

PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Aspergillus casielus* COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

ELAINE APARECIDA WILGES KRONBAUER*
ROSANE MARINA PERALTA**
CLARICE AOKI OSAKU***
MARINA KIMIKO KADOWAKI***

Neste trabalho foi avaliada a produção de xilanase por *Aspergillus casielus*, utilizando diversas fontes de carbono (resíduo ou bagaço de cevada, bagaço de cana, casca de amendoim, resíduo fibroso da mandioca, germe de trigo, bagaço de milho verde e casca de laranja). Dentre as fontes de carbono testadas na produção de xilanase pelo fungo *A. casielus* em condições de fermentação semi-sólida, os melhores indutores foram o bagaço de cevada seguido pela casca de amendoim com atividade específica de 9,22 U/mg de proteína e 4,55 U/mg, respectivamente. Obteve-se produção máxima de xilanase livre de celulase no 3º dia (72 horas) com atividade específica de 7,88 U/mg proteína. O pH ótimo e a temperatura ótima de atividade xilanásica foram 6,5 e 50°C, respectivamente. A estabilidade térmica da xilanase na temperatura de 45°C mostrou-se praticamente constante, com perda de apenas 18% da atividade xilanolítica inicial em 90 minutos de reação. No entanto, nas temperaturas de 50°C e 55°C a enzima mostrou meia-vida de 50 e 17 minutos, respectivamente. Na análise dos produtos de hidrólise do xilano pela xilanase produzida por *A. casielus* verificou-se a formação de vários xilooligossacarídeos (xilose, xilobiose, xilotriose) indicando a ação de provável endoxilanase.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus casielus*; BAGAÇO DE CEVADA; XILANASE; FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA.

- * Bióloga, Pós-graduanda *Lato Sensu* em Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR (e-mail: elaine@fag.edu.br).
- ** Doutora em Bioquímica, Professora Adjunta, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.
- *** Doutora em Bioquímica, Professora Adjunta, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR (e-mail: marinakk@unioeste.br).

1 INTRODUÇÃO

A indústria brasileira de cerveja gera grandes quantidades de resíduos sólidos (bagaço de cevada), resultantes dos processos efetuados. Estima-se que a quantidade de resíduo de cevada produzida anualmente no Brasil deve ser de aproximadamente dois milhões de toneladas e seu único destino tem sido a dieta de ruminantes (CABRAL FILHO, 1999; MELLO e PAWLOWSKY, 2003). Esses resíduos apresentam elevado teor de proteínas e carboidratos podendo ser aproveitados como substrato para produção de enzimas por microrganismos. Entre os diversos resíduos agroindustriais com potencial para uso como substrato em bioprocessos encontra-se o bagaço de cevada, produzido em larga escala pela indústria cervejeira. Após a utilização do grão de cevada na fabricação da cerveja resta a “polpa úmida de cerveja” ou “bagaço de cevada”, bagaço de malte, ou ainda, “cevada úmida” como é conhecida popularmente (CAMPO e LIZIEIRE, 2006). Segundo REINOLD (1997), um dos principais resíduos da produção de cerveja é o bagaço de malte que representa 85% dos subprodutos do processo. Sua composição envolve principalmente materiais nitrogenados, fibra, lipídeos e lignina. A cada 100 litros de cerveja produzida são gerados 20 kg de bagaço, utilizados somente como ração animal.

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de microrganismos como agentes redutores de matéria orgânica para eliminação ou redução de compostos tóxicos (TAVARES et al., 1998).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a diversos substratos, entre os quais efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais e resíduos derivados de petróleo (TAVARES et al., 1998).

Diversos resíduos estão sendo aproveitados como substratos na produção de enzimas pelos microrganismos. Resíduos lignocelulósicos como palha de arroz, palha de trigo, farelo de trigo e bagaço de cana tem sido utilizados para produção de xilanase com *Aspergillus fumigatus* (ANTHONY et al., 2003). A produção de xilanase por fungos filamentosos está relatada para várias espécies como, *Aspergillus* sp (SOUZA, SOUZA e PERALTA, 2001; PALMA, 2003); *Fusarium* sp (SAHA et al., 2002), *Melanocarpus* sp e *Penicillium* sp (PALMA et al., 1996; PALMA, 2003).

Xilanases são β-glucanases capazes de catalisar a hidrólise do xilano e devido à sua estrutura heterogênea demandam complexo xilanolítico para sua total degradação e não apenas uma enzima. Os componentes desse sistema que têm sido mais extensivamente estudados são as endoxilanases e as - β-xilosidases. Dependendo de sua origem biológica, uma ou mais isoformas de endo – 1,4-β-xilosidase (1,4-β-D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) clivam o xilano randomicamente em suas ligações β-1,4 em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose. Já a β-xilosidase (β-D-xilosídeo-xilohidrolase, EC 3.2.1-37) hidroliza xilobiose e pequenos xilo-oligossacarídeos em regiões não-redutoras até xilose. Endo-xilanases, os maiores componentes do sistema xilanolítico de microrganismos, têm sua ação facilitada por enzimas acessórias que removem as ramificações da cadeia do xilano como a α-L-arabinofuranosidase, α-glucuronidase, acetilxilano esterase e ácido felúrico esterase, entre outras (PRADE, 1995; SIMÃO, SOUZA e PERALTA, 1997; ZANOELO et al., 2004; POLIZELI et al., 2005; COLLINS, GERDAY e FELLER, 2005).

O grande interesse pelas enzimas xilanases está relacionado com seu potencial de aplicação na indústria e sua eficiência vem sendo estudada nos processos de clareamento de polpa de papel, recuperação de fibras celulósicas têxteis e bioconversão da biomassa em combustíveis e substâncias químicas (PRADE, 1995). Na panificação, por exemplo, as xilanases são adicionadas ao pão para aumentar o seu volume específico, determinando a textura do miolo e seu sabor final (CAMACHO e AGUIAR, 2003). Na fabricação de cerveja ocorre liberação de longas cadeias arabinoxilanás, que aumentam a viscosidade podendo deixar a cerveja turva. As xilanases auxiliam na solubilização das arabinoxilanás a oligossacarídeos menores, diminuindo sua viscosidade e consequentemente eliminando a turbidez da cerveja. A produção de etanol a partir de pentoses como a xilose vem sendo amplamente estudada (RIZZATTI, 2004).

No presente trabalho estudou-se a produção de xilanase por *Aspergillus casielus*, utilizando diversas fontes de carbono. Foram investigadas também as características bioquímicas da xilanase, pH, temperatura, estabilidade térmica e produtos de hidrólise do xilano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 O MICRORGANISMO E SUA MANUTENÇÃO

O fungo *Aspergillus casielus* foi mantido em meio de ágar-batata-dextrose (BDA) a temperatura de 4°C por até 30 dias para a obtenção de conídios, depois transferidos ao meio de cultivo.

2.2 MEIOS DE CULTURA

Para fermentação semi-sólida utilizou-se o meio mineral de Czapecck, contendo NaNO_3 (0,3 %), KHPO_4 (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 %), KCl (0,05%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001%) e pH ajustado para 7,0. Em frascos erlenmeyer (250 mL) foram colocados 5 g da fonte de carbono e adicionados 10 mL do meio mineral, sendo as culturas esterilizadas em autoclave a 121° C por 15 minutos. Todos os resíduos agroindustriais utilizados como substratos foram desidratados em estufa a 50°C e armazenados em temperatura ambiente para serem utilizados como fonte de carbono. Somente as cascas de laranja e de amendoim foram trituradas em moinhos após a secagem em estufa.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E OBTENÇÃO DA ENZIMA

As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de solução com 10^5 esporos por mL, ressuspensos em água destilada e transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo meio de cultura e a fonte de carbono. Os meios suplementados com as fontes de carbono foram incubados a 25°C, em condições estáticas, por período variável estipulado para cada experimento. Após o desenvolvimento das culturas em fermentação semi-sólida foram adicionados 50 mL de água destilada estéril, seguido de agitação em shaker a 250 rpm por 45 minutos a 25°C. A cultura foi filtrada com auxílio de bomba a vácuo e obteve-se o extrato bruto a ser utilizado para as determinações das atividades xilanolíticas.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTÉICA

Determinou-se a atividade da enzima xilanase incubando 1,0 mL da enzima (extrato bruto) com 1,0 mL de substrato xilana de birchwood 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, durante 60 minutos, em banho-maria a temperatura de 40°C. Em intervalos de 0, 10, 20, 40 e 60 minutos, alíquotas de 0,25 mL foram retiradas da solução e transferidas para tubos contendo 0,25 mL da solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959) para interrupção da reação. Os tubos de reação foram aquecidos por 5 minutos em banho-maria fervente, resfriados em água corrente e adicionados 5,0 mL de água destilada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores (xiloooligossacarídeos) liberados foi estimada de acordo com a curva padrão da xilose. A unidade de atividade xilanásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores por minuto, em cada 1,0 mL do extrato enzimático bruto (U/mL).

As proteínas foram estimadas no extrato bruto pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão e leitura em espectrofômetro a 595 nm.

2.5 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE XILANASE

As culturas foram desenvolvidas conforme o item 2.2, variando-se as seguintes fontes de carbono: bagaços (cana, cevada, milho verde), cascas (amendoim e laranja), germe de trigo e resíduo fibroso da

mandioca de farinheira. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa por 96 horas a 25°C. Após a interrupção dos cultivos extraiu-se o extrato enzimático, sendo as atividades xilanásicas dosadas e as quantidades de proteína estimadas para o cálculo da atividade específica da xilanase.

2.6 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO FUNGO *A. casielus* NA PRODUÇÃO DE XILANASE

O fungo *A. casielus* foi inoculado em frascos de erlenmeyer, contendo o meio de sais Czapecck e bagaço de cevada. A cada 24 horas uma das culturas foi interrompida e após a extração do extrato bruto foram realizadas as dosagens enzimáticas e protéicas.

2.7 INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DA XILANASE

O substrato xilano 1% foi preparado utilizando-se tampão MCILVAINE (1921) em faixas de pH 2,5 a 8,0 e as dosagens enzimáticas realizadas como descrito anteriormente.

2.8 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE DA XILANASE

Foram preparados vários ensaios enzimáticos, ajustando-se em cada um deles a temperatura do banho-maria em escala de temperatura entre 35 a 70°C com intervalo de 5 °C.

Para investigar a estabilidade térmica, a enzima foi incubada em banho-maria com temperatura ajustada em 45, 50 e 55°C por período que variou de 0 a 90 minutos. As alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 90 minutos e mantidas em banho de gelo. Em seguida, essas alíquotas foram utilizadas para a dosagem da xilanase residual pelo método de DNS (MILLER, 1959).

2.9 CROMATOGRAFIA EM PAPEL DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO XILANO

A xilanase foi incubada com o substrato xilano 1% (dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5) em banho-maria a 40°C. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos e levadas à fervura por cinco minutos. Volumes de 10 µL do padrão xilose 1 mg/mL e 15 µL das amostras anteriormente incubadas foram aplicados em pontos demarcados em papel Whatman nº1. Efetuou-se a análise por cromatografia ascendente em temperatura ambiente, utilizando como sistema solvente benzene: butanol: piridina: água destilada (1: 5: 3: 3). Os cromatogramas foram revelados com nitrato de prata (MAYER e LARNER, 1959).

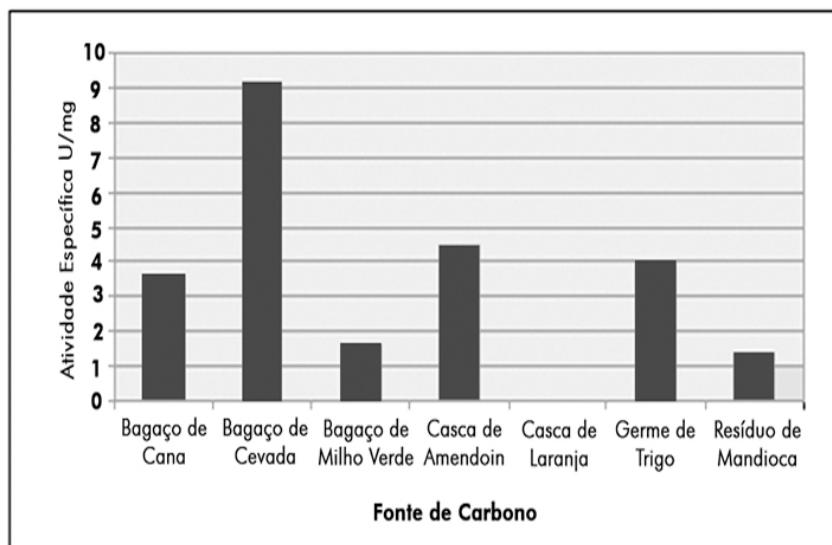
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE XILANASE POR *A. casielus*

Dentre as fontes de carbonos testadas na produção de xilanase pelo fungo *A. casielus* em condições de fermentação semi-sólida, os melhores indutores foram o bagaço de cevada seguido pela casca de amendoim (atividade específica de 9,22 U/mg de proteína e 4,55 U/mg, respectivamente). As demais fontes de carbono testadas (bagaço de cana, bagaço de milho verde, casca de laranja, germe de trigo e resíduo fibroso da mandioca) induziram fracamente a produção de xilanase (Figura 1). Na literatura são encontrados vários trabalhos utilizando resíduos industriais e agroindustriais como fonte indutora de xilanase como o bagaço de cana (PALMA *et al.*, 1996; SOUZA, ROBERTO e MIGALRES, 1999; PANDEY *et al.*, 2000), sabugo de milho (KADOWAKI *et al.*, 1997; DAMASO, ANDRADE e PEREIRA, 2000), farelo de trigo (GOMES, GOMES e STENER,

1994), casca de coco verde (COELHO *et al.*, 2001) e polpa de tomate (RAWASHDEH, SAADOUN e MAHASNEH, 2005). GUPTA *et al.* (2001) observaram que a utilização de resíduos como farelo de trigo, bagaço de cana, sabugo de milho e cavaco de madeira gerou produção cinco vezes maior de xilanase por *Staphylococcus* spp, quando comparado aos resultados obtidos com xilose e xilana pura. Os fungos *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete Chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102 também produziram xilanase e celulase quando crescidos com resíduos agrícolas (bagaço de cana tratado e não-tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó) (ABD-EL-NASSER, HELMY e GAMMAL, 1997). SILVA *et al.* (2005) obtiveram produção de xilanase com o fungo *T. arantiacus* em fermentação em estado sólido utilizando sabugo de milho, grama e palha de milho.

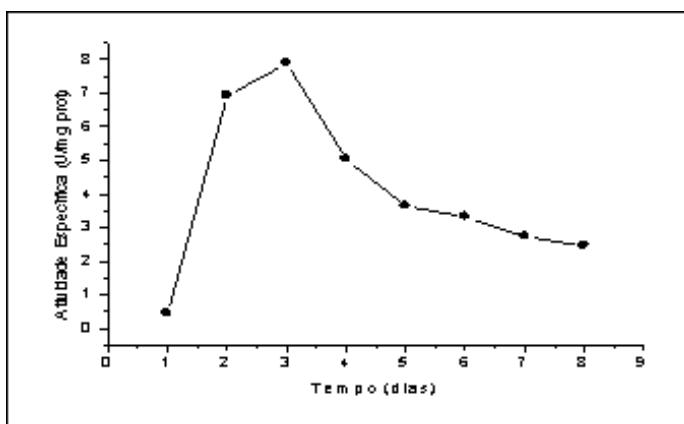
FIGURA 1 - EFEITO DAS FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE XILANASE PELO FUNGO *A. casielus* EM CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA POR 96 HORAS DE CULTIVO A 25°C



3.2 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO *A. casielus* NA PRODUÇÃO DA XILANASE

Na Figura 2 está representado o perfil da produção de xilanase durante 10 dias de incubação de *A. casielus* com resíduo industrial de cervejaria em condições de fermentação semi-sólida. Atingiu-se produção máxima de xilanase no 3º dia (72 horas) com atividade específica de 7,88 U/mg proteína. Verificou-se aumento progressivo de produção de xilanase no período de 24 para 72 horas de cultivo, com posterior queda e estabilização na produção da enzima. A celulase também foi dosada neste experimento, não sendo observada indução dessa enzima com essa fonte. *Aspergillus niger*, cultivado em fermentação semi-sólida com resíduo industrial da casca de coco verde, também evidenciou produção máxima de xilanase entre 24 e 96 horas de cultivo (COELHO *et al.* 2001). Estudo da produção de xilanase por cepas de bactérias isoladas da Amazônia, como a cepa BL 53 identificada como *Bacillus subtilis* cultivada com resíduo fibroso da soja (gerado na produção da proteína da soja), mostrou atividade específica de 5,19 U/mg de xilanase em 72 horas de cultivo em condições de fermentação semi-sólida (HECK, HERTZ e AYUB, 2002).

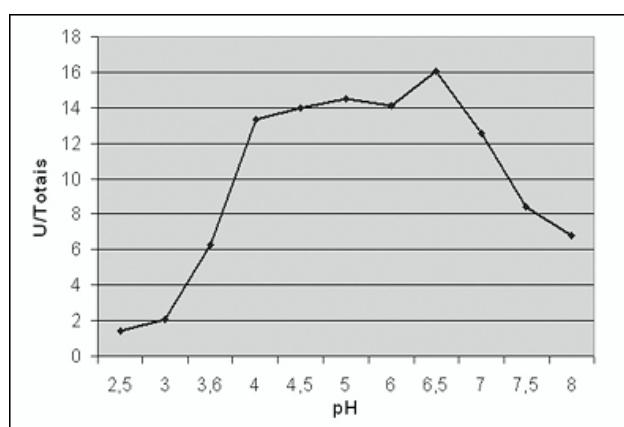
FIGURA 2 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DE *A. casielus* NA PRODUÇÃO DE XILANASE



3.3 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILANASE

A xilanase produzida por *A. casielus* apresentou atividade enzimática estável entre pH 4,5 a 6,5, com atividade máxima em pH 6,5. Acima desses valores a atividade diminuiu sensivelmente (Figura 3). RAWASHDEH, SAADOUN e MAHASNEH (2005) observaram atividade máxima de xilanase de *Streptomyces sp* também em pH 6,5. POLIZELLI et al. (2005) relataram que a maioria dos fungos das espécies de *Aspergillus* citadas na revisão sobre xilanases apresentam pH ótimo na faixa de 4,0 a 6,0, exceto o *Aspergillus nidulans* KK-99 (pH 8,0) e *Aspergillus nidulans* (pH 7,0). Segundo PALMA (2003) as xilanases provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo as melhores atividades enzimáticas constatadas em pH entre 4 e 7.

FIGURA 3 - PERFIL DA ATIVIDADE XILANÁSICA DE *A. casielus* EM FUNÇÃO DO pH

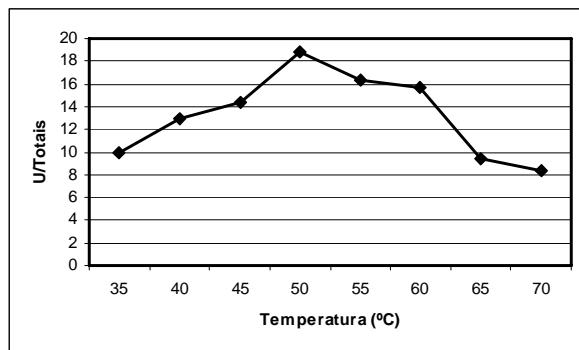


3.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA XILANASE

A xilanase apresentou temperatura ótima de 50°C com 18,77 U/totais. Como pode ser observado na Figura 4 houve queda significativa na atividade da enzima em temperaturas superiores a 50°C. Em *Aspergillus phoenicis*, três tipos de xilanases parcialmente purificadas mostraram temperaturas ótimas entre 45 e 50° C (RIZZATI et al., 2004). BEG et al. (2001) também relataram temperaturas ótimas de 50°C das xilanases produzidas pelos fungos *Acrophialophora nainiana* (XIMENES et al., 1999), *Aspergillus kawachii* IFO 4308 (ITO, IWASHITA e IWANO, 1992) e *Aspergillus*

sojae (KIMURA, SASAHARA e TAJIMA, 1995). POLIZELI et al. (2005) citaram outras espécies de *Aspergillus* com temperaturas ótimas de 50°C para atividade xilanolítica, o *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus sp*, *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus terreus*.

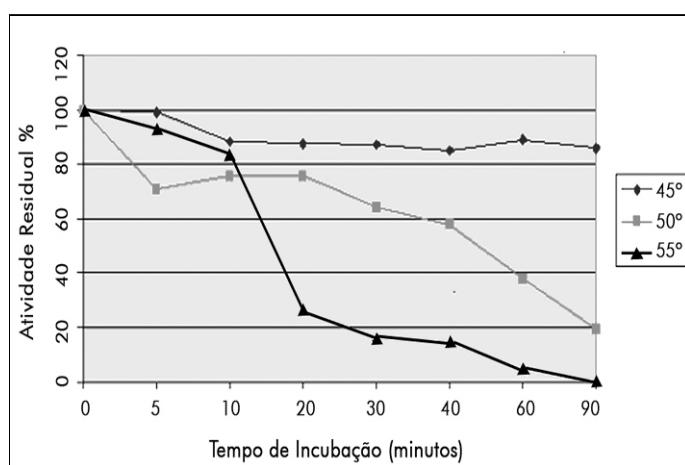
FIGURA 4 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE XILANÁSICA



3.5 ESTABILIDADE TÉRMICA DA XILANASE

A estabilidade térmica da xilanase incubada nas temperaturas de 45, 50 e 55°C durante 90 minutos está representada na Figura 5. Observou-se que a atividade xilanolítica a 45°C manteve-se praticamente estável com perda de apenas 18% da atividade xilanolítica residual aos 90 minutos de reação. A enzima mostrou meia-vida de 50 minutos na temperatura de 50°C, a qual diminuiu para 17 minutos quando incubada a 55°C. A endoxilanase do *Aspergillus awamori* mostrou estabilidade térmica nas temperaturas de 30 a 40°C durante 300 minutos e a 50°C por 240 minutos, conforme LEMOS et al. (2000). Nos estudos de CORDEIRO et al. (2002) com *Bacillus* ssp. a enzima permaneceu 100% ativa por 2 horas em temperaturas de 30°C a 50°C, a qual foi perdida em temperaturas superiores.

FIGURA 5 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA XILANASE DE *A. casielus*

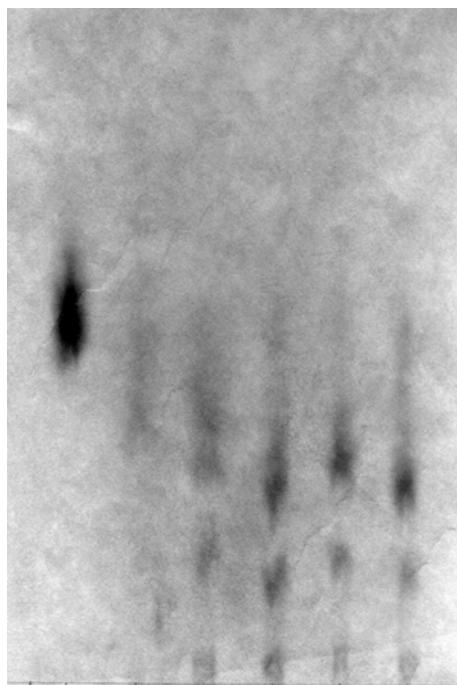


3.6 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO XILANO

Na Figura 6 está representado o perfil cromatográfico dos produtos de hidrólise do xilano birchwood 1% pela xilanase do *Aspergillus casielus*. Foram usadas amostras incubadas em presença

do substrato nos tempos: 0; 15; 30; 60 e 120 min. O cromatograma mostrou apenas traços de xilose no tempo (0) zero e formação principalmente de xilobiose, xilotriose e traços de xilose nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos, indicando a ação de endoxilanase no substrato.

FIGURA 6 - CROMATOGRAMA EM PAPEL DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO XILANO



Xyl 0 15 30 60 120

4 CONCLUSÃO

Foi possível obter quantidades significativas de endoxilanase livre de celulase pelo fungo *Aspergillus casielus*, quando cultivado em meio semi-sólido induzido com bagaço de cevada seguido pela casca de amendoim (atividade específica de 9,22 U/mg de proteína e 4,55 U/mg, respectivamente). O resíduo da indústria cervejeira foi o melhor indutor com grande potencial biotecnológico na produção de xilanase quando comparado às demais fontes de carbono testadas (bagaço de cana, bagaço de milho verde, casca de laranja, germe de trigo e resíduo fibroso da mandioca) que induziram fracamente a produção de xilanase. A xilanase desse fungo apresentou termoestabilidade em altas temperaturas. Os valores de pH e temperaturas ótimas de atividade xilanolítica mostram a viabilidade de aplicação dessa enzima nos processos industriais.

ABSTRACT

XYLANASE PRODUCTION BY *Aspergillus casielus* INDUCED WITH DIFFERENT CARBON SOURCES

This work aimed to evaluate the xylanase production by *Aspergillus casielus* using different carbon sources, such as barley residues or bagasse, sugar cane bagasse, peanut husk, cassava bagasse, wheat germ, corn bagasse and orange husk. Among the carbon sources tested on the production of xylanase by the fungus *A. casielus* in semi-solid fermentation conditions, the best inducers were the barley bagasse, followed by the peanut husk with an

specific activity of 9.22 U/mg of protein and 4.55 U/mg, respectively. The highest production of cellulase-free xylanase was obtained on the third day (72 hours) with an specific activity of 7.88 U/mg of protein. The optimal pH and temperature of xylanases activities were 6.5 e 50°C, respectively. The thermal stability of xylanase was constant at 45°C, with an activity loss of only 18% after 90 minutes of reaction. However, at 50°C and 55°C the enzyme showed a half life of 50 and 17 minutes, respectively. Analyzing the hydrolysis products of xylan by the xylanase produced by *A. casielus* the formation of several xylooligosaccharides (xylose, xylobiose, xylotriose) was verified, indicating probable action of endoxylanase.

KEY-WORDS: *Aspergillus casielus*; BARLEY BAGASSE; XYLANASE; SEMISOLID FERMENTATION.

REFERÊNCIAS

- 1 ABD-EL-NASSER, N.H.; HELMY, S.M.; EL GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, n. 7, p. 249-255, 1997.
- 2 ANTHONY, T.; RAJ, K.C.; RAJENDRAN, A.; GUNASEKARAN, P. Highest molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 647-654, 2003.
- 3 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.
- 4 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 5 CABRAL FILHO, S.L.S. **Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares correlatas**. Piracicaba, 1999. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração energia na agricultura), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- 6 CAMACHO, N.A.; AGUIAR O.G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp and its application in bakery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.104, p.159-172, 2003.
- 7 CAMPO, O. F.; LIZIEIRE, R. S. **Cevada úmida na alimentação de bovinos de leite**. EMBRAPA. Disponível em: www.cnpgl.embrapa.br/jornaleite/carta.php?pagina=4 - 25k. Acesso em: 20 de agosto de 2006.
- 8 COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca do coco verde. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n.1, p. 33-42, jan/jun 2001.
- 9 COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- 10 CORDEIRO, C.A.M.; MARTINS, M.L.L.; LUCIANO, A. B.; SILVA, R.F. Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, n.4, p.413-418, 2002.
- 11 DAMASO, M.C.T.; ANDRADE, C.M.M.C; PEREIRA, N.J. Use of corn cob for endoxylanase production by thermophilic fungus *thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 821-834, 2000.
- 12 GOMES, D. J.; GOMES J.; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 87-94, 1994.
- 13 GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G.S.; KUHAD, R.C. Improved xylanase production from haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 5-8, 2001.
- 14 HECK, J.X.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Cellulase and xylanase production by isolated Amazon *bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.213-218, 2002.
- 15 ITO, K.; IWASHITA, K.; IWANO, K. Cloning and sequencing of the xyn C gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, p.1338-1340, 1992.
- 16 KADOWAKI, K. M.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 97-106, 1997.
- 17 KIMURA, T.; SASAHARA, H.; TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n.4, p. 334-339, 1995.
- 18 LEMOS, J.L.S.; BON, E. P. S.; SANTANA, M. F.E.; JUNIOR, N.P. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3 p. 206-211, jul./set. 2000.
- 19 MAYER, C.; LARNER, J. Substrate cleavage point of a α and β amylase. **Journal Chemistry**, v. 81, p. 623-665, 1959.

- 20 McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 83-186, 1921.
- 21 MELLO, E.T.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos em uma indústria de bebidas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, n. 4, p. 249-256, 2003.
- 22 MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426–429, 1959.
- 23 PALMA, M.B.; MILAGRES, A.M.F.; PRATA, A.M.R.; MANCILHA, I.M. Influence of aeration on agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 141-145, 1996.
- 24 PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Florianópolis, 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 25 PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- 26 POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- 27 PRADE, R. A. Xylanases from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 101-131, 1995.
- 28 RAWASHDEH, R.; SAADOUN, I.; MAHASNEH, A. Effect of conditions on xylanase production *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential utilization in tomato pomace. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 251-255, 2005.
- 29 REINOLD, M.R. **Manual prático da cerveja**. São Paulo: ADEN Editora e Comunicação, 1997.
- 30 RIZZATTI, A.C.S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenicis***. Ribeirão Preto/SP, 2004. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Universidade de São Paulo.
- 31 RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; POLIZELI, M. L.T.M. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermo tolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31 p. 88-93, 2004.
- 32 SAHA, B.C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n.11, p. 1279-1284, 2002
- 33 SILVA, T.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONES, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 235-241, 2005.
- 34 SIMÃO, R.C.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl β-D-xyloside. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 267-271, 1997.
- 35 SOUZA, D.F; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 835-838, 2001.
- 36 SOUZA, M.C.O.; ROBERTO, I.C.; MILAGRES, A.M.F. Solid state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiascus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p.768-772, 1999.
- 37 TAVARES, V.B.; SIVIERI, K.; CERON, C.R.; DA SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p.722-725, 1998.
- 38 XIMENES, F.A.; SOUZA, M.V.; PULS, J.; SILVA, JR., F.G.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, p.18-21, 1999.
- 39 ZANOELLO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical properties of a thermostable xyloside-tolerant β-d-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p.170-176, 2004.

AGRADECIMENTOS

À Cervejaria Colônia pela doação do bagaço de cevada, à Faculdade Assis Gurgacz pela bolsa concedida para Elaine A. W. Kronbauer e ao Caio C. Soster pelo auxílio prestado em alguns experimentos deste trabalho.