

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Produção de xilanase e xilosidase por *Aspergillus versicolor*

Natália Henrique Fernandes

Araraquara

2012

Natália Henrique Fernandes

Produção de xilanase e xilosidase por *Aspergillus versicolor*

Monografia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana Angélica e Ary,
por todo amor, apoio e força em todos os momento.
E ao meu irmão, Vitor, pela amizade e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão pelo carinho, dedicação, confiança e incentivo. Sem medir esforços, me proporcionaram todo amor para que eu alcançasse meus objetivos e seguisse sempre em frente.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti e a todos do Laboratório de Enzimologia pela orientação, paciência, ensinamentos, ajuda e oportunidade de realização desse trabalho. Proporcionaram-me bons exemplos para a minha futura vida profissional.

A todos meus amigos de faculdade pela amizade verdadeira, conselhos e companheirismo durante todos esses anos. Por todos os momentos compartilhados que fizeram dessa fase ser inesquecível. Que os laços de amizades sejam cada dia mais fortes.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho e a todos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. GÊNERO ASPERGILLUS.....	9
1.2. ASPERGILLUS VERSICOLOR	11
1.3. ENZIMAS.....	11
1.4. ENZIMAS XILANOLÍTICAS	12
2. DESENVOLVIMENTO	16
2.1.OBJETIVOS	16
2.2.MATERIAL E MÉTODOS	16
2.2.1.Crescimento do fungo <i>Aspergillus versicolor</i>	16
2.2.2.Meio de cultivo-M4 modificado.....	17
2.2.4.Obtenção de conídios.....	18
2.2.5.Obtenção de enzima extracelular	18
2.2.6. Obtenção de enzima intracelular	19
2.2.7.Precipitação com acetona.....	19

2.2.8. Dosagem de proteínas.....	19
2.2.9. Determinação das atividades enzimáticas.....	19
2.2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	20
2.2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturante	22
2.3. RESULTADOS	23
2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	33
3. CONCLUSÃO	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

Os fungos são microrganismos heterótrofos e desenvolvem-se bem sobre os mais variados substratos orgânicos. O fungo filamentoso *Aspergillus versicolor* foi utilizado nesse trabalho para a produção das enzimas xilanase e xilosidase. Essas enzimas são importante para algumas indústrias tais como: indústria de papel, sucos e cervejarias. Os esporos e conídios foram obtidos em meio sólido ágar-aveia e foram inóculados em meio líquido, nos quais as fontes de carbono foram xilana, pó sabugo de milho e pó bagaço de cana-de-açúcar. Houve uma maior produção de proteínas no meio intracelular (0,21 mg/mL) em relação ao meio extracelular (0,0171 mg/mL). A atividade da enzima xilanase foi maior no meio extracelular (0,177 U/mL) e em relação a enzima xilosidase foi maior no meio intracelular (0,034 U/mL). Foi possível mostrar através da cromatografia ascendente em sílica gel os produtos hidrolíticos formados. Também foi avaliado as diferenças nos perfis protéicos das amostras contendo as enzimas extracelulares e intracelulares. A boa atividade de xilosidade obtida do micélio traz perspectivas para estudos de imobilização multipontual em suportes sólidos objetivando a produção de xilose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representa a eletroforese em gel de poliacrilamida. SDS-PAGE	28
Figura 2. Cromatografia ascendente em camada delgada em sílica gel das amostras da enzima intracelular (A) e extracelular (B).	29
Figura 3. Eletroforese SDS-PAGE.	30
Figura 4. Eletroforese PAGE. Amostra da enzima extracelular.....	31
Figura 5. Eletroforese PAGE. Amostra da enzima intracelular	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosagem de proteínas e determinação de atividade enzimática extracelular nos filtrados de cultivo, utilizando pó de sabugo de milho (SM) e pó de bagaço de cana-de-açúcar (BC).....	23
Tabela 2. Dosagem de proteínas e determinação de atividade enzimática nos filtrados de cultivo, utilizando sabugo de milho.....	24
Tabela 3. Produção de xilanase extracelular utilizando como fonte de carbono a xilana e o pó de sabugo de milho (SM).....	24
Tabela 4. Produção de xilanase intracelular utilizando xilana e sabugo de milho	25
Tabela 5. Produção de xilanase extracelular em meio Vogel em função do tempo.....	25
Tabela 6. Produção de xilosidase extracelular em meio Vogel em função do tempo.....	26
Tabela 7. Dosagem de proteína e determinação de atividade de xilanase e xilosidase extracelular, utilizando meio Vogel.....	26
Tabela 8. Dosagem de proteína e determinação de atividade de xilanase e xilosidase intracelular, utilizando meio Vogel	27

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos encontrados na água e na terra, são heteróforos e, em geral, desenvolvem-se bem sobre os mais variados substratos orgânicos, como restos de vegetais em apodrecimento e em animais mortos. São microorganismos eucarióticos quimiorganotróficos. Reproduzem naturalmente por meio de esporos, com poucas exceções, e dependendo do processo de reprodução podem ser mitóticos ou meióticos. Não possuem clorofila, são filamentosos, em geral, e comumente ramificados.

Os fungos estão relacionados a inúmeras atividades humanas, seja na indústria, na medicina, na farmacologia ou na pesquisa biológica. Desempenham um importante papel na efetivação de ciclos da matéria e são, juntamente com as bactérias, os principais organismos decompositores nos mais diversos ecossistemas. Os fungos tem uma excepcional capacidade de dispersão, graças ao elevado número de microscópicos esporos produzidos, que praticamente ocorre em todos os ambientes.

Substrato, umidade e ausência de luz ou luz fraca são as condições requeridas para um bom desenvolvimento da maioria das espécies.

1.1. GÊNERO ASPERGILLUS

O gênero *Aspergillus* possui mais de cem espécies, e pertence à divisão *Eucomycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae*. Apresenta uma reduzida necessidade nutricional, podendo ser isolado do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar. A reprodução ocorre de forma assexuada através de conídios, embora algumas espécies apresentem a forma sexuada do tipo ascosporada (Berchieri & Macari, 2000; Kearns & Loudis, 2003; Lacaz et al 1984; Sidrim & Rocha,

2004). São largamente espalhados na natureza, sendo encontrados em frutas, vegetais e outros substratos capazes de fornecer o alimento necessário ao crescimento. Algumas espécies se envolvem na deterioração de alimentos. São utilizados em numerosas fermentações industriais (Pelczar et al, 1980).

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da macro e micromorfologia do fungo. Na avaliação macroscópica, as colônias deste gênero apresentam diferentes colorações do verso e reverso, textura e topografia conforme a espécie (Lacaz et al 1984; Martins et al 2005; Raper & Fennell, 1965; Sidrim & Rocha, 2004).

Todas as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam microscopicamente hifas regulares medindo aproximadamente 4µm de diâmetro, septadas, com bifurcações em ângulo agudo, e estrutura de esporulação caracterizada por conidióforos com extremidade dilatada formando a vesícula, de onde se originam as fiálides que dão origem aos conídios (Santos, 1999; Sidrim & Rocha, 2004).

Os *Aspergillus* crescem na presença de altas concentrações de açúcar e de sal, indicando que podem extrair água de substâncias relativamente secas (Pelczar et al, 1980). Esse gênero apresenta grande variedade de espécies economicamente importantes tanto por serem utilizadas como fonte de enzimas industriais, como por causarem prejuízo, principalmente devido à produção de toxinas potentes (Klich & Pitt, 1988). Além da produção de micotoxinas, espécies do gênero *Aspergillus* podem crescer sobre produtos agrícolas armazenados (Raper & Fennell, 1965) como milho, soja, amendoim, café e cereais em geral (Klich & Pitt 1988; Varga et al., 2004), causando perda da coloração dos grãos e produção de odores e sabores desagradáveis (Varga et al., 2004). Há espécies desse gênero que são de importância médica, pois podem causar aspergiloses em pacientes imunocomprometidos (Mcwinney et al, 1993)

1.2. *ASPERGILLUS VERSICOLOR*

O fungo filamentoso *Aspergillus versicolor* foi empregado nesse trabalho. As características apresentadas por este organismo são de interesse em processos industriais, onde a preservação da integridade celulose é necessária, como em indústrias de papel e em indústrias têxteis.

1.3. ENZIMAS

As enzimas são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas. São proteínas e, portanto, consistem em cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. Servem para catalisar reações bioquímicas, o que significa que aumentam a velocidade da reação bioquímica sem se deixar afetar pela mesma. As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores (carboidratos em açúcares, por exemplo), de catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula (caso da isomerização da glicose em frutose), assim como podem ajudar a construir moléculas específicas (de material celular, por exemplo).

Desde a Antiguidade, o homem explora involuntariamente as enzimas para produzir alimentos e bebidas, como o pão, o queijo, a cerveja e o vinho, pela fermentação natural. Em 1926, provou-se que pela primeira vez que as enzimas eram proteínas, depois que Sumner isolou e cristalizou urease e postulou que enzimas eram proteínas. Logo depois, em 1930, John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina e a tripsina, concluindo também que elas eram proteínas (Nelson & Cox, 2002). A seguir, centenas de enzimas foram classificadas, purificadas e isoladas, além da descoberta das ribozimas recentemente.

Atualmente, as enzimas são comumente utilizadas em várias aplicações industriais, e a demanda para aumentar a estabilidade, atividade e especificidade destas cresce rapidamente. O uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases cresceu consideravelmente, especialmente na indústria têxtil, de ração, uva e vinho assim como produção de polpa e papel. Hoje essas enzimas somam 20% do mercado mundial de enzimas, a maioria produzida por *Trichoderma* e *Aspergillus* (Bhat, 2000).

1.4. ENZIMAS XILANOLÍTICAS

Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, sua completa hidrólise requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente (Collins et al, 2005). Tais enzimas são produzidas por fungos, bactérias, algas marinhas, protozários, gastrópodes e artrópodes (Kulkarni et al, 1999). Os fungos filamentosos são particularmente produtores interessantes de xilanases, uma vez que a enzima é sintetizada e excretada para o meio de cultivo em níveis mais altos do que aquelas produzidas por leveduras e bactérias (Kulkarni et al, 1999)

No entanto, a escolha de um substrato apropriado e da composição do meio de cultivo influencia a produção dessas enzimas, além da importância de se obter xilanases livres de celulasas para a indústria de celulose e papel, visando o mínimo de gastos possível para a sua produção (Kulkarni et al, 1999).

Uma alternativa de baixo custo é a utilização de resíduos agro-industriais como fonte de carbono: serragem, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, sabugo de milho, entre outros. Por outro lado, há microorganismos que tem uma melhor produção de xilanases utilizando substrato natural (xilana pura). Também há relatos de xilanases induzidas

por substratos sintéticos como 2-O- β -D-xilopiranosil D-xilose, 3-O- β -D-xilopiranosil D-xilose e 2-O- β -D-glucopiranosil D-xilose (Polizeli et al, 2005).

Xilanases e β -xilosidades são produzidas principalmente por bactérias e fungos, sendo que em geral, os fungos as produzem em níveis mais elevados.

As endo-1,4- β -xilanase clivam as ligações glicosídicas internas ao longo da cadeia da xilana, diminuindo assim o grau de polimerização do substrato. O mecanismo de clivagem não é ao acaso, sendo dependente da natureza, do comprimento, do grau de polimerização da molécula e da presença de substituintes. Os produtos formados pela ação das endoxilanases são xilooligossacarídeos maiores, e posteriormente pequenas moléculas como xilotriose, xilobiose e xilose (Collins et al, 2005; Polizeli et al, 2005). As endoxilanases são normalmente inibidas por altas concentrações de seus produtos e principalmente por xilobiose. Em culturas laboratoriais de fungos, as endoxilanases são liberadas para o meio de cultivo, atuando sobre o substrato.

As β -D-xilosidases podem ser reconhecidas e classificadas como xilobiasas ou exo-1,4- β -xilanases em função de suas afinidades relativas para xilobiose e para grandes xilooligossacarídeos, respectivamente. Segundo Biely (1985, 1993) são responsáveis pela hidrólise de xilooligossacarídeos menores e xilobiose liberados pela ação de endoxilanases sobre a xilana, tendo como produto xilose. Tais enzimas são freqüentemente de localização intracelular, mas podem estar associadas à membrana e voltadas para o lado externo, em alguns casos. A xilosidase é responsável pela remoção da causa da inibição das endoxilanases, uma vez que hidrolisa xilobiose, aumentando assim, a eficiência de hidrólise da xilana (Collins et al, 2005; Polizeli et al, 2005). Os fungos filamentosos são amplamente utilizados como produtores de enzimas e são geralmente considerados mais potentes produtores xilanolíticos do que bactérias e leveduras (Haltrich et al. 1996; Polizeli et al, 2005).

A enzima estudada apresenta atividade máxima entre 30-70°C. β -xilosidases de cepas de termotolerantes, como fungos do gênero *Aspergillus*, apresentam atividade ótima em temperaturas mais altas, em torno de 75°C. As β -xilosidases possuem temperaturas ótimas para dosagem da atividade entre 35°C (Saxena et al., 1995) e 70°C (Kormelink et al., 1993). A faixa de pH, na qual a atividade é maior, é desde 3,0 (Takenishi et al., 1973) a 9,0 (Bachmann & McCarthy, 1989). O ponto isoelétrico (pI) varia de 3,0 (Dobberstein & Emeis, 1991; Uziie et al., 1985) a 8,9 (Touhy et al., 1993), sendo que a maioria das β -xilosidases já purificadas e caracterizadas apresentam um pI entre 4,0 e 4,9. As descritas na literatura apresentam massas moleculares entre 26kDa (Matsuo & Yasui, 1988) e 240 kDa (Dobberstein & Emeis, 1991; Matsuo & Yasui, 1988; Uziie et al., 1985), sendo que essas proteínas são geralmente monoméricas ou diméricas.

Particularmente, fungos filamentosos de β -xilosidases são mais vantajosos do que outros microrganismos e plantas, devido à alta estabilidade e baixo custo comercial (Eneyskaya et al. 2003). Nas últimas décadas cresceu o interesse industrial pelas enzimas fúngicas que promovem a degradação da xilana por fungos produtores de xilanases extracelulares e intracelulares. Estes microrganismos produzem enzimas xilanolíticas acessórias que são necessárias para o branqueamento das xilanas. Em escala industrial, as xilanases são produzidas por *Aspergillus* e *Trichoderma* (Haltrich et al., 1996).

A adição de enzimas exógenas, como as β -xilosidases, às dietas, aumenta o valor nutritivo dos alimentos e do desempenho dos animais (Pettersson et al. 1990; Beauchemin et al. 2003; Omogbenigun et al. 2004). As enzimas xilanolíticas são capazes de hidrolisar as hemiceluloses presentes no trigo, milho e outros cereais, promovendo a digestão dos nutrientes e redução do chorume, a excreção de nitrogênio e fósforo. A utilização de enzimas na alimentação de animais pode melhorar a carne e eficiência na produção de leite, bem como reduzir o impacto ambiental (Bhat 2000; Ahuja et al. 2004; Graminha et al 2008).

As indústrias de celulose e papel tem utilizado as enzimas xilanolíticas. (Biely 1985; Viikari et al. 1994; Prade 1995; Sunna e Antranikian 1997, Haarhoff et al. 1999; Medeiros et al. 2003; Subramaniyan e Prema 2002; Polizali et al. 2005). De acordo com Sunna e Antranikian (1997), a aplicação de enzimas no branqueamento da celulose reduz em até 30% da utilização dos compostos de cloro e 15-20% na liberação de organoclorados que são altamente tóxicos para o meio ambiente.

Na indústria de alimentos, as β -xilosidases são utilizadas na extração e clarificação de sucos, com vantagens na produção, operação e qualidade do produto final (Biely 1985; Bhat 2000; Beg et al. 2001; Polizeli et al. 2005). Na fabricação de cerveja, longas cadeias de arabinosilanos são liberadas, aumentando a viscosidade e, assim, levando a um aumento na turbidez da cerveja. As β -xilosidases promovem a solubilização do arabinosilano, diminuindo a viscosidade e, portanto, a turbidez da cerveja (van der Broeck et al. 1990; Kulkarni et al. 1999; Dervilly et al. 2002). Uma outra aplicação de β -xilosidases é no processamento de café, maceração de vegetais, preparação de produtos de fibra cozida e pigmentos, condimentos, bem como na produção de substâncias farmacologicamente ativas e antioxidantes (Coughlan et al. 1993; Prade 1995; Kulkarni et al. 1999; Collins et al. 2005).

Devido a sua importância biotecnológica, progressos significativos foram feitos sobre a importância bioquímica e molecular de β -xilosidases nos últimos anos. A maioria dos estudos realizados tem se concentrado no rastreio, isolamento, produção, purificação e caracterização dessa enzima. A xilanase e xilano não são bastante usados na indústria farmacêutica. A xilanase foi algumas vezes empregada com complexo de enzimas (hemicelulases, proteases e outras) em suplementos alimentares, mas poucos produtos medicinais possuem essa formulação (Polizelli et al., 2005).

Esses são alguns dos exemplos para que a enzima em questão seja utilizada no cotidiano das indústrias.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1.OBJETIVOS

Produção das enzimas xilanase e xilosidase por *Aspergillus versicolor*

2.2.MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Manutenção do fungo *Aspergillus versicolor*

A linhagem de *Aspergillus versicolor* cresceu, primeiramente, em meio de cultura contendo 2% de Ágar e 4,5% de aveia (Quaker). Foram pesados e misturados o ágar e a aveia. Ferveu-se com água, colocando, posteriormente, em tubos de ensaio ou garrafas. A seguir os tubos e garrafas foram autoclavados a 120° C, por 20 minutos. Após a esterilização, os meios de cultura foram solidificados de forma inclinada, aumentando, assim, a superfície para o crescimento desses microorganismos.

2.2.2. Meio de cultivo-M4 modificado

O meio é composto por: 0,1% de CaCO₃; 0,5% NaCl; 0,1% NH₄Cl; 0,5% água maceração de milho; H₂O destilada e 1% sabugo de milho ou bagaço de cana. Primeiramente, pesou-se a fonte de carbono (sabugo de milho e/ou bagaço de cana-de-açúcar), colocando-os em erlenmeyer. Posteriormente, os outros ingredientes foram pesados e misturados em um béquer, acrescentando uma parte da água destilada. O pH foi acertado para 6,0; utilizando NaOH ou HCl, conforme o necessário. Completou-se com o restante da água destilada, sob agitação. Distribuiu-se nos erlenmeyers de 125 mL(aproximadamente 25 mL em cada frasco).

Após isso, foi autoclavado a 120⁰C, por 20 minutos. Após o resfriamento os meios foram guardados na geladeira.

2.2.3. Meio de cultivo-Meio Vogel

O outro meio líquido utilizado para a produção de enzimas tem em sua composição:

Água destilada	100mL
Sais de Vogel	2mL
Solução de Biotina (5mg/ml)	25 µL
Xilana	0,75% ou
Xilose	1%

A mistura de sais de Vogel (Vogel, 1956) foi preparada da seguinte forma: A 750mL de água destilada, adicionou os sais abaixo relacionados em ordem, dissolvendo cada um deles antes da adição do seguinte:

Citrato de sódio. 5H ₂ O	150g
KH ₂ PO ₄	250g
NH ₄ NO ₃	100g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10g
CaCl ₂ . 2H ₂ O (pré dissolvido em 20mL de água)	5g
Solução de biotina (vide abaixo)	5mL
Solução de traços de elementos (vide abaixo)	5mL

Em seguida, o volume da solução foi ajustado para 1000mL com água destilada. Adicionou clorofórmio (2-3mL) como preservativo e a solução foi estocada a temperatura ambiente. A solução de sais de Vogel foi diluída adicionando-se uma parte da solução estoque para 49 partes de água destilada. Posteriormente, a solução de Vogel diluída foi esterilizada e

então, adicionada fonte de carbono. A solução contendo traços de elementos foi preparada por adição sucessiva, em 95mL de água destilada, dos seguintes ingredientes:

Ácido cítrico . 1H ₂ O	5,00g
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	5,00g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6H ₂ O	1,00g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25g
MnSO ₄ .1 H ₂ O	0,05g
H ₃ BO ₃	0,05g
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,05g

Em seguida, o volume final foi acertado para 100mL e adicionou 1mL de clorofórmio como preservativo. A solução de Biotina foi preparada por dissolução de 5mg de biotina em 100mL de etanol 50% (v/v).

2.2.4.Obtenção de conídios

Os conídios foram obtidos a partir das culturas de estoque descritas em 2.2.1. Em cada tubo de cultura foi acrescentado 10 mL. A superfície da cultura foi raspada com uma alça estéril. A suspensão de conídios obtida foi utilizada pra inocular o meio líquido. O tempo de cultivo foi de 24h, 48h, 72h e 96h, sob agitação a 25°C.

2.2.5.Obtenção de enzima extracelular

Após o tempo de cultivo, a massa micelial foi separada do meio por filtração a vácuo, utilizando um funil de Büchner contendo papel de filtro. Desse modo, obtém-se um filtrado que foi utilizado para os experimentos.

2.2.6. Obtenção de enzima intracelular

Macerou-se, até a ruptura das células, a massa micelial obtida após a filtração descrita no item 2.2.5. Para isso foi utilizado um graal de porcelana, o qual durante o processo estava em banho de gelo. Para a maceração, utilizou-se areia lavada e água milli-Q. Após esse processo, levou-se a centrifugação, com isso o sobrenadante foi separado da areia e dos restos celulares.

2.2.7. Precipitação com acetona

Para essa parte do experimento, utilizou-se 5mL de filtrado de cultivo (extracelular e intracelular) e 15mL de acetona a frio, deixando por 60 minutos no “freezer”. Após esse período, centrifugou-se 9000rpm por 20 minutos a 4° C, desprezando o sobrenadante. Utilizou-se um secador para a evaporação da acetona e logo após houve a ressuspensão o precipitado concentrando-o dez vezes.

2.2.8. Dosagem de proteínas

As determinações de concentração de proteína foram realizadas pela metodologia descrita por Lowry, modificado por Hartree (1972). Nessa utilizou-se quantidade da enzima e de água suficiente para um o volume de 0,5 mL, acrescentando 2,5 da solução A, feita na hora, a qual é composta por Ca_2CO_3 , CuSO_4 e tartarato de sódio. Esperou-se 15 minutos e adicionou o Folin, aguardando mais 30 minutos. Finalmente, a leitura foi feita em $\lambda = 660\text{nm}$.

2.2.9. Determinação das atividades enzimáticas

a- Atividade da xilanase:

As atividades xilanolíticas foram determinadas pela formação de açúcares redutores (xilooligossacarídeos) a partir da xilana pelo método de DNS (Miller, 1959). Os ensaios

foram feitos em um erlenmeyer, no qual havia o substrato, a xilana; o tampão acetato pH 5,0 e a enzima extracelular ou micelial. A quantidade desses componentes dependeu da necessidade, ou seja, conforme foram feitas as leituras espectrofotométricas e obtido resultados. A reação foi conduzida a 35°C e alíquotas de 0,25 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 0,25 mL de DNS. Os tubos foram levados a fervura por 5 minutos e após o resfriamento adicionou-se 2,5 mL de água destilada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em $\lambda = 540\text{nm}$, utilizando uma curva padrão de xilose.

b-Atividade da β -xilosidase

A atividade β -xilosidásica foi detectada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil-beta-D-xilopiranosídeo. O ensaio foi feito em um tubo de ensaio contendo solução de substrato a 0,25%, tampão fosfato monobásico e enzima extracelular ou micelial. A reação foi conduzida a 40°C e alíquotas foram retiradas em diferentes tempos e interrompidas pela adição de 1,5 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A quantidade das substâncias citadas dependeu da necessidade, ou seja, conforme foram feitas as leituras espectrofotométricas e obtido resultados. Uma unidade enzimática para atividade β -xilosidásica foi definida como a quantidade de enzima que libera, a partir do substrato, 1 μmol de p-nitrofenol por minuto. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína.

2.2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Foram utilizados géis em placas (7,0 cm x 10,0 cm) com espaçador de 1,5 mm. Para preparar o gradiente linear de gel de 5 a 20% foram utilizadas as seguintes misturas: mistura de 10% de acrilamida: Tris HCl 3 M pH 8,9 (0,63 mL), SDS 1% (0,5 mL), acrilamida: bisacrilamida (280:0,735; p/v) (0,9 mL), persulfato de amônio (10mg/mL) (0,25 mL),

TENED (0,01 mL) e água destilada (2,73 mL). Gel de empilhamento a 4 % de acrilamida: Tris HCl 0,1 M pH 6,8 (0,4 mL), SDS 1 % (0,5 mL), acrilamida: bisacrilamida (28:0,735; p/v) (0,7 mL), persulfato de amônio (10 mg/mL) (0,25 mL), TEMED (0,01 mL), água destilada (3,1 mL).

As misturas de 10% de acrilamida foram colocadas em um sistema formador de gradiente e após a polimerização deste gel foi acrescentada a mistura do gel de empilhamento. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: 50 μ L da amostra em tampão Tris 5 m M pH 7,5 foram misturados com 50 μ L de tampão diluente (Tris HCL 0,124 M pH 6,8, sacarose 15% e SDS 4 %), 10 μ L de azul de bromofenol 0,1 % e 5 μ L de 2-mercaptoetanol. Após a homogeneização, as amostras foram fervidas em banho-maria durante 5 minutos e posteriormente aplicadas no gel. O tampão de corrida utilizado foi Tris HCL 0,025 M e Glicina 0,192 M pH 8,3 em SDS 0,1 %. O gel foi submetido a uma corrente de 50 mA até que a amostra passe pelo gel de empilhamento e 70 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente de 3 horas, a temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e as proteínas foram coradas através da coloração em prata com os seguintes passos:

Preparo das soluções:

Solução 1- 35 ml de etanol, 7 mL de ácido acético e completar para 70 mL com água.

Solução 2- 7 mL da solução 1 e 53 mL de água

Solução 3- 12mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ em 60 mL de água

Solução 4- 0,120g de AgNO_3 em 60 mL de água; 45 μ L de formaldeído 37%

Solução 5- 3,6 g de NaCO_3 ; 48mL de água; 30 μ L de formaldeído 37%; 1,2 mL solução 3

Solução 6- 3 mL de ácido acético concentrado, 57mL de água

Solução 7- 7 mL de glicerol e 53mL de água.

Procedimento para a coloração:

Primeiramente, o gel foi deixado por 30 minutos na solução 1. Foi retirado, sem lavar, e colocado por 15 minutos na solução 2. Após isso, foi lavado 3 vezes de 5 minutos com água e colocado na solução 3 por 1 minuto. Novamente foi lavado com água, por 30 segundos e posto, por 20 minutos, na solução 4 que fora deixada no escuro. Ao tirar da solução 4 foi lavado duas vezes com água, por 20 segundos. Foi adicionado o revelador, ou seja, a solução 5. Foi parado com a solução 6 e deixado na solução 7.

2.2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturante

O gel de concentração de 7% de acrilamida foi polimerizado em tubos de vidro (0,5 cm x 8cm). As amostras analisadas eletroforéticamente foram diluídas em tampão de amostras (Tris-base 0,065M azul de bromofenol 0,002% e glicerol 20%) pH 6,8. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida pH 8,3 (constituído de Tris-HCl 0,05 M e glicina 0,384 M) diluído 5 vezes no momento da utilização, por um período de 3 e 6 horas, a temperatura ambiente. A corrente aplicada foi de 4mA por tubo e voltagem de 120V que foi mantida até o final da corrida eletroforética.

Os géis foram retirados dos tubos e a revelação das proteínas foi feita utilizando-se Coomassie BLUE R-250 (Sigma). A solução corante contendo Coomassie BLUE R-250 foi preparada da seguinte maneira: 0,625g de Coomassie BLUE R-250 foram dissolvidos em uma solução contendo 227mL de metanol 50% (v/v) e 23mL de ácido acético glacial e posteriormente a solução foi filtrada em papel Whatman número 1. Os géis permaneceram na solução corante durante a noite a temperatura ambiente.

A solução utilizada para descorar os géis foi preparada misturando 650mL de água destilada, 250mL de etanol e 80mL de ácido acético glacial.

2.3.RESULTADOS

Primeiramente, foi utilizado o pó de sabugo de milho e o pó de bagaço de cana-de-açúcar como fontes de carbono. De acordo com a Tabela 1, pode-se dizer que a atividade específica foi maior quando utilizou o sabugo de milho. Observa-se, também que quanto maior tempo de cultivo, maior foi a atividade em ambos os meios. Em relação à dosagem de proteínas houve uma pequena diferença entre os dois.

Tabela 1. Dosagem de proteínas e determinação de atividade enzimática extracelular nos filtrados de cultivo, utilizando pó de sabugo de milho (SM) e pó de bagaço de cana-de-açúcar (BC)

Filtrado de cultivo	Tempo de cultivo (horas)	Volume obtido (mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
SM	18	46mL	0,06005	0,0086	0,143
SM	24	47mL	0,0592	0,0503	0,849
BC	18	37mL	0,0581	0,00075	0,012
BC	24	45mL	0,0508	0,0035	0,068

Observações: Meio M4, pH 6,0. O inóculo foi feito com 2,5mL de suspensão de esporo. Dosagem de proteína: 0,1 mL e 0,2mL do filtrado. Ensaio da atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 2mL da enzima extracelular. Os tempos foram 15 e 30 minutos.

O melhor tempo de cultivo foi de 72 horas, de acordo com a Tabela 2. Após esse tempo houve uma queda na quantidade de proteínas e também da atividade específica.

Tabela 2. Dosagem de proteínas e determinação de atividade enzimática nos filtrados de cultivo, utilizando sabugo de milho.

Tempo de cultivo (Horas)	Volume(mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
24	26mL	0,24	0,099	0,41
48	27mL	0,28	0,138	0,49
72	22mL	0,27	0,212	0,79
96	25mL	0,22	0,158	0,72

Observações: Meio M4, pH 6,0. Dosagem de proteína: 0,05mL ;0,1 mL e 0,2mL do filtrado.

Ensaio da atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 2mL da enzima extracelular. Tempos: 10 e 20 minutos.

Na Tabela 3 compare-se a produção de xilanase extracelular utilizando xilana e o pó de sabugo de milho. Percebe-se que as atividades foram maiores quando utilizou-se a xilana.

Tabela 3. Produção de xilanase extracelular utilizando como fonte de carbono a xilana e pó de sabugo de milho (SM)

Filtrado de cultivo	Tempo de cultivo (horas)	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
Xilana	72	45	0,99	0,168	0,169
SM	72	49	0,96	0,106	0,110

Observações: Meio M4, pH 6,0. Dosagem de proteína: 0,05mL; 0,1 mL e 0,2mL do filtrado.

Ensaio atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1mL da enzima extracelular.

Pela Tabela 4, pode-se dizer que a houve uma maior quantidade de proteína e atividade específica quando utilizou xilana como fonte de carbono.

Tabela 4. Produção de xilanase intracelular, utilizando como fonte de carbono a xilana e o pó de sabugo de milho (SM).

Filtrado de cultivo	Tempo de cultivo	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
Xilana	72 horas	14	0,1049	0,2258	2,15
SM	72 horas	14	0,0528	0,0761	1,44

Observações: Meio M4, pH 6,0. Dosagem de proteína: 0,05mL; 0,1 mL e 0,2mL do filtrado. Ensaio atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 0,5 mL da enzima extracelular. Tempos: 10 e 20 minutos.

A Tabela 5 mostra a produção de xilanase extracelular em meio contendo sais de Vogel. De acordo com os resultados apresentados abaixo, pode-se dizer que no tempo de crescimento de 72 horas houve maior quantidade de proteínas e maior atividade específica.

Tabela 5. Produção de xilanase extracelular em meio Vogel em função do tempo.

Tempo cultivo (horas)	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
24	47	0,49	0,014	0,02
72	43	0,14	0,1635	1,16

Observações: Meio Vogel. Dosagem de proteína: 0,05mL; 0,1mL e 0,2mL do filtrado. Ensaio atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1,0mL da enzima extracelular. Tempos: 10, 20 e 30 minutos.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos pela produção de xilosidase extracelular em meio contendo sais de Vogel em relação ao tempo de cultivo. Com isso, pode-se dizer que o

melhor tempo de cultivo foi de 72 horas, pois nesse tempo houve a maior atividade específica, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 6. Produção de xilosidase extracelular em meio Vogel em função do tempo.

Tempo cultivo (horas)	Volume (mL)	Proteína (mg totais)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot.)
24	47	0,49	$2,26 \cdot 10^{-4}$	$4,6 \cdot 10^{-4}$
72	43	0,14	$1,94 \cdot 10^{-4}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$

Observações: Ensaio atividade enzimática: 0,2 ml substrato beta xilosídeo; 0,2 ml tampão fosfato de sódio; pH 6,0; 0,1 ml do filtrado. Tempos 10, 20 e 30 minutos.

A Tabela 7 mostra os resultados da dosagem de proteínas e determinação da atividade da xilanase e xilosidase extracelular. Pode-se dizer que atividade específica da xilanase apresentou um resultado maior do que a atividade específica da xilosidase.

Tabela 7. Dosagem de proteína e determinação de atividade e atividade específica (AE) xilanase e xilosidase extracelular, utilizando meio Vogel

Tempo cultivo (horas)	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Xilanase (U/mL)	Atividade Xilosidase (U/mL)	AE xilanase (U/mg prot.)	AE xilosidase (U/mg prot.)
72	898	0,0171	0,177	$1,13 \cdot 10^{-4}$	10,35	0,0066

Observações: Meio contendo sais de Vogel. Dosagem de proteína: 0,2; 0,3; 0,4 mL. Ensaio atividade enzimática xilanase: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1mL da enzima extracelular. Tempos: 10, 15 e 20 minutos. Ensaio atividade xilosidase: 0,2 ml

substrato beta xilosídeo; 0,1 ml tampão fosfato de sódio pH 6,0; 0,2 ml do filtrado. Tempos 10, 20 e 30 minutos.

Por fim, a Tabela 8 mostra os resultados obtidos da dosagem de proteína e determinação de atividade de xilanase e xilosidase intracelular. Os resultados demonstram que a atividade específica da xilanase é maior do que a da xilosidase

Tabela 8. Dosagem de proteína e determinação de atividade de xilanase e xilosidase intracelular, utilizando meio Vogel

Tempo de cultivo (horas)	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade xilanase (U/mL)	Atividade xilosidase (U/mL)	Atividade específica xilanase (U/mg prot.)	Atividade específica xilosidase (U/mg prot.)
72	173	0,21	0,144	0,034	0,68	0,16

Observações: Meio contendo sais de Vogel. Micélio (46,90g) foi macerado com areia lavada e água milliQ (110 mL). Dosagem de proteína: 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mL do filtrado. Ensaio atividade enzimática: 27µg de xilana; 5mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1mL da enzima intracelular. Tempos: 10, 15 e 20 minutos. Ensaio atividade de xilosidase extracelular: 0,25 ml substrato beta xilosídeo; 0,28 ml fosfato de sódio; pH 6,0; 0,02 ml da enzima. Tempos 5, 10 e 15 minutos.



Figura 1: Representa a eletroforese em gel de poliacrilamida. SDS-PAGE

1- 10 μ l intracelular, 2- 5 μ l intracelular. 3- 10 μ l extracelular, 4- 5 μ l extracelular

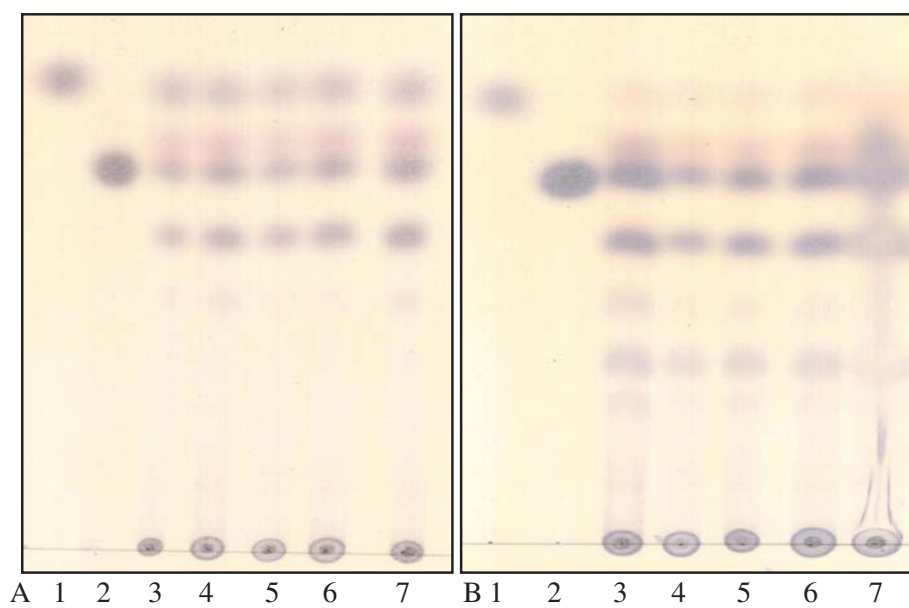


Figura 2. Cromatografia ascendente em camada delgada em sílica gel das amostras da enzima intracelular (A) e extracelular (B). 1-xilose, 2- xilobiose, 3- Tempo 0 minutos, 4- Tempo 30 minutos, 5- Tempo 60 minutos, 6- Tempo 90 minutos, 7- Tempo 120 minutos.

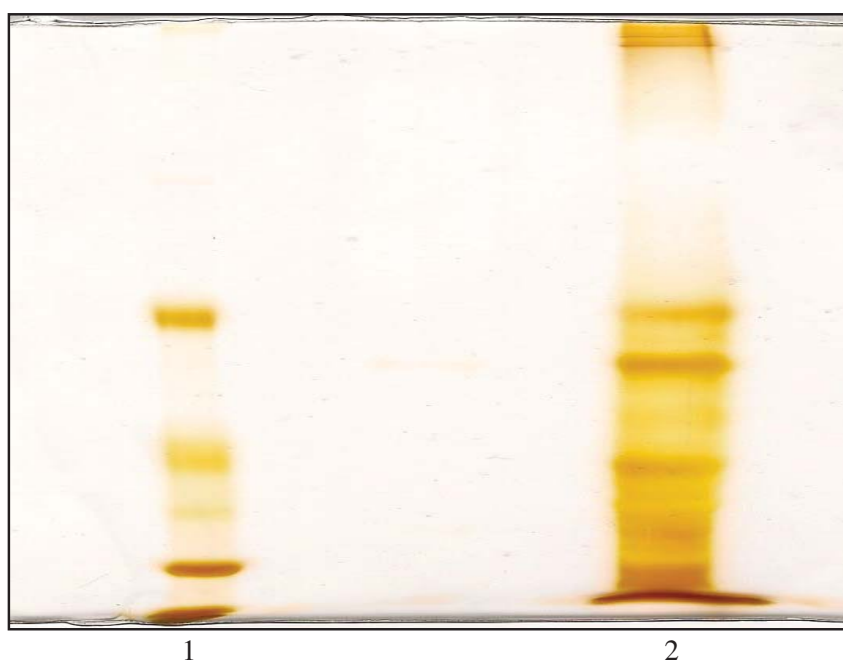


Figura 3. Eletroforese SDS-PAGE.

1-Padrão 2-30 μ l amostra de enzima extracelular

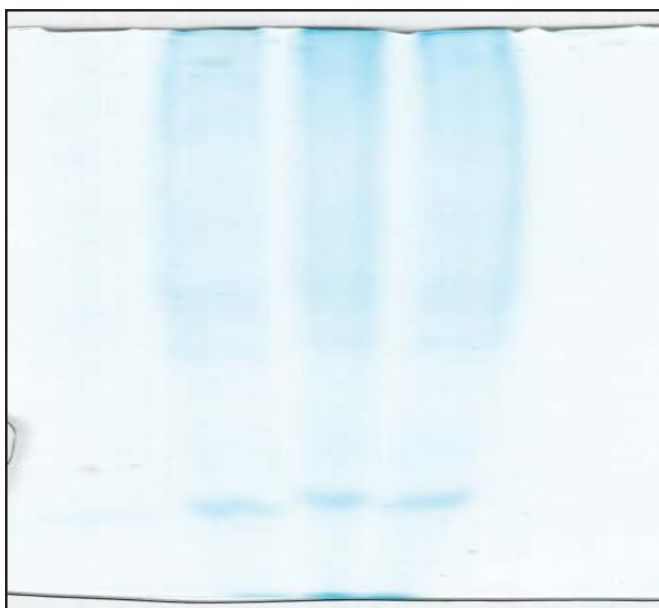


Figura 4- Eletroforese PAGE.

Amostra da enzima extracelular

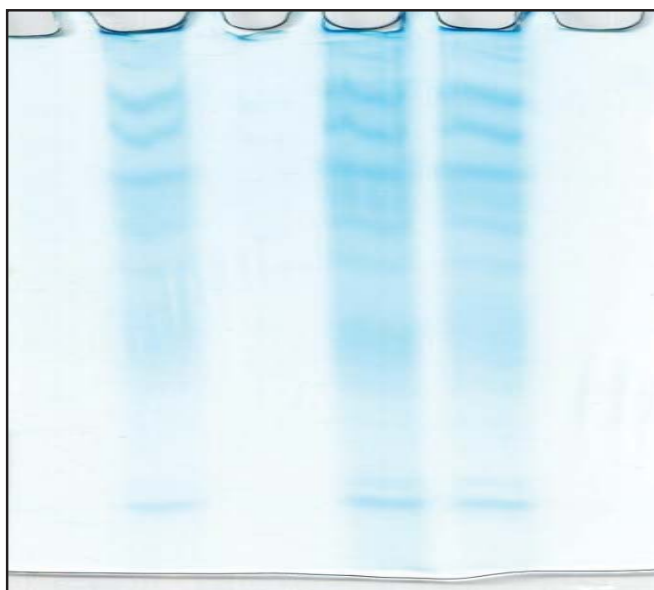


Figura 5. Eletroforese PAGE.

Amostra da enzima intracelular

2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para o desenvolvimento desse trabalho foi, primeiramente, utilizado o sabugo de milho e o bagaço de cana-de-açúcar como fontes de carbono a 1%. De acordo com a Tabela 1, observa-se que fonte de carbono de sabugo de milho forneceu uma maior atividade enzimática em relação ao meio cuja fonte de carbono era o pó bagaço de cana-de-açúcar, cerca de 12,5 vezes maior. Este último apresentou também uma dosagem de proteína menor. Outra análise é que, quanto maior foi o tempo para o crescimento maior foi a atividade enzimática da xilanase em ambos meios. Já em relação à dosagem de proteínas, observa-se que conforme o tempo de crescimento foi maior, a quantidade de proteína (mg/mL) diminuiu tanto quando a fonte de carbono era o sabugo de milho e quando era o pó bagaço de cana-de-açúcar.

Em outro experimento utilizou-se somente o sabugo de milho como fonte de carbono e variou o tempo de crescimento. Isso foi feito, pois conforme os resultados apresentados na Tabela 1, a fonte de carbono sabugo de milho é que apresentou melhores resultados em relação a outra fonte. Nesse caso foi analisado qual seria o melhor tempo de cultivo. Nota-se que até as 72 horas de crescimento os resultados mostram-se crescente e há uma queda quando o crescimento ocorre em 96 horas. Desse modo, pode-se dizer que o tempo de 72 horas é que apresentou melhores resultados em comparação aos outros (Tabela 2).

Foi realizado outro experimento, no qual utilizou xilana e sabugo de milho como fontes de carbono, cujo crescimento foi de 72 horas. Observa-se que houve uma pequena diferença quanto à dosagem de proteína. Já em relação à atividade enzimática de xilanase, o meio com xilana é que apresentou uma maior atividade específica em relação ao meio com sabugo de milho (1,5 vezes maior), de acordo com a Tabela 3. Também pode dizer que houve uma maior produção de enzima intracelular e maior atividade enzimática específica quando o substrato do meio foi a xilana (1,5 vezes maior) (Tabela 4).

Realizou-se a eletroforese (SDS-PAGE) 10%, cuja amostra era da fonte de carbono xilana. Foi aplicado 5 e 10 μ l de enzima intracelular e extracelular (Figura 1). A coloração foi a “coloração com prata”, cujos procedimentos foram descritos anteriormente. Nota-se que há uma maior quantidade de proteínas intracelular no poço que continha 10 μ l.

Foi preparado outro meio de cultura, sendo esse o meio líquido contendo sais de Vogel (Vogel, 1956). Nota-se, através das Tabelas 5 e 6 que houve uma maior produção de proteínas quando o tempo de cultivo foi de 24 horas. Analisando-se a atividade enzimática específica, quando o tempo de crescimento foi de 72 horas há uma maior atividade da enzima xilanase em comparação com a enzima xilosidase (Tabelas 5 e 6).

Para finalizar o projeto foi feito 1 litro de Meio de Cultura contendo sais de Vogel para dosar a quantidade de proteínas e determinar a atividade das enzimas xilanase e xilosidase tanto intracelular quanto extracelular. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. O tempo de crescimento não variou, foi de 72 horas. Nota-se que houve uma maior quantidade de proteínas intracelular. A atividade específica da amostra extracelular da enzima xilanase foi muito maior que da enzima xilosidase e, em relação, a amostra intracelular a atividade específica da enzima xilanase foi 4,25 vezes maior que a enzima xilosidase.

A cromatografia em camada delgada ascendente em sílica gel dos produtos de hidrólise obtidos em diferentes tempos com as enzimas intracelular e extracelular é mostrada na Figura 2 A e B, respectivamente. Na Figura 2A, pode-se observar uma maior produção de xilose, e menor de xilobiose e xilooligossacarídeos. Na Figura 2B, pode-se observar que houve produção mínima de xilose, mas uma grande quantidade de xilobiose e xilooligossacarídeos.

A análise eletroforética pela amostra do cultivo em meio líquido contendo sais de Vogel (Vogel, 1956) foi representada pela Figura 3. Nesse pode-se observar o perfil das proteínas intracelulares.

Por fim, foi realizada uma PAGE tanto da amostra extracelular (Figura 4) quanto da amostra intracelular (Figura 5).

3. CONCLUSÃO

Conclui-se, neste trabalho, que o fungo *Aspergillus versicolor* produziu as enzimas xilanolíticas em presença de pó de sabugo de milho, pó de bagaço de cana-de-açúcar e xilana como fontes de carbono nos meios de cultivo utilizados, e estas enzimas puderam ser concentradas com acetona e ensaiadas para atividades específicas. Através das cromatografias foi possível obter os produtos formados pela hidrólise, a partir de ensaio enzimático. Com isso, pode-se conferir a presença da enzima xilanase no meio extracelular e da enzima xilosidase no meio intracelular. O fungo filamentosso em questão apresenta genes específicos que codificam a enzimas xilanase e xilosidase. O fungo libera extracelularmente a enzima xilanase que irá quebra a xilana, presente no meio, em compostos menores, como xilose e xilooligossacarídeos, que conseguem ultrapassar a membrana e servir de alimento para o fungo. Conferindo, assim, o que há na literatura: que as xilanases constitutivas são responsáveis pela produção destes xilooligossacarídeos a partir da xilana. Através de permeases, estes xilooligossacarídeos são transferidos para o interior das células desencadeando a transcrição de genes do sistema xilanolítico (BIELY, 1985).

A boa atividade de xilosidade obtida do micélio traz perspectivas para estudos de imobilização multipontual em suportes sólidos objetivando a produção de xilose.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S.; FERREIRA, G.; MOREIRA, A. Utilization of enzymes for environmental applications. Crit. Rev. BiotechnoBoca Raton, v.24, p.125-154, 2004.

BACHMANN, S. L.; MCCARTHY, A. J. Purification and characterization of a thermostable beta-xylosidase from *Thermosnospora fusca*. Jornal of General Microbiology, v.135, p.293-300, 1989.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J Anim Sci, v. 81, p. 37- 47, 2003.

BEG, Q.K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol, v. 56, p. 326-338, 2001.

BERCHIERI, A. J.; MACARI, M. Enfermidades Micóticas., Doenças das Aves. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, São Paulo, p. 369 – 375, 2000.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Avd, v.18 (5), p. 355-383, 2000.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol, v. 3, p. 286-290, 1985.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (eds) Hemicellulose and hemicellulases. Portland Press, London, pp. 29-51, 1993.

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

COUGHLAN M.P.; TUOHY, M.G.; FILHO, X.F.; PULS, J.; CLAEYSSSENS M.; VRANSKA, M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: COUGHLAN M.P.; HAZLEWOOD G.P. (eds) Hemicellulose and hemicellulases. Portland Press, London, pp 53–84, 1993.

DERVILLY G.; LECLERCQ C.; ZIMMERMANN D.; ROUE, C.; THIBAUT J.F.; SALNIER L. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. Carbohydr Polym, v.47, p.143–149, 2002.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C.C. Purification and characterization of beta-xylosidase from *Aureobasidium pullulans*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.35, p.210-5, 1991.

ENEYSKAYA, E.V.; BRUMER, H.; BACKINOWSKY, L.V.; IVANEN, D.R.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A. (2003) Enzymatic synthesis of b-xylanase substrates: transglycosylation reaction of the b-xylosidase from *Aspergillus sp.* Carbohydr Res, v.338, p.313–325, 2003.

GRAMINHA, E.B.N.; GONCALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. Anim Feed Sci Technol, v.144, p.1–22, 2008

HAARHOFF, J., MOES, C.J.; CERFF, C.; VAN WYK, W.J.; GERISCHER, G.; JANSE, B.J.H. Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi. Biotechnol Lett, v.21, p. 415–420, 1999.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANIC, S. Production of fungal xylanases. *Biores Tech*, v.58, p.137–161, 1996.

KEARNS, K. S.; LOUDIS B., *Aspergilosis aviar.*, in *Recent Advances in Avian Infectious Diseases*, International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003; A1902.0903.ES

KLICH, M.A.; PITT, J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs, 1988

KORMELINK, F. J. M.; SEARLE- VAN LEEUWEN, M. J. F.; Wood, T. M.; Voragen, A. G. J. Purification and characterization of three endo (1,2)-beta-xylanases and beta-xylosidase from *Aspergillus awamori*. *Journak of Biotechonology*, v.27, p.249-65, 1993.

KULKARNI, N.; SHENFYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Lett*, v.135, p.287–293, 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Micologia Médica*. 6º ed. Sarvier. São Paulo – SP, p. 306, 1984.

LACAZ, C.S.; MINAMI, P.S.; PURCHIO, A. *O grande mundo dos fungos*. Ed. Polígono, 1 ed., São Paulo, p. 3-20, 1970.

MATSUO, M.; YASUI, T. beta-xylosidases of several fungi. *Methods in Enzymology*, v.160, p.684-95, 1988

MCWINNEY, PH.; KIBBLER, C.C.; HAMON, MD; SMITH, O.P.; GANDHI, L; BERGER, L.A.; WALESBY, L.K.; HOFFBRAND, A.V.; PRENTICE, H.G. *Progresse in the diagnosis*

and manegement of aspergilosis in bone marrow transplantation:13 years` experience. Clinical and Diseases, v.17, p. 397-404, 1993.

MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E.X. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. Int Biodeterior Biodegrad, v.52, p.97–100, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M. M. Lehninger princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, 3 ed., São Paulo, p. 100-103, 2002.

OMOGBENIGUN, F.O.; NYACHOTI, C.M.; SLOMINSKI, B.A. Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs. J Anim Sci, v.82, p. 1053–1061, 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S.. Microbiologia. v.1, São Paulo, Mc Graw, 1980.

PETTERSSON, D.; GRAHAM, H.; AMAN, P. Enzyme supplementation of low and high crude protein concentration diets for broiler chickens. Anim Prod, v.51, p.399–404, 1990

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. Appl Microbiol Biotechnol, v.67, p.577–591, 2005.

PRADE, R. Xylanases: from biology and biotechnology. Biotechnol Gen Eng Rev, v.13, p.101–131, 1995.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 686, 1965.

SANTOS, L. C. Laboratório Ambiental, EDUNIOESTE, Cascavel, PR, 1999, p. 218-226, 1999.

SAXENA, S.; FIEROBE, H. P.; GAUDIN C.; GUERELESQUIN, F.; BELAICH, J. P. Biochemical properties of a beta –xilosidase from *Clostridium cellulolyticum*. Applied and Environmental Microbiology, v. 6, p.3509-12, 1995.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Crit Rev Biotechnol, v.22, p.33–64, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit Rev Biotechnol, v.17, p. 39–67, 1997.

TAKENISHI, S.; TSUJISAKA, Y.; FUKUMOTO, J. Studies on hemicellulases. IV. Purification and properties of the beta-xylosidase produced by *Aspergillus niger* van Tieghem. Journal of Biochemistry, v.73, p.335-43, 1973.

TUOHY, M. G.; PULS, J.; CLAEYSSSENS, M.; VRSANAKÁS, M.; COUGHLAN, M. P. The xylan-degrading enzyme system of *Talaromyces emersonii* novel enzymes with activity against aryl beta-D-xylosides and unsubstituted xylans. Biochemical Journal, v.290, p.515-23, 1993.

UZHIE, M.; MATSUO, M.; YASUI, T. Purification and some properties of *Chaetomium trilaterale* beta-xylosidase. Agricultural and Biological Chemistry, v.49, p.1159-66, 1985.

VAN DER BROECK, H.C.; DE GRAAFF, L.L.; HILLE, J.D.R.; VAN OUYEN, A.J.J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper products. Eur Pat Appl, v. 90, p. 202–220, 1990

VARGA, J.; JHÁSZ, A.; KEVEI, F.; KOZAKIEVICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. European Journal of Plant Pathology, v.110, p. 627-640, 2004.

VIIKARI L, KANTELINEN, A.; SUNDWUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. FEMS Microbiol Rev, v.13, p.335–350, 1994.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora* (médium N). Microbial Genetics Bulletin, v13, p.42-3, 1956.