



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102023026904-4 A2

(22) Data do Depósito: 19/12/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
01/07/2025

(54) Título: PROCESSO FÍSICOQUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

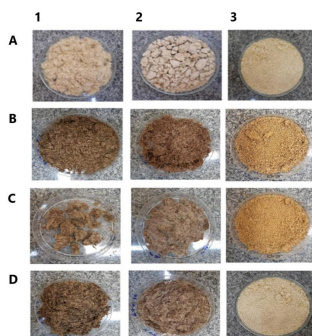
(51) Int. Cl.: C12P 19/04; C12P 19/14; C12P 19/02; C07H 1/08; C07C 227/28; (...).

(52) CPC: C12P 19/04; C12P 19/14; C12P 19/02; C07H 1/08; C07C 227/28; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): CAROLINA FROES FORSAN; MICHEL BRIENZO.

(57) Resumo: PROCESSO FÍSICOQUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE CELOOLIGOSSACARÍDEOS. O presente pedido de patente compreende a utilização de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba, resíduos gerados em excesso na fruticultura, para a produção de celo-oligossacarídeos (COS), compostos de interesse industrial com potenciais benefícios à saúde. Pertencendo ao campo da agricultura, mais especificamente a saúde animal e saúde humana, o processo promove a combinação de quatro pré-tratamentos químicos (ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio alcalino) aliados ao uso de moinho de bolas e hidrólise enzimática usando xilanase e endoglucanase, de modo a aumentar o rendimento da produção de COS a partir de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba.



PROCESSO FÍSICOQUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente compreende a utilização de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba, resíduos gerados em excesso na fruticultura, para a produção de celo-oligossacarídeos (COS), compostos de interesse industrial com potenciais benefícios à saúde.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O campo de aplicação está relacionado com a agricultura, mais especificamente a saúde animal, com a aplicação em alimentos, em medicamentos e suplementos alimentícios.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] Celo-oligossacarídeos (COS) e xilooligossacarídeos (XOS) são carboidratos não digeríveis, compostos por unidades de glicose e xilose, respectivamente, ligadas por ligações glicosídicas β -1,4, com grau de polimerização entre 2 e 6 unidades, que podem ser obtidas a partir de materiais lignocelulósicos. XOS podem apresentar grupos laterais, como grupos acetil, ácido urônico e resíduos de arabinofuranosil. COS e XOS são substâncias promissoras na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer colorretal, diabetes e obesidade, aumentam a absorção de cálcio, atuam como anti-inflamatório, antioxidante e são considerados prebióticos. Eles atuam como substrato seletivo para microrganismos desejáveis, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, presentes na microbiota intestinal, aumentando sua população e controlando o crescimento de patógenos. COS demonstrou um efeito prebiótico, estimulando o crescimento de cepas de *Clostridium butyricum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus gasseri*. COS tem potencial para ser aplicado nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de bebidas, cosmética e ração animal. Além disso, pode ser aplicado na produção de biocombustíveis, como substratos de fermentação, e no desenvolvimento de materiais biodegradáveis

devido às suas propriedades funcionais, reológicas e físico-químicas. São resistentes à compressão e capazes de reter óleos e formar pó com alta fluidez, características que podem melhorar as formulações. Assim como os XOS, são resistentes ao calor e ao pH ácido, resistindo ao ácido clorídrico no estômago e chegando intactos ao intestino, onde servirão como substrato para bactérias. Os XOS possuem sabor adocicado e baixa viscosidade, podendo ser facilmente incorporados em alimentos.

[004] COS e XOS podem ser produzidos a partir de subprodutos agroindustriais, como resíduos de banana (*Musa spp*) e goiaba (*Psidium guajava L.*), abundantes na colheita e processamento industrial dessas frutas. O Brasil é o quarto maior produtor de banana do mundo, uma das frutas mais consumidas no mundo. Os subprodutos gerados no cultivo e colheita da banana são pseudocaules, folhas, cascas e bananas descartadas. A goiaba também é uma fruta amplamente consumida no mundo e os principais resíduos gerados durante seu processamento são sementes, cascas e folhas. Resíduos descartados em locais inadequados podem causar contaminação do solo e dos corpos hídricos, além de disseminar doenças. A biomassa pode ser reutilizada para fabricar produtos de valor agregado, como biocombustíveis, fibras de nanocelulose, bioplásticos, enzimas, aditivos alimentares e oligossacarídeos.

[005] COS e XOS podem ser produzidos a partir de resíduos usando ácido orgânico ou mineral, tratamento hidrotérmico, explosão à vapor ou tratamentos que removem a hemicelulose e a lignina e diminuem a estrutura cristalina da celulose, expondo-a à ação enzimática.

[006] Uma estratégia para reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose é submetê-la à moagem em moinho de bolas, um processo barato e facilmente reproduzível, que pode aumentar significativamente o rendimento da hidrólise enzimática, ao reduzir o tamanho das partículas e aumentar a área de superfície para contato com a enzima, mostrando seu potencial para o avanço da produção de biocombustíveis e bioprodutos.

[007] A celulose é o polissacarídeo mais abundante na Terra, mas a sua recalcitrância natural representa desafios para aplicações industriais. A diminuição da recalcitrância da celulose, seja por meio de métodos físicos, químicos ou enzimáticos, auxilia as biorrefinarias na extração do potencial máximo da biomassa. Isso auxilia na produção de prebióticos, biocombustíveis, papel, têxteis, cosméticos, produtos farmacêuticos e muito mais. Os prebióticos têm inúmeros benefícios à saúde e possibilidades de uso industrial. O mercado global de prebióticos foi estimado em 4,07 bilhões de dólares em 2017 e atingiu 7,37 bilhões de dólares em 2023. Partindo dessa premissa, o objetivo de utilizar a celulose do pseudocaule e das folhas da bananeira e do bagaço de goiaba, subprodutos abundantes no Brasil, por meio de tratamentos químicos e modificação da recalcitrância por moagem de bolas combinado com hidrólise enzimática parece uma estratégia promissora. Adicionalmente, o presente estudo avaliou o impacto da moagem de bolas e da endoxilanase de *Aspergillus versicolor* na redução da recalcitrância da celulose para a produção de COS durante a hidrólise enzimática usando Celluclast da Novozymes, um coquetel comercial rico em endoglucanase. A endoxilanase hidrolisou a xilana ainda ligada à celulose após tratamento químico, produzindo xilooligossacarídeos (XOS), outro composto de significativo interesse industrial.

[008] O documento AU2006233185 refere-se a uma fibra alimentar proveniente de material vegetal, mais especificamente a uma fibra alimentar produzida a partir de frutas e vegetais. A invenção inclui um método de processamento do material vegetal para fornecer a fibra dietética, bem como a fibra produzida pelo método de processamento. O método compreende: a) cortar a planta em cubos material; b) submeter o material cortado em cubos a tratamento ácido ou alcalino a temperatura elevada; c) adição de xilanase e pelo menos uma outra enzima ao material tratado para dar uma composição bruta; d) secar e moer a composição bruta para dar a fibra dietética composição.

[009] O documento BR102019025014 refere-se ao processo de obtenção de xilooligossacarídeos (XOS), celo-oligossacarídeos (COS) e lignina a partir do

subproduto de Eucalyptus gerado no processamento de cavacos de madeira do setor celulósico. O pré-tratamento hidrotérmico do subproduto de Eucalyptus promoveu a formação de um hidrolisado hemicelulósico rico em XOS (fração solúvel), gerando uma fração sólida rica em lignina e celulose (fração insolúvel). Assim, a fração rica em lignina e celulose (fração insolúvel) pós-tratamento hidrotérmico foi submetida à uma etapa de extração alcalina removendo-se parcialmente as frações de hemicelulose e lignina, no entanto, a celulose não foi removida, porém a mesma tornou-se mais acessível em resposta à hidrólise enzimática. O subproduto pós-tratamento hidrotérmico seguido de extração alcalina foi hidrolisado enzimaticamente com endoglucanases promovendo a formação de um hidrolisado celulósico rico em COS (fração solúvel), gerando um “resíduo final do bioprocessamento” rico em lignina (fração insolúvel). Os XOS e COS produzidos podem ser utilizados para a formulação de diversos bioprodutos de interesse comercial. O “resíduo final do bioprocessamento” rico em lignina pode ser aplicado para cogeração de energia.

[010] O documento Ávila et al. (2021) - <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03041-2>
Título: CELLO-OLIGOSACCHARIDES PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS AND THEIR EMERGING PREBIOTIC APPLICATIONS referem-se aos celo-oligossacarídeos (COS) que são oligossacarídeos lineares compostos por unidades de glucopiranosose ligadas a β -1,4. Eles compreendem um grupo de novos oligossacarídeos importantes de interesse significativo e aplicações potenciais nas indústrias farmacêutica, alimentícia, química e de rações, emergindo atualmente como potenciais compostos prebióticos. COS de biomassa lignocelulósica, especificamente os resíduos agroindustriais e subprodutos da indústria florestal, constituem um novo processo atrativo que impõe o uso sustentável dos recursos de biomassa. Duas estratégias principais têm sido utilizadas para a produção de COS: hidrólise de celulose à base de ácido e enzima. Este último tem sido considerado mais atrativo devido à utilização de condições reacionais mais suaves e menor produção de monômeros. Esta revisão resume que embora o COS esteja

emergindo como um potencial prebiótico com também outras aplicações potenciais, faltam informações quanto à produção em larga escala, o que pode estar associado à natureza recalcitrante da celulose em comparação com outros polissacarídeos, o que dificulta a hidrólise de sua densa rede.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[011] O principal objetivo da presente invenção é produzir celo-oligossacarídeos (COS) através de hidrólise enzimática utilizando endoglucanase.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção traz como vantagem a combinação de tratamento químico, físico e enzimático para produção de celo-oligossacarídeos (COS), melhorando o rendimento. Além de obter COS, xilo-oligossacarídeos (XOS) também podem ser produzidos, ambos com potencial para aplicações industriais, principalmente devido à sua ação prebiótica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[013] A Figura 1 apresenta a fotografia dos materiais pré-tratados. Colunas 1, 2 e 3: folhas de bananeira, pseudocaule de bananeira e bagaço de goiaba, respectivamente. Linhas A, B, C e D: Peróxido de hidrogênio, Ácido sulfúrico, Hidróxido de sódio e Hidróxido de potássio, respectivamente.

[014] A Figura 2 mostra o rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e da folha da bananeira e do bagaço de goiaba não tratado e moído em moinho de bolas, a Figura 2A mostra o material hidrolisado com endoglucanase, carga enzimática de 20, 50 e 100 UI/g por 24 h e a Figura 2B mostra o material hidrolisado com xilanase, carga enzimática 30 UI/g por 24 h, seguida de endoglucanase, 20 UI/g por 6 h.

[015] A Figura 3 mostra o rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e da folha da bananeira e do bagaço de goiaba pré-tratados com hidróxido de sódio e moídos em moinho de bolas, a Figura 3A ilustra o material hidrolisado com endoglucanase, carga enzimática de 20, 50 e 100 UI/g por 24, e a

Figura 3B ilustra o material hidrolisado com xilanase, carga enzimática 30 UI/g por 24 h, seguida de endoglucanase, 20 UI/g por 6 h.

[016] A Figura 4 mostra rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e da folha da bananeira e do bagaço de goiaba pré-tratados com hidróxido de potássio e moídos em moinho de bolas, a Figura 4A mostra o material hidrolisado com endoglucanase, carga enzimática de 20, 50 e 100 UI/g por 24 h, e a Figura 4B mostra o material hidrolisado com xilanase, carga enzimática 30 UI/g por 24 h, seguida de endoglucanase, 20 UI/g por 6 h.

[017] A Figura 5 mostra o rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e da folha da bananeira e do bagaço de goiaba pré-tratados com ácido sulfúrico e moídos em moinho de bolas, a Figura 5A ilustra o material hidrolisado com endoglucanase, carga enzimática de 20, 50 e 100 UI/g por 24 h e a Figura 5B ilustra o material hidrolisado com xilanase, carga enzimática 30 UI/g por 24 h, seguida de endoglucanase, 20 UI/g por 6 h.

[018] A Figura 6 mostra o rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e da folha da bananeira e do bagaço de goiaba pré-tratados com peróxido de hidrogênio e moídos em moinho de bolas, a Figura 6A mostra material hidrolisado com endoglucanase, carga enzimática de 20, 50 e 100 UI/g por 24 h e a Figura 6B mostra o material hidrolisado com xilanase, carga enzimática 30 UI/g por 24 h, seguida de endoglucanase, 20 UI/g por 6 h.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] O presente pedido de patente de invenção visa a utilização de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba, resíduos gerados em excesso na fruticultura, para a produção de celo-oligossacarídeos (COS), compostos de interesse industrial com potenciais benefícios à saúde. A biomassa (pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba), preparada da seguinte maneira: o bagaço de goiaba foi moído em moinho de facas com peneira de malha 20 (0,8 mm) e a folha e o pseudocaule da bananeira foram expostos ao sol até a perda do excesso de umidade, cortados em pequenos pedaços, secos em estufa a 60 °C, até

aproximadamente 10% de umidade, e moídos em moinho de facas com peneira de malha 20 (0,8 mm).

[020] O processo geral da invenção consiste nas informações abaixo:

Pré-tratamento alcalino

[021] Cerca de 5 g da biomassa (pseudocaule e folha de bananeira e bagaço de goiaba) moída em moinho de facas com peneira de malha 20 mesh (0,8mm) foi colocada em frasco Schott contendo 100 mL de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio 20% (m/m), (massa de álcali por massa de material) (proporção sólido-líquido de 1:20). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 30 min (Autoclave Stermax). A mistura foi filtrada a vácuo, a fração líquida foi descartada e a fração sólida foi lavada com água até pH neutro, seca em estufa a 45 °C e utilizada para hidrólise enzimática e caracterização química. Os pré-tratamentos foram realizados em triplicata.

Pré-tratamento ácido

[022] Cerca de 5 g da biomassa (pseudocaule e folha de bananeira e bagaço de goiaba) moída em moinho de facas com malha 20 (0,8 mm) foi colocada em um frasco Schott contendo 100 mL de ácido sulfúrico 20% (m/m), (massa de álcali por massa de material) (proporção sólido-líquido de 1:20). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 30 min (autoclave Stermax). A mistura foi filtrada a vácuo, a fração líquida foi descartada e a fração sólida foi lavada com água até pH neutro, seca em estufa a 45 °C e utilizada para hidrólise enzimática e caracterização química. Além disso, os pré-tratamentos foram realizados em triplicata.

Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

[023] As biomassas de banana e goiaba foram lavadas com 0,2% (m/v, massa/volume) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por 1 h a 90 °C para remoção de cátions metálicos. O material foi seco a 45°C por 48 h. Cerca de 5 g de material foram tratados com 100 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 6% com pH ajustado para 11,6 com hidróxido de sódio 5 mol/L. A suspensão foi agitada

por 4 h a 120 rpm a 25 °C em shaker (Marconi ma 830/a) e filtrado a vácuo. A fração líquida foi descartada. A fração sólida foi lavada até pH neutro na água de lavagem e seca em estufa a 45 °C.

Atividade endo- β -1,4-glucanase

[024] Uma solução de carboximetilcelulose (CMC) a 0,44% foi preparada em tampão acetato de sódio (pH 5,2). A solução foi aquecida a 50 °C e agitada em agitador magnético até dissolução (2 a 3 h). Para determinar a atividade enzimática foram preparados 3 tubos de ensaio contendo: Branco: foram adicionados ao tubo de ensaio 1 mL de água destilada e 1,5 mL de DNS. A solução foi fervida por 5 min. Controle: foram adicionados 0,9 mL de substrato (CMC) ao tubo de ensaio. O tubo foi aquecido a 50 °C por 5 min e em seguida foram adicionados 1,5 mL de DNS e 0,1 mL da enzima (Celluclast – Novozymes). A solução foi fervida por 5 min. O frasco controle foi confeccionado em duplicata. Frasco de reagente: 0,9 mL de substrato (CMC) e 0,1 mL de enzima foram adicionados ao terceiro tubo e aquecidos a 50 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de DNS para interromper a reação e o tubo foi fervido por 5 min. O frasco de reagente foi preparado em duplicata. Os tubos foram lidos em espectrofotômetro a 540 nm (Bel UV-M51) utilizando o branco para zerar o equipamento. A enzima foi diluída em tampão acetato de sódio pH 5,2 até que fosse possível lê-la em espectrofotômetro. Para determinar a concentração de açúcares redutores, foi construída uma curva padrão com soluções de glicose 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 e 2 mg/mL. A atividade da endoglucanase foi de 2.910 UI/mL. Uma solução de xilana a 1% (Sigma Aldrich) foi preparada com tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L, pH 6. Cerca de 750 μ L desta solução foram adicionados a um tubo de ensaio com volume de enzima entre 10 e 250 μ L (a absorvância não deve ser superior a 1,0) e uma alíquota de 250 μ L foi retirada e imediatamente adicionada a um tubo com 250 μ L de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), sem tempo suficiente para gerar monômeros e oligômeros. Esta solução foi fervida e foram adicionados 2,5 mL de água destilada. A solução foi utilizada como branco no espectrofotômetro (BEL UV-M51). Além disso, alíquotas

de 250 µL da mistura (xilana + enzima) foram retiradas após 5 min e 10 min em banho-maria a 55 °C e adicionadas a tubos contendo 250 µL de DNS que foram fervidos para interromper a reação. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de água destilada e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm.

[025] Para determinar a concentração de açúcares redutores foi construída uma curva padrão com soluções de xilose (Merck) 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/mL. A atividade inicial da endoxilanase foi de 414,4 UI/mL.

Hidrólise enzimática para produção de celo-oligossacarídeos (e xilo-oligossacarídeos como subproduto)

[026] Biomassas não tratadas e pré-tratadas com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio foram divididas em dois grupos: não moídas e moídas em moinho de bolas por 30 min. A hidrólise enzimática foi realizada de duas maneiras.

[027] Primeiramente, 0,1 g de cada material foi hidrolisado com uma carga de endoglucanase (coquetel comercial *Celluclast* - *Novozymes*) de 20, 50 ou 100 UI/g em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mol/L, pH 5,2. A mistura foi agitada a 170 rpm (Marconi ma 830/A) a 50 °C por 24 horas e, em seguida, os tubos foram fervidos por 5 minutos para interromper a ação enzimática.

[028] Segundo, cerca de 0,1 g de cada material foi hidrolisado com 30 UI/g de endo-β-1,4-xilanase purificada de *Aspergillus versicolor* em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mol/L, pH 6,0, com agitação de 170 rpm em um agitador (Marconi ma 830/A), a 55 °C por 24 horas e os tubos foram fervidos por 5 minutos para interromper a ação enzimática. O hidrolisado foi centrifugado por 15 min a 5.000 rpm (Novatecnica, NT815) e a fração líquida foi removida. Em seguida, foram adicionados à fração sólida 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mol/L pH 5,2, 20 UI/g de endoglucanase e a reação foi realizada sob agitação de 170 rpm a 50 °C por 6 h. Após a reação, o frasco foi fervido em água por 5 min para interromper a ação da enzima.

[029] As frações líquidas foram filtradas através de um filtro de seringa de 0,22 µm e as amostras que apresentaram cor (amarelada) foram filtradas com um filtro SAP-PAK (Waters) para remover a cor. As amostras filtradas foram caracterizadas quanto às concentrações de glicose, COS, xilose e XOS por HPLC.

[030] A conversão em celo-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos foi calculada em relação ao teor de celulose e xilana nos materiais.

Determinação de monossacarídeos, COS e XOS

[031] Os teores de glicose, xilose, arabinose e ácido acético provenientes da caracterização da composição química foram determinados por HPLC utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX87H (300 × 7,8 mm) mantida a 50 °C, detector de índice de refração Waters 2414 a 40 °C, detector de índice de refração Waters 2414 a 40 °C, fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, vazão de 0,6 mL/min e volumes de injeção de amostra de 20 µL. As amostras foram filtradas usando um filtro de seringa com tamanho de poro de 0,22 µm.

[032] Os conteúdos dos grupos laterais glucano, xilano, arabinosil e acetil foram calculados multiplicando a porcentagem de glicose, xilose, arabinose e ácido acético por seus fatores de hidrólise (0,9, 0,88, 0,88 e 0,72, respectivamente).

[033] As concentrações de COS e XOS foram determinadas por HPLC utilizando equipamento Waters, nas seguintes condições: coluna Aminex HPX-87C BIO-RAD (300 × 7,8 mm); temperatura: 80 °C; eluente: água ultrapura com vazão de 0,6 mL/min; volume da amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 40 °C, tempo de análise: 15 min. Soluções de glicose (C1) (Sigma), celobiose (C2), celotriose (C3), celotetraose (C4), celopentaose (C5) e celohexaose (C6) (Megazyme) foram utilizadas como padrões. As amostras foram filtradas usando um filtro de seringa com tamanho de poro de 0,22 µm. Soluções de xilose (X1) (Sigma), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexaose (X6) (Megazyme) foram usadas como padrões.

Caracterização química da biomassa

[034] É importante ressaltar que dependendo da espécie e do tipo de processo ao qual essas biomassas foram submetidas, a composição química diferiu. O pseudocaule da bananeira apresentou 48,4% de celulose e 14,6% de hemicelulose, resultados semelhantes aos obtidos. Porém, a quantidade de celulose e hemicelulose presente no pseudocaule da bananeira pode chegar a 60,8% e 33,5%, respectivamente. As folhas de bananeira apresentaram 24,09% de celulose, 17,29% de hemicelulose e 27,90% de lignina, resultados semelhantes aos obtidos para celulose, semelhantes aos relatados, para hemicelulose e lignina.

[035] Alguns estudos relataram a quantidade de holocelulose, por exemplo, relataram a composição de ramos e folhas de goiaba como 26,56-69,49% para holocelulose, 11,02-34,12% para hemicelulose, 17,77-35,26% para lignina, 1,87-8,20% para cinzas. Os valores encontrados para o bagaço de goiaba foram próximos ao estudo citado: 17,17%; 19,96%; 36,33%; 1,12% e 6,22% para celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos. A variação na composição dos materiais é influenciada por fatores como local de crescimento da planta, nutrientes do solo, colheita e clima, entre outros.

Caracterização química de material pré-tratado

[036] Folha e pseudocaule de bananeira e bagaço de goiaba foram pré-tratados com peróxido de hidrogênio a 6% em meio alcalino, contendo hidróxido de sódio, 20% (m/m) ácido sulfúrico, 20% (m/m) hidróxido de sódio e 20% (m/m) hidróxido de potássio (Figura 1). Na presença de peróxido de hidrogênio, o material adquire uma coloração mais clara em relação aos demais pré-tratamentos devido à reação de branqueamento.

[037] A maior porcentagem de recuperação de massa foi obtida no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio 6% (m/v) em meio alcalino, exceto no caso das folhas de bananeira, em que a maior recuperação de massa obtida foi com hidróxido de potássio 20% (m/m) (Tabela 1).

[038] Os pré-tratamentos provocam perda de massa devido à solubilização dos componentes presentes no material. Neste processo ocorre a quebra das ligações

glicosídicas, solubilização e remoção da hemicelulose, precipitação da lignina devido à quebra de suas ligações moleculares e condensação, e remoção dos grupos acetil presentes na hemicelulose facilitando a atividade das hemicelulases. Todas essas alterações na biomassa provocam um aumento no percentual de celulose, tornando o material poroso, e a celulose mais acessível à ação de enzimas como as celulasas. O pré-tratamento ácido é mais adequado para biomassas com menor teor de lignina, pois durante o processo a maior parte permanece na fração sólida e aproximadamente 5 a 10% é solubilizada.

[039] O material com maior percentual de celulose (62,85%) foi obtido utilizando pseudocaule de bananeira tratado com ácido sulfúrico a 20% (m/m). Nos materiais pré-tratados com ácido houve aumento na concentração de celulose e lignina, e diminuição na hemicelulose, que foi solubilizada e retirada da biomassa (Tabela 1), e realizaram a caracterização química de pseudocaule de bananeira pré-tratado com ácido sulfúrico 20% (m/m), a 121 °C por 30 min, e os valores encontrados para celulose, hemicelulose e lignina foram respectivamente: 63,37%, 4,13% e 30,08%.

[040] No pré-tratamento com hidróxido de sódio 20% (m/m), a maior concentração de celulose foi obtida utilizando pseudocaule de bananeira. As concentrações de celulose, hemicelulose e lignina foram de 53,75%, 14,21% e 17,6%, respectivamente. Nos pré-tratamentos com hidróxido de sódio houve aumento no teor de celulose no pseudocaule e folha da bananeira e diminuição no bagaço de goiaba. A hemicelulose diminuiu em todos os casos e a lignina diminuiu apenas no pseudocaule. No pré-tratamento alcalino com hidróxido de potássio houve aumento de celulose apenas para a folha pré-tratada, e aumento no teor de hemicelulose e lignina em todos os casos (Tabela 1). A caracterização química do pseudocaule de bananeira pré-tratado com hidróxido de sódio 20% (m/m) a 121 °C por 30 min foi relatada anteriormente. Os valores encontrados para celulose, hemicelulose e lignina foram respectivamente: 70,01%, 9,68% e 10,78% realizaram o pré-tratamento de pseudocaule de banana com hidróxido de sódio 2 mol/L, autoclavado por 90 min, relação massa/líquido de 1:4. Obteve-se um material com 51,66% de

celulose, 23,29% de hemicelulose e 11,44% de lignina. A concentração de celulose pode aumentar em até 10% no tratamento com NaOH. No presente pedido de patente o percentual de celulose foi semelhante ao estudo citado. Entretanto, houve maior remoção de hemicelulose e menor remoção de lignina, com concentração de NaOH equivalente a 0,25 mol/L. Foi obtida 44% de lignina. A concentração de celulose pode aumentar em até 10% no tratamento com NaOH. No presente pedido de patente o percentual de celulose foi semelhante ao estudo citado. Entretanto, houve maior remoção de hemicelulose e menor remoção de lignina, com concentração de NaOH equivalente a 0,25 mol/L. Foi obtida 44% de lignina. A concentração de celulose pode aumentar em até 10% no tratamento com NaOH. O percentual de celulose foi semelhante ao estudo citado. Entretanto, houve maior remoção de hemicelulose e menor remoção de lignina, com concentração de NaOH equivalente a 0,25 mol/L.

[041] O pseudocaule da bananeira foi pré-tratado em várias etapas usando hidróxido de sódio a 5%, seguido de peróxido de hidrogênio a 16% (v/v) em meio alcalino e ácido sulfúrico a 60% (m/m). O rendimento obtido foi de 0,073 g de celulose por grama de pseudocaule (rendimento de extração de 7,3%). O resultado encontrado foi inferior ao obtido no presente pedido de patente considerando todas as biomassas e pré-tratamentos realizados. Um estudo relatou hidrólise de pseudocaule de bananeira com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio 2% (m/v), a 121°C por 30 min e obteve um material com 52,11% e 50,6% de celulose, respectivamente, 28,45% e 28,83% de hemicelulose, 10% e 12% de lignina, respectivamente. Em comparação com o presente pedido de patente, os percentuais obtidos para celulose e lignina foram menores e para hemiceluloses maiores.

[042] Os pré-tratamentos alcalinos solubilizam e removem parcialmente a hemicelulose e a lignina e incham a celulose. O hidróxido de sódio é amplamente utilizado em pré-tratamentos alcalinos porque é um catalisador básico forte, capaz de solubilizar significativamente a hemicelulose e a lignina sob condições

otimizadas. Em relação aos demais pré-tratamentos alcalinos, pode-se observar que o hidróxido de sódio aumenta a eficiência da hidrólise enzimática, reduzindo a recalcitrância do material. Ele funciona quebrando as ligações éter e éster entre a lignina e a hemicelulose e as ligações éster e carbono-carbono na molécula de lignina.

[043] No pré-tratamento com peróxido de hidrogênio 6% (m/m), o maior percentual de celulose foi obtido com pseudocaule de bananeira. Os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina foram de 53,57%, 16,46% e 19,21%, respectivamente (Tabela 1). Neste pré-tratamento, a quantidade de celulose aumentou no pseudocaule e na folha da bananeira e diminuiu no bagaço de goiaba, a hemicelulose diminuiu em todas as amostras e a lignina diminuiu apenas no pseudocaule da bananeira (Tabela 1). Foi reportada a caracterização química de pseudocaule de bananeira pré-tratado com peróxido de hidrogênio 6% (m/m) a 25 °C por 4 h, a qual resultou em celulose, hemicelulose e lignina respectivamente: 70,99%, 11,31% e 9,29%. Reagentes oxidantes combinados com meio alcalino são eficientes para a quebra de moléculas de lignina e hemicelulose e provocam sua solubilização, aumentando a quantidade de açúcares liberados após a hidrólise enzimática.

[044].

Tabela 1- Composição química do material não tratado e pré-tratado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidróxido de sódio e potássio (NaOH e KOH).

Composição Química do material não tratado e <u>pré-tratado</u> (% base seca)								
Material	Pré-tratamento	Celulose/ <u>glu</u> <u>cana</u>	Xilana	Arabinosil	Acetil	Hemicelulose <u>ose</u> Total	Lignina	Massa recuperada (%)
Pseudocaul de bananeira	Não tratado	48,41a + 0,58	10,48 + 0,16	3,80 + 0,11	0,38 + 0,42	18,5a±0,69	19,84a±1,74	-
	H2O2 6% (p/v)	53,57b + 0,46	11,97 + 0,32	4,49 + 0,12	0	16,46b + 0,44	19,21a + 3,25	54,32
	H2SO4 20% (p/p)	62,85c + 0,44	5,17 + 0,47	0,56 + 0,09	0,21 + 0,19	5,94c±0,56	34,21b±1,27	34,66
	<u>NaOH</u> 20% (p/p)	53,75d + 1,18	10,26 + 0,31	3,95 + 0,40	0	14,21d±0,71	17,6c±1,99	32,88
	KOH 20% (p/p)	42,35e + 2,17	21,46 + 1,11	5,71 + 0,92	0	27,17e±2,03	21,72d±0,73	38,16
Folhas de bananeira	Não tratado	24,09a + 1,44	10,62 + 0,59	6,32 + 0,62	0,37 + 0,27	17h31a±1,48	27h90±2,43	-
	H2O2 6% (p/v)	41,42b + 2,67	11,19 + 1,02	5,25 + 0,32	0	16,45b + 1,34	44,42b + 1,38	32,21
	H2SO4 20% (p/p)	36,05c + 1,67	4,31 + 0,27	0,54 + 0,04	0,19 + 0,02	5,04c±0,33	41,86c±0,39	48,62
	<u>NaOH</u> 20% (p/p)	35,94d + 2,77	11,70 + 1,22	2,09 + 1,12	0	13,79d±2,34	30,07d±0,47	39,89
	KOH 20% (p/p)	36,39ec + 0,62	13,94 + 0,28	7,29 + 0,58	0	21,23e±0,86	30,42d±1,53	52,23
Bagaço de goiaba	Não tratado	37,74a + 0,06	19,09 + 0,93	1,89 + 0,72	2,02 + 1,53	23a±3,18	34,15a±1,81	-
	H2O2 6% (p/v)	28,71b + 4,29	17,91 + 0,65	1,18 + 1,89	0	19,09b + 2,54	38,77b + 2,41	50,98
	H2SO4 20% (p/p)	39,22c + 3,07	11,16 + 3,58	0,17 + 0,26	0 + 0,08	11,33c±3,92	49,66c±0,28	43,91
	<u>NaOH</u> 20% (p/p)	34,66d + 2,51	11,02 + 1,02	0,92 + 1,17	0	11,93 CC±2,19	34,78a±0,97	44,85
	KOH 20% (p/p)	31,04e + 1,97	23,90 + 1,36	4,43 + 0,59	0,23 + 0,03	28,56e±1,98	42,96d±0,26	45,10

*testes realizados em triplicata; (-): não reportado; Lignina: soma da lignina solúvel e insolúvel. Letras iguais, na mesma coluna para cada biomassa, representam a mesma similaridade estatística, menor que 0,05 ($p < 0,05$).

[046] O alto grau de polimerização e cristalinidade da celulose, e sua associação com lignina e hemicelulose tornam a biomassa recalcitrante. Os pré-tratamentos (moagem, químicos e físico-químicos) são essenciais para a posterior eficiente hidrólise enzimática da celulose, aumentando consequentemente sua reatividade.

Hidrólise enzimática para produção de COS

[047] Inicialmente para produzir COS a partir de resíduos de frutas, foram aplicados ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio como pré-tratamento prévio à hidrólise enzimática. Os materiais foram moídos em moinho de faca (0,8 mm) antes dos pré-tratamentos, e uma parte foi moído em moinho de bolas após os pré-tratamentos. Outra estratégia foi aplicar hidrólise com xilanase seguida de endoglucanase. Essa estratégia produziu XOS, removendo a hemicelulose do material, expondo a celulose à hidrólise da endoglucanase, liberando COS.

[048] O material não tratado, moído em moinho de faca e moinho de bolas, foi submetido à hidrólise enzimática tanto pela endoxilanase quanto pela endoglucanase, (Tabela 2, Figura 2). Para material não tratado (apenas moído com faca), os maiores rendimentos de COS foram 10,10%, 21,72% e 32,06% para pseudocaule (20 UI/g), folha (20 UI/g) e bagaço de goiaba (100 UI/g), respectivamente. A carga de hidrólise enzimática avaliada (20, 50 e 100 UI/g) apresentou pequena variação no rendimento de COS. O maior rendimento de COS de 32,06% para o bagaço de goiaba apresentou concentração de 1,0 g/L nas condições experimentais aplicadas.

[049] A aplicação de endoxilanase resultou em rendimento de XOS de 56,76%, 54,35% e 52,48%, respectivamente para BP, BL e GB. Esses rendimentos de XOS podem ser considerados altos em comparação com processos que solubilizaram a xilana previamente à hidrólise enzimática. O resíduo sólido proveniente da hidrólise da endoxilanase foi submetido a uma etapa de hidrólise com endoglucanase. O rendimento de COS aumentou 5,7 vezes para BP e 3,4 e 1,5 vezes para BL e BG, respectivamente (Tabela 2). A remoção da hemicelulose do material não tratado mostrou-se uma boa estratégia para posterior hidrólise com endoglucanase para produção de COS.

[050] O material não tratado foi moído previamente à hidrólise da endoglucanase, aumentando o rendimento de COS em 1,6 vezes para BP e 1,3 vezes para BL, sem aumento para GB. O GB foi mais resistente ao moinho de bolas, talvez influenciado

pela estrutura da semente e teor de lignina (Tabela 1). Para a produção de XOS, o rendimento do XOS foi ligeiramente maior em comparação com o não moído (Figura 2). O rendimento de COS foi ligeiramente inferior aplicando o moinho de bolas anteriormente à endoxilanase e à andoglucanase. Tanto para a produção de XOS quanto de COS, o moinho de bolas não foi eficiente em aumentar o rendimento da produção.

Tabela 2- Rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba não tratados.

Material não tratado hidrolisado com <u>endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	24	44,90	4,49	0	0	0	3,99	8.48a	0,85
	50		47,40	0	0	0	0	3,85	3.85b	0,43
	100		50,90	0	0	0	4,69	5,40	10.10c	0,98
BL	20		67,20	12,60	0	0	0	9,15	21.74a	1.01
	50		60,50	0	0	0	0	2,57	2.57b	0,12
	100		68,70	8.17	1.11	0	0	4.29	13.56c	0,65
GB	20		16,00	20.01	0	0	0	8.33	28.34a	0,97
	50		13,00	14,64	0	0	0	7,93	22.57b	0,83
	100		12,00	0	1,28	0	0	30,78	32.06c	1.09
Material não tratado hidrolisado com <u>xilanase</u> , seguido de <u>endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	X5 (%)	X6 (%)	XOS (%)	XOS (g/L)
PA	30	24	0	55,15	0	0	0	1,60	56.76a	11.24a
BL	30		0,39	0	0	0	0	0	54.35b	11.63b
GB	30		0,04	52,48	0	0	0	0	52.48c	11h55
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	6	6.26	47,61	0	0	0	1,28	48.88a	4,65
BL	20		2,63	72,32	0	0	0	0	72.32b	3,71
GB	20		7,46	16,88	31,52	0	0	0	48,40c	1,70

C1: glicose; C2: celobiose; C3: celotriose; C4: celotetraose; C5: celopentaose; C6: celohexaose; COS: glico-oligossacarídeos=C2+C3+C4+C5+C6.

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5/X6: xilopentaose/xilohexaose; XOS: xilooligossacarídeos=X2+X3+X4+X5/X6.

Pré-tratamento alcalino (hidróxido de sódio e potássio)

[051] Estratégias semelhantes foram aplicadas à biomassa, mas previamente pré-tratada com hidróxido de sódio e potássio. O pré-tratamento com hidróxido de sódio

previamente à hidrólise da endoglucanase resultou em menor rendimento de COS em comparação à hidrólise enzimática do material não tratado (Tabela 3). O perfil de produção de COS e XOS com endoxilanase, endoglucanase e moinho de bolas antes da hidrólise enzimática foi semelhante para o material não tratado. Este perfil de produção XOS e COS significa o efeito de tendência de cada etapa do processo. Numa comparação geral, o pré-tratamento apresentou benefícios para algumas condições específicas.

[052] Os maiores rendimentos de COS foram obtidos utilizando biomassa pré-tratada com álcali. Os valores foram de 53,05% para pseudocaule de bananeira pré-tratado com hidróxido de potássio, 79,73% para folhas de bananeira pré-tratadas com hidróxido de sódio e 59,99% para bagaço de goiaba pré-tratado com hidróxido de sódio (Figuras 3 e 4).

Tabela 3 – Rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba pré-tratados com hidróxido de sódio.

Material <u>hidrolisado com endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	24	3,99	3,82	0	0	0	1,68	5,50 ^a	0,59
	50		6,21	3,81	0	0	0	1,88	5,69b	0,63
	100		14,80	4,75	0,24	0	0	3,20	8,20c	0,85
BL	20		3,93	3,42	0	0	0	4,03	7,44a	0,51
	50		10,30	4,22	0	0	0	4,06	8,27b	0,57
	100		20,20	3,71	0,10	0	0	5,35	9,16c	0,67
GB	20		0	0,17	0	0	0	1,22	1,39a	0,08
	50		0	0,87	0	0	0	3,86	4,73b	0,27
	100		10,60	1,45	0	0	0	3,63	5,08c	0,29
<u>Hidrólise com xilanase, seguida de endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	X5 (%)	X6 (%)	XOS (%)	XOS (g/L)
PA	30	24	0	57,99	0	0	0	0	57,99a	11,83
BL	30		0	52,70	0	0	0	0	52,70b	11,49
GB	30		0	55,14	0	0	0	0	55,14c	11,69
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	6	3,26	42,82	0	0	0	0	42,82a	4,54
BL	20		0,60	45,67	0	0	0	0	45,67b	3,17
GB	20		0	15,72	29,36	0	0	0	45,09c	2,55

C1: glicose; C2: celobiose; C3: celotriose; C4: celotetraose; C5: celopentaose; C6: celohexaose; COS: glico-oligossacarídeos=C2+C3+C4+C5+C6.

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5/X6: xilopentaose/xilohexaose; XOS: xilooligossacarídeos=X2+X3+X4+X5/X6.

[053] Hidróxido de sódio e potássio como pré-tratamento para hidrólise com endoglucanase resultou em menor rendimento de COS em comparação com a hidrólise de material não tratado (Tabela 4). Os resíduos de frutas apresentaram composição química característica de um material lignocelulósico (Tabela 1). Porém, o efeito dos pré-tratamentos com hidróxido de sódio e potássio não foi eficiente na modificação da estrutura para posterior hidrólise enzimática. Para um material lignocelulósico típico, espera-se que o pré-tratamento alcalino remova parte da lignina e da hemicelulose, aumentando a acessibilidade à celulose. Porém, para os resíduos de frutas (banana e bagaço de goiaba) o efeito do pré-tratamento não seguiu a mesma tendência observada para hemicelulose e lignina (Tabela 1).

Tabela 4 – Rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba pré-tratados com hidróxido de potássio.

Hidrólise com <u>endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	24	3,08	2,38	0	0	0	6,41	8,78a	0,77
	50		7,53	4,20	0	0	0	3,15	7,35b	0,62
	100		25,00	7,26	0,41	0	0	4,65	12,32c	1,05
BL	20		4,25	2,55	0	0	0	2,62	5,17a	0,39
	50		8,82	4,37	0,18	0	0	2,95	7,50b	0,56
	100		14,0	1,97	0,10	0	0	3,76	5,84c	0,44
GB	20		5,83	1,98	0,00	0	0	1,70	3,67a	0,24
	50		17,20	3,60	0,00	0	0	1,34	4,94b	0,31
	100		7,24	1,70	0,00	0	0	2,55	4,25c	0,28
Hidrólise com <u>xilanase</u> , seguida de <u>endoglucanase</u>										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	X5 (%)	X6 (%)	XOS (%)	XOS (g/L)
PA	30	24	0	59,10	0	0	0	0	59,10a	12,06
BL	30		0	57,45	0	0	0	0	57,45b	11h49
GB	30		0,04	56,49	0	0	0	0	56,49c	11,64
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	6	0,10	53,05	0	0	0	0	53,05a	4,50
BL	20		3,36	58,07	0	0	0	0	58,07b	4,18
GB	20		0	16,42	34,39	0	0	0	50,81c	3,24

C1: glicose; C2: celobiose; C3: celotriose; C4: celotetraose; C5: celopentaose; C6: celohexaose; COS: gluco-uoligossacarídeos=C2+C3+C4+C5+C6.

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5/X6: xilopentaose/xilohexaose; XOS: xilooligossacarídeos=X2+X3+X4+X5/X6.

Pré-tratamento com ácido sulfúrico

[054] O pré-tratamento com ácido sulfúrico resultou em menor rendimento de COS com a hidrólise da endoglucanase (Tabela 5), em comparação com a hidrólise da biomassa não tratada. O rendimento de XOS ficou na mesma faixa, e houve um rendimento de COS menor quando a endoglucanase foi aplicada após a endoxilanase em comparação com o material não tratado.

Tabela 5 – Rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba pré-tratados com ácido sulfúrico.

Hidrolisado com endoglucanase										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	24	0,62	1,08	6,69	0	0	0	7,77 ^a	1,03
	50		3,46	1,57	0	0	0	1,77	3,34 ^b	0,42
	100		6,93	1,81	0	0	0	2,26	4,07 ^c	0,53
BL	20		0,91	2,26	0	0	0	5,04	7,30	0,53
	50		5,41	1,80	0	0	0	6,08	7,88 ^a	0,57
	100		13,60	3,44	0	0	7,94	0	11,38 ^b	0,84
GB	20		6,12	2,92	0	0	0	2,59	5,51 ^a	0,43
	50		3,83	1,18	0	0	0	4,46	5,64 ^a	0,42
	100		14,30	2,54	0,13	0	0	4,46	7,13 ^b	0,53
Hidrolisado com xilanase, seguido de endoglucanase										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	X5 (%)	X6 (%)	XOS (%)	XOS (g/L)
PA	30	24	0,05	60,13	0	0	0	0	60,13 ^a	12,15
BL	30		0	52,58	0	0	0	0	52,58 ^b	11,88
GB	30		0	57,25	0	0	0	0	57,25 ^c	12,14
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	6	1,40	30,51	0	0	0	0	30,51 ^a	3,88
BL	20		3,58	53,01	0	0	0	0	53,01 ^b	4,31
GB	20		0	11,71	19,95	0	0	0	31,66 ^c	2,48

C1: glicose; C2: celobiose; C3: celotriose; C4: celotetraose; C5: celopentaose; C6: celohexaose; COS: glico-oligossacarídeos=C2+C3+C4+C5+C6.

X1: xilose; X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetraose; X5/X6: xilopentaose/xilohexaose; XOS: xilooligossacarídeos=X2+X3+X4+X5/X6.

[055] O maior rendimento foi obtido com o material moído em moinho de bolas e submetido à xilanase antes da endoglucanase, porém para o pseudocaule e folha de bananeira o rendimento foi semelhante ao material submetido às mesmas condições, mas não moído em moinho de bolas (Figura 5).

Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

[056] O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio resultou em baixo rendimento de COS para todas as biomassas não moídas (Tabela 6). Quando as biomassas foram moídas em moinho de bolas houve aumento no rendimento de COS, porém o maior resultado foi obtido com biomassas não moídas em moinho de bolas e submetidas à ação da endoxilanase antes da endoglucanase (Figura 6). O maior

rendimento de COS foi observado com a menor carga de endoglucanase (20 UI/g), enquanto o aumento na carga enzimática não colaborou para um maior rendimento.

Tabela 6 – Rendimento de COS e XOS após hidrólise enzimática do pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba pré-tratados com peróxido de hidrogênio.

Hidrolisado com endoglucanase										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	24	41,30	5,98	1,00	0	0	3,41	10.39a	1.18
	50		49,70	7,72	0	0	0	2,89	10.61a	1.17
	100		50,10	8.29	0	0	4,86	0	13.15b	1,43
BL	20		57,70	7,72	0	0	0	3,96	11.67a	1.01
	50		62,40	9,49	1.01	0	0	4,54	15.04b	1,44
	100		64,20	8.14	0	0	14.28	0,00	22.41c	1,87
GB	20		66,00	0	0	0	0	2.04	2.04a	0,12
	50		75,10	10,90	0	7.09	0	3,72	21.71b	1,26
	100		69,30	7,84	0	0	0	3,75	11.59c	0,79
Hidrolisado com xilanase, seguido de endoglucanase										
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	X5 (%)	X6 (%)	XOS (%)	XOS (g/L)
PA	30	24	0	58.10	0	0	0	0	58.10a	11.97
BL	30		0	12,69	30,58	0	0	0	43.28b	9,0
GB	30		6,78	13,91	27,58	0	0	0	41.49c	8,30
MATERIAL	Carga enzimática (UI/g)	Tempo de reação (h)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)	C5 (%)	C6 (%)	COS (%)	COS (g/L)
PA	20	6	4,60	31,81	0	0	0	0	31.81a	3,47
BL	20		4.32	75,95	0	0	0	0	75,95b	6,35
GB	20		0	8,67	28.24	0	0	0	36.91c	2.20

[057] Observou-se que o menor tamanho de partícula obtido após moagem em moinho de bolas e a utilização da enzima xilanase foram responsáveis pelo aumento na produção de COS. Em alguns casos, a glicose também aumentou, provavelmente devido ao aumento da superfície de contato e à maior exposição da celulose à endoglucanase causada pela remoção da xilana.

[058] Foi relatada a produção de COS utilizando palha de cana-de-açúcar pré-tratada com ácido sulfúrico e hidrolisada utilizando o coquetel comercial Celluclast. O material foi pré-tratado com ácido sulfúrico 0,5% (v/v), concentração de sólidos de 9% (m/m) a 140 °C por 15 min e em seguida foi submetido à hidrólise enzimática com Cellulast 10 UI/g, em 0,1 mol/ L de tampão fosfato de sódio (pH 5), temperatura de 50 °C, concentração de substrato de 1% (m/v) por 48 h. A quantidade de COS

obtida foi de aproximadamente 33,54 mg de COS por grama de palha de cana pré-tratada.

[059] No presente pedido de patente, o maior rendimento de COS obtido (79,73% para folhas de bananeira pré-tratadas com hidróxido de sódio) foi igual a 180,5 mg de COS por grama de material, ou seja, foi 5 vezes maior que o relatado no estudo. Provavelmente, a menor concentração de COS obtida no estudo de Barbosa *et al.* Devido à baixa concentração de ácido, que foi insuficiente para tornar a celulose mais acessível à enzima (coquetel Cellulast) e a concentração da enzima não foi capaz de hidrolisar a celulose de forma eficiente. O estudo também foi realizado com líquido iônico e o coquetel comercial Celluclast 10 UI/g. A biomassa foi pré-tratada com acetato de 2-hidroxietilamônio e hexanoato de 2-hidroxietilamônio a 130 °C durante 4 h. Houve produção de aproximadamente 90 mg/g de COS, quantidade cerca de 2,7 vezes maior que o valor relatado com o uso de ácido sulfúrico e 2 vezes menor que o presente pedido de patente. O estudo também foi realizado com líquido iônico e o coquetel comercial Celluclast 10 UI/g. A biomassa foi pré-tratada com acetato de 2-hidroxietilamônio e hexanoato de 2-hidroxietilamônio a 130 °C durante 4 h. Houve produção de aproximadamente 90 mg/g de COS, quantidade cerca de 2,7 vezes maior que o valor relatado com o uso de ácido sulfúrico e 2 vezes menor que o presente pedido de patente. O estudo também foi realizado com líquido iônico e o coquetel comercial Celluclast 10 UI/g. A biomassa foi pré-tratada com acetato de 2-hidroxietilamônio e hexanoato de 2-hidroxietilamônio a 130 °C durante 4 h. Houve produção de aproximadamente 90 mg/g de COS, quantidade cerca de 2,7 vezes maior que o valor relatado com o uso de ácido sulfúrico e 2 vezes menor que o presente pedido de patente.

[060] A hidrólise enzimática foi aplicada após pré-tratamento hidrotérmico para obter COS do pseudocaule da bananeira. O rendimento de oligossacarídeos obtidos do material sem pré-tratamento não excedeu 3,2%. Quando o material foi pré-tratado hidrotermicamente a 150 °C, o rendimento aumentou para 28% (dos quais 72% estavam na forma de celo-oligossacarídeos, ou seja, 134,48 mg de COS

por g de pseudocaule), com 1 FPU/g de celulase para 12h. O rendimento foi inferior ao obtido no presente pedido de patente, pois menos de 28% da celulose foi convertida em COS. O pré-tratamento hidrotérmico foi menos eficiente que os pré-tratamentos químicos de acordo com as condições aplicadas.

[061] Os COS foram produzidos a partir de palha de cana-de-açúcar e casca de café deslignificada com clorito de sódio, tratada com hidróxido de potássio 4,5% m/v a 121 °C por 30 min e hidrolisada com uma mistura de enzimas comerciais contendo celulase e esterase. O rendimento máximo obtido foi de 63,56 mg/g de substrato e baixa concentração de glicose. No presente pedido de patente, quando utilizado hidróxido de potássio no pré-tratamento, o rendimento máximo foi de 53,05% para pseudocaule de bananeira (Tabela 3), ou seja, 230 mg/g, valor 3,6 vezes maior que o do estudo citado. Isto provavelmente se deveu ao efeito do hidróxido de potássio no pré-tratamento e ao uso da xilanase anteriormente à endoglucanase.

[062] A xilanase foi aplicada no presente pedido de patente visando a remoção da xilana e, conseqüentemente, expondo a celulose à ação posterior da endoglucanase. A remoção de componentes como xilana e lignina pode aumentar a área superficial exposta da celulose e conseqüentemente aumentar a ação enzimática. O pré-tratamento ácido pode causar realocação/precipitação de lignina sob a fibra, contribuindo também para a exposição da celulose.

[063] De modo geral, o rendimento de conversão de xilana em XOS no presente pedido de patente foi superior a 50%, atingindo percentual máximo de 68,76% na hidrólise de folhas de bananeira moídas em moinho de bolas e pré-tratadas com hidróxido de potássio. Após os materiais serem moídos em moinho de bolas, houve uma tendência de aumento do rendimento de XOS provavelmente pelo aumento da superfície de contato, permitindo uma melhor interação com a endoxilanase.

[064] Foi possível converter 67,43%, 69,71% e 61% de xilana em XOS na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e folha e pseudocaule de bananeira, respectivamente, utilizando endoxilanase purificada de *Aspergillus versicolor*,

utilizando um agente enzimático carga de 30 UI/g por 24 h. O uso da endoxilanase diminuiu a recalcitrância do material com a solubilização da xilana, deixando a celulose mais exposta e acessível à endoglucanase, e possibilitando a produção de XOS e COS na mesma reação.

[065] COS foram produzidos com predominância de celobiose e celohexaose. As endoglucanases quebram aleatoriamente as ligações β -glicosídicas principalmente da região amorfa da celulose, liberando oligômeros de tamanhos variados, principalmente celobiose e celotriose. Utilizando o material sem pré-tratamento, houve formação de celobiose e celohexaose em todas as condições. Entretanto, foi observada elevada formação de glicose, exceto nos não moídos e submetidos à xilanase previamente ao material endoglucanase. Após a hidrólise do material pré-tratado com peróxido de hidrogênio, houve formação de celobiose e glicose em todos os ensaios. Quando o material não moído foi submetido à ação da xilanase e da endoglucanase, houve menor formação de glicose. Utilizando o material pré-tratado com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio,

[066] Para facilitar a compreensão dos resultados, foram criados gráficos no material suplementar com os melhores rendimentos para cada material submetido aos diferentes pré-tratamentos. Pode-se observar que o material não tratado submetido à hidrólise enzimática resultou em elevada quantidade de COS. A combinação de endoxilanase e endoglucanase resultou em melhor rendimento de COS. O moinho de bolas teve efeito positivo no rendimento de COS para material pré-tratado com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO FÍSICOQUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS, **caracterizado pelas** seguintes etapas:

- Preparação da biomassa (pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba), em que o bagaço de goiaba foi moído em moinho de facas com peneira de malha 20 mesh (0,8 mm) e a folha e o pseudocaule da bananeira foram expostos ao sol até a perda do excesso de umidade, cortados em pequenos pedaços, secos em estufa a 60 °C, até aproximadamente 10% de umidade, e moídos em moinho de facas com peneira de malha 20 (0,8 mm);
- Pré-tratamento de 5 g de biomassa (pseudocaule de bananeira, folhas de bananeira e bagaço de goiaba) moída em moinho de facas com peneira de malha 20 mesh (0,8 mm), colocada em frasco Schott contendo 100 mL de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio 20% (m/m), então os frascos foram autoclavados a 121 °C por 30 min, a mistura foi filtrada a vácuo, a fração sólida foi lavada com água até pH neutro, seca em estufa a 45 °C e utilizada para hidrólise enzimática e caracterização química;
- Pré-tratamento de 5 g da biomassa (pseudocaule e folha de bananeira e bagaço de goiaba) moída em moinho de facas com peneira de malha 20 (0,8 mm) colocada em frasco Schott contendo 100 mL de ácido sulfúrico 20% (m/m), então os frascos foram autoclavados a 121 °C por 30 min, a mistura foi filtrada a vácuo, a fração sólida foi lavada com água até pH neutro, seca em estufa a 45 °C e utilizada para hidrólise enzimática e caracterização química;
- Lavagem das biomassas com 0,2% (m/v) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por 1 h a 90 °C, e secagem a 45 °C por 48 h, em seguida 5 g de material foram tratados com 100 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 6% com pH ajustado para 11,6 com hidróxido de sódio 5 mol/L, a suspensão foi agitada por 4 h a 120 rpm a 25 °C em shaker e filtrado a vácuo, a fração sólida foi lavada até pH neutro na água de lavagem e seca em estufa a 45 °C;

- Hidrolisar 0,1 g de cada material com uma carga de endoglucanase de 20, 50 ou 100 UI/g em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mol/L, pH 5,2, então a mistura foi agitada a 170 rpm a 50 °C por 24 horas e, em seguida, os tubos foram fervidos por 5 minutos;
- Hidrolisar 0,1 g de cada material com 30 UI/g de endo- β -1,4-xilanase purificada de *Aspergillus versicolor* em 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mol/L, pH 6,0, com agitação de 170 rpm a 55 °C por 24 horas, então os tubos foram fervidos por 5 minutos, o hidrolisado foi centrifugado por 15 min a 5.000 rpm, em seguida, foram adicionados à fração sólida 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mol/L pH 5,2, 20 UI/g de endoglucanase e a reação foi realizada sob agitação de 170 rpm a 50 °C por 6 h, após a reação, o frasco foi fervido em água por 5 min.

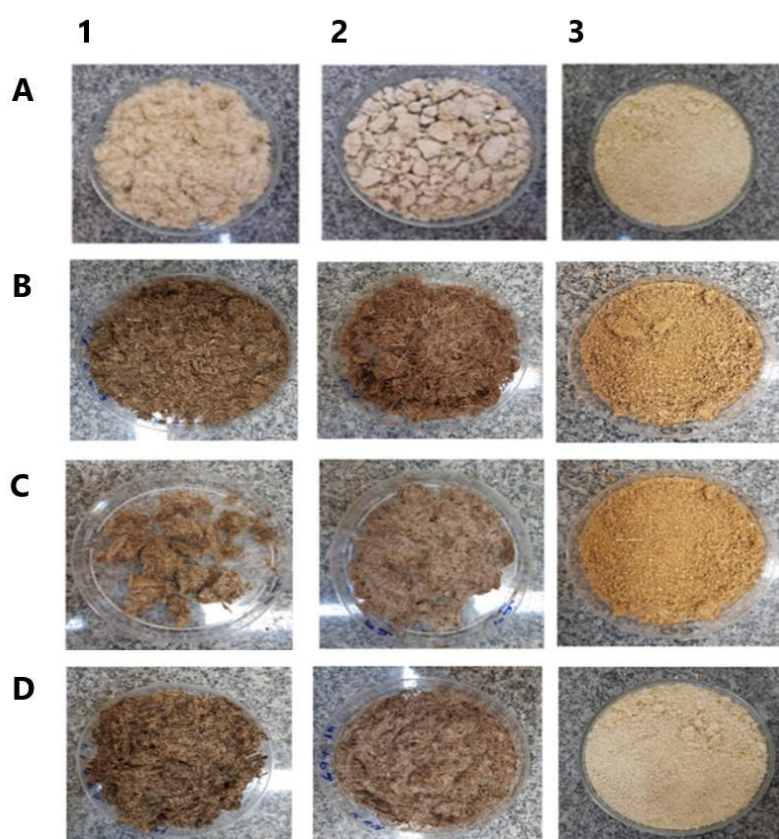
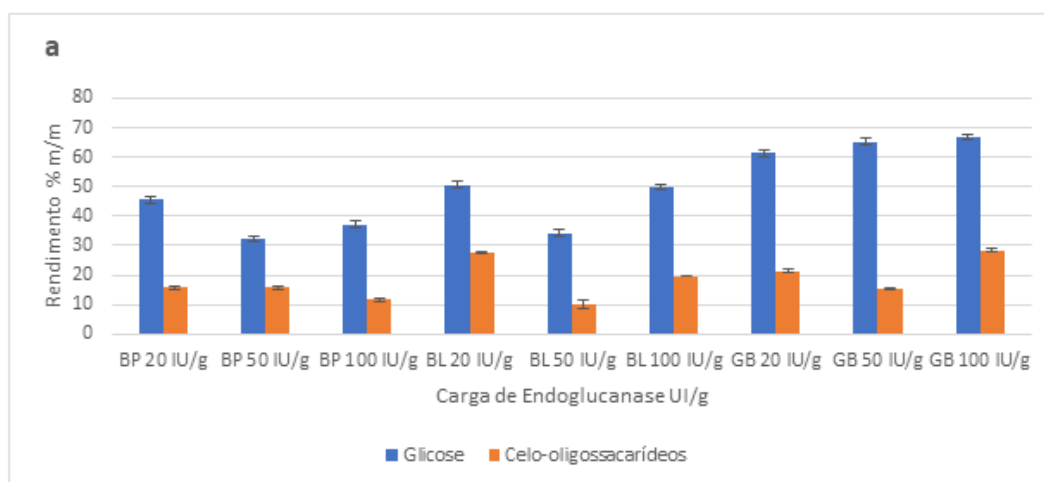
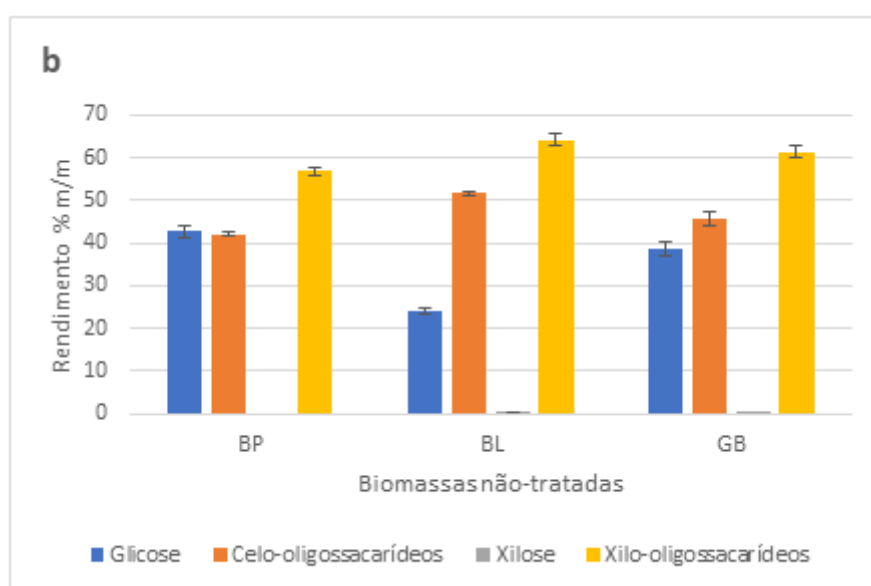
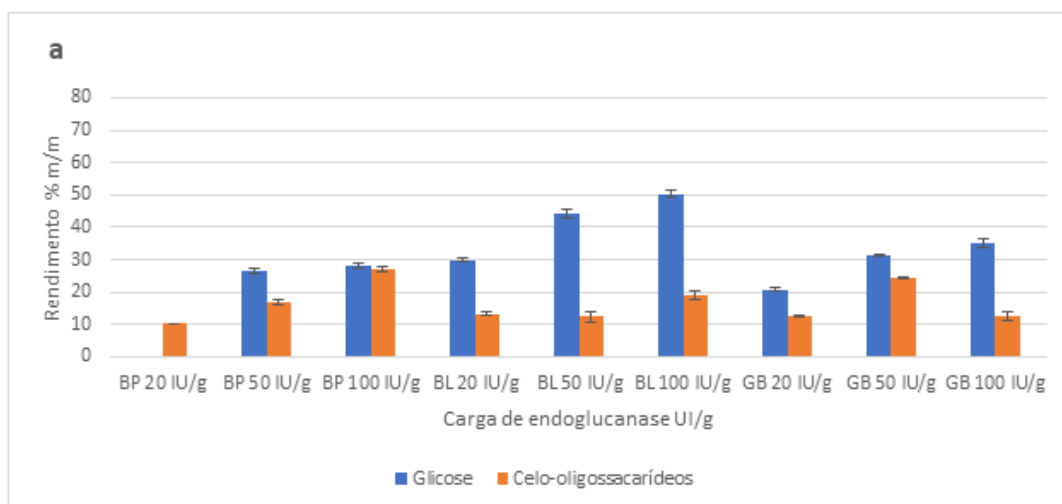
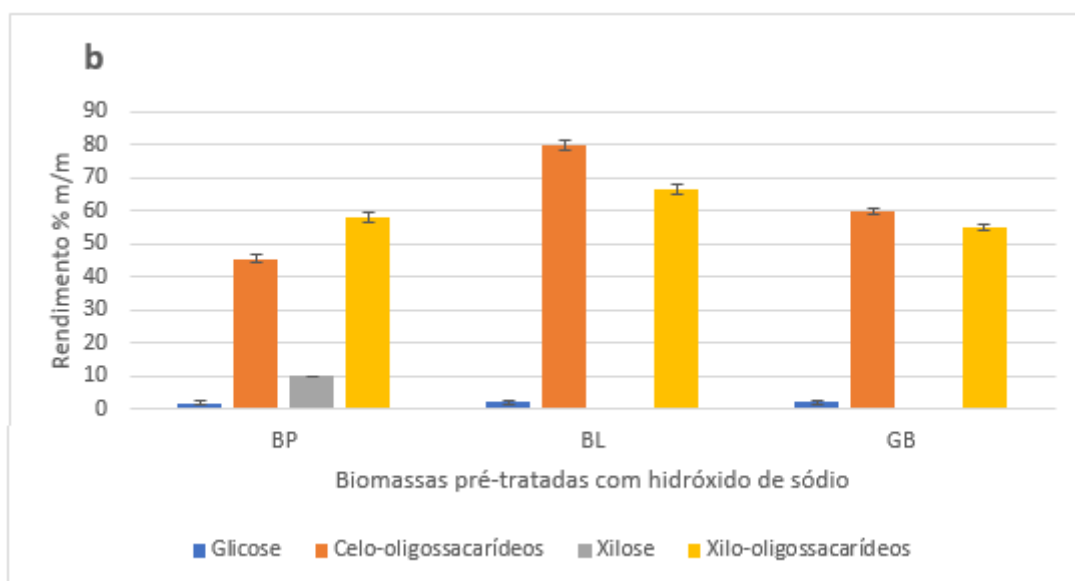


FIGURA 1

**FIGURA 2A**

**FIGURA 2B**

**FIGURA 3A**

**FIGURA 3B**

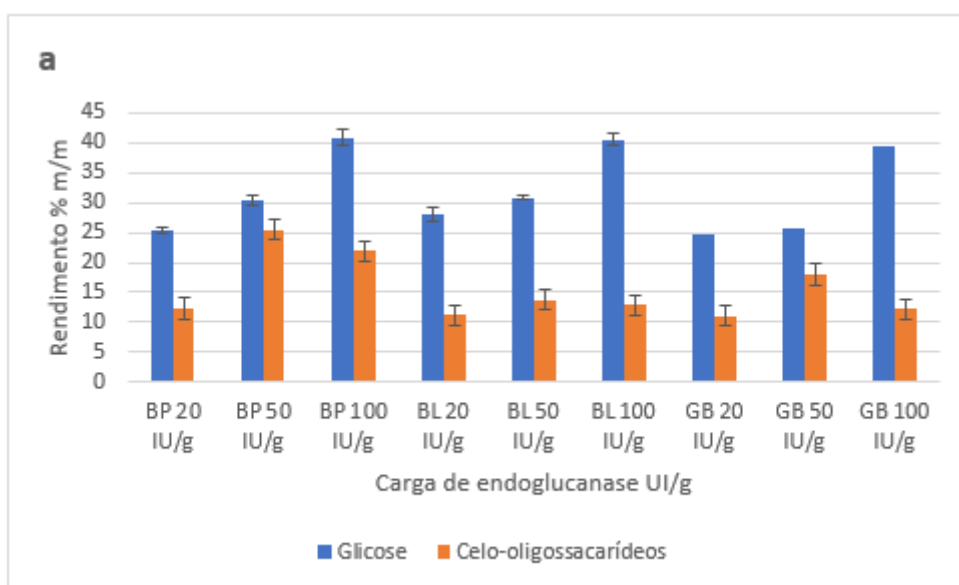


FIGURA 4A

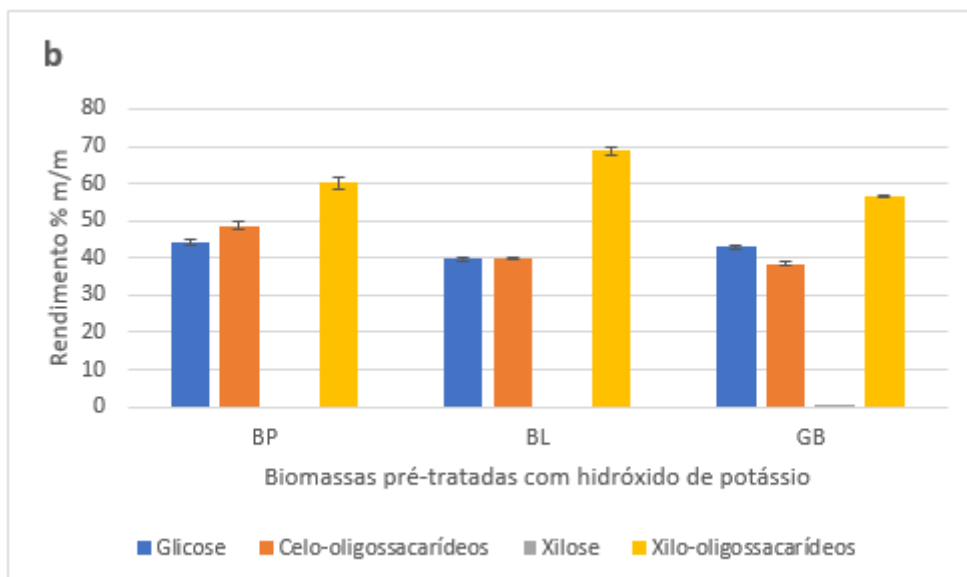


FIGURA 4B

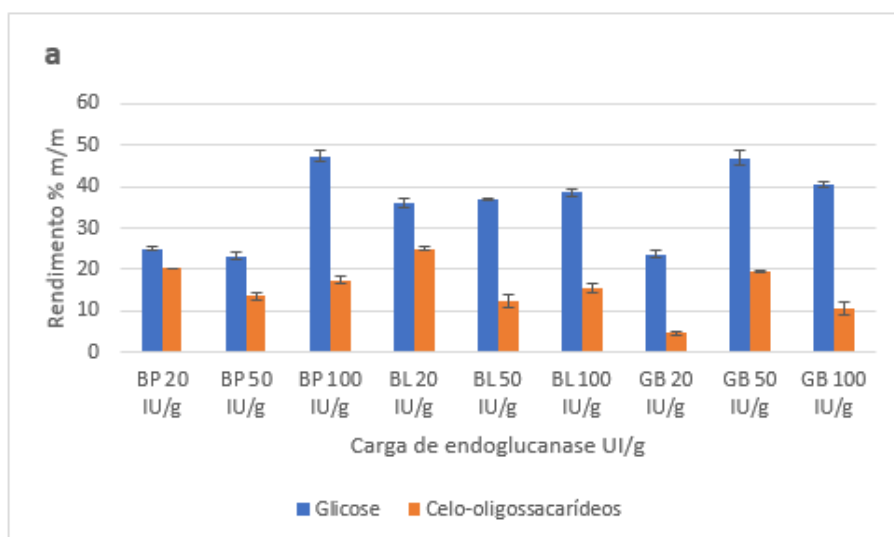
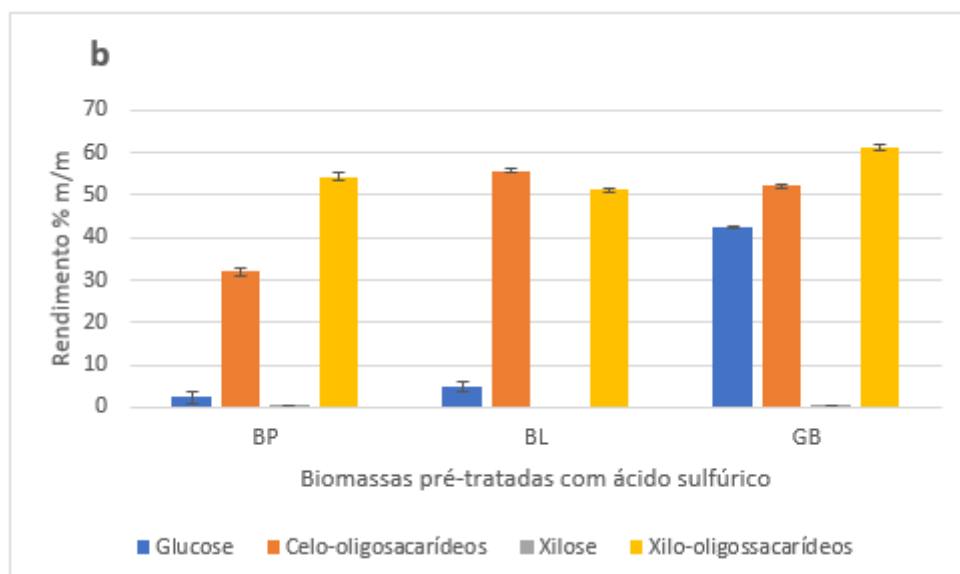


FIGURA 5A

**FIGURA 5B**

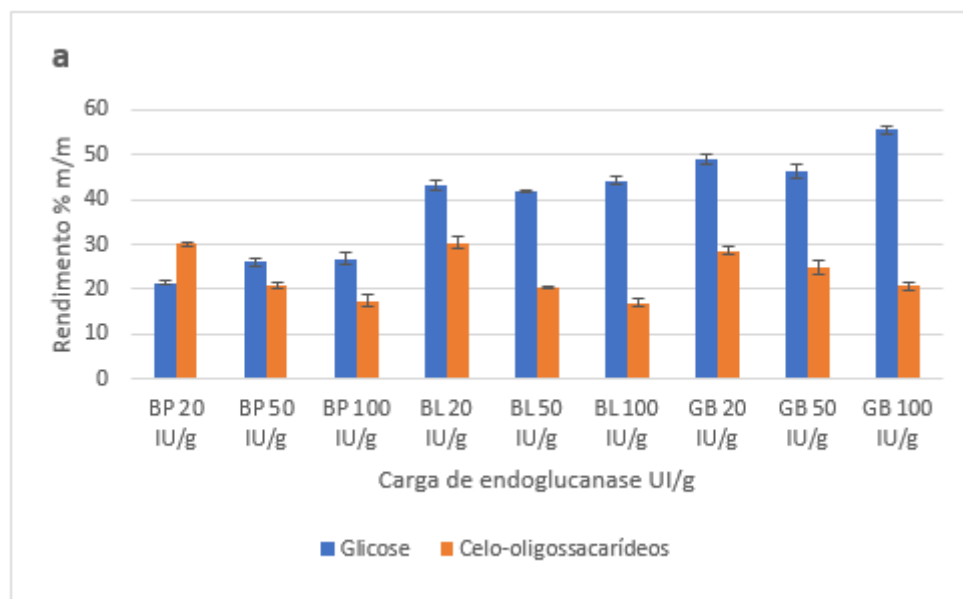


FIGURA 6A

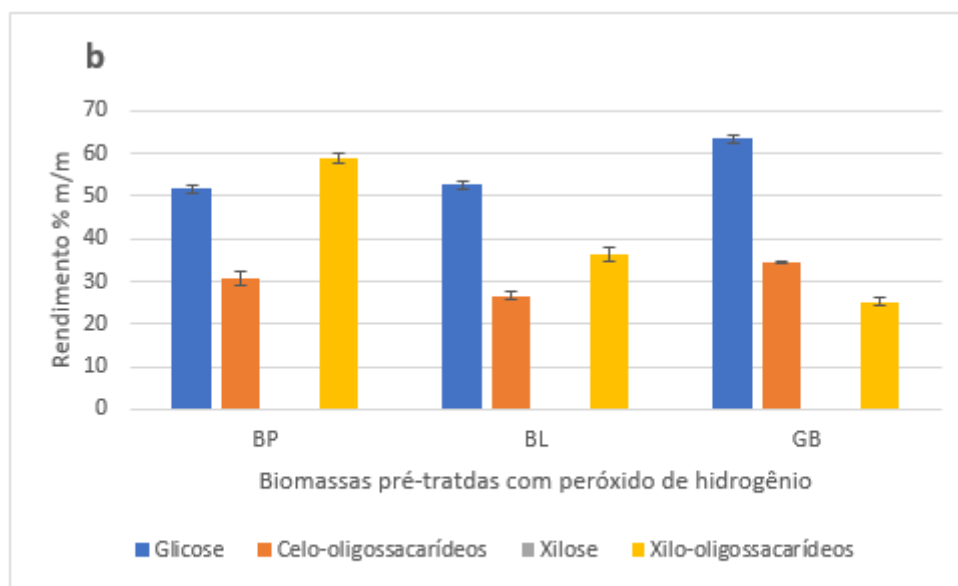


FIGURA 6B

RESUMO

PROCESSO FÍSICOQUÍMICO E ENZIMÁTICO PARA PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

O presente pedido de patente compreende a utilização de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba, resíduos gerados em excesso na fruticultura, para a produção de celo-oligossacarídeos (COS), compostos de interesse industrial com potenciais benefícios à saúde. Pertencendo ao campo da agricultura, mais especificamente a saúde animal e saúde humana, o processo promove a combinação de quatro pré-tratamentos químicos (ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio alcalino) aliados ao uso de moinho de bolas e hidrólise enzimática usando xilanase e endoglucanase, de modo a aumentar o rendimento da produção de COS a partir de pseudocaule e folhas de bananeira e bagaço de goiaba.