

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PAOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

ESTÁGIO SUPERVISIONADO NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE *Campus*
CASCAVEL
ÁREA: BIOQUÍMICA DE MICRORGANISMOS

Aluna: Jaina Caroline Lunkes
Supervisor: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PAOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

ESTÁGIO SUPERVISIONADO NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE *Campus*
CASCAVEL

Aluna: Jaina Caroline Lunkes
Supervisor: Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA – PR
Agosto de 2013

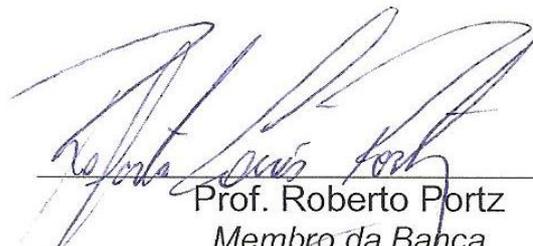
**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso
Área de Estágio: Bioquímica de Microrganismos
Acadêmica: Jaina Carline Lunkes
Supervisor do Estágio: Prof.º Dr.º José Luis da Conceição Silva
Orientadora do Estágio: Prof.ª Dr.ª Marise Fonseca dos Santos

O presente TCC foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:



Prof. Roberto Portz
Membro da Banca



Prof. Cristina Beatriz Aroca
Ribeiro
Membro da Banca



Prof. Marise Fonseca dos
Santos
Orientador

Palotina, PR, 08 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a Deus. Atribuo a ele todas as coisas boas que aconteceram até agora.

Agradeço a minha mãe pelos sacrifícios financeiros e emocionais durante toda graduação e antes dela. E tudo que ela fez muitas vezes além das suas condições. E ao meu pai também.

Não posso deixar de agradecer a minha irmã gêmea Jussara, não seria nada sem você.

Meus amigos que mais uma vez Deus providenciou: Maik, Laís, Priscila, Gracy, Luana, Ademir, Marcos, Barth, Roger, Vieira e Anderson, obrigada por tudo.

Ao pessoal do Labiogen, Fernando, Kleber, Andressa, Camila, Sarah, Joel, Fernanda, Elisiane e Prof. Eliane minha maravilhosa orientadora de IC.

Ao Prof. Carlos Coimbra que além de tudo, trouxe a FECITEC. Agradeço a todos os meus colegas da FECITEC também.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos que tão bem me recebeu e ensinou. Especialmente a Josi, a Prof. Marina e ao Prof. Zé.

A Prof.^a Marise que me orientou com muita dedicação neste estágio. Foi uma luta, mas agora estamos prontas.

E as pessoas que eu amo muito e que na medida do possível me ajudaram, mas moram longe, Yohana, Nanda e Gu. Vocês moram no meu coração.

E por último, mas não menos importante, aos meus colegas de turma e dos formandos deste ano e a todos que fizeram parte de algum momento da minha graduação. Sou muito grata por tudo.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do polissacarídeo xilano	8
FIGURA 2. Estrutura do xilano e os locais de ação das enzimas do complexo xilanolítico	9
FIGURA 3. Gel de SDS-PAGE. Frações eluídas em NaCl 100mM na cromatografia	22
FIGURA 4. Imagem colorida do zimograma.....	23
FIGURA 5. Perfil de eletroforese em gel de agarose à 0,7%	23
FIGURA 6. Perfil de eletroforese em agarose à 1%	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS	7
2.2 XILANO.....	8
2.3 XILANASE.....	9
2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	10
2.4.1 Métodos Aplicados à Xilanases	11
2.5 REGIÕES ITS EM FUNGOS	13
3 OBJETIVO GERAL	14
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 CULTIVO DO FUNGO.....	15
4.1.1 Meios de Cultura	15
4.2 CULTIVO DO FUNGO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	15
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA.....	15
4.4 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DO FRACIONAMENTO DA XILANASE	16
4.4.1 Cromatografia.....	16
4.4.2 SDS-PAGE e zimograma	17
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA MISCELIAL	18
4.6 PCR	18
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 PURIFICAÇÃO DA XILANASE EM COLUNA DE TROCA IÔNICA.....	20
5.2 SDS-PAGE E ZIMOGRAMA - ESTABELECIMENTO DESTE PROTOCOLO	20
5.3 EXTRAÇÃO DO DNA MISCELIAL	23
5.4 PCR	24
6 ANÁLISE CRÍTICA.....	25
7 CONCLUSÃO	26
8 REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Os fungos produzem para sua própria sobrevivência enzimas que degradam matéria orgânica. Muitas destas enzimas possuem uma valiosa importância industrial como é o caso da xilanase (de degradação do xilano). O xilano está presente na hemicelulose e esta é encontrada em todos os vegetais, principalmente os que apresentam parede celular secundária (SALAMA, et al 2008).

A utilização da xilanase vai desde o tratamento de resíduos agroindustriais, o melhoramento da absorção da ração por animais de corte (TORRES, et al 2003) e na indústria de papel (SAVITHA, et al 2009). O desenvolvimento de biotecnologias de baixo custo, que possibilitem a produção de xilanase, é de grande interesse para estas e outras áreas industriais.

Para tanto, estão sendo estudadas a capacidade de produção e a qualidade das xilanases produzidas por diversos fungos. Os fungos são mais interessantes para a produção destas enzimas, pois, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular, podem produzir enzimas resistentes a altas temperaturas e que agem em ampla faixa de pH. Este trabalho apresenta a purificação parcial da xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, além de outras atividades visando a melhoria dos trabalhos com a xilanase e a identificação do fungo por via molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, tem grande adaptação a diversos substratos. Esta característica é interessante do ponto de vista biotecnológico, pois possibilita que resíduos industriais e agroindustriais sejam utilizados como substrato.

“A nutrição da maioria dos fungos dá-se por absorção dos produtos finais de processos nos quais enzimas extracelulares adequadas destes microrganismos, hidrolisam macromoléculas tornando-as assimiláveis através de mecanismos de transporte. As principais enzimas encontradas nos fungos são: lipases, invertases, lactases, amilases, proteinases etc. Há fungos que tem a capacidade de hidrolisar substâncias orgânicas complexas como quitina, osso, couro, inclusive materiais plásticos.” (ALTERTHUM, TRABULSI, 2004, p.456)

Resíduos agroindustriais são rejeitos dos processos que envolvem o beneficiamento de matérias primas biológicas. Não é lixo, pois tem potencial para ser aproveitado.

Nos resíduos de origem vegetal o tratamento com xilanases é muito importante. A hemicelulose, um dos principais constituintes do resíduo vegetal é uma matriz heteropolimérica que inclui o xilano. Estes resíduos são oriundos dos mais diversos processos industriais, vão desde o bagaço da cana, casca de arroz, casca ou bagaço de laranja, palha de milho, entre outros. O resíduo agroindustrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido (PELIZER, PONTIERI, MORAES, 2007). A problemática destes resíduos envolve principalmente o volume que é muito grande. Segundo Foletto, et al (2005) “a biomassa pode ser utilizada para produção de energia em um método de queima direta, o qual produto final seriam cinzas que poderiam ser aproveitadas.”

O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, combinados com a utilização de microrganismos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do acúmulo na natureza (ALEXANDRINO, et al, 2007). E, a partir dos microrganismos, é possível obter a produção de enzimas que podem ser utilizadas em outros processos industriais, bem como na biorremediação.

2.2 XILANO

O xilano está presente na parede celular de todas as plantas terrestres e é particularmente abundante naquelas que possuem parede celular secundária (SALAMA et al, 2008). É o principal componente da hemicelulose, juntamente com a celulose, representam mais de 50% de toda a biomassa de uma planta (SÁ PEREIRA, et al 2003).

Sua forma estrutural básica é formada de ligações β -1,4-D-xiloses (Figuras 1 e 2) e por ramificações, tais como L-arabinoses, D-galactoses, acetil, feruloil, *p*-coumaroil e resíduos de ácido glucurônico (DOBREV, et al 2007). Segundo Savitha et al (2009), “a degradação do xilano é realizada por um complexo xilanolítico”. (Figura 2)

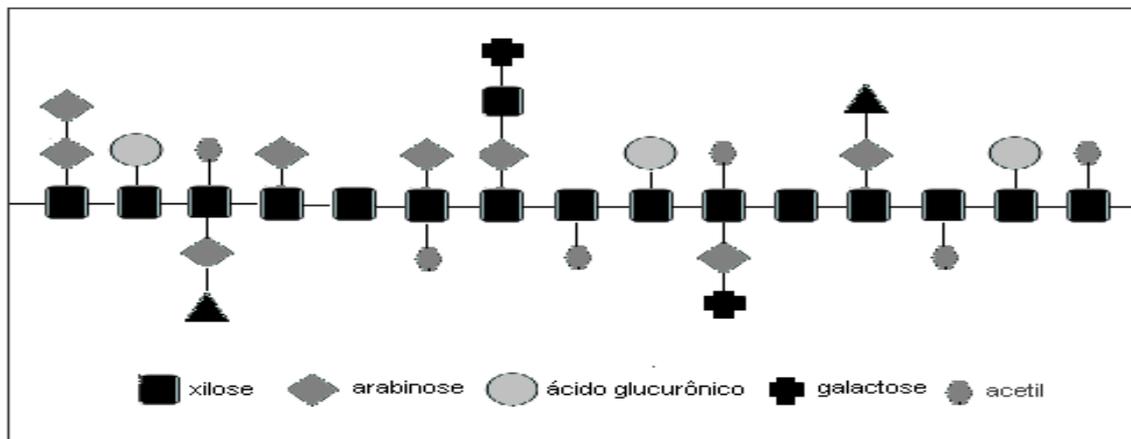


FIGURA 1. Representação esquemática do polissacarídeo xilano (VRIES & VISSER, 2001).

Segundo Chávez, et al (2006) este complexo é composto por:

- “Endoxilanasas (E.C. 3.2.1.8): hidrolisam ligações α 1-4 internas e aleatoriamente a cadeia principal do xilano, produzindo uma mistura de xilooligossacarídeos;
- β -Xilosidases (E.C. 3.2.1.37): hidrolisam ligações da extremidade α 1-4 não redutora liberam a xilose livre e oligossacarídeos encurtados;
- L-Arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55): hidrolisam as ligações α 1-4 e removem as cadeias laterais de L-Arabinofuranose;
- D-Glucuronidasas (E.C. 3.2.1.139): hidrolisam os resíduos de metil glucuronato;
- Acetil Xilano Estearases (E.C. 3.1.1.72): hidrolisam grupos acetato da cadeia principal;

- Feruloil (E.C. 3.1.1.73) e Coumaroil (E.C. 3.1.1.-) Esterases: hidrolisar os respectivos ácidos aromáticos ligados aos resíduos de arabinofuranosídeos.”

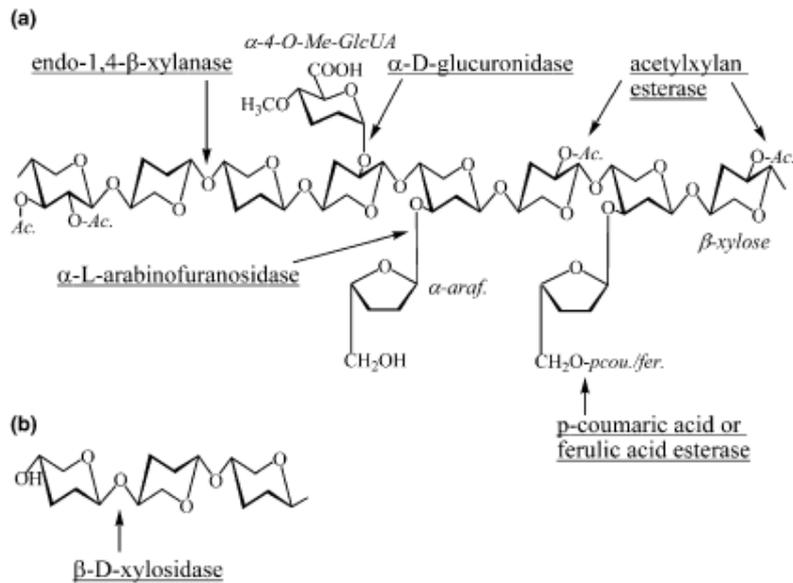


FIGURA 2. Estrutura do xilano (xilano-pirossil em ligações α 1-4) e os locais de ação das enzimas do complexo xilanolítico. (a) endo-1,4 β -xilanase, α -D-glucuronidase, Acetilxilanoesterase, α -L-arabinofuranosidase, ácido ferulíco esterase (b) β -xilosidase. Imagem extraída de COLLINS et al (2005).

2.3 XILANASE

O termo xilanase refere-se às enzimas capazes de hidrolisar as ligações β -1,4-D-xiloses (GHOSE & BISARIA, 1987). A Xilanase é uma enzima de grande interesse industrial. Sua principal aplicação é na indústria de papel e celulose, porém, tem sido aplicada de modo diverso como, a suplementação com enzimas exógenas na ração dos frangos de corte pelo aumento da digestão com possíveis vantagens econômicas (TORRES, et al 2003). Xilanases também tem sido usadas para acelerar o processo de panificação, pois ajudam a quebrar os polissacarídeos na massa (JIANG, et al 2010). Estes polissacarídeos encontrados na farinha de trigo são formados de xilanopiranosil em cadeia linear e ramificada, tal como o xilano principalmente com arabinofuranosil. A sua distribuição espacial e ramificação podem afetar a sua relação com as proteínas formadoras do glúten e assim influenciar suas propriedades reológicas, especialmente relacionadas à elasticidade/coesão (GAROFALO, et al 2011).

O interesse na aplicação da xilanase produzida por fungos na indústria de papel tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Isto se deve a propriedade da xilanase de

facilitar a remoção da lignina sem prejudicar a polpa de papel na etapa de branqueamento. O processo atual utiliza compostos clorados que são conhecidos pela sua difícil degradação e por eventualmente poluir corpos hídricos (SAVITHA, et al 2009). Estes compostos são o cloro elementar que gera grande quantidade de dioxinas (um forte cancerígeno) ou o dióxido de cloro, o qual reduz, mas não impede a formação de dioxinas. A xilanase, por outro lado, não é tóxica nem poluente.

Existem diversos microrganismos que produzem xilanase, sendo eles bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes (COLLINS, et al 2005). Os fungos, no entanto são mais interessantes para a produção desta enzima devido à facilidade de cultivo sobre diferentes substratos, mas principalmente, pelas diferentes qualidades de xilanase produzida por fungos diferentes. Estas enzimas costumam ser resistentes a altas temperaturas quando originadas de fungos termófilos. Ishihara e colaboradores (1997) identificaram uma xilanase produzida pela cepa de fungo termófilo HG-1 em que esta enzima tinha sua temperatura ótima de atividade a 70°C e pH ótimo de 4,5 a 5,0, no entanto a enzima, a 30°C, manteve sua atividade na faixa de pH de 2,0 a 12,0. Além disso, diferentemente de bactérias e a maioria das leveduras, os fungos filamentosos podem secretar a enzima para o meio extracelular (FANG, et al 2008).

Gathora e colaboradores (2006), detectaram a importância dessa variedade entre as xilanasas e estudaram principalmente aquelas alcalino-resistentes para aplicação na etapa de branqueamento do papel. Encontraram que as xilanasas dos fungos *Chaetomium thermophilum*, *Hemicula isolens*, *Melanocarpus sp.*, *Malbranchea sp.* e *Thermoascus aurantiacus* são ativas em ambientes alcalinos e eficientes no branqueamento do papel.

2.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas possuem características químicas e físico-químicas que as diferem. As características mais marcantes são relativas a carga elétrica e peso molecular ou volume molecular. As técnicas de separação ou fracionamento em grande maioria baseiam-se nessas propriedades. A solubilidade das proteínas está diretamente relacionada ao seu tamanho molecular e também a sua propriedade de carga, que dependem do pH, da temperatura, da concentração salina, etc. As etapas iniciais de um fracionamento empregam normalmente as diferenças na solubilidade das proteínas (NELSON & COX, 2002). A adição de um sal pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecerão solúveis. Segundo

Nelson & Cox, (2002), costuma-se utilizar sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) para precipitações em virtude da sua alta solubilidade em água.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações/propriedades químicas ou físicoquímicas. É uma técnica versátil e de grande aplicação. Normalmente em uma cromatografia os eluídos são acompanhados por verificação de alguma propriedade físicoquímica ou bioquímica: absorvância, atividade enzimática, etc. As metodologias de fracionamento para purificação de proteínas que são enzimas normalmente empregam temperatura de 4°C, pois as enzimas costumam perder suas atividades fora do meio fisiológico e da sua temperatura normal. Para preservar mantêm-se a 4°C.

A cromatografia de troca iônica explora a diferença de sinal e de magnitude das cargas elétricas líquidas das proteínas em um determinado pH (NELSON & COX, 2002). A matriz da coluna possui grupos carregados ligados a ela. A afinidade de cada proteína pelos grupos carregado da coluna são afetadas pelo pH e por íons salinos livres (força iônica). Por isso cada proteína tem uma interação diferente com a coluna e para a eluição das proteínas ligadas, utiliza-se um gradiente salino para vencer a força iônica da proteína ligada ao contra íon da matriz cromatográfica.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), empregada na maioria das vezes com fins analíticos, é uma técnica que se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico (LEHNINGER, 2002). É importante, pois permite separar e visualizar as proteínas separadas além de permitir estimar o seu peso molecular, comparando com um peso molecular padrão.

Esta diferença entre as proteínas permite a existência de inúmeros protocolos para a purificação mesmo para uma mesma proteína, como é o caso da xilanase.

2.4.1 Métodos Aplicados à purificação de Xilanases

Li e colaboradores em 2010 utilizaram inicialmente à precipitação de 40-60% com sulfato de amônia para a purificação da xilanase de *Streptomyces rameus* L12001 usando extrato bruto de xilanase obtido do sobrenadante do meio de cultura. Foi realizada uma cromatografia de troca iônica em uma coluna DEAE – 52 após o precipitado ser dissolvido e dialisado. A coluna foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,0 até atingir um fluxo de 1mL/min. Seguindo a cromatografia em coluna DEAE – 52, a xilanase ainda foi

submetida a uma cromatografia de troca catiônica CM Sepharose Fast Flow equilibrada com tampão acetato 20mM (pH5,3). Após a aplicação da amostra as proteínas ligadas foram eluídas com gradiente de 0 a 0,5M de NaCl num fluxo de 1mL/min.

Jiang e colaboradores em 2010 usaram para a purificação da xilanase produzida por *Chaetomium sp.* a precipitação com sulfato de amônio de 0-40% do meio de cultura o qual o fungo foi crescido. O precipitado, depois de centrifugado, foi ressuspensão em tampão fosfato 50mM pH 7,5 e foi aplicado em cromatografia de troca iônica (aniônica) em gel de DEAE-52. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 50mM pH 7,5. A proteína não ligada foi concentrada e aplicada em uma cromatografia de gel filtração analisada por SDS-PAGE.

Sharma e colaboradores em 2010 buscavam purificar duas xilanases produzidas por *Malbranchea flava*. Adicionaram ao meio de cultura no qual o fungo foi crescido 50ml de tampão citrato de sódio 50mM pH 6,5 e agitaram a 45°C suavemente durante 1h. A suspensão foi filtrada em um pano musseline e centrifugada a 11000g por 10min à 45°C. O filtrado foi concentrado por ultrafiltração em membrana de exclusão de peso molecular de 10 kDa (Pall, EUA) numa célula agitada (Millipore) e então aplicado em uma coluna cromatografia de troca iônica (aniônica fraca) DEAE-Sepharose (FastFlow) equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 6,5. Após lavagem foi feito um gradiente linear de 0-1M de NaCl em tampão Tris-HCl 20mM pH 6,5. Um pico de xilanase foi obtido durante a eluição isocrática e outros cinco durante o gradiente de NaCl. As frações correspondentes ao pico I foram reunidas, concentradas, dessalinizadas e equilibradas com 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão acetato 50mM pH 5,0. A amostra foi aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica Fenil Sepharose 6FF (Amersham Biociences). A coluna foi eluída com um gradiente linear de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1 a 0M em tampão acetato 50mM pH 5,0 a um fluxo de 1ml/min. As frações foram reunidas e a enzima chamada MFX I foi caracterizada. As frações de enzima ligada (pico V) na coluna DEAE-Sepharose obtida durante a eluição com NaCl 0,45M foram reunidas, concentradas, equilibradas com 1,0M de em tampão acetado 50mM pH 5,0 e foram aplicadas na coluna Fenil Sepharose 6FF como descrito acima. As frações ativas da xilanase (MFX II) foram reunidas, concentradas e aplicadas sobre Polubuffer permutador¹ (PBE-94, Amersham Biociences) coluna equilibrada com tampão acetato 20mM pH 5,0. A coluna foi eluída com

¹ Polybuffer Permutador é um tampão utilizado em gradientes de pH estável para realizar cromatofocagem, utilizada para a separação de proteínas de acordo com as diferenças no seu ponto isoelétrico (pI). O pI de cada proteína é o pH ao qual a proteína tem zero de carga de superfície. O PBE 94 é utilizado para separar proteínas com pI variando entre pH 4,0 e 9,0 (GE HEALTHCARE, instruções Meio Cromatofocagem, 2006). É uma alternativa a eletroforese bidimensional.

um gradiente linear de 0-1M de NaCl em tampão acetato 20mM pH 5,0, a um fluxo de 0,2ml/min. As frações correspondentes a MFX II foram reunidas e caracterizadas.

2.5 REGIÕES ITS EM FUNGOS

As técnicas de identificação molecular de organismos são muito recentes. Plantas, algas, fungos outros microrganismos eram identificados através da morfologia. Esta técnica deixava a desejar, pois muitos destes organismos assemelhavam-se entre si. Lima da Silva e colaboradores (2012), comentando sobre a micoteca da Embrapa Agroindústria de Alimentos, afirmam que em razão da semelhança, muitos fungos apresentavam apenas especificação de gênero. As técnicas moleculares, no entanto, possibilitam não só a identificação do microrganismo, bem como sua taxonomia acima de gênero e espécie.

A técnica molecular mais promissora é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica identifica até uma cópia de DNA por célula (BOLLELA, et al 1999) a partir de um DNA molde e sem muita qualidade. Além disso, apresenta resultado em poucas horas.

Os fungos apresentam em seu cluster gênico os genes 18S, 5,8S e 28S. Estes são separados por regiões chamadas de ITS 1 e ITS 2 as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (FUNGARO, 2009). A região ITS, que compreende entre 600 e 800 pares de bases, pode ser amplificada, utilizando os primers universais (ITS 1 e ITS 4), os quais são complementares às sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA (CÓRDOBA, et al 2002). Outra característica é que o rRNA é altamente repetitivo, portanto esse gene pode ser facilmente amplificado e sequenciado, mesmo com pouquíssima quantidade de DNA. Segundo Fungaro (2009) “as regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie.”.

Na micologia, a PCR com os primers ITS tem sido utilizados tanto para a detecção de fungos que contaminam alimentos com suas toxinas (FUNGARO, 2009) quanto para a verificação da variedade fúngica em um determinado ambiente (CÓRDOBA, et al 2002). Com o acesso facilitado a bancos de dados genéticos, a exemplo do site NCBI (National Center for Biotechnology Information), após o sequenciamento da região ITS amplificada pela PCR, é possível comparar o gene de um fungo com o banco de dados, e obter a identificação da espécie do fungo.

3 OBJETIVO GERAL

Acompanhar a rotina do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UNIOESTE – *Campus Cascavel*

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ensaiar a purificação parcial da xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, por cromatografia de troca iônica;
- Padronizar metodologia de eletroforese SDS-PAGE e zimograma;
- Extrair DNA do fungo *Aspergillus ochraceus* e realizar PCR com os primers IST 1 e ITS 4 para posterior identificação molecular para confirmação da espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DO FUNGO

O fungo utilizado pertence a coleção do projeto SISBIOTA realizado pelo laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Unioeste-Cascavel. A manutenção dos fungos foi realizada em tubos contendo 5 ml de meio sólido agar-batata-dextrose (BDA). Após inóculo, as culturas foram crescidas a 26°C por 10 a 14 dias, sendo estocadas em geladeira a 4°C por até 30 dias.

4.1.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram o meio (BDA): Glicose 1,5%, agar-agar 2,0%, batata 20%; e o meio mineral Czapeck (modificado): NaNO₃ 0,3%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄.7H₂O 0,001%, Caseína 0,1%. O pH deste meio foi acertado para 6,0 e como fonte de carbono foi adicionado 1% de palha de milho.

4.2 CULTIVO DO FUNGO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O cultivo do fungo *Aspergillus ochraceus* foi feito a partir do inóculo de esporos produzidos pelo fungo em BDA sólido, ressuspensos em água destilada estéril em frascos de erlenmeyer (125 mL), contendo 25 mL do meio mineral Czapeck (modificado) e suplementado com 1% de palha de milho. O meio foi incubado a 29°C em condição estacionária por 8 dias. O extrato bruto foi obtido após o crescimento, por filtração do meio de cultivo usando papel Whatman n° 1 com o auxílio de bomba a vácuo. E ainda dialisado com água de osmose reversa para retirar o excesso de açúcares e mantido congelado em freezer.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE XILANÁSICA

A atividade enzimática da xilanase extracelular foi determinada através da liberação de açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com xilano. A reação enzimática foi constituída de 0,5ml de xilano 1% em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6, e 0,5ml da amostra contendo a enzima xilanase no extrato bruto ou obtida de fracionamento.

A reação foi incubada a 50°C e alíquotas de 125µL foram retiradas nos tempos de 10, 20 e 30 minutos e adicionadas em tubos contendo 250µL de ácido 3.5 dinitrosalicílico (DNS), que serviu tanto para paralisar a reação enzimática quanto como reagente para açúcares redutores. Em seguida os tubos, foram colocados em banho fervente por 5 minutos e adicionado 1ml de água destilada por tubo. A leitura da absorbância foi realizada a 540nm contra um branco (Miller, 1959).

4.4 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DO FRACIONAMENTO DA XILANASE

O ensaio de purificação da enzima Xilanase foi realizado por cromatografia de troca iônica e a análise da homogeneidade das frações obtidas, por SDS-PAGE acompanhadas de ensaio de atividade para identificação da enzima no gel de eletroforese (zimograma).

4.4.1 Cromatografia

Foram ensaiadas dois tipos de cromatografia de troca iônica: DEAE – Cellulose e CM-Cellulose

As colunas foram ativadas segundo especificações da fabricante Sigma Aldrich.

DEAE-Cellulose: a coluna foi empacotada com a resina DEAE-Celulose (2cm de diâmetro por 15 cm de altura) e eluiu-se a coluna com NaOH 0,1M até que se pudesse confirmar sua saída com fita de pH (Merck). Deixou-se por 10 minutos em repouso e após lavou-se abundantemente com água de osmose reversa até que o pH ficasse neutro. Repetiu a operação usando HCl 0,1 M. Então lavou-se a coluna com dois volumes da coluna de tampão McIlvane 20mM, pH 6,0 para equilibrar toda a coluna neste tampão.

CM-Cellulose: a coluna foi empacotada com a resina CM-Celulose (2cm de diâmetro por 15 cm de altura) e eluiu-se a coluna com HCl 0,1M até que se pudesse confirmar sua saída com fita de pH (Merck). Deixou-se por 10 minutos em repouso e após lavou-se abundantemente com água de osmose reversa até que o pH ficasse neutro. Repetiu a operação usando NaOH 0,1 M. Então lavou-se a coluna com dois volumes da coluna de tampão McIlvane 20mM, pH 6,0 para equilibrar toda a coluna neste tampão.

A amostra (extrato bruto) foi equilibrada (10mL da amostra + 10mL de tampão McIlvane 40mM pH6,0) totalizando 20mL. A amostra equilibrada foi aplicada na coluna DEAE previamente equilibrada. Após a aplicação da amostra em um fluxo de 1mL/min a coluna foi lavada com tampão McIlvane 20mM pH 6,0 (duas vezes o volumes da coluna) e

então feito eluir com um volume de coluna de NaCl em tampão McIlvane 20mM, pH 6,0, nas concentrações em sequencia de 300mM, 500mM e 1M apenas para limpeza da coluna.

Então foi realizada outra etapa com uma coluna CM-Celulose previamente equilibrada com tampão McIlvane 20mM, pH 6,0. Equilibrou-se amostra (eluído da coluna DEAE) com o tampão McIlvane 40mM pH 6,0 totalizando 20mL, esta foi passada pela coluna. Depois da amostra, passou-se tampão novamente (dois volumes da coluna) e iniciou-se a eluição da xilanase com uma vez o volume de coluna em gradiente de NaCl em tampão McIlvane 20mM pH 6,0. Desta vez foi usado as concentrações de 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 400mM, 500mM e 1M.

Os eluídos das colunas foram coletados em tubos de ensaio numerados. A atividade enzimática nos tubos foi determinada segundo tópico 4.3.

4.4.2 SDS-PAGE e Zimograma

SDS-PAGE é um gel de poliacrilamida para eletroforese com o agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS). Foi feito um gel a concentração de 10% em acrilamida, (LAEMMLI, 1970) sem gel de empilhamento/concentração. O gel foi dividido em duas partes iguais para aplicação de metodologias diferentes de coloração. Em uma das metades, para coloração de proteínas, o gel foi incubado por 1h em uma solução de fixadora (10% de ácido acético, 40% de etanol e 50% de água de osmose reversa). Então, a coloração foi realizada com Comassie Blue R-250 e descorado com solução de ácido acético a 7%. A outra metade foi utilizada para o zimograma. Zimograma é uma técnica que permite detectar a atividade de uma enzima diretamente no gel de separação eletroforética. Foi ensaiado um protocolo descrito por Lial, H., et al (2012), com algumas modificações. O gel foi incubado com uma solução de Triton X-100 a 2,5% (v/v) por uma hora para retirar o SDS e permitir a renaturação das proteínas. Então foi lavado com água de osmose reversa para retirar excesso de Triton X-100. Depois o gel foi incubado por 15 minutos com tampão fosfato 500mM no pH 6,0. Em seguida incubado com tampão fosfato a 200mM mesmo pH, por 15 minutos. Uma terceira incubação, por 15 minutos, em mesmo pH e com tampão fosfato a 50mM.

O gel foi então, incubado por 30 minutos no substrato xilano 1% em tampão fosfato 50mM, pH 6,0, a 50°C. Após uma lavagem simples para a remoção de qualquer excesso de substrato sobre o gel este foi corado com vermelho de congo 0,5% por 10 minutos. Então o gel foi descorado com NaCl 1M.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA MICELIAL

O fungo foi crescido de acordo com as condições do item 4.2 e os micélios foram separados do meio extracelular com auxílio de uma micropipeta. Esses foram lavados com água livre de DNAs e RNAs (DEPEC) e macerados vigorosamente com nitrogênio líquido. À uma quantidade de aproximadamente 100µl da amostra macerada (em pó) e adicionou-se 500µl de brometo de cetilmetilamônia (CTAB) previamente aquecido a 60°C e 10µL de proteinase, então foi deixado em banho-maria a 60°C por 30 minutos agitando a cada 10 minutos. Após, o tubo foi resfriado em temperatura ambiente por 15 minutos. Foi adicionado 50 µL de clorofórmio: álcool-isoamílico 24:1 (v/v) e misturado manualmente por 10 minutos, centrifugado a 5000g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado para outro microtubo. Repetiu-se uma vez o passo anterior. Em seguida foram adicionados 10µL de RNase e incubado em banho-maria 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol gelado ao todo e misturado suavemente até formar precipitado. O tubo foi centrifugado a 10000rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% e centrifugado a 10000rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado e deixado secar a 37°C por 10 minutos. Então 50µL de tampão Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0 (TE) foram adicionados e deixado agir overnight em geladeira. O sucesso da extração foi conferido por eletroforese em gel de agarose a 0,7% (SAMBROOK E RUSSEL, 2001).

4.6 PCR

Após a realização da extração de DNA, foi realizada reação de PCR com o conjunto de primers universais para fungos ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTGATATGC-3'). Foi utilizado 2µL do DNA extraído e adicionados 5µL de tampão verde Go Taq (Promega) 14µL de água de PCR, 1µL de MgCl₂, 1µL do primer ITS 1 e 1µL do primer ITS 4, 0,5µL de dNTPs e 0,5µL Go Taq Polimerase (Promega) totalizando 25µL para reação. Foi incubado em termociclador da Eppendorf com o programa: 95°C – 2 minutos, 94°C – 45 minutos, 50°C – 45 minutos, 72°C – 1 minuto, repete-se este ciclo 35 vezes então 72°C – 5 minutos e mantido a 4°C para conservação da amostra até que fosse retirada do aparelho.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a visualização do DNA e oligonucleotídeos utilizou-se a eletroforese em gel de agarose (SAMBROOKS & RUSSEL, 2001). Para DNA Total o gel construído foi de 0,7% em 25mL de tampão Tris 0,89M; EDTA-Na₂ 0,02M; Ácido Bórico 0,089M (TBE). Para os fragmentos do DNA amplificados em PCR, 1% de agarose em 25ml de tampão TBE. As condições elétricas da corrida eletroforética foram de 100V e 20mA por aproximadamente 30min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de xilanase e de outras enzimas tem sido amplamente estudada há décadas. Em estudos anteriores, a palha de milho demonstrou aumentar a produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus ochraceus*, por isso o meio foi enriquecido com este substrato. A enzima obtida não foi amplamente estudada neste trabalho, algumas referências que se tem, inclusive da palha de milho, são de trabalhos anteriores, realizado pelo mesmo laboratório com as mesmas condições.

5.1 PURIFICAÇÃO DA XILANASE EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

Na coluna DEAE, a enzima xilanase não ficou presa na matriz como esperado, sendo eluída com o tampão de lavagem da coluna, encontrando-se nos tubos de ensaio ainda antes da passagem do NaCl. Na cromatografia de CM celulose observou-se a atividade xilanólítica na passagem de NaCl 100mM. O objetivo da primeira cromatografia foi de retirar proteínas que aderiram na DEAE. Na segunda, com CM-Celulose, foi de fracionar as proteínas aderidas através da diferença de força iônica. Obtendo-se uma fração parcialmente purificada de xilanase. A enzima parcialmente purificada será utilizada em futuros experimentos.

Li e colaboradores em 2010 obtiveram um único pico de xilanase após a passagem da amostra na coluna CM-Sepharose, obtendo uma proteína com alta pureza, entretanto eles realizaram precipitação como primeira etapa.

Sharma e colaboradores conseguiram purificar as duas xilanases com alta pureza. Observa-se que foram utilizados diversos processos para atingir este objetivo. Isto indica que é necessário a realização de mais etapas para uma purificação de alta qualidade de uma proteína.

5.2 SDS-PAGE E ZIMOGRAMA - ESTABELECIMENTO DESTE PROTOCOLO

Na figura 3 é mostrada a imagem do perfil de proteínas obtidas do fracionamento por SDS -PAGE em uma metade. Na outra metade, o revelado para o zimograma. Foi aplicada a amostra coletada com atividade xilanásica eluída com 100mM de NaCl. Foi possível observar que fração com a atividade xilanásica ainda não está homogênea, pois apresentou mais do que uma banda de proteína. Indicando que serão necessárias mais etapas de purificação.

A imagem do gel foi obtida através de um 'scanner' de géis (ImageScanner II GE-Health Care). A figura 4 mostra a imagem do zimograma, obtida com uma câmara fotográfica.

Com este trabalho, pode-se verificar que a purificação parcial que foi ensaiada poderá ser realizada através deste protocolo, podendo ser seguida as etapas de purificação por determinação da atividade xilanásica, quanto pelo gel SDS-PAGE e zimograma.

Por haver proteínas de alto peso molecular acima da fração com atividade xilanólítica, é possível sugerir uma etapa de fracionamento por peso molecular. Ou ainda, reproduzir o trabalho de Li e colaboradores (2010), onde anterior as etapas de cromatografia foi realizada uma precipitação de por sulfato de amônio. Eles obtiveram no SDS-PAGE e no zimograma apenas uma banda proteica de xilanase. A banda da xilanase do fungo *Streptomyces rameus* L2001 tinha peso molecular aproximado de 21 kDa.

Jiang e colaboradores em 2010, também purificaram de forma homogênea a xilanase produzida pelo fungo *Chaetomium sp.*, sendo possível observar apenas uma banda no SDS-PAGE de aproximadamente 25,1 kDa.

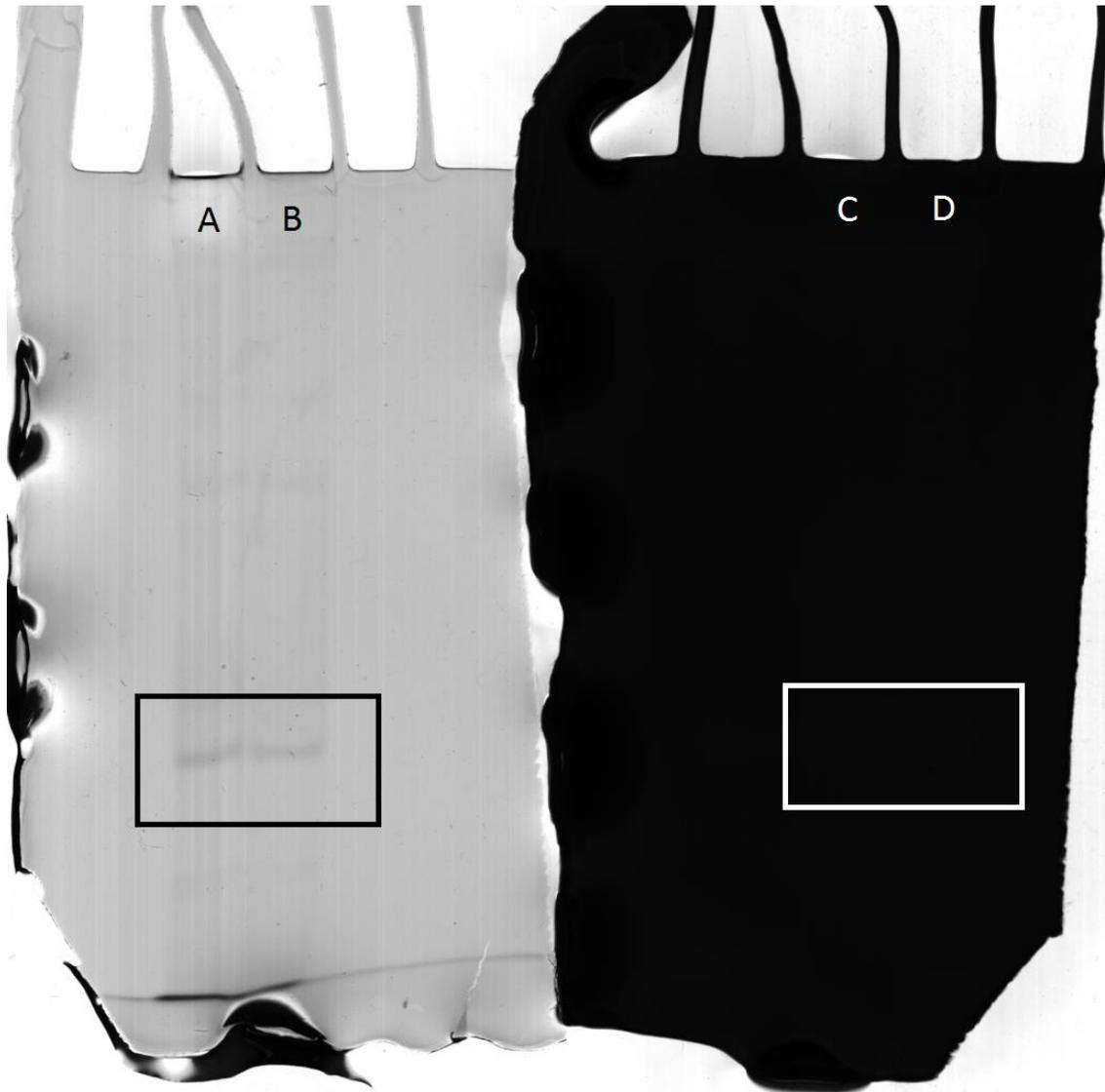


FIGURA 3: Gel de SDS-PAGE. Frações eluidas em NaCl 100mM. Em (A) e (B) amostras idênticas da metade do gel corado com Comassie-Blue. Em (C) e (D) amostras idênticas da metade do gel submetida ao zimograma com coloração com vermelho de congo..

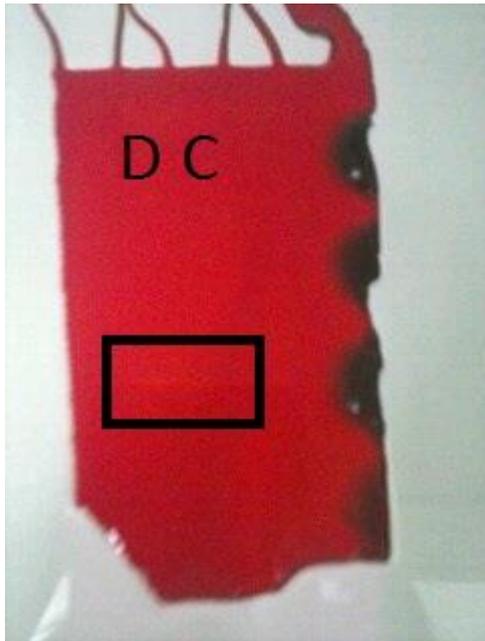


FIGURA 4: imagem colorida do zimograma. (D) e (C), são referências as mesmas amostras da figura 3

5.3 EXTRAÇÃO DO DNA MICELIAL

O DNA foi extraído com sucesso conforme mostra a Figura 5 onde é possível observar bandas de DNA coradas com brometo de etídio.

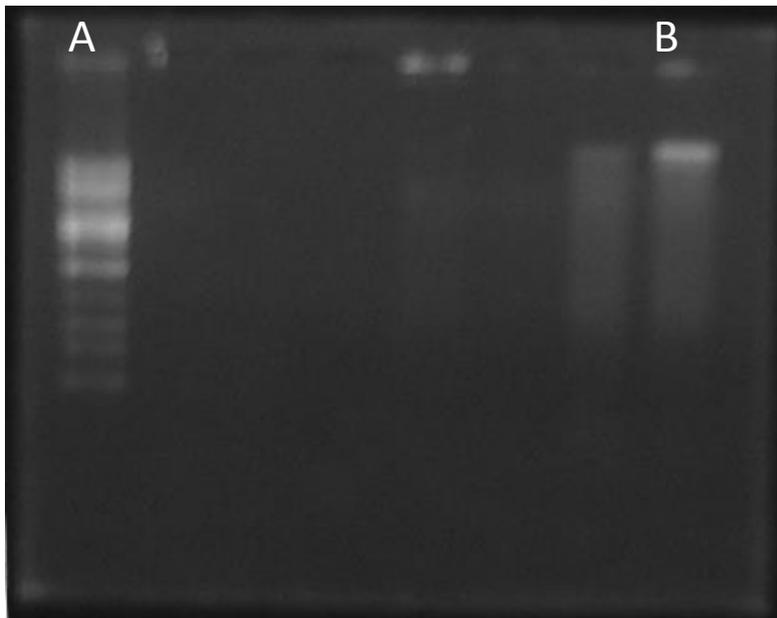


FIGURA 5. Perfil de eletroforese em gel de agarose à 0,7%. (A) padrão de peso molecular ladder de 100kb e (B) 5µl do DNA extraído de *Aspergillus ochraceus*.

5.4 PCR

O PCR foi realizado com sucesso e o resultado avaliado em eletroforese em gel de agarose a 1% Figura 6 está apresentado o gel com as bandas de DNA coradas com brometo de etídio.

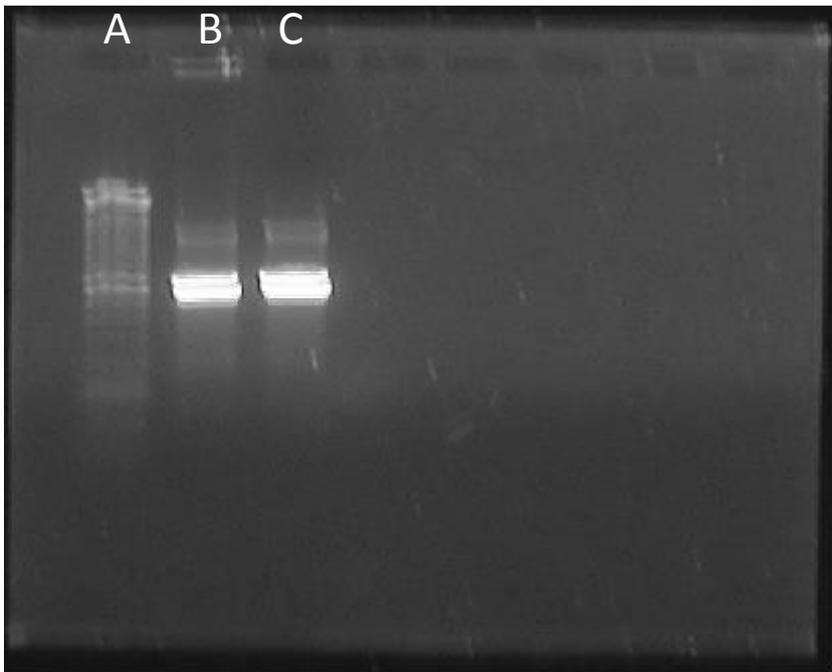


FIGURA 6. Perfil de eletroforese em agarose à 1%. Em (A) padrão de peso molecular ladder de 100kb e (B) e (C) com 5µl do PCR com os primers ITS 1 e ITS 4 para amplificação a partir do DNA de *Aspergillus ochaceus*.

A extração de DNA também foi executada com sucesso, o DNA não estava com tanta qualidade, mas isso não atrapalhou a reação de PCR. A reação de PCR ocorreu conforme o esperado, amplificando o gene de interesse com qualidade. Após esta etapa o material amplificado foi encaminhado para uma empresa de sequenciamento genético para identificação molecular do fungo

6. ANÁLISE CRÍTICA SOBRE O ESTÁGIO

O estágio no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Unioeste-Cascavel foi excelente. Foi possível realizar e aplicar várias técnicas bioquímicas fundamentais para os biotecnólogos, tais como: cromatografia líquida em coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida, PCR e etc.

Participar da implementação de uma metodologia como a do zimograma foi importante para desenvolver capacidade crítica.

Outras técnicas previamente conhecidas na Iniciação Científica como extração de DNA, utilização do espectrofotômetro e confecção de meios de cultura, puderam ser utilizadas para contribuir no estágio e ver suas aplicações em outros modelos experimentais. Iniciar o estágio trazendo conhecimento prático das técnicas citadas foi positivo, pois gerou maior confiança por parte do supervisor do estágio.

Entretanto o tempo foi insuficiente para alcançar todos os objetivos do projeto. Foi possível perceber que necessita de dedicação integral para este tipo de trabalho.

7. CONCLUSÕES

O protocolo usado para purificação da xilanase foi parcial, indicando ainda ser necessária mais uma etapa. Foi possível a implementação do protocolo do zimograma com as modificações. O protocolo de extração de DNA e PCR ensaiado foi bem sucedido, indicando que a identificação por sequenciamento para identificação do fungo será possível.

8 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A. M., FARIA, H. G., SOUZA, C. G. M., PERALTA, R. M. Aproveitamento de resíduos de laranja para a produção de enzimas lignocelulíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27(2), p. 364-368, abr.-jun., 2007.
- ALTERTHUM, Flávio; TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 456, 2004.
- BATAILLON, M.; CARDINALI, A. P.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 187-192, 2000.
- BIELY, P.; PULS J.; SCHNEIDER H. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. **FEBS Letters**, v. 186, p. 80-84, 1985.
- BOLLELA, V. R., SATO, D. N., FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Journal of Public Health**, Universidade Federal de São Paulo, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.
- BONATTO, A. M. **Otimização e caracterização da xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus alliaceus* em condições de fermentação submersa**. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, p. 42-45, Monografia, 2008.
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C; BALANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007.
- CARMONA, C. E.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, p. 311-315, 1998.
- CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 359-364, 2005.
- CHAVEZ, R., BULL, P., EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433. 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- CORDOBA, A. S., MENDONÇA M. M., ARAÚJO, E. F. Avaliação diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em três estádios de estabilização de dunas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 26, p. 931-937, 2002.

COSTA, J.A.V.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G. SANTOS, L., BERTOLIN, T. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 759-766, 2008.

DEGANI, A. L. G., CASS. Q. B., VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, maio, 1998.

DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, Bulgaria, v. 98, p. 2671-2678, 2007.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; LAN, C. H.; FANG, T. J. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. **Process Biochemistry**, Taiwan, v. 43, p. 49-55, 2008.

FAULET, B. M.; NIAMKÉ S.; GONNETY J. T.; KOUAMÉ L. P. Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 273-282, 2006.

FOLETTI, E. L., HOFFMANN R., HOFFMANN, R. S., PORTUGAL JR., U. L., JAHN, S. L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FUNGARO, M. H. L. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, p. 12-16, 2007.

GAROFALO L., VASQUEZ D., FERREIRA F., SOULE, S. Wheat flour non-starch polysaccharides and their effect on dough rheological properties. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1327-1331, 2011.

GATHORA, S. K., CHADHA, S. B., BADHAN, A. K., SAINI, H. S., BHAT, M. K. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. **Bioresources**, v. 1, p. 18-33, 2006.

GAWANDE P. V.; KAMAT M. Y. Purification of *Aspergillus* sp xylanase by precipitation with an anionic polymer Eudragit S100. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 577-580, 1999.

GE HEALTHCARE. Chromatofocusing with polybuffer and polybuffer exchangers. **Instructions 52-1586-00 AL, Chromatofocusing Media**. 2006.

GHOSE. T. K., BISARIA, V.S. Measurement of emicellulase activities. Part 1:Xylanases. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739-1752, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA C.; CARVALHEIRO F.; DUARTE L. C.; MARQUES S.; BOGEL-LUKASIK R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOULART, A. J.; CARMONA, E. C.; MONTI, R. Partial Purification and Properties of Cellulase-Free Alkaline Xylanase Produced by *Rhizopus stolonifer* in Solid-State Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil, v. 48, n. 3, p. 327-333, 2005.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE J. A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 42, p. 52-57, 2007.

HASS, H.; HERFURTH, E.; STOFFLER, G.; REDL, B. Purification characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 1117, n. 3, p. 279-286, 1992.

ISHIHARA, M., TAWATA, S., TOYAMA, S. Purification and some properties of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus strain HG-1. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 478-480, 1997.

JIANG, Z., CONG, Q., YAN, Q., KUMAR, N., DU. X. Characterization of a thermostable xylanase from *Chaetomium sp.* and its application on chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 120, p. 457-452, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-85,1970.

LI, X., SHE, Y., SUN, B., SONG, H., ZHU, Y., LV, Y., SONG, H. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable xylanase from *Streptomyces ramosus* L2001 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 71-78, 2010.

LIMA DA SILVA, J. P., VIANA, L. A. M., SOUZA, E. F., LIMA, I. S., FRAGA, M. E., OLIVEIRA, E. M. M. Caracterização molecular de fungos filamentosos da coleção de microrganismos de interesse da indústria de alimentos. **II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**, 2012.

LIAU, H., XU, C., TAN S., ZHONG, W., LING, N., YU, G., RAZA, W., ZHANG, R., SHEN, Q., XU, Y. Production and Characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117-124, 2012.

LIU, C.; HUANG, L.; CHANG, C.; SUNG, H. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. **Food Chemistry**. n. 96, p. 621-631, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, p. 424-426, 1959.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simoes, Wilson Roberto Navega Lodi. 3. Ed. Parte II, p. 89-115. São Paulo, 2002.

PELIZER, L. H., PONTIERI, M. H., MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology, Management & Innovation**, v. 2, i. 1, p. 118-127, 2007.

PETZOLD, K.; SCHWIKAL, K.; HEINZE, T. Carboxymethyl xylan – synthesis and detailed structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, Germany, v. 64, p. 292-298, 11 May 2006.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Brazil, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

SA PEREIRA, P., PAVEIA H. COSTA-FERREIRA, M., AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257-281. 2003.

SALAMA, M. A., ISHMAIL. K. M. I., AMANY, H. A., ABO. E.L., GEWEELY, N.S.I. Biochemical studies on purified extracellular xylanases from *Aspergillus versicolor*. **Internacional Journal of Botany**, v. 4(1), p. 41-48, 2008.

SAMBROOK & RUSSEL. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAVITHA, S., SADHASIVAN, S. SWAMINATHAN, K. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. **Biosource Technology**, v. 100, p. 883-889, 2009.

SHARMA, M., CHADHA, B. S., SAINI, H. S. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. **Biosource Technology**, v. 101, p. 8834-8842. 2010.

SILVA, C. H. C., PULS, J., SOUZA, M. V., FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Revista de Microbiologia*. v. 30, n. 2, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, V. B., SIVIERI K., CERON, C. R., SILVA, R., TRABUCO, E., LOMBARDI, F. R., GOMES, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21(6), p. 722-725, 1998.

TORRES, D. M., TEIXEIRA, A. S., RODRIGUES, P. B., BERTECHINI, A. G., FREITAS, R. T. F., SANTOS, E. C. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1401-1408, nov/dez, 2003.

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

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, The Netherlands, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.