presença de L-asparaginase proveniente do fungo *Beauveria bassiana* (MSS18/41) isolado de sedimento marinho.

Levando em consideração a toxicidade da enzima L-glutaminase na utilização da enzima L-asparaginase como fármaco, todos os isolados que apresentaram resultados positivos para L-asparaginase na triagem inicial foram submetidos a uma triagem em meio sólido tendo como principal fonte de nitrogênio o aminoácido L-glutamina. Dos 407 fungos testados para presença de L-glutaminase, 327 foram positivos (75,5%) e 80 negativos (24,5%).

Apesar de ser um fármaco amplamente utilizado, a L-asparaginase possui uma atividade secundária L-glutaminase reduzindo rapidamente as concentrações de glutamina circulante no plasma dos pacientes, porque esta é convertida em ácido glutâmico e amônia (OLLENSCHLÄGER *et al.*, 1988). Com isso é gerado vários efeitos secundários associados com o tratamento à base de L-ASPases, incluindo reações imunológicas, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, anormalidades de coagulação, entre outros. Neste contexto, o estudo de características enzimáticas é muito importante para uma melhor compreensão das causas de efeitos colaterais ou a sua associação com as características indesejáveis da enzima.

5.3.2. Triagem quantitativa (meio líquido)

Os 407 fungos positivos para L-asparaginase em meio sólido foram submetidos à triagem em meio líquido. Dentre os isolados analisados, 304 não apresentaram atividade enzimática e 103 apresentaram atividade na faixa de 0,02 a 1,65 U/mL em meio de cultura Czapeck Dox's modificado acrescido de L-prolina. Dos fungos que apresentaram atividade enzimática, 95 são de origem marinha (costa brasileira) e 8 de origem Antártica.

Dentre os fungos de origem marinha (costa brasileira), 22 foram capazes de produzir a enzima em uma faixa de 0,5 a 1,65 U/mL (Tabela 8). O isolado LAMAI 297 foi o melhor produtor (1,65 U/mL) e esta sendo submetido aos ensaios de avaliação dos parâmetros cinéticos pelo grupo de pesquisa do Prof. Adalberto Pessoa Jr (FCF/USP). Em adição, dentre os fungos marinhos da costa brasileira avaliados, 18 foram negativos para L-glutaminase (Tabela 9). Os isolados negativos para L-glutaminase produziram a enzima L-asparaginase em uma faixa de 0,02 a 0,67 U/mL. Estes resultados são particularmente importantes, visto que a atividade da glutaminase nas preparações terapêuticas das L-asparaginases são indicadas como sendo uma possível causa de efeitos colaterais (HAWKINS *et al.*, 2004). Em adição, podemos observar que os fungos que apresentaram produção acima de 0,67 U/mL de L-asparaginase, são todos

positivos para L-glutaminase, sugerindo que a produção da L-asparaginase pode estar associada à produção L-glutaminase.

Tabela 8. Produção de L-asparaginase pelos fungos de origem marinha da costa brasileira (após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm).

Isolado	U/ mL	Isolado	U/ mL
LAMAI 297	1,65	LAMAI 442	0,79
M7 1.2.1	1,34	LAMAI 401	0,75
4.1 RB	1,23	LAMAI 104	0,67
LAMAI 57	1,17	LAMAI 135	0,67
LAMAI 30	1,08	LAMAI 630	0,66
LAMAI 141	1,06	LAMAI 9	0,66
LAMAI 444	0,98	M2 A1.3	0,62
LAMAI 177	0,90	LAMAI 154	0,62
LAMAI 290	0,88	LAMAI 218	0,58
LAMAI 124	0,81	LAMAI 132	0,58
LAMAI 441	0,80	LAMAI 216	0,53

Tabela 9. Produção de L-Asparaginase pelos 18 fungos com atividade negativa para L-glutaminase na triagem em meio sólido.

Isolado	U/mL	Isolado	U/mL
LAMAI 135	0,67	LAMAI 306	0,10
LAMAI 319	0,43	LAMAI 58	0,08
LAMAI 210	0,38	LAMAI 115	0,07
LAMAI 334	0,33	LAMAI 101	0,07
LAMAI 53	0,28	LAMAI 256	0,04
LAMAI 107	0,26	LAMAI 158	0,03
LAMAI 339	0,19	LAMAI 77	0,02
LAMAI 475	0,14	LAMAI 368	0,02
LAMAI 357	0,13		
LAMAI 55	0,10		

Os resultados referentes às determinações enzimáticas em meio líquido dos oito fungos de origem Antártica positivos para L-asparaginase em meio sólido demonstraram que o isolado não identificado LAMAI 505 foi o melhor produtor (1,46 U/mL), seguido pelo isolado não identificado LAMAI 535 (0,60 U/mL). Dentre os fungos avaliados taxonomicamente

identificados, quatro isolados representantes do gênero *Cosmospora* (recuperados de amostra de osso de baleia) foram produtores da L-asparaginase em meio líquido.

Representantes do gênero *Geomyces* e *Penicillium* também apresentaram capacidade de produção desta enzima em meio líquido. A produção de L-asparaginase por representantes do gênero *Penicillium* foi reportada em literatura (SARQUIS *et al.*, 2004; SONIYAMBY *et al.*, 2011). Cabe destacar que, todos os isolados de origem Antártica que apresentaram resultados na quantificação em meio líquido, mostraram ser positivos para L-glutaminase na triagem em meio sólido (Tabela 10). Em adição, a maioria dos fungos da Antártica positivos para L-asparaginase em meio líquido são de origem terrestre (osso de baleia e líquens).

Tabela 10. Produção de L-asparaginase por fungos marinhos e terrestres da Antártica após 7 dias de cultivo a 20°C e 140 rpm.

Código CRM	Código LAMAI	U/mL	Origem	Taxon	L-glutaminase
ND	LAMAI 505	1,46	Caramujo	<i>Penicillium</i> sp.	+
ND	LAMAI 535	0,60	Osso de baleia	NI	+
33	LAMAI 518	0,54	Osso de baleia	<i>Cosmospora</i> sp.	+
59	LAMAI 587	0,49	Estrela do mar	<i>Penicillium</i> sp.	+
35	LAMAI 509	0,35	Osso de baleia	<i>Cosmospora</i> sp.	+
31	LAMAI 592	0,27	Osso de baleia	<i>Cosmospora</i> sp.	+
51	LAMAI 548	0,24	<i>Salpa</i> sp.	<i>Geomyces</i> sp.	+
ND	LAMAI 559	0,21	Líquén	NI	+
ND	LAMAI 523	0,07	<i>Salpa</i> sp.	NI	+
ND	LAMAI 569	0,01	Líquén	NI	+

*NI= não identificado, * ND = não depositado.

5.4. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção de xilanases (Planejamento Experimental).

O planejamento experimental foi realizado com isolado LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) o qual se destacou na produção da enzima, produzindo 49,4 U/mL em meio de cultura mínimo (MS) com adição de xilana como única fonte de carbono.

Alguns trabalhos relatam a toxicidade atribuída às toxinas Ocratoxina A (OTA) e Fumonisininas relacionada aos fungos do gênero *Aspergillus*, incluindo *A. tubingensis* (ABARCA, 2001; BAYMAN, 2012; HESSELTINE, 1972; VARGA, 1996). Frisvad *et al.*, (2007) relataram pela primeira vez a produção de toxina fumonisina B2 por *Aspergillus niger*.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica, quando presente nos alimentos, pode causar danos à saúde do consumidor. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou a Ocratoxina A como um agente possivelmente carcinogênico para humanos (grupo 2B). Fumonisinias são carcinogênicas, hepatotóxicas e nefrotóxicas. O consumo de alimentos contaminados por fumonisinias pode estar relacionado ao maior índice de câncer esofágico em humanos (DESJARDINS, 2006; MURPHY et al., 2006).

Análises de toxicidades para as toxinas OTA e fumonina B2 foram realizadas com isolado *Aspergillus tubingensis* (LAMAI 31) pela Dra. Marta Hiromi Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos ITAL (Campinas, SP). Os resultados revelaram a ausência de ambas as toxinas (OTA e fumonina B2). Estes dados confirmam os trabalhos de Samson *et al.*, (2004) e Frisvad *et al.*, (2011) que não encontraram cepas de *A. tubingensis* produtoras de ocratoxina A e fumonina B2.

Tendo em vista os resultados negativos de patogenicidade, o planejamento experimental foi conduzido para este isolado previamente selecionado. As condições de cultivo, tais como fonte de carbono podem afetar significativamente a produção de xilanases (SORGATTO *et al.*, 2012). A escolha de um adequado substrato é de grande importância para o sucesso da produção destas enzimas. O substrato além de servir como um importante fonte de carbono para crescimento do micro-organismo, é também indutor da produção de xilanases (HALTRICH *et al.*, 1996; YEOMAN *et al.*, 2009).

A utilização de resíduos agrícolas como fontes de carbono pode reduzir os custos de produção e o preço do produto final (BETINI *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, os resíduos industriais e agroindustriais como o bagaço de cana (PALMA *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000), farelo de trigo (GOMES, 1994) e palha de arroz podem ser usados como fonte indutora de xilanases.

Tendo em vista a importância dos resíduos agroindustriais na produção de xilanases, optamos em utilizar no planejamento experimental o bagaço de cana, palha de arroz e farelo de trigo como fontes de carbono e como indutores na produção da enzima.

5.4.1. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 10 variáveis

A abordagem estatística escolhida para o estudo inicial de otimização foi a matriz *Plackett-Burman*. Esta matriz permite avaliar um número maior de variáveis e reduz o número de ensaios com excelente qualidade na determinação dos efeitos principais das variáveis, sendo eficiente para fins de rastreio quando não se sabe quais os componentes que devem estar

presentes no meio (OOIJKAAS, 2000). Todos os experimentos foram realizados de acordo com a matriz de desenho experimental, que se baseia no número de variáveis a serem estudadas (Tabela 11).

Os resultados das atividades enzimáticas estão apresentados na Tabela 11. O ensaio 12 foi o de maior valor (501,9 U/mL) e apresenta em sua composição peptona (1 g/50mL), bagaço de cana (3 g/50mL), palha de arroz (3 g/50mL), xilana (1 g/50mL), 3 *pellets* de inóculo e pH 7. O segundo ensaio com maior valor de atividade enzimática foi o 6 (494,4 U/mL). As condições deste ensaio foram similares às do ensaio 12, incluindo a presença do bagaço de cana (3 g/50mL). O terceiro ensaio com melhor resultado foi o 8 (290,5 U/mL), possuía em sua composição o bagaço de cana (3 g/50mL), e a palha de arroz (3 g/50mL). Os três ensaios que mais se destacaram apresentaram em comum além da concentração máxima de bagaço de cana (3g/50mL), o pH 7 e a ausência de salinidade (ASW).

A atividade enzimática não foi detectada no ensaio 5 (Tabela 11) do primeiro planejamento experimental *Plackett-Burman*. Neste ensaio o farelo de trigo, palha de arroz, sacarose e xilana estavam ausentes. A ausência dessas fontes de carbono pode ter influenciado na não detecção da enzima pelos métodos empregados. A variável xilana, presente nos ensaios 6 e 12, sugere uma possível indução na produção da enzima, já que estes foram os ensaios com melhores resultados.

Tabela 11. Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm para otimização da produção da enzima xilanase.

Ensaio	pH	ASW (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/50mL)	Peptona (g/50mL)	BC (g/50mL)	FT (g/50mL)	PA (g/50mLL)	Sacarose (g/50mL)	Inóculo (pellet)	Xilana (g/50mL)	U/mL
	7 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	16,1
2	7 (+1)	100 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	1 (+1)	45,1
3	7 (+1)	100 (+1)	0,2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	1 (-1)	1 (+1)	1,8
4	7 (+1)	100 (+1)	0,2 (+1)	1 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	2,4
5	5 (-1)	100 (+1)	0,2 (+1)	1 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	0
6	7 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	1 (+1)	3 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	1 (+1)	494,4
7	5(-1)	100 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	3 (+1)	3 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	109,3
8	7 (+1)	0 (-1)	0,2 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	3 (+1)	3 (+1)	1 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	290,5
9	7 (+1)	100 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	3 (+1)	1 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	38,3
10	5(-1)	100 (+1)	0,2 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	1 (+1)	3 (+1)	1 (+1)	15,3
11	5(-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	1 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	3 (+1)	1 (+1)	83,1
12	7 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	0 (-1)	3 (+1)	1 (+1)	501,9
13	5(-1)	100 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	51,3
14	5(-1)	0 (-1)	0,2 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	3 (+1)	0 (-1)	3(+1)	0 (-1)	50,3
15	5(-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (+1)	1 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	86,5
16	5(-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0
17 (C)	6 (0)	50 (0)	0,1 (0)	0,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	0,5 (0)	2 (0)	0,5 (0)	370,2
18 (C)	6 (0)	50 (0)	0,1 (0)	0,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	0,5 (0)	2 (0)	0,5 (0)	246,7
19 (C)	6 (0)	50 (0)	0,1 (0)	0,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	0,5 (0)	2 (0)	0,5 (0)	319,8
20 (C)	6 (0)	50 (0)	0,1 (0)	0,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	1,5 (0)	0,5 (0)	2 (0)	0,5 (0)	381,0

(c) ponto central, (-1), (0) e (+1) são níveis codificados, BC = Bagaço de cana, FT = Farelo de Trigo, PA = Palha de Arroz

Na Tabela 12 estão apresentados os efeitos das variáveis do planejamento PB16. Duas variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo: ASW (água do mar artificial), cujo efeito foi negativo e o bagaço de cana que apresentou efeito positivo. Embora o isolado estudado seja derivado de ambiente marinho a presença de salinidade (ASW) não contribuiu para aumento da produção da enzima de interesse. Desta forma, a variável salinidade foi eliminada e não considerada no próximo planejamento. Em contrapartida, a variável bagaço de cana apresentou efeito positivo, sendo os ensaios contendo esta variável os que apresentaram resultados relativamente mais altos de atividade enzimática. Assim, para o próximo planejamento experimental, a variável bagaço de cana foi fixada. Outros trabalhos demonstraram o favorecimento da produção de xilanases pelo bagaço de cana (MACIEL, *et al.*,2008).

Embora o efeito não tenha sido estatisticamente significativo para as outras variáveis estudadas, sacarose e inóculo apresentaram efeitos negativos, enquanto que pH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona, farelo de trigo, palha de arroz e xilana apresentaram efeito positivo na produção da enzima. Com exceção da variável $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cujo resultado apesar de positivo foi baixo quanto à indução da produção da enzima (Tabela 12), todas as outras variáveis com efeito positivos foram mantidas no próximo planejamento experimental.

O primeiro planejamento experimental mostrou ser eficiente já que houve aumento na produção da enzima passando de 49,41 U/mL para 501,9 U/mL. Tendo em vista os resultados obtidos após a condução do primeiro planejamento experimental, podemos considerar que a composição do meio e tipo de substrato tiveram grande influência na produção da enzima.

Tabela 12. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento *Plackett-Burman* (PB16).

Variáveis	Efeito	P-valor
pH	124,332	0,124019
ASW	-157,427	0,060222*
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11,143	0,882498
Peptona	105,698	0,183107
Bagaço de cana	146,423	0,076804*
Farelo de trigo	67,285	0,382503
Palha de arroz	50,166	0,510889
Sacarose	-77,388	0,318504
Inóculo	-35,758	0,637270
Xilana	96,582	0,220102

*variáveis significativas ($p < 0,1$)

5.4.2. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 5 variáveis

O segundo planejamento foi estruturado com base nos resultados do primeiro (PB16). Em um novo planejamento do tipo Plackett-Burman com 12 ensaios mais 4 pontos centrais totalizando 16 experimentos (PB12), foram analisadas 5 variáveis independentes. Neste segundo PB, a variável bagaço de cana foi fixada em 3 g/50mL de meio de cultura, sendo as outras variáveis com efeito positivo ajustadas a novos valores (Tabela 13).

O ensaio 2 apresentou o melhor resultado (629,67 U/mL), sendo este constituído das variáveis peptona (2 g/50mL), palha de arroz (4,5 g/50mL) pH 6 e 6 *pellets* de inóculo. O ensaio 5 foi o segundo melhor ensaio (609,78 U/mL), diferindo das condições do ensaio 2 apenas no valor de pH, que neste caso foi 8. O terceiro melhor resultado foi obtido no ensaio 4 com (496,26 U/mL), o qual apresentou em comum com ensaio 2 e 5 as variáveis peptona (1,5 g/50mL) e o número de inóculo (5 *pellets*). A palha de arroz estava presente no ensaio 4 porém em quantidades menores (1,5 g/mL) do que as dos ensaios 2 e 5. Em adição, no ensaio 4 havia a presença da variável xilana, a qual estava ausente nos ensaios 2 e 5.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, a variável xilana não apresentou efeito estatisticamente significativo, sendo o seu efeito negativo na produção da enzima. Frente a este resultado e considerando que os ensaios com os maiores valores de xilanase não continham xilana, essa variável foi desconsiderada na estruturação do próximo planejamento.

Tabela 13. Matriz do planejamento experimental PB12 (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm.

Ensaio	Peptona (g/50mL)	Palha arroz (g/50mL)	Xilana (g/50mL)	Inóculo (<i>pellet</i>)	pH	U/mL
1	2(1)	1,5(-1)	2(1)	3(-1)	6(-1)	104,48
2	2(1)	4,5(1)	0(-1)	5(1)	6(-1)	629,67
3	0(-1)	4,5(1)	2(1)	3(-1)	8(1)	78,36
4	2(1)	1,5(-1)	2(1)	5(1)	6(-1)	496,26
5	2(1)	4,5(1)	0(-1)	5(1)	8(1)	609,78
6	2(1)	4,5(1)	2(1)	3(-1)	8(1)	180,24
7	0(-1)	4,5(1)	2(1)	5(1)	6(-1)	71,27
8	0(-1)	1,5(-1)	2(1)	5(1)	8(1)	18,58
9	0(-1)	1,5(-1)	0(-1)	5(1)	8(1)	26,64
10	2(1)	1,5(-1)	0(-1)	3(-1)	8(1)	93,66
11	0(-1)	4,5(1)	0(-1)	3(-1)	6(-1)	129,67
12	0(-1)	1,5(-1)	0(-1)	3(-1)	6(-1)	139,75
13 (C)	1(0)	3(0)	1(0)	4 (0)	7(0)	358,53
14 (C)	1(0)	3(0)	1(0)	4 (0)	7(0)	421,82
15 (C)	1(0)	3(0)	1(0)	4 (0)	7(0)	439,13
16 (C)	1(0)	3(0)	1(0)	4 (0)	7(0)	439,43

(c) ponto central, (-1), (0) e (+1) são níveis codificados, PA = Palha de Arroz

As variáveis peptona e inóculo apresentaram efeito significativo e positivo (Tabela 14). A peptona estava presente nos ensaios que derivaram os maiores valores de xilanase (Tabela 13). A peptona como fonte de nitrogênio pode ter forte influência no crescimento do fungo e indução da enzima. De acordo com Ho (2014) diferentes fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico) pode exercer influente impacto na capacidade crescimento dos micro-organismos, bem como a produção de enzimas. Essas variáveis forma mantidas no próximo planejamento experimental.

A variável palha de arroz apesar de não significativa teve efeito positivo e foi mantida no terceiro planejamento experimental. A variável pH apesar de efeito negativo, foi também mantida no planejamento experimental subsequente (tabela 15).

Tabela 14. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento *Plackett-Burman* (PB16).

Variáveis	Efeito	P-valor
Peptona	274,969	0,010767*
Palha de arroz	136,601	0,151502
Xilana	-113,328	0,226647
Inóculo	187,674	0,058677*
pH	-93,974	0,310499

*variáveis significativas ($p < 0,1$)

5.4.3. Planejamento experimental: Fatorial Fracionado 2^{4-1} (FF 2^{4-1})

Com base nos resultados do segundo planejamento experimental (PB12), foi estruturado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , com 8 ensaios e 4 pontos centrais, totalizando 12 experimentos (Tabela 15). Neste novo planejamento experimental, a variável bagaço de cana continuou fixada em 3 g/50mL.

De acordo com os resultados obtidos, o planejamento FF 2^{4-1} não foi eficiente, sendo os valores de atividade enzimática inferiores ao PB anterior (PB12). O melhor resultado foi obtido no ensaio 1 (135,30 U/mL), cujas condições de cultivo foram: pH 6, 5 *pellets* de inóculo, palha de arroz (3,5 g/mL) e sem presença de peptona. O segundo melhor resultado foi o do ensaio 4 (124,37 U/mL) que diferiu do ensaio 1 nas variáveis pH (8) e quantidade de inóculo (7 *pellets*) (Tabela 16).

Tabela 15. Matriz do planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado 2^{4-1} (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm.

Ensaio	pH	Inóculo (pellets)	Peptona (g/50mL)	PA (g/50mL)	U/mL
1	6(-1)	5(-1)	0(-1)	3,5(-1)	135,30
2	8(1)	5(-1)	0(-1)	5,5(1)	91,21
3	6(-1)	7(1)	0(-1)	5,5(1)	104,78
4	8(1)	7(1)	0(-1)	3,5(-1)	124,37
5	6(-1)	5(-1)	4(1)	5,5(1)	63,69
6	8(1)	5(-1)	4(1)	3,5(-1)	61,43
7	6(-1)	7(1)	4(1)	3,5(-1)	79,90
8	8(1)	7(1)	4(1)	5,5(1)	42,97
9(C)	7(0)	6(0)	2(0)	4,5(0)	73,12
10 (C)	7(0)	6(0)	2(0)	4,5(0)	72,74
11 (C)	7(0)	6(0)	2(0)	4,5(0)	88,19
12 (C)	7(0)	6(0)	2(0)	4,5(0)	50,50

(c) ponto central, (-1), (0) e (+1) são níveis codificados, PA = Palha de Arroz

De acordo com os resultados dos efeitos apresentados abaixo na Tabela 16 podemos observar que as variáveis peptona e palha de arroz apresentaram efeito estatisticamente significativo, porém negativo. A única variável com efeito positivo foi o inóculo.

Tabela 16. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} .

Variáveis	Efeito	P-valor
pH	-15,9236	0,181476
Inóculo	0,0942	0,993241
Peptona	-51,9167	0,001884*
Palha de arroz	-24,5921	0,055702*

*variáveis significantes ($p < 0,1$)

Frente aos resultados inferiores do planejamento experimental FF 2^{4-1} e visando alcançar a otimização da produção da enzima, um novo planejamento do tipo Fatorial Fracionado foi estruturado.

5.4.3.1. Segundo planejamento experimental: Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹ (FF 2⁴⁻¹)

De acordo com resultados obtidos no planejamento FF 2⁴⁻¹ anterior um novo planejamento foi estruturado utilizando as mesmas variáveis, mas com alteração dos valores nos pontos axiais -1,0 e +1 (Tabela 17).

O melhor resultado de produção da enzima foi obtido no ensaio 2 (180,24 U/mL). Apesar de haver uma melhora no resultado comparado ao planejamento experimental FF anterior, o valor da atividade enzimática está ainda bem inferior ao obtido no ensaio 2 do segundo PB (629,67 U/mL). Para esse planejamento somente a peptona apresentou efeito estatisticamente significativo, sendo este efeito negativo (Tabela 18). Inóculo e palha de arroz também apresentaram efeito negativo, sendo a variável pH a única a apresentar efeito positivo.

Tabela 17. Matriz do planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹ (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática). Os ensaios foram conduzidos a 28°C e 140 rpm.

Ensaio	pH	Inóculo (pellets)	Peptona (g/50mL)	Palha arroz (g/50mL)	U/mL
1	5(-1)	4(-1)	0(-1)	2,5(-1)	176,50
2	7(1)	4(-1)	0(-1)	4,5(1)	180,24
3	5(-1)	6(1)	0(-1)	4,5(1)	95,53
4	7(1)	6(1)	0(-1)	2,5(-1)	169,04
5	5(-1)	4(-1)	2(1)	4,5(1)	61,20
6	7(1)	4(-1)	2(1)	2,5(-1)	95,16
7	5(-1)	6(1)	2(1)	2,5(-1)	82,47
8	7(1)	6(1)	2(1)	4,5(1)	108,59
9(C)	6(0)	5(0)	1(0)	3,5(0)	122,77
10 (C)	6(0)	5(0)	1(0)	3,5(0)	175,38
11 (C)	6(0)	5(0)	1(0)	3,5(0)	92,92
12 (C)	6(0)	5(0)	1(0)	3,5(0)	86,20

*(c) ponto central, (-1), (0) e (+1) são níveis codificados

Tabela 18. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹.

Variável	Efeito	P-valor
pH	34,33066	0,181222
Inóculo	-14,3666	0,554100
Peptona	-68,4747	0,021070*
Palha de arroz	-19,4043	0,429118

*variáveis significantes (p<0,1)

Tendo em vista que todos valores de atividade enzimática obtidos nos ensaios dos dois últimos planejamentos do tipo FF 2⁴⁻¹ foram menores do que os valores apresentados no ensaio 2 do PB12 (629,67 U/mL), a condição de cultivo empregada neste ensaio foi repetida (em triplicata) visando a validação do processo de otimização da produção de xilanases pelo fungo de origem marinha *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31.

5.4.4. Validação do planejamento experimental

Com base nos resultados observados nos planejamentos anteriores o ensaio 2 do PB12 (item 5.4.2) apresentou o melhor resultado de atividade enzimática (629,67 U/mL). Para validar o ensaio e determinar o tempo de cultivo foi realizada uma curva da atividade enzimática por 168 horas com as concentrações de peptona (2g/50 mL), palha de arroz (4,5 g/50 mL), 5 *pellets* de inóculo, pH 6.

Nas 24 horas iniciais foi possível identificar a presença da enzima (32,65 U/mL) no filtrado do cultivo do fungo LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*). O pico de produção da enzima foi observado após 96 horas de cultivo (561,59 U/mL), havendo uma diminuição da produção enzimática a partir de 96 horas, chegando a 374,47 U/mL após 168 horas (Figura 9). Esses resultados diferem dos obtidos por Mostafa *et al.*, (2014), onde o aumento da produção de xilanase pelo consórcio de micro-organismos *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Epicoccum purpurascens* ocorreu a partir de 96 horas de cultivo.

A redução da produção da enzima após 96 horas de cultivo pode ter ocorrido devido ao esgotamento dos nutrientes disponíveis para os micro-organismos, ou devido à ação de proteases (SEPAHY *et al.*, 2011).

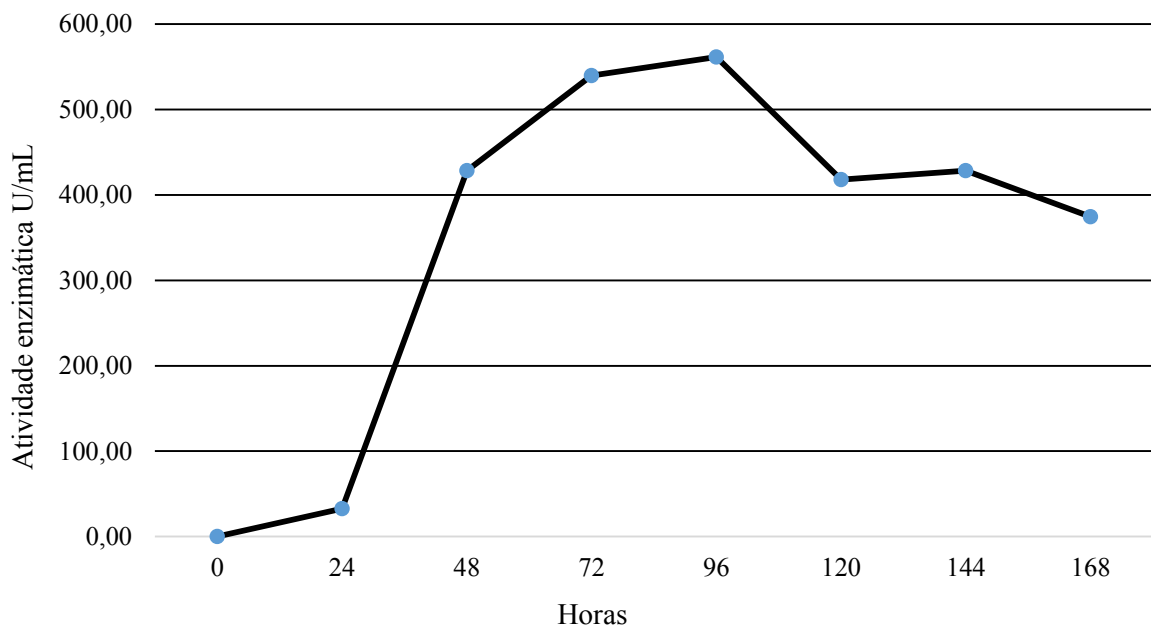


Figura 9. Curva de atividade enzimática por 168 horas do isolado LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) durante a validação do ensaio 2 do PB12.

5.5. Determinação proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada no intuito de averiguar a quantidade de proteína produzidas concomitantemente com a xilanase (atividade específica) durante a utilização dos substratos presentes no meio de cultivo otimizado.

De acordo com tabela 19 a quantidade de proteínas variou durante o período de crescimento estudado (7 dias). O valor mais elevado de proteínas nos primeiros dias pode ter relação com as proteínas já presentes no meio de cultivo. Após 96 horas de cultivo, o fungo *A. tubingensis* (LAMAI 31), apresentou maior atividade enzimática (561,59 U/mL), entretanto a atividade específica (197,02 mg/mL) foi menor do que após 72 horas de cultivo (209,26 mg/mL).

Tabela 19. Atividade específica do caldo enzimático em condições otimizadas, de xilanases de *Aspergillus tubingensis* (LAMAI 31).

Tempo (horas)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade específica (mg/mL)
24	32,65	4,11	7,95
48	428,51	3,02	142,03
72	539,76	2,58	209,26
96	561,59	2,85	197,02
120	418,13	2,78	150,18
144	428,57	3,27	131,15
168	374,47	2,71	138,29

5.6. Caracterização da enzima xilanase no caldo enzimático

5.6.1. Influência do pH sobre a atividade da xilanase

O extrato enzimático foi caracterizado em relação ao pH ótimo de atividade da enzima variando-se o pH do meio reacional. As melhores atividades foram obtidas em pH 4,6, 5,0 e 5,6 (Figura 10). O melhor resultado foi obtido em pH 5,0 em tampão Mcilvaine 0,1 mol/L, onde a atividade enzimática foi de 694,64 U/mL. Em tampão acetato de sódio 0,1 mol /L a atividade foi de 590,05 U/mL. Seguindo do pH 5,6 em tampão Mcilvaine com 572,61 U/mL e tampão acetato 589,96 U/mL. No pH 4,6 em tampão Mcilvaine foi obtido 562,54 U/mL e em tampão acetato de sódio 550,22 U/mL. A enzima não apresentou atividade em pH 8,0 e 9,0.

Resultados semelhantes foram reportados por Moretti *et al.*, (2012) onde a faixa de pH ótimo para a xilanase do fungo *A. fumigatus* M.7.1 está entre 4,0 e 4,5-5,5. Em uma revisão sobre xilanases (POLIZELI *et al.*, 2005) foi relatado que a maioria dos fungos das espécies de *Aspergillus* citadas na revisão sobre xilanases apresentam pH ótimo na faixa de 4,0 a 6,0.

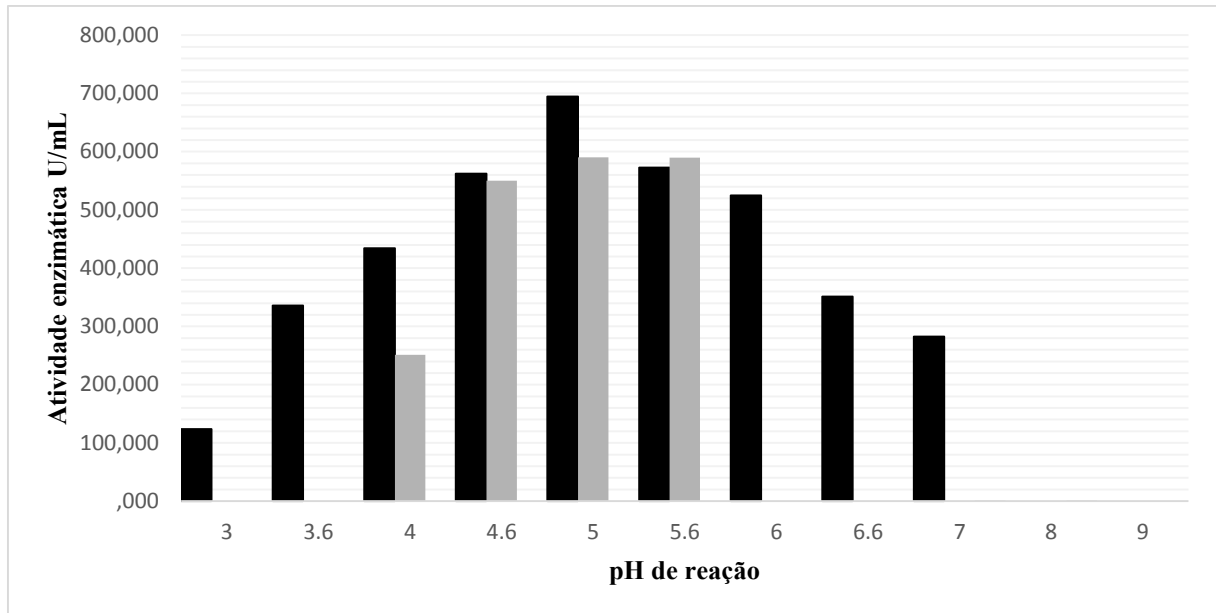


Figura 10. Efeito do pH de reação sobre a atividade xilanase de *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31. As reações foram realizadas a 40 °C nos tampões: (preto) Mcilvaine 0,1 mol/L; (cinza claro) acetato de sódio 0,1 mol/L; (cinza escuro) Tris-HCl 0,1 mol/L.

5.6.2. Influência da temperatura sobre a atividade xilanase

A enzima mostrou-se ativa em todas temperaturas estudadas (Figura 11). A atividade de xilanase foi gradativamente aumentando a partir da temperatura mínima estudada (30°C) até 50 °C, onde foi obtida a maior atividade (711,43 U/mL), sendo considerada esta temperatura como ótima. A partir de 55 °C a atividade enzimática foi diminuindo gradativamente até atingir o valor de 294,98 U/m (em 70 °C).

Subramaniyan e Prema (2002) reportaram maiores atividades de xilanasas de um fungo do gênero *Aspergillus* na faixa entre 45 a 60°C, Polizeli et al., (2005) descreveram que o pico de atividade da enzima xilanase pode ocorrer entre 40 e 80 °C. Medeiros *et al.*, (2003) obtiveram maior atividade da enzima xilanase de *Aspergillus niger* cultivado em meio líquido acrescido de xilana em 40°C, Zhao *et al.*, (2002) demonstraram que a maior atividade de xilanase por *Aspergillus niger* em meio de cultivo contendo farelo de trigo, se deu a 48°C, sendo esta enzima estável entre 45 e 55°C. Estes resultados corroboram os obtidos no presente estudo, onde a faixa de temperatura com os maiores valores de atividade de xilanase foi de 40 °C a 65 °C.

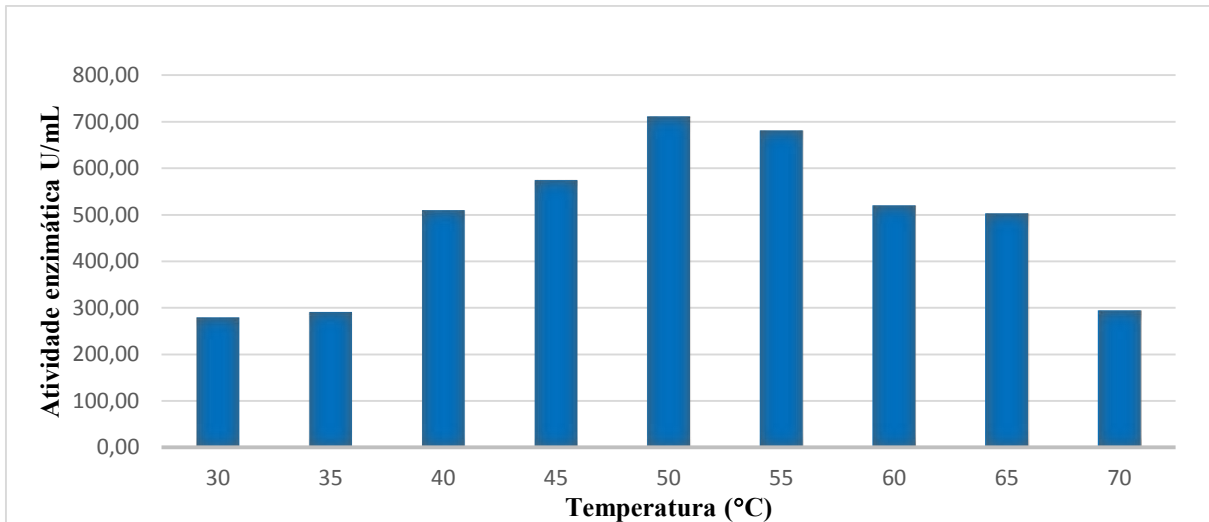


Figura 11. Efeito da temperatura de reação sobre a atividade xilanase de *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31 (as reações foram realizadas com Mcilvaine 0,1 mol/L).

5.6.3. Estabilidade da xilanase em diferentes pH

Foi avaliada a estabilidade em diferentes pH da xilanase produzida pelo fungo de origem marinha *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31. O extrato enzimático apresentou atividade em todas faixas de pH estudadas (Figura 12), mostrando boa estabilidade após o período de incubação. Em pH 3,6 e 5,6 as atividades de xilanase foram menores. O melhor resultado (393,49 U/mL) foi obtido em pH 7,0. O tampão, Mcilvaine (pH 4,0 e 4,6) resultou em uma maior estabilidade da enzima, enquanto que o tampão acetato de sódio (pH 5,0 e 5,6) conferiu uma maior estabilidade da xilanase.

Izidoro *et al.*, (2014) estudando xilanase de *A. niger* demonstraram uma maior estabilidade da enzima em pH 4,5 a 7,0. O estudo de estabilidade da enzima em diferentes pH é parte essencial da caracterização enzimática. Normalmente, xilanases microbianas são estáveis em uma ampla faixa de pH 3,0 a 10,0 (Kulkarni *et al.*, 1999).

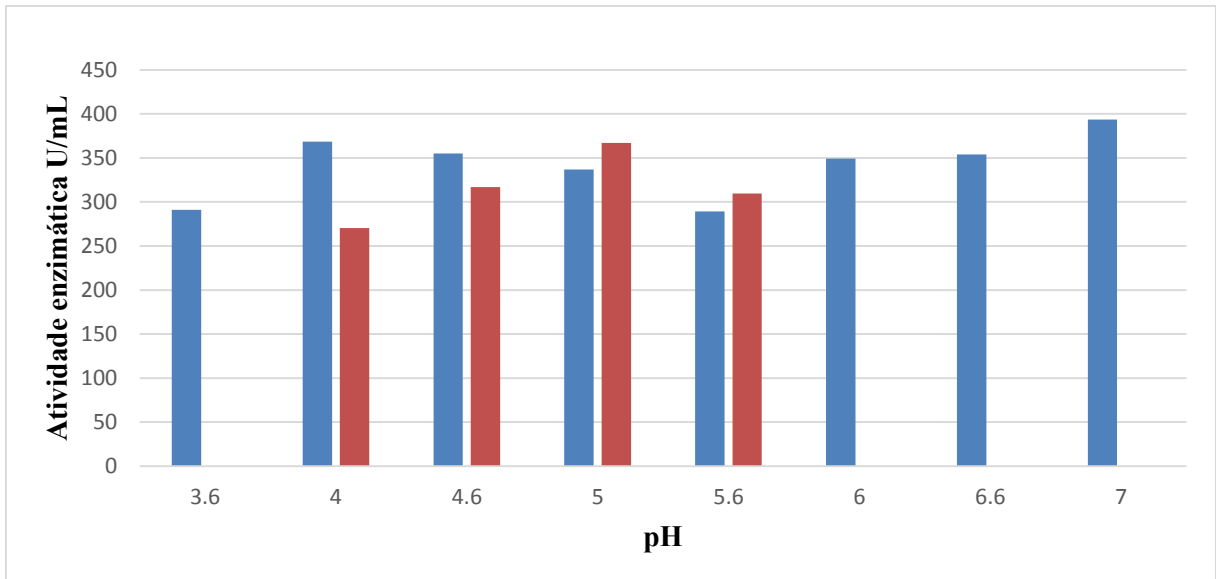


Figura 12 Estabilidade ao pH da atividade xilanase de *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31. As amostras foram incubadas por 24 horas a 4 °C, na ausência de substrato, com os tampões: Mcilvaine 0,1 mol/L (azul); acetato e sódio 0,1 mol/L (vermelho).

5.6.4. Estabilidade da xilanase em diferentes temperaturas

A enzima foi avaliada quanto a estabilidade nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 °C. A enzima apresentou boa estabilidade a 40 °C e 45 °C, mantendo a atividade durante os 60 minutos de incubação (Figura 13). Na temperatura de 40 °C e 50 °C pode-se observar que a enzima se manteve estável, apresentando um aumento na atividade depois de 50 minutos de incubação (Figura 13). A enzima mostrou não ser estável a temperatura de 55 °C, pois em 10 minutos de incubação sua atividade foi baixa (235,09 U/mL), diminuindo gradativamente e drasticamente após 30 minutos de incubação (Figura 12).

A estabilidade de uma enzima é um parâmetro importante para a sua aplicação num processo industrial. Alta estabilidade e a manutenção do nível de atividade durante um longo período são dois pontos importantes a serem considerados para a aplicação da enzima (KAPPOR *et al.*, 2008).

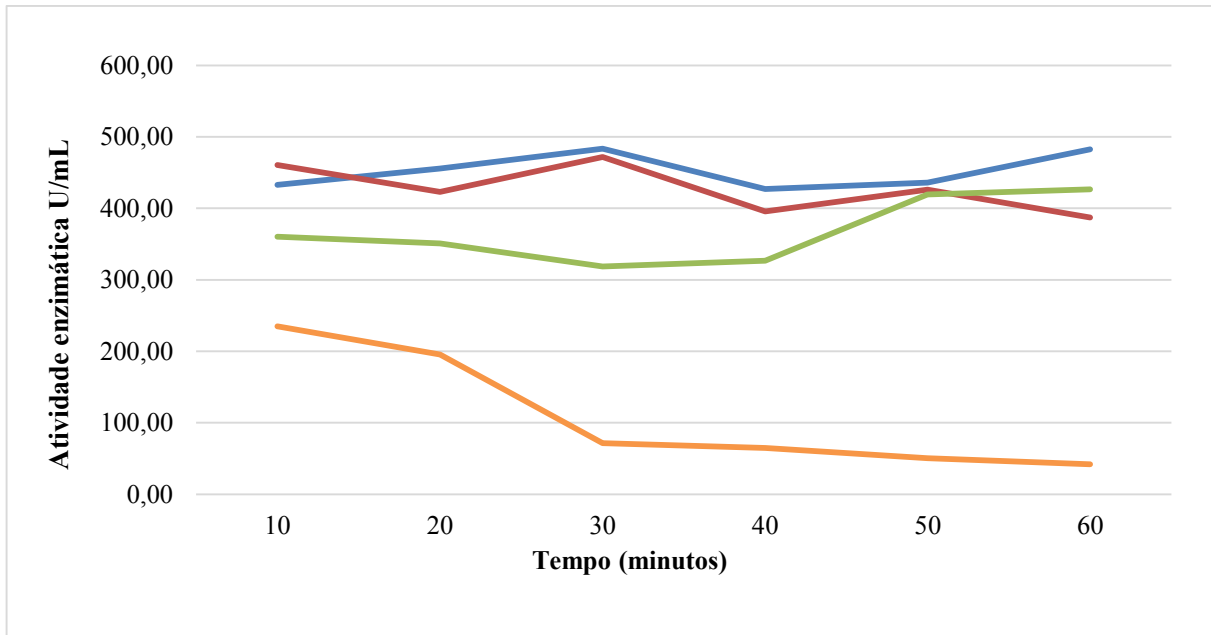


Figura 13. Estabilidade térmica do extrato enzimático de xilanase de *Aspergillus tubingensis* LAMAI 31. As amostras foram incubadas a 40 °C (azul), 45 °C (vermelho), 50 °C (verde) e 55 °C (laranja) na ausência de substrato.

Após a caracterização preliminar a xilanase de *A. tubingensis* LAMAI 31 demonstrou ser termoestável e acidofílica. Enzimas xilanolíticas comerciais com características semelhantes, são utilizadas na indústria têxtil no tratamento das fibras de algodão, estas apresentam atividade ótima na faixa de pH de 4,5-5,0 a 50°C (CSISZÁR *et al.*, 2001).

Estes resultados confirmam a importância do estabelecimento dos parâmetros enzimáticos ótimos para um melhor aproveitamento do processo e aplicação industrial da enzima.

5.7. Avaliação da influência de diferentes fatores e otimização da produção enzima L-asparaginase (Planejamento Experimental).

5.7.1. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 12 variáveis

Diversos estudos, sobre as condições de cultivo dos micro-organismos produtores da enzima L-asparaginase, mostraram que a atividade da enzima é influenciada pelas condições de cultivo do micro-organismo como suprimento de oxigênio, temperatura de incubação, pH e nutrientes presentes no meio de cultivo. Sarquis *et al.*, (2004) demonstraram que em alguns fungos a produção de L-asparaginase é regulada pela fonte de nitrogênio. Neste contexto, foi estruturado um planejamento experimental utilizando o delineamento de *Plackett-Burman* (PB)

visando avaliar a influência de 12 variáveis (L-prolina, L-asparagina, L-glutamina, ureia, glicose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Extrato de levedura, pH, KH_2PO_4 , sacarose, inóculo e peptona) (Tabela 20). Na produção de L-asparaginase pelos isolados LAMAI 505 (de origem Antártica) e LAMAI 297 (marinho da costa brasileira), os quais foram selecionados por serem os melhores produtores desta enzima nas condições da triagem inicial. O experimento teve duração de 7 dias de cultivo a 28 °C e 140 rpm, sendo 16 ensaios mais 4 pontos centrais, totalizando 20 ensaios (PB16).

Como demonstrado na Tabela 20, 16 ensaios não apresentaram atividade enzimática incluindo os 4 pontos centrais, tanto para o isolado LAMAI 505 quanto para o isolado LAMAI 297. Os resultados obtidos foram inferiores aos da quantificação inicial que foi de 1,46 U/mL e 1,65 U/mL, respectivamente.

Tabela 20. Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) para enzima l-asparaginase. Os ensaios foram conduzidos a 28°C(isolado marinho) 20°C (antártico) e 140 rpm.

Ensaio	L-prol (g/50ml)	L-asp (g/50ml)	L- glut (g/50ml)	Ureia (g/50ml)	Glicose (g/50ml)	MgSO4.7 H2O (g/50ml)	Extrato levedura (g/ 50ml)	pH	KH ₂ PO ₄ (g/50ml)	Sacarose (g/50ml)	Inoculo	Peptona (g/50ml)	LAMAI 505 U/mL	LAMAI 297 U/mL
1	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	9 (1)	0,6 (1)	0 (-1)	3 (1)	0 (-1)	ND	ND
2	2 (1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,04 (1)	0 (-1)	7 (-1)	0,6 (1)	0,2 (1)	1 (-1)	0,1 (1)	ND	0,26
3	2 (1)	2 (1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	7 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	3 (1)	0 (-1)	ND	ND
4	2 (1)	2 (1)	2 (1)	0,06 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	9 (1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	0,1 (1)	ND	0,88
5	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0,06 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (-1)	0,6 (1)	0 (-1)	1 (-1)	0,1 (1)	0,14	ND
6	2 (1)	0 (-1)	2 (1)	0,06 (1)	0,2 (1)	0,04 (1)	0 (-1)	7 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	1 (-1)	0 (-1)	0,07	0,35
7	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,06 (1)	0,2 (1)	0,04 (1)	1 (1)	7 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3 (1)	0 (-1)	0,25	ND
8	2 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	0,04 (1)	1 (1)	9 (1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	0,1 (1)	ND	ND
9	2 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,06 (1)	0 (-1)	0,04 (1)	1 (1)	9 (1)	0,6 (1)	0 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	ND	ND
10	0 (-1)	2 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	1 (1)	9 (1)	0,6 (1)	0,2 (1)	1 (-1)	0 (-1)	0,06	0,64
11	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0,06 (1)	0 (-1)	0,04 (1)	0 (-1)	9 (1)	0,6 (1)	0,2 (1)	3 (1)	0 (-1)	ND	0,14
12	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,06 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	1 (1)	7 (-1)	0,6 (1)	0,2 (1)	3 (1)	0,1 (1)	ND	0,43
13	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	0,04 (1)	0 (-1)	9 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	3 (1)	0,1 (1)	ND	ND
14	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,04 (1)	1 (1)	7 (-1)	0,6 (1)	0 (-1)	3 (1)	0,1 (1)	ND	1,58
15	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,06 (1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	9 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	1 (-1)	0,1 (1)	ND	ND
16	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	ND	ND
17 (C)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0,03 (0)	0,1 (0)	0,02 (0)	0,5 (0)	8 (0)	0,3 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,05 (0)	ND	ND
18 (C)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0,03 (0)	0,1 (0)	0,02 (0)	0,5 (0)	8 (0)	0,3 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,05 (0)	ND	ND
19 (C)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0,03 (0)	0,1 (0)	0,02 (0)	0,5 (0)	8 (0)	0,3 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,05 (0)	ND	ND
20 (C)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0,03 (0)	0,1 (0)	0,02 (0)	0,5 (0)	8 (0)	0,3 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,05 (0)	ND	ND

* (c) = ponto central; (-1), (0) e (1) = são níveis codificados; ND = Atividade enzimática não detectada nas condições de ensaio; L- prol =L- prolina; L- asp. = L-asparagina; L-glut = L-glutamina.

Os resultados das análises dos efeitos relacionados ao PB16 (Tabela 20) para isolado LAMAI 505 demonstraram que as variáveis L-asparagina, ureia e glicose foram estatisticamente significativas e apresentaram efeito positivo. Essas variáveis estão presentes no ensaio 7 que derivou o melhor resultado (0,25 U/mL). As variáveis L-prolina e pH foram também estatisticamente significativas, porém com efeito negativo na produção da enzima.

Tabela 21. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento *Plackett-Burman* com 12 variáveis para isolado LAMAI 505.

Variável	Efeito	P-valor
L-prolina	-0,04695	0,05378*
L-asparagina	0,046953	0,05378*
L- glutamina	0,002669	0,898997
Ureia	0,048772	0,047129*
Glicose	0,064181	0,015827*
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,014559	0,496093
Extrato de levedura	0,012739	0,549853
pH	-0,04877	0,047129*
KH ₂ PO ₄	-0,01456	0,496093
Sacarose	-0,03154	0,163808
Inóculo	-0,00267	0,898997
Peptona	-0,02997	0,183036

*variáveis significativas ($p < 0,1$)

As análises dos efeitos relacionados ao PB16 (Tabela 22) para o isolado LAMAI 297 mostraram que nenhuma variável foi estatisticamente significativa. No entanto, os resultados de atividade enzimática foram relativamente melhores quanto comparados aos resultados obtidos para o isolado LAMAI 505. A maior produção de L-asparaginase pelo isolado LAMAI 297 foi de 1,58 U/mL obtida no ensaio 14 (Tabela 20).

Tabela 22. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento *Plackett-Burman* com 12 variáveis para isolado LAMAI 297.

Variável	Efeito	P-valor
L-prolina	-0,057204	0,08634
L-asparagina	-0,091418	0,818587
L- glutamina	0,364641	0,714798
Ureia	-0,085109	0,172796
Glicose	-0,179378	0,733533
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,048348	0,479527
Extrato de levedura	0,128179	0,846205
pH	-0,119323	0,610119
KH ₂ PO ₄	0,228151	0,634581
Sacarose	-0,079407	0,373837
Inóculo	0,222448	0,750636
Peptona	0,250353	0,385221

5.7.2. Planejamento experimental: *Plackett-Burman* com 7 variáveis

Tendo em vista os melhores resultados de produção enzimática pelo isolado LAMAI 297, este foi submetido a um novo planejamento do tipo PB, com 7 variáveis, 16 ensaios e 4 pontos centrais, totalizando 20 ensaios (PB16). Para tanto, foram consideradas as variáveis presentes no ensaio que apresentou melhor resultado de produção de xilanase (ensaio 14 do PB16 anterior).

Dentre os resultados obtidos nos 16 ensaios do segundo PB16 (Tabela 23), somente um ensaio (ensaio 6) apresentou atividade enzimática (0,97 U/mL) e esta foi inferior à produção obtida na triagem inicial. Estes resultados demonstram que as variáveis escolhidas não foram satisfatórias ao processo de otimização da L-asparaginase realizado no presente estudo.

Em adição, nenhuma variável mostrou ser estatisticamente significativa e os efeitos das mesmas independente de ser positivo ou negativo, foram muito baixos (Tabela 24).

Tabela 23. Matriz do planejamento experimental do tipo PB (valores reais e codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) para enzima L-asparaginase testes realizado com isolado LAMAI 297.

Ensaio	pH	Inoculo (<i>pellet</i>)	Peptona (g/50mL)	L- glutamina (g/50mL)	MgSO4.7 H2O (g/50mL)	Extrato lev. (g/50mL)	KH2(PO) 4 (g/50mL)	U/mL
1	7 (1)	3 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,08 (1)	0 (-1)	0 (-1)	ND
2	7 (1)	5 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	ND
3	7 (1)	5 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	ND
4	7 (1)	5 (1)	0,2 (1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND
5	5 (-1)	5 (1)	0,2 (1)	4 (1)	0,08 (1)	0 (-1)	0 (-1)	ND
6	7 (1)	3 (-1)	0,2 (1)	4 (1)	0,08 (1)	2 (1)	0 (-1)	0,97
7	5 (-1)	5 (1)	0 (-1)	4 (1)	0,08 (1)	2 (1)	1 (1)	ND
8	7 (1)	3 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,08 (1)	2 (1)	1 (1)	ND
9	7 (1)	5 (1)	0 (-1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	ND
10	5 (-1)	5 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,08 (1)	0 (-1)	1 (1)	ND
11	5 (-1)	3 (-1)	0,2 (1)	4 (1)	0 (-1)	2 (1)	0 (-1)	ND
12	7 (1)	3 (-1)	0 (-1)	4 (1)	0,08 (1)	0 (-1)	1 (1)	ND
13	5 (-1)	5 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,08 (1)	2 (1)	0 (-1)	ND
14	5 (-1)	3 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2 (1)	1 (1)	ND
15	5 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	1 (1)	ND
16	5 (-1)	3 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND
17 (C)	6 (0)	4 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,04 (0)	1 (0)	0,5 (0)	ND
18 (C)	6 (0)	4 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,04 (0)	1 (0)	0,5 (0)	ND
19 (C)	6 (0)	4 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,04 (0)	1 (0)	0,5 (0)	ND
20 (C)	6 (0)	4 (0)	0,1 (0)	2 (0)	0,04 (0)	1 (0)	0,5 (0)	ND

Tabela 24. Efeitos principais e das interações das variáveis do planejamento *Plackett-Burman* com 7 variáveis para isolado LAMAI 297.

Variável	Efeito	P-valor
pH	-0,122174	0,247784
Inóculo	0,122174	0,247784
Peptona	-0,121324	0,250904
L-Glutamina	0,122174	0,247784
MgSO4.7H2O	0,122174	0,247784
Extrato lev.	0,121324	0,250904
KH2(PO)4	0,121324	0,250904

Embora as tentativas de otimização da produção de L-asparaginase não tenham sido eficientes para aumentar a produção da enzima, os isolados estudados são oriundos de ambientes com condições únicas de adaptações (LAMAI 505, marinho da Antártica e LAMAI 297 marinho da costa brasileira) e podem apresentar potencial para aplicação farmacêutica.

De acordo com Broome (1968) mesmo existindo diversos organismos produtores de L-asparaginase, para que esta enzima seja utilizada clinicamente, no tratamento de leucemias, é necessário que ela seja facilmente isolada, estável e ativa em pH e temperatura fisiológicos e que apresente um baixo valor de K_m , ou seja uma alta afinidade da enzima pelo substrato. Enzimas psicrófilicas podem ser até 10 vezes mais ativas a temperaturas baixas e moderadas do que as homólogas mesófilicas. Além disso, requerem menor energia de ativação para romper o estado nativo e são inativadas a temperaturas maiores do que a temperatura ótima para a catálise (FELLER e GERDAY, 2003).

Cabe destacar que os isolados LAMAI 505 e LAMAI 297 estão sendo estudados pelo grupo de pesquisa do Prof. Adalberto Pessoa Jr (FCF/USP) com o objetivo de avaliação dos parâmetros cinéticos de suas respectivas L-asparaginases. Dentre os fungos que estão sendo triados no âmbito do projeto Temático Fapesp (2013/08617-7) coordenado pelo Prof. Adalberto Pessoa Jr, aquele que apresentar vantagens para aplicação como um antileucêmico, será submetido aos estudos subsequentes de clonagem e expressão heteróloga visando obtenção de um biofármaco.

6. CONCLUSÕES

- A abordagem utilizada para a organização do acervo de fungos marinhos da costa brasileira e marinhos e terrestres da Antártica pode ser considerada satisfatória, uma vez que todos os isolados recuperados (71% do acervo inicial) foram fotodocumentados e preservados em novos lotes (com duas abordagens distintas de preservação). As informações associadas ao acervo estudado foram inseridas no sistema informatizado de gerenciamento do acervo da CRM-UNESP (μ SICol) e serão disponibilizadas online na Rede *speciesLink* e no Sistema de Informações sobre a Biodiversidade Brasileira (SIBBr).
- Quanto à prospecção de enzimas, de maneira geral, os fungos de origem marinha se destacaram na produção de xilanase e L-asparaginase, tanto os da costa brasileira quanto os da Antártica. Tendo em vista as propriedades diferenciadas pela adaptação ao frio e ao ambiente salino, os isolados selecionados no presente estudo podem apresentar parâmetros cinéticos enzimáticos de importância para o setor industrial.
- A estratégia empregada no processo de otimização da produção de enzima xilanase foi eficiente e satisfatório, elevando a produção de 49,41 U/mL para 629,67 U/mL (cerca de 13 vezes).
- O fungo marinho LAMAI 31 (*Aspergillus tubingensis*) pode ser considerado um recurso genético relevante para aplicação biotecnológica em processos industriais, uma vez que este foi capaz de utilizar resíduos agroindustriais para crescimento e produção de enzima xilanas e não apresentou patogenicidade.
- As estratégias utilizadas para otimização da produção da enzima L-asparaginase não foi eficiente para os dois isolados testados (LAMAI 505 e LAMAI 297).
- Os resultados do presente trabalho são considerados relevantes para a pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico, visto que o acervo estudado (organizado e preservado) é constituído de micro-organismos adaptados às condições extremas do ambiente Antártico e marinho, que podem apresentar propriedades específicas para aplicações industriais e ambientais, bem como pode conter espécies ainda não conhecidas pela ciência. Em adição, os estudos preliminares de caracterização e otimização da produção da enzima xilanase produzida pelo fungo *A. tubingensis* LAMAI 31 abre perspectiva para o desenvolvimento de novos estudos, incluindo a purificação e aplicação da mesma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APERL-BIRKHOLO, P.C.; WALTON, J.D. Cloning, disruption, and expression of two endo-beta 1, 4-xylanase genes, XYL2 and XYL3, from *Cochliobolus carbonum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p. 4129-4135, 1996.

ARFI, Y.; CHEVRET, D.; HENRISSAT, B.; BERRIN, J. G.; LEVASSEUR, A.; & RECORD, E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. **Nature communications**, v.4, 1810, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, n.3, p.257-270, 1992.

BAKER, P.W.; KENNEDY, J.; DOBSON, A.D.W., MARCHESI J.R. Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Activities of Fungi Associated with *Haliclona simulans* Isolated from Irish Coastal Waters. **Marine Biotechnology**, v.11, p.540-547, 2009.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; AND POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced by solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching, **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v.32, p.819-824. 2008.

BIELY, P.; MARKOVIC, O.; MISLOVICOVA, D. Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. **Anal. Biochem.** v.144, p. 147-15, 1985.

BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enz. Microb. Technol.**, v.46, p.17-37, 2010a.

BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Mycological Research**, v.114, p.863-872, 2010b.

BONUGLI-SANTOS, R.C.; VASCONCELOS, R.D.; PASSARINI, M.R.Z., VIEIRA, G.A.L.; LOPES, V.C.P.; MAINARDI, P.; SANTOS, J.A.; DUARTE, L.A.; OTERO, I.V.R.; YOSHIDA, A.M.S.; FEITOSA, V.A., PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.269, 2015.

BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat. Product Rep.**, v.21, p.143-163, 2004.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.64, p.573-606, 2000.

BUSHMAN, J.E.; PALMIERI, D.; WHINNA, H.C.; CHURCH, F.C. Insight into the Mechanism of Asparaginase-Induced Depletion of Antithrombin III in Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Leukemia Research**, v. 24, p.559-565, 2000.

CASTELLANI, A., J. Trop. Med. Hyg., v.70, p.181-184, 1967.

CHEN, C.; CHEN, J. L.; LIN, T.Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 21, p.91-96, 1997.

CLARKE, A. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context, p. 3-17, 2003.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol** v. 29, p.3-23, 2005.

COSTA, R.R. **Perfil Enzimático e Potencial Biotecnológico de Fungos Isolados de Jardins de Fungo das Formigas Cortadeiras**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, area de concentração: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Rio Claro, São Paulo, 2014.

COWAN, D.A.; TOW, L.A. Endangered Antarctic Environments. **Annual Reviews of Microbiology**, v.58, p.649-690, 2004.

CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.11, p.1065-1072, 2001.

DAMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.D.; RAGHUKUMAR, S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p. 172-181, 2006.

DANIEL H.M.; PRASAD G.S. The role of culture collections as an interface between providers and users: the example of yeasts **Research in microbiology**, v.161, n.6, p.488-496, 2010.

DA SILVA, M.; PASSARINI, M.R.Z.; BONUGLI, R.C.; SETTE, L.D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environ. Technol.**, v.29, p.1331-1339, 2008.

DEBASHISH, G., MALAY, S., BARINDRA, S., & JOYDEEP, M. Marine enzymes. **Marine Biotechnology I**, Springer Berlin Heidelberg, p.189-218, 2005.

DEL-CID, A.; UBILLA, P.; RAVANAL, M. C.; MEDINA, E.; VACA, I.; LEVICÁN, G.; & CHÁVEZ, R. Cold-Active Xylanase Produced by Fungi Associated with Antarctic Marine Sponges. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.172, n.1, p.524-532, 2014.

DEL-FRATE, G.; CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. **Polar Biol.**, v.11, p.1-7, 1990.

DESGRANGES, C.; DURAND, A. Effect of pCO₂ on growth conidiation and enzyme production in solid-state culture by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. **Enz. Microb. Tech**, v.12, p.546 -551, 1990.

DE SOUZA, D. F.; DE SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. **Process Biochem**, v.36, p.835 -838, 2001.

DODD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v.1 n.1, p. 2-17, 2009.

EL-KADY, I.A.; OMO EL-MAGHRABY; SABBER, S. Halofilicos fungos ou halotolerante de quatro sementes do Egito. **Cryptogamie. Mycologie**. v.17, n.4, p.289-293, 1986.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. **Nat. Rev. Microbiol**, v.1, p.200-208, 2003.

FELLER, G.; ZEKHNINI, Z.; LAMOTTE-BRASSEUR, J. GERDAY, C. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the Antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. **European Journal of Biochemistry**, v.244, p.186-191, 1997.

FERREIRA, G.; BOER, C.G.; PERALTA, R.M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. **FEMS Microbiol. Lett**, v.173, p.335-339, 1999.

FILHO, E.X.F. Xilanases. In: SAID, S., PIETRO, R. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. **Legis Summa Ltda**, v. 1, p. 137-148, 2004.

GEORLETTE, D.; BLAISE, V.; COLLINS, T.; AMICO, S.D.; GRATIA, E.; HOYOUX, A., MARX, J.C., SONAN, G., FELLER, G., GERDAY, C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews.**, v.28, p.25-42, 2004.

GERDAY, C.; GLANSDORFF, N. **Physiology and Biochemistry of extremophiles**, ASM Press, Washington, USA, 2007.

GHANEM, N.B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, v.73, n.2, p.113-121, 2000.

GRAHAM, M.L., Pegaspargase: a Review of Clinical Studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p.1293-1302, 2003.

GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J.C.; DIDERICHSEN, B.; PLEMENITAS, A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v.28, n.28, p.1273-1278, 2003.

GULATI, R.; SAXENA, R.; GUPTA, R.A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms, **Lett. Appl. Microbiol.** v.24, p.23-26, 1997.

HALTRICH, D., NIDETZKY; B., KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC. S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technol. International Journal of Integrative Biology**, v.6, p.22-26, 1996.

HAWKINS, D.S.; PARK, J.R.; THOMSON, B.G.; FELGENHAUER, J.L.; HOLCENBERG, J.S.; PANOSYAN, E.H.; AVRAMIS, V.I. Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res.**, v.10, p.5335-5341, 2004.

HILL, R.A. Marine natural products. **Annual Reports on the Progress of Chemistry**. v.101, p.124-136, 2005.

HOLDGATE, M.V. Terrestrial ecosystems in the Antarctic. **Philos T Roy Soc B.**, v.279, p.5-25, 1977.

HOU, Y.H.; WANG, T.H.; LONG, H.; ZHU, H.Y. Novel cold-adaptive *Penicillium* strain FS010 secreting thermo-labile xylanase isolated from Yellow Sea. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 38, n.2, p.142-149, 2006

HYDE, K.D.; SARMA, V.V.; JONES, E.B.G. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. **Marine Mycology: A Practical Approach**, v.1, p.172-204, 2000.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and Glutaminase Activities of Microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n.1, p. 85-99, 1973.

IVSHINA, I.B. Current situation and challenges of specialized microbial resource centres in Russia. **Microbiology**, v. 81, n. 5, p.509-516, 2012.

KAPOOR, D.; KUMAR, V.; CHANDRAYAN. S.K.; AHMED, S.; SHARMA, S.; DATT, M.; SINGH, B.; KARTHIKEYAN, S.; GUPTASARMA, P. Replacement of the active surface of a thermophile protein by that of a homologous mesophile protein through structure-guided protein surface grafting. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1784, p.1771-1776, 2008.

KARL, D.M. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. **Nature reviews Microbiology**, v.5, n. 10, p.759-769, 2007.

KIN, S.L. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.9, p. 245-251, 2006.

KIRSOP, B. E., DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods**. Academic Press, p. 17-18, 1991.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A.D.; KONIG, G.M. New secondary metabolites from the marine endophytic fungus *Apiospora montagnei*. **J. of Nat. Prod.**, v.67, p. 1058-1063, 2004.

KOHLMEYER J., KOHLMEYER E. **Marine Micology: The Higher Fungi**. Academic Press, New York, 1979

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.411-456, 1999.

JACKSON, A., PARDUE, J.H. The Role of Nutrient Additions on Crude Oil Degradation in Louisiana's Salt Marshes. **Water Soil Air Pollut**, v.109, p.343-355, 1999.

JOSEPH, B., RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G.; SHRIVASTAVA, N. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.2, n.2, p.39-48, 2007.

LAPMAK, K.; LUMYONG, S.; THONGKUNTHA, S.; WONGPUTTISIN, P.; SARDSUD, U. L-asparaginas production by *Bipolaris* sp. BR438 isolated from brown rice in Thailand. **Journal of Science**, v.37, p.160-164, 2010.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological reviews**, v.54, n.3, p.305-315, 1990.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 93, p.265-275, 1951

MARGESIN, R.; FELLER, G.; GERDAY, C.; RUSSEL, N. Cold adapted Microorganisms: Adaptation strategies and biotechnological potential. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, p.871-885, 2002.

MARSHALL, W.A. Biological particles over Antarctica. **Nature**, v.383, p.680, 1996.

MARTINELLI, H. L.; PANEK, A.D. Bioquímica experimental. **Livro Técnico**, p. 112, 1968.

MEDEIROS, L.A. **Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera.**

126f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FILHO, E.X.F. Production of xylanegrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.52, p.97-100, 2003.

MENEZES, C.B.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; MIQUELETTO, P.B.; PASSARINI M.R.Z.; SILVA, C.H.D.; JUSTO, M.R.; LEAL, R.R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V.M.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiology Research**, v.165, p.466-482, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-429, 1959.

MÖLLER, C.; DREYFUSS, M.M. Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. **Mycologia**, v.88, p.922-933, 1996.

MORETTI, M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R. D., RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.1062-1071, 2012.

MOSTAFA, F.A.; EL ATY, A.A.A.; WEHAIDY, H.R. Improved Xylanase production by mixing low cost wastes and novel co-culture of three marine-derived fungi in solid state fermentation. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v.3, n.7, p.336-349, 2014.

MÜLLER, H.J.; BOOS, J. Use of L-Asparaginase in Childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n.2, p. 97-113, 1998.

MURRAY, A.E.; WU, K.Y.; MOYER, C.L.; KARL, D.M.; DELONG, E.F. Evidence for circumpolar distribution of planktonic Achaea in the Southern Ocean. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 18, p. 263-273, 1999.

NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v.61, p.208-221, 2007.

OLLENSCHLÄGER, G.; ROTH, E.; LINKESCH, W.; JANSEN, S.; SIMMEL, A.; MÖDDER, B. Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side effects. **European Journal of Clinical Investigation**. v.5, p. 512-516, 1988.

ONOFRI, S.; PAGANO, S.; ZUCCONI, L.; TOSI, S., *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycetes), anam.-gen. and sp. nov., from continental Antarctica. **Nova Hedwigia**, v.68, p.175-181, 1999.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), Biological Resource Centers: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. OECD Publications, Paris, France, p. 66, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) (0). Guidance of operation of Biological Resource Centres (BRCs), 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres, OECD Directorate for Science, Technology and Industry (<http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf>), 2007.

OSTERHAGE, C; KONIG, G.M; HOLLER, U; WRIGHT, A.D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **J. of Nat Prod**, v. 65, p.306-313, 2002.

OSTERHEGE, C. **Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi**. Tese (Doutorado) - Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha, 2001.

ØVSTEDAL, D.O; LEWIS, SMITH, R.I. Lichens of Antarctica and South Georgia. In: Øvstedal DO, Lewis Smith RI, editors. A guide to their identification and ecology. **Studies in Polar Research**, University of Cambridge, p.4-5, 2001.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.L.; DA SILVA, M.; SETTE, L.D. Marine derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.364-370, 2011.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELLI, M.L.T.M. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp Biobleaching. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p.149-155, 2009.

PIETERS, R.; HUNGER, S.P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; PUI, C. H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v.117, n.2, 238- 249, 2011.

PIETERS, R.; APPEL, I.; KUEHNEL, H. J.; TETZLAFF-FOHR, I.; PICHLMEIER, U.; VAN DER VAART, I.; STIGTER, R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. **Blood**, v.112, n.13, p.4832-4838, 2008.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J.; AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.67, p.577-591, 2005.

PRICE, B.P. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p.1247-1251, 2000.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A.K. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v.34, p.189-206, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S.; CHINNARAJ, A.; CHANDRAMOHAN, D.; D'SOUZA, T.M.E.; REDDY, C.A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. **Botanica Marina**, v.37, p. 515-523, 1994.

RAGHUKUMAR C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD V.R.; MISHRA R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **J. Ind. Microbiol. Biotechnology**. v.31, p.433-441, 2004.

ROSA, L.H.; VAZ, A.B.M.; CALIGIORNE, R.B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C.A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, v.32, p.161-167, 2009.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.6, p.27-141, 2007.

SALEEM, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M.; LEE, Y.S. Marine natural products of fungal origin. **Nat. Prod. Rep**, v.24, p.1142-1152, 2007.

SARQUIS, M.I.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; SANTOS A.; COSTA, G.L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 489-492, 2004.

SAVITRI; ASTHANA, N.; AZMI, W. Microbial L-Asparaginase: A Potential Anti-tumour Enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**. v.2, p.183-194. 2002.

SCHLICHTING, H.M.; SPEZIALE, B.J.; ZINK, R.M. Dispersal of algae and protozoa by Antarctic flying birds. **Antarctic Journal**, v.13, p.147-149, 1978.

SETTE, L.D.; CUPOLILLO, E.; TIGANO, M.S.; VAZOLLER, R.F.; CANHOS, V.P. Recomendações para operação e gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos. **Microbiologia in foco**, v.2, p.49-55, 2007.

SETTE, L.D.; PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 2-8, 2013.

SETTE, L.D. **Nota Técnica: Recursos Humanos e Infra-Estrutura para Coleções Microbiológicas**. (<http://www.cria.org.br/cgee/documentos/infraestrutura.doc>), 2005.

SEPAHY, A.A.; GHAZI, S.; SEPAHY, M.A.: Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. **Enzyme Res.**, 593-624, 2011.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Production of Lactase by *Trichoderma* sp. **Food Technol. Biotechnol.**, v.42, n.2, p.21-124, 2004.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G.S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**, p. 3-18, 2009.

SIMÕES, M.L.G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Rio Claro, São Paulo, 2006.

SINHA, RATI; SINGH, H.R.; JHA, S.K. Microbial L-asparaginase: present and future prospective. **International Journal of Innovative Research in Science. Engineering and Technology**, v.2, n.11, p. 7031-7051, 2013.

SIDDIQUI, K.S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-Adapted Enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v.75, p.403-433, 2006.

SMITH, D., RYAN, M.J.; STACKEBRANDT, E. The ex situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. **Biotechnology**, 2008.

SONIYAMBY, AMBI R.; SUNDARAM, LALITHA; VASANTHA, Praveesh Bahuleyan. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v.4, n.1, p. 279-282, 2012.

STRUVAY, C.; FELLER, G. Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.9, p.11643-11665, 2012.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p.33-64, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.17, n.1, p.39-67, 1997.

SURAJIT, D.; LYLA, P.S.; AJMAL KHAN, S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**. v.90, n.10, p.1325-1335, 2006.

TERRASAN, C.R.F.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA, F.G.; CARMONA, E.C. Xylanase and β -Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, Physico-chemical Properties, and Application of the Crude Extract to Pulp Biobleaching. **BioResources.**, v.8, n.1, p.1292-1305, 2013.

THEANTANA, T.; HYDE, K.D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **Kmitl Sci. Tech. J.**, v.7, n.1, p. 13-18, 2007.

TOLEDO, T.R.; DEJANI, N.N.; MONNAZZI, L.G.S.; KOSSUGA, M.H.; BERLINCK, R.G.; SETTE, L.D.; MEDEIROS, A.I. Potent Anti-Inflammatory Activity of Pyrenocine A Isolated from the Marine-Derived Fungus *Penicillium paxilli* Ma (G) K. **Mediators of inflammation**,v. 2014, 2014.

TRINCONE, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n.3, p.241-256, 2010.

TRINCONE, A. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. **Marine drugs**, v.9, n.4, p. 478-499, 2011.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VAZOLLER, R.F.; CANHOS, V.P. Coleções de Culturas de Serviços e Centros de Recursos Biológicos. <http://www.cria.org.br/cgee/documentos/crb.doc>, 2005.

VERBIST, J.; SALLENAVE, C.; POUCHUS, Y. Marine fungal substances. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 24, p. 979-1092, 2000.

VERMA, N.; KUMAR, K.; KAUR, G.; ANAND, S. L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.45-62, 2007.

VERMA, A.K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y.S.; NAIK, C.G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v.21, n.2, p. 217-233, 2010.

VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p. 335–350, 1994.

VINCENT, W.F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v.12, p. 374-385, 2000.

VISHNIAC, H.S. The microbiology of Antarctic soils. In: Friedmann EI (ed) Antarctic microbiology. **Wiley-Liss**, New York, p. 433–490, 1993.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p.545-551, 2006.

WFCC – World Federation for Culture Collections (www.wfcc.info/GuideFinal.html). Guidelines for the establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms.

WONG, K.K.; TAN L.U.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52 p. 305–17, 1988.

WYNN-WILLIAMS, D.D. Ecological aspects of Antarctic microbiology. **Adv. Microb. Ecol.**, v.11, p.71–146, 1990.

ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y; GAO, P. 2002. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. . **Enzyme and Microbial Tehnology**. v.30, p.734-740, 2002.

ZHANG, C.; KIM, S.K. Research and application of marine microbial enzymes: Status and prospects. **Mar. Drugs**, v.8, p. 1920-1934, 2010.