
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas.

FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Área: Microbiologia Aplicada.

Março - 2016

FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Área: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Rio Claro
2016

547.758 Figueiredo, Franciane Cristina de
F475e Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a
partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando
extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas / Franciane
Cristina de Figueiredo. - Rio Claro, 2016
65 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Enzimas. 2. Pré-tratamento alcalino. 3. Hidrólise
enzimática. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito prebiótico do XOs produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar utilizando como substrato diferentes hemiceluloses e enzimas de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus fumigatus*

AUTORA: FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

ORIENTADOR: PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



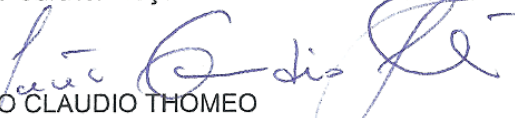
Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - SP



Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia-IPBEN-Unesp



Prof. Dr. JOÃO CLAUDIO THOMEIO

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto

Rio Claro, 07 de abril de 2016

Titulo Alterado para: Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas

Dedico este trabalho aos
meus pais, Sonia e Erberto.

Agradecimentos

Ao prof Pedro de Oliva Neto pela oportunidade, orientação e confiança em meu trabalho. Seu profissionalismo e dedicação me incentivaram durante estes dois anos de trabalho. Muito obrigada.

À Ana Flávia pelos ensinamentos, paciência e, sobretudo, por compartilhar comigo seu tempo e amizade.

A todos os colegas de laboratório, em especial à Tania, pela parceria e amizade e à Thaís e Fabi pelas risadas e companhia diária.

Aos meus pais, Erberto e Sonia, que sempre me apoiaram e me incentivaram. Obrigada pelo carinho. Serei eternamente grata.

Ao meu irmão, Silmar, pelo encorajamento e pelas caronas.

Aos meus avós, Licão e Maria Otília pelas orações e amor.

Aos meus tios, especialmente a tia Bete pelas orações e por tanto carinho.

Ao meu querido Lucas por seu carinho e apoio. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, amor, e alegria, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por sempre estar comigo.

Ao Adriano, por gentilmente me hospedar em sua casa durante as disciplinas em Rio Claro, além da amizade e das conversas esclarecedoras.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Eu guardei muitas coisas em minhas mãos, e perdi todas. Mas todas que coloquei nas mãos de Deus, essas eu ainda possuo.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) e fruto-oligossacarídeos (FOs) apresentam atividades prebióticas, favorecendo a melhora nas funções intestinais, ação imunológica, antimicrobiana e outros benefícios à saúde. A produção dos XOs pode ser realizada pela utilização de materiais lignocelulósicos (MLCs). O objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar a extração de hemicelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, além de comparar a produção de XOs com xilanases de *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Aspergillus fumigatus* M51. Foram feitos testes de digestibilidade “in vitro” e também de fermentação “in vitro” com bactérias probióticas e patogênicas para avaliar o potencial prebiótico de XOs produzidos por tratamento alcalino e compará-los com XOs e FOs comerciais. Os pré-tratamentos alcalinos desenvolvidos com 10% de KOH a 70°C (tratamento 1) e com 5% de KOH a 121°C (tratamento 3) se mostraram similares ao método que utiliza 24% de KOH a 35°C (método ZD) para extração de hemicelulose, porém são mais simplificados e econômicos. O tratamento 1 apresentou redução de 54,1% de KOH e 1,98% de etanol e o tratamento 3 reduziu em 76,2% o KOH e 40,9% o etanol. Estes três experimentos de extração de hemicelulose foram selecionados para os testes de hidrólise enzimática com xilanases dos fungos *T. reesei* e *A. fumigatus* para produção de XOs. A hidrólise com enzimas de *T. reesei* se mostrou mais vantajosa apenas para produção de xilose (54,9%) em 24 horas, utilizando-se hemicelulose produzida pelo tratamento número 3. Testes com enzimas de *A. fumigatus* apresentaram melhor rendimento de XOs (27,1%) em 24 horas e menor rendimento de xilose (19,6%), com hemicelulose do tratamento 1 (XOs LABI). Experimentos de fermentação “in vitro” demonstraram a capacidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* fermentarem XOs e FOs comerciais, destacando-se a preferência de *B. breve* e *L. brevis* por XOs comercial, enquanto *B. lactis* e *L. acidophilus* demonstraram preferência por FOs comercial. *B. longum* cresceu tanto nos XOs e FOs comerciais e *B. animalis* não cresceu em nenhum oligossacarídeo comercial. *Salmonella enterica* em 4 horas não cresceu quando os oligossacarídeos estavam presentes, diferentes dos meios com outras fontes de carboidratos, comprovando-se a seletividade destes prebióticos por linhagens probióticas. Os XOs LABI não foram capazes de estimular o crescimento da maioria das bactérias probióticas, embora tenham inibido o crescimento de *S. enterica* e resistido à ação de enzimas digestivas. Estes dados indicam a provável ação prebiótica dos XOs LABI e a necessidade de purificação do produto para eliminar possíveis resíduos da extração, os quais inibem fortemente o crescimento dos micro-organismos estudados.

Palavras chave: xilo-oligossacarídeo, pré-tratamento alcalino, hidrólise enzimática, bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The xylo-oligosaccharides (XOs) and fructo-oligosaccharides (FOs) have prebiotic activities, improving bowel function, immunological and antimicrobial activity and other health benefits. XOs production can be accomplished by the use of lignocellulosic materials (LCMs). The goal of this work was to improve the hemicellulose extraction from sugarcane bagasse and to compare the XOs production using xylanases from *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Aspergillus fumigatus* M51. We performed "in vitro" digestibility tests and also "in vitro" fermentation with probiotic and pathogenic bacteria to evaluate the prebiotic potential of XOs produced by alkali treatment and compared it with commercial XOs and FOs. Alkaline pretreatments developed with 10% KOH at 70° C (treatment 1) and 5% KOH at 121° C (treatment 3) were similar to the method using 24% KOH at 35° C (ZD method) for hemicellulose extraction, but they were more simplified and economical. Treatment 1 presented a reduction of 54.1% KOH and 1.98% ethanol and treatment 3 reduced KOH in 76.2% and ethanol in 40.9%. These three hemicellulose extraction experiments were selected for XOs production in the enzymatic hydrolysis tests with fungal xylanases of *T. reesei* and *A. fumigatus*. Hydrolysis with *T. reesei* enzymes proved advantageous only for xylose production (54.9%) at 24 hours, using hemicellulose produced by treatment number 3. Testing with *A. fumigatus* enzymes showed better XOs production (27.1%) at 24 hours and lower release of xylose (19.6%), using hemicellulose obtained by treatment 1 (XOs LABI). Fermentation experiments "in vitro" showed the ability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to ferment commercial XOs and FOs, emphasizing the preference of *L. brevis* and *B. breve* for commercial XOs while *B. lactis* and *L. acidophilus* demonstrated preference for commercial FOs. *B. longum* grew in both XOs and commercial FOs and *B. animalis* did not grow in any commercial oligosaccharide. Regarding the cultivation of *Salmonella enterica*, in four hours there was no growth where oligosaccharides were present, opposed to medium with other sources of carbohydrate, confirming the selectivity of this prebiotic by probiotic bacteria. XOs LABI were not able to stimulate the growth of most probiotic bacteria, although they inhibited the growth of *S. enterica* and resisted the digestive enzymes. These results indicate the probable prebiotic action of XOs LABI and the need of purification to eliminate possible residues from the extraction, which strongly inhibit the growth of the microorganisms studied.

Keywords: xylo-oligosaccharide, alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, sugarcane bagasse.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo Geral	11
1.1.2 Objetivos Específicos	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Prebióticos, Probióticos e Simbióticos	12
2.2 Xilo-oligossacarídeos e benefícios à saúde.....	15
2.3 Composição do bagaço de cana-de-açúcar	17
2.4 Produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos	18
2.5 Microbiota gastrointestinal de mamíferos	22
2.6 <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i> como probióticos	23
2.7 Métodos de avaliação de prebióticos	24
2.7.1 Teste de não digestibilidade	24
2.7.2 Fermentação pela microbiota intestinal.....	25
2.7.3 Estimulação seletiva da atividade e/ou crescimento de bactérias intestinais	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Produção de xilo-oligossacarídeos.....	26
3.1.1 Micro-organismos.....	26
3.1.2 Produção de xilanases.....	26
3.1.3 Pré-tratamento por KOH para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.....	27
3.1.4 Hidrólise enzimática da hemicelulose para a produção de XOs	28
3.2 Digestão “in vitro” dos oligossacarídeos	29
3.2.1 Digestão por amilase presente na saliva humana	29
3.2.2 Digestão por suco gástrico artificial	29
3.2.3 Digestão por enzimas pancreáticas suínas.....	30
3.3 Fermentação “in vitro” de oligossacarídeos	30
3.3.1 Micro-organismos.....	30
3.3.2 Meios de crescimento	31
3.3.2.1 Meio de Crescimento para bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	31
3.3.2.2 Meio para crescimento de <i>Escherichia coli</i>	32
3.3.2.3 Meio de crescimento de <i>Salmonella enterica</i>	32

3.4	Métodos Analíticos	33
3.4.1	Cálculo do rendimento do material extraído do bagaço (Rex), rendimento de hemicelulose (Rh) e eficiência na extração de hemicelulose (Eh).....	33
3.4.2	Determinação da atividade xilanolítica	34
3.4.3	Identificação e quantificação de xilo-oligossacarídeos	34
3.4.4	Determinação dos oligossacarídeos antes e após digestão enzimática.....	35
3.4.5	Determinação da curva e velocidade de crescimento.....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Extração de hemicelulose por KOH	36
4.2	Produção de XOs a partir da extração de hemicelulose e xilanases fúngicas.....	40
4.3	Digestão “in vitro” de oligossacarídeos	45
4.4	Fermentação “in vitro” de oligossacarídeos	48
5.	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se aumentado o uso de alimentos ou ingredientes que promovam benefícios à saúde e, concomitantemente, previnam o surgimento de doenças. Estes ingredientes conhecidos como suplementos alimentares, podem estar presentes naturalmente nos alimentos ou ser adicionados a produtos industrializados. Atualmente pesquisadores buscam descobrir e desenvolver novos produtos que auxiliem ou modulem o bom funcionamento do organismo.

Dentre estes suplementos estão os prebióticos, que estimulam seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias benéficas, geralmente do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino do homem e de outros animais.

A maior parte dos novos prebióticos desenvolvidos atualmente são oligossacarídeos não digeríveis, como por exemplo, fruto-oligossacarídeos (FOs) e isomalto-oligossacarídeos (IMOs). Nas últimas décadas há um crescente interesse no desenvolvimento de novos prebióticos, dentre eles, os xilo-oligossacarídeos (XOs), que apresentam efeitos benéficos na flora intestinal e estimulam maior número de bifidobactérias no intestino do que os FOs (RYCROFT et al., 2001).

Os XOs são oligossacarídeos que podem ser obtidos por tratamento enzimático da hemicelulose presente em resíduos agroindustriais, como sabugo de milho, cascas de arroz, palha de cevada, talo de tabaco, talo de algodão, caule de girassol, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar.

Atualmente muitos estudos buscam o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos como fonte renovável para produção de biocombustíveis e produtos alimentícios. Se utilizados de forma sustentável os resíduos agrícolas poderão se tornar uma prática rentável para o país, o que sustenta a necessidade de um maior reaproveitamento de materiais agroindustriais.

Dentre os resíduos agroindustriais o que mais se destaca no Brasil é bagaço de cana-de-açúcar, que além da produção de energia através de sua queima, pode ser utilizado também para o desenvolvimento de produtos com um alto valor nutritivo, como os prebióticos, anteriormente citados.

Muitas pesquisas têm como finalidade reduzir os custos para produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos. Entretanto, o presente trabalho buscou, além de reduzir os custos para produção de XOs, avaliar o potencial prebiótico do mesmo. Para isto, foram estudados os XOs produzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial da UNESP-Campus

de Assis-SP (XOs LABI), com as melhores condições definidas neste estudo, bem como o XO comercial quanto a: a) resistência à hidrólise de enzimas do trato digestório; b) estímulo do crescimento de bactérias consideradas benéficas de maneira a comprovar as suas atividades prebióticas e; c) inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Também foi feito este mesmo estudo para o FO comercial, visando compará-los com os XOs.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico a partir da extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar por método alcalino mais econômico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Aperfeiçoar a extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pelo pré-tratamento alcalino
- Comparar a produção de XOs com xilanases produzidas por *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Aspergillus fumigatus* M51 utilizando como substrato as hemiceluloses previamente extraídas.
- Avaliar a digestão “in vitro” de XOs LABI pela enzima amilase presente na saliva humana e compará-los com XOs e FOs comerciais
- Estudar a digestão “in vitro” de XOs LABI por suco gástrico artificial e compará-los com XOs e FOs comerciais
- Analisar a digestão “in vitro” de XOs LABI por enzimas pancreáticas suínas e compará-los com XOs e FOs comerciais
- Determinar a curva de crescimento “in vitro” de *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* crescidas em meios contendo XOs LABI, XOs e FOs comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Prebióticos, Probióticos e Simbióticos

O trato intestinal é intensamente colonizado por diversos micro-organismos. Estes são divididos basicamente em dois grupos: micro-organismos prejudiciais à saúde, pois sua excessiva proliferação pode causar ao hospedeiro diarreias e infecções; micro-organismos benéficos à saúde, que melhoram a absorção de nutrientes e estimulam as funções do sistema imune, além de inibir o crescimento de bactérias patogênicas (GIBSON et al., 1995). Por apresentar importantes funções biológicas, a flora intestinal tem sido alvo de intensas pesquisas. Um bom exemplo são os alimentos prebióticos, pois seu consumo tem aumentado à medida que seus efeitos benéficos vêm sendo demonstrados por meio de pesquisas. O termo prebiótico geralmente é usado para definir oligossacarídeos não digeríveis, que ao serem consumidos estimulam o crescimento seletivo de bactérias benéficas principalmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* já presentes no intestino (MANNING e GIBSON, 2004).

Todo componente da dieta que resista a ação de enzimas do trato digestório e que estimule o crescimento de bactérias benéficas presentes no intestino pode ser considerado como um potencial prebiótico. Entretanto, são os oligossacarídeos não digeríveis, que apresentam cadeias curtas de monossacarídeos compostos de 2 a 12 açúcares simples ligados entre si, que têm despertado maior interesse pelas inúmeras propriedades prebióticas (MANNING e GIBSON, 2004; NABARLATZ, FARRIOL, MONTANÉ, 2004).

Os oligossacarídeos são solúveis em água e geralmente apresentam doçura dependendo da massa molecular e do grau de polimerização (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Alguns oligossacarídeos não são digeridos pelos seres humanos devido à ausência de uma enzima que degrade ligações β , encontradas entre unidades de alguns monossacarídeos. Estas características permitem que estes oligossacarídeos sejam utilizados para produção de doces, alimentos de baixa caloria e para consumo de pessoas com diabetes (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; MANNING e GIBSON, 2004). Devido à estrutura química e a capacidade de chegar intacto ao intestino, os oligossacarídeos servem como substratos para bactérias benéficas que colonizam o trato intestinal do hospedeiro (BIELECKA et al., 2002).

Por apresentarem vários benefícios à saúde, alguns pesquisadores apontam os oligossacarídeos não digeríveis como suplementos alimentares, podendo ser adicionados em bebidas, derivados de leite, iogurtes e em alimentos simbióticos (MANNING e GIBSON,

2004; ZIEMER e GIBSON, 1998; GIBSON e ROBERFROID, 1995; MUSSATTO e MANCILHA, 2007). Dentre todos os benefícios já estudados, destacam-se:

- Modificação expressiva da microflora presente no cólon intestinal, pois, como citado anteriormente, os oligossacarídeos não digeridos servem como substrato estimulando o crescimento seletivo de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.
- Produção de nutrientes, como vitaminas do complexo B e ácido fólico.
- Diminuição de casos de diarreia, relacionadas a infecção do trato intestinal.
- Aumento da absorção de minerais, tais como, ferro, cálcio e magnésio.
- Diminuição de infecções gastrointestinais, do trato respiratório e urogenital, pois bactérias probióticas inibem a adesão de patógenos nas paredes epiteliais.
- Diminuição do risco de câncer, principalmente do cólon intestinal.
- Aumento do bolo fecal, melhora do controle de glicose e modulação do metabolismo de triglicerídeos.

Entretanto, nem todos os prebióticos são estritamente oligossacarídeos e sua não digestibilidade nem sempre é claramente comprovada, sendo assim, na prática, os prebióticos são carboidratos de cadeias curtas não degradadas por enzimas digestivas (CUMMINGS, MACFARLANE, ENGLYST, 2001). Para ser classificado como prebiótico o oligossacarídeo deve seguir alguns critérios, como, apresentar resistência à acidez gástrica e à ação de algumas enzimas no intestino, ser fermentado seletivamente pela microflora intestinal, e estimular o crescimento ou atividade de bactérias ligadas à saúde (GIBSON et al., 2004). Os prebióticos que mais se destacam na comercialização como suplementos alimentares são: lactulose, FOs, inulina, arabinose, manano-oligossacarídeos (MOs), galacto-oligossacarídeos (GOs), XOs, IMOs, lactossacarose, e palatinose (MANNING e GIBSON, 2004). Estes ingredientes podem ser encontrados em grandes concentrações em sementes, leite, mel e vegetais como, por exemplo, cevada, feijão, grãos de soja, além da chicória, alho, cebola e aspargos (GIBSON e ROBERFROID, 1995; VÁZQUEZ et al., 2000; AL-SHERAJI et al., 2013; BALI et al., 2015).

Os FOs são intensamente estudados, pois embora geralmente encontrados em grande quantidade em alguns vegetais, técnicas de hidrólise enzimática estão sendo empregadas por proporcionar a produção industrial em larga escala e facilitar a comercialização deste produto como prebiótico (GIBSON e ROBERFROID, 1995; CRITTENDEN e PLAYNE, 1996; DE SOUSA, DOS SANTOS e SGARBIERI, 2011; BALI et al., 2015). Os FOs alcançam o

intestino e estimulam seletivamente crescimento de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, além de *Lactobacillus* e alguns *Streptococcus* as quais, por competição, inibem o crescimento de bactérias putrefativas, como as dos gêneros *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campilobacter* (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Estudos “in vivo” demonstraram que a ingestão de 10 gramas de FOs por dia é capaz de tornar bactérias como as do gênero *Bifidobacterium* predominantes no intestino, sem o aumento de efeitos colaterais, como constipação (BOUHNİK et al., 1999; GIBSON et al., 1995).

OS GOs são obtidos por enzimas hidrolases de ligações glicosídicas utilizando a lactose como substrato. Estudos indicam que dietas enriquecidas com GOs impactaram positivamente na composição da flora intestinal, como o aumento do número de bifidobactérias e lactobacilos no intestino (TORRES et al., 2010; SEARLE et al., 2009).

Outros ingredientes utilizados na indústria de alimentos com alto valor nutricional são os probióticos. Este termo refere-se a organismos conhecidos por equilibrar a flora intestinal, apresentando benefícios à saúde e pode ser adquirido como suplemento alimentar constituído de micro-organismos vivos, que estão diretamente envolvidos com a melhoria do equilíbrio intestinal (ZIEMER e GIBSON, 1998). Os principais modos de ação dos probióticos estão relacionados com a inibição da proliferação de patógenos através da competição entre probióticos e patógenos por receptores de adesão presentes no intestino, produção de substâncias antibacterianas, competição por nutrientes e estímulo do sistema imune (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001). A maioria dos alimentos comercializados como probióticos contém bactérias ácido-láticas (lactobacilos, estreptococos, enterococos, lactococos e bifidobactérias) (ZIEMER e GIBSON, 1998; GIBSON, 2004; SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001). Entretanto, outros micro-organismos que compõem naturalmente ou não a microbiota intestinal também são capazes de prevenir distúrbios gastrointestinais e consequentemente melhorar a saúde do hospedeiro, é o caso de *Bacillus* spp. e alguns fungos (*Aspergillus* spp. e *Saccharomyces* spp.) (GIBSON, 2004). Devido a diversas pesquisas que comprovam seus efeitos benéficos à saúde, a levedura não patogênica *Saccharomyces boulardii* é utilizada mundialmente como probiótico para prevenção de diarreias (MARTINS et al., 2005).

Também são comercializados amplamente produtos conhecidos como simbióticos que consistem na mistura de micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos. As indústrias alimentícias que comercializam estes produtos destacam seus efeitos benéficos na saúde, além da melhor implantação e sobrevivência de bactérias probióticas no organismo hospedeiro (ZIEMER e GIBSON, 1998). Em 1993 surgiu o primeiro simbiótico “Bikkle”

contendo XOs e bifidobactérias, comercializado com sucesso pela Suntory (VÁZQUEZ et al., 2000). Um recente estudo demonstrou que a combinação de XOs e *Bifidobacterium lactis* pode conferir benefícios adicionais na microbiota intestinal e no sistema imune, devido o aumento da sobrevivência das bactérias vivas presentes no suplemento alimentar (CHILDS et al., 2014). De maneira geral, prebióticos, probióticos e simbióticos são ingredientes frequentemente adicionados a alimentos, e que conferem efeitos positivos na saúde do consumidor.

2.2 Xilo-oligossacarídeos e benefícios à saúde

Xilo-oligossacarídeos são oligômeros constituídos de unidades de xilose contendo ligações β 1-4 (Figura 1), encontrados naturalmente em vegetais, frutos, leite e mel (GULLÓN et al., 2008). A composição dos XOs depende basicamente de sua origem e do processo de extração (KABEL et al., 2002). São considerados oligossacarídeos não digeríveis capazes de estimular o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, inibindo e/ou diminuindo a proliferação de bactérias patogênicas no intestino (RYCROFT et al., 2001; GULLÓN et al., 2008; MUSSATTO e MANCILHA, 2007). O Japão é o maior produtor e consumidor de prebióticos e o pioneiro a incorporar os XOs comumente em vários produtos alimentícios oferecidos ao homem e outros animais (VÁZQUEZ et al., 2000 e BRIENZO, 2010).

Os efeitos prebióticos de xilo-oligossacarídeos têm sido muito estudados. Estudos mostram que os XOs chegam intactos ao intestino e estimulam seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium*, principalmente *B. adolescentis*, além de inibir o crescimento de *Clostridium* e *E. coli* (OKAZAKI, FUJIKAWA, MATSUMOTO, 1990). Os XOs produzidos a partir de *Miscanthus giganteus*, em testes “in vitro” demonstraram ser fermentados pela maioria das bactérias do gênero *Bifidobacterium* e algumas bactérias do gênero *Lactobacillus*, além de produção de ácido acético e lático como produtos final da fermentação (CHEN et al., 2014 e CHEN et al., 2016). Finegold e colaboradores (2014) avaliaram que a ingestão de apenas 1,4 g/dia de XOs é suficiente para aumentar o número de bifidobactérias presentes no intestino, sem aumentar os níveis de constipação e diarreia quando comparados ao grupo que não ingeriu XOs. Para Xiao, Ning e Xu (2012), a dose máxima tolerada para o consumo de XOs por humanos é de 12 g/dia.

Além do efeito prebiótico, destaca-se também o potencial dos XOs para sua utilização em outras vertentes como, por exemplo, na agricultura para desenvolvimento de

estimulantes de crescimento, e na indústria farmacêutica, para produção de fármacos relacionados ao controle de obesidade e tratamento de infecções gastrointestinais (VÁZQUEZ et al., 2000). Estudos indicam que a suplementação de alimentos com XOs melhoram as funções intestinais, como absorção de cálcio, proporcionando efeitos positivos no sistema imune, cardiovascular e desencadeando atividades antialérgicas e anti-inflamatórias (GROOTAERT et al., 2007; AACHARY e PRAPULLA, 2009; CHUNG et al., 2007).

Outra vertente é a utilização de prebióticos, inclusive os XOs, na alimentação animal em substituição, ou parcial substituição, dos antibióticos, pois o uso excessivo destes fármacos pode provocar a resistência de bactérias, incluindo as patogênicas (CARVALHO et al., 2013).

Embora seja um processo caro e trabalhoso, os XOs podem ser utilizados para produção de xilitol, que apresenta propriedade adoçante e anticariogênica, além de ser adicionado em produtos industriais para consumo por indivíduos com diabetes ou que necessitam de dietas de baixas calorias (RIVAS et al., 2002).

Em relação à produção industrial, os XOs apresentam propriedades favoráveis para seu desenvolvimento como suplemento para alimentos, pois demonstram possuir maior resistência a altas temperaturas e estabilidade em pH ácido quando comparados aos FOs, além de apresentar baixa caloria e não toxicidade (BRIENZO, 2010).

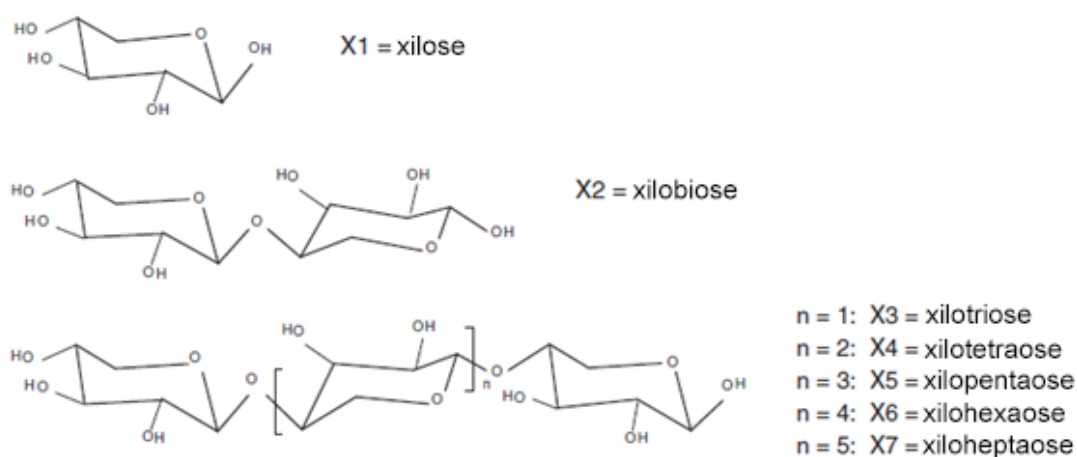


Figura 1- Estrutura esquemática de xilose e xilo-oligossacarídeos. Adaptado: Carvalho et al. (2013).

2.3 Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Os materiais lignocelulósicos (MLCs) representam uma das maiores fontes de biomassa do mundo (MENEZES e DURRANT, 2008). Os MLCs são constituídos por três macromoléculas: celulose, lignina e hemiceluloses (heteropolissacarídeo derivado de vários monossacarídeos, como arabinose, xilose, manose e ramnose) (GARROTE, DOMÍNGUEZ, PARAJO, 1999).

Devido às atividades agroindustriais, há um acúmulo de resíduos lignocelulósicos, como por exemplo, sabugo de milho, cascas de arroz, palha de cevada, tabaco, talo de algodão, caule de girassol, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (NABARLATZ, EBRINGEROVÁ, MONTANÉ, 2007; RODRIGUES et al., 2010; AKPINAR, ERDOGAN, BOSTANCI, 2009 (a)). Embora parte destes resíduos seja utilizada para produção de energia, muitas pesquisas buscam novas aplicações para o melhor aproveitamento destes materiais (BRIENZO, 2010).

Dentre os materiais lignocelulósicos, o que mais se destaca no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar tem sido cultivada no Brasil por aproximadamente 500 anos, sendo utilizada para produção de etanol e açúcar. Em 2015/2016 a estimativa da safra para a produção de cana-de-açúcar atingiu 654,6 milhões de toneladas e a produção de bagaço em torno de 169 milhões de toneladas (CONAB, 2015; HOFSETZ e SILVA, 2012; GARCIA, LIMA e VIEIRA, 2015). Após a extração do caldo, o bagaço (de 50 a 90%) é utilizado por usinas autossustentáveis para geração de energia por meio de sua queima (BRIENZO, 2010).

Dentre as macromoléculas que compõe os lignocelulósicos, a celulose ($C_6H_{10}O_5$)_x é o principal constituinte estrutural da parede celular, composta basicamente por subunidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β 1-4 (BALAT, 2011). As ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular formam feixes de moléculas de celulose que se agregam na forma de microfibrilas, formando regiões altamente organizadas (cristalinas) e as regiões menos organizadas (amorfas) (FENGEL, WEGENER, 1984). A celulose é atacada lentamente por ácidos diluídos a quente e insolúvel em álcalis.

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo, presente principalmente nas camadas primária e secundária da parede celular das plantas, associada à lignina e celulose. A cadeia de hemicelulose pode ser constituída por diferentes polímeros de pentoses (D-arabinose e D-xilose) e hexoses (D-galactose, D-manose e D-glicose), além de ácidos urônicos (BALAT, 2011). A xilana é um dos polissacarídeos mais encontrados na natureza e é a principal hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

As hemiceluloses são amorfas e conseqüentemente, menos resistentes ao ataque de agentes químicos e é solúvel em álcalis (BALAT, 2011).

Lignina é uma estrutura complexa que dá as plantas maior resistência e proteção ao ataque de insetos e fungos. É sintetizada por precursores de fenilpropano, formando uma molécula tridimensional e amorfa. Sua composição varia entre os grupos de plantas e pode ser representada por guaiacila, guaiacila-siringila, guaiaicila-siringila-p-hidroxifenila (BALAT, 2011; RODRIGUES, et al., 2010; CHIANG e FUNAOKA, 1990). Este composto é muito resistente à degradação química e enzimática o que dificulta o processo industrial de deslignificação para a conversão da biomassa em outros componentes, como por exemplo, produção de etanol.

A associação entre os três principais constituintes do MLCs torna este material recalcitrante ao processo de bionconversão, dificultando a utilização na indústria para o desenvolvimento de biocombustíveis e produtos com alto valor nutricional.

2.4 Produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos

A produção industrial de xilo-oligossacarídeos é realizada pela utilização de materiais lignocelulósicos (MLCs) (MENEZES e DURRANT, 2008). Para a obtenção de açúcares provenientes da celulose ou da hemicelulose é necessário um pré-tratamento que remova lignina seguido de uma hidrólise para a quebra dos polímeros e, conseqüentemente, a liberação dos monômeros (MOSIER et al., 2005; BALAT e BALAT, 2008). O pré-tratamento pode atuar alterando fatores estruturais e/ou composição química da biomassa, além de aumentar a área de superfície, facilitando a acessibilidade aos constituintes dos MLCs (MOSIER et al., 2005).

A obtenção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos pode ser feita diretamente por hidrólise ácida e posterior purificação (OTIENO e AHRING, 2012) ou ainda em duas etapas. A primeira etapa consiste na extração da hemicelulose, podendo ser por processos de autohidrólise, hidrólise ácida e pré-tratamento alcalino, já a segunda etapa se baseia na hidrólise ácida ou no tratamento enzimático da hemicelulose pela utilização de xilanases (Figura 2) (CARVALHO et al., 2013). No tratamento enzimático é necessária a utilização de endo-xilanases para produção de XOs e limitar a produção de xilose, pois esta inibe enzimas que produzem XOs (MENEZES e DURRANT, 2008; CARVALHO et al., 2013). Após a etapa de pré-tratamento são utilizados álcoois e cetonas para a recuperação da hemicelulose solubilizada (AKPINAR, ERDOGAN, BOSTANCI, 2009 (b); VÁZQUEZ et al., 2005).

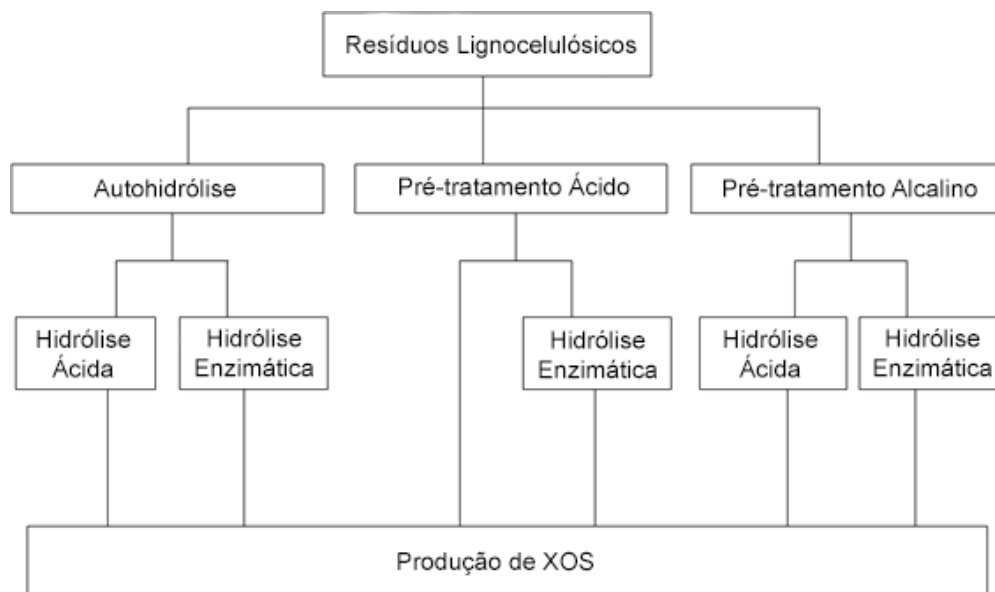


Figura 2- Diferentes métodos para produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos. Adaptado: Carvalho et al., 2013.

- Método alcalino

Apresenta pouca degradação da hemicelulose e celulose e sua eficácia está relacionada com a quantidade de lignina presente na biomassa. Muitos reagentes podem ser utilizados para este processo, os principais são: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia, hidróxido de cálcio. A base causa um inchamento na biomassa e consequentemente um aumento da área superficial, proporcionando maior abertura da estrutura (WEIL et al., 1994). Este aumento da estrutura facilita a entrada da água que age rompendo as interações entre lignina e carboidratos. O resultado é a diminuição da cristalinidade e o rompimento da lignina que é solúvel nessas condições (WEIL et al., 1994; BALAT e BALAT, 2008). Nos métodos alcalinos a remoção da lignina ocorre sem degradar os outros componentes, devido as condições mais amenas do processo quando comparados aos tratamentos ácidos, além da baixa liberação de compostos inibidores da hidrólise enzimática (BALAT e BALAT, 2008; ZHU et al., 2006). O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio é eficiente para remoção de lignina e hemicelulose, preservando sua estrutura química (BRIENZO, SIQUEIRA, MILAGRES, 2009). No entanto, o tratamento do MLC com peróxido de hidrogênio requer a remoção de metais pesados, pois em meio alcalino estes metais aceleram a decomposição do peróxido de hidrogênio nos radicais hidroxila e ânion superóxido. Como efeito positivo estes radicais atuam na deslignificação, porém hidrolisam carboidratos gerando produtos indesejáveis durante o processo (BRIENZO, SIQUEIRA, MILAGRES, 2009). Para obtenção de XOs posteriormente ao pré-tratamento alcalino para a

extração de hemicelulose, pode ser realizado um tratamento ácido brando ou enzimático (CARVALHO et al., 2013).

- Autohidrólise e hidrólise ácida

Realizada em temperaturas entre 150 e 220°C, sem adição de catalisadores, a autohidrólise ocorre em condições ácidas, devido a formação de ácido acético pela clivagem dos grupos acetil da hemicelulose (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996). Este processo é aplicado principalmente em resíduos agroindustriais onde as hemiceluloses são principalmente xilanas e tem como vantagem não utilizar produtos químicos, evitando corrosão dos equipamentos (OVEREND e CHORNET, 1989). No entanto, o hidrolisado contém grande variedade de componentes indesejáveis, como lignina solúvel, grande quantidade de monossacarídeos, furfurais e hidroximetilfurfural (HMF) (ZHU et al., 2006).

Para a produção de XOs com grau de polimerização na faixa de 2-6 por autohidrólise é necessária a realização de um tratamento extra utilizando enzimas ou ácidos, pois resultados de XOs proveniente de autohidrólise geralmente apresentam compostos com alto grau de polimerização (VÁZQUEZ et al., 2005; NABARLATZ, EBRINGEROVÁ, MONTANÉ, 2007; MOURE et al., 2006; CARVALHO et al., 2013). A severidade do processo de autohidrólise é determinada pela temperatura e tempo de reação. Estas duas variáveis estão diretamente relacionadas com a acidificação do meio devido a clivagem dos grupos acetil, a geração de produtos obtidos da degradação de açúcares e ao grau de polimerização dos XOs (GARROTE, DOMÍNGUEZ, PARAJO, 1999).

O pré-tratamento ácido é uma hidrólise geralmente realizada com ácido diluído para evitar a corrosão de equipamentos e a alta demanda de energia para a recuperação do ácido para sua reutilização. Ácidos sulfúrico, clorídrico, acético e fosfórico são os ácidos mais utilizados neste processo. Ocorre a solubilização da hemicelulose, contendo predominantemente pentoses, e uma fração sólida contendo principalmente celulose e lignina (MUSSATTO e MANCILHA, 2007; PARAJO, DOMÍNGUEZ, DOMÍNGUEZ, 1998). A hidrólise da xilana pode ocorrer por clivagem aleatória ou despolimerização. A clivagem aleatória quebra a cadeia liberando oligossacarídeos de baixo grau de polimerização, e a despolimerização libera monossacarídeos dependendo do grau de polimerização da cadeia (GÓMEZ, 1985; PARAJO, DOMÍNGUEZ, DOMÍNGUEZ, 1998; TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Esses dois tipos de atuação dos ácidos podem ocorrer simultaneamente, sendo assim, concentração de ácido, temperatura e tempo de reação determinam o grau de polimerização dos XOs e a quantidade de xilose liberada (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Na hidrólise ácida mais severa, a liberação de xilose ou outros monômeros pode gerar, consequentemente, compostos inibidores da hidrólise enzimática, como furfural e ácido acético (GÓMEZ, 1985). O tratamento ácido pode ser realizado para a obtenção direta de xilo-oligossacarídeos, ou ser realizado em duas etapas, primeiramente um pré-tratamento ácido brando para extração de hemicelulose e posterior tratamento enzimático para produção de XOs (CARVALHO et al., 2013).

- Produção de inibidores

Os inibidores podem estar presentes na biomassa ou produzidos durante o pré-tratamento, geralmente em condições severas de reação. A degradação de açúcares leva a formação de ácidos orgânicos, que podem ser considerados inibidores da hidrólise enzimática (CARVALHO et al., 2015). O composto tóxico 5-hidroximetilfurfural (HMF) é proveniente da degradação das hexoses, enquanto furfural provém das pentoses (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). A quebra do furfural e HMF libera ácido fórmico, além disso, a degradação de HMF produz ácido levulínico e compostos fenólicos são formados a partir da lignina (MUSSATTO e ROBERTO, 2004).

- Hidrólise enzimática

As enzimas são catalizadores que possuem alto grau de especificidade e favorecem as reações biológicas. A conversão da biomassa por hidrólise enzimática apresenta como vantagens: o baixo consumo de energia, por utilizar condições amenas, ausência de perda de substrato, o que diminuiria consideravelmente o rendimento, e a não produção de subprodutos (BEG et al., 2001).

As xilanases são enzimas hidrolíticas que clivam a cadeia principal da xilana β 1-4, são classificadas nas famílias 10 e 11, baseadas na sequência primária de aminoácidos e domínio catalítico. A endo β -1,4-D-xilanases atuam na cadeia principal gerando xilo-oligossacarídeos de baixo grau de polimerização, já as exo β -1,4-D-xilanases agem no terminal não redutor de XOs gerando D-xilose (BEG et al., 2001; VÁZQUEZ et al., 2000). As xilanases da família 10 produzem XOs com grau de polimerização menor do que as xilanases da família 11, devido às diferenças catalíticas como grau de especificidade e massa molecular das enzimas (MASLEN et al., 2007).

Várias espécies microbianas produzem xilanases, como bactérias do gênero *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. e *Streptomyces* spp. e fungos do gênero *Aspergillus* spp. e *Trichoderma*

spp (DUARTE et al., 2000; RUIZ-ARRIBAS et al., 1995; CARVALHO et al., 2013). *T. reesei* é um bom produtor de xilanases, compostas por endoxilanases e exoxilanases. As xilanases de *A. fumigatus* M51 atingiu altos níveis de produção de XOs (37,6%) com 72 horas de reação, principalmente xilobiose e xilotriose, usando com substrato hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO et al., 2015).

Aachary e Prapulla, em 2009, consideraram a hidrólise enzimática a melhor opção para produção de XOs, pois neste processo não há liberação de grande quantidade de monossacarídeos e produtos indesejáveis.

2.5 Microbiota gastrointestinal de mamíferos

A microbiota intestinal apresenta uma complexa e dinâmica interação entre diversas populações de micro-organismos. Muitas espécies de bactérias anaeróbicas obrigatórias e algumas anaeróbicas facultativas são adaptadas a viver no intestino humano. A colonização intestinal por micro-organismos já ocorre poucos dias após o nascimento de um mamífero (LEAHY et al., 2005).

O trato intestinal de um homem adulto consiste predominantemente nos seguintes micro-organismos: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus* (GUARNER e MALAGELADA, 2003; HOLZAPFEL et al., 1998).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de compreender melhor os efeitos benéficos que certas bactérias, habitantes naturais do intestino, proporcionam ao organismo dos animais (ZIEMER e GIBSON, 1998). Estudos apontam importantes funções metabólicas e protetoras que as bactérias probióticas desempenham no organismo hospedeiro, promovendo melhora na saúde e no bem-estar do hospedeiro (GUARNER e MALAGELADA, 2003). Bactérias probióticas que compõem a microbiota intestinal atuam inibindo a colonização de micro-organismos patógenos causadores de diarreias e infecções gastrointestinais, através da liberação de produtos gerados a partir de seu metabolismo, no qual, torna o intestino um ambiente inóspito para os patógenos (LEAHY et al., 2005). A função metabólica mais importante responsável pela microbiota intestinal é a fermentação de resíduos originários da ingestão de alimentos não digeríveis, entretanto, a flora intestinal também está envolvida no reaproveitamento de energia sob a forma de ácidos graxos de cadeia curta, produção de vitamina K e absorção de nutrientes (LEAHY et al., 2005; GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Apesar de a microbiota frequentemente ser associada com a saúde do hospedeiro, o trato intestinal é suscetível à colonização de patógenos, como bactérias do gênero *Samonella*, geralmente envolvidas com sérias infecções gastrointestinais. Mudanças nos hábitos alimentares, situações de estresse, uso de medicamentos e alterações climáticas podem diminuir populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, conseqüentemente, aumentar o número de micro-organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* e *Streptococos* podendo levar ao surgimento de doenças como diarreias e infecções do trato intestinal (HOLZAPFEL et al., 1998).

A evidente importância da microbiota intestinal corrobora o grande interesse pelo desenvolvimento de alimentos que preservem ou estimulem o crescimento de micro-organismos benéficos à saúde.

2.6 *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* como probióticos

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estão comumente associadas à saúde do organismo em que habitam e frequentemente são alvos da ação de vários prebióticos (LEAHY et al., 2005). As bactérias lácticas são anaeróbicas facultativas, encontradas em plantas e no intestino de animais, preferem a lactose como fonte de carbono e produzem ácido láctico como resultado da fermentação da lactose (TUOHY et al., 2005).

O *Lactobacillus acidophilus* é o micro-organismo probiótico mais utilizado, que inibe a proliferação de micro-organismos patogênicos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Klebsiella* (ZIEMER e GIBSON, 1998). Este efeito inibitório se dá através da quebra dos alimentos pelo *L. acidophilus* que leva a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e outros subprodutos que tornam o ambiente hostil para micro-organismos indesejáveis (HOLZAPFEL et al., 1998).

Muitos autores consideram *Bifidobacterium bifidum*, habitante natural do cólon intestinal, como uma das mais importantes bactérias probióticas, pois a produção de ácidos, como láctico e acético, faz com que o pH do intestino diminua, impedindo a colonização de bactérias putrefativas indesejáveis (ZIEMER e GIBSON, 1998). Além disso, *B. bifidum* modulam o bom funcionamento hepático, contribuem para a síntese de vitaminas do complexo B e estão relacionadas com a regularidade dos movimentos peristálticos intestinal. Há também, diversas bactérias do gênero *Bifidobacterium* que também estão presentes na

flora intestinal, entre elas *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. lactis*, *B. angulatum* e *B. pseudocatenulatum* (LEAHY et al., 2005).

Embora o processo de fermentação e degradação de oligossacarídeos não digeríveis seja realizado pela flora intestinal em conjunto, quando o objetivo é avaliar o potencial prebiótico é de extrema importância o conhecimento individual das necessidades e preferências energéticas de cada cepa a ser utilizada (CRITTENDEN et al., 2002; MOURA et al., 2007).

2.7 Métodos de avaliação de prebióticos

Para que o prebiótico seja aceito no mercado como um alimento funcional confiável, alguns testes devem ser realizados de acordo com os critérios de classificação de um prebiótico já mencionado previamente: a) apresentar resistência à acidez do suco gástrico, assim como, resistência à ação de enzimas presentes no trato gastrointestinal de animais, b) ser fermentado pela microbiota intestinal e c) estimular seletivamente o crescimento ou atividade de bactérias intestinais benéficas à saúde. Para avaliar estas características algumas metodologias “in vivo” e “in vitro” foram propostas:

2.7.1 Teste de não digestibilidade

É utilizado para avaliar se o prebiótico apresenta resistência ao suco gástrico e à ação de enzimas gastrointestinais. Metodologias “in vitro” criam meios quimicamente semelhantes à acidez do suco gástrico e determinam a hidrólise dos produtos, adicionando enzimas salivares, pancreáticas e do intestino delgado (OKU, TOKUNAGA, HOSOYA, 1984; ZIESENITZ e SIEBERT, 1987).

Em testes “in vivo” um método muito comum para avaliar a digestibilidade, se dá através da administração oral do prebiótico a ratos livres de infecções ou tratados com antibióticos para suprimir a flora intestinal, após este processo são recolhidas as fezes e analisado a digestibilidade do produto administrado (NILSSON e BJORCK, 1988). Existem alguns métodos mais invasivos que consiste na intubação do sistema gastrointestinal de ratos anestesiados (NILSSON e BJORCK, 1988). Algumas metodologias possibilitam determinar a digestibilidade em seres humanos, após ser administrado o prebiótico, são feitos exames de sangue para analisar o aumento ou não de taxas glicêmicas no sistema circulatório (MOLIS et al., 1996; GIBSON et al., 2004).

2.7.2 Fermentação pela microbiota intestinal

Os testes “in vitro” mais frequentes utilizados para determinar a fermentação de prebióticos, são baseados em culturas puras de espécies de micro-organismos selecionados que habitam naturalmente o trato intestinal, ou ainda, com culturas de amostras fecais, ambas crescidas com o produto a ser testado (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007).

Em teste “in vivo” a fermentação pela microbiota intestinal pode ser estudada em animais e em seres humanos. Em ratos, o prebiótico é administrado via oral, são adicionados nos alimentos ou na água. Amostras fecais são colhidas e então os animais são anestesiados e mortos para que o conteúdo gastrointestinal seja removido para a análise (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007). Em humanos a fermentação de carboidratos pode ser analisada de maneira indireta ou direta. A primeira consiste na administração de prebióticos e posterior medição da concentração de gases produzidos, principalmente oxigênio. A segunda é realizada por coleta de amostras fecais e análise da quantidade de prebiótico recuperada nas fezes após a administração oral (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007).

2.7.3 Estimulação seletiva da atividade e/ou crescimento de bactérias intestinais

Testes “in vitro” podem ser realizados em culturas puras ou em culturas a partir de amostras fecais. Nas culturas puras alguns micro-organismos que habitam o intestino são selecionados, como cepas de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp. e *Escherichia coli* (GIBSON et al., 2004) e são crescidos em meios onde é adicionado o prebiótico testado como única fonte de carbono. Em culturas com amostras fecais os micro-organismos também são crescidos em meio contendo o prebiótico como única fonte de carbono e posteriormente são analisados o efeito seletivo de estimulação de crescimento (GIBSON et al., 2004). Ambos os testes apresentam vantagens e desvantagens, pois em culturas puras não é possível identificar os efeitos inibitórios de patógenos pelo crescimento de bactérias benéficas. Entretanto, testes com amostras fecais apresenta certa dificuldade na identificação das espécies presentes, o que não acontece em culturas puras (ROBERFROID, 2007). Por esta razão, os testes “in vitro” de culturas puras de bactérias probióticas e patogênicas foram os escolhidos para avaliar os XOs e FOs neste trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção de xilo-oligossacarídeos

3.1.1 Micro-organismos

O fungo *Aspergillus fumigatus* M51 foi isolado de material lignocelulósico coletado em São Paulo, Brasil. Esta cultura foi depositada na coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Industrial (UNESP, campus Assis/SP) e na Coleção de Cultura Tropical (CCT), Fundação André Tosello, (Campinas, SP, Brasil) com o código CCT 7732. *A. fumigatus* M51 foi depositado e mantido em amostras congeladas em nitrogênio líquido (-270°C) em meio Potato Dextrose Agar (PDA), pH 4,5 com 10% de glicerol na solução para preservação das células.

O fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 foi obtido pela Coleção de Cultura Tropical (CCT), cedido pela Fundação André Tosello, (Campinas, SP, Brasil) com o código CCT 2768. *T. reesei* foi depositado na coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Industrial (UNESP, campus Assis/SP), e mantido em amostras congeladas em nitrogênio líquido (-270°C) em meio Potato Dextrose Agar (PDA), pH 4,5 com 10% de glicerol na solução para preservação das células.

3.1.2 Produção de xilanases

As linhagens de *Aspergillus fumigatus* (M51) e *Trichoderma reesei* QM 9414 foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio descrito por Silva e colaboradores (2013): 3% de capim napier (*Pennisetum purpureum*) moído, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,0017% MgSO₄.7H₂O, 0,11% K₂HPO₄, 0,0028% ZnSO₄, 0,1% NH₄H₂PO₄, 0,06% KCl, 0,1% extrato de levedura e 1% sacarose. O meio foi preparado em pH 4,5 e autoclavado por 20 minutos a 121°C. O material foi inoculado com 10⁶ esporos por grama de substrato contados por microscopia em câmara de Neubauer. A fermentação foi incubada a 28°C sob agitação de 180 rpm, por 144 horas. O material foi filtrado a vácuo, utilizando papel Whatman nº 1 e posteriormente centrifugado (Heraeus Cryofuge 6000i) a 4000 x g.

3.1.3 Pré-tratamento por KOH para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar

Foram feitos alguns experimentos com a finalidade de aperfeiçoar a extração de hemicelulose, visando tornar este processo mais econômico. Para efeito comparativo foram realizados um método já descrito na literatura e mais cinco tratamentos com variações na quantidade de reagentes e na temperatura durante a hidrólise. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O método descrito por Zilliox e Debeire (1998) (método ZD) para extração de hemicelulose consistiu em: 8% de bagaço (Usina Água Bonita - Tarumã/SP) moído, lavado e seco foi pré-incubado a 60°C por 16 h em 400 ml de água. Em seguida, o mesmo foi drenado. Após este processo o bagaço foi hidratado para 250 ml de uma solução de KOH (Sigma Aldrich) (24% m/v) e NaBH₄ (Sigma Aldrich) (1% m/v) por 3 h a 35°C. O extrato foi obtido por filtração em papel de filtro Whatman nº 1. A hemicelulose foi precipitada da fase aquosa na proporção de 1,8 volumes de etanol gelado (combustível) e 0,2 volume de ácido acético glacial P.A. (Synth) para 1 volume de hemicelulose solubilizada. O material precipitado foi centrifugado (Heraeus Cryofuge 6000i) a 4000 x g por 15 minutos. Posteriormente, o material foi lavado 4 vezes com uma solução de 50% de água, 50% de álcool e 0,5% de EDTA (Sigma Aldrich), antes de ser seco a 60°C (ZILLIOX e DEBEIRE, 1998; AKPINAR, ERDOGAN, BOSTANCI, 2009(a)).

Para os tratamentos houve alteração de: concentração de bagaço, ausência ou presença de pré-incubação a 60°C por 16 horas, concentração de KOH, tempo e temperatura da hidrólise, proporção de etanol e ácido acético utilizado na precipitação da hemicelulose e número de lavagens. As lavagens foram feitas até obter pH neutro. O KOH foi escolhido para este trabalho pela possibilidade de recuperação e reutilização do mesmo para posteriores extrações. As metodologias do método ZD e dos tratamentos estão descritas resumidamente na tabela 1.

Tabela 1- Tratamentos para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar por pré-tratamento alcalino.

	Pré-Tratamento					Precipitação etanol+ácido acético:hidrolisado (v/v)	Nº lavagens *
	Bagaço (%)	Pré- incubação (60°C/16h)	KOH (%)	Temp. (°C)	Tempo		
Método ZD	8	Sim	24	35	3 h	2:1	5
Tratamento1	8	Sim	10	70	3 h	2:1	4
Tratamento2	8	Sim	5	70	3 h	1:1	4
Tratamento3	8	Não	5	121	30 min	2:1	1
Tratamento4	12	Não	5	121	30 min	2:1	1
Tratamento5	8	Não	5	121	30 min	1:1	1

*Lavagem da hemicelulose com água, álcool e EDTA.

3.1.4 Hidrólise enzimática da hemicelulose para a produção de XOs

Os parâmetros para produção de XOs foram previamente desenvolvidos e otimizados por Carvalho et al. (2015). A reação enzimática foi constituída na mistura de 120U de enzimas xilanases, produzidas por *Aspergillus fumigatus* M51, por gramas de hemicelulose obtidas pelos diferentes métodos de extração da hemicelulose (Item 3.1.3 (Tabela 1)) e 20 ml de suspensão de hemicelulose (7%) em 100 mM de tampão acetato (pH 5,5). Essas misturas foram incubadas a 50°C com agitação de 130 rpm por 24h, sendo coletadas alíquotas com 0h, 12h e 24h de reação. As reações de hidrólise foram paralisadas submetendo-as por 10 minutos em banho de ebulição. O mesmo processo foi repetido para a hidrólise enzimática com enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* QM 9414. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2 Digestão “in vitro” dos oligossacarídeos

Os testes “in vitro” foram realizados em triplicata de acordo com Asano et al., (2003). Foram utilizados FO comercial (Clariant ORAFIT 95P), XO comercial (Shandong Longlive Biotechnology CO., LTD 95P) e XOs LABI (produzido com as melhores condições determinadas nos itens 3.1.3 e 3.1.4). Como controle, XOs LABI, XOs e FOs comerciais foram incubados nas mesmas condições descritas nos subitens seguintes (3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3), porém sem adição de enzimas digestivas.

3.2.1 Digestão por amilase presente na saliva humana

XOs e FOs comerciais e XOs LABI (2%) foram dissolvidos em 50mM de tampão maleato de sódio (pH 6,0). A α -amilase (Sigma Aldrich) foi diluída em água destilada para uma atividade de 20U/ml (ASANO et al., 2003). A digestão foi iniciada pela adição de 0,5 ml de amilase em 1 ml de solução de substrato no tubo e incubado a 37°C por 4 horas. Em seguida o tubo foi mergulhado em banho-maria com água fervente por dez minutos para inativar a enzima. O controle da reação foi feito com maltose (Sigma Aldrich). 1U foi determinada pela liberação de 1,0 μ mol de glicose a partir do amido em 3 minutos, pH 6,0 a 37°C. Os oligossacarídeos remanescentes foram avaliados por HPLC.

3.2.2 Digestão por suco gástrico artificial

XOs e FOs comerciais e XOs LABI (4%) foram dissolvidos em água destilada. O suco gástrico artificial (em 100 ml) foi preparado com 320 mg de pepsina suína (Sigma Aldrich), 200 mg de NaCl e 2,4 ml de HCl (0,1 M) (ASANO et al., 2003). A reação foi iniciada pela adição de 0,5 ml de cada solução de substrato em 1 ml de suco gástrico artificial e posteriormente incubados a 37°C por 4 horas. Em seguida o tubo foi mergulhado em banho-maria com água fervente por dez minutos até inativar a pepsina. O controle da reação foi feito com maltose (Sigma Aldrich). Os oligossacarídeos remanescentes foram avaliados por HPLC.

3.2.3 Digestão por enzimas pancreáticas suínas

As enzimas pancreáticas suínas (Sigma Aldrich) foram dissolvidas em tampão fosfato 50 mM (pH 8,0) com atividade da enzima amilase de 70 U/ml (ASANO et al., 2003). Os XOs e FOs comerciais e XOs LABI (4%) foram dissolvidos em tampão fosfato. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 ml da solução pancreática em 1 ml da solução de substrato e incubados a 37°C por 4 horas. Em seguida o tubo foi mergulhado em banho-maria com água fervente por dez minutos até inativar a enzima pancreática. O controle da reação foi feito com maltose (Sigma Aldrich). 1U foi determinada pela liberação de 1,0 μ mol de glicose a partir de amido em 3 min, pH 6 a 37°C. Os oligossacarídeos remanescentes foram avaliados por HPLC.

3.3 Fermentação “in vitro” de oligossacarídeos

3.3.1 Micro-organismos

Linhagens de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 utilizadas neste trabalho foram disponibilizados pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, RJ, Brasil). As culturas foram mantidas no Laboratório de Biotecnologia Industrial (UNESP – Assis/SP) em amostras congeladas em nitrogênio líquido (-270°C) em meio MRS, pH 6,0 com 10% de glicerol na solução para preservação das células.

Os micro-organismos do gênero *Bifidobacterium* utilizados no estudo foram: *Bifidobacterium animalis* BB-12 Christian Hansen (Hoersholm, Dinamarca), *Bifidobacterium lactis* BI-07 Danisco (Madison, EUA), *Bifidobacterium longum* BL-05 Danisco (Madison, EUA) e *Bifidobacterium breve* BB-03 Danisco (Madison, EUA). Estas linhagens foram mantidas no Laboratório de Biotecnologia Industrial em amostras congeladas em nitrogênio líquido (-270°C) em meio MRS com cisteína, pH 6,0 e 10% de glicerol na solução para preservação das células.

As cepas patogênicas que foram utilizadas neste trabalho são micro-organismos causadores de doenças do trato gastrointestinal obtidas na coleção da Fundação André Tosello, (Campinas, SP, Brasil). Foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* (ATCC 8739) (CCT 1371) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028) (CCT 1478). As culturas foram mantidas no Laboratório de Biotecnologia Industrial (UNESP-Assis/SP) em amostras congeladas em

nitrogênio líquido (-270°) em meio Ágar Nutriente, pH 7 com 10% de glicerol na solução para preservação das células.

3.3.2 Meios de crescimento

Os meios foram preparados variando a fonte de carbono pelos oligossacarídeos testados (XOs LABI, XOs e FOs comerciais) (MOURA et al., 2007; CRITTENDEN et al., 2002; MÄKELÄINEN et al., 2010).

3.3.2.1 Meio de Crescimento para bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Foi utilizado o meio formulado MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARP, 1960), o qual consistiu de (g/l): glicose 20 g, peptose proteona 10 g, extrato de carne 10 g, extrato de levedura 5 g, acetato de sódio 5 g, fosfato dissódico 2 g, citrato de amônio 2 g, tween ® 80 1 g, sulfato de magnésio 0,1 g e sulfato de manganês 0,05 g. O meio foi preparado em pH 6 e autoclavado por 20 minutos a 121°C. As cepas de *L. acidophilus* foram crescidas a 37°C por 72 horas e as cepas de *L. brevis* foram crescidas a 30°C por 72 horas.

Para as culturas de *Bifidobacterium* foi utilizado meio MRS modificado (SYKES e SKINNER, 1973), que apresenta adição de L-cisteína. A solução de cisteína foi filtrada em membrana Millipore (0,22 µm) antes de ser adicionada ao meio previamente autoclavado (121°C por 20 minutos) e resfriado a temperatura ambiente. As cepas foram crescidas a 37°C por 72 horas.

Os XOs (LABI) produzidos no laboratório de Biotecnologia Industrial com as melhores condições definidas nos itens 3.1.3 e 3.1.4 foram utilizados para o teste de fermentação “in vitro”, apresentando um total de 3,9% de carboidratos, sendo 1,7% de XOs e 2,2% de xilose. Para que o meio com XOs LABI apresentasse os 2% de carboidrato total referente à formulação original do meio, foi necessário diluí-lo até apresentar a seguinte composição: 0,87% de XOs e 1,13% de xilose. Para efeito comparativo foram realizados testes com meio contendo 1,13% de D-xilose (Serva) como única fonte de carbono e meio contendo 0,87% de D-glicose (Synth) como única fonte de carbono.

Além dos testes utilizando XOs LABI 2%, xilose 1,13% e glicose 0,87%, também foram utilizados meios com 2% de FOs (Clariant ORAFTI 95P), 2% XOs (Shandong Longlive Biotechnology CO., LTD 95P) e como controle positivo e negativo: 2% de D-

glicose (Synth) e meio sem carboidrato, respectivamente. Os experimentos de crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono foram realizados em triplicata.

3.3.2.2 Meio para crescimento de *Escherichia coli*

Para os cultivos foi preparado o meio Eosin Methilene Blue (EMB) (HOLT-HARRIS, TEAGUE, 1916) líquido com pequena modificação, cuja composição é (g/l): 10 g de peptona, 5 g de fosfato dipotássico, 5 g de lactose e 5 g de sacarose. O meio foi preparado em pH 7 e autoclavado por 20 minutos a 121°C. Os inóculos foram incubados a 37°C por 48 horas.

Os XOs (LABI) produzidos no laboratório de Biotecnologia Industrial com as melhores condições definidas nos itens 3.1.3 e 3.1.4 foram utilizados para o teste de fermentação “in vitro”, apresentando um total de 3,9% de carboidratos, sendo 1,7% de XOs e 2,2% de xilose. Para que o meio com XOs LABI apresentasse 1% de carboidrato total referente à formulação original do meio, foi necessário diluí-lo até apresentar a seguinte composição: 0,44% de XOs e 0,56% de xilose. Para efeito comparativo foram realizados testes com meio contendo 0,56% de D-xilose (Serva) como única fonte de carbono e meio contendo 0,44% de lactose (Synth) + sacarose (Synth) como única fonte de carbono.

Além dos testes utilizando XOs LABI 1%, xilose 0,56% e glicose 0,44%, também foram utilizados meios com 1% de FOs (Clariant ORAFIT 95P), 1% XOs (Shandong Longlive Biotechnology CO., LTD 95P) e como controle positivo e negativo: 1% de lactose + sacarose e meio sem carboidrato, respectivamente. Os experimentos de crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono foram realizados em triplicata.

3.3.2.3 Meio de crescimento de *Salmonella enterica*

Para os cultivos foi preparado o meio Verde Brilhante (BG) (KAUFFMANN, 1935) líquido com pequena modificação, cuja composição é (g/l): 3 g de extrato de levedura, 10 g de peptona proteose, 5 g de cloreto de sódio, 10 g de lactose e 10 g de sacarose. O meio foi preparado em pH 7 e autoclavado por 20 minutos a 121°C. Os inóculos foram incubados a 37°C por 48 horas.

Os XOs (LABI) produzidos no laboratório de Biotecnologia Industrial com as melhores condições definidas nos itens 3.1.3 e 3.1.4 foram utilizados para o teste de fermentação “in vitro”, apresentando um total de 3,9% de carboidratos, sendo 1,7% de XOs e

2,2% de xilose. Para que o meio com XOs LABI apresentasse os 2% de carboidrato total referente a formulação original do meio, foi necessário diluí-lo até apresentar a seguinte composição: 0,87% de XOs e 1,13% de xilose. Para efeito comparativo foram realizados testes com meio contendo 1,13% de D-xilose (Serva) como única fonte de carbono e meio contendo 0,87% de lactose (Synth) + sacarose (Synth) como única fonte de carbono.

Além dos testes utilizando XOs LABI 2%, Xilose 1,13% e lactose + sacarose 0,87%, também foram utilizados meios com 2% de FOs (Clariant ORAFIT 95P), 2% XOs (Shandong Longlive Biotechnology CO., LTD 95P) e como controle positivo e negativo: 2% de lactose + sacarose e meio sem carboidrato, respectivamente. Os experimentos de crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono foram realizados em triplicata.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Cálculos do rendimento do material extraído do bagaço (Rex), rendimento de hemicelulose (Rh) e eficiência na extração de hemicelulose (Eh).

Os rendimentos do material extraído do bagaço, hemicelulose e a eficiência estão apresentados nas respectivas equações (Eq 1, 2 e 3):

Eq 1: $\% \text{ Rex} = (Me/Mb) \cdot 100$ onde, Rex = rendimento do material extraído, Me = massa seca do material extraído, Mb = massa do bagaço seco utilizado para extração.

Eq 2: $\% \text{ Rh} = ((Me \cdot Mh)/Mb) \cdot 100$ onde, Rh = rendimento de hemicelulose baseado no bagaço, Mh = massa de hemicelulose quantificada do material extraído.

Eq 3: $\% \text{ Eh} = (Me \cdot Mh)/(Mb \cdot Mhb) \cdot 100$ onde, Eh = eficiência na extração de hemicelulose, Mhb = massa de hemicelulose quantificada no bagaço.

A massa seca do bagaço e do material extraído foi obtida a 100-105°C por 24 horas. A porcentagem de lignina total, hemicelulose e celulose foi obtida de acordo com Sluiter et al., (2010). Sais totais foram realizados em mufla a uma temperatura de 800°C por 5 horas. A porcentagem de potássio foi obtida através dos sais totais dissolvidos em HCl com posterior

leitura em absorção atômica. Análises estatísticas foram realizadas para comparar a extração de hemicelulose usando ANOVA e teste Tukey pelo software BioEstat 5.0.

3.4.2 Determinação da atividade xilanolítica

A atividade da enzima (item 3.1.2) foi analisada a 50°C numa reação com 0,1 ml de enzima previamente diluída e acrescentou-se 0,65 mL de solução de substrato em tampão de acetato de sódio 0,25 M, pH 5,0 (CARVALHO et al., 2015). O substrato utilizado foi 0,5% de xilana de bétula (Sigma Aldrich). A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER 1959). Uma unidade (U) de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcar redutor por minuto por mL da mistura de reação.

3.4.3 Identificação e quantificação de xilo-oligossacarídeos

A identificação e quantificação dos xilo-oligossacarídeos (item 3.1.4) foram realizadas em HPLC (dispositivo Agilent 1100) e um detector de índice de refração. Coluna Bio-Rad HPX-87C foi usada com temperatura de 65°C, a eluição foi realizada em água mili-Q. O tempo de eluição foi de 20 minutos e a taxa de fluxo mantida a 0,5 ml/min. Os padrões utilizados foram: arabinose (Sigma Aldrich), xilose (Sigma Aldrich), xilobiose (Megazyme International), xilotriose (Megazyme International) e xilotetraose (Megazyme International).

Os rendimentos de XOs e xilose foram determinados pela equação 4 e 5 (CARVALHO et al., 2015):

Eq 4: $XOs (\%) = (XOs \text{ total (g)} / \text{hemicelulose (g)}) * 100$, onde XOs total é a soma de xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexaose (X6).

Eq 5: $Xilose (\%) = (Xilose \text{ (g)} / \text{hemicelulose (g)}) * 100$

Análises estatísticas foram realizadas para comparar a produção de XOs usando ANOVA pelo software BioEstat 5.0.

3.4.4 Determinação dos oligossacarídeos antes e após digestão enzimática

XOs e FOs comerciais e XOs LABI antes e depois da digestão enzimática foram quantificados. Depois da desativação de enzimas digestivas (item 3.2), as soluções de incubação foram diluídas 100 vezes com água e centrifugadas (Heraeus Megafuge 16R) a 5200 x g por 10 minutos (ASANO et al., 2003). O sobrenadante foi utilizado para análise por HPLC após filtragem através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Advantec). A determinação de oligossacarídeos foi realizada com um dispositivo Agilent 1100 e um detector de índice de refração. Coluna Bio-Rad HPX-87C foi usada com temperatura de 65°C, a eluição foi realizada em água mili-Q. O tempo de eluição foi de 20 minutos e a taxa de fluxo mantida a 0,5 ml/min. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.5 Determinação da curva e velocidade de crescimento

As curvas de crescimento de bactérias probióticas e de bactérias patogênicas foram determinadas por análise da densidade óptica (O.D.). A absorbância foi lida a 600 nm em espectrofotômetro (Fento 700 Plus) (MOURA et al., 2007). Alíquotas de bactérias probióticas foram tiradas com 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Para as bactérias patogênicas as alíquotas foram tiradas com 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. Os crescimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de hemicelulose por KOH

Os testes para extração de hemicelulose visaram o aperfeiçoamento do pré-tratamento alcalino (ZILLIOX e DEBEIRE, 1998) com o intuito de torná-lo um processo mais econômico e simplificado. Os experimentos foram feitos variando a porcentagem de KOH (24%, 10% e 5%) e aumentando a temperatura de 35°C para 70°C e 121°C.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo apresentou 6% de umidade (analisada pela massa seca do bagaço). A composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho foi determinada por Carvalho et al. (2015) e apresentou: 40,3% de celulose (glucana), 25,1% de hemicelulose (arabinana 1,9%, galactana 0,5%, xilana 21,9%, manana 0,8%), 25,2% de lignina total (lignina solúvel 1,7% e lignina insolúvel 23,5%) e 4,5% de cinzas. De acordo com a literatura, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta 24-29% de hemicelulose, 19-25% de lignina total, 38-50% de celulose e 1-7% de cinzas (BRIENZO, SIQUEIRA, MILAGRES, 2009; GOUVEIA, DO NASCIMENTO, SOUTO-MAIOR, 2009).

O método ZD apresentou 72,1% de hemicelulose no material extraído (Tabela 2). O rendimento do material extraído (Rex), rendimento de hemicelulose em relação ao bagaço (Rh) e eficiência na extração (Eh) foi de respectivamente 27%, 19,6% e 78% (Tabela 3). Com exceção do tratamento 1 todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa na concentração de hemicelulose (ANOVA e teste Tukey $p < 0,05$) em relação ao método ZD. Carvalho et al. (2015) utilizando as mesmas condições do método ZD para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram resultados semelhantes, apresentando 71,9% de hemicelulose e o Rex e Rh foi de 25,4% e 18,26%, respectivamente.

Jayapal et al. (2013) também realizaram o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, porém combinado com explosão a vapor para a extração de hemicelulose. O rendimento de hemicelulose foi superior utilizando hidróxido de sódio (85%) quando comparado à extração utilizando hidróxido de potássio (53%).

Os tratamentos 1 e 3 apresentaram Rex menores do que o método ZD, sendo 24,8% e 25,8% respectivamente, porém não foram estatisticamente significativos (ANOVA e teste Tukey $p > 0,05$) (Tabela 3). Entretanto a porcentagem de hemicelulose quantificada no material de ambos os tratamentos foram superiores ao método ZD, destacando-se o tratamento 3 com 76,3% de hemicelulose e 72,9% de eficiência no processo de extração (Tabelas 2 e 3).

O tratamento 1 apresentou 72,8% de hemicelulose e a eficiência de extração de hemicelulose foi 72% (Tabelas 2 e 3).

O tratamento 2 apresentou o menor rendimento do material extraído com diferença estatística significativa (ANOVA e teste Tukey $p > 0,05$) e queda de mais de 10% quando comparado ao método ZD (Tabela 3), portanto não foi considerado um resultado satisfatório. A porcentagem de hemicelulose extraída foi baixa, com apenas 64,8% (Tabela 2). Houve um aumento na porcentagem de sais totais (22%) e os resultados de rendimento de hemicelulose em relação ao bagaço e eficiência na extração foram os mais baixos, apresentando 10,3% e 41,3% respectivamente (Tabela 3).

O aumento da quantidade de bagaço para o processo de extração no tratamento 4 não aumentou a porcentagem de hemicelulose extraída (69,5%), apresentando somente 50,1% de Eh e 12,6% de Rh (Tabelas 2 e 3). O rendimento de material extraído no tratamento 4 apresentou diferença estatística (ANOVA e teste Tukey $p > 0,05$) quando comparado ao método ZD.

O tratamento 5 apresentou um razoável rendimento de material extraído (23,5%), sem diferença estatística (ANOVA e teste Tukey $p > 0,05$) em relação ao ZD, embora a concentração de hemicelulose tenha sido baixa (65,9%) comparada aos outros tratamentos (exceto tratamento 2) (Tabelas 2 e 3). Este resultado demonstra a relevância na proporção utilizada de etanol e ácido acético durante o processo de precipitação, assim como no tratamento 2 onde a proporção também foi de 1 volume de etanol e ácido acético para 1 volume de hemicelulose solubilizada, diferentemente dos demais experimentos em que a proporção foi de 2:1. Estes dados indicam que a proporção de 2:1 é fundamental no processo de extração e separação da hemicelulose em relação aos outros componentes. Isto justifica a presença de um maior teor de sais em ambos os tratamentos com proporção de 1:1, o que fica mais evidente quando o tratamento 5 é comparado aos demais experimentos realizados com a mesma temperatura (121°C) e concentração de KOH.

O método ZD e o tratamento 1, realizados com mais hidróxido de potássio para a extração da hemicelulose (24% e 10% de KOH, respectivamente), apresentaram altas concentrações de potássio em relação aos tratamentos com 5% de KOH (Tabela 2), exceto o tratamento 2 que apresentou a maior concentração de potássio em relação aos demais experimentos. Dentre os experimentos utilizando apenas 5% de KOH, os tratamentos 2 e 5 apresentaram maiores concentrações de potássio, o que reforça ainda mais a importância da proporção de etanol e ácido acético na eliminação de impurezas contidas no material.

Tabela 2- Composição química do material extraído.

	Hemicelulose (%)	Glicose (%)	Lignina Total (%)	Sais Totais (%)	Potássio (%)**
Método ZD	72,1 ± 0,6a*	3,4 ± 0,2	9,4 ± 0,7	16,13 ± 0,6	2,27 ± 0,3
Tratamento 1	72,8 ± 0,3a	1,10 ± 0,5	11,2 ± 0,2	16,54 ± 0,5	2,18 ± 0,1
Tratamento 2	64,8 ± 0,9b	1,08 ± 0,5	7,8 ± 0,2	22,09 ± 0,3	2,49 ± 0,2
Tratamento 3	76,3 ± 0,4c	2,40 ± 1,3	10,3 ± 0,3	13,06 ± 0,1	1,11 ± 0,5
Tratamento 4	69,5 ± 0,2d	2,72 ± 0,6	10,0 ± 0,3	12,07 ± 0,3	1,00 ± 0,1
Tratamento 5	65,9 ± 0,6b	4,88 ± 0,5	8,7 ± 0,1	16,82 ± 0,2	1,86 ± 0,2

*Valores seguidos de letras iguais não apresentaram diferença significativa na ANOVA seguida do teste Tukey. **Em relação aos sais totais.

Tabela 3- Rendimento de material extraído, rendimento e eficiência na extração de hemicelulose, baseados na composição química do bagaço de cana-de-açúcar.

	Rendimento do material extraído (% Rex)	Rendimento de hemicelulose (% Rh)	Eficiência na extração de hemicelulose (% Eh)
Método ZD	27,0 ± 1,9a*	19,6 ± 0,3	78,0 ± 0,2
Tratamento 1	24,8 ± 0,9a	18,0 ± 0,2	72,0 ± 0,1
Tratamento 2	16,0 ± 1,2b	10,3 ± 0,5	41,3 ± 0,3
Tratamento 3	25,8 ± 1,6a	18,3 ± 0,2	72,9 ± 0,1
Tratamento 4	18,0 ± 0,2b	12,6 ± 0,1	50,1 ± 0,1
Tratamento 5	23,5 ± 0,1a	15,4 ± 0,3	61,6 ± 0,2

*Valores seguidos de letras iguais não apresentaram diferença significativa na ANOVA seguida do teste Tukey.

A tabela 4 mostra a utilização de reagentes como álcool e KOH, além do tempo gasto durante o processo de extração de hemicelulose. Os tratamentos 3, 4 e 5 apresentaram mais de 75% de redução do uso de KOH por grama de hemicelulose bruta extraída e uma redução de mais de 40% de etanol em relação ao método ZD. Para estes tratamentos houve diminuição de

27 vezes do tempo gasto na etapa de extração quando comparado ao método ZD, devido a retirada da etapa de pré-incubação e a redução de 4 lavagens, o que simplificou o processo. Nos tratamentos 1 e 2 o gasto de tempo foi semelhante ao método ZD, com economia de apenas 15 minutos proporcionado pela diminuição de 1 lavagem.

Embora o aumento de temperatura de 35°C (método ZD) para 70°C (tratamentos 1 e 2) e 121°C (tratamentos 3, 4 e 5) resulte em maior gasto de energia, todos os tratamentos apresentaram economia dos insumos em relação ao método ZD, exceto o tratamento 2 que houve um aumento de 10,8% no consumo de etanol. Por estes motivos, os tratamentos estudados são mais interessantes pela diminuição dos custos com os reagentes utilizados, pois estes produtos apresentam valores altos no mercado, como por exemplo, o KOH (Sigma Aldrich) com um preço médio atual de 470 reais o quilo e etanol (combustível) com preço médio de 2,09 reais o litro.

Tabela 4- Insumos utilizados durante o tratamento alcalino para extração da hemicelulose.

	Etanol/hemicelulose (ml/g)			Redução/ Aumento (%)	Total KOH/ hemicelulose (g/g)	Redução de KOH (%)	Tempo Total (h)*
	Precipitação	Lavagem	Total				
Método ZD	52,9	73,5	126,4	0	11,76	0	20,25
Tratamento 1	58,7	65,2	123,9	- 1,98	5,40	54,1	20
Tratamento 2	40,0	100	140,0	+ 10,8	4,16	64,6	20
Tratamento 3	60,0	14,7	74,7	- 40,9	2,80	76,2	0,75
Tratamento 4	52,9	14,7	67,6	- 46,5	2,45	79,2	0,75
Tratamento 5	27,3	17	44,3	- 65,0	2,84	75,9	0,75

*Considerando pré-incubação (0 - 16h), extração alcalina (30 min - 3h) e lavagem (15 min/lavagem), exceto precipitação (15 min) e secagem (24h), pois ambos são iguais em todos os experimentos.

Desta forma, destacam-se os tratamentos 1 e 3, pois apresentaram: a) melhor rendimento de hemicelulose, b) não houve aumento significativo na porcentagem de sais totais, c) além da economia com reagentes utilizados durante a extração de hemicelulose, pois o tratamento 1 reduziu em 54,1% do consumo de KOH e 1,98% do consumo de etanol, e o tratamento 3 reduziu 76,2% no consumo de KOH e 40,9% no consumo de etanol (Tabela 4).

4.2 Produção de XOs a partir da extração de hemicelulose e xilanases fúngicas

Os testes com enzimas do fungo *T. reesei* e de *A. fumigatus* foram realizados com os melhores tratamentos para obtenção de hemicelulose, selecionados no item anterior (item 4.1): hemicelulose contendo 24% de KOH incubada a temperatura de 35°C (método ZD), hemicelulose extraída com 10% de KOH incubada a uma temperatura de 70°C (tratamento 1) e hemicelulose com 5% de KOH autoclavada (121°C) por 30 minutos (tratamento 3). A hidrólise enzimática para a produção de XOs com as xilanases dos dois fungos e com os três tratamentos para obtenção de hemicelulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar estão representados na Figura 3 e Tabelas 5 e 6.

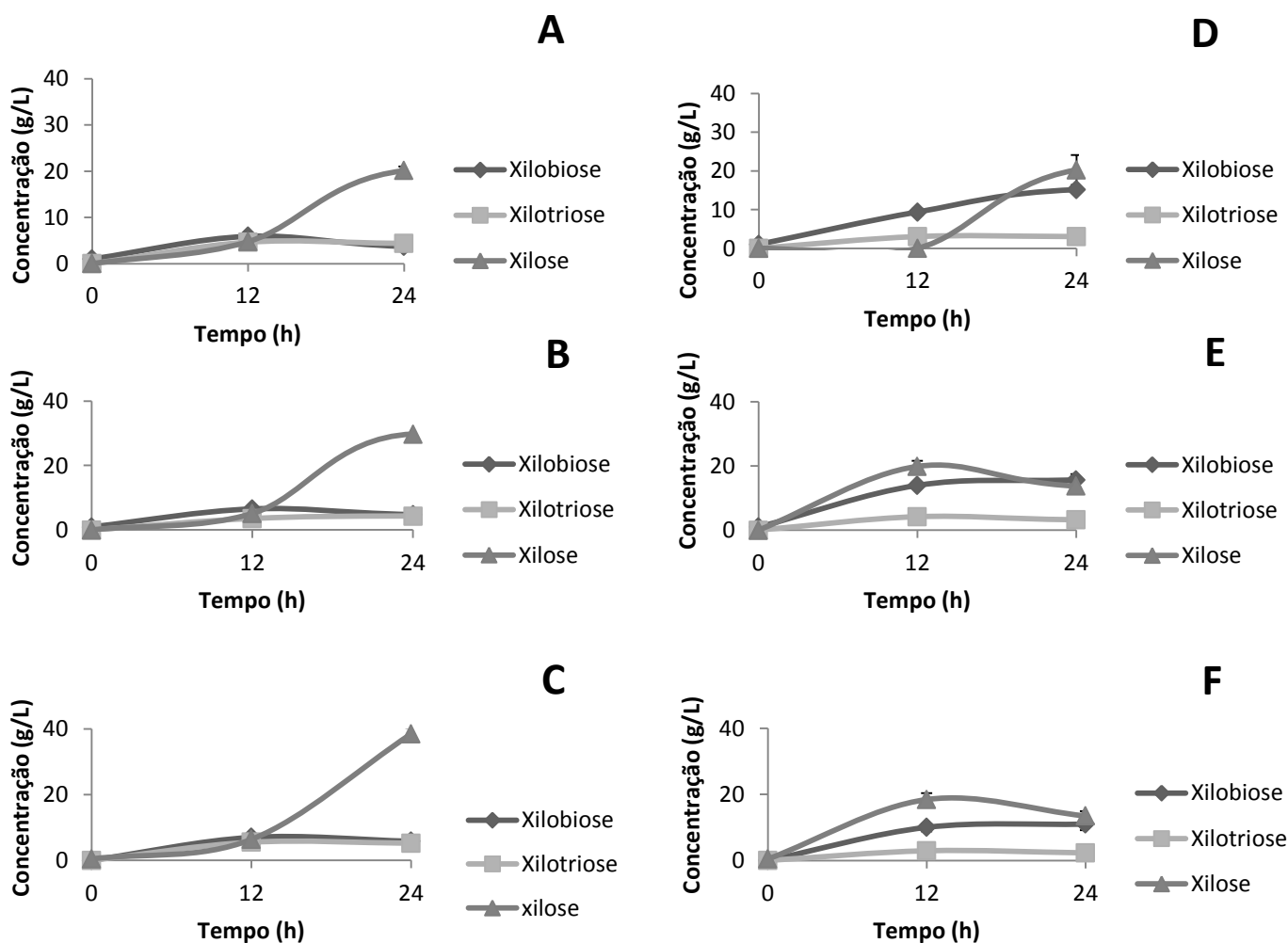


Figura 3- Comparação entre XOs produzidos com enzimas de *T. reesei* utilizando como substrato hemicelulose obtida pelos métodos ZD (A), tratamento 1 (B) e tratamento 3 (C) e os XOs produzidos com enzimas de *A. fumigatus* utilizando como substrato hemicelulose obtida pelo método ZD (D), tratamento 1 (E) e tratamento 3 (F). Incubados a 50°C, 130 rpm por 24h.

Nos experimentos com enzimas de *T. reesei*, houve uma alta produção de xilose e baixa liberação de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) (grau de polimerização (dp 2-3)) e praticamente não liberou outros XOs (observado em HPLC a ausência de picos correspondentes a X4, X5 etc.), independentemente do tipo de processo de extração de hemicelulose utilizado na reação (Figura 3 A, B e C).

Em todas as reações enzimáticas com o fungo *T. reesei*, a maior porcentagem de hidrólise da hemicelulose foi em 24 horas de incubação. Os efeitos da porcentagem de KOH e da temperatura de extração de hemicelulose influíram nos testes de hidrólise enzimática da hemicelulose, visto que no método ZD e tratamentos 1 e 3, as porcentagens de hidrólise foram respectivamente: 40,3%, 55,5% e 70,6%. Portanto é nítido o aumento da porcentagem de hidrólise em função do aumento de temperatura e diminuição de KOH durante o processo de extração da hemicelulose (Tabela 5). Entretanto este aumento da porcentagem de hidrólise enzimática está diretamente ligado à produção de xilose, pois quanto maior foi a temperatura e menor a porcentagem de KOH, maior a liberação de xilose em 24 horas de reação, apresentando rendimentos de 28,7% no método ZD, 42,5% no tratamento 1 e 54,9% no tratamento 3.

Para o método ZD e tratamento 1 a produção de XOs (X2 e X3) foi semelhante, apresentando em 24 horas de reação apenas 11,57% e 12,96%, respectivamente. No tratamento 3, a produção de XOs foi um pouco maior apresentando 17,8% e 15,7%, com 12 e 24 horas respectivamente (Tabela 5). Brienzo (2010) utilizando enzimas de *T. reesei* também observou a maior produção de XOs (20%) em pouco tempo de reação (6 horas) e concluiu que aumento do tempo (6-24 horas) favoreceu a liberação de xilose.

T. reesei é produtor de enzimas β xilosidase (POUTANEN e PUIS, 1988; GÓMEZ et al., 2001) e de xilanases, o que explica a ação das β xilosidases através de sua alta liberação de xilose nas primeiras 24 horas de reação. De acordo com a literatura, estudos com outros micro-organismos relatam que a alta concentração de xilose inibe a atuação de xilanases que converte a hemicelulose em XOs (ARO, PAKULA, PENTILLA, 2005; VÁZQUEZ et al., 2005).

Tabela 5- Comparação entre porcentagem de KOH, temperatura utilizada durante o pré-tratamento alcalino, porcentagem de hidrólise enzimática da hemicelulose, concentração e rendimento de xilose e XOs após hidrólise por xilanases de *T. reesei*.

<i>T. reesei</i>	KOH (%)	Temp. (°C)*	Hidrólise (%)**	Xilose (g/l)	Rendimento Xilose (%)	XOs (g/l)	Rendimento XOs (%)
Método ZD 0 h	24	35	0	0	0	0	0
Método ZD 12 h	24	35	21,90	4,75	6,79	10,5	15,05
Método ZD 24 h	24	35	40,30	20,11	28,73	8,10	11,57
Tratamento 1 0h	10	70	0	0	0	0	0
Tratamento 1 12h	10	70	21,64	5,10	7,29	10,0	14,36
Tratamento 1 24h	10	70	55,50	29,76	42,51	9,07	12,96
Tratamento 3 0 h	5	121	0,60	0,40	0,60	0	0
Tratamento 3 12h	5	121	26,91	6,36	9,09	12,5	17,83
Tratamento 3 24h	5	121	70,61	38,44	54,91	10,9	15,70

*Pré-tratamento alcalino para extração de hemicelulose

**Considerando hemicelulose bruta (7%)

Nas hidrólises realizadas com enzimas de *A. fumigatus* M51 houve melhor produção de X2 e X3 (grau de polimerização (dp 2-3)) e praticamente não liberou outros XOs (observado em HPLC a ausência de picos correspondentes a X4, X5, etc.), e a liberação de xilose foi menor, exceto no método ZD (Figura 3 D, E e F).

No método ZD a maior porcentagem de hidrólise da hemicelulose foi com 24 horas de reação, apresentando 54,9% (Tabela 6). A hidrólise da hemicelulose no tratamento 3 com xilanases de *T. reesei* em 24 horas foi de 15,7% superior a hidrólise do método ZD com 24h e 25,77% superior a hidrólise do tratamento 3 com 12h, ambos com xilanases de *A. fumigatus*. Porém nas hidrólises utilizando enzimas do fungo *T. reesei* houve um predomínio de xilose.

Nos tratamentos 1 e 3 a maior porcentagem de hidrólise da hemicelulose ocorreu com 12 horas de reação apresentando respectivamente 53,3% e 44,8%. Diferente das hidrólises anteriores (*T. reesei*), os resultados com a enzima do fungo *A. fumigatus* mostraram que o aumento da temperatura e diminuição na porcentagem de KOH durante a extração da hemicelulose diminuiu a porcentagem de hidrólise na reação enzimática. Os maiores rendimentos de xilose ocorreram nas primeiras 12 horas dos tratamentos 1 (28,3%) e 3 (26,3%) (Tabela 6). O perfil de liberação de xilose foi diferente no método ZD, houve baixa liberação nas primeiras 12 horas e um pico de xilose (28,9%) com 24 horas.

Para todos os experimentos, exceto o tratamento 3, a produção de XOs utilizando enzimas do fungo *A. fumigatus* foi superior aos experimentos de hidrólise com enzimas do fungo *T. reesei*. O rendimento de XOs no método ZD foi de 25,9% com 24h (Tabela 6). No tratamento 1 o rendimento de XOs atingiu 27,1% (Figura 4) e no tratamento 3 obteve-se apenas 18,9%, ambos em 24 horas de reação (Tabela 6).

O rendimento de XOs utilizando hemicelulose pelo tratamento 1 e enzimas de *A. fumigatus* foi menor do que o obtido por Carvalho e colaboradores (2015), que produziram XOs utilizando 2% de hemicelulose extraída pelo método ZD a partir do bagaço de cana-de-açúcar com 120-500 U/g de xilanases de *A. fumigatus* M51 e obtiveram um rendimento de 37,6% com um tempo maior de reação (48-72 horas) a 50°C. Outro rendimento maior de XOs (37,1%) foi observado por Brienzo, Carvalho e Milagres (2010) obtidos com 60U de enzimas de *Thermoascus aurantiacus* e 2% de hemicelulose extraída por método alcalino (peróxido de hidrogênio) a partir do bagaço de cana-de-açúcar em um tempo ainda maior de reação (96h) a 50°C. Jayapal et al. (2013) obteve um rendimento de apenas 8,6% de XOs utilizando pré-tratamento alcalino para extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar com apenas 13,3 U de enzimas de *Trichoderma viridae* por 8 horas de reação. Outro trabalho utilizando talo de tabaco como substrato para extração de hemicelulose por método alcalino obteve 11,4% de XOs com 20U de enzimas de *Aspergillus niger* por 24h a 40°C (AKPINAR, ERDOGAN, BOSTANCI, 2009 (a)).

A hidrólise enzimática com enzimas do fungo *T. reesei* mostrou ser mais vantajosa e econômica para produção de xilose, principalmente quando se utiliza hemicelulose tratada com 5% de KOH a 121°C por 30 minutos como substrato, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação a xilose (ANOVA $p = 0,18$).

Os experimentos com hidrólise enzimática por enzimas do fungo *A. fumigatus* mostraram ser mais eficientes para produção de XOs, principalmente xilobiose e xilotriose. Apesar da produção de XOs com enzima de *A. fumigatus* não ter apresentado diferença estatística significativa (ANOVA $p = 0,28$) entre as reações enzimáticas com as hemiceluloses extraídas dos diferentes tratamentos, o tratamento que utilizou hemicelulose extraída com 10% de KOH se tornou um processo mais interessante pela eficiência na produção de XOs com baixa liberação de xilose e pela redução na quantidade de KOH, resultando em produto mais puro e em uma economia significativa com este reagente (Tabela 4).

Tabela 6- Comparação entre porcentagem de KOH, temperatura utilizada durante o pré-tratamento alcalino, porcentagem de hidrólise enzimática da hemicelulose, concentração e rendimento de xilose e XOs após hidrólise por xilanases *A. fumigatus*.

<i>A. fumigatus</i>	KOH (%)	Temp. (°C)*	Hidrólise (%)**	Xilose (g/l)	Rendimento xilose (%)	XOs (g/l)	Rendimento XOs (%)
Método ZD 0 h	24	35	0	0	0	0	0
Método ZD 12 h	24	35	17,76	0,02	0,03	12,4	17,73
Método ZD 24 h	24	35	54,91	20,25	28,93	18,2	25,99
Tratamento 1 0h	10	70	0	0	0	0	0
Tratamento 1 12h	10	70	53,34	19,83	28,33	18,1	25,87
Tratamento 1 24h	10	70	46,53	13,72	19,60	19,0	27,14
Tratamento 3 0h	5	121	0,60	0,40	0,60	0	0
Tratamento 3 12h	5	121	44,84	18,43	26,33	13,0	18,51
Tratamento 3 24h	5	121	38,21	13,46	19,23	13,3	18,99

*Pré-tratamento alcalino para extração de hemicelulose

**Considerando hemicelulose bruta (7%)

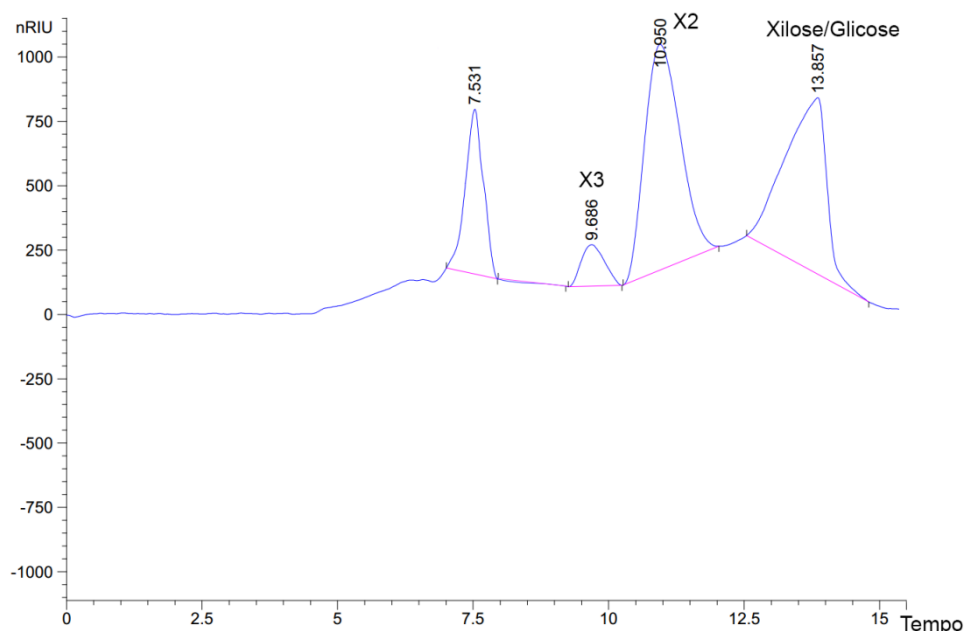


Figura 4- Cromatograma dos XOs utilizando como substrato hemicelulose extraída com 10% de KOH a 70°C e enzima de *A. fumigatus*. Reação por 24h a 50°C.

Sendo assim, para os testes de digestibilidade por enzimas do trato gastrointestinal (Item 4.3) e fermentação “in vitro” de oligossacarídeos por bactérias probióticas e patogênicas

(Item 4.4), foram utilizados os XOs produzidos por enzimas de *A. fumigatus* utilizando hemicelulose extraída pelo tratamento 1 (XOs LABI).

4.3 Digestão “in vitro” de oligossacarídeos

Os testes de digestibilidade de oligossacarídeos teve a finalidade de simular o trato gastrointestinal para comprovar a resistência dos mesmos à ação de enzimas encontradas no sistema digestório (Figuras 5, 6, 7 e 8). Os XOs e FOs foram incubados por 4 horas a 37°C com amilase salivar humana, enzima pancreática suína e suco gástrico artificial.

Os testes se mostraram positivos para classificação dos XOs LABI como ingrediente prebiótico, pois estes resistiram à ação de enzimas amilase, pancreática e à acidez do suco gástrico. Houve uma degradação de apenas 3% de X2 em suco gástrico (Figura 5). Okazaki e colaboradores (1991) realizaram testes de digestibilidade “in vitro” de XOs com grau de polimerização (dp 2), também comprovando sua resistência às enzimas salivares, pancreáticas, suco gástrico e mucosa intestinal.

O XO comercial dp 2-4 (xilobiose, xilotriose e xilotetraose) não sofreu nenhuma degradação quando incubado com enzima amilase salivar e sofreu decomposição de apenas 2% em X2 e X3 em 4 horas por pancreatina e 4% de X4 e X3 em suco gástrico (Figura 6). Os testes comprovam a resistência dos XOs à ação de enzimas digestivas, atendendo a um dos critérios utilizados para classificação de ingredientes prebióticos (OKU, TOKUNAGA, HOSOYA, 1984).

Os FOs dp 2-3 (kestose (GF2) e nistose (GF3)) também apresentaram resistência à enzima amilase. Sofreu degradação de 5% de GF2 em 4 horas por pancreatina suína e 5% de GF3 em suco gástrico (Figura 7). Estes resultados também foram positivos para classificação dos FOs como ingredientes prebióticos. Estudos “in vitro” também demonstraram a não digestibilidade de FOs por enzimas salivares, pancreáticas e intestinais (HIDAKA et al., 1986; ZIESENITZ e SIEBERT, 1987).

A maltose, utilizada como um controle positivo para a enzima alfa amilase salivar, por sua vez, sofreu decomposição de 15% em 4 horas somente nos testes com amilase. E apresentou resistência as outras enzimas (Figura 8).

Estudos anteriores também realizados “in vitro” comprovaram com resultados semelhantes, a resistência de oligossacarídeos à ação de enzimas digestivas, onde mono-oligossacarídeos foram testados. Em amilase não houve degradação de MOs (manotetraose e manobiose), entretanto 40% de maltose foi decomposta por esta enzima em 4 horas de

incubação. No suco gástrico não houve alteração em MOs e em maltose, e após 4 horas de incubação em pancreatina houve pequena queda de MOs e 10% de degradação de maltose (ASANO et al., 2003).

Sem sofrer digestão por enzimas, os oligossacarídeos alcançam intáctes o intestino e servem como substrato para o crescimento de bactérias probióticas, os produtos desta fermentação inibem a proliferação de bactérias patogênicas presentes no cólon intestinal (MUSSATTO e MANCILHA, 2007), por isso a importância dos testes avaliados.

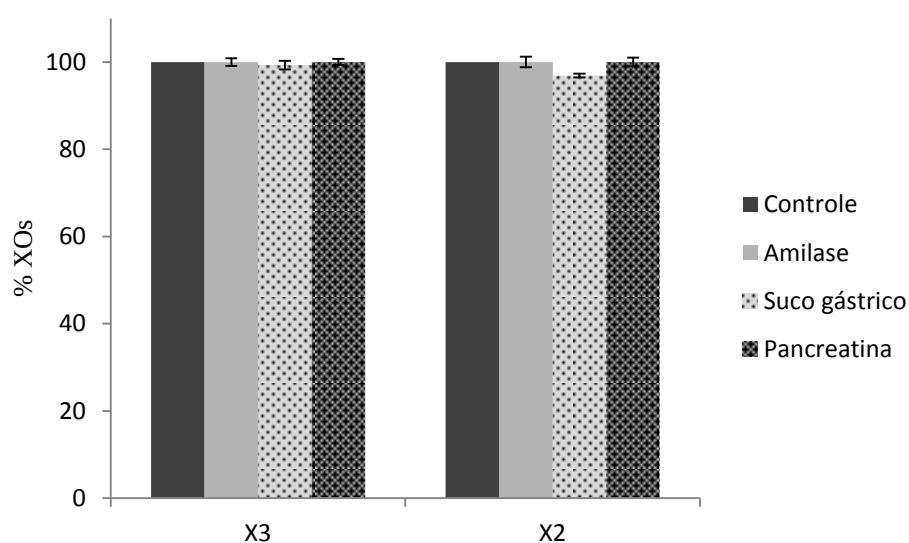


Figura 5- Perfil de digestibilidade de xilo-oligosacarídeo LABI por enzimas presentes no trato gastrointestinal em 4 horas de incubação a 37°C. (X3- xilotriose e X2- xilobiase).

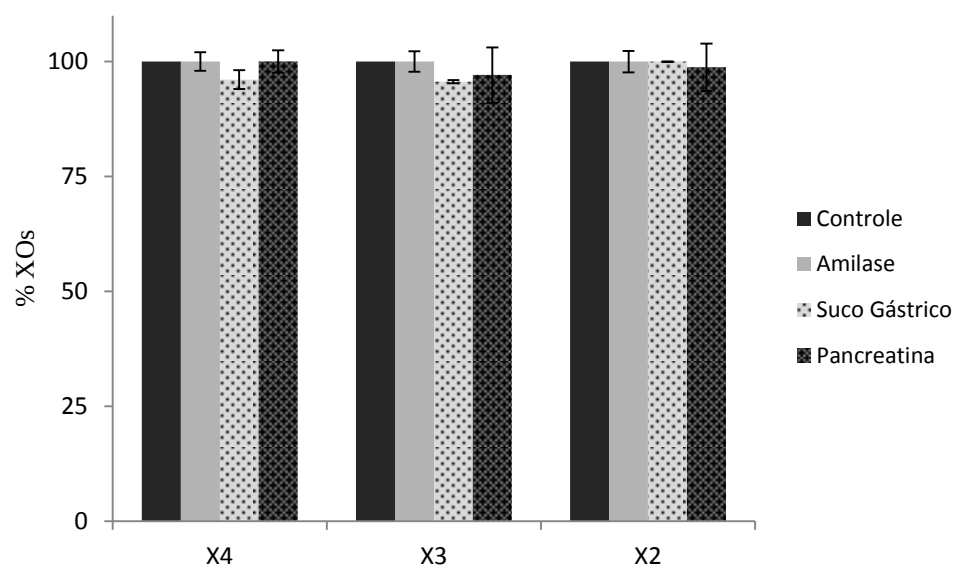


Figura 6- Perfil de digestibilidade de xilo-oligossacarídeo comercial por enzimas presentes no trato gastrointestinal em 4 horas de incubação a 37°C. (X4- xilotetraose, X3- xilotriose e X2- xilobiose).

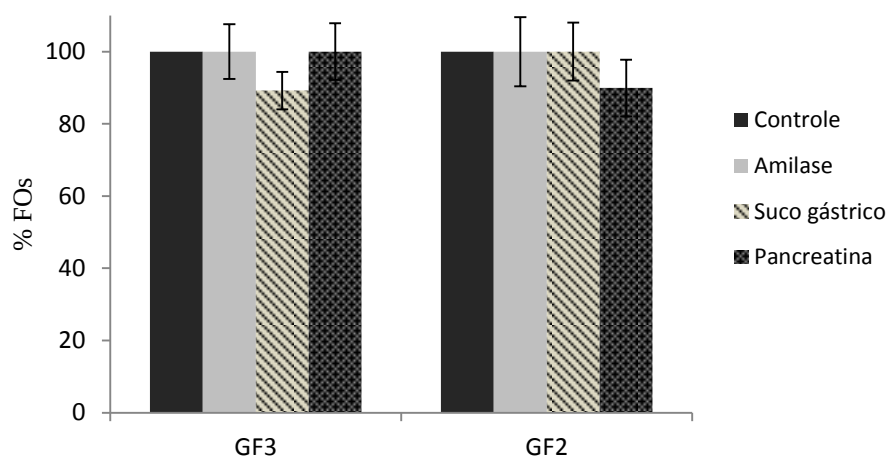


Figura 7- Perfil de digestibilidade de fruto-oligossacarídeo comercial por enzimas presentes no trato gastrointestinal em 4 horas de incubação a 37°C (GF3- nistose e GF2- kestose).

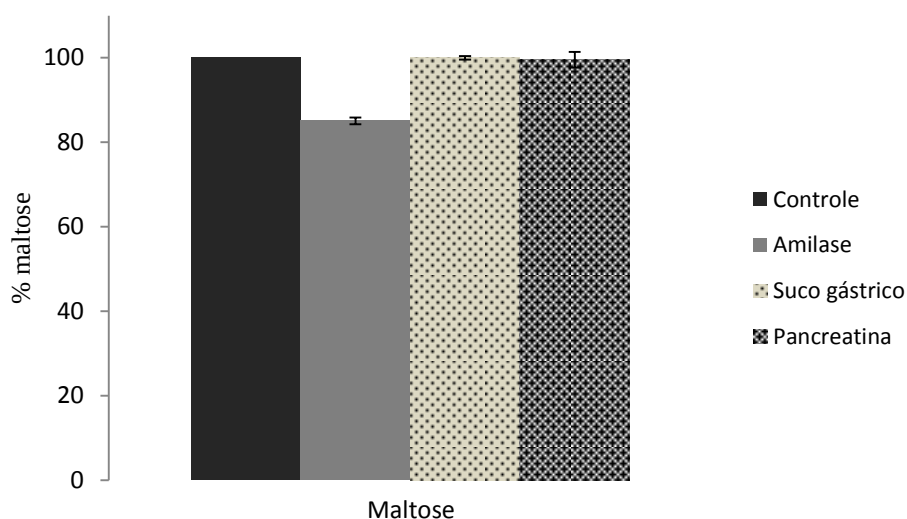


Figura 8- Perfil de digestibilidade da maltose por enzimas presentes no trato gastrointestinal em 4 horas de incubação a 37°C.

4.4 Fermentação “in vitro” de oligossacarídeos

Os testes com fermentação “in vitro” tiveram a finalidade de comprovar a capacidade de estimular o crescimento de bactérias benéficas dos XOs LABI e compará-los com XOs e FOs comerciais.

Como o esperado, todas as bactérias probióticas não cresceram em meio sem fonte de carbono, utilizado como controle negativo (Tabela 7). Os XOs LABI não foram capazes de estimular o crescimento de bactérias probióticas, embora tenha apresentado um aumento no crescimento de *L. brevis* e *B. breve* com 72h (Tabela 7), provavelmente estes XOs apresentem em sua composição algum componente que esteja inibindo o crescimento destes micro-organismos, o que demonstra a necessidade de uma purificação do produto. A purificação dos XOs é realizada em cromatografia de filtração em gel, que separa os subprodutos (geralmente de baixo peso molecular) dos oligossacarídeos (HO et al., 2014).

As linhagens de *Bifidobacterium* foram capazes de crescer em oligossacarídeos comerciais, com exceção do *B. animalis* que teve um crescimento muito baixo em meio contendo FOs e XOs comerciais e em XOs LABI (Figura 9 A). *B. animalis* foi capaz de fermentar glicose, tendo um desempenho melhor no meio contendo 2% de glicose quando comparado ao crescimento em meio contendo apenas 0,87% de glicose e xilose (Tabela 7).

B. breve demonstrou preferência por XOs comercial, sendo capaz de fermentar os xilo-oligossacarídeos e a xilose com a mesma eficiência que utilizou a glicose 2% para

seu crescimento. Apresentou crescimento em XOs LABI apenas com 72 horas (Tabela 7 e Figura 9 B). Os meios contendo FOs e glicose 0,87% não mostraram bons resultados para o crescimento desta linhagem.

B. longum teve bom crescimento nos meios contendo XOs e FOs comerciais, embora o crescimento tenha sido menor do que nos meio contendo glicose e xilose (Tabela 7 e Figura 10 A). Mäkeläinen et al. (2010) demonstrou a fermentação por *B. longum* em meios contendo XOs e FOs comercial, seus resultados apontam uma preferência desta linhagem por FOs, embora seu crescimento não tenha sido tão alto quanto em meio com glicose. Em 2002, Crittenden et al. apresentou resultados de *B. longum* apontando a capacidade desta linhagem fermentar XOs 70 (Suntory, Japão) e xilose.

O crescimento de *B. lactis* foi maior em meios contendo glicose 2%, glicose 0,87% e xilose (Figura 10 B). Esta linhagem não foi capaz de utilizar XOs comercial e XOs LABI. A bactéria cresceu em meio contendo FOs, porém foi pouco inferior ao crescimento em meio contendo glicose 2% (Tabela 7). Estudos mostram que *B. lactis* é capaz de fermentar os XOs (Longlive) e os FOs (Beneo) atingindo um crescimento relativamente alto (CRITTENDEN et al., 2002; MÄKELÄINEN et al., 2010), porém este resultado não foi observado no presente estudo.

As linhagens de *Lactobacillus* também apresentaram capacidade de fermentar oligossarídeos, entretanto, cada linhagem apresentou preferência por diferentes prebióticos (Figura 11 A e B). *L. acidophilus* teve melhor crescimento em meio contendo 2% de glicose e desempenho um pouco inferior com glicose 0,87% e xilose. Nos XO comercial e XOs LABI não houve um bom crescimento (tabela 7). *L. acidophilus* foi capaz de crescer utilizando FOs com a mesma eficiência que utilizou glicose 0,87%. Mäkeläinen et al. (2010) também descreveu a preferência de *L. acidophilus* por FOs, atingindo bons resultados em seu crescimento.

L. brevis cresceu melhor no meio com XOs comercial, obtendo um crescimento semelhante ao meio contendo glicose 2% (Tabela 7). Isto corrobora estudos anteriores que indicaram um crescimento satisfatório de *L. brevis* em meio contendo XOs comercial como única fonte de carbono (CRITTENDEN et al., 2002; MOURA et al., 2007). *L. brevis* teve um crescimento inferior em meios com XOs LABI, xilose e glicose 0,87%. O resultado não foi satisfatório no meio contendo FOs comercial.

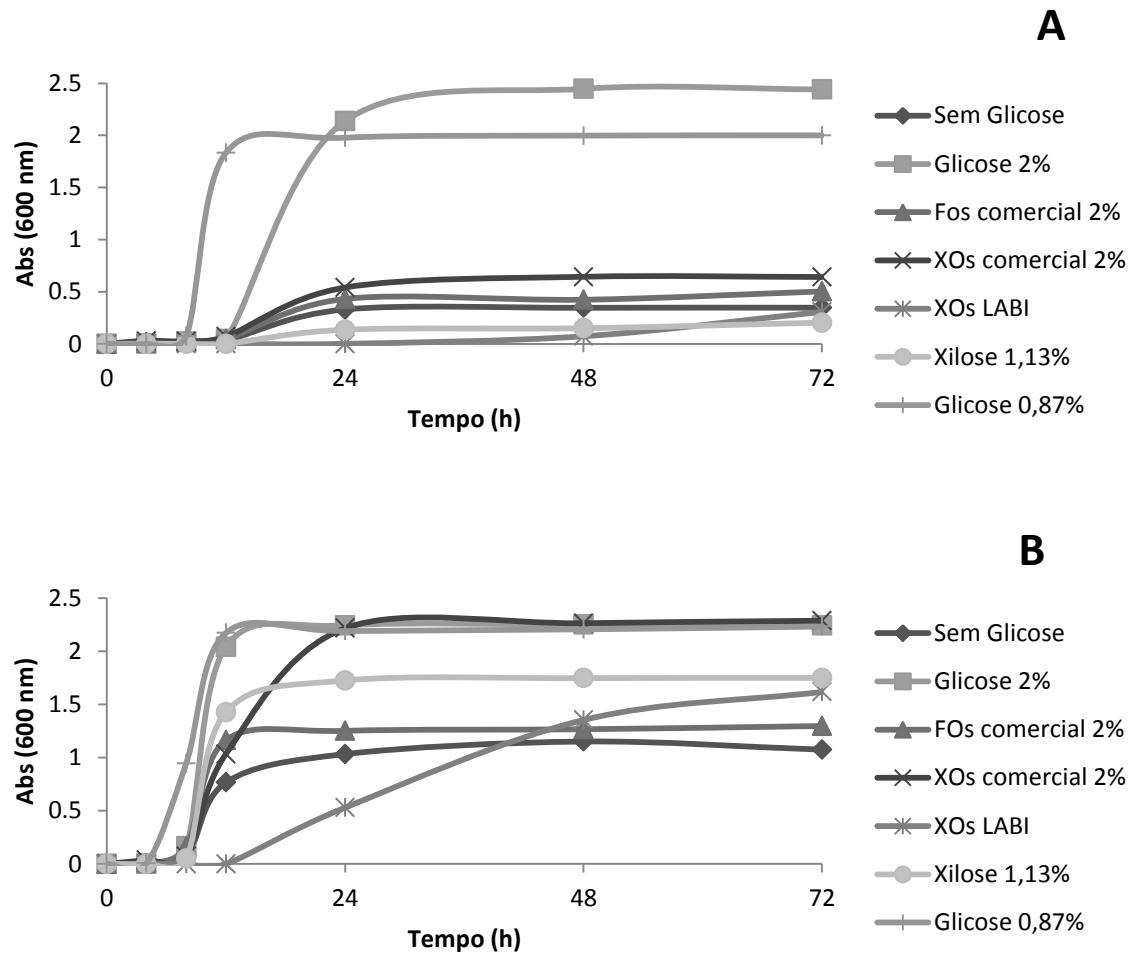


Figura 9- Perfil de crescimento de bactérias probióticas. **(A)** *Bifidobacterium animalis* e **(B)** *Bifidobacterium breve*. Os micro-organismos foram cultivados em triplicata utilizando diferentes fontes de carbono.

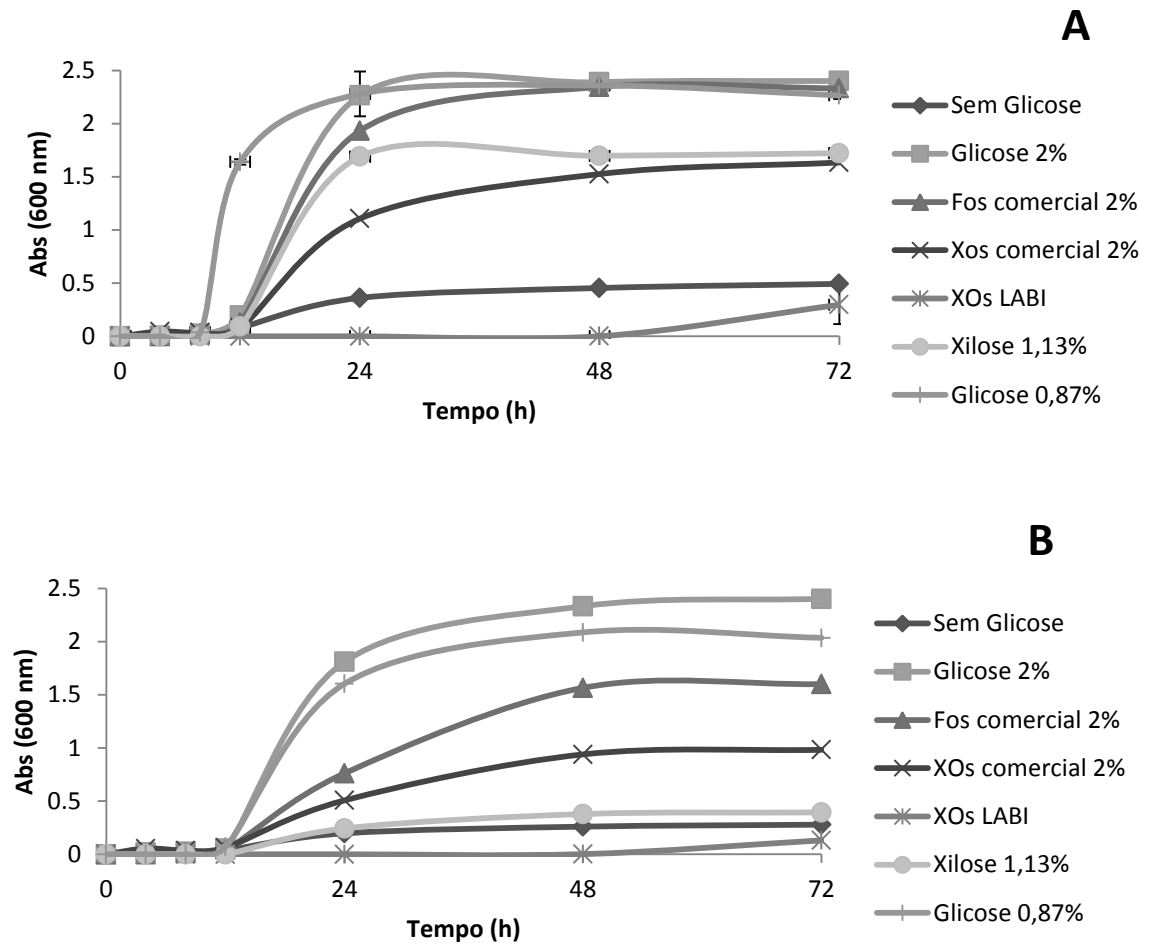


Figura 10- Perfil de crescimento de bactérias probióticas. **(A)** *Bifidobacterium longum* e **(B)** *bifidobacterium lactis*. Os micro-organismos foram cultivados em triplicata utilizando diferentes fontes de carbono.

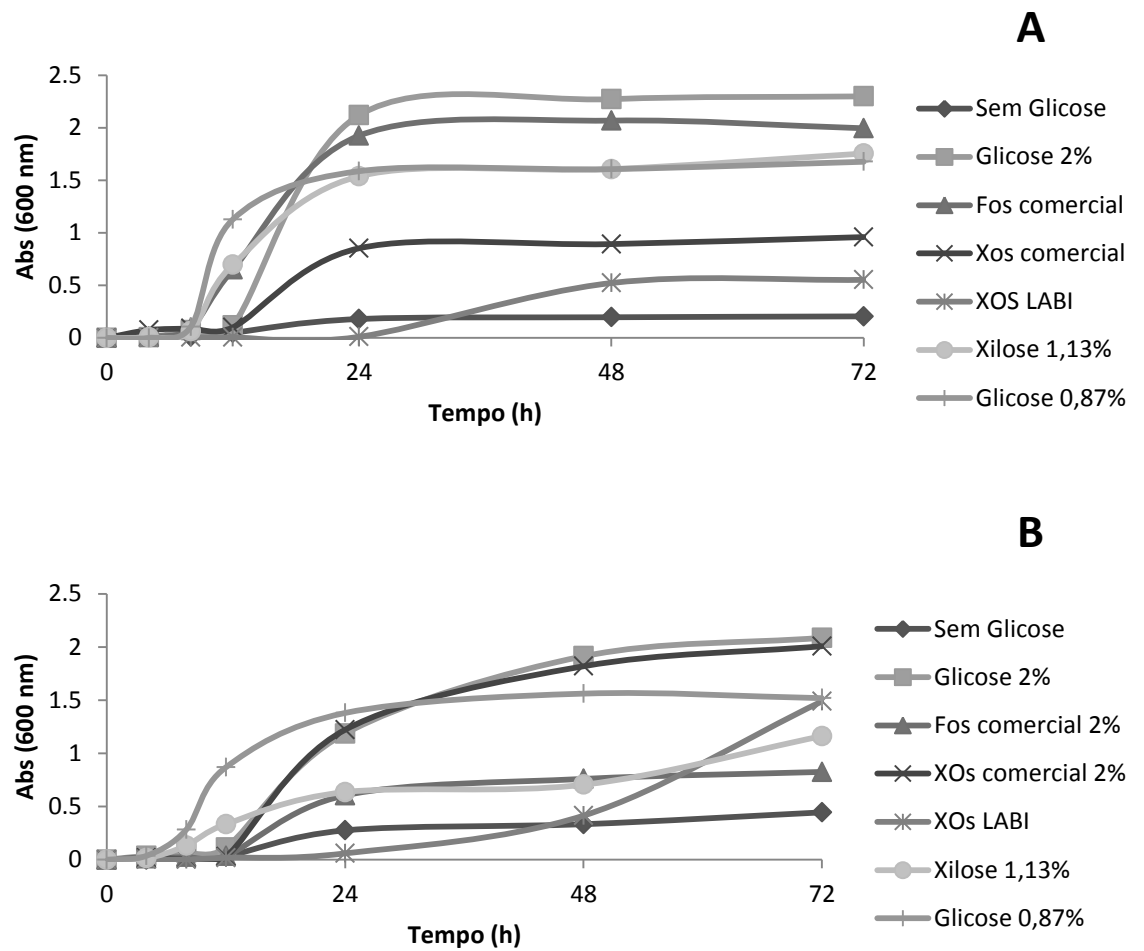


Figura 11- Perfil de crescimento de bactérias probióticas. **(A)** *Lactobacillus acidophilus* e **(B)** *Lactobacillus brevis* Os micro-organismos foram cultivados em triplicata utilizando diferentes fontes de carbono.

Tabela 7- Crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em diferentes fontes de carbono.

	Sem glicose	Glicose 2%	Glicose 0,87%	FOs comercial	XOs comercial	XOs LABI	Xilose 1,13%
<i>B. animalis</i>							
24 horas	+	+++++	++++	+	+	-	++++
48 horas	+	+++++	++++	+	++	-	++++
72 horas	+	+++++	++++	+	++	+	++++
<i>B. breve</i>							
24 horas	++	+++++	+++	+++	+++++	++	+++++
48 horas	++	+++++	+++	+++	+++++	+++	+++++
72 horas	++	+++++	+++	+++	+++++	++++	+++++
<i>B. longum</i>							
24 horas	+	+++++	+++++	+++	+++	-	+++++
48 horas	+	+++++	+++++	+++	+++	-	+++++
72 horas	+	+++++	+++++	++++	++++	+	+++++
<i>B. lactis</i>							
24 horas	+	++++	++++	++	+	-	++++
48 horas	+	+++++	++++	+++	++	-	++++
72 horas	+	+++++	++++	++++	++	+	++++
<i>L. acidophilus</i>							
24 horas	+	+++++	+++	++++	++	-	+++
48 horas	+	+++++	++++	++++	++	+	++++
72 horas	+	+++++	++++	++++	++	+	++++
<i>L. brevis</i>							
24 horas	+	+++	+++	++	+++	-	+++
48 horas	+	++++	+++	++	++++	+	+++
72 horas	+	++++	+++	++	++++	+++	+++

Crescimento “+” e “-” representa uma faixa de crescimento obtida pela absorbância medida a 600nm, onde. “-” = 0-0,1, “+” = 0,11-0,50, “++” = 0,51-1,00, “+++” = 1,10-1,50, “++++” = 1,60-2,00, “+++++” = > 2,10.

Os prebióticos podem promover o crescimento de bactérias ácido-láticas no intestino e atuar de forma antagônica na proliferação de *Salmonella* e *E. coli* (PATEL e GOYAL, 2012). Nos estudos com *E. coli* notou-se um baixo crescimento em todos os meios com as diversas fontes de carbono (Figura 12 A). Sendo assim, a *E. coli* não foi considerada parâmetro para o estudo.

Conforme a Tabela 8 houve crescimento mais acelerado da *S. enterica* nas primeiras horas de incubação em meios com e sem frutose e sacarose, já nos demais (XOs, FOs e xilose) o crescimento foi inferior. Nos tempos entre 24 e 48 horas o crescimento igualou em todos os meios e a bactéria entrou na fase estacionária. Somente no meio contendo XOs LABI a bactéria não cresceu, indicando um possível efeito bacteriostático para este micro-organismo.

O destaque foi nas primeiras 4 horas de fermentação, pois a *Salmonella enterica* apresentou um melhor crescimento em meios com xilose, sem e com frutose e sacarose (Tabela 8). Entretanto a bactéria não cresceu nos meios contendo FOs e XOS comerciais e XOs LABI, podendo ser um possível indicativo de que ao alcançar o intestino, os XOs e FOs não sejam fermentados por *Samonella*, somente por bactérias probióticas, comprovando a ação prebiótica dos oligossacarídeos comerciais e dos XOs LABI testados no presente estudo (Figura 12 B). Mäkeläinen et al. (2010) também testou o efeito dos prebióticos como fonte de carbono no crescimento de *Salmonella typhimurium* em meio TBS (tryptic soy broth) e observou um crescimento baixo em meios contendo XOs dp 2 e XOs (Longlive), além de crescimento praticamente nulo em XOs dp 2-10 e FOs (Beneo).

Muitos trabalhos destacam que o efeito inibitório na proliferação de bactérias causadoras de doenças esteja relacionado principalmente a competição entre probióticos e patogênicos por sítios de ligação que estão presentes no intestino. Além de produtos resultantes da fermentação de prebióticos por bactérias benéficas, como por exemplo, a produção de ácidos láctico e acético que fazem com que o pH diminua tornando o ambiente inóspito para bactérias patogênicas (ZIEMER e GIBSON, 1998; CRITTENDEN e PLAYNE, 1997; SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001).

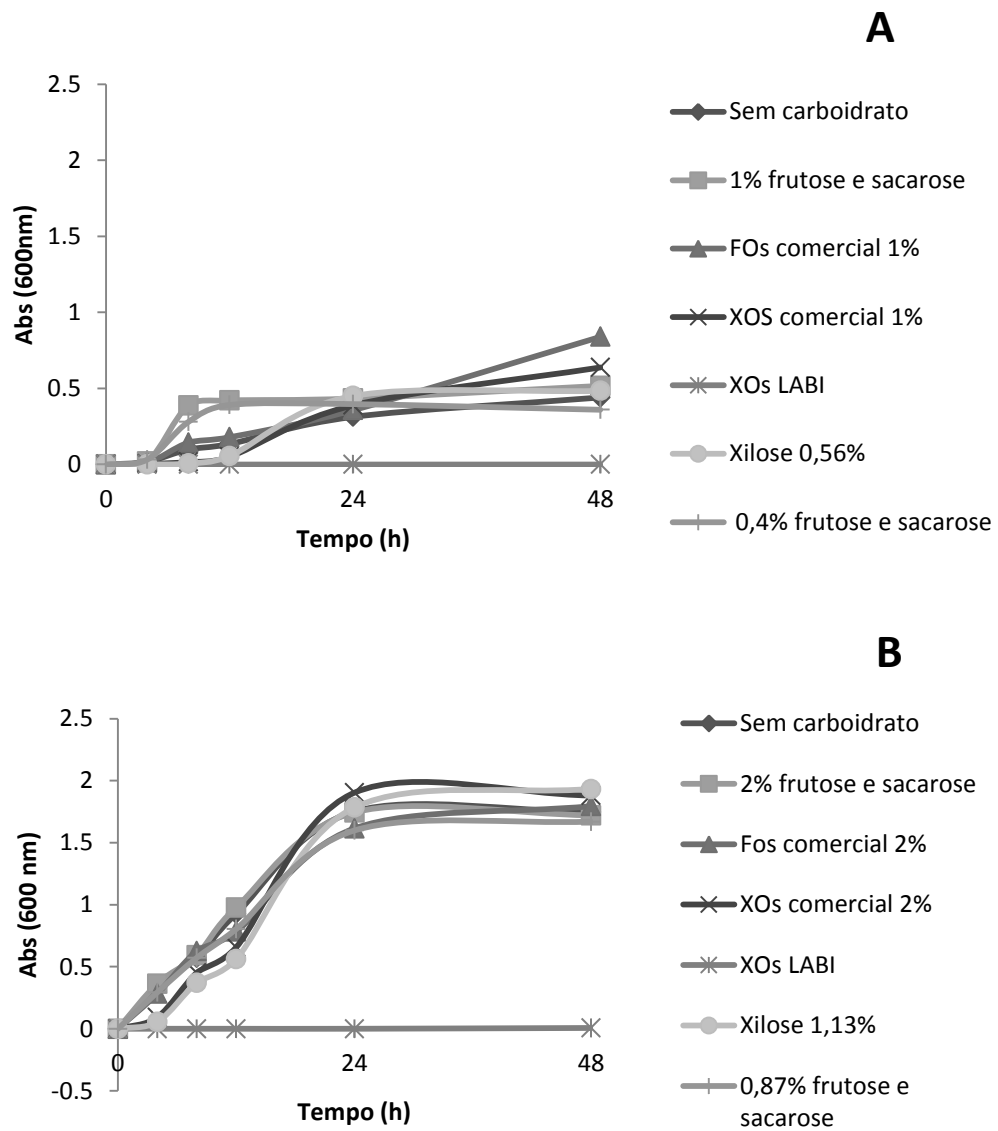


Figura 12- Perfil de crescimento de bactérias patogênicas. **(A)** *Escherichia coli* e **(B)** *Salmonella entérica*. As bactérias foram cultivadas em diferentes fontes de carbono.

Tabela 8- Crescimento de *Salmonella enterica* em diferentes fontes de carbono.

<i>Salmonella entérica</i>	Sem fonte carbono	2% frutose/ sacarose	0,87% frutose/ sacarose	FOs comercial	XOS comercial	XOS LABI	Xilose 1,13%
4 horas	++	++	+	-	-	-	+
8 horas	+++	+++	+++	++	++	-	+++
12 horas	+++++	+++++	+++++	+++	+++	-	+++++
24 horas	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	-	+++++
48 horas	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	-	+++++

Crescimento “+” e “-” representa uma faixa de crescimento obtida pela absorbância medida a 600nm, onde. “-” = 0-0,1, “+” = 0,11-0,30, “++” = 0,31-0,50, “+++” = 0,51-0,71, “++++” = 0,71-0,90, “+++++” = > 0,91.

5. CONCLUSÕES

O aumento da temperatura durante o pré-tratamento alcalino possibilitou a diminuição na quantidade de KOH sem prejudicar a eficiência na extração de hemicelulose. Os experimentos que utilizam 10% de KOH a 70°C por 3 horas (Tratamento 1) e 5% de KOH a 121°C por 30 minutos (Tratamento 3) foram similares no rendimento de hemicelulose em relação ao método ZD, porém foram bem mais econômicos. O tratamento 1 apresentou redução de 54,1% de KOH e 1,98% de etanol e o tratamento 3 reduziu em 76,2% o KOH e 40,9% o etanol. Este último tornou-se um processo menos trabalhoso pela retirada da etapa de pré-incubação e consequentemente mais rápido, resultando em uma economia de 27 vezes no tempo gasto durante a reação, quando comparado ao método ZD.

A hidrólise com enzimas do fungo *A. fumigatus* juntamente com substrato de hemicelulose obtida por hidrólise alcalina utilizando 10% de KOH a 70°C por 3 horas, apresentou melhor rendimento de XOs com 24 horas de reação. A hidrólise enzimática com enzimas do fungo *T. reesei* mostrou ser mais vantajosas para produção de xilose, principalmente com substrato de hemicelulose obtida utilizando 5% de KOH a 121°C por 30 minutos.

Testes de digestibilidade “in vitro” confirmaram a resistência dos XOs e FOs comerciais a ação de enzimas encontradas no trato gastrointestinal e resistência à acidez do suco gástrico. A fermentação “in vitro” dos FOs e XOs comerciais indicaram a capacidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizarem estes oligossacarídeos como fonte de nutrientes para o crescimento, comprovando o potencial prebiótico dos mesmos. *B. breve* e *L. brevis* demonstraram preferência por XOs comercial, enquanto *B. lactis* e *L. acidophilus* demonstraram preferência por FOs comercial. *B. longum* cresceu tanto no XO comercial como no FO comercial e *B. animalis* não foi capaz de fermentar nenhum dos oligossacarídeos estudados. Os XOs LABI não foram capazes de estimular o crescimento da maioria das bactérias probióticas, provavelmente pela sua pureza inferior ao comercial, o que reforça a necessidade de mais estudos de purificação. Entretanto os resultados indicaram um possível potencial prebiótico dos XOs LABI, visto que, apresentaram resistência à ação de enzimas presentes no trato gastrointestinal de animais e inibiram o crescimento de *Salmonella enterica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylo-oligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 991-995, 2009.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylo-oligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**. v. 87, p. 145-151, 2009 (a).
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylo-oligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**. v. 344, p. 660-666, 2009 (b).
- AL-SHERAJI, S. H., et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1542-1553, 2013.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 719-739, 2005.
- ASANO, I., et al. In vitro digestibility and fermentation of manno-oligosaccharides from coffee mannan. **Food Science and Technology Research**. v. 9, p. 62-66, 2003.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Process in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34, p. 551-573, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. v. 52 p. 858-875, 2011.
- BALI, V., et al. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 55, p. 1475-1490, 2015.
- BEG, Q. K., et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied of Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 326-338, 2001.
- BIELECKA, M., et al. M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. **Food Research International**. v. 35, p. 139-144, 2002.
- BOUHNİK, Y., et al. Short chain fructo-oligosaccharide administration dose dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**. v. 129, p. 113-116, 1999.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**. v. 46, p. 199-204, 2009.
- BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligosacarídeo**. 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo- SP.

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

CARVALHO, A. F. A., et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**. v. 51, p. 75-85, 2013.

CARVALHO, A. F. A., et al. Screening of xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for prebiotic xylo-oligosaccharide production using bagasse. 2015. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 1, 2015.

CHEN, M. H., et al. Autohydrolysis of *Miscanthus × giganteus* for the production of xylo-oligosaccharides (XOS): kinetics, characterization and recovery. **Bioresource Technology**. v. 65, p. 155-359, 2014.

CHEN, M. H., et al. *Miscanthus × giganteus* xylo-oligosaccharides: purification and fermentation. **Carbohydrate Polymers**. v. 140, p. 96-103, 2016.

CHIANG, V.L., FUNAOKA, M. The difference between guayacyl and guaiacyl-syringyl lignins in their response to kraft delignification. **Holzforschung**. v. 44, p. 309-313, 1990.

CHILDS, C. E., et al. Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial cross-over study. **British Journal of Nutrition**. v. 111, p. 1945-1956, 2014.

CHUNG, Y. C., et al. Dietary intake of xylo-oligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. **Nutrition Research**. v. 27, p. 756-761, 2007.

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

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Primeiro levantamento de cana-de-açúcar Abri/2015**. Disponível na internet: <
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_p](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf)
[ortugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf)> Acesso em 04/2015.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 71, p. 353-361, 1996.

CRITTENDEN, R. G., et al. In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. **Journal of the Science of food and Agriculture**. v. 82, p. 781-789, 2002.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 415-420, 2001.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**. v. 23, p. 130-135, 1960.

DE SOUSA, V. M. C.; DOS SANTOS, E. F.; SGARBIERI, V. C. The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. **Food and Nutrition Sciences**. v. 2, p. 133-144, 2011.

DUARTE, M. C. T., et al. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 90-94, 2000.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter. 613, 1984.

FINEGOLD, S. M., et al. Xylo-oligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food & Function**, v. 5, p.436-445, 2014.

GARCIA, J. R.; LIMA, D. A. L. L.; VIEIRA, A. C. P. A nova configuração da estrutura produtiva do setor sucroenergético brasileiro: panorama e perspectivas. **Revista de Economia Contemporânea**. v. 19, p. 162-184, 2015.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylo-oligosaccharide production from wood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 74, p. 1101-1109, 1999.

GIBSON, G. R., et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and Inulin. **Gastroenterology**. v. 108, p. 975-982, 1995.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**. v. 1, p. 25-31, 2004.

GIBSON, G. R., et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**. v. 17, p. 259-275, 2004.

GÓMEZ, R. J. H. **Sacarificação da hemicelulose do bagaco de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985, Tese (Doutorado em ciências), Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

GÓMEZ, M., et al. Chemical mechanism of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414: pH-dependence of kinetic parameters. **Biochimie**. v. 83, p. 961-967, 2001.

GOUVEIA, E. R.; DO NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**. v. 32, p.1500-1503, 2009.

GROOTAERT, C., et al. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. **Trends in Food Science & Technology**. v. 18, p. 64-71, 2007.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**. v. 361, p. 512-19, 2003.

GULLÓN, P., et al. Assessment on the fermentability of xylo-oligosaccharides from *Rice husks* by probiotic bacteria. **Journal of Agricultural Food Chemicals**. v. 56, p. 7482-7487, 2008.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 10-18, 2009.

HIDAKA, H., et al. Effects of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**. v. 5, p. 37-50, 1986.

HO, A. L., et al. Production and purification of xylo-oligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. **Bioresource Technology**. v. 152, p. 526-529, 2014.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**. v. 46, p. 564-573, 2012.

HOLT-HARRIS, J. E.; TEAGUE, O. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 18, p. 596-600, 1916.

HOLZAPFEL, W. H., et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. v. 41, p. 85-101, 1998.

JAYAPAL, N., et al. Value addition to sugarcane bagasse: xylan extraction and its process optimization for xylo-oligosaccharides production. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 14-24, 2013.

KABEL, M. A., et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 50, p. 47-56, 2002.

KAUFFMANN, F. Weitere erfahrungen mit den kombinierten anreicherungsverfahren für *Salmonellabacillen*. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v. 117, p 26-32, 1935.

LEAHY, S. C., et al. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 1303-1315, 2005.

MÄKELÄINEN, H., et al. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. **Beneficial Microbes**. v. 1, p. 81-91, 2010.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 18, p. 287-298, 2004.

MARTINS, F. S., et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, p. 1-13, 2005.

- MASLEN, S. L., et al. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC–MALDI-TOF/TOF-MS/MS. **Carbohydrate Research**. v. 342, p. 724-735, 2007.
- MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilo-oligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 38, p. 587-592, 2008.
- MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOLIS, C., et al. Digestion, excretion, and energy value of fructo-oligosaccharides in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 64, p. 324-328, 1996.
- MOSIER, N., et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 673–686, 2005.
- MOURA, P., et al. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **LWT- Food Science and Technology**. v. 40, p. 963-972, 2007.
- MOURE A., et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1913-1923, 2006.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 68, p. 587-597, 2007.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. v. 93, p. 1-10, 2004.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 20–28, 2007.
- NABARLATZ, D.; FARRIOL, X.; MONTANÉ, D. Kinetic modeling of the autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicellulose-derived oligosaccharides. **Industrial Engineering Chemistry Research**. v. 43, p. 4124-4131, 2004.
- NILSSON, U.; BJORCK, I. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract. **Journal of Nutrition**. v. 118, p. 1482-1486, 1988.
- OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effects of xylo-oligosaccharides on growth of bifidobacteria. **Bifidobacteria and Microflora**. v. 9, p. 77-86, 1990.
- OKAZAKI, M., et al. In vitro digestibility and in vivo utilization of xylobiose. **Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science**. v. 44, p. 41-44, 1991.
- OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a new sweetener, "neosugar," in the rat. **Journal of Nutrition**. v. 114, p. 1574-1581, 1984.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. A thermochemical pretreatment process to produce xylo-oligosaccharides (XOS), arabino-oligosaccharides (AOS) and manno-oligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. **Bioresource Technology**. v. 112, p. 285-292, 2012.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Steam and aqueous pretreatments: are they prehydrolyses? In: **Wood Processing and Utilisation**. Chichester: Ellis Horwood, p. 395-400, 1989.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**. v. 66, p. 25-40, 1998.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review, **3 Biotech**. v. 2, p. 115-125, 2012.

POUTANEN, K.; PUIS, J. Characteristics of *Trichoderma reesei* p-xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. **Applied Microbiology Biotechnol.** v. 28, p. 425-432, 1988.

RIVAS, B., et al. Bioconversion of posthydrolysed autohydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 431-438, 2002.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **Journal of Nutrition**. v. 137, p. 830-837, 2007.

RODRIGUES, R. C. L. B., et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1247-1253, 2010.

RUIZ-ARRIBAS, A., et al. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 2414-2419, 1995.

RYCROFT, C. E., et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 878-887, 2001.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 361-400, 2001.

SEARLE, L. E. J., et al. A mixture containing galacto-oligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in mice. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 37-48, 2009.

SILVA, D.F., et al. Cellulolytic enzyme production by the fungi *Trichoderma reesei* CCT 2769 using citrus pulp. **Anais do 6o. Simpósio de Microbiologia Aplicada**. Rio Claro-SP, Brazil, 2013.

SLUITER, A., et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical Report**. p. 1-14, 2010.

- SYKES, G.; SKINNER, F.A. Techniques for the isolation and characterization of *Actinomyces* and *Bifidobacterium* species report of a panel discussion. **Applied Bacteriology Symposium**. v. 2, p. 327-333, 1973.
- SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**. v. 10, p. 367-375, 1996.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TORRES, D. P. M., et al. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 9, p. 438-454, 2010.
- TUOHY, K. M. et al., Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. **Current Pharmaceutical Design**. v. 11, p. 75-90, 2005.
- VÁZQUEZ, M. J., et al. Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11, p. 387–393, 2000.
- VÁZQUEZ, M. J., et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylo-oligosaccharides: Evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 889-896, 2005.
- WEIL, J., et al. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 1002-1004, 1994.
- XIAO, L.; NING, J.; XU, G. Application of xylo-oligosaccharide in modifying human intestinal function. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, p. 2116-2119, 2012.
- ZHU, S., et al. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 1964-1968, 2006.
- ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An Overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 473-479, 1998.
- ZIESENITZ, S. C.; SIEBERT, G. In vitro assessment of nystose as a sugar substitute. **Journal of Nutrition**. v. 5, p. 846-851, 1987.
- ZILLIOX, C.; DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: adsorption and kinetic studies. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 58-63, 1998.