

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MILENA MAYUMI YAMATSUKA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
XILANASES**

BAURU

2015

MILENA MAYUMI YAMATSUKA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
XILANASES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a Dr^a Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

BAURU

2015

Yamatsuka, Milena Mayumi

Y198b

Bioprospecção de fungos produtores de xilanases /
Milena Mayumi Yamatsuka. -- 2015.

36f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany M. de Queiroz-Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru –
SP.

1. Bioprospecção. 2. Lodo ativado. 3. Xilanase. I.
Yamatsuka, Milena Mayumi. II. Queiroz-Fernandes, Geisiany
Maria de. III. Título.

MILENA MAYUMI YAMATSUKA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE XILANASES

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a Dr^a Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Cynthia Barbosa Rustiguel
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

Bauru, 19 de novembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe e a meus avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me amparar nessa trajetória, me permitindo concluir esta importante etapa de minha vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, por todo o conhecimento transmitido, pela atenção, oportunidade, paciência e apoio para a realização deste trabalho.

À minha mãe e meus avós por todo o suporte e incentivo, pela confiança e por acreditar e tornar possível a realização desse sonho.

À todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica, por todo o conhecimento compartilhado.

À todos os meus amigos pela amizade e companheirismo, por todas as trocas de experiência e por todo o apoio e incentivo.

À Universidade do Sagrado Coração pelo curso de graduação e por toda a infra-estrutura oferecida que me permitiu alcançar formação acadêmica e o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

RESUMO

A bioprospecção permite conhecer e buscar, dentro da biodiversidade, produtos que possibilitem o desenvolvimento econômico e crescimento científico. Os micro-organismos são importantes fontes de bioprospecção devido à sua versatilidade metabólica, que permite a obtenção de produtos com valor comercial agregado e viáveis para o consumo, como antibióticos, quimioterápicos, antifúngicos e enzimas de interesse industrial. O sistema de lodo ativado é um processo utilizado no tratamento de resíduos industriais e caracteriza-se por uma associação de micro-organismos, que são capazes de degradar substâncias tóxicas com geração de um lodo ativado residual. No entanto, no decorrer desse processo esses micro-organismos podem sofrer alterações no próprio microambiente e em suas rotas bioquímicas, uma vez que, o contato com substâncias tóxicas podem favorecer mutações. Assim, o lodo ativado residual, configura uma atraente fonte de micro-organismos que podem apresentar capacidade de produzir enzimas de interesse biotecnológico, como as xilanases. O presente estudo teve como objetivo realizar bioprospecção de fungos produtores de xilanases em lodo ativado residual cedido por uma indústria de celulose do interior do Estado de São Paulo para um estudo anterior. Este foi coletado após o processo de tratamento contínuo dos efluentes ácido e alcalino gerados durante as etapas de branqueamento da celulose. O isolamento dos fungos foi realizado em estudo anterior, cujo objetivo foi realizar a bioprospecção de fungos produtores de amilase neste lodo ativado residual cedido pela indústria de celulose, utilizando o meio de cultura ágar Sabouraud com cloranfenicol. Os fungos isolados capazes de secretar a enzima de interesse foram selecionados para serem utilizados no presente estudo e identificados quanto ao gênero, correlacionando-se características de condições de crescimento, macroscópicas e microscópicas. A produção de xilanase e a quantificação da atividade xilanásica foram realizadas utilizando meio de cultura, condições de cultivo e de dosagem descritos em literatura científica. A bioprospecção em lodo ativado residual foi eficaz, visto que, as três linhagens fúngicas utilizadas foram capazes de produzir xilanase, apresentando os seguintes valores de atividade específica: linhagem 2: 27,25 U/mg, linhagem 3: 436, 7 U/mg e linhagem 5: 126,47, sendo a linhagem 3 a responsável pela produção mais efetiva de xilanase.

Palavras-chave: Bioprospecção. Lodo Ativado. Xilanase.

ABSTRACT

The bioprospecting permitted to know and to seek within the biodiversity, products that enable economic and scientific development. The microorganisms are important sources of bioprospecting because of their metabolic versatility which allows obtaining of products with value aggregate and viable for commercial consumption as antibiotics, chemotherapeutics, antifungal agents and enzymes of industrial interest. The activated sludge system is a process used in the treatment of industrial waste and characterized by a combination of microorganisms capable to degrade toxic substances with the generation of a activated waste sludge. However, during the process these microorganisms may change your microenvironment and their biochemical pathways, since the contact with toxic substances can favor mutations. Thus, the activated waste sludge set up an attractive source of microorganisms that may have the ability to produce enzymes of biotechnological interest, as the xylanases. Our aim conduct bioprospecting of fungi producers of xylanases in the activated waste sludge it was given by the pulp industry of São Paulo State to a previous study. The activated waste sludge it was collected after continuous treatment process of acid and alkaline wastewater generated during the pulp bleaching stages. The isolation of fungi was realized in previous study, whose goal was to carry out bioprospecting of fungi producers of amilase in this activated waste sludge given by the pulp industry, using the culture medium Sabouraud agar with chloramphenicol. The fungi isolated it was capable of secreting the enzyme of interest it was selected for use in this study and identified according to genus, correlating the characteristics macroscopic and microscopic and growth conditions. The production of xylanase and quantification of xylanase activity were performed using culture medium, cultivation conditions and dosing described in the scientific literature. The bioprospecting in activated waste sludge was effective, since the three fungal strains used were able to produce xylanase, with the following values of specific activity: strain 2: 27. 25 U/mg, strain 3: 436. 7 U/mg and strain 5: 126.47 U/mg. The strain 3 it was responsible for more effective production of xylanase.

Keywords: Bioprospecting, Activated Sludge, Xylanase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características macroscópicas do primeiro isolamento obtido do lodo ativado residual.	21
Figura 2 - Características macroscópicas dos fungos isolados do lodo ativado residual que apresentaram capacidade de produzir enzimas de interesse biotecnológico.	22
Figura 3 - Características microscópicas da linhagem fúngica 2, identificada como <i>Aspergillus</i> sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 1 indica o conidióforo, a seta 2: vesícula, seta 3: fiálides e seta 4: conídios.	23
Figura 4 - Característica microscópicas de um <i>Aspergillus</i> sp. em aumento de 40X.	23
Figura 5 - Características microscópicas da linhagem fúngica 3, identificada como <i>Aspergillus</i> sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 5 indica o conidióforo, a seta 6: vesícula, seta 7: fiálides e seta 8: conídios.	24
Figura 6 - Característica microscópicas de um <i>Aspergillus</i> sp. em aumento de 40X.	24
Figura 7 - Características microscópicas da linhagem fúngica 5, identificada como <i>Geotrichum</i> sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 9 indica uma hifa hialina septada e a seta 10 indica um artroconídio.	25
Figura 8 - Característica microscópicas de um <i>Geotrichum</i> sp., em aumento de 40X.	25
Figura 9 - Extrato bruto e biomassa obtidos após a produção enzimática.	26
Figura 10 - Biomassa obtida após a filtração a vácuo.	26
Figura 11 - Curva analítica de albumina de soro bovino.	28
Figura 12 - Curva analítica de xilose.	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 BIOPROSPECÇÃO EM LODO ATIVADO RESIDUAL.....	13
2.2 XILANASE.....	13
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 MATERIAIS.....	16
4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura	16
4.1.2 Equipamentos.....	16
4.2 METODOLOGIA.....	17
4.2.1 Obtenção do lodo ativado residual.....	17
4.2.2 Isolamento dos fungos do lodo ativado residual	17
4.2.3 Manutenção dos fungos isolados.....	17
4.2.4 Identificação do gênero dos fungos isolados.....	18
4.2.5 Obtenção de inóculo para a produção enzimática	18
4.2.6 Produção de xilanase.....	19
4.2.7 Recuperação da Enzima	19
4.2.8 Determinação do coeficiente de extinção molar	19
4.2.9 Determinação de peso úmido e peso seco.....	20
4.2.10 Determinação de proteínas e atividade de xilanase.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Bioprospecção consiste na busca, dentro de uma biodiversidade, por micro-organismos, genes e substâncias que tenham potencial econômico e que possam dar origem a novos produtos com fins comerciais. É exercida por uma grande variedade de setores como a indústria farmacêutica e de cosméticos, química, alimentícia, biotecnológica, sendo ainda utilizada em ramos da agricultura, engenharia, medicina e botânica (TORRES; VELHO, 2009; BEATTIE et al., 2011; ACHARY; CHAUDHARY, 2012; MELGAREJO, 2013).

O grande benefício da bioprospecção é a possibilidade de conhecer o potencial da biodiversidade, sendo uma prática que evita impactos drásticos sobre o meio ambiente, sobretudo quando exercida com cautela, além de possibilitar o desenvolvimento econômico e crescimento científico de uma determinada região ou país (BEATTIE et al., 2011).

A quantidade de micro-organismos existentes, aliada à sua versatilidade metabólica facilita seu crescimento sob diversas condições. Essas características tornam os micro-organismos lucrativos e inesgotáveis, sendo uma grande fonte de bioprospecção, permitindo a obtenção de produtos com valor comercial agregado e viáveis para consumo. A bioprospecção de micro-organismos produtores de antibióticos, quimioterápicos, antifúngicos, imunossupressores, agrotóxicos e produtos de interesse industrial é uma prática comum. Micro-organismos endófitos são habitantes de plantas superiores e produzem metabólitos de interesse para as áreas da medicina, industrial e agricultura, como exemplo, destacam-se estirpes de *Streptomyces* sp. extraídos da planta *Kennedia nigricans* que foram capazes de produzir antibióticos, e fungos *Taxomyces andreanae* extraídos da espécie vegetal *Taxus brevifolia* capazes de produzir o agente anti-cancerígeno paclitaxel (STROBEL; DAISY, 2003; AKONDI; LAKSHMI, 2013).

Bioprospecção também pode ser realizada na área genômica, seja na busca por novos genes ainda desconhecidos, mas que possam ter interesse comercial, ou ajudando na busca de funções biológicas ainda desconhecidas para uma abundância de dados genômicos ou metagenômicos já sequenciados (HICKS; PRATHER, 2014).

A bioprospecção marinha é outro exemplo que surge como alternativa devido à enorme diversidade microbiana e de organismos, ainda pouco explorados nesses

nichos. O que dificulta a exploração nessa área são as condições complicadas de coleta e o consequente manuseio destes materiais (REID et al., 2011; FELÍCIO et al., 2012; ABIDA et al., 2013).

Grande parte do potencial de bioprospecção mundial tem relação com o estudo de micro-organismos extremófilos, que são capazes de prosperar em condições adversas e extremas, e que podem ser utilizados em processos industriais. A bioprospecção em ambientes polares vem sendo realizada no intuito de se encontrar micro-organismos que se adaptam às temperaturas baixas. Porém, o ambiente polar não é o único que é foco de estudo de extremófilos, outros locais que apresentam condições opostas como nascentes termais, fontes hidrotermais também fazem parte destes estudos (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; PASCALE et al., 2012).

Uma variedade de micro-organismos são capazes de produzir compostos de armazenamento de energia e de carbonos intracelulares, conhecidos como polihidroxicanoatos (PHAs). Os polihidroxicanoatos são sintetizados por muitos micro-organismos em ambientes com disponibilidade de carbono e ausência de outros nutrientes essenciais. As células de micro-organismos com teor mais alto de polihidroxicanoatos podem ter um tempo de sobrevivência maior do que as com um teor inferior de PHAs, já que podem utilizar a sua reserva de forma mais longa e eficiente; por isso, o acúmulo de PHA pode prolongar o tempo de sobrevivências dos micro-organismos em ambientes extremófilos ou quando há pouca disponibilidade de nutrientes. Os micro-organismos extremófilos apresentam um grande potencial econômico em inúmeros processos industriais, já que se adaptam a temperaturas variáveis e a baixa disponibilidade de nutrientes, podendo oferecer vantagens para a produção de PHAs industrial, além de serem um recurso valioso para a exploração de novos processos biotecnológicos (CIESIELSKI, 2014).

O sistema de lodo ativado é um processo utilizado no tratamento de águas residuárias, efluentes ou esgotos e tem sido amplamente empregado para o tratamento de resíduos industriais, sendo vantajoso economicamente e operacionalmente. No Brasil, o lodo ativado geralmente é fornecido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Este sistema caracteriza-se por uma associação de micro-organismos, composta em sua maioria por bactérias e fungos, que são mediadores de um processo baseado na oxidação de compostos

inorgânicos e orgânicos presentes nos resíduos, degradando-se substâncias tóxicas com geração de um lodo ativado residual (LOPES et al., 2005; BRASIL, 2014).

Os micro-organismos encontrados mais frequentemente neste lodo são bactérias dos gêneros *Achromobacterium*, *Chromobacterium* e *Pseudomonas*; e fungos do gênero *Geotrichum*. No entanto, sabe-se que, no decorrer do processo de tratamento de efluentes, esses micro-organismos podem apresentar variações sejam devido a alterações do próprio microambiente, com o surgimento de espécies diferentes, ou devido à possibilidade de ocorrerem alterações nas rotas bioquímicas dos micro-organismos presentes ao degradar substâncias tóxicas, uma vez que, o contato com estas podem favorecer mutações que levarão a uma versatilidade metabólica interessante. Essas características tornam o lodo ativado residual, cujo destino final em parte é o emprego como biofertilizante e em outra parte é incinerado gerando poluentes que são lançados ao ar, uma atraente fonte de micro-organismos que podem apresentar capacidade de produzir enzimas de interesse biotecnológico (BENTO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; BRASIL, 2014).

As leveduras também podem ser encontradas no sistema de lodo ativado residual, elas são vantajosas no tratamento de águas residuais de fermentação e de águas residuais da fabricação de papel, em função de sua elevada resistência ao baixo pH, salinidade elevada, e à sua alta demanda química de oxigênio, podendo sobreviver também em um sistema de lodo ativado, principalmente nos que estão em execução por longo tempo. Os sistemas de tratamento de águas residuais possuem diversas espécies de leveduras, apesar de representarem apenas uma pequena parcela dos micro-organismos presentes no lodo ativado, o que justifica a pouca atenção dada à elas nesses sistemas. Muitas espécies de leveduras são encontradas em específicas estações de tratamento de águas residuais, resultando na formação de comunidades características em função do tipo de efluente processado e pelo tipo de processo de tratamento, evidenciando que de acordo com cada sistema de tratamento de águas residuais, as populações de leveduras possuem diferentes funções. As leveduras também são capazes de produzir enzimas de interesse industrial, que possuem papel importante na degradação de poluentes no tratamento de águas residuais (YANG et al., 2013).

Enzimas são catalisadores de origem biológica, bioquimicamente, classificadas como proteínas, possuem a vantagem de serem mais reativas quando comparadas a catalisadores comuns, além de apresentarem alta especificidade.

Possuem grande importância e são cada vez mais utilizadas por diferentes segmentos industriais como por indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrícolas, dentre tantas outras. Representam um mercado em crescimento ascendente em função do desenvolvimento cada vez maior de novas tecnologias e a busca por novos campos de aplicação (BON et al., 2008; REINEHR et al., 2014).

Em função dos avanços na área biotecnológica e de fatores ambientais, muitos processos químicos realizados em indústrias têm sido substituídos por enzimáticos. O fato de as enzimas serem obtidas de inúmeras fontes, como plantas e micro-organismos, caracteriza uma vantagem e facilidade de seu uso. A obtenção de enzimas proveniente dos micro-organismos é interessante sendo esta, atualmente, a fonte mais empregada para a produção de enzimas comerciais, por serem mais estáveis do que as provenientes de outras fontes. Micro-organismos não necessitam de condições exigentes de crescimento e podem ser cultivados em grandes quantidades e por um curto intervalo de tempo, produzindo numerosa quantidade de produtos enzimáticos de interesse (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012).

As xilanases (EC 3.2.1.8) são um grupo importante de enzimas industriais responsáveis pela hidrólise da xilana, são glicosil hidrolases que catalisam a hidrólise aleatória de ligações β - 1,4-glicosídicas na xilana; as ligações escolhidas para a hidrólise dependem da natureza da molécula de substrato, ou seja, do comprimento da cadeia, o grau de ramificação, e a presença de substituintes. A xilana é um substrato da xilanase e é a principal e mais comum hemicelulose em paredes celulares de plantas e o segundo mais abundante polissacarídeo de ocorrência na natureza.

Xilanases são geralmente enzimas induzíveis secretadas em meios contendo xilana puro ou resíduos ricos em xilana, são produzidas geralmente por fungos, leveduras e bactérias, mas a principal fonte de xilanases comerciais são os fungos filamentosos. São amplamente empregadas em indústrias de celulose e papel para o processo de bi branqueamento; na indústria alimentar, podendo ser utilizada na fabricação de pão, e na clarificação de sucos de fruta e vinho; indústria têxtil; na produção de etanol; é usada como aditivo na alimentação dos animais e também utilizada em indústrias de tratamento de resíduos (BEG et al., 2001; BOCCHINI et al., 2002; COLLINS et al., 2004; BISWAS et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOPROSPECÇÃO EM LODO ATIVADO RESIDUAL

A bioprospecção é responsável pelo descobrimento e comercialização de novos compostos, como por exemplo, as enzimas, que vêm sendo introduzidas como forma de substituição em diferentes processos químicos em variadas indústrias como a alimentícia, têxtil, de papel e celulose. As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, sendo os micro-organismos uma fonte bastante atraente e amplamente utilizada, especialmente, por estes representarem uma fonte inesgotável e de fácil crescimento, além da facilidade de tempo para sua obtenção, as condições mínimas de armazenamento exigidas e sua estabilidade que possibilita a produção de inúmeras substâncias, que podem dar origem a produtos de expressivo valor comercial e de grande interesse para o consumo (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; AKONDI e LAKSHMI, 2013; HICKS e PRATHER, 2014; VESTER et al., 2015).

Lodo ativado é um sistema de tratamento biológico de esgoto aeróbio e fermentativo de alta eficiência responsável pela retirada de poluentes orgânicos das águas residuárias e esgoto. O princípio do sistema consiste na oxidação bioquímica dos compostos orgânicos e inorgânicos mediada por uma variedade de micro-organismos, como bactérias e fungos; gerando um lodo ativado residual. Os micro-organismos isolados desse lodo podem representar fontes importantes de bioprospecção, como por exemplo, para a produção de compostos de alto valor comercial como as enzimas (BENTO et al., 2005).

2.2 XILANASE

As enzimas são proteínas responsáveis por catalisar inúmeras reações químicas, realizando a conversão de substratos em produtos. São catalisadores extremamente seletivos que ajudam a acelerar a velocidade e a especificidade das reações, utilizando menor quantidade de energia (HUANG et al., 2013; GURUNG et al., 2013)

Em função de sua seletividade e sua eficácia como catalisador, as enzimas vêm sendo muito utilizada para fins industriais e terapêuticos. São fundamentais e altamente empregadas em processos biotecnológicos em indústrias farmacêuticas,

têxteis, de alimentos e bebidas, materiais de limpeza e produtos de papel. O uso de enzimas microbianas vem adquirindo grande destaque devido à uma série de fatores como: maior atividade catalítica, grande versatilidade, estabilidade, é altamente rentável e é acessível economicamente. Enzimas de fontes fúngicas têm ganhado cada vez mais destaque pela possibilidade de produção de uma maior variedade, além do menor custo (GURUNG et al., 2013; LIN et al., 2013; NIRMAL; LAXMAN, 2014; SMANIOTTO et al., 2014).

As xilanases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana, que é o principal componente da hemicelulose nas paredes celulares das plantas, provocando uma redução no grau de polimerização do substrato. As enzimas xilanolíticas têm atraído grande atenção devido ao seu potencial biotecnológico em vários processos industriais, como indústrias de papel e celulose, indústrias de alimentos, alimentos para animais, combustível, indústria têxtil e em indústrias de tratamento de resíduos. Devido a variedade de enzimas xilanolíticas existentes, os micro-organismos são capazes de produzir vários tipos de xilanases, que podem possuir diferentes propriedades físico-químicas, mecanismo de ação, estruturas, especificidade de substrato, rendimento e atividades específicas, o que aumenta a eficiência e a diversidade de enzimas.

A grande maioria da xilanase comercial é produzida pelo processo de fermentação microbiana. Elas podem ser produzidas por fungos, leveduras e bactérias, mas a principal fonte de xilanases comerciais são os fungos filamentosos, porque são mais interessantes industrialmente, devido ao fato de elas secretarem níveis de enzimas xilanolíticas muito mais elevados. A grande maioria das xilanases são excretadas para o meio extracelular devido ao grande tamanho do substrato que impede a sua penetração na célula. Alguns parâmetros que podem influenciar durante a produção de xilanase são o pH, a temperatura, a concentração do substrato, fontes nutricionais e o tempo de cultivo (COLLINS et al., 2004; POLIZELI et al., 2005; BAE et al., 2008; BISWAS et al., 2010; SANTOS; ISHII, 2011; GUIMARAES et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo realizar bioprospecção de fungos produtores de xilanases em lodo ativado residual cedido por uma indústria de celulose do interior do Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o lodo ativado residual;
- Isolar fungos do lodo ativado residual;
- Promover o crescimento e manutenção das linhagens fúngicas isoladas;
- Identificar o gênero dos fungos isolados;
- Produzir xilanase a partir dessas linhagens fúngicas;
- Obter o peso de biomassa úmida e seca;
- Determinar a concentração de proteínas totais no extrato bruto enzimático;
- Determinar a atividade de xilanase no extrato bruto enzimático;
- Calcular a atividade específica da xilanase produzida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol (SDA+C) - Acumedia

Cloreto de potássio (KCl) - CAAL

Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4$) - Dinâmica

Fosfato de amônio $[(NH_4)_2 HPO_4]$ - Reagen

Fosfato monossódico (NaH_2PO_4) - Reagen

Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2$) - Vetec

Sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4$) - Nuclear

Sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4$) - Dinâmica

Xilana - Sigma-Aldrich

Reagente de Bradford - Sigma-Aldrich

Ácido 3,5 dinitrosalicílico - Vetec

Hidróxido de sódio - Dinâmica

Tartarato de sódio e potássio - Neon

Metabissulfito de sódio - Reagen

Fenol - Dinâmica

4.1.2 Equipamentos

Balança - Marte

Autoclave vertical - Phoenix

Fluxo Laminar - VECO

Estufa micológica - Fanem

Estufa microbiológica - Fanem

pHmetro - Gehaka

Banho Maria - FANEM

Banho de aquecimento - Fisatom

Shaker - Tecnal TE 420

Bomba de vácuo - Primatec

Microscópio - Nikon E 100

Espectrofotômetro - BEL

Câmara de Neubauer - Precicolor

Vidrarias

Pipetas de volume variável

Ponteiras

Tubos Falcon

Espátulas

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Obtenção do lodo ativado residual

O lodo ativado residual foi cedido por uma indústria de celulose do Estado de São Paulo, sendo que esse foi coletado após o processo de tratamento contínuo dos efluentes ácido e alcalino formados durante as etapas de branqueamento da celulose no segundo semestre de 2014.

4.2.2 Isolamento dos fungos do lodo ativado residual

O isolamento dos fungos foi realizado em estudo anterior (ANGÉLICO, 2014). Para tal, foi utilizado o meio de cultura Ágar Sabouraud com cloranfenicol (SDA+C), que foi preparado segundo as orientações do fabricante, esterilizados em autoclave a 121 °C e vertido em placas de Petri de 25 mm.

O lodo ativado residual foi pesado e diluído em água destilada previamente esterilizada (diluição 1:10; 1:100 e 1:1000), homogeneizado e transferido para placas de Petri contendo o meio SDA+C e com o auxílio de alça de Drigalski espalhado sobre o meio. As placas foram incubadas a 28 °C por cerca de 7 dias. Após o período de incubação as colônias foram isoladas com auxílio de agulha em tubos contendo o meio SDA+C. Todos os procedimentos foram realizados em zona asséptica, utilizando a capela de segurança biológica e bico de Bunsen.

4.2.3 Manutenção dos fungos isolados

A manutenção destes fungos foi realizada em meio de cultura Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SDA+C) a 28°C com repiques quinzenais.

4.2.4 Identificação do gênero dos fungos isolados

Os fungos isolados em estudo anterior e que apresentaram melhor capacidade de secretar amilase anteriormente, foram identificados no presente estudo correlacionando-se características de condições de crescimento, macroscópicas e as microscópicas, pela observação da presença de estruturas típicas de cada gênero como: hifas, pseudohifas, blastoconídios, micro e macroconídios. Através de microscopia óptica pela realização da técnica de microcultivo (ANVISA, 2014).

A técnica de microcultivo foi realizada utilizando-se lâminas colocadas sobre suportes metálicos, e contidas em placas de Petri esterilizadas. Em seguida, foram colocados cubos de ágar PDA (Ágar batata). Os fungos foram semeados nos quatro lados do bloco de ágar, que posteriormente foi recoberto com lamínulas esterilizadas. Montou-se uma câmara úmida, embebendo de água destilada um pequeno algodão esterilizado para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. As placas foram tampadas e incubadas a 28° C por 7 dias (ANVISA, 2004).

Após esse período, adicionou-se 1 mL de formol ao algodão para inativar a esporulação e auxiliar na fixação das estruturas microscópicas. As lamínulas e lâminas foram retiradas cuidadosamente, uma vez que nelas estavam aderidas as hifas e conídios dos fungos, pingou-se uma gota do corante azul de lactofenol ou azul de algodão ("Cotton Blue") observou-se em microscópio óptico nos aumentos 40 e 100 todas as estruturas fúngicas formadas (ANVISA, 2004). Comparou-se todas as características com o atlas Koneman, Diagnóstico Microbiológico (KONEMAN et al.,2008).

4.2.5 Obtenção de inóculo para a produção enzimática

Para obtenção dos inóculos utilizados em todas as produções enzimáticas, os fungos 2, 3 e 5 obtidos no estudo "Bioprospecção de Fungos Produtores de Amilase" (ANGÉLICO, 2014), foram cultivados a 28° C por 7 dias e as células foram ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração 10^7 célula/mL.

4.2.6 Produção de xilanase

A xilanase foi obtida através de fermentação líquida submersa (SmF) em erlenmeyers de 125 mL e volume de meio de 50 mL, em agitador orbital.

O meio de cultura e as condições de cultivo utilizados foram os descritos por Nair et al. (2008), constituído de KCl 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂HPO₄ 2,5; NaH₂PO₄ 0,5; CaCl₂.2H₂O 0,01; FeSO₄.7H₂O 0,01; ZnSO₄.7H₂O 0,002 e xilana 0,5 (g.L⁻¹) dissolvidos em 1 L de água. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,0, com ácido e/ou base fraca; foi incubado durante 7 dias com agitação na velocidade de 100 rpm e temperatura de 30°C. A produção enzimática foi realizada em duplicata.

4.2.7 Recuperação da Enzima

Após a produção, o extrato enzimático foi filtrado à vácuo em papel de filtro de 0,45 µm para retirada da biomassa. Foram avaliados o peso úmido da biomassa produzida e o peso seco após secagem em estufa. O filtrado foi armazenado a -20°C para posteriores análises.

4.2.8 Determinação do coeficiente de extinção molar

As determinações da concentração de proteínas e de atividade xilanásica foram fundamentadas em soluções-padrão específicas. Para a determinação da concentração de proteínas foi empregada uma solução de albumina de soro bovino, em concentrações que variaram de 0,1 a 2mg/mL, e para a determinação da atividade xilanásica empregou-se solução-padrão de xilose com concentrações que variam de 100 a 700µg/mL. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra (µmols/mL) foi traçado, determinando-se o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A = Absorbância, ϵ = absorvidade, b = caminho óptico (1 cm) e c = concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por µmols. µL⁻¹. cm⁻¹.

4.2.9 Determinação de peso úmido e peso seco

Após a etapa de filtração do extrato enzimático em papel de filtro, a biomassa foi separada e pesada logo em seguida, determinando o peso da biomassa úmida. Depois de pesada, incubou-se a biomassa em estufa a 37°C para secagem e posteriormente seu peso foi novamente determinado até atingir peso constante determinando-se assim o peso da biomassa seca.

4.2.10 Determinação de proteínas e atividade de xilanase

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford empregando-se uma curva analítica contendo albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

A quantificação da atividade enzimática foi realizada segundo método descrito por Nair et al. (2008), utilizando xilana como substrato: uma solução de 900 µL de 1% (m/v) xilana (preparado em tampão de citrato de sódio 50mM e pH 5,3) foi misturada a 100 µL do extrato bruto enzimático e incubada a 50°C durante 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e os conteúdos foram fervidos durante 5 minutos. Após resfriamento, foi realizada leitura a 540 nm contra o branco que foi preparado conforme a reação da amostra, com exceção da adição do extrato bruto, por ter sido realizada somente após a desnaturação prévia durante 15 minutos. A quantidade de açúcares redutores liberados foi quantificada utilizando xilose como padrão. Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância (540 nm)} \times \text{vol. ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de xilose por minuto conforme as condições experimentais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas dez diferentes espécies de fungos do lodo ativado residual como representado na Figura 1, porém em estudos anteriores verificou-se que apenas cinco eram capazes de produzir enzimas de interesse (ANGÉLICO, 2014), e destas cinco linhagens, as três que foram capazes de produzir enzimas com os melhores resultados de atividade específica foram selecionadas para este estudo, diante disso, neste estudo foram utilizadas somente as linhagens 2,3 e 5.

Como observado na Figura 2, as características macroscópicas das três linhagens fúngicas utilizadas no presente estudo apresentaram aspectos filamentosos e leveduriformes, sendo assim, as linhagens fúngicas 2 e 3 possuíam aspecto filamentoso, já a linhagem 5 apresentou aspecto leveduriforme.



Figura 1 - Características macroscópicas do primeiro isolamento obtido do lodo ativado residual.

Fonte: Angélico (2014).

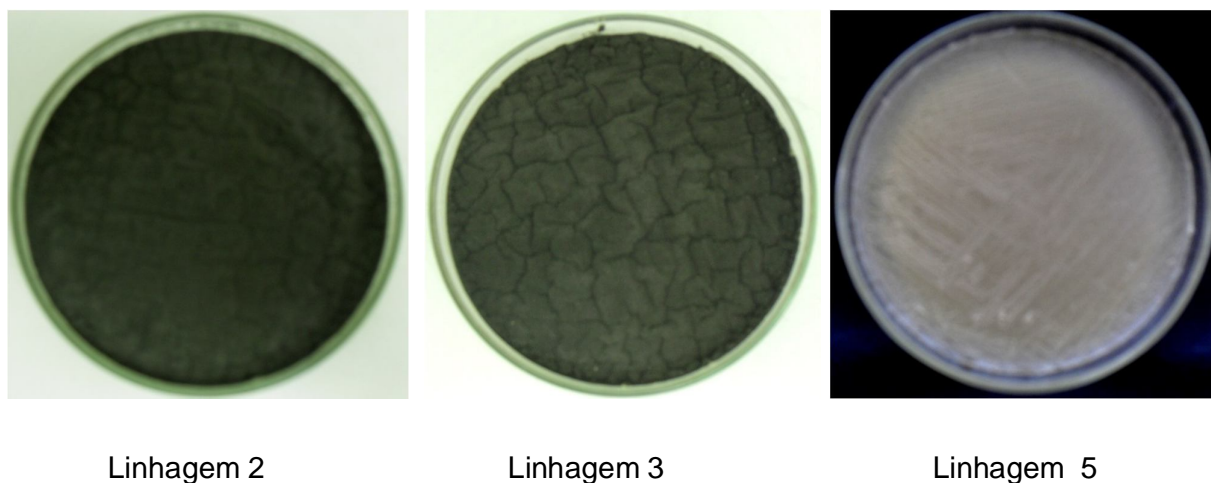


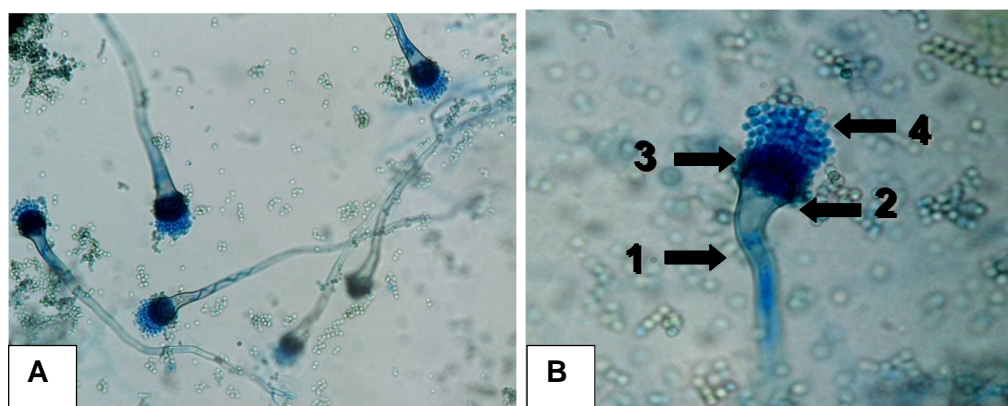
Figura 2 - Características macroscópicas dos fungos isolados do lodo ativado residual que apresentaram capacidade de produzir enzimas de interesse biotecnológico.
 Fonte: Elaborada pela autora.

As espécies de *Aspergillus*, microscopicamente, são caracterizadas pela produção de hifas septadas hialinas, que possuem um segmento que é capaz de dar origem a um conidióforo. Os conidióforos terminam em uma vesícula na qual está presente uma ou duas camadas de fiálides que dão origem a cadeias de conídios esféricos e pigmentados. A análise das características de todas essas estruturas é indispensável para a identificação das espécies (SIDRIM; MOREIRA, 1999; KONEMAN et al., 2008)

O gênero *Geotrichum* apresenta colônias de crescimento rápido, secas e com tonalidade branca ou branco-amarelada. Microscopicamente, apresentam hifas hialinas ramificadas e possuem grande quantidade de arthroconídios, que são formados através da fragmentação das hifas e possuem formato retangular. A análise das características dessas estruturas também é determinante para a identificação das espécies (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

As características microscópicas obtidas por meio do microcultivo dessas diferentes espécies podem ser observadas nas Figuras 3, 5 e 7. As setas presentes na Figura 3 e 5, representam respectivamente: seta 1 e 5: conidióforo, seta 2 e 6: vesícula, seta 3 e 7: fiálides e seta 4 e 8: conídios, que são estruturas características do gênero *Aspergillus*. Já as setas presentes na Figura 7 representam: seta 9: hifa hialina segmentada e seta 10: arthroconídios, que são estruturas características do gênero *Geotrichum*.

A partir da observação das características microscópicas e comparação com o atlas Koneman, Diagnóstico Microbiológico (KONEMAN et al., 2008), aliado a comparação das características macroscópicas pode-se concluir que as linhagens 2 e 3 pertencem ao gênero *Aspergillus* sp. e que a linhagem 5 pertence ao gênero *Geotrichum* sp. As figuras 4, 6 e 8 são imagens comparativas de *Aspergillus* sp. e *Geotrichum* sp. obtidas do Atlas de Micologia Médica da ControlLab (Controle de Qualidade para Laboratórios)



Linhagem 2

Figura 3 - Características microscópicas da linhagem fúngica 2, identificada como *Aspergillus* sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 1 indica o conidióforo, a seta 2: vesícula, seta 3: fiálides e seta 4: conídios.

Fonte: Elaborada pela autora.

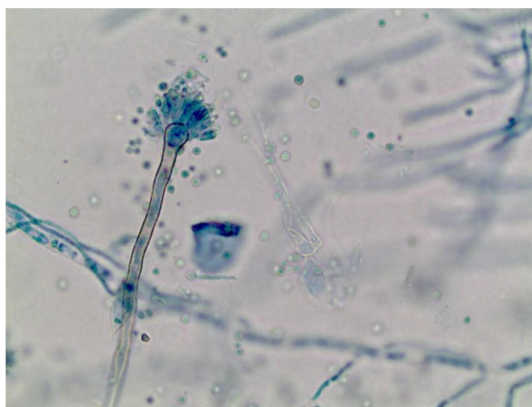
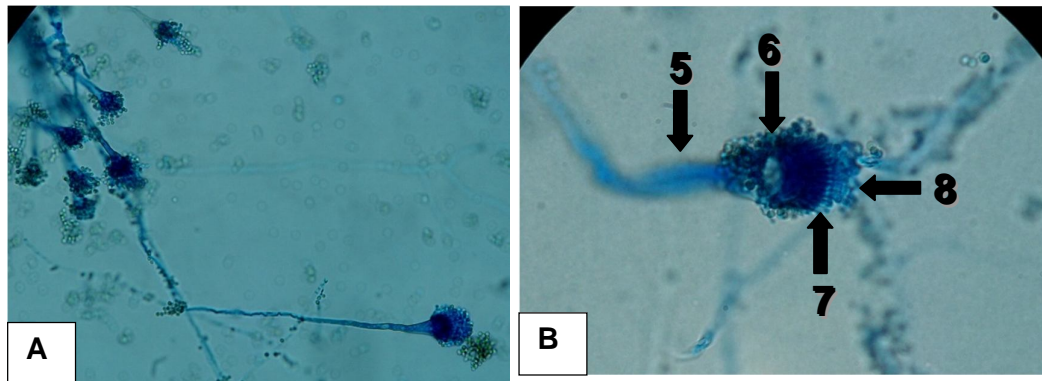


Figura 4 - Característica microscópicas de um *Aspergillus* sp. em aumento de 40X.

Fonte: ControlLab, 2013



Linhagem 3

Figura 5 - Características microscópicas da linhagem fúngica 3, identificada como *Aspergillus* sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 5 indica o conidióforo, a seta 6: vesícula, seta 7: fiálides e seta 8: conídios.
Fonte: Elaborada pela autora.

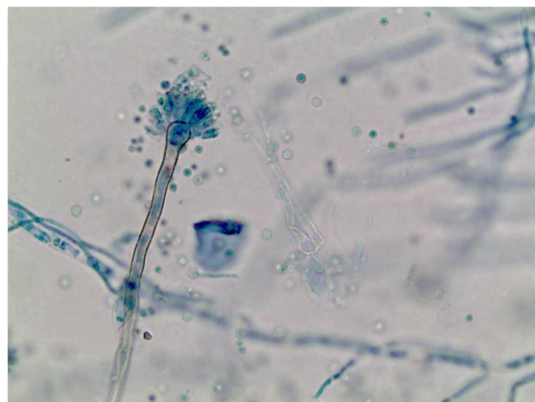
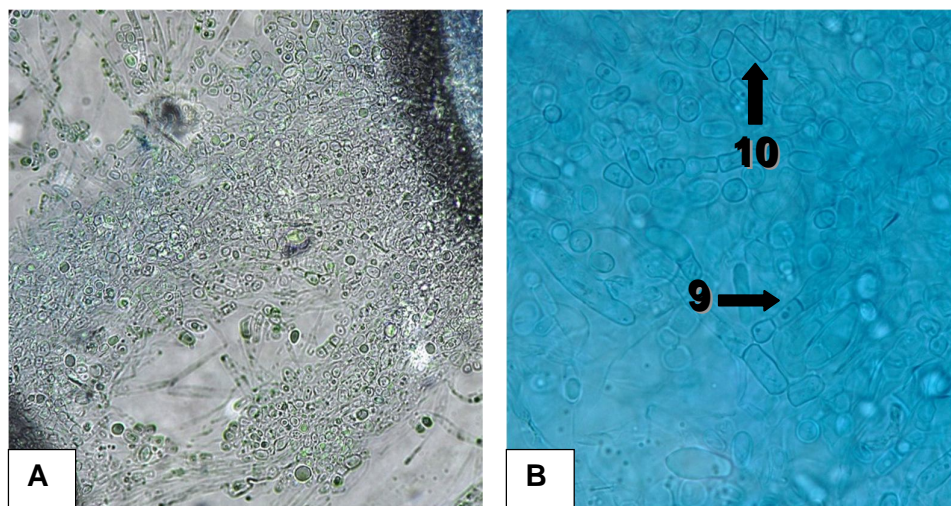


Figura 6 - Característica microscópicas de um *Aspergillus* sp. em aumento de 40X.

Fonte: ControlLab, 2013.



Linhagem 5

Figura 7 - Características microscópicas da linhagem fúngica 5, identificada como *Geotrichum* sp. Em A: microscopia óptica em aumento de 40X. Em B: microscopia óptica em aumento de 100X. Em B, pode-se observar que a seta 9 indica uma hifa hialina septada e a seta 10 indica um arthroconídio.

Fonte: Elaborada pela autora.

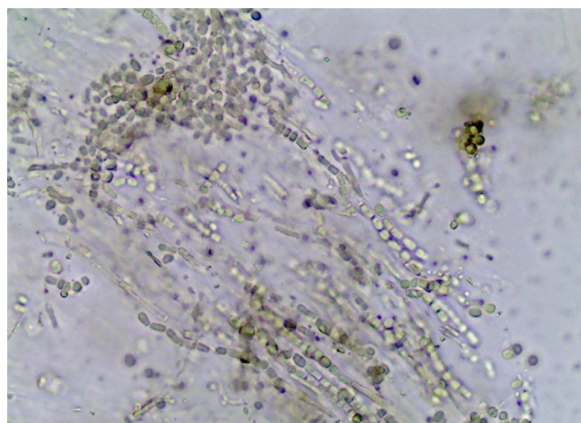


Figura 8 - Característica microscópicas de um *Geotrichum* sp., em aumento de 40X.

Fonte: ControlLab, 2013.

Após as etapas de identificação e o período de incubação das produções enzimáticas obteve-se o extrato bruto e a biomassa que foram separados por filtragem à vácuo e podem ser observados na Figura 9.

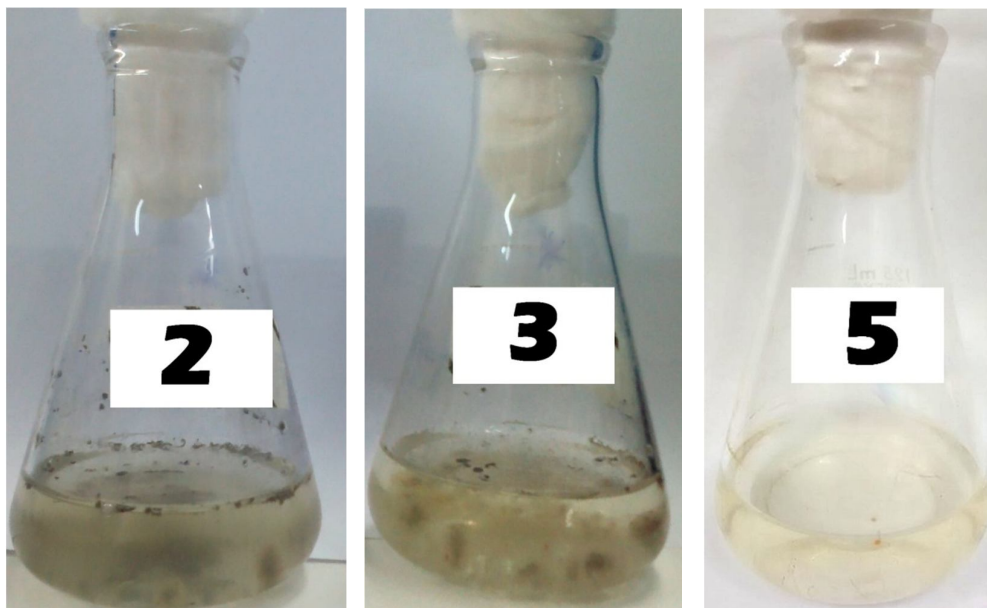


Figura 9 - Extrato bruto e biomassa obtidos após a produção enzimática.
Fonte: Elaborada pela autora.

Finalizado o processo de filtragem a vácuo, foram obtidas as biomassas em papéis de filtro que podem ser observadas na Figura 10. Os valores obtidos da pesagem das biomassas úmidas e secas das três linhagens fúngicas estão apresentados na Tabela 1.

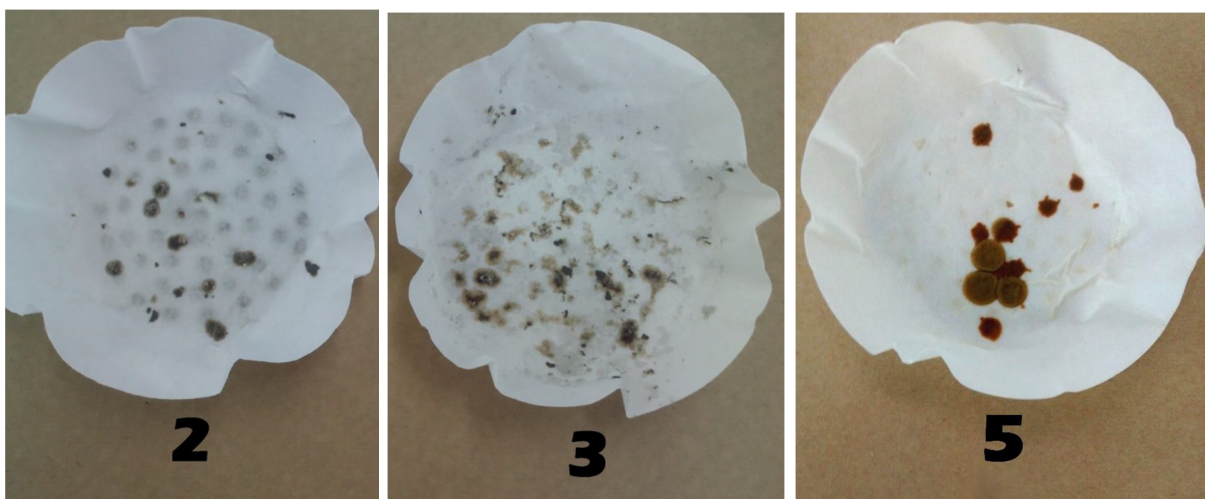


Figura 10 - Biomassa obtida após a filtragem a vácuo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1: Peso úmido e seco de biomassa das três linhagens fúngicas obtidos após o processo de filtração.

Fungos	Biomassa Úmida (g)	Biomassa Seca (g)
2	1,9231	0,0245
3	2,0087	0,0173
5	1,52	0,03

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se pela observação dos dados da Tabela 1 que a linhagem 3 foi a que produziu maior biomassa úmida, porém, após a evaporação da água, a linhagem 5 foi a que apresentou maior peso de biomassa seca.

Após a filtração das produções e a pesagem das biomassas, foi realizada a leitura das absorbâncias e os cálculos para a determinação da concentração de proteínas totais, atividade xilanásica e atividade específica.

Para a realização dos cálculos para a determinação da concentração de proteínas totais e da atividade xilanásica foi necessária a obtenção dos valores dos coeficientes de extinção molar, e para isso foi preciso realizar a confecção das curvas analíticas utilizando soluções padrões específicas como pode-se observar na Figura 11 e na Figura 12.

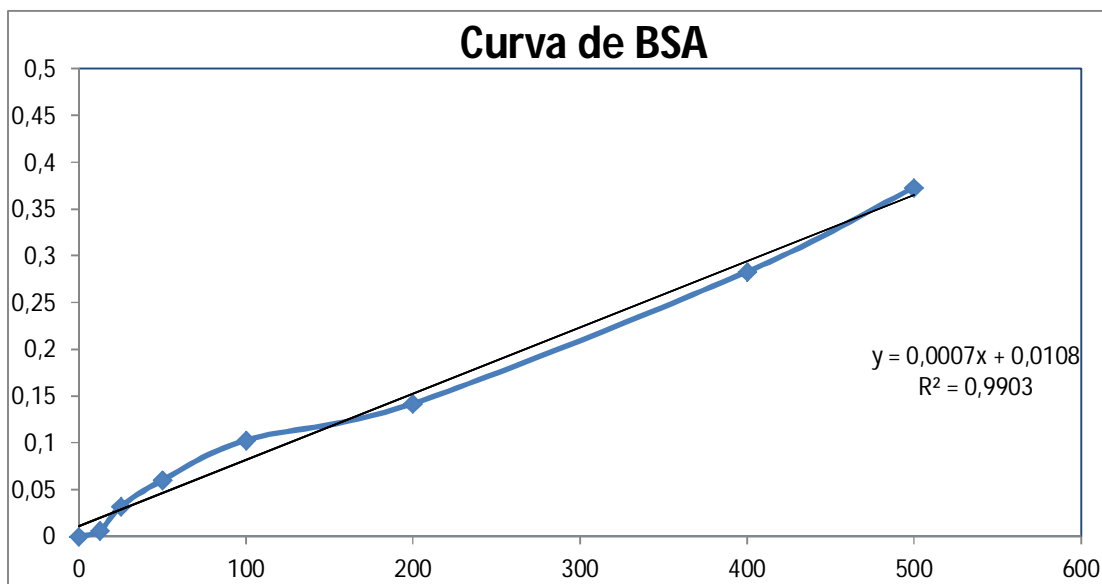


Figura 11 - Curva analítica de albumina de soro bovino.
Fonte: Elaborado pela autora.

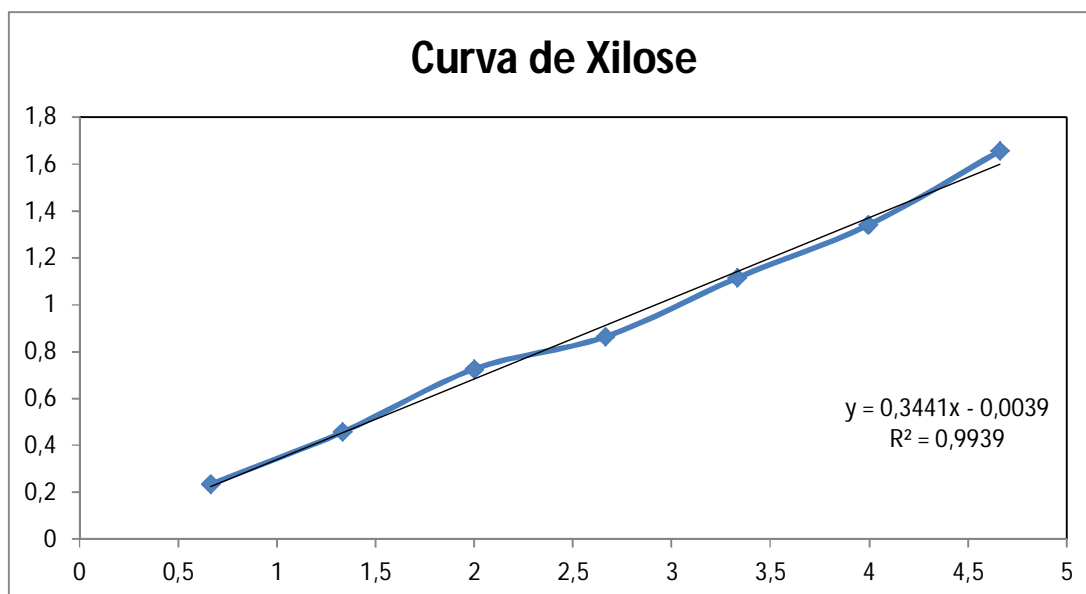


Figura 12 - Curva analítica de xilose.
Fonte: Elaborado pela autora.

O coeficiente de extinção molar obtido através da curva analítica de albumina de soro bovino observada na Figura 11 para a determinação da concentração de proteínas totais foi igual a $\epsilon = 0,0007$. Já o coeficiente de extinção molar obtido através da curva analítica de xilose observada na Figura 12 para a determinação da concentração de atividade xilanásica foi igual a $\epsilon = 0,3441$.

A concentração de proteínas totais pelo método de Bradford foi calculada utilizando a curva analítica obtida através dos valores de absorvância de soluções de concentrações conhecidas. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a velocidade de formação do produto, e é influenciada por fatores como a variação de temperatura, pH do meio, presença de inibidores enzimáticos e a concentração de enzima e substrato. A atividade específica foi obtida em razão da atividade da enzima e o teor de proteína totais (GUEDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; MORAES et al., 2013). Os resultados obtidos através do cálculo das médias das duplicatas realizadas podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração de proteínas totais, atividade xilanásica e atividade específica calculados a partir da média das duplicatas da produção enzimática obtida de três linhagens fúngicas isoladas de lodo ativado residual.

Fungos	Concentração de Proteínas (mg/mL)	Atividade Xilanásica (U/min/mL)	Atividade Específica (U/mg)
2	0,09	2,5	27,25±3,04
3	0,02	10,64	436,7±43,6
5	0,06	7,43	126,47±42,1

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados observados na Tabela 2, a linhagem 3 foi a que mostrou maior atividade específica, igual a 436,7 U/mg, apresentando um bom resultado que pode ser aperfeiçoado através de etapas de purificação.

Segundo Shah e Madamwar (2005), cujo estudo abordou a produção de xilanase por fermentação submersa a partir do isolamento da espécie *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 obtida da decomposição de resíduos agrícolas e cultivada em meio nutritivo em distintas análises com diferentes tipos de substratos, utilizando pH

5,0 à 30°C e 180 rpm, obteve a mais efetiva produção de xilanase, com valor igual a 80,5 U/min/mL, um valor superior aos encontrados no presente trabalho.

Conforme descrito também por Bakri et al. (2008), a espécie de *Aspergillus niger* SS7 isolada do solo e cultivada em meio de cultura submerso para a produção de xilanase à 30°C, 120 rpm, por 5 dias; mostrou que em pH 7,0, obteve-se melhor atividade xilanásica de 110 U/min/mL, também apresentando um resultado superior em relação aos resultados obtidos no atual estudo.

Guimarães et al. (2013) realizou estudo utilizando as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* isoladas do solo inoculadas em meio utilizando diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações (glicose 1%, farelo de arroz 1% e 0,5%, palha de arroz 1% e 0,5%, bagaço de cana fina 1% e 0,5%, bagaço de cana grossa 1% e 0,5%, sabugo de milho 1% e 0,5%, farelo de trigo 1% e 0,5%, xilana derivada de madeira 1% e 0,5%, xilana derivada de aveia de trigo vermelho 1% e 0,5%, uma mistura de sabugo de milho a 0,5% com bagaço de cana fina a 0,5%, mistura de farelo de trigo a 0,5% com bagaço de cana fina a 0,5% e uma mistura de farelo de trigo a 0,5% com sabugo de milho a 0,5%) e incubadas sob agitação de 110 rpm a 30°C de dois a cinco dias, verificaram que para o *A. niger* a melhor fonte de carbono foi uma mistura de farelo de trigo e sabugo de milho, obtendo atividade específica de 20,19 U/mg; já para o *A. flavus* a melhor fonte de carbono foi a xilana derivada de madeira a 1%, com resultado de atividade específica de 20,40 U/mg, evidenciando resultados abaixo dos encontrados neste estudo.

Angélico (2014) demonstrou em seu estudo que dentre as linhagens fúngicas bioprospectadas em lodo ativado residual e utilizadas neste estudo, a que apresentou maior capacidade em secretar amilase foi a linhagem 5, diferentemente, neste estudo, observou-se que a linhagem 3, que corresponde a um *Aspergillus* sp., foi a mais efetiva em produzir xilanase.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a bioprospeccção no lodo ativado residual levou ao isolamento de linhagens fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Geotrichum* sp. capazes de produzir xilanase com bons resultados de atividade específica com destaque para a linhagem 3. Ressaltando que para resultados ainda mais eficazes são necessárias etapas posteriores de identificação das linhagens por um centro de referência e de purificação da enzima obtida.

REFERÊNCIAS

- ABIDA, H.; RUCHAUD, S.; RIOS, L.; HUMEAU, A.; PROBERT, I.; VARGAS, C.; BACH, S.; BOWLER, C. Bioprospecting marine plankton. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4594-4611, 2013.
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 844-856, 2012.
- AKONDI, K. B.; LAKSHMI, V. V. Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. **Journal of Integrative Biology**, v. 17, n. 2, p. 61-70, 2010.
- ANGELICO, M. Biprospecção de Fungos Produtores de Amilase. 2014. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2014.
- BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3513-3519, 2007.
- BAKRI, Y.; AL-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase Production by a Newly Isolated *Aspergillus niger* SS7 in Submerged Culture. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 249-251, 2008.
- BEATTIE, A. J.; HAY, M.; MAGNUSSON, B.; NYS, R.; SMEATHERS, J.; VINCENT, J. F. V. Ecology and bioprospecting. **National Institute of Health**, v. 36, n. 3, p. 341–356, 2011.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BENTO, A. P.; SEZERINO, P. H.; PHILIPPI, L. S.; REGINATTO, V.; LAPOLLI, F. R. Microfauna Characterization in Activated Sludge Wastewater Treatment plant: An Instrument of Assessment and Control of Process. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 10, p. 329-338, 2005.
- BISWAS, R.; SAHAI, V.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-

residual extract. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 702-708, 2010.

BOCCHINI, D. A.; PRADO, H. F. A.; BAIDA, L. C.; ROBERTO, I. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 727-731, 2002.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BRASIL. CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). **Manual técnico da microbiologia para sistemas de lodos ativados operando com esgotos domésticos. Norma técnica L1.025**. Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas---cetesb/43-normas-tecnicas---cetesb>.

Acesso: 22 de novembro de 2014.

CIESIELSKI, S.; GÓRNIK, D.; MOZEJKO, J.; SWIATECKI, A.; GRZESIAK, J.; ZDANOWSKI, M. The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. **Current Microbiology**, v. 69, p. 594–603, 2014.

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

FELICIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.

GUEDES, H. V.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. **Quantificação de Proteínas Totais de Bactérias Diazotróficas Crescidas em Meio de Cultivo Semi-Sólido**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2007.

GUIMARAES, N. C. A.; SORGATTO, M.; NOGUEIRA, S. C. P.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and

Aspergillus flavus on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **Springer**, v. 2, 2013.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, 2013.

HICKS, M. A.; PRATHER, K. L. J. Bioprospecting in the Genomic Age. **Advances in Applied Microbiology**, v. 87, p. 111-146, 2014.

HUANG, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, C. W.; TANG, C. Y. Enzyme Reaction Annotation Using Cloud Techniques. **BioMed Research International**, 2013.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico** : texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LIN, H.; CHEN, W.; DING, H. AcalPred: A Sequence-Based Tool for Discriminating between Acidic and Alkaline Enzymes. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

LOCKE, D. M. **Enzimas**: Os Agentes da Vida. São Paulo: Expressão e Cultura, 1969.

LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Biotecnologia aplicada a prospecção e uso de serviços e funções da biodiversidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 34, p. 29-35, 2005.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

MELGAREJO, L. M. Bioprospecting as a possible development mechanism for Colombia. **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, n. 1, p. 19-30, 2013.

MORAES, C. S.; JUNIOR, F. O. R. O.; MASSON, G.; REBELLO, K. M.; SANTOS, L. O.; BASTOS, N. F. P.; FARIA, R. C. **Série em Biologia Celular e Molecular: Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2013.

NAIR, S. G.; RAVEENDRAN, S.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 82-86, 2008.

NIRMAL, N. P.; LAXMAN, S. R. Enhanced Thermostability of a Fungal Alkaline Protease by Different Additives. **Enzyme Research**, 2014.

OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 401-404, 2010.

OLIVEIRA, G. S. S.; ARAÚJO, C. V. M.; FERNANDES, J. G. S. Microbiologia de sistema de lodos ativados e sua relação com o tratamento de efluentes industriais: a experiência da Cetrel. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.2, p. 183-192, 2009.

OLIVEIRA, J. C. **Atlas de Micologia Médica**. ControlLab, 2013.

PASCALE, D.; SANTI, C.; FU, J.; LANDFALD, B. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. **Marine Genomics**, v. 8, p. 15-22, 2012.

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

RAO, Y.K.; SHIH-CHIN, LU.; BING-LAN, LIU; YEW-MIN TZENG. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 57–66, 2006.

REID, E. L.; WORTHY, C. A.; PROBERT, I.; ALI, S. T.; LOVE, J.; NAPIER, J.; LITTLECHILD, J. A.; SOMERFIELD, P. J.; ALLEN, M.J. Coccolithophores: functional biodiversity, enzymes and bioprospecting. **Marine Drugs**, v. 9, p. 586-602, 2011.

REINEHR, C. O; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso

em reações de esterificação e alcoólise: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Química Nova**, v.37, n.3, p. 454-460, 2014.

SANTOS, L. F.; ISHII, P. L. Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 7-15, 2011.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1763–1771, 2005.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; PAROUL, N.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 294-302, 2014.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TORRES, O. D.; VELHO, L. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. **Ciência da Informação**, Brasília, DF, v. 38, n. 3, p.96-110, set./dez., 2009.

VESTER, J. K.; GLARING, M. A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Springer**, v. 19, p. 17-29, 2015.

YANG, Q.; ZHANG, H.; LI, X.; WANG, Z.; XU, Y.; REN, S.; CHEN, X.; XU, Y.; HAO, H.; WANG, H. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. **Bioresource Technology**, n.129, p. 264–273, 2013.