



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação.

São José do Rio Preto
2019

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto
2019

N244p

Nascimento, Carlos Eduardo de Oliveira

Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação / Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento. -- São José do Rio Preto, 2019
78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto da Silva

Coorientadora: Ana Lucia Barretto

Penna

1. Xilo-oligossacarídeos. 2. Xilanase GH10 recombinante. 3. Prebiótico. 4. *Thermoascus aurantiacus*. 5. Xilana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção de xilo-oligossacarídeos a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa em *Pichia pastoris* e aplicação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Michel Brienzo
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr^a: Gabriela Salvador de Amo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Câmpus de Catanduva SP

São José do Rio Preto
05 de Julho de 2019

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS pela oportunidade de estar aqui neste dia.

Agradecer ao Prof. Dr. Roberto da Silva pela oportunidade de poder fazer parte do grupo de pesquisa LBMA.

Agradecer a minha família e em especial minha mãe Silvana de Oliveira Nascimento pelo dom da vida e por tudo que tem feito por mim todos esses anos e dizer que essa conquista não é somente minha e sim de todos meus entes queridos, amigos e familiares que acompanharam mesmo que de longe toda essa jornada.

Agradecer pela minha querida amiga Lorena Caixeta de Oliveira Simões pelo companheirismo e paciência, e também gostaria de dizer que foi um imenso prazer lhe conhecer no início dessa jornada, quero agradecer cada momento que passamos no LBMA, cada ensinamento, cada risada, cada desânimo e cada café, entre tantas outras coisas. Tenho imensa admiração pela sua dedicação e comprometimento em tudo que faz. (Que isso Carrrrrrrlos !!!!)

Obrigado a Josiane de Cassia Pereira por contribuir com as análises estatísticas e foi muito bom ver e acompanhar seu comprometimento com a excelência em todo trabalho que você fez e faz. (Oi Meu Anjo !!).

Gratidão por conhecer vocês: Janaina Pires, Tiago Ohe, Ana Lúcia, Pedro Lucas, Roni, Carol Santos, Erick Galindo, Gabi Okamura, Diego, Juliet, Jorge, Maitê Bernardo, Cintia, Gabi Salvador, Jaqueline Vaz, Eduardo Simioni, Eduardo Duffek, Sidney, Yuri, Gabriel, Marcos Palka, Pâmela Rahal, vocês fizeram desses dias os melhores dias.

Família LBMA vocês são os MELHORES !!!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são ingredientes com atividade prebiótica e podem ser adicionados em muitos alimentos como doces e pães ou como suplementos na forma de cápsulas ou sachês. XOS desempenham funções benéficas por estimular seletivamente o crescimento de bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na microbiota intestinal. A xilana, precursora dos XOS, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, presente na parede celular vegetal e disponível nos resíduos lignocelulósicos (RLC) como o bagaço de cana-de-açúcar. A grande disponibilidade deste material, devido ao elevado número de usinas que processam a cana-de-açúcar, o tornam alvo de inúmeras pesquisas buscando alternativas para o seu melhor aproveitamento. Uma destas alternativas se configura na produção dos XOS, o qual consistiu no objetivo deste trabalho. Inicialmente foram estudados métodos de extração da xilana, estabelecendo, ao final, um processo multi etapas empregando NaOH 15% (m/v) / ácido fosfórico / etanol 96%. Então, foi avaliado o efeito da granulometria na eficiência da extração desta fração (avaliada com teor de xilose) obtendo-se os seguintes resultados: granulometrias < 1 mm, 1 mm e 1,41 mm e > 1,41 resultaram em 83,41% ± 2,08%, 51,74% ± 2,58% e 31,85% ± 1,42% de xilana respectivamente. A extração de xilana também foi avaliada onde foi obtido um índice de recuperação de 91,15% ± 1,96%, 44,22% ± 2,13% e 18,62% ± 4,63% de xilana respectivamente de acordo com as granulometrias citadas acima. A hemicelulose que apresentou melhor extração foi submetida a hidrólise enzimática para produção de xilo-oligossacarídeos pela enzima xilanase GH10 recombinante de *Thermoascus aurantiacus* expressa por *Pichia pastoris*. Foi aplicado um planejamento estatístico do tipo Face Centrada com 2 fatores envolvidos (carga de enzima e concentração de hemicelulose), visando a otimização da produção de XOS e as condições ótimas obtidas foram, 220 U de xilanase g⁻¹ de xilana e 25% de xilana. Nestas condições foi possível obter 28,62±1,29 g L⁻¹ de XOS com predominância de xilobiose, xilotriose e xilotetraose. Estudos de inibição mostraram que a xilanase GH10 foi inibida em concentrações superiores a 50 mM de xilose. A capacidade dos XOs de estimularem o crescimento de *Lactobacillus*, comparativamente a glicose e xilose, mostraram que 5 cepas de *Lactobacillus* foram capazes de crescer utilizando os XOS como fonte de carbono.

Palavras-chave: Xilo-oligossacarídeos, Xilanase GH10 recombinante, prebiótico, *Thermoascus aurantiacus*, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

Xylo-oligosaccharides (XOS) are ingredients with prebiotic activity and can be added in many foods as sweets and breads or as supplements in the form of capsules or sachets. XOS perform beneficial functions by selectively stimulating the growth of probiotic bacteria of the genus Lactobacillus and Bifidobacterium in the intestinal microbiota. Xylan, the precursor of XOS, is the second most abundant polysaccharide in nature, present in the plant cell wall and available in lignocellulosic (RLC) residues such as sugarcane bagasse. The high availability of this material, due to the high number of sugarcane processing plants, makes it the target of numerous researches seeking alternatives for its better use. One of these alternatives is the production of XOS, which consisted of the objective of this work. Initially, xylan extraction methods were studied, establishing in the end a multistate process using NaOH 15% (m / v) / phosphoric acid / ethanol 96%. The effect of the granulometry on the efficiency of the extraction of this fraction (evaluated with xylose content) was evaluated, with the following results: granulometry <1 mm, 1 mm and 1.41 mm and > 1.41 resulted in 83.41% ± 2.08%, 51.74% ± 2.58% and 31.85% ± 1.42% of xylose respectively. Hemicellulose extraction was also evaluated where a recovery index of 91.15% ± 1.96%, 44.22% ± 2.13% and 18.62% ± 4.63% of hemicellulose was obtained according to granulometries cited above. The hemicellulose that presented the best solubilization was submitted to enzymatic hydrolysis for the production of xylo-oligosaccharides by the recombinant xylanase GH10 enzyme of Thermoascus aurantiacus expressed by Pichia pastoris. A statistical analysis was applied with two factors involved (enzyme loading and hemicellulose concentration), aiming at the optimization of XOS production and the optimum conditions obtained were 220U xylanase and 25% xylan. Under these conditions it was possible to obtain 28,62±1,29 g L⁻¹ of XOS with predominance of xylobiose, xylotriose and xylo-tetraose. Inhibition studies showed that xylanase GH10 was inhibited at concentrations greater than 50 mm xylose. The ability of XOs to stimulate growth of Lactobacillus, compared to glucose and xylose, showed that 5 strains of Lactobacillus were able to grow using XOS as the carbon source.

Keywords: Xylooligosaccharides, recombinant xylanase GH10, prebiotic, Thermoascus aurantiacus.

Lista de figuras

Figura 1: Esquema tridimensional da matriz lignocelulósica.	15
Figura 2: Fibra de celulose com regiões cristalinas e amorfas	16
Figura 3: Estrutura química de xilano	17
Figura 4: Representação estrutural de xilanas: homoxilanas, glucuronoxilanas, galactoglucomananos, xiloglucanas, arabinoglucanas.....	18
Figura 5: Estrutura química de um heteropolímero de lignina	19
Figura 6: Esquema do resíduo antes e depois do pré-tratamento.....	22
Figura 7: Modo de ação de xilanases GH10 na cadeia de xilana.....	24
Figura 8: Preparo do bagaço de cana-de-açúcar. (A) Lavagem, (B) Secagem, (C) Trituração	28
Figura 9: Padronização do bagaço de cana-de-açúcar.....	28
Figura 10: Fluxograma da 1ª etapa de extração da xilana	33
Figura 11: Fluxograma da 2ª etapa da extração da xilana	33
Figura 12: Presença de hemicelulose na biomassa de acordo com a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar.....	41
Figura 13: Separação de etanol hemicelulose e resíduo derivado da neutralização do pH.....	44
Figura 14: Análise por espectrometria de infravermelho <i>FTIR-ATR</i>	50
Figura 15: Perfil de ação da enzima Xilanase – GH10 e liberação de XOS em xilana <i>beechwood</i>	52
Figura 16: Avaliação da atividade enzimática na presença de xilose em diferentes concentrações.	53
Figura 17: Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis carga de xilana e carga de xilanase na hidrólise da xilana utilizando planejamento estatístico (Face Centrada 2^2), tendo como resposta a liberação de XOS	56

Figura 18: Função de desejabilidade para produção de XOS a partir da xilana extraída do BC, influência dos fatores substrato (xilana) e enzima (xilanase GH10)	57
Figura 19: Avaliação da atividade enzimática na presença de xilose em diferentes concentração.....	58
Figura 20: Crescimento das cepas probióticas sob a influência de diferentes fontes de carbono	62
Figura 21: Ácidos orgânicos produzidos em 48 horas de fermentação	64

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores codificados e reais do delineamento fatorial completo do tipo Face Centrada (FC) 2^2 utilizado na hidrólise da xilana do bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Tabela 2: Formulação da suplementação na fonte de carbono.....	36
Tabela 3: Composição química das biomassas obtidas no processo de extração de hemicelulose de bagaço-de-cana de diferentes granulometrias.....	39
Tabela 4: Composição química da biomassa após a extração da hemicelulose.....	39
Tabela 5: Avaliação do valor aproximado do processo de extração da hemicelulose do bagaço de cana.....	46
Tabela 6: Levantamento de custo na etapa de precipitação da hemicelulose e custo total aproximado do processo de extração da hemicelulose	47
Tabela 7: Avaliação do custo operacional na extração da hemicelulose do presente trabalho	48
Tabela 8: Atividade de xilanase GH10 sobre diferentes substratos	51
Tabela 9: Estrutura do planejamento estatístico Face Centrada 2^2 e resultados	55
Tabela 10: Influência do tempo sobre a produção de xilo-oligossacarídeos..	59

Lista de abreviações

ANOVA – Análise de variância

ART – Açúcares Redutores Totais

BC – Bagaço de cana

BMGY - *Buffered Glycerol-complex Medium*

BMMY - *Buffered Methanol-complex Medium*

CFT – Compostos Fenólicos Totais

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP – *Degrees of polymerization*

FTIR-ATR – *Fourier transform infrared-attenuated total reflectance*

HPLC – *High performance liquid chromatography*

KOH – Hidróxido de potássio

MRS – Man, Rugosa e Sharpe

RBC – Resíduo de Bagaço de cana

U – Unidade de enzima

X1 – Xilose

X2 – Xilobiose

X3 – Xilotriose

X4 – Xilotetrose

X5 – Xilopentose

X6 – Xolihexose

XBC – Xilana de bagaço de cana

XBW – Xilana *Beechwood*

XOS – Xilo-oligossacarídeos

Xyna – Gêne de xilanase

Sumário

1 Introdução	12
2 Revisão Bibliográfica	14
2.1. Resíduo lignocelulósico	14
2.2 Características químicas	14
2.2.1 Celulose	15
2.2.2 Hemicelulose	16
2.2.3 Lignina	18
2.3 Enzimas	19
2.3.1 Endo- β -1,4-D-Xilanases	19
2.4 <i>Thermoascus aurantiacus</i>	20
2.5 Pré-tratamento	21
2.6 Método de extração da hemicelulose	22
2.7 Aplicação biotecnológica das xilanases	23
2.8 Xilo-oligossacarídeos (XOS)	23
2.9 Prebióticos e Probióticos	25
3 Objetivo geral	27
3.1 Objetivos específicos	27
4 - Materiais e métodos	28
4.1 Padronização no bagaço de cana-de-açúcar	28
4.2 Microrganismos	29
4.3 Determinação da atividade de xilanase	29
4.4 Atividade para β – Xilosidase, β – Glicosidase e α – L – Arabinofuranosidase	30
4.5 Atividade para CMCase e Avicelase	30
4.6 Processamento e padronização do bagaço de cana de açúcar	30
4.7 Caracterização química do bagaço de cana e xilana	31
4.8 Análise estrutural do bagaço por FTIR-ATR	31
4.9 Análise de carboidrato por cromatografia de troca iônica	31
4.10 Extração de xilana do bagaço de cana	32
4.11 Produção dos xilo-oligossacarídeos	34

4.12 Eletroforese Capilar.....	35
4.13 Assimilação de XOS por cepas de <i>Lactobacillus</i>	36
4.14 Avaliação e quantificação de ácidos orgânicos produzidos na fermentação ...	36
 5 Resultados e Discussões	38
5.1 Extração da hemicelulose	38
5.3 Análise do custo estimado da extração de hemicelulose de bagaço de cana utilizando diferentes métodos.....	41
5.4 Caracterização da hemicelulose por FTIR-ATR	49
5.5 Característica funcionais da enzima e ação sobre diferentes substrato	50
5.6 Perfil de hidrólise de xilana beechwood pela ação da xilanase GH10.....	51
5.7 Testes de inibição da atividade enzimática por xilose	53
5.8 Produção de XOS a partir de hidrólise enzimática	54
5.9 Efeito do tempo na produção de XOS	58
5.10 Assimilação de XOS por diferentes cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i>	60
5.11 Análise da fermentação dos XOS.....	63
6. Conclusões.....	65
7. Trabalhos futuros	66
Referências	67

1 Introdução

O aumento da demanda por alimentos funcionais impulsiona pesquisas em exploração e desenvolvimento de novos ingredientes eficientes em promover a saúde e o bem estar do consumidor, tornando-se, assim, um assunto de interesse científico e econômico no cenário mundial (SAMANTA et al., 2012, 2015).

Neste sentido, os ingredientes prebióticos vêm sendo utilizados na suplementação alimentar devido as suas características multifuncionais benéficas quando ingeridos. Esses efeitos podem ser, por exemplo: estímulo ao crescimento seletivo da microbiota intestinal benéfica que são as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, controle no crescimento de patógenos presentes no intestino, produção de ácidos graxos de cadeia curta como ácido lático, ácido propiônico, ácido butírico entre outros, atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória e promoção da diminuição do colesterol ruim LDL (AACHARY; PRAPULLA, 2011a; ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017).

Neste contexto, os xilo-oligossacarídeos despontam como uma classe de prebióticos de grande interesse para a área de alimentos funcionais por apresentar as características descritas acima e, sobretudo, pela ampla disponibilidade de seu precursor, a xilana, presente na fração hemicelulósica de biomassas em geral. Os resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, farelo de trigo, casca de arroz, sabugo de milho, entre outros, são fontes da xilana. Logo, o baixo custo, associado a grande disponibilidade, tornam os resíduos lignocelulósicos material de grande interesse para reaproveitamento visando a obtenção de produtos de maior valor agregado.

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico produzido em grande quantidade pela indústria sucroalcooleira devido ao processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol e açúcar. Ele é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (TRAVAINI et al., 2016). A hemicelulose, que corresponde de 20 a 35% da biomassa, é um heteropolímero constituído por açúcares de cinco e seis carbonos, com destaque para as pentoses D-xilose (que é o açúcar majoritário de sua composição) e L-arabinose, e para as hexoses D- glucose, D- manose, D-galactose e D-frutose e também álcoois como *p*-cumárico, ferúlico e ácido acético. Estes açúcares podem ser utilizados para produção de

outros compostos de interesse comercial como xilitol, etanol, manitol, arabitól, entre outros (JEFFRIES, 2005).

A xilana presente na hemicelulose do bagaço de cana é constituída por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1-4), e pode apresentar ramificações ao longo da cadeia principal que podem ser açúcares como arabinose, fazendo ligação com resíduos de ácido ferúlico presente na lignina. Ramificações como ácido glucurônico podem ser encontradas ao longo da cadeia principal.

A ação de endoxilanases sobre a xilana promove a clivagem do polímero formando xilo-oligossacarídeos (XOS) de diversos graus de polimerização (DP) como a xilobiose (X2), xilotriose (X3) e xilotetraose (X4) que possuem características prebióticas. Eles têm sido descritos como promotores do crescimento seletivo de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e ainda, inibidores do crescimento de microrganismos patogênicos como *Escherichia coli*. Assim, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos sobre suas utilizações para o crescimento de diferentes microrganismo probióticos (AACHARY; PRAPULLA, 2011b).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa clonou e expressou a xilanase da família GH10 do fungo *Thermoascus aurantiacus* na levedura *Pichia pastoris*. O uso deste microrganismo como produtor da xilanase GH10 recombinante para obtenção de produtos com atividade prebiótica pode ser uma aplicação bastante interessante para a área de alimentos funcionais. Comparado ao processo convencional, empregando a linhagem selvagem do respectivo fungo, a enzima recombinante apresenta algumas vantagens, como: a) *Pichia pastoris* é um organismo GRAS (Generally Recognised As Safe) segundo o FDA (Food and Drug Administration); b) utilização de um microrganismo mais seguro do ponto de vista sanitário; c) melhor reprodutibilidade dos níveis de produção e d) menor grau de impureza no meio de produção da enzima (CEREHINO; CREGG, 2000).

Logo, o propósito do presente trabalho foi produzir a endo-xilanase recombinante a partir da levedura *Pichia pastoris* transformada e aplicá-la na xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de XOS. E, posteriormente a aplicação e avaliação da eficiência destes açúcares no crescimento de cepas de *Lactobacillus* probióticos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1. Resíduo lignocelulósico

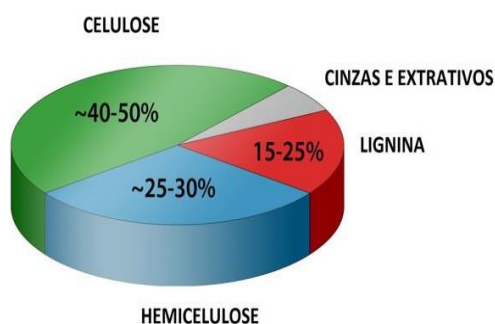
Resíduos lignocelulósicos são materiais derivados do processamento de biomassa, como o bagaço de laranja proveniente da citricultura, bagaço de cana provindo do setor sucroenergético e também serragem resultante do processamento de madeira para produção de móveis. Os resíduos lignocelulósicos podem ser caracterizados em quatro grupos: (1) biomassa florestal, (2) subprodutos da agroindústria (palha de milho, palha de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar e outros), (3) culturas energéticas: (*switchgrass*, *miscanto* e cana-energia), (4) resíduos lignocelulósicos variados: serragem, resíduos municipais e polpa vegetal (KIM; LEE; KIM, 2016).

O setor sucroenergético é um dos responsáveis pela produção da maior parte de resíduos lignocelulósicos produzido no Brasil. Cerca de 633 milhões de toneladas de cana-de-açúcar são processadas a cada ano, e esse número aumenta a cada safra. O material gerado pelo processamento da cana-de-açúcar hoje é usado como “combustível” para o aquecimento de caldeiras para produção de energia por meio da combustão convertendo-a em energia elétrica (CONAB, 2018). O bagaço de cana-de-açúcar, é um material rico em carboidrato composto de 30% a 50% de celulose, 20% a 30% hemicelulose e 20% a 30% de lignina (VALLEJOS et al., 2015), podendo ser explorado para o reaproveitamento de seus açúcares (pentoses e hexoses) e compostos fenólicos presente na biomassa (OECD, 2018).

2.2 Características químicas

Os resíduos lignocelulósicos podem se diferenciar quimicamente de acordo com a região, época do ano, espécie e partes da planta como: xilema, floema, zonas apicais, raízes, folhas, sementes, flores e frutos que podem diferenciar a composição estrutural e quantidade/variedade de carboidratos (GUERRIERO et al., 2016).

Figura 1: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: SUN e colaboradores, 2011

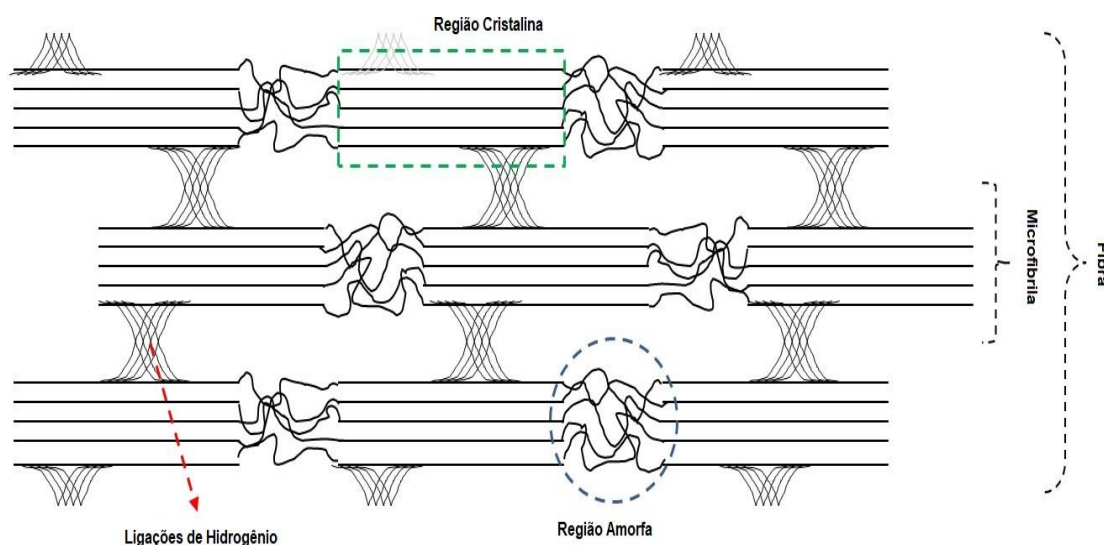
2.2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de D-glicose unidas organizadamente por ligações β -1,4-glicosídica, e podem apresentar alto grau de polimerização (7,000 a 15,000 monômeros). Esses polissacarídeos são interligados por ligações de hidrogênio onde formam-se fibrilas de celulose (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015).

Este constituinte da biomassa pode ser caracterizado em celulose cristalina e amorfa. A celulose cristalina é interligada por ligações de hidrogênio que promovem uma altíssima recalcitrância a estrutura. Esta estrutura cristalina apresenta baixa solubilidade em água e dificulta a ação de enzimas que possam vir a degradar a macroestrutura (MARIANO; EL KISSI; DUFRESNE, 2014)

Já a celulose amorfa é também constituída por D-glicose interligadas por ligações β -1,4-glicosídica mas pode ser diferenciada pela sua organização que não apresenta o mesmo padrão que a celulose cristalina e ainda a ausência de pontes de hidrogênio faz com que a estrutura seja mais solúvel e mais suscetível ao ataque de enzimas fúngicas e microbianas (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016a).

Figura 2: Fibra de celulose com regiões cristalinas e amorfas

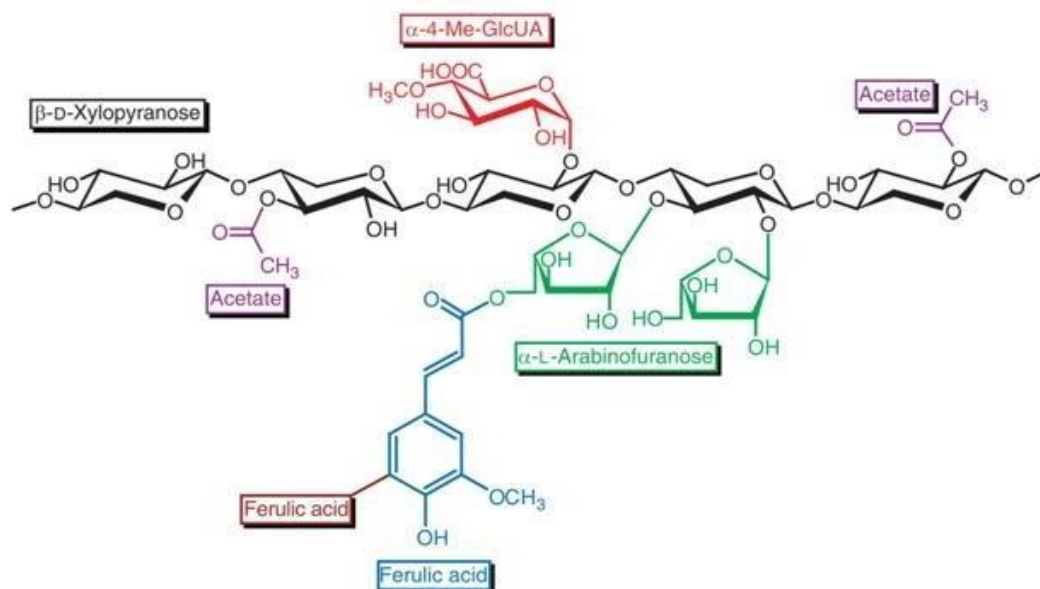


Fonte: Lin e colaboradores (2012)

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado que apresenta baixo grau de polimerização. As cadeias dos polissacarídeos são formadas predominantemente por monômeros de D-xilose, unidos por ligação β -1,4-xilosídica, e podem apresentar diversas ramificações que determinarão a sua morfologia. Os componentes dessas ramificações podem ser outros açúcares como: glicose, xilose, arabinose, manose e também podem apresentar grupos acetil, resíduos de ácido ferúlico e ácido glucurônico (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2016). As madeiras mole majoritariamente apresentam heteropolissacarídeos de O-acetil-galactoglucomanas e arabino-4-O-metilglucurono-D-xilana, já em madeiras duras há a maior predominância de O-acetil-4-O-metilglucurono-D-xilana (AACHARY; PRAPULLA, 2011b).

Figura 3: Estrutura química de xilano



Fonte: Morgan e colaboradores, 2017

As hemiceluloses podem ser classificadas de acordo com a composição de açúcares presentes em sua cadeia central, podendo ser xilanas, mananas, xilogucanas, β -1,3 e β -1,4-glucanas, β -1,4-galactanas e arabinoglucanas. Os açúcares que podem constituir tais estruturas podem ser: D-manose, D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, L-fucose, D-glicose além de ácidos urônicos como glucurônico, galacturônico e metil-galacturônico (SPORCK et al., 2017)

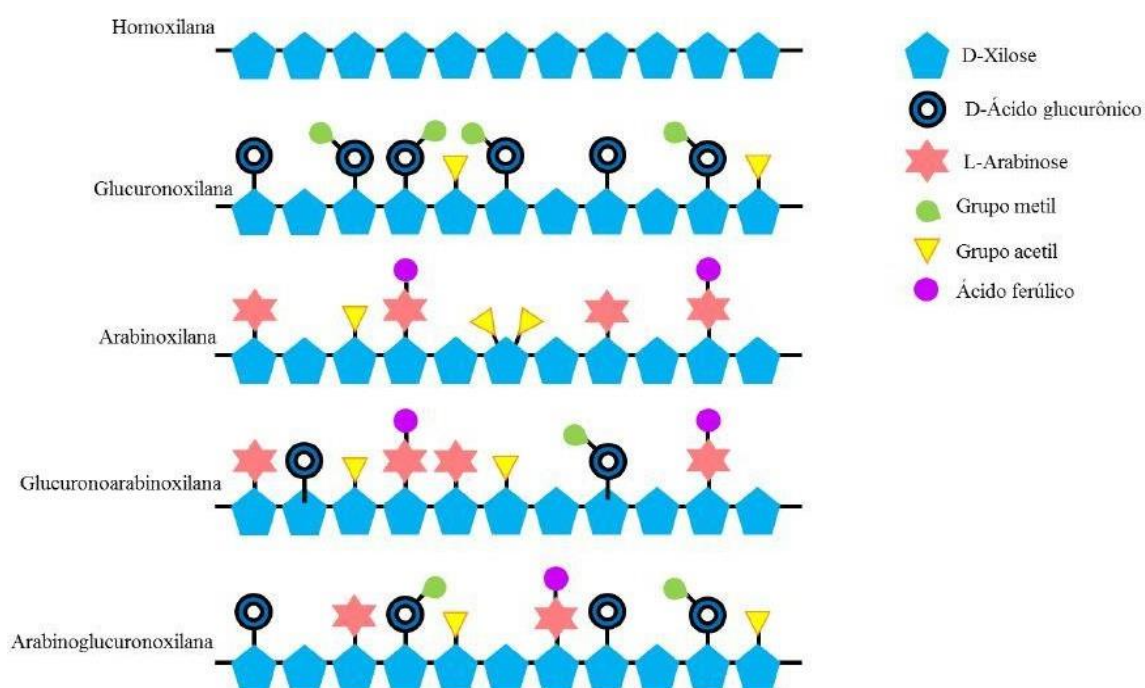
A homoxilana é um polissacarídeo raro encontrado em apenas alguns tipos de materiais vegetais como algas marinhas e em alguns tipos de casca de sementes de plantas. Ela pode ainda apresentar ligações β -1,3 ou β -1,4 na mesma cadeia. Já as heteroxilanas são encontradas em maior abundância na natureza, sendo compostas por uma cadeia central de monômeros de D-xilose ligados por ligação β -1,4-xilosídica com ramificações no carbono 2 de ácido glucurônico, que por sua vez pode ser metilado no carbono 4 (WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2016)

Outro tipo de hemicelulose é a arabinoxilana, este polímero apresenta uma cadeia central de D-xilose interligadas por ligações β -1,4-glicosídicas e apresenta ramificações de arabinose ligadas por ligação α -1,2 e α -1,3. Estas moléculas de arabinose fazem ligações diretas em resíduos de ácido ferúlico fazendo com que se liguem na matriz de lignina. Esse tipo de heteropolissacarídeo é normalmente

encontrado em cascas e sementes de alguns cereais como trigo, aveia, sorgo e milho (ZHANG et al., 2011).

As arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas apresentam uma certa semelhança em sua estrutura, sendo que as arabinoglucuronoxilanas apresentam uma maior composição de ácido glucurônico em relação a glucuronoarabinoxilana e normalmente são encontradas em coníferas (PENG et al., 2012a).

Figura 4: Representação estrutural de xilanas: homoxilanas, glucuronoxilanas, galactoglucomananas, xiloglucanas, arabinoglucanas.



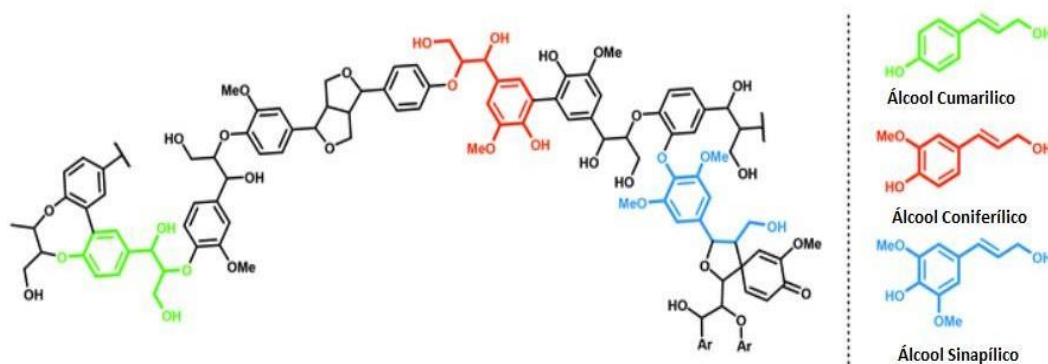
Fonte: Terrone, 2017

2.2.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero aromático, amorfo formado predominantemente por unidades de fenil-propanóides, constituindo cerca de 25 – 39% em madeiras duras e 17 – 32% em madeiras moles. Esta estrutura confere à biomassa altíssima capacidade recalcitrante, protegendo o vegetal de ataques de patógenos que possam invadir o sistema vascular das plantas (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016b). Madeiras moles são majoritariamente compostas por unidades de guaiacil, já em madeiras duras a lignina tem sua maior parte composta por unidades de siringil e uma menor parte de guaiacil. Outros compostos fenólicos encontrados de interesse

comercial são os ácidos p-cumárico, ferúlico e diferúlico. Tais componentes promovem a ligação entre lignina e a hemicelulose (JÖNSSON; MARTÍN, 2016)

Figura 5: Estrutura química de um heteropolímero de lignina.



Fonte: Karkas e colaboradores, 2016.

2.3 Enzimas

Enzimas são em sua grande maioria proteínas que apresentam a capacidade de catalisar reações. Tais proteínas, em geral, possuem alto poder catalítico e também podem apresentar alta especificidade em relação à degradação de substratos. Com base nisso, devido a sua especificidade como citado acima, hoje algumas enzimas podem ser usadas em diversas aplicações no nosso cotidiano como: lactase para pessoas com baixa tolerância à lactose, onde a enzima cliva o dímero de lactose liberando então glicose e galactose, proteases em indústrias de detergentes e sabão em pó e ainda o uso na área de produtos lácteos como queijos e amilases para o aumento da sacarificação do amido para panificação ou produção de etanol (XU; YAN; FENG, 2016).

2.3.1 Endo- β -1,4-D-Xilanases

Xilanases possuem a capacidade de hidrolisar ligações β -1,4 glicosídicas presentes na cadeia de xilana clivando-a randomicamente e produzindo oligômeros de baixo grau de polimerização (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010a; MORGAN et al., 2017; SAMANTA et al., 2012).

As endoxilanases são classificadas como glicosil hidrolases (GH), sendo as principais famílias 10 e 11. Na classe de endoxilanases da família GH10 sua estrutura físico-química pode se diferenciar da família GH11, apresentando normalmente massa molar ≥ 30 kDa e ponto isoelétrico geralmente mais baixo quando comparado aos da família GH11. Quando se trata da versatilidade e especificidade de ação, membros da família GH10 exibem diferentes comportamentos em relação as enzimas da família GH11, onde mostram maior versatilidade catalítica e menor especificidade aos substratos (DUMON et al., 2012; MORGAN et al., 2017). Xilanases da família GH10 apresentam um enovelamento típico na forma de TIM (β/α) 8 possuindo 8 folhas- β arranjadas em um barril β central rodeado por 8 α hélices, além destas, outras seis curtas hélices- α também estão presentes e dispersas ao longo da cadeia polipeptídica (JUTURU; WU, 2012). Presentes nas enzimas GH10 normalmente há dois resíduos de glutamato que são conservados na família de xilanases e estão diretamente relacionados catálise enzimática (DE SOUZA et al., 2016a).

2.4 *Thermoascus aurantiacus*

Em 1907 o botânico, Hugo Miehe isolou a primeira cepa do ascomiceto *Thermoascus aurantiacus* a partir de pilha de feno aquecida e mais tarde o fungo foi descrito por Cooney e Emerson em 1964. O fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* é um fungo termofílico que pode apresentar crescimento em faixas de temperaturas entre 40°C à 60°C. Algumas características como, crescimento em altas temperaturas, fator este que pode inibir o crescimento de outros microrganismos, o alto desempenho do fungo em produzir enzimas de interesse biotecnológico, como as celulosas e hemicelulosas, que podem apresentar ampla estabilidade em temperaturas entre 50°C e 80°C, fazem com que o fungo seja alvo de estudos, como bem explorado por (CHANWICHA e colaboradores, 2015).

O *Thermoascus aurantiacus* tem sido estudado desde então por apresentar alta produção de algumas enzimas como celulasas e hemicelulasas, logo essa característica foi objetivo de estudo pela equipe de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – UNESP – câmpus São Jose do Rio Preto. Em alguns deles, a cepa foi explorada pela capacidade de produzir alta carga de enzimas hemicelulolíticas. Franco e colaboradores (2011), exploraram a expressão

heteróloga do gene de produção de xilanase GH10, obtendo-se sucesso. E ainda, recentemente, devido ao sucesso de clonagem do gene em outro microrganismo, DE Souza e colaboradores, 2016a trabalharam no melhoramento da termoestabilidade da xilanase GH10 a nível genético.

2.4.1 Microrganismos geneticamente modificados

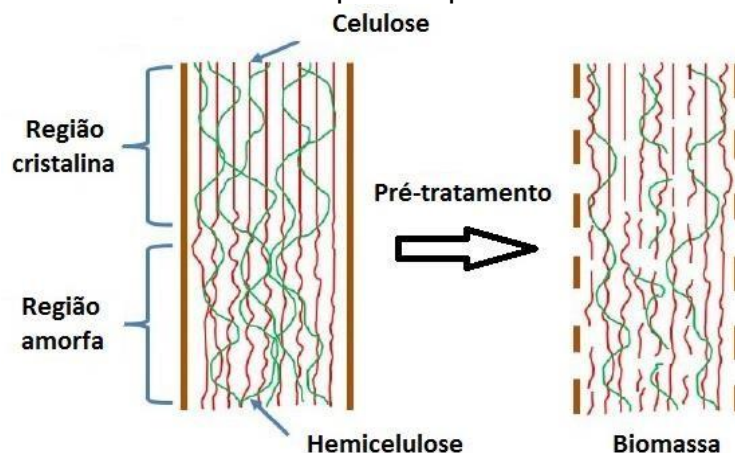
Nos últimos anos, alguns microrganismos tem sido usados como sistemas alternativos de expressão de proteínas de interesse biotecnológico. Os microrganismos frequentemente utilizados como vetores dos genes de produção de enzimas são: *Pichia pastoris*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* e no presente trabalho foi utilizado uma cepa de *Pichia pastoris* que expressa gene de produção de xilanase GH10 do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*.

Algumas características tornaram esses microrganismos eficientes na aplicação como produtores de enzimas como: não são fermentadores eficientes, sendo assim não produzem etanol em quantidades significativas durante a produção de enzimas. São microrganismos metilotróficos, pois utilizam metanol como indutor de expressão e secreção de proteínas e, ainda, possuem sistema de expressão de proteínas com interesse industrial (CEREGHINO; CREGG, 2000; DE SOUZA et al., 2016).

2.5 Pré-tratamento

Diferentes tipos de pré-tratamento têm sido utilizados a fim de desestruturar a fração de lignina que apresenta alta recalcitrância e dificulta o acesso das xilanases à fibra de xilana, impedindo, assim, o seu aproveitamento. O pré-tratamento promove a quebra das ligações da lignina fortemente atreladas a hemicelulose e celulose e, assim, enzimas podem acessar os açúcares presente na biomassa, permitindo uma posterior fermentação por microrganismos fermentadores, bem como a extração derivada para biotransformação em elementos com maior valor agregado. O pré-tratamento pode ser capaz de aumentar a porosidade da matriz, diminuir a formação de compostos que possam vir inibir a ação de enzimas ou a sua fermentabilidade e diminuir a cristalinidade da celulose (DE CASSIA PEREIRA et al., 2016).

Figura 6: Esquema do resíduo antes e depois do pré-tratamento.



Fonte: MILLATI e colaboradores, 2011

2.6 Método de extração da hemicelulose

Muitos métodos vêm sendo desenvolvidos para a extração de materiais lignocelulósicos. Tais métodos tem como base a diferença da solubilidade da hemicelulose em solventes como, álcool, ácidos e ou água que podem diferir-se em relação ao rendimento, grau de polimerização e pureza. Logo, o método de extração a ser selecionado, deve ser escolhido de acordo com a xilana que se quer obter (PENG et al., 2012b; SUN et al., 2011b; ZHANG et al., 2017).

Os tratamentos suplementados com agentes alcalinos tem maior efeito sobre a extração da hemicelulose pois atua, sobre diversas ligações entre a hemicelulose e a matriz lignocelulósica. Agentes alcalinos podem clivar ligações de hidrogênio presentes na celulose e ligações éster, formadas por ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico e ácido ferúlico) fortemente presente em moléculas de monolignóis e parte da hemicelulose solubilizada. Além de tudo, parte da hemicelulose extraída com álcali é solubilizada como decorrência da ionização de grupos laterais de ácidos urônicos carregados negativamente (GUSTAVSSON et al., 2001; WANG et al., 2014).

No presente trabalho foi abordado o uso de hidróxido de sódio para extração da hemicelulose de acordo com o método de KAUR e colaboradores, 2018 onde foi abordado o custo de extração da hemicelulose e a minimização do tempo gasto para a produção. A efetividade da ação do hidróxido de sódio sobre a extração da

hemicelulose foi relatado em aproximadamente 95% das investigações abordadas no presente trabalho.

2.7 Aplicação biotecnológica das xilanases

Ao longo de anos de estudo, as xilanases vêm sendo aplicadas em diversas áreas, desde a indústria médica até a indústria agrícola (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2016). Hoje, xilanases podem ser usadas no branqueamento da polpa Kraft na indústria de papel e celulose, uma vez que as xilanase clivam as ligações de carboidratos da lignina, melhorando a acessibilidade dos produtos químicos de branqueamento na polpa facilitando a remoção da lignina solubilizada no branqueamento (BAJPAI, 2015).

Já na indústria de alimentos as xilanases podem ser aplicadas no processamento de frutas e cereais, pois, enzimas do complexo xilanolítico podem atuar na quebra de polissacarídeos presentes no suco de maceração, aumentando assim, a eficiência na produção (NUMAN; BHOSLE, 2006). Ainda, no cenário alimentício, as xilanases podem ser aplicadas na produção de pães. As xilanases não possuem ação amilolítica, mas podem agir sobre outros polissacarídeos como o arabinoxilanos na farinha de trigo sendo que tais polissacarídeos absorvem a água presente na massa reduzindo, assim, sua maciez e ainda promove o aumento da viscosidade na massa. Com a quebra das estruturas de arabinoxilanos, a água pode ser absorvida pelo glúten e amido, resultando em uma massa com maior maciez (OLIVEIRA et al., 2010). Como resultado da ação da enzima a massa pode crescer apresentando maior volume e depois de pronto, apresenta maior tempo de prateleira (BUTT et al., 2008; NUMAN; BHOSLE, 2006).

Outra atividade que viabiliza o uso de xilanases, é o setor de produção de ração animal para frango, porcos e peixes já que são culturas que demandam pouco tempo de engorda e tal prática pode aumentar o rendimento da engorda destes animais. A utilização de celulase, pectinases e hemicelulases diminuem a complexidade do material lignocelulósico facilitando a sua digestão (NUMAN; BHOSLE, 2006).

2.8 Xilo-oligossacarídeos (XOS)

XOS são oligômeros de xilose interligados por ligação β -1,4-glicosídicas e podem ser estruturados em diferentes graus de polimerização, variando de xilobiose

(X2) até xilododecaose (X12). Tais oligômeros apresentam melhor fermentabilidade por microrganismos probióticos (AACHARY; PRAPULLA, 2011b). XOS podem ser produzidos através da clivagem do polissacarídeo de xilana por ação de xilanases (XU et al., 2009). Dependendo dos diferentes métodos usados para a produção de XOS, a sua estrutura e grau de polimerização podem variar. Como bem explorado por QUIÑONES e colaboradores (2015), diversas biomassas provenientes de resíduos agrícolas podem ser refinadas para produção de XOS ao passo que há uma ampla diversidade da composição química da biomassa lignocelulósica. O mesmo autor abordou a produção de XOS a partir de (i) gramíneas para silagem, (ii) silagem de milho e (iii) silagem com diversos tipos de gramíneas.

Figura 7: Modo de ação de xilanases GH10 na cadeia de xilana



Fonte: Adaptado de BIELY; SINGH; PUCHART (2016a)

Ainda, os XOS apresentam a capacidade de estimular o crescimento de microrganismos presentes na microbiota intestinal como os dos gêneros: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* inibindo, assim, o crescimento de microrganismos patogênicos e, ainda, podem promover um melhor desempenho nas funções do intestino promovendo a disponibilidade de cálcio por melhora de sua absorção. Também possuem efeitos citotóxicos em células leucêmicas, efeito positivo sobre diabetes mellitus tipo II e ainda exibe atividade antioxidante (JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Um estudo realizado por Okazaki e colaboradores, 1990, mostrou que microrganismos probióticos podem ter seu crescimento estimulado por XOS de diferentes graus de polimerização. Ao avaliar o perfil e assimilação de XOS por

Bifidobacterium adolescentis o autor mostra que o microrganismo apresentou preferência por X2 e X3.

HOPKINS e colaboradores, 1998 avaliaram a produção de XOS de farelo de trigo e posterior assimilação do composto por bactérias probióticas como cepas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Weissella ssp.* As três cepas mostraram preferência por X2 e X4.

2.9 Prebióticos e Probióticos

O termo prebióticos pode ser definido como um ingrediente alimentar não digerível que pode trazer efeitos benéficos a seu hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e atividade de microrganismos benéficos e, ainda, limitar o crescimento de bactérias patogênicas no intestino e, assim, melhorar a saúde do hospedeiro. Posteriormente o termo prebiótico foi redefinido como um ingrediente seletivamente fermentado, que permite mudanças específicas para microrganismo e hospedeiro, na composição e atividade da flora gastrointestinal (GIBSON et al., 1995; PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao seu hospedeiro. Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais abordadas na literatura pela sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patógenos no trato intestinal (ROBERFROID et al., 2010).

2.9.1 *Lactobacillus sp.*

Cepas do gênero *Lactobacillus* são normalmente utilizadas em alimentos, sendo um grupo heterogêneo, composta por diversas espécies e subespécies. São microrganismos ubíquos, Gram positivos, incapazes de esporular, podem ser encontrados em forma de bacilos, são microaeróbios mas apresentam crescimento ótimo em condições anaeróbias.

Os *Lactobacillus sp* podem se dividir em 2 grandes grupos, baseando-se em seu metabolismo: homofermentativos, produzem predominantemente ácido lático, já os heterofermentativos: produzem predominantemente dióxido de carbono, etanol, e/ou ácido acético e lático.

Para o seu crescimento, as cepas de *Lactobacillus* sp. utilizam nutrientes complexos sendo assim classificados como microrganismos de difícil crescimento. A temperatura ótima de crescimento de cepas do gênero *Lactobacillus* pode variar entre 30 e 40°C sendo assim classificados como microrganismos mesofílicos. Já o pH ótimo de crescimento pode variar de 5,5 a 6,2 (WIKANDRI et al., 2018).

3 Objetivo geral

Produzir XOS a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela ação da xilanase GH10 recombinante de *Thermoascus aurantiacus* e avaliar sua eficiência como agente prebiótico.

3.1 Objetivos específicos

- Aplicar xilanase recombinante da família GH10 do fungo *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa por *Pichia pastoris*.
- Avaliar a eficiência de três granulometrias de bagaço de cana-de-açúcar na extração da hemicelulose.
- Caracterizar de forma química a xilana do bagaço de cana.
- Realizar hidrólise enzimática da xilana do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos.
- Realizar hidrólise enzimática da xilana beechwood para análise de perfil de XOS liberados a partir da ação da xilanase GH10.
- Otimizar a produção dos XOS através de análises estatísticas
- Análise de custo na produção de XOS.
- Caracterizar dos XOS:
 - Eletroforese capilar
 - Cromatografia de troca iônica
- Avaliar o crescimento das cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* sob a influência XOS como fonte de carbono.
- Avaliar os metabolitos produzidos pelas cepas de *Lactobacillus*.

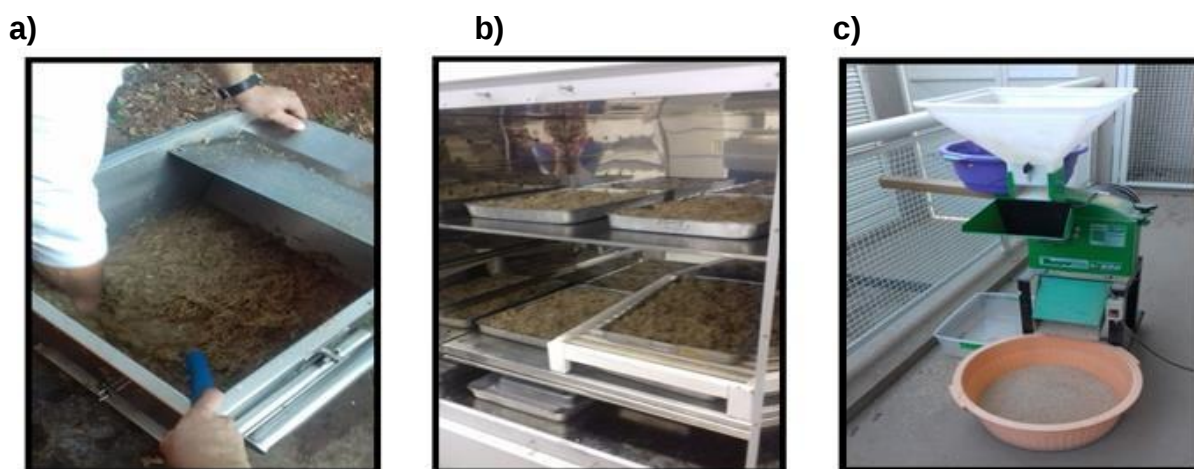
4 - Materiais e métodos

4.1 Padronização no bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana utilizado no presente trabalho foi recebido e foi submetido a lavagem para retirada de sujidades como, terra e pedras provenientes da lavoura. A lavagem consistiu em 5 ciclos com água corrente e posterior secagem a 50°C por 48 horas e ou até que atingisse umidade de $\pm 12\%$.

Após a secagem o bagaço seguiu para um processo de trituração (Figura 10) e posterior tamisação por peneiras padronizadas com abertura 1mm e 1,41mm. Desta maneira, como observado na Figura 11, foi possível obter 3 tamanhos de bagaço de cana ($< 1\text{ mm}$, $1\text{ mm a }1,41\text{mm}$ e $>1,41\text{mm}$).

Figura 8: Preparo do bagaço de cana-de-açúcar. (A) Lavagem, (B) Secagem, (C) Trituração.



Fonte: autoria própria

Figura 9: Padronização do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: autoria própria

4.2 Microrganismos

Uma linhagem de levedura *Pichia pastoris* GS 115 recombinante expressa o gene de produção de xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* foi modificada geneticamente após ser transformada com o gene da xilanase pela equipe de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP – Câmpus - São José do Rio Preto pela Dr^a. Angélica Rodrigues de Souza como parte de seu doutorado (DE SOUZA et al., 2016b).

4.2.1 Produção de xilanase GH10 por *Pichia pastoris*.

Seguindo a metodologia descrita por Franco, (2011), uma colônia isolada foi inoculada em 25mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100 mmol L⁻¹, YNB (Yeast Nitrogen Base) 1,34%, biotina 4x10⁻⁵% e glicerol 1%) em frasco de 250 mL e incubada a 30°C sob agitação (200 rpm) até atingir uma OD de 0,2 a 0,6 a 600 nm (em torno de 16 a 18 horas). As células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em 250 mL de meio BMMY (BMGY trocando glicerol 1% por metanol 0,5%) em Erlenmeyer aletado de 1L, obtendo uma OD 0,2 a 600 nm e incubadas por 96 horas sob as mesmas condições. 1 mL de Metanol 100% foi adicionado a cada 24 horas a uma concentração final de 0,5%, para manter a indução da produção de xilanase. Ao final de indução, foi possível obter um extrato enzimático com 120 U mL⁻¹ de atividade.

4.3 Determinação da atividade de xilanase.

A atividade xilanolítica foi avaliada a partir da hidrólise da xilana beechwood e xilana do bagaço de cana 1% (m/v) e quantificação dos açúcares pelo método (MILLER, 1959) que utiliza ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). As reações foram realizadas em microplaca como descrito por BIELY e colaboradores, 1997 com modificações, em 100 µL de volume reacional sendo 10 µL de extrato enzimático mais 90 µL de solução xilana *beechwood* 1% (Sigma) como substrato. A reação foi conduzida a 60°C por 10 minutos e após a reação foi adicionada 100 µL de DNS e incubados a 95°C por 10 minutos. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por min,

utilizando xilose como um produto padrão. Uma reação de controle consistiu na adição da enzima após a incubação da reação com o DNS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 Atividade para β – Xilosidase, β – Glicosidase e α – L – Arabinofuranosidase

Para a determinação da atividade de β – Xilosidase, β – Glicosidase e α – L – Arabinofuranosidase, 10 μ L do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 40 μ L de solução tampão acetato (0,05 mol L⁻¹, pH 5,0) e 50 μ L de 4 – nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo, (4mmol L⁻¹) – PNPX (Sigma), 4- nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo, (4 mmol L⁻¹) – PNPG, Sigma e 4 – nitrofenol – α – L- arabinopiranosídeo, (4mmol L⁻¹) – PNPA Sigma respectivamente. A reação foi mantida a 50°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 100 μ L de solução de Na₂CO₃ (2M L⁻¹). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

4.5 Atividade para CMCase e Avicelase

A atividade de endoglucanase (CMCase) e exoglucanase (Avicelase) foi determinada conforme o item 4.2, porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (4%) e celulose microcristalina (1%) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ART por minuto de reação.

4.6 Processamento e padronização do bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Usina Itajobi localizada no município de Itajobi no interior de São Paulo. A padronização seguiu o método desenvolvido por PERRONE e colaboradores (2016). O bagaço foi lavado em água corrente onde foi realizada cinco ciclos de lavagem para a retirada de particulados como cascalho, terra e metais provenientes da lavoura. Após a lavagem o material foi acondicionado em estufa de secagem a 40°C por 48 horas onde atingiu umidade de $\pm 13\%$. Posteriormente, o bagaço foi triturado utilizando o equipamento TRAPP®

400 com peneira interna de 1 mm. E posteriormente separados em três tamanhos: <1 mm, 1 mm a 1,41 mm e > 1,41mm.

4.7 Caracterização química do bagaço de cana e xilana.

A caracterização do bagaço foi realizada conforme SLUITER e colaboradores, 2008). Foi coletada uma alíquota de 300 mg do bagaço e adicionados em um Erlenmeyer de 200 mL, ao qual foi adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) e mantidos em repouso em temperatura ambiente por 60 minutos, após o repouso e adicionados 84 mL de água, as amostras serão submetidas a autoclave (121°C) por 1 hora para a hidrólise ácida. Logo após a solução foi filtrada em papel de filtro *whatman* 1 previamente pesados. No sobrenadante foi realizado leitura espectrofotométrica em 240 nm para quantificar a lignina solúvel, logo em seguida foi determinado o teor de xilose, glicose e arabinose por HPLC-Dionex. O material sólido, retido no filtro foi lavado com 150 mL de água quente, para retirada de todo ácido remanescente no conjunto amostra/filtro, secos em estufa a 105°C por 24 horas e pesados para obtenção da lignina insolúvel. O material restante foi submetido à mufla à 575°C para obtenção da cinza de cada amostra. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8 Análise estrutural do bagaço por FTIR-ATR.

Após o pré-tratamento o bagaço foi seco em estufa a 40°C até atingir peso constante Aproximadamente 100 mg de bagaço foram pesados para formulação de um disco de 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Os espectros foram coletados em espectrofotômetro Perkin Elmer (*FT-IR Spectrum Two – UART Two*) na região de 400 a 4000 cm⁻¹. Devido a heterogeneidade do bagaço, o feixe de luz foi direcionado em pelo menos 8 posições e construído um espectro médio para cada amostra.

4.9 Análise de carboidrato por cromatografia de troca iônica

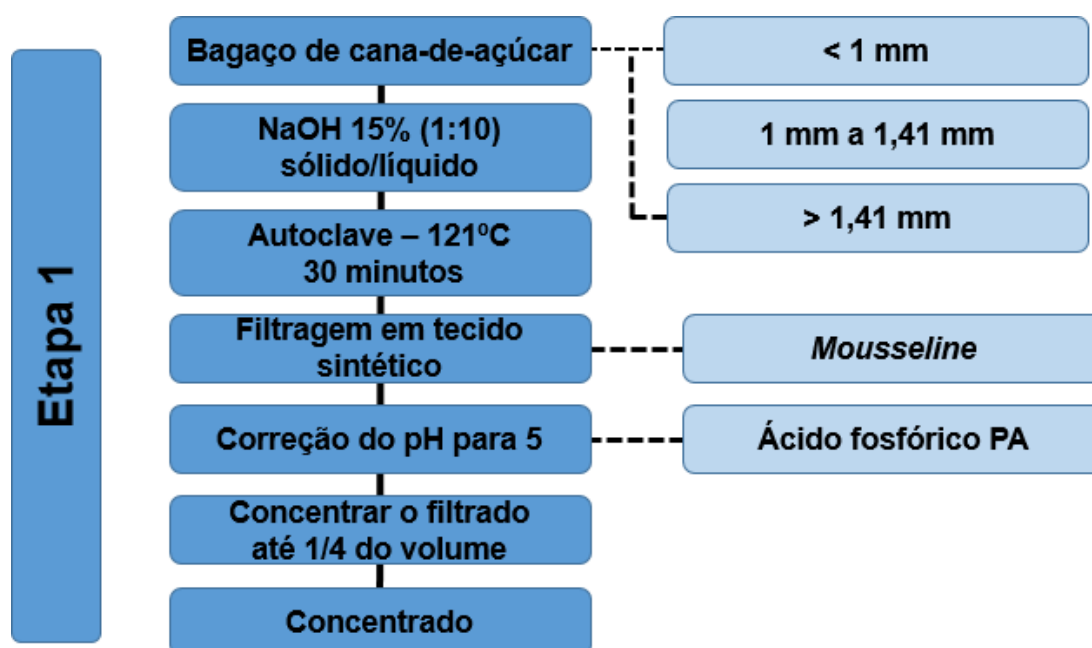
Os produtos da hidrólise foram analisados utilizando um HPAEC-PAD sistema (ICS 5000, Dionex) Todas as amostras foram filtradas em filtros de 0,22 µm e injetada no sistema HPAEC-PAD (20 µL loop de amostra). A taxa de fluxo foi de 1

mL min⁻¹ a 30°C. Todos os eluentes foram preparados com água ultrapura (18 mO cm) com N². Os xilo-oligossacarídeos foram separados usando Coluna de guarda CarboPac™ PA-100 (4mm x 50 mm) e Coluna CarboPac™ PA-100 (4mm x 250 mm). Eluente A foi usado NaOH 0,2 mol L⁻¹, eluente B foi água ultrapura e o eluente C foi acetato sódio 0,5 mol L⁻¹ em NaOH 0,15 mol L⁻¹. A primeira fase, isocrática, foi de 5 min em 50% A e 50% B, seguido por um gradiente linear de 50% A e 50% B a 44% A e 16% C ao longo de 20 min. Para identificação dos produtos foram usados Xilose (X1) Sigma, Xilobiose, Xilotriose, Xilotetrose, Xilopentose e Xilohexose (Megazyme).

4.10 Extração de xilana do bagaço de cana.

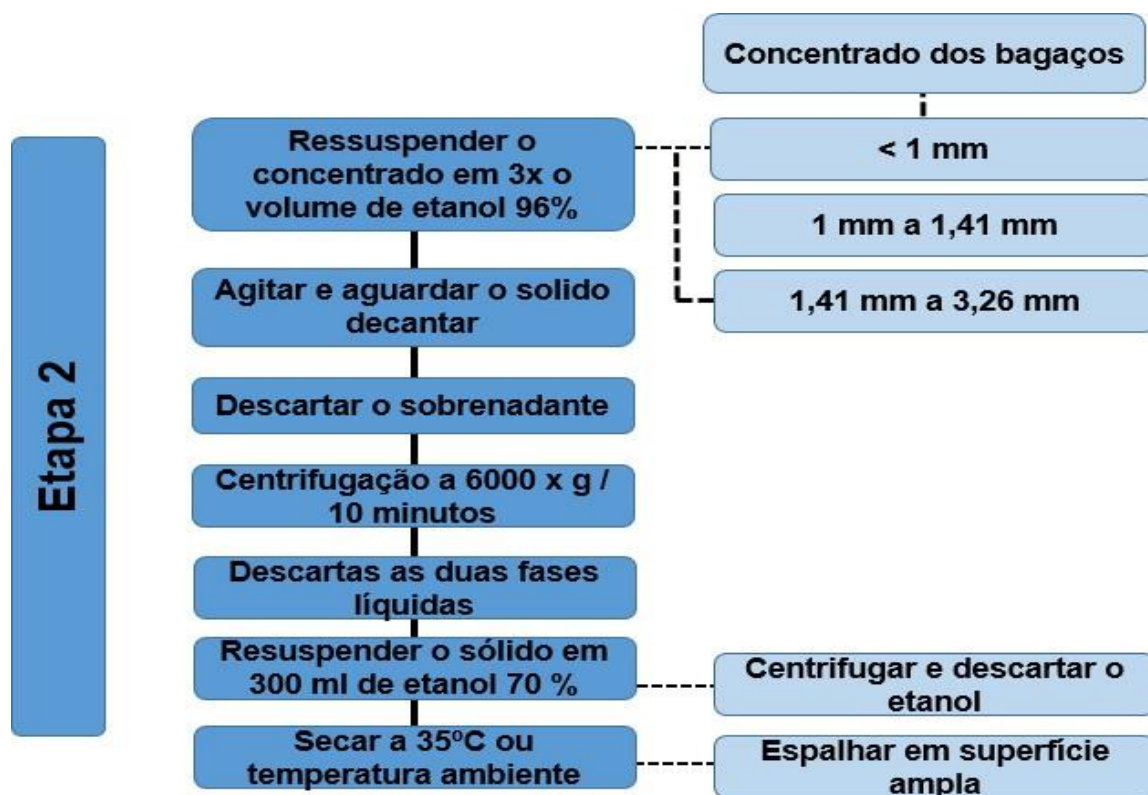
Foram usados para extração de xilana os 3 tamanhos de bagaço de cana triturados e foi empregado o método descrito por KAUR e colaboradores (2018), cujo procedimento consiste em 2 etapas. Etapa 1: foi utilizado NaOH 15% (m/v), na relação sólido-líquido de 1:10 e posteriormente, a solução com bagaço de cana foi autoclavado por 30 minutos (121°C 2 atm). Após, a solução foi filtrada em *mousseline* (tecido sintético), a solução teve seu pH corrigido para 5 com ácido fosfórico puro onde houve a precipitação da hemicelulose. Etapa 2 - O líquido foi concentrado em rotoevaporador até 1/3 do seu volume inicial e após adicionou-se 3x o volume de etanol 96%, a solução foi centrifugada 6000 x g por 10 minutos onde houve a separação da xilana. Após, as fases líquidas foram dispensadas e a fase sólida foi ressuspensa em 300 ml de etanol 70%, a solução foi centrifugada novamente e posteriormente seguiu a etapa de secagem. A secagem da xilana foi feita em estufa com circulação de ar a 35°C.

Figura 10: Fluxograma da 1ª etapa da extração da xilana.



Fonte: autoria própria

Figura 11: Fluxograma da 2ª etapa da extração da xilana presente no bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: autoria própria

4.11 Produção dos xilo-oligossacarídeos

Os experimentos iniciais de hidrólise enzimática da xilana de cana-de-açúcar foram realizados utilizando-se o extrato enzimático obtido pelo cultivo da levedura engenheirada *Pichia pastoris* em meio BMMY como descrito no item [4.1.1] a 30°C, por 96 horas. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em duplicata, a 60°C, sob agitação de 180 rpm, utilizando-se carga de xilana de 20, 25 e 30% (m/v), carga de enzima baseada em 140, 180 e 220 U de xilanase gr⁻¹ de xilana. Foram utilizados frascos *Erlenmeyer* de 50 mL vedados com rolha de borracha, contendo solução tampão fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹, pH 5,0) e volume final de 20 mL. Amostras foram coletadas em 6 horas (um frasco para cada ponto), fervidas em banho de ebulição por 10 minutos para inativação da enzima e posteriormente, 1 ml da solução de hidrólise foi coletada em *ependorf* e centrifugadas a 13.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para análise onde foi filtrada em filtros de 0,22 µm e analisada quanto à presença de xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose e xilohexaose, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O rendimento foi expresso gramas de XOS L⁻¹.

4.11.1. Delineamentos experimentais

O extrato enzimático de *Pichia pastoris*, foi utilizado nos experimentos de hidrólise envolvendo delineamentos experimentais, visando a otimização das condições do processo, tendo como resposta a concentração de XOS total obtido. Inicialmente foi avaliada a influência das variáveis carga de xilana de cana-de-açúcar (%) e carga de enzima (U g⁻¹ de xilana) empregando-se um planejamento fatorial completo 2² do tipo Face Centrada (FC), incluindo 4 pontos fatoriais e 4 pontos centrais. Em seguida um novo delineamento foi realizado para avaliar a influência das variáveis temperatura (°C) e pH, utilizando-se o mesmo planejamento citado acima, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.

Os valores reais e codificados dos níveis de cada variável são apresentados nas Tabela 1. O software Statistica (Statsoft 7.0) foi usado para analisar os resultados, os quais que foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Tabela 1: Valores codificados e reais do delineamento fatorial completo do tipo Face Centrada (FC) 2^2 utilizado na hidrólise da xilana do bagaço de cana-de-açúcar.

Fatores	Variáveis		
	-1	0	+1
Xilana %	20	25	30
Enzima U g ⁻¹ xilana	140	180	220

4.12 Eletroforese Capilar.

A análise dos xilo-oligossacarídeos por eletroforese capilar acoplada a detector de fluorescência induzida por laser (CE-LIF) foi realizada em um aparelho P/ACE MDQ (Beckman Coulter) visando a determinação do perfil de produtos resultantes da hidrólise de xilana *beechwood* (Sigma-Aldrich) pela ação das xilanase GH10 de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa por *Pichia pastoris*. Os XOs analisados foram produzidos utilizando 60 U mL⁻¹ de xilanase GH10 por grama de xilana e 5% de xilana *beechwood* (Sigma-Aldrich) 1%. As amostras foram marcadas através de reação de aminação redutiva com o fluoróforo APTS (ácido 1,3,6 - trissulfônico-8-aminopireno-Sigma-Aldrich), conforme escrito por Evangelista e colaboradores (1995). Um capilar de sílica fundida (TSP 050375, Polymicro Technologies) foi usado como coluna de separação dos xilo-oligossacarídeos. A corrida foi realizada utilizando tampão fosfato de sódio 40 mmol L⁻¹, pH 2,5, nas condições de 20kV/70-100 µA com polaridade reversa sob temperatura controlada de 25 °C. Os xilo-oligossacarídeos marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi determinada a 520 nm. Para prevenir a ocorrência de contaminações cruzadas, o capilar foi lavado entre as corridas com água e, em seguida, com o tampão de corrida. Os picos resultantes foram identificados pela comparação com os tempos de retenção dos padrões de xilose (Sigma-Aldrich) e xilo-oligossacarídeos de grau de polimerização de 2 a 6 (Megazyme). Esta análise foi realizada pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo.

4.13 Assimilação de XOS por cepas de *Lactobacillus*

Para avaliação da fermentabilidade dos XOS foram usadas cinco cepas de bactérias conhecidas por comporem a microbiota intestinal. As cepas probióticas foram *Lactobacillus rhamnosus* (cepa comercial, cedida pela empresa multinacional dinamarquesa Chr. Hansen) e duas cepas de *Lactobacillus casei*, uma cepa de *Lactobacillus fermentum* e uma cepa de *Lactobacillus bulgaricus*.

Para ativação das cepas 30µL de solução de bactérias armazenadas a -80°C foram inoculadas em 10 mL de meio MRS (Man, Rugosa e Sharpe) pH 5,0 e suplementada com 1% de fonte de carbono (Glicose). Com 12 horas de crescimento foi retirado 30 µL do cultivo e inoculado novamente em 10 ml de meio MRS. Após 12 horas de crescimento foram feitas diluições seriadas para padronização do inoculo.

Foi inoculada 100 µL da diluição 10^{-3} no meio MRS formulado com diferentes fontes de carbono (1%) para avaliação da fermentabilidade de diferentes açúcares.

Foi avaliado o crescimento das cepas na presença de glicose, xilose e XOS como abordada na Tabela 2 e o crescimento sendo acompanhado por espectrofotometria utilizando o equipamento Cary 60 UV/VIS Agilent.

Coletas de 1mL foram feitas em 0, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas para acompanhar a absorbância da fermentação. As amostras foram submetidas a leitura da absorbância no comprimento de onda a 600 nanômetros e diluições foram feitas para que a OD ficasse entre 0,5 e 1,0.

Tabela 2: Formulação da suplementação na fonte de carbono.

	Fonte de carbono		
	%		
	Glicose	XOS	Xilose
Fermentação 1	100	0	0
Fermentação 2	50	50	0
Fermentação 3	0	100	0
Fermentação 4	0	0	100

Fonte: autoria própria

4.14 Avaliação e quantificação de ácidos orgânicos produzidos na fermentação

Os metabolitos da fermentação analisados foram: ácido oxálico, ácido fórmico, ácido pirúvico, ácido málico, ácido malônico, ácido lático, ácido acético,

ácido cítrico, ácido succínico e ácido propiônico utilizando um HPLC UV/VIS. Todas as amostras foram filtradas em filtros de 0,22 μm e injetadas no sistema (20 μL no loop de amostra). A taxa de fluxo foi de 0,5 mL min^{-1} 20° C. Todos os eluentes foram preparados com água ultrapura. Os ácidos orgânicos foram separados usando Coluna *Bronlee Choice Organic Acids* (5 μm x 250mm x 4,6 mm – PerkinElmer). O eluente utilizado na separação dos ácidos orgânicos foi tampão fosfato de potássio na concentração de 100 mM pH 2,5. A corrida teve duração de 40 minutos e ocorreu sob modo isocrático. Curvas de calibração foram feitas nas seguintes concentrações 25, 50 e 100 mg L^{-1}

5 Resultados e Discussões

5.1 Extração da hemicelulose

A trituração e padronização do bagaço de cana foi feita para que fosse possível avaliar o efeito da granulometria na extração da hemicelulose. Poucos trabalhos abordam a relevância de tal fator, e tais condições nos mostram que a biomassa pode ter seu reaproveitamento quase que por completo quando se trata do tamanho do bagaço de cana quando submetido a extração da hemicelulose.

A partir da tamisação do bagaço de cana-de-açúcar foi possível obter 3 medidas de bagaço de cana que chamaremos de bagaço 1, 2 e 3 como abordado na Figura 11. A separação tem como objetivo avaliar a influência da granulometria sobre a extração da hemicelulose.

Ao se aplicar métodos para extração de hemicelulose, os tratamentos alcalinos são amplamente utilizados na extração de diferentes biomassas devido ao seu modo de ação, rompendo ligações éter e éster presentes entre a matriz de hemicelulose e lignina e pouco afeta a hemicelulose. Deste modo, é possível observar que a eficiência da ação do hidróxido de sódio na extração da hemicelulose pode variar de acordo com a granulometria do material, tal resultado pode ser observado na Tabela 3.

Com base nos resultados obtidos na extração da hemicelulose podemos observar uma diminuição gradativa da eficiência da extração quando há um aumento da granulometria do bagaço de cana. A partir dos 3 tamanhos de bagaços obtidos, os mesmos foram submetidos a um processo de extração alcalina para avaliarmos a sua influência na extração da hemicelulose e foi possível observar que, houve uma variação na extração da hemicelulose de acordo com a granulometria. A hemicelulose extraída dos bagaços tamisados $< 1\text{mm}$, $1\text{ mm a }1,41\text{mm}$ e $>1\text{mm}$ apresentaram uma composição de $83,41\% \pm 2,08\%$, $51,74\% \pm 2,58\%$ e $31,85\% \pm 1,42\%$ de xilana, respectivamente, como consta na Tabela 3. Isso indica que a diminuição da área de superfície dificulta o acesso do reagente usado na extração impedindo assim sua ação.

PERRONE e colaboradores, 2016 ao avaliar a influência da granulometria do bagaço de cana sob a eficiência de um pretratamento oxidativo para produção de etanol 2G, constatou que as melhores condições encontradas foram para o bagaço com menor tamanho ($0,86\text{mm}$), isso se deu pelo aumento da área superficial onde

foi possível deixar as fibras mais exposta a ação do agente oxidativo na etapa de pretratamento.

JAYAPAL e colaboradores, 2013, ao utilizarem condições alcalinas associadas a explosão a vapor para extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram rendimento de 85% na extração quando utilizou hidróxido de sódio e 53 % quando utilizou hidróxido de potássio.

Tabela 3: Composição química das biomassas obtidas no processo de extração de hemicelulose de bagaço-de-cana (HBC) de diferentes granulometrias.

Produto Analisado	Lignina Total %	Hemicelulose %	Celulose %	Extrativos %	Balanço de massa
BC in natura	25,6 ± 0,11	27,7 ± 1,71	44,4 ± 0,20	6,0 ± 1,56	102,02 ± 3,86
HBC T1	12,3 ± 3,04	83,41 ± 2,08	3,02 ± 1,77		101,61 ± 3,84
HBC T2	10,54 ± 2,69	51,74 ± 2,58	3,65 ± 2,05		65,93 ± 1,89
HBC T3	7,54 ± 1,79	31,85 ± 1,42	2,89 ± 1,85		42,28 ± 2,82
Xilana Beechwood Sigma	14,8 ± 2,92	84,72 ± 1,99	0		99,52 ± 3,58

Fonte: autoria própria

Com base nos resultados obtidos na Tabela 4 podemos observar que a granulometria pode influenciar no rendimento da extração da hemicelulose presente no bagaço de cana, isso pode ocorrer devido ao aumento da área de superfície de contato no (tamanho 1 - < 1 mm). A menor granulometria permitiu maior acesso do hidróxido de sódio promovendo maior rendimento, permitindo assim extrair uma maior quantidade de hemicelulose.

Tabela 4: Composição química do resíduo do bagaço de cana após a extração da hemicelulose (RBC).

Produto Analisado	Lignina Total %	Hemicelulose %	Celulose %	Extrativos %	Balanço de massa	Eficiência na extração
BC in natura	25,6 ± 0,1	27,7 ± 1,70	44,4 ± 0,2	6,0 ± 1,56	103,70 ± 3,86	
RBC T1	21,76 ± 2,54	2,45 ± 1,96	77,4 ± 5,27		101,61 ± 4,92	91,15
RBC T2	16,89 ± 4,58	15,45 ± 2,13	65,35 ± 4,58		97,69 ± 5,87	45,77
RBC T3	17,19 ± 1,54	23,54 ± 4,63	61,54 ± 3,63		102,27 ± 3,87	15,01

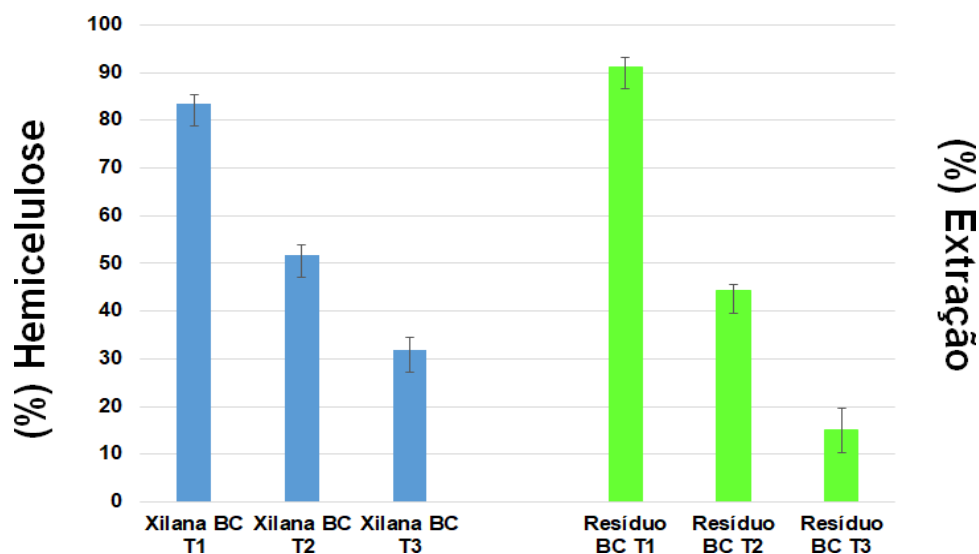
Fonte: autoria própria

As análises de caracterização química realizada na tabela 4 tiveram como objetivo avaliar a eficiência na extração da hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar, e com base nos resultados presentes na Tabela 4, podemos afirmar que a granulometria do material pode influenciar no rendimento de extração.

Neste estudo, de Carvalho e colaboradores (2017) realiza uma etapa de pretratamento da biomassa para deslignificação do material e posteriormente a extração de xilana. Os rendimentos obtidos em relação a recuperação de hemicelulose foram de 87,5%, porém a porcentagem de hemicelulose extraída do bagaço de cana não foram quantificados pelo autor. Contudo, no trabalho em estudo foi possível recuperar 91,15 % de hemicelulose presente no bagaço de cana sem que o material fosse submetido a etapa de pretratamento, etapa esta que pode ser dispendiosa e pode haver a perda da hemicelulose.

Com base nos resultados abordados na Figura 12, podemos concluir que a granulometria do bagaço de cana tem influência direta sobre a extração da hemicelulose, sendo que quanto menor a granulometria, maior será a área superficial do particulado e assim maior será a exposição da hemicelulose a ação dos agentes de extração como o hidróxido de sódio. Em contrapartida, quanto maior a granulometria do BC, menor é a área superficial do particulado e assim é observado o decréscimo no rendimento tanto na extração da hemicelulose quanto na composição de xilana na hemicelulose obtida.

Figura 12: Presença de hemicelulose na biomassa de acordo com a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar, (Azul) percentual de xilana presente na biomassa extraída, (Verde) eficiência na extração de hemicelulose.



Fonte: autoria própria

5.3 Análise do custo estimado da extração de hemicelulose de bagaço de cana utilizando diferentes métodos.

No presente trabalho foi avaliado a eficiência em relação a efetividade, custo e tempo na extração da hemicelulose presente no bagaço de cana. Como abordado na Tabela 5 e 6, a eficiência do método utilizado mostra-se superior aos demais, onde foi possível extrair 91,15% de hemicelulose do bagaço de cana. A hemicelulose extraída apresentou 83,4 % de xilose.

O custo de um determinado produto está diretamente atrelado ao custo da matéria prima. Singh e colaboradores (2015), ao analisarem custos relacionados a produção dos principais prebióticos comerciais como fruto-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e inulina, indicam que a relação entre o custo final do produto é decorrente da matéria-prima que está suscetível a mudanças sazonais de preço.

Ao relacionarmos a produção XOSs a partir de resíduos lignocelulósicos como: *hardwood*, sabugo de milho, farelo de trigo, bagaço de cevada, podemos ter um produto com menor custo, uma vez que resíduos lignocelulósicos são

subprodutos gerados em grande quantidade a partir do processamento de matrizes alimentícias e/ou energéticas e são usados para outros fins na indústria.

Para se obter XOS a partir de resíduos lignocelulósicos, a maioria dos métodos utilizados por outros autores emprega uma primeira etapa, a deslignificação. A deslignificação promove retirada de lignina do material, assim, é possível obter uma biomassa com a hemicelulose mais suscetível ao ataque de agentes alcalinos como o hidróxido de sódio que apresentam alta efetividade sobre a extração da hemicelulose.

O emprego de uma etapa de deslignificação pode onerar o custo da produção do produto em estudo, e quando se pensa em uma cadeia produtiva, quanto maior a quantidade de etapas para se produzir um produto, maior será o seu custo final.

Brienzo e colaboradores (2010b) mostraram a efetividade na aplicação de um pretratamento sobre o bagaço de cana antes da extração da hemicelulose, entretanto a quantidade de xilana presente na hemicelulose obtida foi de 80,9%, valor próximo ao método utilizado no presente trabalho que apresentou 83,4% de xilana na hemicelulose sem que o bagaço de cana fosse submetido a um pré- tratamento.

de Carvalho e colaboradores (2017), ao aplicarem um pretratamento com ácido peracético para deslignificação, seguido de uma extração com dimetilsulfóxido obtiveram uma biomassa parcialmente pura, porém o método utilizado não foi capaz de retirar grupos acetil presente no heteropolímero. Os grupos acetil estão ligados a cadeia principal de xilana formando assim um polímero acetilado que por sua vez pode impedir a ação de enzimas como as xilanases.

Após a deslignificação, quando aplicada junto as metodologias, posteriormente segue-se a etapa de extração da hemicelulose do bagaço de cana, que no presente trabalho foi usado uma etapa hidrotérmica alcalina onde há uma extração da hemicelulose sob altas temperaturas. A etapa tem como objetivo acelerar a catálise do hidróxido de sódio sobre as ligações éster e éter fortemente presente na matriz lignocelulósica. Na Tabela 5 foi avaliada a quantidade de hidróxido de sódio usada na extração em comparação com outros autores. O método utilizado no presente trabalho mostrou ser mais oneroso devido a quantidade superior de hidróxido utilizada quando comparada aos outros autores. Porém a quantidade de hidróxido de sódio utilizada foi capaz de extrair cerca de 91,15% da hemicelulose presente no bagaço de cana. Tal resultado é superior aos trabalhos abordados na Tabela 6.

Após a etapa de extração da hemicelulose, o licor coletado rico em compostos fenólicos oriundos da lignina e hemicelulose foi submetido a correção do pH. A correção do pH tem como objetivo precipitar a fração de hemicelulose presente na solução. Devido as suas características químicas a hemicelulose sofre precipitação em pH ácido próximo ao neutro.

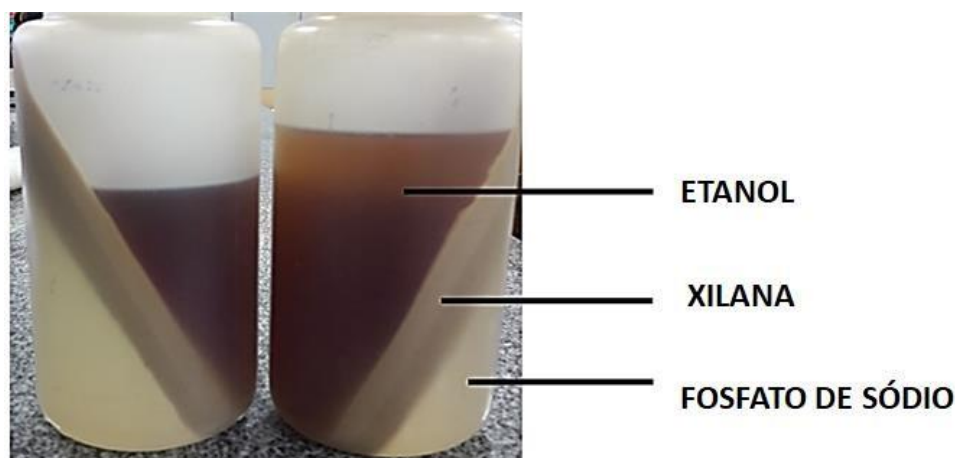
Para correção do pH podem ser utilizados diversos tipos de ácidos como: ácido acético, ácido sulfúrico e ácido clorídrico. A utilização de tais ácidos pode promover a formação de sais como acetato de sódio, que por sua vez, pode interferir no rendimento da recuperação da hemicelulose do material. No presente trabalho, o uso de ácido fosfórico para a correção mostrou ser mais eficiente pois houve uma separação da hemicelulose sem que houvesse a formação de grandes quantidades de sais. O ácido fosfórico usado na correção do pH seguido da concentração por rotoevaporação foi eficiente, pois não foi preciso diluí-lo para aplicá-lo na correção do pH e ainda não houve a degradação dos açúcares da hemicelulose na presença do ácido puro.

Posteriormente a etapa de correção do pH, segue a etapa de lavagem que é dividida em 2 etapas, a primeira lavagem com etanol 96%, comum a todos os métodos citados na Tabela 6. Após a centrifugação aplicada houve a separação de três fases etanol/hemicelulose/sal derivado da neutralização do pH como consta na Figura 13 onde pode ser separado a fase solida do sistema.

A segunda lavagem após a centrifugação foi realizada com etanol 70%. Para a hemicelulose extraída sob as melhores condições de tamisação (bagaço <1mm) em apenas 2 lavagens foi possível obter a hemicelulose com 83,4% de xilana.

de Carvalho e colaboradores (2017) avalia a extração sob a influência de diversos fatores como hidróxido de potássio, etanol usado na precipitação da hemicelulose e ácido acético. A lavagem com etanol é aplicada 4 vezes, cerca de 2000 ml para a precipitação da hemicelulose, retirada de lignina presente no material e sais formados na correção do pH. Essa quantidade é superior a quantidade utilizada no presente trabalho Tabela 5 onde foi utilizado 1170 ml, cerca de 58,5 % menos.

Figura 13: Separação de etanol / hemicelulose e resíduo derivado da neutralização do pH.



Fonte: autoria própria

Sporck e colaboradores (2017) ao testarem métodos alcalinos para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar aplicaram dois métodos ambos sob condições alcalinas, um abordado por De Lopez e colaboradores (1996a) que avaliou a extração de hemicelulose de palha de cevada e outro abordado por Hoije e colaboradores (2005) que avaliou a extração de hemicelulose em bagaço de cevada. O trabalho mostrou que os métodos utilizados foram aplicáveis em outra biomassa, sobretudo na eficiência da extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com alto índice de xilana 71,0% e 69,4% respectivamente, porém houve uma baixa taxa de extração da hemicelulose chegando a 53,3 % e 44,6% respectivamente de acordo com os métodos utilizados.

Shen e colaboradores (2016) ao utilizar sabugo de milho para extração de xilana aplicou além de etapas de lavagem com etanol, etapas de dessalinização por diálise, entretanto tal etapa acrescenta tempo e parcial perda de açúcares no processo. No entanto, mesmo com o acréscimo desta última etapa, a hemicelulose apresentava cerca de 51,3% de xilana.

Morgan e colaboradores (2017) abordou a utilização de subprodutos da moagem de trigo que continha 18,8 % de hemicelulose foi usado como substrato para produção de XOS, para que isso fosse possível, foi utilizado um método de extração alcalina da hemicelulose anteriormente à hidrólise enzimática. O método utilizado foi eficiente sobretudo na taxa de extração onde foi obtido 81,4 % da hemicelulose. A taxa de extração da hemicelulose do trabalho em estudo foi de 91,15%, resultado superior e com menor custo de extração

. O presente trabalho seguiu o método abordado por Kaur e colaboradores onde foi necessário utilizar hidróxido de sódio 15% para processar 100 g de bagaço de cana, entretanto a quantidade do agente catalizador (hidróxido de sódio) usado por Sporck e colaboradores (2017) é superior a todos os métodos utilizados, chegando a 40% (m/v) hidróxido de sódio.

Após as comparações em relação as metodologias utilizadas para extração da hemicelulose por outros autores, foi estimado o custo relacionado a utilização dos equipamentos (Tabela 6) onde podemos observar que ao processarmos 100 g de bagaço de cana para extração de hemicelulose podemos ter um custo estimado em R\$ 12,33 onde pode ser obtido 25 g de xilana que posteriormente pode ser submetida à hidrólise enzimática e ou utilizada para atividades como ensaios enzimáticos para detecção de xilanases. O método de extração utilizado no presente trabalho apresentou um custo de R\$ 21,30 totalizando R\$ 33,63 entre insumos e custos relacionados a utilização de equipamentos. Na presente análise não foi calculado custos de mão de obra e depreciação de equipamentos.

Tabela 5: Avaliação do valor aproximado do processo de extração da hemicelulose do bagaço de cana

Etapa 1 – Extração

	Tempo estimado em (Horas)	Peso (gr)	Biomassa	Pretratamento	Agente Químico de extração	Peso aproximado de NaOH utilizado (gr)	Valor aproximado (Kg) NaOH	Agente químico para neutralização do pH	Volume aproximado de Ácido utilizado (ml)	Valor / (Lt)
Autor	48	100	BC	Não	NaOH	150		Ácido Fosfórico	120	R\$ 55,00
Kaur, 2018	48	100	BC	Não	NaOH	150		Ácido Acético	250	R\$ 40,00
Brienzo, 2010	48	10*	BC	Sim	NaOH	80		Ácido Sulfúrico	100	R\$ 70,00
Sporck, 2017	72	100	BC	Não	NaOH	400	R\$ 20,00	Ácido Acético	250	R\$ 40,00
De Lopez, 1996	72	10*	PC	Sim	NaOH	13		Ácido Acético	250	R\$ 40,00
Sporck, 2017	96	100	BC	Sim	NaOH	40		Ácido Acético	250	R\$ 40,00
Hoije, 2005	96	100	TC	Sim	NaOH	40		Ácido Clorídrico	100	R\$ 40,00
Shen, 2016	96	100	SM	Não	NaOH	4		Ácido Acético	250	R\$ 40,00
Morgan, 2017	72	100	FT	Sim	NaOH	8		Ácido Acético	250	R\$ 40,00

Materiais: BC: Bagaço de cana, PC: Palha de cevada, TC: Torra de Cevada, SB: Sabugo de Milho, FT: Farelo de Trigo; (*) valores calculados para 100 gr de biomassa.

Tabela 6: Levantamento de custo na etapa de precipitação da hemicelulose e custo total aproximado do processo de extração da hemicelulose

Etapa 2 – Precipitação da hemicelulose									
Autores	Biomassa	Agente de precipitação	Volume de etanol 96% utilizado (ml)	Custo aproximado Etanol 96 % (Lt)		Xilana %	Recuperação %	Custo Aproximado	
Autor	BC	Etanol	1170	R\$	10,00	83,4	91,15	R\$	21,30
Kaur, 2018	BC	Etanol	2000	R\$	10,00	74,3	71,92	R\$	33,00
Brienzo, 2010	BC	Etanol	2000	R\$	10,00	80,9	*	R\$	27,32
Sporck, 2017	BC	Etanol	2000	R\$	10,00	71,0	53,3	R\$	25,32
De Lopez, 1996	PC	Etanol	2000	R\$	10,00	81,1	52,34	R\$	30,26
	BC	Dessalinização por diálise				69,4	44,6	R\$	10,80
Sporck, 2017	TC					83,0	*	R\$	4,60
Shen, 2016	SM	Etanol	2000	R\$	10,00	51,3	*	R\$	30,08
Morgan, 2017	FT	Etanol	2000	R\$	10,00	89,3	81,4	R\$	30,16

* Não foi avaliado o índice de recuperação de hemicelulose. Materiais: BC: Bagaço de cana, PC: Palha de cevada, TC: Torra de Cevada, SB: Sabugo de Milho, FT: Farelo de Trigo

Tabela 7: Avaliação do custo operacional na extração da hemicelulose do presente trabalho

Custo Operacional para processar 100 gr de BC				
1	quilowatt	=	1000	watt
Valor watt hora		0,36809		
Equipamento		Horas	Consumo (watt)	Valor
Autoclave		0,5	4000	0,736
	Banho de gelo	8	1920	5,654
Rotoevaporador	Banho de Aquecimento	8	1400	4,123
	Bomba de vácuo	8	414	1,219
Centrifuga		0,5	6600	0,607
Total		25	14334	12,339

5.4 Caracterização da hemicelulose por FTIR-ATR

A Figura 14 mostra o espectro da xilana extraída a partir do bagaço de cana por um método alcalino e para comparação (controle positivo) foi utilizado uma xilana (*Beechwood*) comercial – Sigma 99% de pureza.

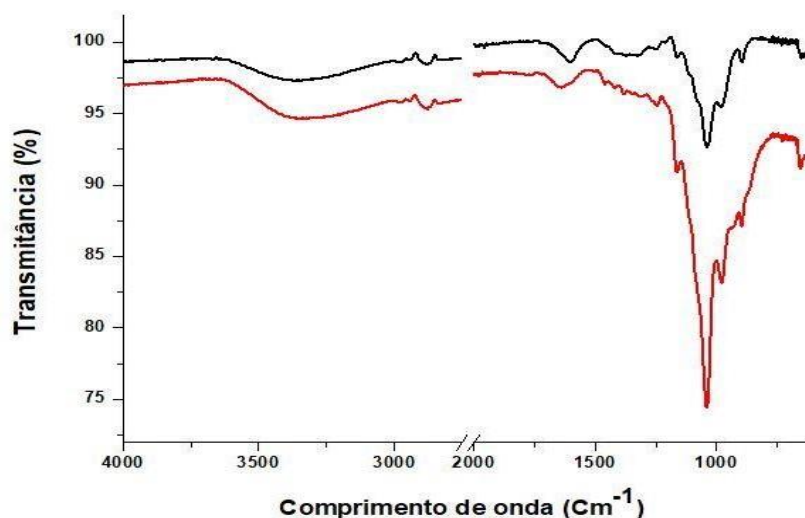
A vibração no estiramento e deformação corresponde a região 897 cm^{-1} do espectro que está relacionado a ligações glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) fortemente presente na cadeia principal de xilana, as mesmas bandas são caracterizadas em hemicelulose provenientes de bagaço de cana-de-açúcar por Spork e colaboradores (2017).

As bandas localizadas na região do espectro 1158 cm^{-1} são do estiramento C-O-C de ligações glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) e a banda localizada na região de absorção 1320 cm^{-1} está associada a vibração do grupo $-\text{CH}_2$ presentes em hemicelulose e celulose. Zhang e colaboradores (2011) ao analisar bagaço de sorgo, apontou as mesmos números de onda no espectro.

Já as bandas encontradas na região 1245 cm^{-1} está relacionada a absorção do infravermelho por cadeias centrais de hemicelulose. Já as bandas localizada na região de absorção 1035 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-O presente em celulose, lignina e hemicelulose, compondo majoritariamente o espectro Gullón e colaboradores (2011).

A presente análise tinha como objetivo caracterizar as 2 hemiceluloses, a extraída do bagaço de cana e a hemicelulose comercial de *beechwood* que é composta por xilana. Com base nos espectros obtidos podemos afirmar que a hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar e composta por xilana.

Figura 14: Análise por espectrometria de infravermelho *FTIR-ATR*.



Legenda: ■ : xilana beechwood, ■ : xilana de bagaço de cana-de-açúcar.

5.5 Característica funcionais da enzima e ação sobre diferentes substrato

No trabalho proposto por De Souza e colaboradores (2016a), onde foi feita a clonagem e expressão heteróloga através e mutagênese sitio dirigida de *Thermoascus aurantiacus* em *Pichia pastoris* como vetor, a mesma realizou a caracterização bioquímica funcional onde pôde ser obtido os seguintes resultados: Temperatura ótima: 65°C, maior atividade enzimática em pH 5, temperatura e pH de estabilidade em 40°C e pH 6 a 8 respectivamente tendo sido avaliada por 24 horas. O presente trabalho foi conduzido com base nos resultados observado pela pesquisadora.

Afim de verificar a especificidade de ação do extrato enzimático contendo xilanase GH10, foram realizados testes de atividade enzimática em diferentes substratos como conta na Tabela 9. A enzima não apresentou atividade quando incubada na presença de outros substratos como Carboximetilcelulose (CMC) – Celulose amorfa, Avicel – celulose micro cristalina, *p*-Nitrofenol- β -D-glucopiranosídeo, *p*-Nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo, *p*-Nitrofenol- α -L-arabinopiranoside e celobiose como consta na Tabela 9.

Tabela 8: Atividade de xilanase GH10 sobre diferentes substratos

Substrato	Enzima	Atividade enzimática
<i>Carboximetilcelulose</i> +	<i>Endoglucanase</i>	<i>n.d</i>
<i>Avicel</i> +	<i>Exoglucanase</i>	<i>n.d</i>
<i>Xilana beechwood</i> - Sigma +	<i>Endoxilanase</i>	120 U/ ml
<i>p-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside</i> ++	<i>β-glicosidase</i>	<i>n.d</i>
<i>p-Nitrophenyl β-D-xylopiranoside</i> ++	<i>β-xilosidase</i>	<i>n.d</i>
<i>p-Nitrophenyl α-L-arabinopiranoside</i> ++	<i>α-L-arabinofuranosidase</i>	<i>n.d</i>
<i>Celobiose</i> +++	<i>Celobiosedesidrogenase</i>	<i>n.d</i>

Legenda: Concentração de substrato utilizada (-): 1%, (+): 4 %, (++) : 4mM, (+++) 3 mM, nd: não detectado

As xilanases GH10 hidrolisam internamente ligações β -1,4-xilosídicas na cadeia da xilana, e ainda pode suportar a presença de glicose em seu sítio ativo sem que a presença do açúcar interfira em seu modo de ação. Collins e colaboradores (2005) abordam que xilanases da família GH10 podem hidrolisar celo-oligomeros, porém a capacidade de hidrolisar o substrato não é a mesma velocidade que a xilana.

Beaugrand e colaboradores (2004) abordam que xilanases da família GH10 tem baixa capacidade de hidrólise sobre xilana insolúveis devido ao baixo grau de substituições ao longo da cadeia central de xilana. Fujimoto e colaboradores (2004) relatam que substituições de arabinose foram observadas em estruturas cristalinas nos subsítios -2, +1, +2, e +3 entretanto, apenas substituições no subsítio -2 são clivadas por xilanases GH10. Pollet e colaboradores (2010) relata que, xilanases da família GH10 podem clivar a cadeia central de xilana no subsítio -3 e algumas podem clivar o heteropolímero de xilano no subsítio +1.

5.6 Perfil de hidrólise de xilana beechwood pela ação da xilanase GH10

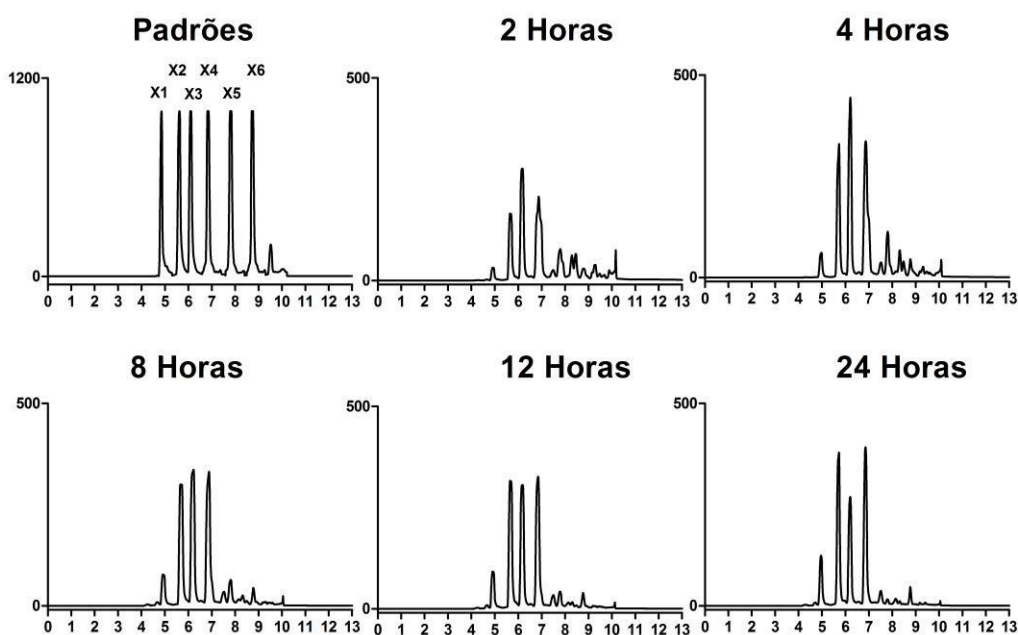
A análise do perfil de hidrólise foi realizada por eletroforese capilar. Ainda que a técnica de separação por eletroforese capilar seja uma técnica qualitativa, ela nos permite analisar produtos resultantes da hidrólise da xilana *beechwood* pela ação de xilanase GH10 e assim avaliar a produção de XOS gerados.

Nas primeiras duas horas o perfil catalítico da xilanase GH10 já se mostra presente na hidrólise, onde há uma maior formação de X1, X2, X3 e X4, tal comportamento corrobora os dados apresentados por (BIELY et al., 1997; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016a). Após 4 horas de hidrólise os XOS de maior grau de polimerização são hidrolisados e há uma produção mais acentuada de X3 seguida pelo aumento de X2 e X4 e ainda um notável aumento de X1. Tal perfil de ação também é observado por (YANG et al., 2007). A produção de xilose pela ação da xilanase pode ser observada devido ao seu modo de ação onde xilanase GH10 requer dois resíduos xilopiranosil não substituídos consecutivos para atacar a cadeia principal de xilano. (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016a). De 8 a 24 horas de hidrólise a xilanase GH10 manteve sua atividade catalítica inicial.

Picos posterior a X5 e X6 presentes no início da hidrólise já não são perceptíveis no final da hidrólise, isso ocorre devido a ação de xilanase sobre oligômeros de maior grau de polimerização produzindo assim oligômeros menores. O mesmo perfil de ação catalítica da xilanase GH10 corrobora os resultados apresentado por (MATHEW et al., 2018; MORGAN et al., 2017).

Com base no perfil de produção de XOS durante a hidrólise podemos afirmar que a enzima em questão é uma xilanase GH10 devido a produção principalmente de xilose, xilobiose e xilotriose, tais oligômeros são ideais para explora-los como um composto prebiótico.

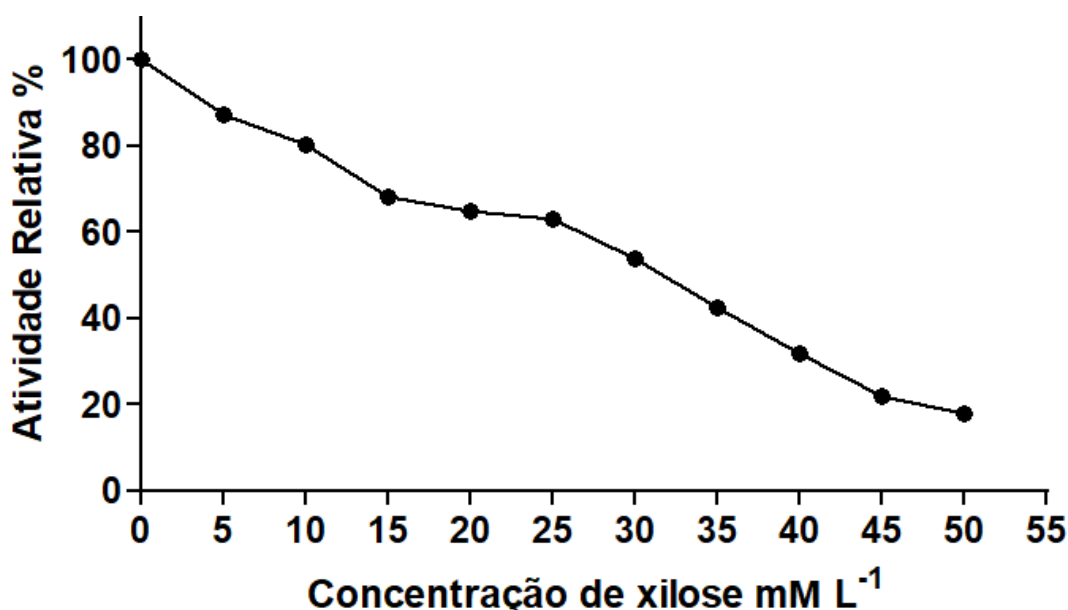
Figura 15: Perfil de ação da enzima Xilanase – GH10 e liberação de XOS em xilana *beechwood*.



5.7 Testes de inibição da atividade enzimática por xilose

A enzima foi incubada sob diferentes concentrações de xilose variando de 5 a 50 mM de xilose. Com base nos resultados obtidos a xilanase GH10 foi gradativamente inibida de acordo com o aumento da concentração de xilose na reação como pode ser visto na Figura 16.

Figura 16: Avaliação da atividade enzimática na presença de xilose em diferentes concentrações.



A inibição da enzima pode ocorrer devido a presença do produto resultante da hidrólise da xilana como, xilose e outros XOS de diferentes graus de polimerização que pode interagir com resíduos de aminoácidos como o glutamato que estão envolvidos na catálise enzimática.

Ao elevarmos a concentração de xilose, um dos principais açúcares produzidos a partir da ação da xilanase GH 10, podemos observar uma gradativa perda da eficiência na catálise. A inibição de enzima pelo produto é um dos principais problemas na produção de XOS, devido heterogeneidade da xilana de bagaço de cana que possui grande quantidade de ramificações e grupos pendentes como α -L-arabinose e ácido glucurônico e tal característica, permite uma maior produção de xilose.

O principal componente da hemicelulose é a xilana. As xilanas são heteropolissacarídeos complexos consistindo de um esqueleto central de resíduos

de xilose ligados a β -1,4 e cadeias laterais de arabinose, ácido glucurônico ou 4-O-metil-éter. Estas cadeias laterais podem ser esterificadas com ácidos acético, ferúlico ou p-cumárico, com variados graus de esterificação dependendo da fonte do xilana (ROHMAN et al., 2018).

As β -1,4-xilosidases são geralmente inibidas pelos seus produtos de hidrólise de monossacarídeos (HERRMANN et al., 1997; JORDAN; BRAKER, 2007). A este respeito, estudos cinéticos mostraram que a xilanase é inibida competitivamente pela arabinose e xilose com K_i 's de $6,8 \pm 0,6 \text{ mmolL}^{-1}$ e $76 \pm 8,5 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Esta inibição reduz a eficácia da xilanase como agente sacarificante, uma vez que estes monossacarídeos podem facilmente atingir concentrações de cerca de 1 M durante o processo de sacarificação (HERRMANN; VRSANSKA, 1997).

Simões, 2019 avaliou a atividade de xilanase GH11 recombinante de *Myceliophthora heterothallica* com atividade expressa por *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, a enzima foi incubada em diferentes concentrações de xilose variando de 5 a 50 mM, a autora observou a diminuição da atividade das enzimas em questão, de acordo com o aumento da concentração de xilose.

Hegazy e colaboradores (2019) relata que a hidrólise da xilana de diferentes substratos é a chave para importantes aplicações biotecnológicas. A xilose é o maior produto gerado na degradação da xilana, e é o maior inibidor de xilanases nos ensaios em biorreatores. O mesmo perfil de atividade de xilanase GH10 exposta diante de diferentes concentrações de xilose, e foi observado ineficiência da atividade da xilanase GH10 de *Geobacillus stearothermophilus* sob a variadas concentrações (0 a 100 mM), com o aumento da concentração de xilose houve a diminuição da atividade da enzima.

5.8 Produção de XOS a partir de hidrólise enzimática

Foi analisado a influência de dois fatores (carga de xilana e carga enzimática) por planejamento estatístico onde foi aplicado um planejamento fatorial de Face Centrada (FC) 2². O planejamento foi realizado com base na liberação de XOS e xilose a partir da ação da xilanase GH10. Após 6 horas a hidrólise foi interrompida com banho de ebulição por 5 minutos para inativação da enzima

As maiores quantidades de XOS foram encontradas quando a hidrólise da xilana seguiu os seguintes parâmetros 220U de Xilanase e 25% de carga de xilana

onde pode ser produzido 32,33 g L⁻¹ de XOS, entretanto os pontos centrais (ensaios 9,10, 11 e 12) de acordo com a Tabela 10, nos mostra que podemos reduzir quantidade de xilanase utilidade sem que isso afete consideravelmente a liberação de XOS durando o processo de hidrólise.

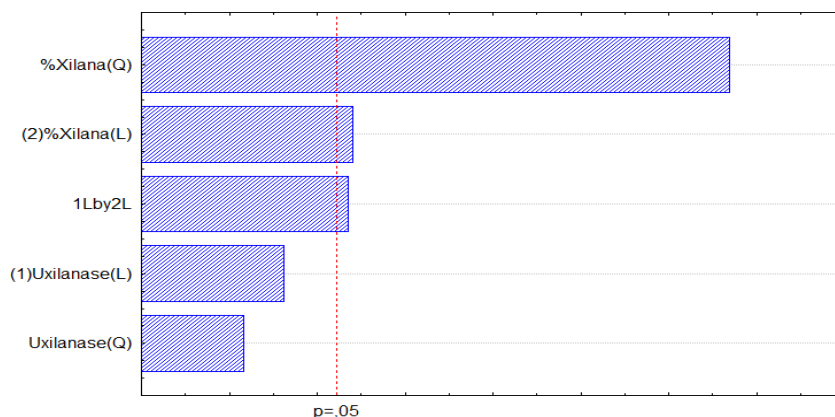
Tabela 9: Estrutura do planejamento estatístico Face Centrada 2² e resultados. Legenda: X1: xilose; X2: Xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5 xilopentaose; X6: xilopentaose. Fonte: autoria própria.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais		Xilo-oligossacarídeos g L-1						XOS Totais g L-1	Conversão
	U*	Xilana %	U*	Xilana %	Xilose	X2	X3	X4	X5	X6		
1	-1	-1	140	20	3,22	11,22	9,36	1,45	0,77	-	25,14	15,78
2	+1	-1	220	20	4,21	13,19	9,64	1,25	0,72	-	28,02	17,68
3	-1	+1	140	30	4,72	14,87	10,94	1,85	0,97	-	28,19	13,49
4	+1	+1	220	30	4,22	14,22	10,33	1,53	0,85	-	27,22	12,62
5	-1	0	140	25	4,07	12,86	8,67	1,18	0,73	-	32,06	13,40
6	+1	0	220	25	4,24	12,45	8,50	1,56	0,96	-	32,33	13,37
7	0	-1	180	20	3,71	10,89	7,38	1,16	0,78	-	26,01	14,47
8	0	+1	180	30	3,23	9,43	6,42	0,94	0,66	-	28,70	8,34
9	0	0	180	25	5,84	16,41	10,69	1,54	0,83	-	33,32	17,24
10	0	0	180	25	4,79	14,77	10,46	1,56	0,78	-	32,37	15,79
11	0	0	180	25	5,50	15,14	12,00	1,58	0,80	-	32,02	17,11
12	0	0	180	25	5,27	15,66	11,01	1,55	0,83	-	31,32	16,75

Fonte: Autoria própria.

De acordo com o Diagrama de Pareto Figura 17 onde são analisadas as interações entre os fatores (carga de xilana %/ carga de enzima U ml⁻¹) nos mostrou que o efeito quadrático e linear do fator xilana tem 95% confiabilidade de influência sobre a produção de XOS. Já os efeitos linear e quadráticos do fator enzima não apresentam significância, com valor de $p < 0,05$.

Figura 17: Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis carga de xilana e carga de xilanase na hidrólise da xilana utilizando planejamento estatístico (Face Centrada 2²), tendo como resposta a liberação de XOS.



Fonte: autoria própria

Com base na análise da variância de regressão do modelo podemos verificar que as respostas variáveis apresentam valores de coeficientes de determinação de R^2 96,49. Já o modelo matemático apresentou nível de 95% de confiança de ($p < 0,05$) conforme o gráfico de Pareto na Figura 18.

A superfície de resposta apresentada na Figura 18 foram geradas pelos modelos para liberação de XOS onde pode-se observar maiores liberação de oligossacarídeos próximo aos pontos centrais. A superfície de resposta indica que a região ótima de liberação de XOS ocorre nas seguintes condições (220U m L⁻¹ de xilanase g⁻¹ de xilana e 25% de xilana). A região ótima para liberação de XOS pode ser descrita pelo modelo matemático abaixo.

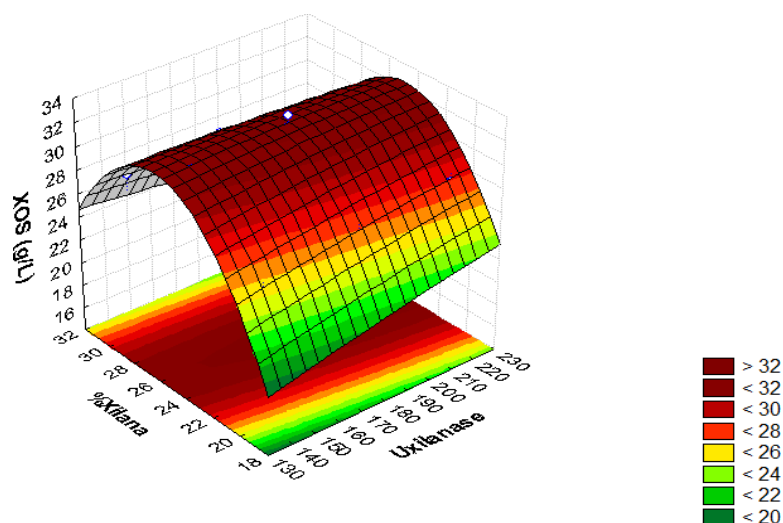
$$Y = 32,282 + 0,363 V_1 + 0,823 V_2 - 0,137 V_1^2 - 4,78 V_2^2$$

Y = Produção de XOS (g L⁻¹)

V₁ = carga de xilanase (U mL⁻¹)

V₂ = carga de xilana (%)

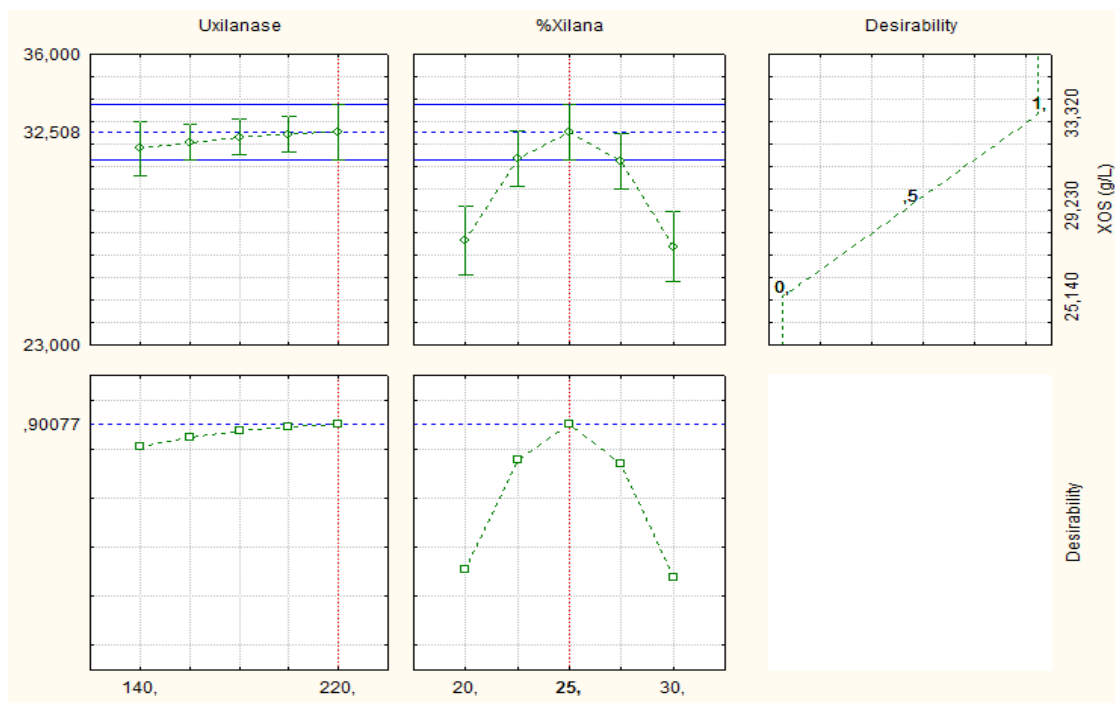
Figura 18: Superfícies de respostas obtido para os efeitos carga de xilana e carga enzimática empregada visando a produção de XOS.



Fonte: Autoria própria

Com a aplicação da função de desejabilidade do *software* Statistica 10.0, podemos prever que a interação dos fatores (substrato/enzima) nas seguintes condições 220 U de xilanaase e 25% de xilana pode-se obter a máxima produção de XOS. A desejabilidade preve que a aplicação dos parâmetros citados acima pode-se produzir entre 25,14 e 33,32 g L⁻¹ de XOS. A validação da função de desejabilidade mostrado na Figura 19, foi realizadas de acordo com os resultados obtidos onde, utilizando os mesmos parâmetros estabelecidos pelo *software* foi possível obter 28,62±1,29 g L⁻¹, o ensaio foi realizados em triplicata.

Figura 19: Função de desejabilidade para produção de XOS a partir da xilana extraída do BC, influência dos fatores substrato (xilana) e enzima (xilanase GH10).



Fonte: autoria própria

5.9 Efeito do tempo na produção de XOS

A xilana foi submetida a hidrólise enzimática pela ação da enzima xilanase GH10 onde foi possível observar a produção gradativa de X1, X2 e X3 até 24 horas de hidrólise (Tabela 12). Em 48 horas de hidrólise é possível observar o aumento da produção de xilose, essa é uma das características de xilanase GH10 quando hidrolisa polímeros de xilana com alto grau de ramificação.

Essa é uma característica morfológica da hemicelulose proveniente do bagaço de cana-de-açúcar que promove uma maior produção de monômeros devido à grande quantidade de substituições quando é hidrolisada por xilanase GH10. A xilanase GH10 requer dois resíduos xilopiranosil não substituídos consecutivos para atacar a cadeia principal de xilana, e então é capaz de clivar a ligação glicosídica na substituição com *Me-GlcA* (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016a).

Tabela 10: Influência do tempo sobre a produção de xilo-oligossacarídeos. X1: xilose; X2: Xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose

Monossacarídeo e xilo-oligossacarídeos g L ⁻¹					
Tempo de hidrólise	X1	X2	X3	X4	XOS Totais g L ⁻¹
0	0	0	0	0	0
2	0,24	0,76	1,14	0,02	1,92
4	0,50	1,11	1,02	0,04	2,16
8	0,93	1,49	1,76	0,04	3,30
12	1,88	2,64	2,08	0,04	4,76
24	2,77	3,34	2,88	0,05	6,27
48	4,83	5,12	3,29	0,05	8,46
72	7,31	5,94	2,24	0,07	8,26
96	8,70	6,08	1,26	0,12	7,46

Fonte: autoria própria

Com base nos resultados na avaliação do efeito tempo sobre a hidrólise enzimática, podemos observar que o fator tempo tem influência na produção de XOS. De 0 até 48 horas foi observado um aumento gradativo na produção de XOS com maior produção de xilotriose e xilobiose juntamente com a xilose. A produção de xilose pela ação da xilanase GH10 pode ocorrer devido ao seu modo de ação pois a enzima é dependendo de ramificações na cadeia central para que haja a clivagem da cadeia central de xilana (BIELY et al., 2013; BIELY; SINGH; PUCHART, 2016a).

Após 48 horas é observado um decréscimo na produção de xilotriose e um expressivo aumento na produção de xilose. Isso pode ser decorrência na presença de substituições presente na xilana do bagaço de cana o que corrobora os dados obtidos por BRIENZO e colaboradores (2010a) que, ao avaliar o efeito do tempo sobre a produção de XOS pelo extrato enzimático bruto de *Thermoascus aurantiacus* observou que tempos acima de 48 horas promoveu a diminuição de xilotriose e xilopentose e isso pode ter ocorrido devido a presença de β -xilosidase e também pela ação de xilanases da família GH10.

Bian e colaboradores (2013) abordou a produção de XOS pela ação de enzimas xilanolíticas de *Bacillus subtilis* como endoxilanases, α -L-arabinosidases e esterases e o mesmo pode constatar que, a ação conjunta de enzimas xilanolíticas pode o aumentar rendimento na hidrólise do bagaço de cana de açúcar.

5.10 Assimilação de XOS por diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus*.

Foi avaliado o crescimento de 5 cepas de *Lactobacillus* considerados probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* GG (Chr. Hansen - Cepa comercial), duas cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus bulgaricus*. Com exceção da cepa *Lactobacillus rhamnosus*, todas foram isoladas a partir do processo de produção de mussarela de búfala (SILVA et al., 2015).

Nenhuma cepa apresentou crescimento significativo em meio com ausência de açúcares fonte de como carbono (Figura 20). O pequeno crescimento observado, medido pelo aumento de absorbância, pode indicar que a cepa possa ter usado outros nutrientes presentes, como fonte de carbono, como por exemplo o extrato de levedura que compõe 0,5% da formulação do meio. O extrato de levedura usado na formulação do meio MRS (Man; Rogosa; Sharpe 1995), tem na sua composição nutrientes como açúcares e vitaminas que podem contribuir com o crescimento.

Ao suplementar os meios de fermentação com 1% de xilose (m/v) como fonte de carbono, todas as cepas apresentaram baixo perfil de crescimento, isso pode ser indicativo que a presença de xilose esteja reprimindo vias de transporte de pentoses. Cepas do gênero *Lactobacillus*, de acordo com AACHARY; PRAPULLA, (2011a) apresentam menor expressão de genes para produção de enzimas do complexo xilanolítico e proteínas de transporte de pentoses. Entretanto, as bactérias do gênero *Bifidobacterium* apresentam uma maior capacidade de expressar tais genes.

O cultivo das cepas suplementadas com 1% de glicose como fonte de carbono apresentou rápido crescimento, onde a fase *lag* ou fase da adaptação, durou aproximadamente 2 horas seguido da fase *log* onde o crescimento exponencial mostrou duração de aproximadamente de 10 horas para todas as cepas. O rápido crescimento microbiano ocorreu devido a glicose estar disponível na sua forma mais simples e não polimerizada.

A variação da fonte de carbono utilizada teve como objetivo avaliar o crescimento das cepas probióticas sob a influência de diferentes açúcares. Assim com base nos resultados obtidos foi possível observar que as cepas cultivadas na presença de 1% de fonte de carbono (50% glicose + 50% XOS), (Figura 20) – A, B, C, D e E apresentaram diauxia ao longo de seu cultivo por apresentar 2 fases *lag* e 2 fases *log*. Tal perfil de crescimento pode indicar que os MOs utilizam a glicose como primeira fonte de carbono pois o açúcar estar em sua forma monomérica. A diauxia pode ocorrer devido as proteínas de transportes de açúcares serem diferentes,

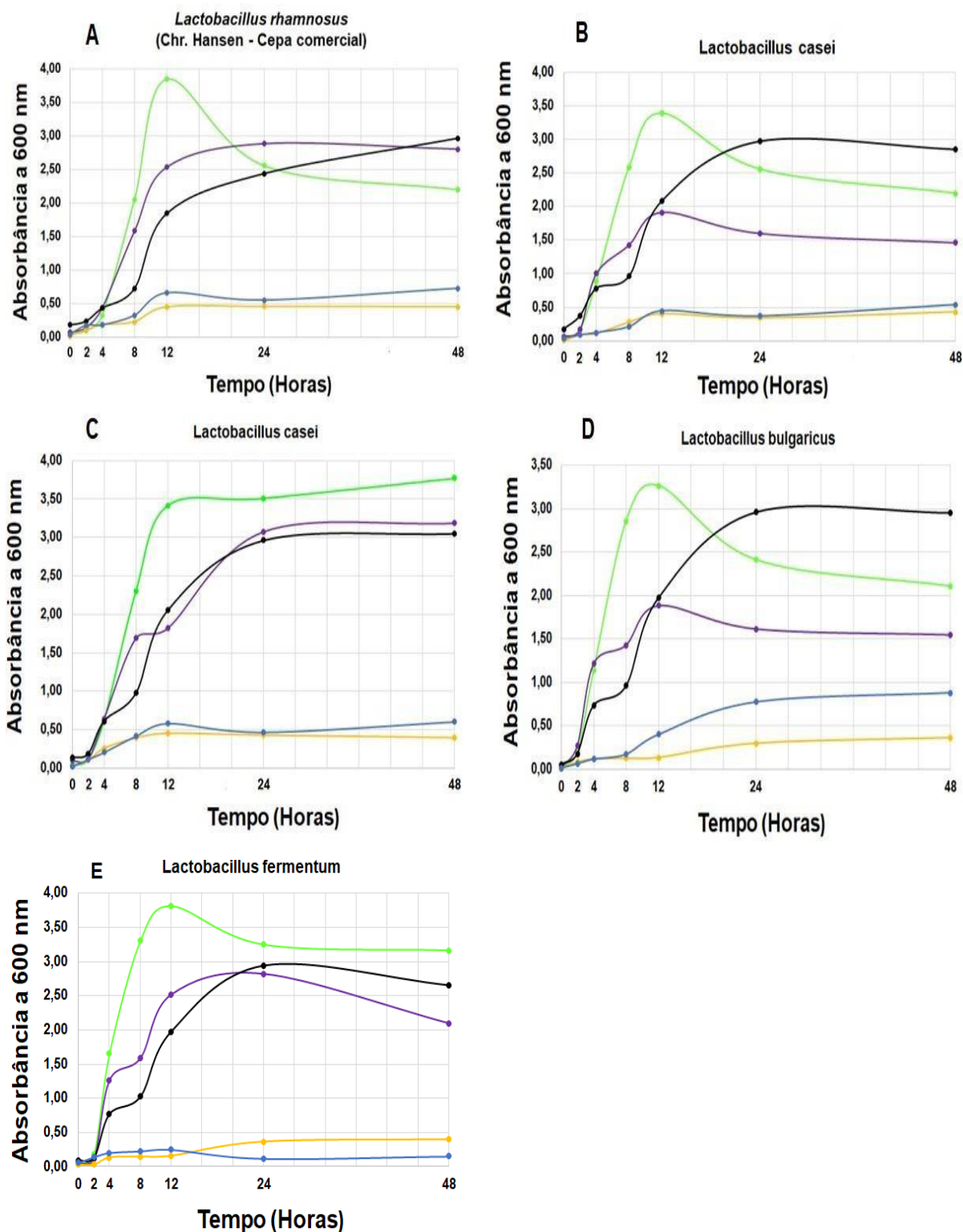
assim, o microrganismo modifica suas vias de assimilação de açúcares sintetizando novas proteínas de transportes que serão responsáveis na assimilação da nova fonte de carbono, tal processo pode ser visto claramente na (Figura 20), em todas as cepas onde o cultivo ocorreu sob as condições 1 % de fonte de carbono (50% de glicose e 50% de XOS).

Todas as cepas de *Lactobacillus* utilizadas no presente trabalho foram capazes de crescer na presença de 1% XOS que continha 54,25 % de xilose, 37,91 % de xilobiose e 7,81 % de xilotriose e 3,02 % de glicose. A presença de glicose na composição dos açúcares é decorrente do processo de extração da hemicelulose, que é um componente da fração.

Diante dos resultados obtidos na Figura 20 é possível afirmar que: as cepas cultivadas em 50% Glicose + 50% XOS, apresentaram diauxia em seus crescimentos, o comportamento indica que o microrganismo esteja utilizando 2 diferentes açúcares, glicose e outros. Porém não é possível concluir quais os tipos de açúcares os microrganismos possam estar metabolizando após a primeira fase log. Estudos sobre a identificação dos açúcares será implementado no presente trabalho para a resolução dos perfis de assimilação dos açúcares presente no meio de cultivo durante os ensaios de fermentação.

Os microrganismos foram capazes de crescer em ensaios suplementados por XOS, entretanto, diante da composição de monômeros e oligômeros presente no hidrolisado de xilana utilizado podemos supor que os microrganismos estejam assimilando primeiramente a glicose residual presente nos XOS. Diante da deficiência na assimilação de xilose no ensaio realizado, podemos supor que a diauxia observada no cultivo das cepas possa ser decorrente a assimilação de algum oligômero de xilose presente no meio de cultivo.

Figura 20: Crescimento das cepas probióticas sob a influência de diferentes fontes de carbono. Legenda: As cepas foram cultivadas usando diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações. Verde – 100% Glicose, Roxo – 50% Glicose / 50% XOS, Preto – 100% XOS, Amarelo – sem fonte de carbono e azul – 100 % Xilose.



Fonte: autoria própria

Kaur e colaboradores, 2018 em seu trabalho mostraram o efeito do crescimento de cepas de *Lactobacillus* sob a suplementação de XOS como fonte de carbono. Os principais oligossacarídeos utilizados na fermentação foram xilobiose, xilotriose e xilose que compunha majoritariamente os açúcares. Os microrganismos apresentaram perfil de crescimento similar entre as fontes de carbono utilizadas na avaliação do mesmo trabalho (xilose, glicose, xilo-oligossacarídeos, fruto- oligossacarídeos).

De Figueiredo e colaboradores, 2017 ao avaliar o crescimento de cepas probióticas como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus brevis*, constatou que as cepas apresentaram baixo crescimento quando a fermentação foi suplementada por XOS produzidos a partir de xilana de bagaço de cana, o mesmo relata que os XOS produzidos podem apresentar componentes em suas ramificações que pode impedir a assimilação de tais probióticos.

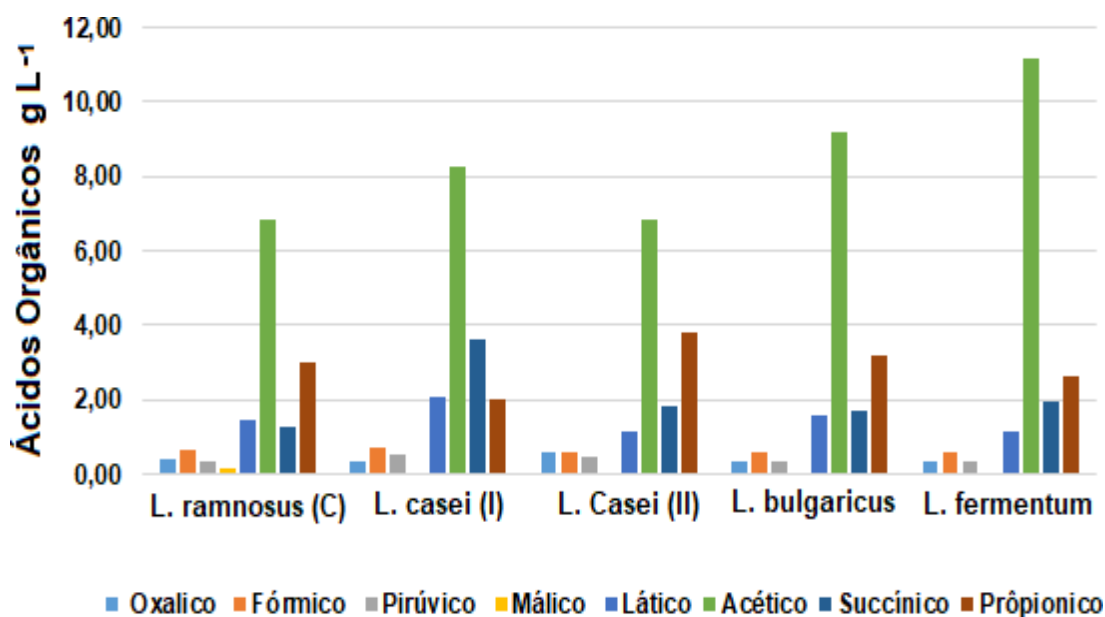
5.11 Análise da fermentação dos XOS

Após as 48 horas de cultivo “in vitro” das cepas probióticas foram analisados os metabolitos gerados a partir da fermentação dos XOS onde foi possível constatar a presença de ácidos orgânicos como: ácido oxálico, fórmico, málico, pirúvico, láctico e succínico.

Todas as cepas apresentaram um perfil parecido quanto a produção de metabólitos com exceção da cepa de *Lactobacillus casei* (I) onde a mesma apresentou uma produção de ácido succínico superior as demais chegando a 3,65 g L⁻¹.

De acordo com o produto final da fermentação as bactérias do gênero *Lactobacillus* podem ser divididas em 2 grupos: as homofermentativas e heterofermentativas. Com base nos resultados obtidos na Figura 21 é possível observar que houve uma grande produção de ácido acético em todas as fermentações chegando a 11,17 g L⁻¹ para a cepa *Lactobacillus fermentum*.

Figura 21: Ácidos orgânicos produzidos em 48 horas de fermentação. Legenda: (C) cepa comercial - Chr. Hansen, (I, II) cepa isolada do processamento de mussarela de búfala.



Fonte: autoria própria

Mathew e colaboradores (2018) ao avaliar os metabólitos resultante da fermentação de XOS por *Lactobacillus brevis* constatou a presença de ácido láctico e ácido acético predominantemente após 48 horas de fermentação onde pode ser produzido $1,76 \pm 0,04$ e $1,14 \pm 0,03$ g L⁻¹ respectivamente.

Alguns trabalhos mostram que o efeito inibitório na proliferação de bactérias patogênica esteja relacionado com a competição entre cepas patogênicas e probióticas por sitio de ligação que estão presentes nas vilosidades da região gastrointestinal. A produção de ácidos como ácido acético e láctico promove a diminuição do pH fazendo com que bactérias conhecidas como patogênicas tenha o seu crescimento controlado ou até inibido (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015; SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

6. Conclusões

Foi constatado no presente trabalho que a influência da granulometria interferiu significativamente na extração da xilana. O bagaço menor <1 mm submetido a extração apresentou uma recuperação de 91,15% da hemicelulose sendo constituída de 83,41% de xilana. O estudo mostrou que dentre os 3 tamanhos analisados, quanto menor a granulometria, maior será o rendimento na extração, contudo, o uso de ácido fosfórico usado na neutralização do pH básico mostrou ser mais eficiente que os outros ácidos devido a sua baixa miscibilidade entre o etanol e resíduo sólido (hemicelulose) possibilitando assim uma melhor separação do composto.

A xilanase GH10 recombinante de *Thermoascus aurantiacus* com atividade expressa por *Pichia pastoris* foi capaz de hidrolisar a xilana extraída do bagaço de cana de açúcar e o emprego do planejamento estatístico resultou em otimização da produção de XOS. A otimização ocorreu empregando os parâmetros 25% de xilana e 220 U de xilanase GH10, resultando numa concentração de 32,33 g L⁻¹ de XOS.

Análises “*in vitro*” mostraram que os oligossacarídeos produzidos a partir da hidrólise enzimática da xilana extraída do bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de promover o crescimento de cepas probióticas como: *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* e *L. bulgaricus*. Porém não é possível afirmar o perfil de consumo dos oligossacarídeos.

Como esperado as cepas foram capazes de produzir diversos metabólitos a partir da fermentação, sendo esta uma das características de cepas probióticas.

7. Trabalhos futuros

Hemicelulose

Muitos estudos trazem diversos métodos de extração da hemicelulose de diferentes biomassas lignocelulósicas como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo, entretanto poucos trabalhos abordam todas as propriedades do produto que pode ser produzido a partir da xilana que são os XOS.

Investigações a respeito das propriedades anticarcinogênica, anti-inflamatória, atividade imunoregulatória e atividade antioxidante devem ser desenvolvidas para um completo entendimento de todas as aplicações dos XOS de diferentes substratos.

Hidrólise enzimática

As xilanases GH10 e GH11 são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da hemicelulose. Não só as xilanases, mas, muitas outras enzimas apresentam inibição pelo produto durante a hidrólise enzimática. Logo, estudos a nível genético que possam visar a produção de enzimas que apresentem atividade sob uma grande concentração de produtos gerados a partir da hidrólise enzimática como xilose, xilobiose ou xilotriose pode ser desenvolvido com o intuito de aumentar os rendimentos na produção de XOS.

Fermentação por cepas probióticas

Identificação do perfil da fermentação quanto ao tipo de oligossacarídeo as bactérias probióticas possuem maior facilidade em assimilar e para os não fermentescíveis qual característica que impede tal assimilação.

Referências

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011a.

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2011b.

ANTOV, M. G.; ĐORĐEVIĆ, T. R. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. **Food Chemistry**, v. 235, p. 175-180, 2017.

BAJPAI, P. Management of pulp and paper mill waste. **Cham, Switzerland: Springer International Publishing**, p. 127, 2015.

BEAUGRAND, J.; CHAMBAT, G.; WONG, V. W.; GOUBET, F.; RÉMOND, C.; PAËS, G.; CHABBERT, B. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2529-2540, 2004.

BIAN, J.; BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X. P.; PENG, P.; XU, F.; & SUN, R. C. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 236-241, 2013.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. et al. Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-166, 1997.

BIELY, P.; CZISZÁROVÁ, M.; UHLIARIKOVÁ, I.; AGGER, J. W.; LI, X. L.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. Mode of action of acetylxytan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5075–5086, 2013.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016a.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016b.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-1205, 2010a.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195–1205, 2010b.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173-181, 2015.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; & SULTAN, M. T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22-31, 2008.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CHANWICHA, N; KATEKAEW, S; Purificaton and characterization of alkaline xylanase form *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 by solid-state fermentation. **Mycoscience**; v. 3, n. 3, p. 5, set. 2014.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento Safra Brasileira Cana-de-Açúcar, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-77, 2018. Disponível em:< https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-canade-acucar/item/download/17026_e0504d08aca77ee13e86c2e7e7f43424>. Acesso em: 29 mai de 2018.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 11, p. 353-361, 1996.

DE FIGUEIREDO, F. C.; CARVALHO, A. F. A.; BRIENZO, M.; CAMPIONI, T. S.; DE OLIVA-NETO, P. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 164–170, 2017a.

DE FIGUEIREDO, F. C.; CARVALHO, A. F. A.; BRIENZO, M.; CAMPIONI, T. S.; DE OLIVA-NETO, P. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 164–170, 2017b.

DE CASSIA PEREIRA, J.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

DE CARVALHO, D. M.; MARTÍNEZ-ABAD, A.; EVTUGUIN, D. V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223-234, 2017.

DE LOPEZ, S.; TISSOT, M.; DELMAS, M. Integrated cereal straw valorization by an alkaline pre-extraction of hemicellulose prior to soda-anthraquinone pulping, case study of barley straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 4, p. 201-211, 1996.

DE SOUZA, A. R.; DE ARAÚJO, G. C.; ZANPHORLIN, L. M.; RULLER, R.; FRANCO, F. C.; TORRES, F. A.; DA SILVA, R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1, 4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 20–26, 2016a.

DE SOUZA, A. R.; DE ARAÚJO, G. C.; ZANPHORLIN, L. M.; RULLER, R.; FRANCO, F. C.; TORRES, F. A.; DA SILVA, R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1, 4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 20–26, 2016b.

DUMON, C.; SONGA, L.; BOZONNET, S.; FAURÉA, M.; O'DONOHUEA, M. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 346–357, 2012.

FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; KUNO, A.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; MIZUNO, H. Crystal Structures of Decorated Xylooligosaccharides Bound to a Family 10 Xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9606-9614, 2004.

FRANCO, Fernanda Craveiro. Clonagem e expressão heteróloga do gene de uma xilanase de *Thermoascus aurantiacus* em *Pichia pastoris*. Universidade estadual Paulista – UNESP – Câmpus – São José do Rio Preto, 2011.

GIBSON, G. R. BEATTY, E. R., WANG, X. I. N., & CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 975–982, 1995.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, F. J.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, S. K. Lignocellulosic biomass: biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.

GULLÓN, P.; SALAZAR, N.; MUÑOZ, M. J. G.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P.; CLARA, G.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3096–3114, 2011.

GUSTAVSSON, M.; BENGTSSON, M.; GATENHOLM, P.; GLASSER, W.; TELEMANN, A.; DAHLMAN, O. Isolation, Characterisation and Material Properties of 4-O-Methylglucuronoxylan from Aspen. **Biorelated Polymers: Sustainable Polymer Science and Technology**, Springer, Boston, MA, p. 41-52, 2001.

HEGAZY, U. M.; EL-KHONEY, M. I.; SHOKEER, A.; ABDEL-GHANY, S. S.; BASSUNY, R. I.; BARAKAT, A. Z.; FAHMY, A. S. Revealing of a novel xylose- binding site of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase by directed evolution. **Journal of biochemistry** v. 165, n. 2, p. 177-184, 2019.

HERRMANN, M.; VRSANSKA, M.; JURICKOVA, M.; HIRSCH, J.; BIELY, P.; KUBICEK, C. P. The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase. **The Biochemical journal**, v. 321, n. 2, p. 375-381, 1997.

HÖIJE, A. GRÖNDAHL, M., TØMMERAAS, K., & GATENHOLM, P. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 266-275, 2005.

HOPKINS, M. J.; CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 381-6, 1998.

JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian journal of experimental biology**, 2015.

JAYAPAL, N.; SAMANTA, A. K.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Value addition to sugarcane bagasse: xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 14-24, 2013.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: Pentoses and Lignin. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 1-32, 1983.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

JORDAN, D. B.; BRAKER, J. D. Inhibition of the two-subsite β -d-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* by sugars: Competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, n. 1, p. 231-246, 2007.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KÄRKÄS, M. D.; MATSUURA, B. S.; MONOS, T. T.; MAGALLANES, G.; STEPHENSON, C. R. J. Transition-metal catalyzed valorization of lignin: the key to a sustainable carbon-neutral future. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 14, n. 6, p. 1853-1914, 2016.

KAUR, R.; UPPAL, S. K.; SHARMA, P. Production of Xylooligosaccharides from Sugarcane Bagasse and Evaluation of Their Prebiotic Potency In Vitro. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-9, 2018.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42- 48, 2016.

LIN, N.; HUANG, J.; DUFRESNE, A. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: A review **Nanoscale**, v. 4, n. 11, p. 3274-3294, 2012.

LINARES-PASTÉN, J.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. **Current Protein & Peptide Science**, 2016.

MATHEW, S.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Xylo- and arabinoxyloligosaccharides from wheat bran by endoxylanases, utilisation by probiotic bacteria, and structural studies of the enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102, n. 7, p. 3105-3120, 2018.

MCMANARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 895–921, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MILLATI, R.; SYAMSIAH, S.; NIKLASSON, C.; CAHYANTO, M. N.; LUDQUIST, K.; TAHERZADEH, M. J. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. **Bio Resources**, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.

MORGAN, N. K. WALLACE, A., BEDFORD, M. R., & CHOCT, M. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 290-296, 2017.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review, **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B. A-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

OECD. Taxing Energy Use 2018: Switzerland. In: **Taxing Energy Use 2018**. [s.l: s.n.].

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 9, n. 2, p. 77–86, 1990.

OLIVEIRA, D. S.; MEHERB-DINI, C.; FRANCO, C. M.; GOMES, E.; & DA-SILVA, R. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. C588-C594, 2010.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.

PENG, F. PENG, P., XU, F., & SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012a.

PENG, F. PENG, P., XU, F., & SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012b.

PERRONE, O. M.; COLOMBARI, F. M.; ROSSI, J. S.; MORETTI, M. M. S.; BORDIGNON, S. E.; NUNES, C. D. C. C.; DA-SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 69–76, 2016.

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 176-191, 2010.

QUIÑONES, T. S.; RETTER, A.; HOBBS, P. J.; BUDDE, J.; HEIERMANN, M.; PLÖCHL, M.; RAVELLA, S. R. Production of xylooligosaccharides from renewable agricultural lignocellulose biomass. **Biofuels**, v. 6, n. 3-4, p. 147-155, 2015.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; GUARNER, F. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

ROHMAN, A.; VAN OOSTERWIJK, N.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; & DIJKSTRA, B. W. Structural basis of product inhibition by arabinose and xylose of the thermostable GH43 β -1,4-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196358, 2018.

SAMANTA, A. K.; SENANI, S.; KOLTE, A. P.; SRIDHAR, M.; SAMPATH, K. T.; JAYAPAL, N.; DEVI, A. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 466–474, 2012.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2015.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - Approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001

SILVA, L. F.; CASELLA, T.; GOMES, E. S.; NOGUEIRA, M. C. L.; DE DEA LINDNER, J.; PENNA, A. L. B. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Journal of food science**, v. 80, n. 2, p. M411- M417, 2015.

SHEN, R.; SHEN, R.; LI, H. Q.; ZHANG, J.; XU, J. Effects of Impurities in Alkali-Extracted Xylan on Its Enzymatic Hydrolysis to Produce Xylo-Oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 5, p. 740-752, 2016.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19-30, 2015.

SIMÕES, Lorena Caixeta de Oliveira. Purificação de xilanase do fungo *Myceliophthora heterothallica* F. 2.1. 4 e aplicação de enzimas nativa purificada e recombinante para produção de xilo-oligossacarídeos. **Universidade estadual Paulista, UNESP, Câmpus, São José do Rio Preto**, 2019.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. TP-510-42618, 2010.

SPORCK, D.; REINOSO, F. A.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; JOSÉ, C.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 296, 2017.

SUN, N., RODRIGUEZ, H., RAHMAN, M., & ROGERS, R. D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass. **Chemical Communications**, v. 47, n. 5, p. 1405–1421, 2011a.

SUN, N., RODRIGUEZ, H., RAHMAN, M., & ROGERS, R. D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass. **Chem. Commun.**, v. 47, n. 5, p. 1405–1421, 2011b.

TERRONE, Carol Cabral. Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas. **Universidade estadual Paulista – UNESP – Câmpus – Rio Claro**, 2013.

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited **Bioresource Technology**, v. 199, p. 2-12, 2016.

- VALLEJOS, M. E.; ZAMBON, M. D.; AREA, M. C.; DA SILVA CURVELO, A. A. Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 349-353, 2015.
- WANG, J.; SUN, B.; LIU, Y.; ZHANG, H. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 150, p. 482-488, 2014.
- WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33-86, 2017.
- WIKANDARI, P. R.; RAFSANJANI, E. R.; PUSPITASARI, K. N. The Potential of Yacon Root (*Smilax sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson) as Prebiotics to Stimulate Growth of *Lactobacillus plantarum* B1765. In: **Seminar Nasional Kimia-National Seminar on Chemistry (SNK 2018)**. Atlantis Press, 2018.
- XU, B.; WANG, Y.; LI, J.; LIN, Q. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 351-357 2009.
- XU, Q. S.; YAN, Y. S.; FENG, J. X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 216 2016.
- YANG, C. H.; YANG, S. F.; LIU, W. H. Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 9, n. 1, p. 216, 2007.
- YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

ZHANG, H.; ZHOU, X.; XU, Y.; YU, S. Production of Xylooligosaccharides from Waste Xylan, Obtained from Viscose Fiber Processing, by Selective Hydrolysis Using Concentrated Acetic Acid. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2017.

ZHANG, H.; ZHOU, X.; XU, Y.; YU, S. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2011.

ZHANG, W., JOHNSON, A. M., BARONE, J. R., & RENNECKAR, S. Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 250–258, 2016.