



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

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE HEMICELULOSE DO PSEUDOCÁULE DE
BANANEIRA COM ENDOXILANASE I DE *Aspergillus versicolor* PARA
PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
PREBIÓTICO**

CAROLINE DE FREITAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona
Co-orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

**Rio Claro
2019**

CAROLINE DE FREITAS

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE HEMICELULOSE DO PSEUDOCAULE DE
BANANEIRA COM ENDOXILANASE I DE *Aspergillus versicolor* PARA
PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS E AVALIAÇÃO DO SEU
EFEITO PREBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona
Co-orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro

2019

F866h	Freitas, Caroline de Hidrólise enzimática de hemicelulose do pseudocaule de bananeira com endoxilanase I de <i>Aspergillus versicolor</i> para produção de xilo-oligossacarídeos e avaliação de seu efeito prebiótico / Caroline de Freitas. -- Rio Claro, 2019 82 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Eleonora Cano Carmona Coorientador: Michel Brienzo 1. Xilana. 2. Pseudocaule de bananeira. 3. Xilanase. 4. Xilo-oligossacarídeos. 5. Prebióticos. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE HEMICELULOSE COM ENDOXILANASE I DE *Aspergillus versicolor* PARA PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO PREBIÓTICO

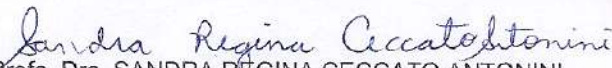
AUTORA: CAROLINE DE FREITAS

ORIENTADORA: ELEONORA CANO CARMONA

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


Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. FERNANDO MASARIN
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Hidrólise enzimática de hemicelulose do pseudocaule de bananeira com endoxilanas I de *Aspergillus versicolor* para produção de xilo-oligossacarídeos e avaliação de seu efeito prebiótico"

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha amada avó Lucy, que desde pequena sempre me incentivou a ler e estudar. Tenho certeza que ela está cheia de orgulho lá no céu. Aos meus pais, Adriana e Luiz, por se dedicarem sem medir esforços para que eu pudesse ter essa oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter guiado e iluminado meu caminho até aqui, pela sabedoria para conduzir os experimentos e fé para superar os obstáculos. “Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem eu confio”. (Salmos 91:2)

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona, pela orientação desde o meu estágio, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Michel Brienzo, pela orientação, paciência, atenção e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Cárol Cabral Terrone e Michel Gracioli, pela amizade, disposição e paciência em esclarecer as dúvidas e ajuda em todas as atividades no laboratório.

À Carmen Casonato, pelo apoio até mesmo nas coisas mais simples, pelas conversas e bons momentos compartilhados no laboratório.

Aos alunos do Prof. Michel pela ajuda na caracterização química, pela disposição e paciência com as análises do HPLC.

À Profa. Dra. Sandra Ceccato Antonini, por fazer me apaixonar por microbiologia, através das suas aulas e orientação da iniciação científica. Por conceder as bactérias probióticas utilizadas nesse trabalho e ajuda na escolha do método de contagem de colônias.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, por conceder a bactéria *E.coli* utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, por permitir o uso do HPLC para quantificação dos XOS.

Aos meus pais, Adriana e Luiz, pelo amor incondicional, carinho, dedicação, apoio, por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, amo vocês demais.

Ao meu amor, Fernando, pelo apoio, paciência, carinho e amparo em todos os momentos, bons e ruins. Você é o amor da minha vida, te amo!

À minha melhor amiga, Thais, por me apoiar, escutar meus desabafos nos momentos de ansiedade, me dar conselhos e força para continuar. Pela nossa amizade!

À Profa. Dra. Sâmia Tauk-Tornisielo, que me viu crescer e sempre foi grande apoiadora em minha jornada acadêmica até aqui.

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



“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Hemiceluloses são polissacarídeos com ligações do tipo β -1,4 sendo o principal tipo encontrado em gramíneas as xilanas, estruturas com cadeia principal de xilose. O pseudocaule de bananeira é um resíduo agrícola da colheita de banana que apresenta em média 19,1 % de xilana em sua composição. Xilanas apresentam grande potencial econômico e uma importante aplicação dessa macromolécula é a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS). XOS são oligômeros de xilose, reconhecidos por seu efeito prebiótico, além de possuírem diversas propriedades biológicas que promovem a saúde. A produção de XOS pode ser realizada por hidrólise enzimática através da ação de endoxilanase na cadeia da xilana. No entanto, é importante que a hemicelulose seja extraída da biomassa lignocelulósica e que o extrato enzimático seja livre de β -xilosidase, enzima que hidrolisa XOS a xilose. Tendo em vista o aumento da demanda de compostos que previnem doenças e promovem a saúde, o objetivo desse trabalho foi a produção de xilo-oligossacarídeos, a partir da hidrólise enzimática de hemiceluloses extraídas de pseudocaule de bananeira, usando a endoxilanase I de *Aspergillus versicolor* e avaliar a ação prebiótica dos compostos produzidos. A xilanase I de *Aspergillus versicolor* foi produzida pelo crescimento do microrganismo em meio contendo xilana proveniente de farelo de trigo. A enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex A-50) e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75). Previamente a extração de hemicelulose do pseudocaule de bananeira, foram avaliados diferentes pré-tratamentos/lavagens para remoção de extrativos. A extração da hemicelulose foi realizada com peróxido de hidrogênio a 6 % (m/v) em meio alcalino (pH 11,6). Após a extração da hemicelulose, as amostras foram quimicamente caracterizadas e o rendimento foi maior após o pré-tratamento alcalino com NaOH. A reação de hidrólise foi realizada variando-se os parâmetros de carga enzimática (10 UI/g, 30 UI/g, 60 UI/g, 100 UI/g e 200 UI/g), concentração de substrato (2%, 4%, 6%, 8% e 10% m/v) e tempo de reação (2h, 4h, 6h, 8h, 16h, 24h e 48h), a fim de se obter as melhores condições para produção de XOS. A maior quantidade de XOS foi obtida pela hidrólise realizada com carga enzimática de 30 UI/g, 8% de substrato e tempo de reação de 24 horas, produzindo 20,51 g/L de XOS, a maioria deles xilopentoses/xilohexoses e não houve produção de xilose. A ação prebiótica dos XOS produzidos foi avaliada através do crescimento de duas bactérias probióticas e uma bactéria patogênica em meio contendo XOS como fonte de carbono. Ambas as cepas probióticas utilizadas demonstraram habilidade em utilizar XOS de cadeia longa para seu crescimento, assim como também a cepa patogênica. Dessa maneira, pode-se afirmar que foi possível produzir compostos prebióticos (XOS) através da hidrólise enzimática de hemicelulose de pseudocaule de bananeira, utilizando a endoxilanase I de *Aspergillus versicolor*.

Palavras chave: xilana, pseudocaule de bananeira, xilanase, xilo-oligossacarídeos, prebióticos

ABSTRACT

Hemicelluloses are polysaccharides with β -1,4 bonds and the main type found in grasses is xylan, xylose main chain structures. The banana pseudostem is an agricultural residue of the banana crop that presents on average 19.1% of xylan in its composition. Xylans present great economic potential and an important application of this macromolecule is the production of xylooligosaccharides (XOS). XOS are sugar oligomers composed of xylose units recognized for their prebiotic effect, besides having diverse biological properties that promote the health. The production of XOS can be carried out by enzymatic hydrolysis through the action of endoxylanase on the xylan chain. However, it is important that the hemicellulose is extracted from the lignocellulosic biomass and that the enzyme extract is free from β -xylosidase, an enzyme that hydrolyzes XOS to xylose. Because of the increase demand for compounds that prevent disease and promote health, the objective of this study was xylo-oligosaccharides production from the enzymatic hydrolysis of hemicelluloses extracted from banana pseudostem using *Aspergillus versicolor* endoxylanase I and evaluate the prebiotic action of the compounds produced. A xylanase from *Aspergillus versicolor* was produced by the growth of the microorganism in medium containing xylan (wheat bran). The enzyme was purified through ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50) and molecular exclusion chromatography (Sephadex G-75). Prior to the hemicellulose extraction from banana pseudostem, different pre-treatments/washes were evaluated for the removal of extractives. The hemicellulose extraction was performed with 6% (m/v) hydrogen peroxide in alkaline medium (pH 11,6). After extraction, the samples were chemically characterized and the higher yield of hemicellulose was obtained after alkaline pre-treatment with NaOH. The hydrolysis reaction was performed by varying the parameters of enzymatic concentration (10 IU/g, 30 IU/g, 60 IU/g, 100 IU/g and 200 IU/g), substrate concentration (2%, 4%, 6%, 8% and 10%) and reaction time (2h, 4h, 6h, 8h, 16h, 24h and 48h), in order to obtain the best conditions for XOS production. The final enzymatic hydrolysis was performed with enzymatic concentration of 30 IU / g, 8% of substrate and 24 hours reaction time, producing 20.51 g / L of XOS, most of them xylopentaose and xylohexaose and there was no xylose production. The prebiotic action of the XOS produced was evaluated by the growth of two probiotic and a pathogenic bacterias in medium containing XOS as carbon source. Both probiotic strains demonstrated the ability to use long chain XOS for their growth, as well as the pathogenic strain. It can be affirmed that it was possible to produce prebiotic compounds (XOS) through the enzymatic hydrolysis of banana pseudostem hemicellulose.

Key words: xylan, banana pseudostem, xylanase, xylo-oligosaccharides, prebiotics

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da biomassa vegetal mostrando a organização entre celulose, hemicelulose e lignina	17
Figura 2. Estrutura da bananeira	19
Figura 3. Carboidratos que compõem as unidades da hemicelulose	21
Figura 4. Estrutura geral mostrando as ramificações que podem ser encontradas em uma variedade de xilanas isoladas da parede celular de plantas	22
Figura 5. Estrutura da xilana e sítios de ataque das enzimas xilanolíticas e acessórias	25
Figura 6. Estrutura tridimensional de xilanase da família GH11 produzida por <i>T. auranticus</i>	26
Figura 7. Representação esquemática da morfologia de <i>Aspergillus</i> spp	29
Figura 8. Colônia e conidióforos característicos da espécie <i>Aspergillus versicolor</i>	30
Figura 9. Representação esquemática da produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos	33
Figura 10. Estrutura esquemática da xilose e xilo-oligossacarídeos	37
Figura 11. Perfil cromatográfico da xilanase I de <i>A. versicolor</i> em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0	49
Figura 12. Precipitação da hemicelulose através da adição de etanol (A), e lavagem com etanol por cerca de 4 vezes (B)	52
Figura 13. Hemicelulose extraída com H ₂ O ₂ 6% (m/v) em meio alcalino após o tratamento com NaOH	55
Figura 14. Gráfico de produção de XOS (g/L) ao longo do tempo (h)	61
Figura 15. Teste de solubilidade da hemicelulose, podendo-se observar o sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel).....	62
Figura 16. Crescimento da bactéria <i>E. coli</i> em diferentes diluições através da técnica "drop plate"	65

Figura 17. Crescimento de <i>L. plantarum</i> em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono	66
Figura 18. Crescimento de <i>L. fermentum</i> em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono.....	67
Figura 19. Crescimento de <i>E. coli</i> em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química percentual em massa seca do pseudocaule de bananeira	19
Tabela 2. Etapas de purificação da principal endoxilanase de <i>A. versicolor</i>	49
Tabela 3. Teor de extrativos e caracterização química do pseudocaule de bananeira (base massa seca) após diferentes pré-tratamentos/lavagens	51
Tabela 4. Extração da hemicelulose de pseudocaule de bananeira após diferentes pré-tratamentos/lavagens	53
Tabela 5. Caracterização química das hemiceluloses extraídas após cada pré-tratamento/lavagem	54
Tabela 6. XOS produzidos por hidrólise enzimática com diferentes cargas da enzima endoxilanase I de <i>A. versicolor</i> com hemicelulose de pseudocaule de bananeira	57
Tabela 7. XOS produzidos por hidrólise enzimática (30 UI/g) com diferentes concentrações de substrato (hemicelulose extraída de pseudo-caule de bananeira) ...	58
Tabela 8. XOS produzidos por hidrólise enzimática com diferentes tempos de reação utilizando carga enzimática de 30UI/g e 2 % de substrato	60
Tabela 9. Frações solúvel e insolúvel da hemicelulose extraída do pseudocaule de bananeira	62
Tabela 10. Hidrólise enzimática com as frações solúvel e insolúvel da hemicelulose para produção de XOS utilizando 2 % de substrato e 30 UI/g de enzima	63
Tabela 11. Hidrólise enzimática em maior escala com as melhores condições dos parâmetros de carga enzimática, concentração de substrato e tempo de reação	64

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Resíduos agroindustriais	16
2.2. Pseudocaule de bananeira	18
2.3. Hemiceluloses (xilana)	20
2.4. Extração de hemicelulose	23
2.5. Xilanases	24
2.6. Gênero <i>Aspergillus</i> e espécie <i>Aspergillus versicolor</i>	29
2.7. Hidrólise enzimática de xilana para a produção de XOS	31
2.8. Bactérias probióticas	34
2.9. Xilo-oligossacarídeos e seu efeito prebiótico	36
3. OBJETIVO	40
3.1. Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Condições de manutenção e crescimento de <i>Aspergillus versicolor</i>	41
4.2. Condições de cultivo para produção de enzimas.....	41
4.3. Obtenção das preparações enzimáticas	41
4.4. Purificação da principal endoxilanase produzida por <i>Aspergillus versicolor</i>	41
4.5. Determinação da atividade de xilanase	42
4.6. Determinação de proteínas	42
4.7. Determinação de atividade β -xilosidase	43
4.8. Lavagem (pré-tratamento) da biomassa para remoção de extrativos e metais	43
4.9. Extração da hemicelulose	43
4.10. Caracterização química do pseudocaule de bananeira	44
4.11. Caracterização química da hemicelulose	44
4.12. Teste de solubilidade	45
4.13. Hidrólise enzimática das hemiceluloses extraídas para produção de XOS	45

4.14. Determinação da concentração de xilo-oligossacarídeos	46
4.15. Fermentação “in vitro” de xilo-oligossacarídeos	46
4.15.1. Micro-organismos	46
4.15.2. Meios de crescimento	46
4.15.3. Crescimento em meio com xilo-oligossacarídeos como fonte de carbono.....	47
4.16. Determinação do crescimento através do plaqueamento “drop plate”	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Purificação da principal endoxilanase produzida por <i>A. versicolor</i>	48
5.2. Atividade β -xilosidase	49
5.3. Caracterização química do pseudocaule de bananeira	50
5.4. Extração da hemicelulose	52
5.5. Caracterização química das hemiceluloses extraídas	53
5.6. Hidrólise enzimática para produção de XOS	55
5.6.1. Carga enzimática	55
5.6.2. Concentração do substrato	57
5.6.3. Tempo de reação	59
5.6.4. Hemicelulose solúvel e insolúvel	61
5.6.5. Hidrólise enzimática com as melhores condições	63
5.7. Fermentação “in vitro” de xilo-oligossacarídeos.....	64
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

A expansão das atividades agrícolas e agroindustriais gera grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, fontes renováveis que têm se tornado interessantes pois podem ser utilizados para a produção de novos materiais, deixando de ser subutilizadas. Entre os constituintes da biomassa, as hemiceluloses são componentes estruturais que correspondem a até 30% em material seco. Estes polissacarídeos podem ser considerados matéria-prima para produção de compostos de maior valor agregado. As hemiceluloses apresentam uma alta organização estrutural com a celulose e lignina na parede celular vegetal, sendo necessário um processo químico ou químico-físico para separar as frações lignocelulósicas. Além disso, a extração da porção de hemicelulose torna esse polissacarídeo mais acessível para ação de enzimas, podendo ser parcial ou totalmente hidrolisado.

As xilanases são enzimas produzidas em grande quantidade por fungos filamentosos, e são conhecidas pela sua capacidade de hidrolisar a xilana, principal componente da porção hemicelulósica. Após sua hidrólise enzimática, outros compostos de interesse industrial podem ser produzidos, via fermentação, ação enzimática ou modificação química. A hidrólise enzimática das hemiceluloses dos resíduos para obtenção de produtos de maior valor agregado é considerada sustentável, pois não produz substâncias secundárias tóxicas ao ambiente. Porém o processo de extração das hemiceluloses necessita de melhorias que levem a maior rendimento de extração. A diversificação na fonte de biomassa pode ser uma vantagem, colaborando com aumento no rendimento de extração e diversidade no efeito prebiótico.

Entre os produtos derivados da xilana, os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligossacarídeos não digeríveis de baixa massa molecular compostos por unidades de xilose. Os XOS podem ser obtidos a partir da xilana de resíduos agroindustriais, através da hidrólise enzimática, ácida ou auto-hidrólise. Esses oligômeros possuem grande potencial prebiótico, diversas propriedades biológicas que promovem a saúde e características físico-químicas favoráveis que permitem que sejam adicionados em alimentos como ingredientes funcionais. Com aumento na preocupação por uma alimentação saudável, e popularização de alimentos funcionais, os XOS apresentam tendência de aumento de demanda.

Os métodos de produção de XOS a partir de resíduos lignocelulósicos têm sido amplamente estudados a fim de aumentar seu rendimento. A clivagem das ligações existentes entre os compostos que os constituem é relativamente de difícil controle, limitando a sua produção. A fim de eliminar essa limitação, estudos devem ser realizados para avaliar os melhores métodos e oportunidades de inovação nesta área.

Os XOS são os únicos prebióticos obtidos através de materiais lignocelulósicos atualmente no mercado e a Ásia tem sido o maior produtor comercial. Os XOS são utilizados como ingredientes funcionais no Japão, país cujas normas e cultura alimentar diferem das da América do Norte e Europa. A produção estimada de xilo-oligossacarídeos no mundo em 1995 foi de cerca de 300 toneladas, sendo que mais da metade foi consumida no Japão, e o faturamento no mercado foi de aproximadamente 10 bilhões de yen. Já o mercado europeu de prebióticos, foi projetado para atingir U\$ 179 milhões em 2010 (FAO, 2007). No ano de 2018, o valor de mercado dos XOS foi da ordem de US\$ 30-50 para cada quilograma de produto, sendo que o valor do produto varia em função de sua pureza.

Tendo em vista o aumento da demanda por alimentos que previnem doenças e promovem a saúde, essa pesquisa foi realizada com objetivo de obter compostos de alto valor agregado a partir de um resíduo agrícola (pseudocaule de bananeira), os xilo-oligossacarídeos. Ainda, avaliar seu efeito estimulador de microrganismos benéficos, como *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, e inibidor de patógenos, como *Escherichia coli*, ou seja, sua atividade prebiótica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

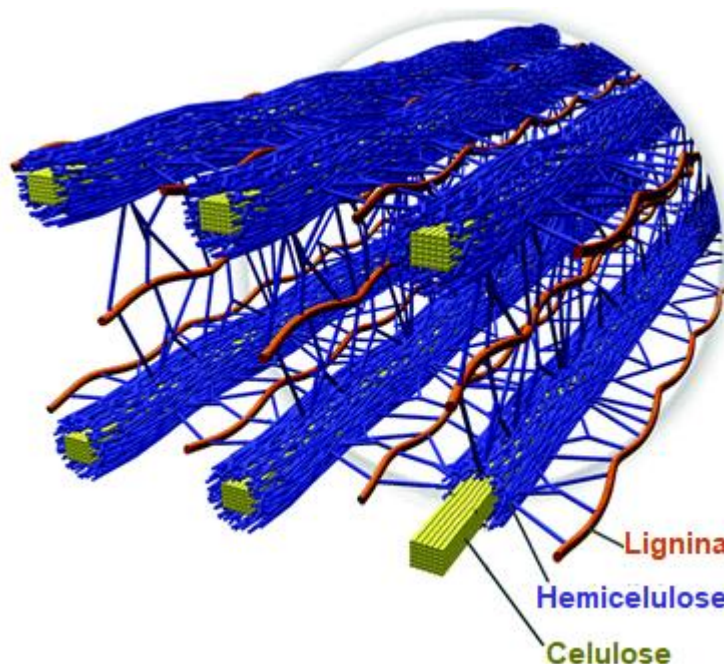
2.1. Resíduos agroindustriais

Atualmente, devido ao crescimento das atividades agroindustriais, mundialmente são gerados milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos por ano, a maior fonte de biomassa do mundo, amplamente disponível e renovável. Essa biomassa é considerada um resíduo de baixo custo e muitas vezes pode gerar prejuízo considerável às atividades econômicas do setor agroindustrial, através do desperdício de insumos e pela necessidade de descarte adequado, e ao meio ambiente. Em contato com corpos hídricos, a grande quantidade dessa matéria orgânica pode diminuir a concentração de oxigênio presente na água e causar a morte de espécies aquáticas (FORSTER-CARNEIRO et al., 2013; BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015).

Nesse contexto, biomassa pode ser definida como “toda matéria orgânica de origem vegetal ou animal, que é produzida na natureza ou ecossistemas conduzidos (agricultura, aquacultura, silvicultura), industrialmente transformados ou não” (NIGAM; PANDEY, 2009). A lignocelulose é o maior componente estrutural da biomassa vegetal, correspondendo cerca de metade da matéria da planta produzida através da fotossíntese, e representando a fonte orgânica renovável mais abundante no solo (MADEIRA JUNIOR et al., 2017). A biomassa lignocelulósica é composta de cadeias de celulose unidas/organizadas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses e ligninas. Esses três componentes estão fortemente entrelaçados e organizados (OGEDA; PETRI, 2010).

A celulose, principal constituinte estrutural da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo composto por moléculas de D-glicose, unidas através de ligações O-glicosídicas do tipo β -1,4. Em função da linearidade de sua cadeia, as moléculas de celulose se agregam dando origem às fibras, que são embebidas por uma matriz composta por hemicelulose e lignina (OGEDA; PETRI, 2010; BALAT, 2011). A lignina é um composto complexo e aromático, formado basicamente de unidades de fenilpropano. Essa molécula confere rigidez e resistência mecânica à parede celular vegetal, e impermeabilidade em vasos condutores. Na estrutura da célula vegetal (**Figura 1**), a lignina está ligada aos grupos laterais das hemiceluloses através de ligações covalentes, formando uma matriz complexa que envolve as fibras de celulose (RODRIGUES et al, 2010; FIGUEIREDO, 2016).

Figura 1. Estrutura da biomassa vegetal mostrando a organização entre celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: Adaptado de Santos et al, 2012

A composição e proporção desses compostos varia não apenas de acordo com o tipo de planta, mas também com as condições de crescimento, parte do vegetal escolhida e idade da planta (OGEDA; PETRI, 2010). Geralmente, na maioria das fibras vegetais, as porções de celulose e hemicelulose representam entre 40-50% e 15-30% da massa seca das plantas, respectivamente. Esses polissacarídeos podem ser clivados em seus monômeros através de hidrólise. Já a lignina pode representar cerca de 10-30% da massa da biomassa (WYMAN et al, 2005; FILHO, 2011).

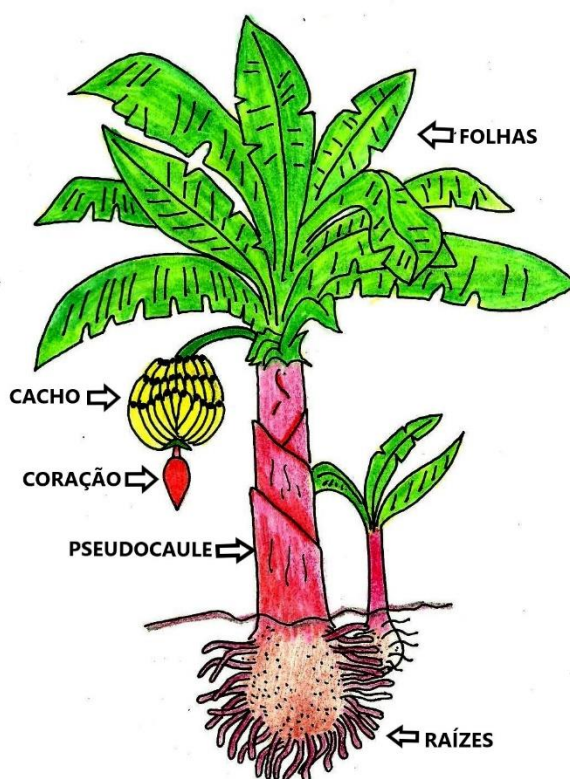
Nos últimos anos, o interesse pela utilização de resíduos agroindustriais tem aumentado, o que tem resultado em um importante estímulo ao estudo de novos materiais, compostos químicos e energia. Além disso, muitos bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando esses resíduos como substratos para a produção de moléculas de alto valor agregado. Dessa forma, uma extensa gama de produtos valiosos e de interesse industrial têm sido recuperados do que anteriormente era considerado resíduo. Esses estudos englobam uma grande área da biotecnologia microbiana com muitas possibilidades de pesquisa e cujas descobertas têm demonstrado enorme potencial prático e econômico (MADEIRA JUNIOR et al., 2017).

O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis capazes de converter biomassa em vários produtos, com maior valor agregado, é importante para aproveitar resíduos agroindustriais e gerar menor impacto ambiental (ROSA et al, 2011). Embora parte destes resíduos seja utilizada para produção de energia e alimentação animal, muitas pesquisas visam novas aplicações para o melhor aproveitamento destes materiais (BRIENZO, 2010).

2.2. Pseudocaule de bananeira

Dentre os resíduos agroindustriais, o pseudocaule de bananeira é produzido em grande quantidade através da cultura da banana no Brasil, o qual é o terceiro maior produtor dessa fruta no mundo (EMBRAPA, 2016). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na safra de 2016 foram produzidas 6,9 milhões de toneladas de bananas, sendo assim a segunda fruta de maior produção no país e, as regiões nordeste e sudeste são as maiores produtoras, responsáveis por cerca de 60% dessa produção.

O pseudocaule de bananeira (**Figura 2**) é o “caule” da planta de banana, o qual produz um único cacho de banana. É constituído por superposições das bainhas das folhas, as quais nascem enroladas e se abrem gradativamente. Sucessivamente vão aparecendo folhas dispostas em forma helicoidal e em conjunto, formando o que recebe, com frequência, o nome de tronco da bananeira, mas que na verdade é um pseudocaule. Possui o formato cilíndrico, reto e rígido, podendo medir de 1,2 a 6,0 metros de altura por 15 a 50 centímetros de diâmetro, e sua cor pode variar de verde brilhante a roxo pardo, dependendo da espécie (MEDINA, 1990; COELHO et al., 2001; FERIOTTI, 2010; MA, 2015).

Figura 2. Estrutura da bananeira

Fonte: Adaptado de: <http://franhelsopiguatuagricola.blogspot.com.br/2011/09/desenho-da-planta-de-bananeira.html>

Em relação a sua composição química, o pseudocaule de bananeira apresenta umidade de aproximadamente 96% e seu conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina pode variar dependendo da espécie, como está apresentado em relação a massa seca na **Tabela 1**.

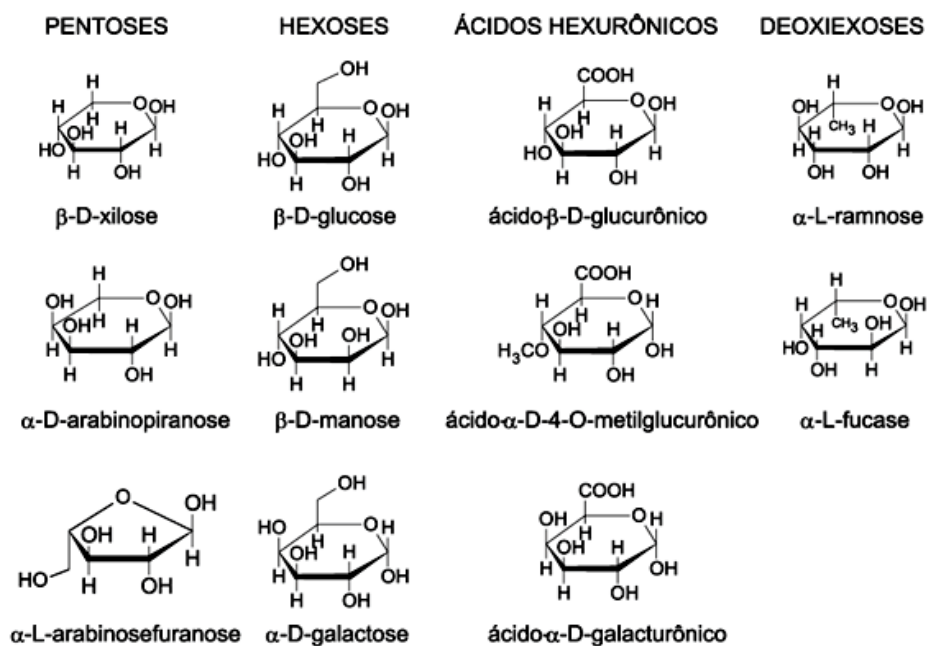
Tabela 1. Composição química percentual em massa seca do pseudocaule de bananeira.

Pseudocaule de bananeira	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Pseudocaule <i>Musa cavendishii</i>	37,1	12,6	13,3	Oliveira et al. (2007)
Pseudocaule <i>Musa acuminata</i>	34,5	25,6	12,0	Cordeiro et al. (2004)
Pseudocaule <i>Musa sapientum</i>	53,5	15,9	11,7	Roja & Neves. (2002)

Após a colheita das bananas, uma grande quantidade de resíduos é gerada, pois cada bananeira não pode ser reutilizada para a próxima colheita. Sendo assim, para cada tonelada de banana produzida no país, são geradas aproximadamente 3 toneladas de pseudocaule, que geralmente são abandonados no solo. Este material sofre decomposição no solo, liberando sulfeto de hidrogênio e gás amônia em grandes quantidades, que podem causar poluição ambiental. Portanto, a exploração desse resíduo para produzir compostos de maior valor agregado é benéfica para o ambiente, além de gerar produtos de interesse para o consumo humano e animal (LI et al, 2010; IDREES et al, 2013; DINIZ et al, 2014).

2.3. Hemiceluloses (xilana)

As hemiceluloses (polioses) são o segundo componente mais abundante na biomassa lignocelulósica, sendo o primeiro a celulose. Diferentemente da celulose, as hemiceluloses podem ser homopolissacarídeos ou hetero-polissacarídeos. Essas moléculas são formadas por unidades de piranose e furanose, incluindo D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-glicose. Além disso, as hemiceluloses podem apresentar cadeias laterais ou grupos pendentes constituídos de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses (**Figura 3**), os quais são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e em álcalis. Diferentes composições e estruturas de hemicelulose podem ser obtidas de diferentes fontes de biomassa (MENEZES, 2007; LADEIRA, 2013; FARHAT et al., 2017).

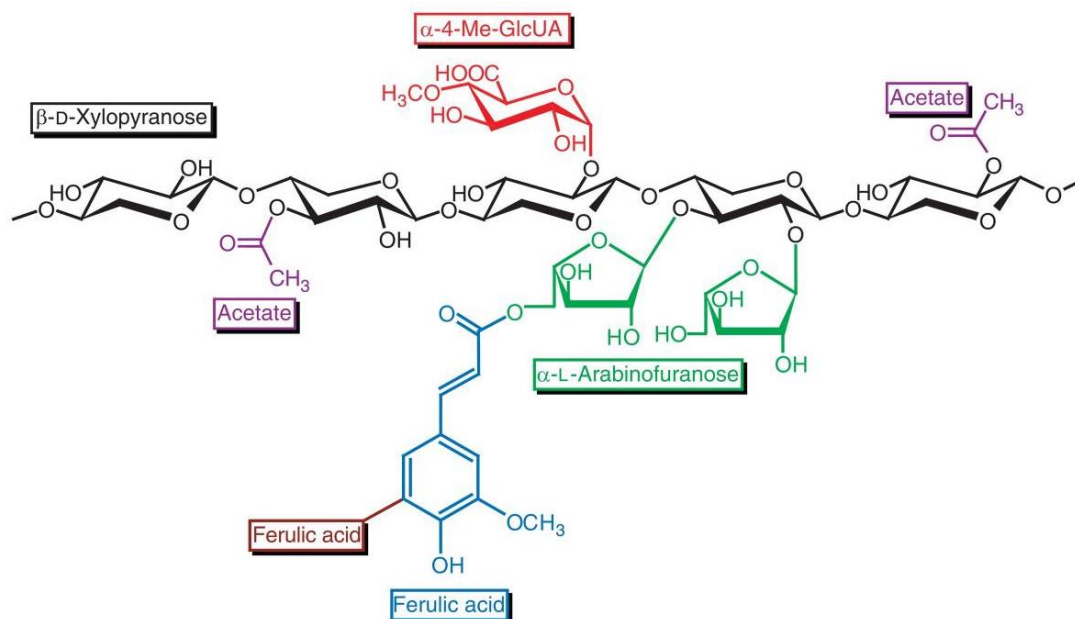
Figura 3. Carboidratos que compõem as unidades da hemicelulose.

Fonte: OGATA, 2013

As hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com o principal monossacarídeo presente na sua composição como por exemplo xilana e manana, formados por xilose e manose, respectivamente. Diferentes subclasses de hemicelulose podem ser encontradas, dependendo da espécie vegetal, do estágio de desenvolvimento e do tipo de tecido. As hemiceluloses têm função de estabilizar a parede celular através de pontes de hidrogênio com a celulose e de ligações covalentes com a lignina (WYMAN et al, 2005). A xilana é o polissacarídeo mais abundante nas hemicelulose de gramíneas, sendo assim a hemicelulose com maior incidência em resíduos agrícolas e agroindustriais (GÍRIO et al, 2010).

A xilana é um polissacarídeo cuja estrutura apresenta uma cadeia composta de resíduos de D-xilose ligados através de ligações β -1,4. Além disso, a cadeia da xilana pode apresentar ramificações que contém α -L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, e ainda ácidos ferúlicos (**Figura 4**). Xilanas isoladas de diferentes plantas apresentam a mesma estrutura principal composta por resíduos de xilose, sendo diferenciados pelos resíduos ramificados ou grupos pendentes. (MADEIRA JUNIOR et al, 2017; ÁLVAREZ et al, 2017).

Figura 4. Estrutura geral mostrando as ramificações que podem ser encontradas em uma variedade de xilanas isoladas da parede celular de plantas (CANN; DODD, 2009).



Essas macromoléculas possuem massa molecular relativamente alta de 10.000 Da a 40.000 Da, um grau de polimerização de 100-200 e são principalmente encontradas nas paredes primária e secundária da planta (DEUTSCHMANN; DEKKER., 2012). O grau de polimerização, o grau de ramificação e os monossacarídeos que compõem as cadeias laterais determinam em grande parte as propriedades biológicas da xilana e seu uso na indústria (CANTU-JUNGLES et al., 2017).

As hemiceluloses presentes nos resíduos agrícolas, principalmente a xilana, apresentam grande potencial econômico e têm encontrado cada vez mais aplicações. Possibilidades para seu uso consistem na sua extração para convertê-la em produtos como prebióticos (xilooligosacarídeos), outros polímeros como xilofane, compostos de aplicação química e farmacêutica, e açúcares fermentáveis para a produção de etanol (MCKENDRY, 2002; BRIENZO, 2010; ZHANG et al, 2016).

As hemiceluloses se ligam covalentemente com a lignina e ambas estão entrelaçadas (interações físicas) com a celulose na parede celular vegetal. Portanto, é um desafio separá-las sem uma mudança significativa em sua estrutura. Para separar essas moléculas é necessário um tratamento ou pré-tratamento para romper as ligações

químicas (SUN et al, 2004; BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; CASTRO, 2009).

2.4. Extração da hemicelulose

A extração da hemicelulose da biomassa é uma etapa essencial para a produção de uma ampla variedade de produtos de maior valor agregado. A hidrólise enzimática da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica é limitada pela organização com os demais componentes como celulose e lignina. Além disso, a solubilização dos componentes lignocelulósicos depende de fatores do processo, como concentração de reagentes, da temperatura, concentração de sólidos e agitação (YILMAZ, 2012).

Diferentes métodos têm sido utilizados para isolar a hemicelulose da biomassa lignocelulósica. Esses métodos incluem pré-tratamentos com ácido diluído, extração alcalina, explosão a vapor, entre outros (FARHAT et al, 2017). Através do tratamento com ácido diluído, a hemicelulose é fracionada em oligossacarídeos ou monossacarídeos, uma vez que o ácido cliva as ligações glicosídicas da cadeia de xilana. A quebra da cadeia de xilana é aleatória e depende do tipo de ácido e da concentração utilizada, além de condições como tempo de reação e temperatura (BRIENZO et al, 2016).

A explosão a vapor é um método hidrotérmico que modifica a estrutura do material lignocelulósico solubilizando oligômeros e monômeros de xilose. A biomassa é submetida a um vapor saturado em alta pressão e temperatura, o sistema é rapidamente despressurizado causando a desestruturação do material. Durante este processo térmico, a maioria das hemiceluloses é solubilizada, mas o conteúdo de hemicelulose e sua composição de ramificação determinam a sua estabilidade. Este tratamento é usado principalmente em biomassa com maior teor de xilana, como resíduos agroindustriais (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; PALM; ZACCHI; 2003).

Dentre os diferentes métodos que podem ser utilizados para isolar a hemicelulose, a extração alcalina é bem estudada e conhecida como um método eficiente. As pontes de hidrogênio entre celulose e hemicelulose são rompidas através dos íons hidróxidos presentes nos reagentes alcalinos, solubilizando o material hemicelulósico. A extração alcalina também libera as hemiceluloses clivando as ligações éster entre a lignina e a hemicelulose, removendo a lignina sem degradar os demais componentes. A eficácia deste tratamento dependerá do teor de lignina na biomassa (FARHAT et al, 2017).

Solventes orgânicos, como o etanol, também têm grande potencial para isolar hemiceluloses, pois são capazes de precipitar os polissacarídeos da biomassa, separando-os da lignina em um processo de purificação parcial. No entanto, este tratamento deve ser usado após a separação da celulose. Através deste tratamento, grande parte da hemicelulose pode ser recuperada, permanecendo em solução até a precipitação com etanol (PENG et al, 2012).

As condições ótimas da extração de hemicelulose dependem estritamente das características de cada matéria-prima, principalmente sua composição química, bem como do propósito final do próprio processo. Independentemente do método de extração, após sua separação dos demais componentes da biomassa lignocelulósica, a hemicelulose deve estar em condições desejáveis/qualidades específicas, para poder ser empregada na conversão em novos produtos.

2.5. Xilanases

A parede celular das plantas é composta por polissacarídeos compostos por unidades de açúcares unidas através de ligações glicosídicas. As enzimas responsáveis pela clivagem dessas ligações são chamadas de glicosil hidrolases (GH) e podem ser produzidas por diversos micro-organismos (DODD; CANN, 2009).

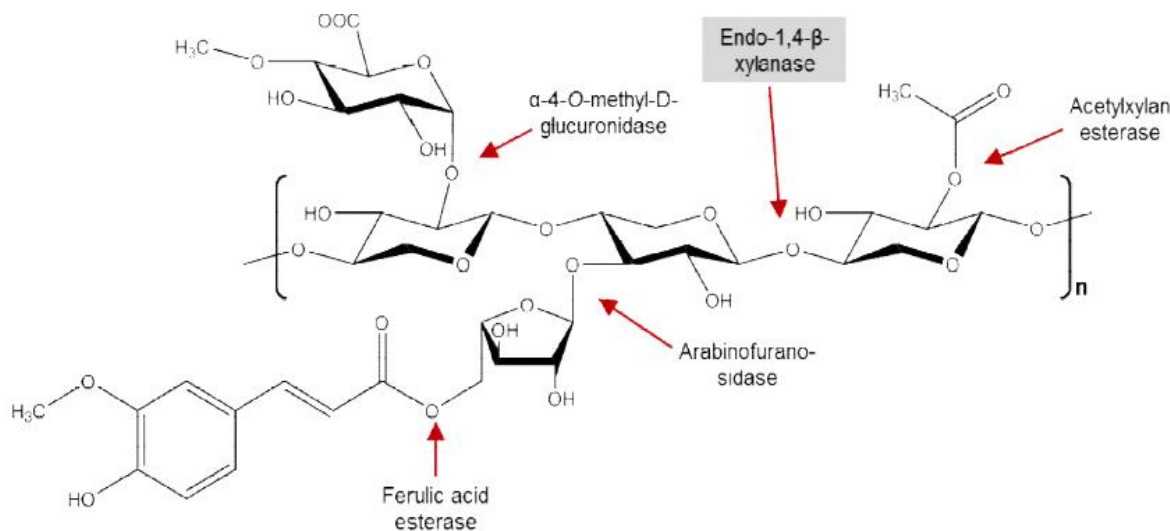
As principais enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia de xilana são as endo-1,4- β -xilanases e β -xilosidades (GOSWAMI; RAWAT, 2015). As xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal da xilana, reduzindo seu grau de polimerização (POLIZELI et al., 2005). Dentre o complexo de enzimas que realizam a hidrólise da xilana, as de maior importância são as endoxilanases. (BATTAN et al, 2007). As endo- β -1,4-D-xilanases (EC 3.2.1.8) agem sobre a cadeia principal de xilana e os produtos formados pela sua ação são xilo-oligossacarídeos, já as β -xilosidades (EC 3.2.1.37) são enzimas que hidrolisam xilobiose e xilo-oligômeros de cadeia curta, liberando unidades de xilose. (COLLINS et al, 2005; SOMERA et al, 2009).

Geralmente, as endoxilanases apresentam seu pico de máxima/ótima atividade entre 40 a 80°C e com pH entre 4,0 e 6,5. Porém condições ótimas fora dessa faixa podem ser encontradas na literatura. A molécula de xilana não é hidrolisada de forma aleatória, os sítios selecionados dependem da natureza da molécula do substrato, do tamanho da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes. Inicialmente, o principal

produto da hidrólise são oligômeros de xilose, porém mono, di ou trissacarídeos de xilose podem ser produzidos (POLIZELI et al, 2005; BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016).

Contudo, para que uma molécula de xilana seja completamente e eficientemente hidrolisada a xilose, são necessárias enzimas acessórias para clivar as diversas cadeias laterais/pendentes da molécula (**Figura 5**). Algumas dessas enzimas que atuam em conjunto com as xilanases são as acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), que removem os grupos O-acetil, e as ferulosil esterases (EC 3.1.1.73) que hidrolisam as ligações ésteres do ácido ferúlico nas cadeias laterais da xilana. Além disso, as glucuronidases (EC 3.2.1.139) hidrolisam as ligações α -1,2 do ácido glucurônico com os resíduos de xilose, e as α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que removem os resíduos de L-arabinoses substituídos na estrutura da xilana (DODD; CANN, 2010).

Figura 5. Estrutura da xilana e sítios de ataque das enzimas xilanolíticas e acessórias.



Fonte: KALIM et al, 2015.

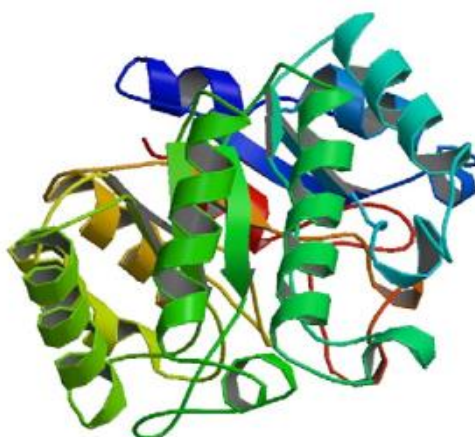
As glicosil hidrolases (GH) estão classificadas em famílias, sendo a maioria das xilanases mais estudadas pertencentes as famílias 10 e 11. As enzimas pertencentes a essas famílias se diferem quanto a suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade ao substrato. As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e hidrolisam as frações de xilana e celulose da parede, enquanto que as da família 11 são menores e altamente específicas, hidrolisando apenas a xilana. Por este

motivo, as xilanases da família 11 têm se mostrado bastante interessantes e de potencial biotecnológico, principalmente, para uso industrial. Além disso, as xilanases de ambas famílias são capazes de manter a atividade catalítica em temperaturas de 60°C a 80°C ou superiores, representando um nicho de interesse comercial, pois muitos dos processos onde as mesmas são empregadas devem ocorrer em altas temperaturas (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012; CENSONI, 2013).

A família GH10 é composta por endo-1,4- β -xilanases e endo-1,3- β -xilanases (EC 3.2.1.32). Essas enzimas são altamente ativas em xilo-oligossacarídeos de cadeias menores, indicando um sítio ativo pequeno. Análises estruturais, análises cinéticas da atividade em xilo-oligossacarídeos de vários tamanhos e análises do produto final da hidrólise indicaram que as xilanases da família 10 possuem de quatro a cinco sítios ativos. As enzimas pertencentes a essa família geralmente possuem massa molecular elevada, baixo ponto isoelétrico e uma estrutura formada por dobramento α/β barril (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

A família GH11 é composta apenas por xilanases (EC3.2.1.8), enzimas que são exclusivamente ativas na presença de substrato que contém D-xilose. São geralmente caracterizadas por um alto ponto isoelétrico, baixa massa molecular e sua estrutura está representada na **Figura 6** (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013).

Figura 6. Estrutura tridimensional de xilanase da família GH11 produzida por *T. auranticus* (JUTURU; WU, 2012)



As xilanases são produzidas principalmente por micro-organismos, e dentre eles, fungos filamentosos, bactérias terrestres e marinhas, mas também podem ser produzidas por algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos e insetos. Geralmente, a produção de xilanases é induzida pela maioria dos micro-organismos durante o seu crescimento em substratos contendo xilana (PASTOR et al, 2007).

Dependendo do organismo, as enzimas podem permanecer no interior da célula, na membrana celular ou ser secretada para fora da célula, para o meio extracelular (PRADE, 1995). Dentre as fontes microbiológicas, os fungos filamentosos são especialmente interessantes para a produção dessas enzimas, pois têm a vantagem de produzi-las de forma extracelular e em quantidade maior que leveduras e bactérias (POLIZELI et al., 2005; LADEIRA, 2013; GOSWAMI; RAWAT, 2015).

A produção das xilanases depende principalmente do tipo de substrato no meio de cultura, sendo que a maioria dos micro-organismos são capazes de produzir essa enzima utilizando a xilana como principal fonte de carbono. Porém, ao utilizar a celulose como substrato, alguns micro-organismos produzem ambas xilanases e celulasas, o que ocorre devido a presença de traços de hemicelulose nos substratos celulósicos (GOSWAMI; RAWAT, 2015). Substratos alternativos como bagaço de cana-de-açúcar, cascas de arroz, resíduos de madeira, entre outros, têm se mostrado eficiente para a produção dessas enzimas (MICHELIN, 2015).

As xilanases são enzimas produzidas através da expressão de genes indutíveis, ou seja, essas enzimas só serão produzidas pelo micro-organismo na presença de xilana, ou melhor, na presença de xilo-oligossacarídeos indutores. A molécula de xilana não é capaz de penetrar na célula microbiana, pois possui uma estrutura polimérica. Geralmente, fragmentos menores como xilooligossacarídeos de baixa massa molecular, são formados pela ação de pequenas quantidades de xilanases constitutivas secretadas no meio extracelular, e são transportados para dentro da célula, através de permeases, induzindo a expressão dos genes envolvidos na síntese de xilanases (ARO et al., 2005; COLLINS et al., 2005). O nível de resposta de indução da síntese de xilanase em fungos filamentosos varia para cada micro-organismo. Um mesmo substrato pode induzir a produção de xilanase em uma espécie, e inibir sua produção em outra espécie (FILHO, 2004; TERRONE, 2013).

O processo que controla a produção enzimática extracelular de acordo com a fonte de carbono presente no meio é influenciado pela disponibilidade de precursores para a

síntese dessa proteína. Baixas taxas de carbono e nitrogênio no meio podem ser uma das estratégias para uma produção de xilanases livre de celulasas, porém para alguns micro-organismos, a presença de substratos celulósicos no meio é essencial para a máxima produção de xilanases (BRIENZO; MONTE; MILAGRES, 2012; GOSWAMI; RAWAT, 2015).

Estudos recentes demonstram que o uso biotecnológico de enzimas xilanases têm sido cada vez maior nas últimas décadas. As xilanases começaram a ser utilizadas nos anos 1980 na preparação de ração animal, e posteriormente começaram a ser aplicadas no setor de alimentos, têxtil e na indústria de papel e celulose. Por conta disso, o mercado dessas enzimas tem crescido significativamente ao longo dos últimos anos (KALIM et al, 2015; KUMAR et al, 2017; BALA; SINGH, 2018; CHEN et al., 2019).

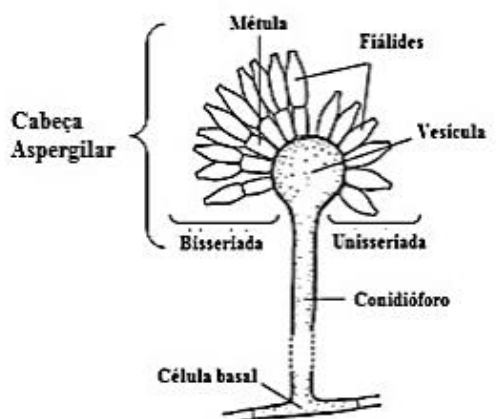
Um uso importante dessa enzima é para o branqueamento da polpa de celulose nas indústrias de papel, colaborando com a etapa posterior de eliminação dos resíduos de lignina presentes (BARLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016). Elas também são utilizadas nas rações animais, pois aumentam sua digestibilidade diminuindo a viscosidade no trato intestinal e aumentando a absorção dos nutrientes. Na panificação, elas podem ser adicionadas para aumentar o volume dos pães e melhorar seu sabor final. Na indústria da cerveja e no processamento de sucos, essas enzimas têm sido utilizadas para reduzir a formação da turvação solubilizando as arabinoxilanas de cadeia longa (POLIZELI et al, 2005). As xilanases em sinergia com outras hemicelulasas e celulasas também podem ser utilizadas para a geração de biocombustíveis, a partir da biomassa lignocelulósica pré-tratada (KUMAR et al, 2017). Outra aplicação interessante é o uso dessas enzimas para produção de xilo-oligossacarídeos, por meio da hidrólise da xilana (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009; BRIEZO et al., 2017). Esses incomuns oligossacarídeos são considerados fibras alimentares solúveis já que se comportam de forma similar a elas no organismo humano, apresentando atividade prebiótica e favorecendo a melhora das funções intestinais. A conversão enzimática da xilana em XOS é preferida pela indústria alimentícia por conta dos problemas relacionados às tecnologias químicas (CARVALHO et al, 2013).

2.6. Gênero *Aspergillus* e espécie *Aspergillus versicolor*

O gênero *Aspergillus* possui espécies comuns e muito difundidas no ambiente, onde crescem geralmente na superfície. É definido como um grupo de fungos conidídeos, ou seja, fungos assexuados. As espécies desse gênero são altamente aeróbicas e são encontradas em quase todos os ambientes ricos em oxigênio. Esses fungos crescem em substratos ricos em carbono, como monossacarídeos (glicose) e polissacarídeos (amido), mas também podem se adaptar e crescer em ambientes deficientes em nutrientes ou com falta de nutrientes essenciais. As espécies de *Aspergillus* são contaminantes comuns de alimentos amiláceos, como pão e batata, e também podem ser encontrados em muitas plantas (BAKER; BENNETT, 2007).

A morfologia é uma parte importante na identificação de espécies, principalmente das espécies do gênero *Aspergillus*, sendo feita através da observação da tipologia da colônia e da morfologia dos conídios e conidióforos (**Figura 7**). A cabeça aspergilar situa-se no topo de um conidióforo que se dilata na sua extremidade formando a vesícula. As células produtoras de esporos (fiálides) são suportadas diretamente pela vesícula ou por uma camada de células estéreis chamadas métula. As fiálides podem cobrir toda a vesícula ou apenas o seu topo, sendo a sua disposição uma característica essencial na identificação morfológica das diferentes espécies de *Aspergillus*. A partir da extremidade das fiálides, surgem os conídios cujas dimensões são variáveis dependendo da espécie. Na base dos conidióforos, sustentados por uma célula basal, encontram-se as hifas (FRANCISCO, 2017).

Figura 7. Representação esquemática da morfologia de *Aspergillus* spp.

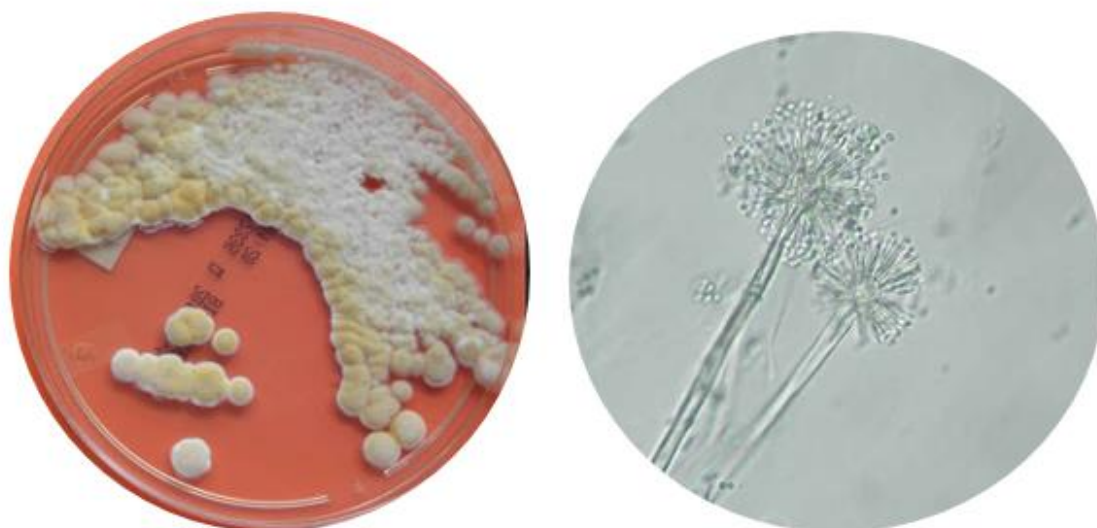


Fonte: VALENTE, 2014.

Entre os cientistas que trabalham com esse gênero de fungos, há uma contínua fascinação pelo seu potencial biotecnológico, já que é capaz de produzir inúmeras enzimas extracelulares, que podem ser úteis em processos industriais, além de metabólitos secundários de importância biotecnológica. Essas características tornam muitas espécies desse gênero comercialmente importantes (MACHIDA; GOMI, 2010).

A espécie *Aspergillus versicolor* é comumente isolada do solo, detritos de plantas e ambientes marinhos (**Figura 8**). É um fungo altamente resistente, o que explica sua ampla distribuição global em diferentes condições ambientais (FOMICHEVA; VASILENKO; MARFENINA, 2006). Para seu crescimento, a condição ideal de temperatura é entre 22 e 28°C, porém estudos mostram que essa espécie pode crescer em uma faixa de temperatura de 4 a 40°C. Quanto ao pH, essa espécie pode tolerar uma ampla faixa, além de ser particularmente resistente a condições alcalinas. *A. versicolor* pode ser considerado osmófilo, ou seja, capaz de se desenvolver em ambientes com altas concentrações de açúcar (até 40%), além de também conseguir se adaptar a ambientes salinos (PASANEN et al., 1997; PITT; HOCKING, 1997).

Figura 8. Colônia e conidióforos característicos da espécie *Aspergillus versicolor*.



Fonte: TOMÉ, 2011

Apesar do *Aspergillus versicolor* ser produtor de sterigmatocistina, um precursor das aflatoxinas, a toxicidade desse composto é extremamente baixa. Este composto apresenta baixa solubilidade em água ou suco gástrico, tornando improvável que esse composto possa causar intoxicação no homem e em animais (PITT; HOCKING, 1997).

Dependendo as condições de cultivo, as colônias podem variar em cores e em taxa de crescimento. *A. versicolor* é caracterizado como fungo filamentosso anamorfo formador de conídios e tem se mostrado eficiente produtor de xilanases, mas produz baixos níveis de celulasas. Por outro lado, esta é uma característica interessante para algumas aplicações industriais, como a hidrólise da xilana presente em resíduos agroindustriais em produtos de maior valor agregado (CARMONA et al, 2005; ARAGON et al., 2013).

2.7. Hidrólise enzimática de xilana para a produção de XOS

A hidrólise enzimática é um processo amplamente estudado para materiais lignocelulósicos, já que a bioconversão de resíduos agroindustriais, pode gerar moléculas de maior valor agregado. Pode colaborar também com a redução do impacto ambiental causado pelo acúmulo de resíduos no ambiente. A hidrólise enzimática, ao contrário da hidrólise ácida, não apresenta reações secundárias ou formação de subprodutos, além disso as reações ocorrem de forma branda e não é necessária alta temperatura ou pressão (BRIENZO et al, 2016).

A hidrólise enzimática das hemicelulose em geral é um processo de reação catalítico complexo de duas fases sólido-líquido, em que as enzimas são adsorvidas da fase líquida para o substrato sólido. As enzimas adsorvidas catalisam a hidrólise do substrato insolúvel na fase sólida, simultaneamente com as enzimas dissolvidas, que catalisam a hidrólise do substrato solúvel na fase líquida. A hidrólise da fase sólida consiste na adsorção da enzima na superfície do substrato, nas mudanças conformacionais e na formação de um complexo pela interação eletrostática, além da quebra de ligações e solubilização de xilo-oligossacarídeos de cadeia curta na fase líquida (DUTTA; CHAKRABORTY, 2015).

A molécula de xilana apresenta uma grande variedade de ligações e tipos de ramificações. Estruturas complexas estão interligadas por ligações covalentes e iônicas, fornecendo uma barreira física, que limita a ação de algumas enzimas, pois para que a

reação ocorra, é necessário um contato direto entre enzima e substrato. A hidrólise enzimática completa da xilana requer um consórcio de enzimas, que agem nas ramificações da molécula e/ou nas ligações glicosídicas internas (SANT'ANNA; DE SOUZA; BRIENZO, 2014; MOREIRA; FILHO, 2016).

A estrutura do substrato, influenciada pelas características do material e as interações da enzima com esse substrato, que depende da natureza e origem do complexo enzimático, são fatores que podem influenciar na eficiência da hidrólise enzimática. Outro fator que deve ser levado em consideração é a heterogeneidade do material lignocelulósico. Por essa razão, para melhor ação da enzima é necessário o isolamento dos polissacarídeos de interesse (BRIENZO et al, 2016).

A produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) pode ser realizada em duas etapas (**Figura 9**). Primeiramente, as hemiceluloses presentes no material lignocelulósico devem ser isoladas por exemplo através da extração alcalina. Os íons hidróxido presentes nos reagentes alcalinos quebram as ligações de hidrogênio entre a celulose e as hemiceluloses, solubilizando a porção de hemicelulose do material. Além disso, a extração alcalina libera as hemiceluloses rompendo as ligações éster com a lignina, removendo-as com pouca degradação das outras macromoléculas (FARHAT et al, 2017). A etapa seguinte é a hidrólise enzimática da xilana extraída, que deve ser realizada aplicando a enzima endo- β -1,4-xilanase, com pouca ou nenhuma atividade da enzima β -xilosidase, tendo em vista que o objetivo é a produção de oligômeros e não de monossacarídeos, como a xilose. Entretanto, xilanases com diferentes especificidades por substratos geram diferentes produtos de hidrólise, não havendo possibilidade de controlar o grau de polimerização dos XOs produzidos (AKPINAR et al, 2010).

Figura 9. Representação esquemática da produção de xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de SAMANTA et al., 2015

As xilanases agem sobre a cadeia principal da xilana, gerando XOS de baixo grau de polimerização. Para a completa hidrólise da hemicelulose, enzimas acessórias que agem nas ramificações das cadeias são necessárias, e a presença ou ausência delas pode gerar XOS com ou sem ramificações. Xilo-oligossacarídeos ramificados podem ser produzidos, através da hidrólise enzimática sem a presença de enzimas acessórias. As ramificações podem influenciar a taxa de hidrólise da xilana, que depende da quantidade de grupos pendentes ou ramificações (PUCHART; BIELY, 2008; BRIENZO et al, 2016).

As endoxilanases das famílias GH 10 e GH 11 se diferem quanto à especificidade pelo substrato. Aquelas da família GH 10 são menos específicas à xilana como substrato e são capazes de hidrolisar formas substituídas da cadeia de xilana, produzindo oligossacarídeos que contém substituintes no terminal não redutor da molécula. As

endoxilanases da família GH 11, conhecidas como xilanases verdadeiras, são restritas à hidrólise da xilana e agem em regiões não ramificadas do polissacarídeo. Sendo assim, as endoxilanases da família GH 10 produzem XOS com menor grau de polimerização que as da família GH 11. (MOREIRA; FILHO, 2016).

As condições de hidrólise enzimática da xilana em xilo-oligossacarídeos devem ser otimizadas a fim de se obter um bioprocessamento mais econômico, visando maior rendimento. Alguns aspectos microbiológicos e bioquímicos da hidrólise enzimática pelas endoxilanases podem influenciar a produção de xilo-oligossacarídeos, e por esse motivo, alcançar a concentração da enzima e do substrato, tempo de reação e temperatura ideais são necessárias para otimização desse bioprocessamento. Além disso, a ausência de β -xilosidades é importante para obtenção de maior concentração de XOS e pouca conversão destes em xilose (CARVALHO et al., 2013; BRIENZO et al., 2016).

2.8. Bactérias probióticas

O conceito de probióticos foi proposto em 1908, quando Elie Metchnikoff observou que a ingestão de alimentos fermentados, particularmente por bactérias lácticas, provocava efeitos benéficos sobre a saúde humana, promovendo longevidade. Desde então, vários estudos confirmaram o impacto positivo de cepas probióticas na saúde do hospedeiro. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde de seu hospedeiro quando administrados em quantias adequadas (CREMON et al, 2018).

Uma ação benéfica das bactérias probióticas é o “efeito barreira”, mecanismo de competição usado por essas bactérias para garantir sua sobrevivência, impedindo o crescimento de micro-organismos ingeridos recentemente pelo hospedeiro, incluindo patógenos. Portanto, pode-se presumir que esse mecanismo de proteção utilizado pelas bactérias probióticas, aumenta o número relativo de bactérias benéficas presentes na microbiota intestinal (KERRY et al, 2018). Quaisquer alterações na diversidade dessa microbiota, podem resultar em vários transtornos ou doenças, para os quais medicamentos convencionais proporcionam eficácia limitada devido ao surgimento de micro-organismos patogênicos tolerantes a antibióticos (PAMER, 2016).

Os probióticos também estimulam, modulam e regulam a resposta imune do hospedeiro, iniciando a ativação de genes específicos de células hospedeiras localizadas

no trato intestinal. Estes micro-organismos desempenham papel significativo na regulação da inflamação aguda e crônica da mucosa intestinal causada pela progressão da doença intestinal inflamatória, pois induzem a produção de uma proteína que estimula a formação de vasos sanguíneos. Além disso, modulam a liberação do hormônio gastrointestinal e possuem funções fisiológicas, que contribuem para o combate ao sobrepeso e obesidade (CHEN et al, 2013; KOBILIAK et al, 2016).

Lactobacillus e *Bifidobacterium* são os micro-organismos mais comuns utilizados como probióticos. Ambos os gêneros são gram-positivos, fazem parte do grupo de bactérias produtoras de ácido lático e são consideradas seguras como suplementos probióticos, sendo que suas culturas ativas geralmente são adicionadas em alimentos fermentados, como os iogurtes por exemplo (SINGH et al, 2011). Esses gêneros são diferentes de outros gêneros de bactérias pela maneira particular com que conseguem fermentar carboidratos das plantas e do leite, sendo benéficos para os seres humanos, que não conseguem digerir esses carboidratos em sua forma natural. A fermentação transforma esses carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta, os quais são a principal fonte de energia para as células locais. Porém, é importante notar que, apesar desses dois gêneros serem encontrados mais comumente no trato gastrointestinal humano, a microbiota é formada por centenas de espécies diferentes e o equilíbrio entre essas espécies é a chave para um trato gastrointestinal saudável (NGUYEN, 2018).

O uso de espécies de *Lactobacillus* para o tratamento e prevenção de doenças, bem como manutenção da saúde, não é recente. No entanto, nos últimos anos, houve uma renovação do interesse no uso de probióticos, em contraponto aos antibióticos, gerando centenas de pesquisas que relatam o uso de várias cepas de *Lactobacillus* como agentes probióticos (KOBILIAK et al, 2016). Em termos gerais, um grupo de requisitos foi identificado como propriedades importantes para os *Lactobacillus* serem considerados probióticos eficazes. Estes incluem a (I) capacidade de aderir às células; (II) eliminar ou reduzir a aderência patogênica; (III) persistir e multiplicar; (IV) produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas antagônicas ao crescimento de patógenos; (V) ser seguro e, portanto, não invasivo e não patogênico e (VI) coagregar e formar uma flora intestinal equilibrada (REID, 1999).

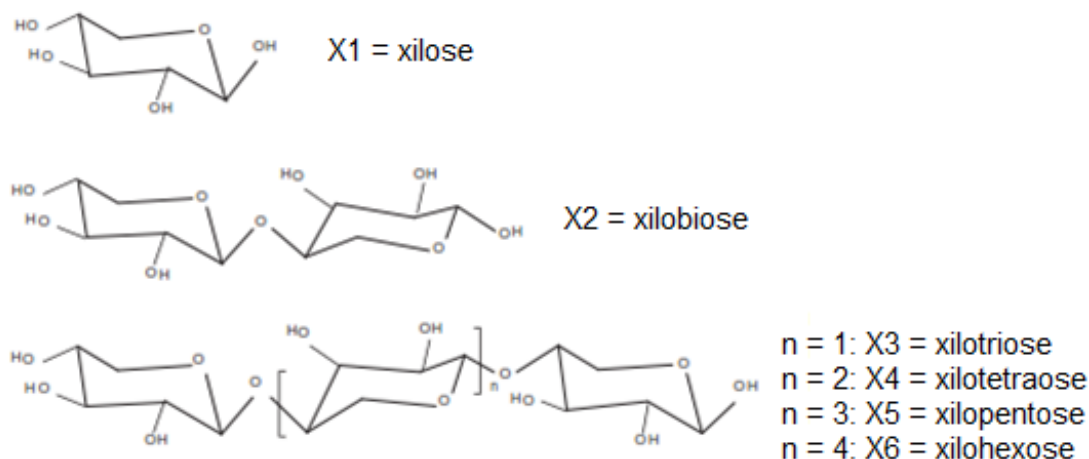
Os *Lactobacillus* têm sido amplamente usados comercialmente em muitos produtos lácteos, já que possuem alta tolerância a baixos pH, uma característica que permite a esses micro-organismos se deslocarem através do trato gastrointestinal e

sobreviverem às mudanças bruscas de pH no sistema intestinal (NGUYEN, 2018). Portanto, bactérias do gênero *Lactobacillus* estão presentes no trato gastrointestinal humano produzindo enzimas que degradam carboidratos e fermentando oligossacarídeos não-digeríveis e produzindo ácidos graxos de cadeia curta que promovem energia metabólica para o hospedeiro além de ajudar com a acidificação do intestino (MADHUKUMAR; MURALLIKRISHNA, 2011).

Os probióticos possuem importantes atributos funcionais que podem preencher a maioria dos requisitos básicos de suplementação nutricional humana. Em diversas pesquisas, estes micro-organismos demonstraram resposta positiva ao tratamento clínico contra várias doenças e distúrbios e, também apresentaram contribuição na prevenção e no tratamento de diabetes, obesidade e doenças relacionadas a micro-organismos patogênicos. Cada cepa probiótica possui funções particulares e específicas, avaliadas através de testes clínicos e nutricionais, porém todas elas devem apresentar a propriedade de segurança e utilidade como alimento e suplemento para a saúde humana (KERRY et al, 2018).

2.9. Xilo-oligossacarídeos e seu efeito prebiótico

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos por unidades de xilose ligadas através de ligações glicosídicas β -1,4. Podem ser encontrados em frutas, vegetais, leite, mel e também nos resíduos lignocelulósicos, os quais podem conter em torno de 25-50% de xilana em sua massa seca (SAMANTA et al, 2015). Variando a fonte de xilana para produção de XOS, suas estruturas também serão diferentes, bem como o grau de polimerização, ou seja, a quantidade de unidades monoméricas (**Figura 10**). As xilanas geralmente apresentam grupos laterais em suas cadeias, como resíduos de arabinofuranosil e grupos acetil, o que pode levar a formação de XOS com diversas propriedades biológicas (AACHARY; PRAPULLA, 2010).

Figura 10. Estrutura esquemática da xilose e xilo-oligossacarídeos.

Fonte: CARVALHO et al. (2013).

Um prebiótico pode ser definido como um “ingrediente seletivamente fermentado que resulta em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios sobre a saúde do hospedeiro” (GIBSON et al., 2010). Para ser considerado um prebiótico, o composto deve resistir aos processos de digestão, absorção e adsorção do hospedeiro, ser fermentável pela microbiota presente no sistema gastrointestinal e seletivamente estimular o crescimento e atividade de pelo menos uma das bactérias probióticas presentes no trato gastrointestinal (PETROVA; PETROV, 2017).

Os xilo-oligossacarídeos possuem características físico-químicas favoráveis principalmente para indústrias alimentícias, como resistência ao calor, estabilidade em condições ácidas e baixo valor calórico (XUE et al, 2016). Considerados prebióticos, XOS não são degradados no estômago, chegam intactos no intestino graças a ausência de enzimas capazes de realizar a hidrólise ligações do tipo β no corpo humano e promovem a proliferação de microrganismos benéficos. A atividade biológica dos XOS irá depender do seu grau de polimerização, aqueles que possuem de duas a doze unidades monoméricas possuem aplicações prebióticas pois promovem a proliferação de bactérias benéficas no trato intestinal humano (CARVALHO et al., 2013).

O principal efeito prebiótico dos XOS, ou seja, promover o crescimento de bactérias probióticas, está sendo estudado desde 1990 e desde então resultados têm mostrado que essas bactérias crescem mais eficientemente em xilose, xilobiose e

xilotetrose do que em outras fontes de carbono. Ainda, os XOS inibem o crescimento de várias bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Dentre as bactérias probióticas, aquelas que melhor respondem aos XOS são as do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, pois apresentam significativo aumento em seu crescimento (PETROVA; PETROV, 2017).

A propriedade prebiótica desses oligômeros é apenas uma das diversas propriedades biológicas que possui (CARVALHO et al., 2013). Essas bactérias utilizam seletivamente os XOS para seu crescimento resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta, o que está relacionado com a prevenção do câncer de cólon (CARVALHO et al., 2013). Além disso, XOS aumentam a biodisponibilidade do cálcio melhorando sua absorção, possuem efeito citotóxico em células de leucemia humana e ainda possuem atividade antioxidante (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015; JAIN; KUMAR; SATYANARAYANA, 2015).

Outra utilização para os XOS seria como substituto dos antibióticos na alimentação animal, já que têm efeitos positivos na saúde do animal, similares aos antibióticos, sem a possibilidade de causar resistência a bactérias patogênicas. Podem ser utilizados também na agricultura, para o desenvolvimento de estimulantes de crescimento e na indústria farmacêutica, para a produção de fármacos relacionados ao controle da obesidade e tratamento de infecções gastrointestinais (VAZQUEZ et al., 2000).

Atualmente, o Japão é o maior produtor e consumidor de xilo-oligossacarídeos, sendo que o mercado e consumo desses prebióticos tem crescido gradualmente no mundo todo, já que há uma preocupação cada vez maior com a qualidade de vida e saúde, aumentando o interesse por alimentos que apresentem substâncias funcionais (BRIENZO et al., 2016; BARRETO; ZANCAN; MENEZES, 2015). Por apresentarem diversas atividades biológicas, XOS podem ser incorporados como ingredientes em alimentos, a fim de promover a melhora da saúde. Entretanto, sua dosagem deve ser feita de forma cuidadosa, já que a quantidade diária recomendada de consumo é entre 2,0 e 5,0 gramas (GOBINATH et al., 2010; CARVALHO et al., 2013).

Entre os prebióticos, os XOS ocupam um espaço significativo por conta de suas diversas influências na saúde humana, além de sua potencialidade para prevenir problemas gastrointestinais. Eles são produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos, que não são adequados para consumo humano e estão disponíveis em grande quantidade, oferecendo uma grande oportunidade para as indústrias de produtos nutracêuticos, já que

a matéria prima é abundante e de baixo custo. Além disso, a conversão da xilana em produtos de maior valor agregado atende a necessidade do uso de grande variedade de resíduos agrícolas que hoje são subutilizados (SAMANTA et al., 2015).

3. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi produzir xilo-oligossacarídeos, a partir da hidrólise enzimática de hemiceluloses extraídas de pseudocaule de bananeira, usando a endo- β -1,4-xilanase I secretada por *Aspergillus versicolor*, avaliando a ação prebiótica desses compostos em bactérias probióticas e bactéria patogênica.

3.1. Objetivos específicos

Cultivar *A. versicolor* para produção de xilanases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono.

Purificação da endo-xilanase I produzida por *A. versicolor*

Estabelecimento das condições de lavagem (pré-tratamento) do pseudocaule de bananeira para remoção de extrativos.

Extração da hemicelulose do pseudocaule de bananeira, em meio alcalino, com peróxido de hidrogênio.

Caracterização química da hemicelulose extraída do pseudocaule de bananeira.

Determinação dos melhores parâmetros de carga enzimática, concentração de substrato e tempo de reação para produção de xilo-oligossacarídeo

Determinação da ação prebiótica dos xilo-oligossacarídeos produzidos através de testes de crescimento com bactérias probióticas e patogênica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições de manutenção e crescimento de *Aspergillus versicolor*

A linhagem do fungo, isolada do solo brasileiro, foi mantida em meio sólido de Vogel (1956), contendo farelo de trigo como fonte de carbono na concentração de 1% (m/v). Foram realizados repiques periódicos em tubos de ensaio, sendo as culturas incubadas por 7 dias a 28 °C. Após esse período a linhagem foi armazenada a 4 °C.

O meio de cultura sólido para produção de esporos foi preparado com a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada (v/v) suplementada com farelo de trigo na concentração de 3,0 % (m/v) e ágar 1,5 % (m/v). O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavados (20 min, 120 °C, 1 atm) e inclinados. As culturas foram incubadas nesse mesmo meio por 7 dias a 28°C para produção de conídios. Os conídios foram suspensos em água estéril destilada e a concentração da suspensão foi ajustada para 10^7 esporos/mL através de contagem em câmara de Newbauer (CARMONA et al, 1997).

4.2. Condições de cultivo para produção de enzimas

Os meios líquidos para cultivo e produção enzimática foram preparados de acordo com Vogel (1956), contendo 1% (m/v) de farelo de trigo. Frascos erlenmeyers (125 mL), contendo 25 mL do meio, foram inoculados com 1,0 mL da suspensão de esporos e incubados de modo estático a 30°C por 5 dias (CARMONA et al, 1997).

4.3. Obtenção das preparações enzimáticas

Após o crescimento em meio líquido, as culturas foram filtradas em sistema a vácuo em funil de Büchner. Desta forma, foi obtido o filtrado de cultura livre de células e micélio. O filtrado foi utilizado como preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

4.4. Purificação da endoxilanase I produzida por *Aspergillus versicolor*

O filtrado da cultura obtido foi dialisado por cerca de 18 horas em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0. A amostra dialisada foi aplicada em uma coluna DEAE-Sephadex A-50, equilibrada com o mesmo tampão, para realização de cromatografia de

troca iônica. As frações que apresentaram atividade xilanase foram reunidas (CARMONA et al, 1998).

A amostra obtida foi dialisada contra água, liofilizada, redissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 e aplicada em uma coluna Sephadex G-75, equilibrada com o mesmo tampão, para realização de cromatografia de exclusão molecular. As frações que apresentaram atividade xilanase foram reunidas e, a amostra obtida novamente foi dialisada contra água e liofilizada (CARMONA et al, 1998).

4.5. Determinação da atividade de xilanase

A atividade xilanase foi determinada pelo método proposto por Bailey et al. (1992) modificado. A enzima (10 a 250 µL) foi incubada a 55°C (pH ótimo – CARMONA et al, 1997) com 750 µL de substrato de xilana de aveia (Sigma) 1% (m/v) em meio tamponado com fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 6,0. Em intervalos de tempos adequados, alíquotas de 250 µL foram retiradas e a reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), para a determinação de açúcares redutores, utilizando-se xilose como padrão. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em unidades por volume (U/mL) da enzima.

4.6. Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951). Inicialmente foi preparado o reagente A, que consiste em adicionar Na₂CO₃ a 2% (m/v) em uma solução de NaOH 0,1 M, adicionados de CuSO₄ 1% e de tartarato de sódio e potássio 1%, nas proporções de 100:1:1, respectivamente. Em tubos de ensaio, as amostras de proteína foram diluídas com água destilada a um volume final de 0,5 mL. Aos tubos, foram acrescentados 2,5 mL de solução A para reação por 15 minutos. Em seguida foram acrescentados 250 µL de solução de Folin diluído em água destilada (1:1) e mantidos sob reação por 30 min. O padrão de proteína utilizado foi soro albumina bovino. A quantificação de proteínas totais presentes em solução foi determinada através da leitura de absorbância, em espectrofotômetro a 660 nm.

4.7. Determinação de atividade β -xilosidase

A atividade da β -xilosidase foi determinada através da quantidade de *p*-nitrofenol (pNP) liberada em meio reacional contendo *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNpX) como substrato (KUMAR; RAMÓN, 1996). A reação foi iniciada pela adição da enzima em solução de substrato preparada em meio tamponado com fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 6,0 e incubada em banho maria a 50°C por 10 minutos. A cada 5 min, alíquotas da solução foram retiradas e adicionadas a uma solução saturada de tetraborato de sódio para interromper a reação enzimática. O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 405 nm (KERSTERS-HILDERSON et al., 1982).

4.8. Lavagem (pré-tratamento) da biomassa para remoção de extrativos e metais

O pseudocaule de bananeira foi moído e submetido a quatro pré-tratamentos, que antecedem a extração de sua hemicelulose, para remoção de extrativos e metais. Em todos os pré-tratamentos foram utilizadas amostras de 50,0 g do pseudocaule de bananeira. O primeiro pré-tratamento foi realizado com etanol 96 % e água em sistema soxhlets, por um período de 8 h para cada solvente. No segundo pré-tratamento, a biomassa foi lavada em meio alcalino NaOH 1 % (500 mL) a 50 °C por 1 h e, no terceiro pré-tratamento, em meio ácido H₂SO₄ 1 % (500 mL) a 50 °C por 1 h. O quarto pré-tratamento foi realizado com solução de ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 0,2 % (500 mL) a 90 °C por 1 h. Após a lavagem, foi realizada uma filtração em papel de filtro a fim de separar a fração líquida (descartada) e sólida, a qual foi lavada com água destilada até obter-se pH da mesma, aproximadamente 5,0. O material foi seco em estufa a 60 °C e armazenado para posterior análise.

4.9. Extração da hemicelulose

Amostras pré-tratadas como descrito anteriormente foram utilizadas para extração de hemicelulose. Dez gramas desse material foram colocados em frascos de 1 L, seguido da adição de 200 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 6 % (m/v). O pH foi ajustado em 11,6 com NaOH 5 molL⁻¹, e o meio agitado a 150 rpm durante 24h sob temperatura de 25°C. Estas condições foram otimizadas para bagaço de cana-de-

açúcar (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), e foram utilizadas como condições iniciais nesse estudo.

Após o período de reação, as amostras foram filtradas. A fração sólida, rica em celulose, foi lavada com água destilada até se obter pH 7,0. A fração líquida, rica em hemicelulose, teve seu pH ajustado para 6,0 e foi colocada em estufa a 60°C para redução do volume a 1/3 do inicial. Com essa amostra de volume reduzido, foi feita uma diluição com etanol 96% (3 volumes), agitação e repouso para decantação do material em suspensão, as hemiceluloses. Posteriormente, o processo foi repetido três vezes com etanol 70% ou até se obter uma fração líquida límpida. Em seguida, o material foi colocado para secagem em estufa a 45°C. O conteúdo seco foi triturado em almofariz para posterior utilização nos experimentos de caracterização química e hidrólise enzimática.

4.10. Caracterização química do pseudocaule de bananeira

Em frasco Scott de 100 mL, foi pesada aproximadamente 300 mg da hemicelulose extraída. A massa seca da amostra foi adicionada 3,0 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m), sendo a reação realizada a 30°C por 1 hora em banho termostatizado. A reação foi interrompida por adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura/suspensão foi autoclavada a 121°C por 1 hora. O conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado em filtro de placa porosa de vidro sinterizado nº 4, previamente tarado. O material retido no filtro foi utilizado para quantificar a lignina insolúvel, por gravimetria. A lignina solúvel foi quantificada através da leitura da absorbância da fração líquida a 215 nm e 280 nm. A determinação do teor de glicose, xilose e arabinose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRIENZO et al., 2009).

4.11. Caracterização química da hemicelulose

Em frasco Scott de 100 mL, foi pesada aproximadamente 300 mg da hemicelulose extraída. A massa seca da amostra foi adicionada 3,0 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m), sendo a reação realizada a 45°C por 7 minutos em banho termostatizado. A reação foi interrompida por adição de 84 mL de água destilada. Essa mistura/suspensão foi autoclavada a 121°C por 30 minutos. O conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado em filtro de placa porosa de vidro sinterizado nº 4, previamente tarado. O material retido no filtro foi utilizado para quantificar a lignina insolúvel, por gravimetria. A lignina solúvel foi

quantificada através da leitura da absorbância da fração líquida a 215 nm e 280 nm. A determinação do teor de glicose, xilose e arabinose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRIENZO et al., 2009).

4.12. Teste de solubilidade

Uma solução, contendo 2% de substrato (0,2 g de hemicelulose em 10 mL do tampão), foi aquecida e deixada em agitação a 25 °C “*overnight*”. A fração líquida (hemicelulose solúvel) foi reservada e a fração sólida (hemicelulose insolúvel) seca em estufa a 105 °C até massa constante.

4.13. Hidrólise enzimática das hemiceluloses extraídas para produção de XOS

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6) em banho-maria a 55°C com agitação de 120 rpm. A reação foi conduzida com a endoxilanase I de *A. versicolor* produzida em meio contendo farelo de trigo e purificada (CARMONA et al, 1998). Cada experimento teve variações de parâmetros como concentração de hemicelulose (2%, 4%, 6%, 8% e 10% m/v), enzimas (10 UI/g, 30 UI/g, 60 UI/g, 100 UI/g e 200 UI/g) e tempo de incubação (2h, 4h, 6h, 8h, 16h, 24h e 48h). Também foi realizada a hidrólise enzimática da xilana insolúvel. Em intervalos de tempo apropriados, foram coletados os tubos para o monitoramento do teor de xilo-oligossacarídeos. Após atingir o tempo reacional, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C durante 5 minutos (adaptado de BRIENZO et al., 2009). O hidrolisado foi filtrado com filtro de seringa 0,22 µm antes da injeção em CLAE para quantificação dos XOS.

O cálculo da porcentagem de conversão da hemicelulose em XOS na hidrólise enzimática foi realizado através das seguintes equação:

$$\text{XOS (\%)} = 100 \times \frac{\text{massa de XOS}}{\text{massa de material (xilana)}}$$

4.14. Determinação da concentração de xilo-oligossacarídeos

As concentrações de oligossacarídeos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm); temperatura de 80°C; eluente: água ultrapura com fluxo 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração (Waters 2414). Foram utilizados como padrões soluções de xilose (Sigma) e de xilobiose (X₂), xilotriose (X₃), xilotetraose (X₄) e xilopentaose (X₅) (BRIENZO, 2010).

4.15. Fermentação “in vitro” de xilo-oligossacarídeos

4.15.1. Micro-organismos

Linhagens de CCT 0580 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) e CCT 0559 *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338) utilizadas nesse trabalho foram disponibilizadas pelo banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, da UFSCar – Campus Araras. A linhagem do micro-organismo patogênico *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cedida pelo Laboratório de Genética Bacteriana – LGB, da Unesp – Campus Rio Claro.

Durante o experimento, as culturas foram mantidas em placa de Petri contendo meio adequado e repicadas a cada semana.

4.15.2. Meios de crescimento

Para o crescimento dos *Lactobacillus* 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 autoclavado por 20 minutos a 121°C.

Para o crescimento de *Escherichia coli* foi preparado o meio Eosin Methylene Blue (EMB) (HOLT-HARRIS, TEAGUE, 1916) líquido com pequena modificação, cuja composição foi (g/L): 10 g de peptona, 5 g de fosfato dipotássico, 5 g de lactose e 5 g de sacarose. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C.

4.15.3. Crescimento em meio com xilo-oligossacarídeos como fonte de carbono

Os meios de cultura foram preparados substituindo a fonte de carbono pelos xilo-oligossacarídeos, produzidos no presente trabalho através da hidrólise enzimática, e pela xilose. Como controle, foi utilizado o meio contendo glicose como fonte de carbono. As bactérias foram mantidas em crescimento até que a suspensão atingisse o valor de absorbância 1,0 no espectrofotômetro, valor equivalente a aproximadamente 10^8 células/mL para os *Lactobacillus* e 10^9 células/mL para *E. coli*. Essa suspensão de células foi diluída até se obter 10^6 células/mL. Para garantir que a quantidade inicial de células/mL dos experimentos era conhecida, foi realizado plaqueamento e contagem de colônias da suspensão de células após a diluição.

Foi inoculado 1 mL da suspensão de células do micro-organismo utilizado, contendo 10^6 células/mL, em 9 mL do respectivo meio de cultura. Sendo assim, a quantidade inicial de células/mL nos experimentos foi de 10^5 . As cepas de *Lactobacillus* foram incubadas a 37°C por 72 horas com agitação de 150 rpm. Amostras foram retiradas após 0, 12, 24, 48 e 72 horas. O micro-organismo *E. coli* foi incubado a 37°C por 48 horas, sem agitação. Amostras foram retiradas após 0, 12, 24 e 48 horas.

Após a retirada de 100µL de cada amostra nos períodos indicados, foi realizada a contagem das bactérias pelo plaqueamento através da técnica “drop plate”.

4.16. Determinação do crescimento através do plaqueamento “drop plate”

As amostras foram diluídas em tubos com solução salina, e 10 µL de cada diluição foi pipetada de 3 a 4 vezes em meio EMB modificado e MRS, conforme o microrganismo plaqueado. As placas contendo os *Lactobacillus* foram incubadas a 37°C por 48-72 horas e aquelas contendo a *E. coli* foram incubadas a mesma temperatura por 24-48 horas. A seguir foram contadas as colônias e os resultados foram expressos em UFC/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação da principal endoxilanase produzida por *A. versicolor*

A primeira etapa de purificação da principal endoxilanase presente do filtrado bruto de *A. versicolor* consistiu em uma cromatografia de troca iônica. A amostra foi aplicada em coluna DEAE-Sephadex A-50 a um fluxo de 60,0 mL h⁻¹. A enzima de interesse, xilanase I, foi eluída da coluna, pois não permaneceu ligada à resina utilizada, sendo a fração ligada, a xilanase II. A purificação prosseguiu apenas com a xilanase I, já que em estudos anteriores de Carmona et al (1998) e Carmona et al (2005), a atividade dessa enzima em relação a xilanase II é maior, além de possuir maior estabilidade.

A amostra proveniente da cromatografia de troca iônica foi liofilizada, ressuspensa em tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 e aplicada em coluna Sephadex G-75. Pelo perfil cromatográfico (**Figura 11**), verificou-se a presença de apenas um pico de atividade xilanase, entre as frações 65 e 80, as quais foram reunidas e essa amostra foi utilizada nos experimentos seguintes.

Após as duas etapas cromatográficas, a xilanase purificada apresentou um fator de purificação de 14,1 vezes com recuperação de 22,9% da atividade inicial (**Tabela 2**). O resultado obtido por Carmona et al (1998) foi similar, houve uma purificação de 18,8 vezes com recuperação de 19,9% da atividade inicial. A atividade específica obtida neste trabalho, entretanto, se apresentou quase 5 vezes maior que a obtida pelos autores, de 635 U/mg. Isso pode ser devido ao fato de que a quantidade de filtrado bruto preparado no presente trabalho foi maior, havendo assim uma maior quantidade de proteínas e, conseqüentemente, de xilanase, presentes na amostra.

Figura 11. Perfil cromatográfico da xilanase I de *A. versicolor* em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0. (□) A₂₈₀, (●) Atividade xilanase. Setas indicam as frações reunidas.

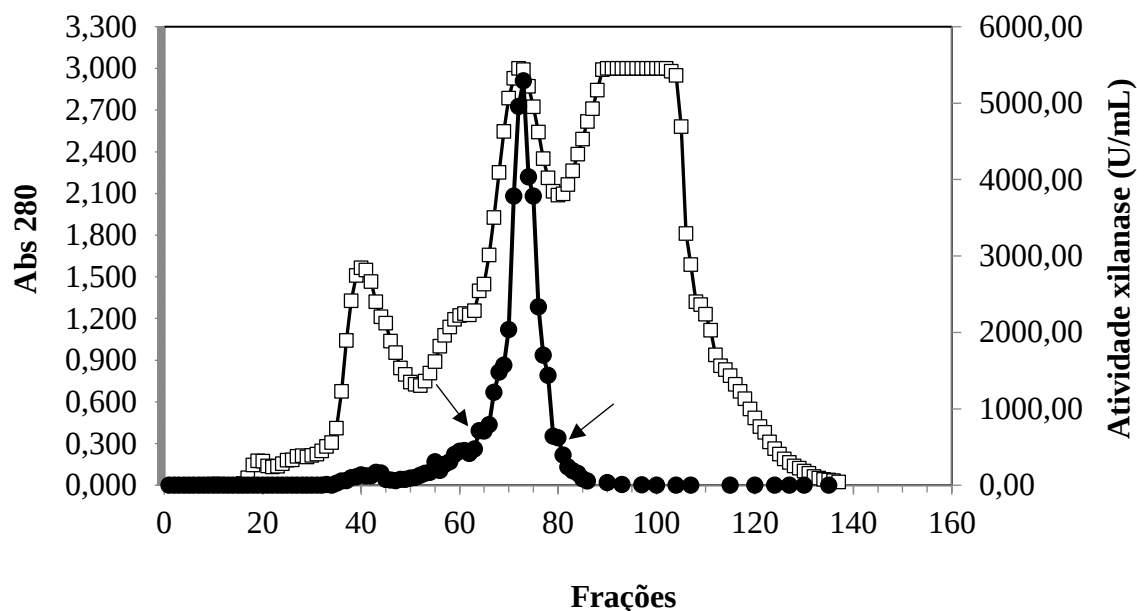


Tabela 2. Etapas de purificação da principal endoxilanase de *A. versicolor*

Etapas de purificação	Atividade total (U) ^a	Proteína total (mg) ^b	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto	128385,0	616,0	208,4	100,0	1,0
DEAE-Sephadex A-50	53805,7	194,0	277,3	41,9	1,3
Sephadex G-75	29412,7	10,0	2941,3	22,9	14,1

^aAtividade medida a 55 °C, usando 1 % de xilana de “*Birchwood*” em tampão 0,05 mol L⁻¹ fosfato de sódio pH 6,0. ^bConteúdo de proteína estimado utilizando método de Lowry.

5.2. Atividade β -xilosidase

Para o propósito desse trabalho, ou seja, a produção de xilo-oligossacarídeos, a presença da enzima β -xilosidase é prejudicial, já que esta realiza a hidrólise dos XOS em xilose, diminuindo o rendimento da produção de XOS. Por isso, foi realizado o teste de atividade β -xilosidase da amostra recolhida após a cromatografia de exclusão molecular e não foi detectada a atividade dessa enzima na amostra purificada de endoxilanase I.

5.3. Caracterização química do pseudocaule de bananeira

O pseudocaule de bananeira possui grande teor de umidade, por isso esse material foi seco em estufa a 45°C antes da caracterização. Além disso, essa biomassa apresenta grande quantidade de extrativos, que são compostos voláteis, solúveis e de baixa massa molecular, que não fazem parte da composição da parede celular da planta e podem ser facilmente extraídos do material. Portanto, para melhor extração da hemicelulose com maior pureza, é importante que esses extrativos sejam removidos antes desse processo. Através da lavagem, todo composto solúvel em meio aquoso pode ser extraído da biomassa. Os extrativos presentes na biomassa, se em grande quantidade, podem consumir reagentes nos processos de conversão.

O pseudocaule de bananeira, obtido após os diferentes pré-tratamentos para remoção de extrativos, foi caracterizado quanto ao teor de carboidratos e lignina, a fim de verificar se algum pré-tratamento promoveu alteração na composição química e qual foi mais eficiente na remoção dos extrativos. A lavagem com etanol/água é um procedimento que faz parte da metodologia aplicada, pois a remoção de extrativos deve ser realizada antes da caracterização química (ABNT, 2016). Portanto, nesse caso, a amostra tratada com etanol/água foi considerada como controle para caracterização química do material in natura.

A composição da biomassa após os pré-tratamentos está apresentada na **Tabela 3**. O teor de extrativos obtido foi alto, quando comparado com materiais lignocelulósicos, sendo equivalente a aproximadamente 1/3 da composição química do material. Em estudos realizados por Cordeiro et al (2004) e Rahman et al (2014), o teor de extrativos obtido foi menor, de 14,1% e 22,8% respectivamente. Porém, esses valores indicam que a quantidade de extrativos presente na biomassa do pseudocaule de bananeira é maior do que em madeiras e similar ao das gramíneas, já que o teor encontrado na literatura varia de 2% a 3% para madeiras e 21% a 26% para gramíneas, segundo Moraes, Nascimento & Melo (2005).

Tabela 3. Teor de extrativos e caracterização química do pseudocaule de bananeira (base massa seca) após diferentes pré-tratamentos/lavagens.

Pré-tratamento	Lignina (%)	Glucana/celulose (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Extrativos (%)	Total (%)
Etanol/Água	3,04 ± 0,3	37,60 ± 1,15	14,00 ± 1,78	5,82 ± 0,55	30,27 ± 0,85	90,73 ± 4,93
NaOH	2,71 ± 0,07	34,37 ± 1,94	12,74 ± 1,44	5,28 ± 0,37	35,25 ± 0,55	90,35 ± 4,37
EDTA	3,33 ± 0,07	36,55 ± 0,35	13,41 ± 0,26	5,90 ± 1,91	29,00 ± 0,8	88,19 ± 3,33
H₂SO₄	3,31 ± 0,04	33,19 ± 2,31	11,25 ± 1,25	5,14 ± 0,93	29,80 ± 1,23	82,69 ± 5,76
Água	3,12 ± 0,05	36,24 ± 0,97	13,85 ± 1,27	5,72 ± 0,89	30,82 ± 0,93	89,75 ± 4,11

Etanol/Água: Sistema Soxhlets por 8 horas cada solvente; NaOH: 50°C por 1 hora; EDTA: 90°C por 1 hora; H₂SO₄: 50°C por 1 hora; Água: 50°C por 1 hora.

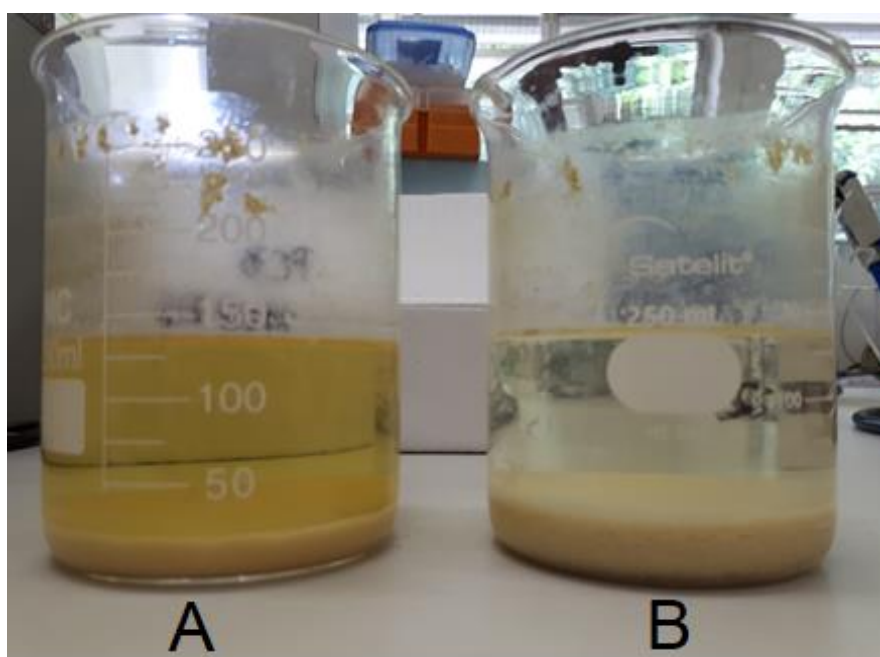
O conteúdo em lignina determinado foi de 3,04% para o material in natura e entre 2,71% e 3,33% para os demais materiais pré-tratados (**Tabela 3**). Este conteúdo de lignina pode ser considerado baixo se comparado com valores encontrados em trabalhos de Li et al (2010) e Preethi e Murthy (2013), os quais reportaram 10,8% e 17,9% de lignina, 71,8% e 53,4% de celulose e 11,2% e 14,1% de xilana, respectivamente. O baixo teor de lignina é uma característica do pseudocaule de bananeira, já que sua estrutura não apresenta muita rigidez. O conteúdo em glucana obtido também foi menor do que o apresentado pelos mesmos autores. Já, a quantidade de xilana e arabinana obtidas foram semelhantes.

Os pré-tratamentos utilizados para a remoção dos extrativos provocaram pouca modificação na composição química da biomassa. Entretanto, as amostras tratadas com NaOH e H₂SO₄ apresentaram teor de carboidratos ligeiramente menor que o restante das amostras, uma diferença média de 6,43% do total de carboidratos quando comparado ao controle. Provavelmente, isso se deve ao fato de que esses reagentes possuem maior capacidade de solubilização dos açúcares presentes na estrutura lignocelulósica, podendo alterar sua estrutura e composição.

5.4. Extração da hemicelulose

A hemicelulose foi extraída do pseudocaule de bananeira através metodologia otimizada para bagaço de cana-de-açúcar (Brienzo et al., 2009). Foi utilizada uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio, e subsequente filtração para separar o material rico em celulose. Posteriormente, houve a neutralização e adição de etanol para a precipitação da hemicelulose e sua separação da lignina, a qual ficou na solução. A **Figura 12** mostra a hemicelulose precipitada após adição de etanol. Após sucessivas lavagens com etanol 70%, a fração líquida fica límpida.

Figura 12. Precipitação da hemicelulose através da adição de etanol (A), e lavagem com etanol por cerca de 4 vezes (B).



Fonte: Acervo pessoal

A extração da hemicelulose foi realizada após os pré-tratamentos/lavagens e uma pesagem foi realizada para determinar a quantidade extraída (**Tabela 4**). Também foi avaliada a extração sem a utilização do pré-tratamento. Considerando a porção hemicelulósica da biomassa representada por xilose e arabinose, foi avaliada a quantidade

de hemicelulose extraída, e o quanto da mesma foi recuperada, levando-se em consideração o teor hemicelulósico total do pseudocaule de bananeira.

Tabela 4. Extração da hemicelulose de pseudocaule de bananeira após diferentes pré-tratamentos/lavagens.

Pré-tratamento	Hemicelulose (% base massa total de pseudocaule)	Hemicelulose (% base massa de hemicelulose no pseudocaule)
Etanol/Água	10,23 ± 1,6	51,61 ± 2,36
NaOH	10,14 ± 0,89	56,17 ± 4,91
EDTA	7,53 ± 0,23	38,99 ± 5,34
H ₂ SO ₄	3,30 ± 1,27	20,45 ± 3,22
Água	9,17 ± 0,58	46,85 ± 2,47
Sem lavagem	8,20 ± 0,76	41,37 ± 3,72

Etanol/Água: Sistema Soxhlets por 8 horas cada solvente; NaOH: 50°C por 1 hora; EDTA: 90°C por 1 hora; H₂SO₄: 50°C por 1 hora; Água: 50°C por 1 hora.

Após o pré-tratamento ácido diluído, a extração da hemicelulose foi baixa, provavelmente devido a capacidade do reagente de solubilizar a hemicelulose através do rompimento de suas ligações glicosídicas. Houve maior extração da hemicelulose após os pré-tratamentos alcalino e com etanol, atingindo a 51,61% e 56,17% de recuperação da hemicelulose total, respectivamente. Estes pré-tratamentos foram aplicados de forma branda, não afetando provavelmente a hemicelulose, como no caso do pré-tratamento com ácido diluído.

5.5. Caracterização química das hemiceluloses extraídas

Foi realizada a caracterização química das hemiceluloses extraídas, utilizando metodologia semelhante à caracterização da biomassa, a fim de se determinar a composição de cada uma quanto aos açúcares presentes e lignina residual. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Caracterização química das hemiceluloses extraídas após cada pré-tratamento/lavagem.

Pré-tratamento	Lignina (%)	Glicose (%)	Xilose (%)	Arabinose (%)
Etanol	2,63 ± 0,48	6,88 ± 0,12	17,14 ± 1,81	8,82 ± 0,02
NaOH	2,28 ± 0,40	2,63 ± 0,09	21,66 ± 2,01	8,90 ± 0,10
EDTA	1,32 ± 0,28	3,80 ± 0,02	10,23 ± 1,24	7,46 ± 0,28
H ₂ SO ₄	6,01 ± 3,43	7,85 ± 0,30	6,97 ± 0,83	2,63 ± 0,11
Água	3,47 ± 1,02	9,59 ± 0,06	9,89 ± 1,13	5,20 ± 0,08
Sem lavagem	3,50 ± 0,94	17,30 ± 0,37	8,12 ± 0,97	3,28 ± 0,12

Etanol/Água: Sistema Soxhlets por 8 horas cada solvente; NaOH: 50°C por 1 hora; EDTA: 90°C por 1 hora; H₂SO₄: 50°C por 1 hora; Água: 50°C por 1 hora.

Quanto ao teor de lignina residual, as amostras apresentaram quantidades semelhantes, exceto a hemicelulose extraída após o pré-tratamento ácido diluído, que apresentou maior teor de lignina quando comparado ao restante das amostras. A amostra sem lavagem apresentou grande quantidade de glicose, enquanto que os menores teores desse açúcar foram encontrados nas amostras dos pré-tratamentos com NaOH e EDTA. Além disso, o teor de açúcares provenientes da hemicelulose, xilose e arabinose, presentes nessa amostra, foi menor.

Não foi determinado um alto teor de açúcares provenientes da hemicelulose em nenhuma das amostras, sendo o máximo obtido de 30,56%. Isso pode se dever ao fato de que a metodologia de caracterização química foi otimizada para bagaço de cana-de-açúcar, não sendo ideal para quantificação da hemicelulose do pseudocaule de bananeira.

Após a extração da hemicelulose, o ideal é obter um material que contenha alto teor de xilose e arabinose, e baixo teor de glicose e lignina. Tendo isso em vista, a hemicelulose extraída após o pré-tratamento com NaOH (**Figura 13**) foi a escolhida para ser utilizada como substrato para hidrólise enzimática com o objetivo de produção de XOS.

Figura 13. Hemicelulose extraída com H_2O_2 6% (m/v) em meio alcalino após o tratamento com NaOH.



Fonte: Acervo pessoal

5.6. Hidrólise enzimática para produção de XOS

A hidrólise enzimática foi realizada com a endoxilanase I produzida por *Aspergillus versicolor* e purificada através das técnicas de cromatografia de troca iônica e filtração em gel, e com a hemicelulose extraída do pseudocaule de bananeira em meio alcalino com H_2O_2 6% (m/v) após tratamento com NaOH. Foram realizadas hidrólises enzimáticas variando os parâmetros de carga enzimática, concentração do substrato e tempo de reação, a fim de se avaliar as melhores condições para a produção de xilooligossacarídeos. Após a reação, as amostras foram fervidas, filtradas e analisadas em CLAE, para determinar a concentração e o tipo de XOS produzidos.

5.6.1. Carga enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada por 24 horas, com 2% de substrato, apenas variando o parâmetro da carga enzimática. A concentração e o tipo de XOS produzidos nas hidrólises com diferentes cargas enzimáticas estão apresentados na **Tabela 6**.

Em todas as hidrólises enzimáticas, houve maior produção de XOS com maior grau de polimerização, xilotetrose e xilopentose/xilohexose. Esse resultado é diferente quando comparado com trabalhos de Akpinar, Erdogan & Bostanci (2009), utilizando xilanase de fungo do gênero *Aspergillus*, e de Brienzo et al. (2010), utilizando xilanase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*. Em ambos os trabalhos, houve maior produção de XOS com menor grau de polimerização, xilotriose e xilobiose.

Com uma carga de 200 UI/g da enzima xilanase de *Thermoascus aurantiacus* e 2% de substrato, foi possível obter 3,04 g/L de XOS e uma grande quantidade de xilose após 24 horas de reação (BRIENZO et al., 2010), enquanto que com uma carga de 200 UI/g de xilanase de *Aspergillus niger* e 2% de substrato foi obtido 3,10g/L de XOS, após 24 horas de reação (AKPINAR, ERDOGAN & BOSTANCI, 2009). No presente trabalho, com qualquer uma das cargas enzimáticas utilizadas, a produção de XOS foi maior. Além disso, não houve produção de xilose, resultado importante que confirma a ausência de β -xilosidases e a purificação eficiente da enzima xilanase.

A produção de XOS foi maior na hidrólise com carga enzimática de 200 UI/g, porém com cargas enzimáticas menores, a produção também foi alta. Com carga enzimática de 30 UI, considerada relativamente baixa, foi possível obter uma boa quantidade de XOS e bom rendimento, cerca de 11 g/L e 61%, respectivamente. Por esse motivo, essa carga enzimática foi utilizada nos experimentos seguintes.

Tabela 6. XOS produzidos por hidrólise enzimática com diferentes cargas da enzima endoxilanase I de *A. versicolor* com hemicelulose de pseudocaule de bananeira.

Carga enzimática (UI/g)	XOS detectados	Concentração (g/L)	Conversão (%)
10	X2	0,40 ± 0,004	2,22 ± 0,02
	X3	0,35 ± 0,004	1,94 ± 0,02
	X4	3,03 ± 0,02	16,76 ± 0,10
	X5/X6	5,66 ± 0,08	31,35 ± 0,46
30	X2	0,52 ± 0,01	2,85 ± 0,06
	X3	0,37 ± 0,04	2,03 ± 0,08
	X4	3,75 ± 0,05	20,77 ± 0,30
	X5/X6	6,38 ± 0,14	35,33 ± 0,76
60	X2	0,55 ± 0,05	3,04 ± 0,26
	X3	0,44 ± 0,01	2,45 ± 0,04
	X4	3,44 ± 0,10	19,02 ± 0,53
	X5/X6	6,05 ± 0,22	33,50 ± 1,24
100	X2	0,43 ± 0,01	2,38 ± 0,04
	X3	0,53 ± 0,04	2,95 ± 0,20
	X4	3,30 ± 0,33	18,28 ± 1,83
	X5/X6	6,06 ± 0,38	33,53 ± 3,79
200	X2	0,40 ± 0,01	2,23 ± 0,06
	X3	0,51 ± 0,09	2,81 ± 0,19
	X4	3,48 ± 0,12	19,29 ± 2,54
	X5/X6	6,59 ± 0,46	36,47 ± 3,99

X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetrose; X5/X6: xilopentose/xilohexose

5.6.2. Concentração do substrato

A hidrólise enzimática foi realizada por 24 horas, com 30 UI/g de carga enzimática, apenas variando o parâmetro da concentração de substrato de hemicelulose extraída de pseudocaule de bananeira. A concentração e o tipo de XOS produzidos nas hidrólises com diferentes cargas enzimáticas estão apresentados na **Tabela 7**.

Assim como na hidrólise enzimática realizada variando a carga de enzima, houve maior produção de XOS com maior grau de polimerização. Além disso, também não houve produção de xilose. Porém, nas concentrações de 2%, 4% e 6% de substrato, não houve a produção de xilotriose e a concentração de xilobiose obtida foi baixa.

A concentração de XOS produzidos aumentou conforme o aumento da concentração do substrato no meio, porém o rendimento de XOS produzidos diminuiu, principalmente de xilotetrose. Isso pode ter ocorrido devido a indisponibilidade de enzimas para hidrolisar o substrato mais concentrado no tempo de reação de 24 horas.

Tabela 7. XOS produzidos por hidrólise enzimática (30 UI/g) com diferentes concentrações de substrato (hemicelulose extraída de pseudo-caule de bananeira).

Substrato (%)	XOS detectados	Concentração (g/L)	Conversão (%)
2	X2	$0,11 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,07$
	X3	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	X4	$3,03 \pm 0,20$	$16,78 \pm 1,13$
	X5/X6	$4,08 \pm 0,32$	$22,60 \pm 1,79$
4	X2	$0,41 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,19$
	X3	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	X4	$3,29 \pm 0,02$	$9,10 \pm 0,06$
	X5/X6	$7,24 \pm 0,29$	$20,04 \pm 0,82$
6	X2	$0,38 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,14$
	X3	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
	X4	$3,50 \pm 0,27$	$6,46 \pm 0,49$
	X5/X6	$8,50 \pm 1,40$	$15,68 \pm 2,58$
8	X2	$0,63 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,08$
	X3	$0,63 \pm 0,36$	$0,88 \pm 0,29$
	X4	$3,99 \pm 0,38$	$5,53 \pm 0,52$
	X5/X6	$13,40 \pm 1,37$	$18,56 \pm 1,91$
10	X2	$0,94 \pm 0,05$	$1,04 \pm 0,05$
	X3	$1,15 \pm 0,37$	$1,27 \pm 0,28$
	X4	$4,46 \pm 0,36$	$4,94 \pm 0,40$
	X5/X6	$15,95 \pm 2,31$	$17,66 \pm 2,56$

X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetrose; X5/X6: xilopentose/xilohexose

Na hidrólise enzimática com concentração de 2% de substrato, apesar de ter apresentado uma menor concentração de XOS em relação as demais concentrações, o rendimento foi maior, e por essa razão essa concentração foi utilizada nos demais experimentos. A escolha de utilizar a concentração de 2% de substrato para hidrólise enzimática em maior escala, talvez não seria viável, já que a quantidade de produto obtida

seria baixa. Com a concentração de 8% e 10% de substrato, foi obtida maior concentração de XOS, porém o rendimento foi menor.

Uma vez que o objetivo para a próxima etapa do trabalho é a produção da maior concentração de XOS possível, a concentração de 8% de substrato foi considerada a melhor condição deste parâmetro.

5.6.3. Tempo de reação

A hidrólise enzimática foi realizada com 30 UI de carga enzimática e 2% de substrato, apenas variando o parâmetro do tempo de reação. A concentração e o tipo de XOS produzidos nas hidrólises com diferentes cargas enzimáticas estão apresentados na **Tabela 8** e a produção dos XOS ao longo do tempo está representada na **Figura 14**.

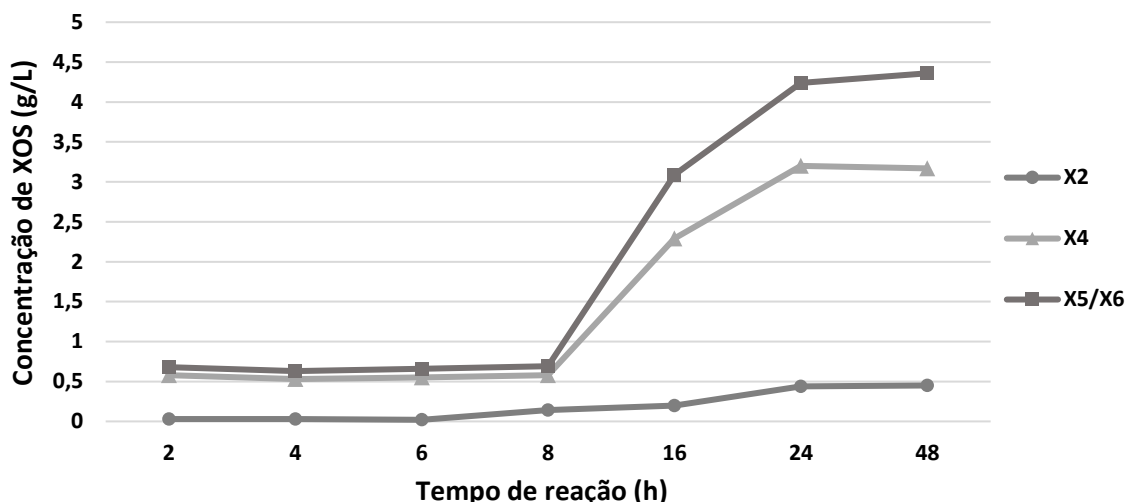
A produção de xilo-oligossacarídeos foi semelhante até o tempo de 8 horas de reação e partir das 16 horas, a produção aumentou quase quatro vezes. Aparentemente, não houve grande diferenças na produção de XOS em 24hs e 48hs de reação. Destaca-se que xilose e xilotriose também não foram produzidas nessas condições.

Tabela 8. XOS produzidos por hidrólise enzimática com diferentes tempos de reação utilizando carga enzimática de 30UI/g e 2 % de substrato.

Tempo de reação (h)	XOS detectados	Concentração (g/L)	Conversão (%)
2	X2	$0,03 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,06$
	X4	$0,58 \pm 0,06$	$3,22 \pm 0,33$
	X5/X6	$0,68 \pm 0,04$	$3,77 \pm 0,19$
4	X2	$0,03 \pm 0,001$	$0,16 \pm 0,003$
	X4	$0,53 \pm 0,04$	$2,91 \pm 0,24$
	X5/X6	$0,63 \pm 0,05$	$3,51 \pm 0,27$
6	X2	$0,02 \pm 0,002$	$0,09 \pm 0,01$
	X4	$0,55 \pm 0,03$	$3,04 \pm 0,16$
	X5/X6	$0,66 \pm 0,03$	$3,68 \pm 0,19$
8	X2	$0,14 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
	X4	$0,58 \pm 0,04$	$3,19 \pm 0,15$
	X5/X6	$0,69 \pm 0,05$	$3,82 \pm 0,10$
16	X2	$0,20 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,08$
	X4	$2,29 \pm 0,16$	$12,68 \pm 0,36$
	X5/X6	$3,09 \pm 0,28$	$17,09 \pm 0,48$
24	X2	$0,44 \pm 0,03$	$2,41 \pm 0,12$
	X4	$3,20 \pm 0,30$	$17,70 \pm 1,69$
	X5/X6	$4,24 \pm 0,21$	$23,47 \pm 1,17$
48	X2	$0,45 \pm 0,14$	$2,47 \pm 0,77$
	X4	$3,17 \pm 0,25$	$17,57 \pm 1,41$
	X5/X6	$4,36 \pm 0,34$	$24,15 \pm 1,88$

X2: xilobiose; X4: xilotetrose; X5/X6: xilopentose/xilohexose

No estudo de Achary & Prapulla (2009), a hidrólise de hemicelulose de espiga de milho usando endo-xilanase de *Aspergillus oryzae* produziu aproximadamente 8,2 g/L de XOS após 6 horas de reação, uma concentração mais alta do que a obtida no presente estudo. Porém, após 24 horas, a concentração alcançada foi de 9,71 g/L de XOS, já que havia presença da enzima β -xilosidase e os XOS foram hidrolisados à xilose. Essa reação não ocorreu neste trabalho, a concentração de XOS obtida após 24 horas foi de 7,88 g/L.

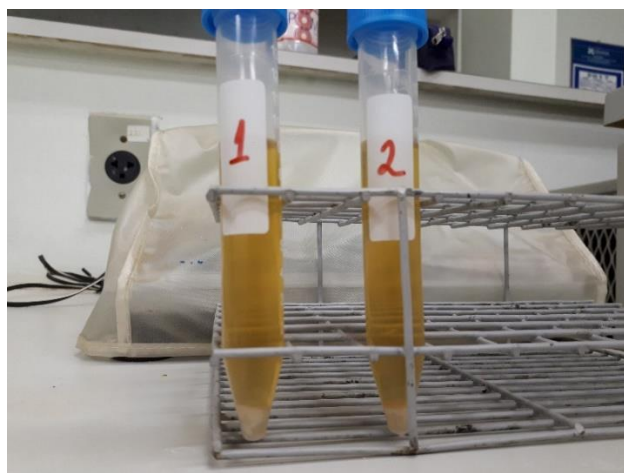
Figura 14. Gráfico de produção de XOS (g/L) ao longo do tempo (h).

No presente trabalho, a xilotriose não foi detectada após hidrólise enzimática nas condições apresentadas acima, porém em estudo de Mandelli et al (2014) e Maalej-Achouri et al (2009) esse xilo-oligossacarídeo foi detectado. No primeiro, a hidrólise enzimática foi realizada utilizando bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com ácido acético e peróxido de hidrogênio, como substrato e uma xilanase purificada de *E. coli* pelo período de 5 horas. Cerca de 20% dos XOS convertidos foram detectados como xilotriose. No segundo estudo, pelo período de 7 horas foi realizada hidrólise enzimática utilizando resíduos agroindustriais como substrato e xilanase purificada e imobilizada de *Talaromyces thermophilus*. Foi observado que durante o período inicial de hidrólise, a xilotriose foi o produto mais liberado, porém a partir de 6 horas de incubação, o produto final apresentou conteúdo rico em xilobiose, indicando que parte da xilotriose foi convertida em xilobiose.

5.6.4. Hemicelulose solúvel e insolúvel

Foi realizado um teste de solubilidade (**Figura 14**) para determinar quanto da hemicelulose extraída de pseudocaule de bananeira com H_2O_2 6% (m/v), após pré-tratamento/lavagem com NaOH, é solúvel em solução aquosa. O resultado, apresentado na **Tabela 9**, mostra que cerca de 79,5% da hemicelulose presente no substrato é solúvel, sendo a fração insolúvel obtida como precipitado. O método utilizado para solubilização é o empregado no preparo de substrato para atividade enzimática.

Figura 15. Teste de solubilidade da hemicelulose, podendo-se observar o sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel).



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 9. Frações solúvel e insolúvel da hemicelulose extraída do pseudocaule de bananeira.

Amostra	% (fração insolúvel)	% (fração solúvel)
1	21,35	78,65
2	19,60	80,40

As amostras 1 e 2 são repetições contendo 2% de hemicelulose de pseudocaule de bananeira dissolvido em água destilada.

Após o teste de solubilidade, foi feita hidrólise enzimática com 2% de substrato, carga enzimática de 30 UI/g e tempo de reação de 24 h a fim de se avaliar as diferenças na concentração e tipo de XOS produzidos com as frações solúvel e insolúvel da hemicelulose. Os resultados estão dispostos na **Tabela 10**.

Na hidrólise enzimática da fração solúvel da hemicelulose, não houve produção de xilotriose, e maior produção de XOS com maior grau de polimerização. Quanto a concentração produzida e o rendimento, foram semelhantes aqueles obtidos com ambas as frações presentes no substrato. Essa reação, em que a enzima e o substrato são solúveis, ocorre em fase homogênea e líquida (SHMAL, 2017).

Na hidrólise enzimática da fração insolúvel, houve uma maior produção de xilotriose, seguida de xilotetrose, porém a produção de xilobiose e xilopentose/xilohexose se mantiveram baixas. Nessa reação, a enzima é solúvel e o substrato insolúvel, portanto a hidrólise enzimática é um processo catalítico heterogêneo e ocorre em duas etapas, reações externas que ocorrem no exterior das partículas e reações internas que ocorrem dentro dos poros das partículas (KATCHALSKI-KATZIR et al., 1985).

Tabela 10. Hidrólise enzimática com as frações solúvel e insolúvel da hemicelulose para produção de XOS utilizando 2 % de substrato e 30 UI/g de enzima.

Substrato	XOS detectados	Concentração (g/L)	Conversão (%)
Hemicelulose solúvel	X2	0,15 ± 0,02	0,83 ± 0,11
	X3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	X4	4,02 ± 1,04	22,25 ± 0,58
	X5/X6	6,34 ± 0,94	35,12 ± 0,52
Hemicelulose insolúvel	X2	0,19 ± 0,02	1,03 ± 0,02
	X3	5,84 ± 0,38	32,34 ± 0,63
	X4	2,34 ± 0,12	12,94 ± 0,19
	X5/X6	0,40 ± 0,18	2,20 ± 0,09

X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetrose; X5/X6: xilopentose/xilohexose

5.6.5. Hidrólise enzimática com as melhores condições

Após as hidrólises enzimáticas variando os diferentes parâmetros, foi possível avaliar as melhores condições para produção de XOS. Os parâmetros utilizados para hidrólise em maior escala foram: carga enzimática de 30UI/g, substrato a 8% e tempo de reação de 24 horas. A hidrólise foi realizada em duplicada, utilizando um volume de reação de 80 mL. Após a hidrólise, as duas amostras foram reunidas e a concentração de XOS obtida está apresentada na **Tabela 11**.

Tabela 11. Hidrólise enzimática em maior escala com as melhores condições dos parâmetros de carga enzimática, concentração de substrato e tempo de reação.

XOS detectados	Concentração (g/L)	Conversão (%)
X2	2,37 ± 0,20	3,70 ± 0,27
X3	0,56 ± 0,21	0,88 ± 0,13
X4	3,55 ± 1,15	5,55 ± 0,52
X5/X6	14,03 ± 2,18	21,92 ± 3,30
Total	20,51 ± 3,74	32,05 ± 4,21

X2: xilobiose; X3: xilotriose; X4: xilotetrose; X5/X6: xilopentose/xilohexose

Assim como nas hidrólises anteriores, houve maior produção de XOS com maior grau de polimerização, xilotetrose e xilopentose/xilohexose, e não houve produção de xilose. O total de XOS obtido foi de 20,51 g/L e uma conversão de aproximadamente 32%.

As bactérias probióticas conseguem realizar a quebra de XOS de cadeias menores com maior facilidade do que aqueles que possuem cadeias grandes. Essa mistura de XOS, em que a maior quantidade é representada por X5/X6, foi utilizada como fonte de carbono nos experimentos de fermentação, para avaliar seu potencial prebiótico.

5.7. Fermentação “in vitro” de xilo-oligossacarídeos

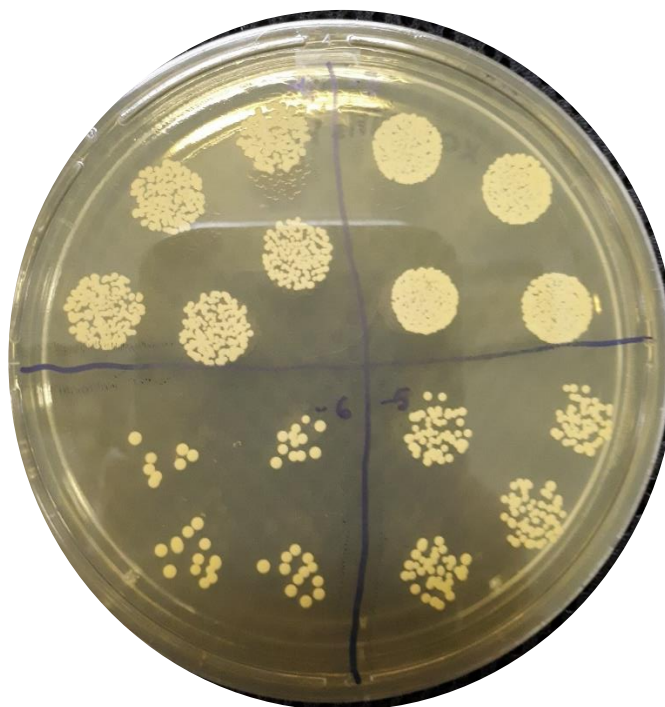
Algumas espécies e cepas de *Lactobacillus* são conhecidas como micro-organismos probióticos (AACHARY; PRAPULLA, 2010). O efeito sinérgico de diferentes enzimas, incluindo β -xilosidase, α -glucuronidase, β -L-arabinofuranosidase, juntamente com a xilanase, são necessárias para a completa degradação de XOS de cadeia longa. Portanto, a habilidade dos micro-organismos probióticos em utilizar XOS depende da eficiência de seu sistema enzimático xilanolítico. A β -xilosidase e outras enzimas deste sistema já foram reportadas em algumas cepas de *Lactobacillus* (CHAPLA et al, 2012). Neste trabalho, foi avaliada a habilidade de duas espécies de *Lactobacillus* e uma bactéria patogênica de utilizar XOS de cadeia longa como prebióticos.

Os resultados do crescimento das bactérias probióticas *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* e da bactéria patogênica *Escherichia coli* na presença de xilo-

oligossacarídeos se encontram nas **Figuras 17, 18 e 19**. O crescimento no meio contendo glicose foi considerado como controle, já que essa fonte de carbono é a usada normalmente. A contagem das bactérias foi realizada através da técnica de plaqueamento “*drop plate*” (**Figura 16**).

O método de “*drop plate*” pode ser usado para determinar o número de células viáveis em uma suspensão de volume conhecido. Esse método possui algumas vantagens em relação ao plaqueamento comum, já que menos tempo e esforço são necessários para dispensar as gotas em uma placa de ágar do que espalhar um volume equivalente de amostra no ágar. Ao distribuir a amostra em gotas, a contagem das colônias pode ser feita mais rapidamente e até mesmo com maior precisão. Apesar de ser utilizado em muitos laboratórios nos últimos anos, o método de plaqueamento “*drop plate*” ainda não foi padronizado (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001).

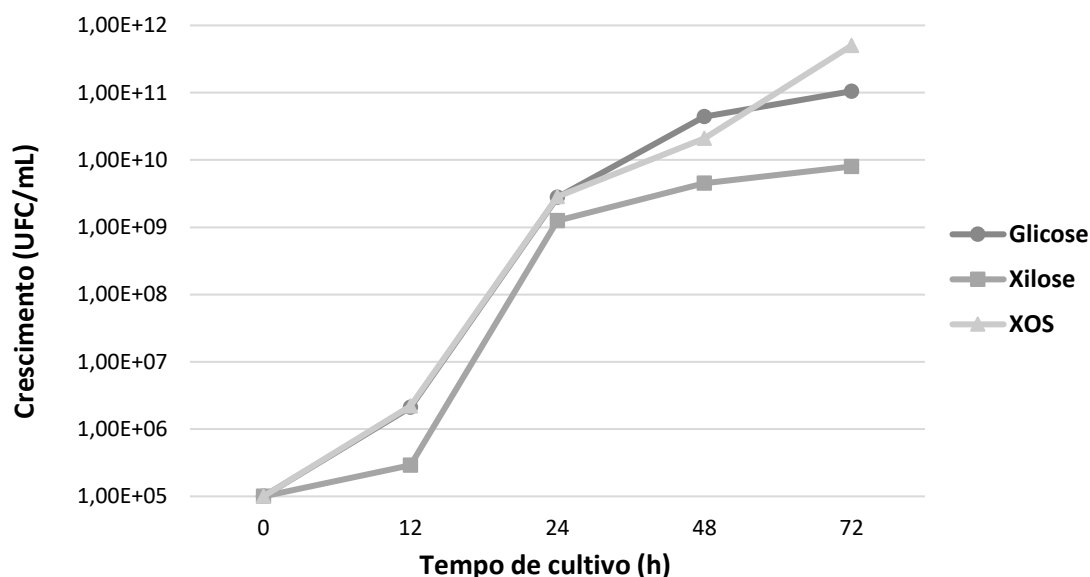
Figura 16. Crescimento da bactéria *E. coli* em diferentes diluições através da técnica “*drop plate*”



A bactéria *L. plantarum*, conseguiu se adaptar e crescer nos meios contendo xilose e xilo-oligossacarídeos. Após 72 horas, as contagens nos meios de cultura com XOS e com glicose foram de 5×10^{11} UFC/mL e 1×10^{11} UFC/mL, respectivamente. No entanto, com a xilose como fonte de carbono o crescimento foi menor, de 1×10^9 UFC/mL. Essa

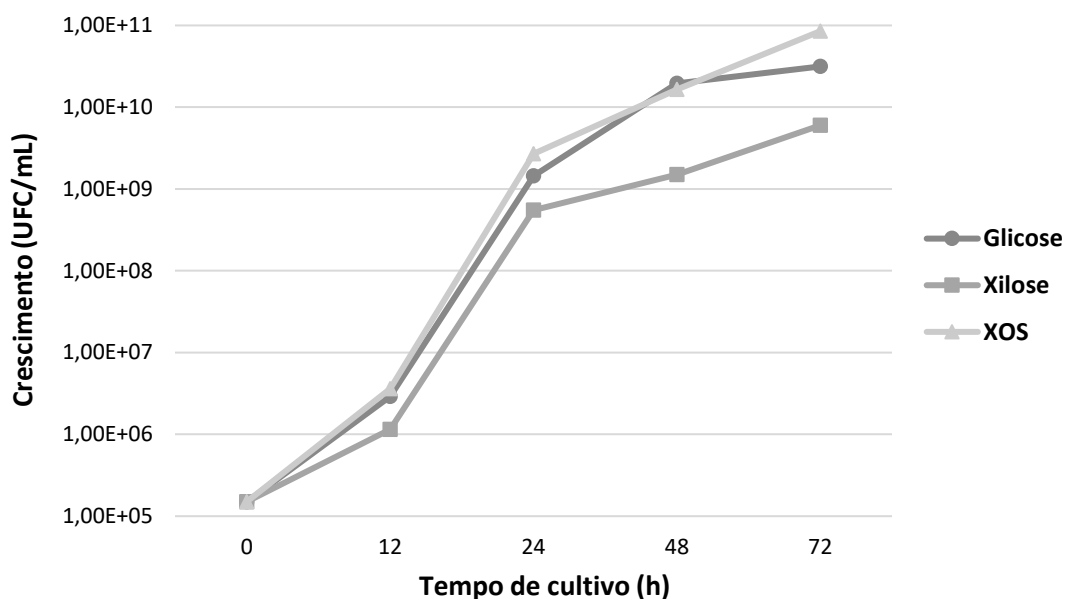
bactéria atingiu o começo de sua fase estacionária após 48 horas de crescimento em meio com glicose e xilose. Na presença de XOS, após o mesmo período, o crescimento ainda se manteve na fase exponencial (**Figura 17**).

Figura 17. Crescimento de *L. plantarum* em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono.



O *L. fermentum* também foi capaz de crescer em meio contendo xilose e XOS como fonte de carbono (**Figura 18**), e assim como *L. plantarum*, seu crescimento foi ligeiramente maior na presença de XOS quando comparado ao controle. Após 72 horas, o crescimento foi de 3×10^{10} e 8×10^{10} UFC/mL com glicose e XOS como fonte de carbono, respectivamente. Após 48 horas, no crescimento com glicose, a bactéria atingiu o início de sua fase estacionária. Já no crescimento com xilose e XOS, após o mesmo período, o crescimento permaneceu na fase exponencial.

Figura 18. Crescimento de *L. fermentum* em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono.



O crescimento com a xilose como fonte de carbono se apresentou menor do que com XOS. Esse mesmo resultado pôde ser observado por Salama et al (2015) e Figueiredo (2016) utilizando cepas de *Lactobacillus brevis*.

Utilizando 0,5% de XOS proveniente de farelo de trigo, Madhukumar & Muralikrishna (2011) obtiveram um bom crescimento de *L. plantarum*, porém o resultado não foi satisfatório ao utilizar XOS da casca de grão-de-bico. Já em meio contendo 2% de XOS comercial (Merck), o crescimento de duas cepas de *L. plantarum* foi avaliado por Ananieva et al (2012) através da densidade óptica. A partir dos resultados apresentados foi determinado que as duas cepas tiveram crescimentos semelhantes em glicose e XOS, assim como no presente trabalho.

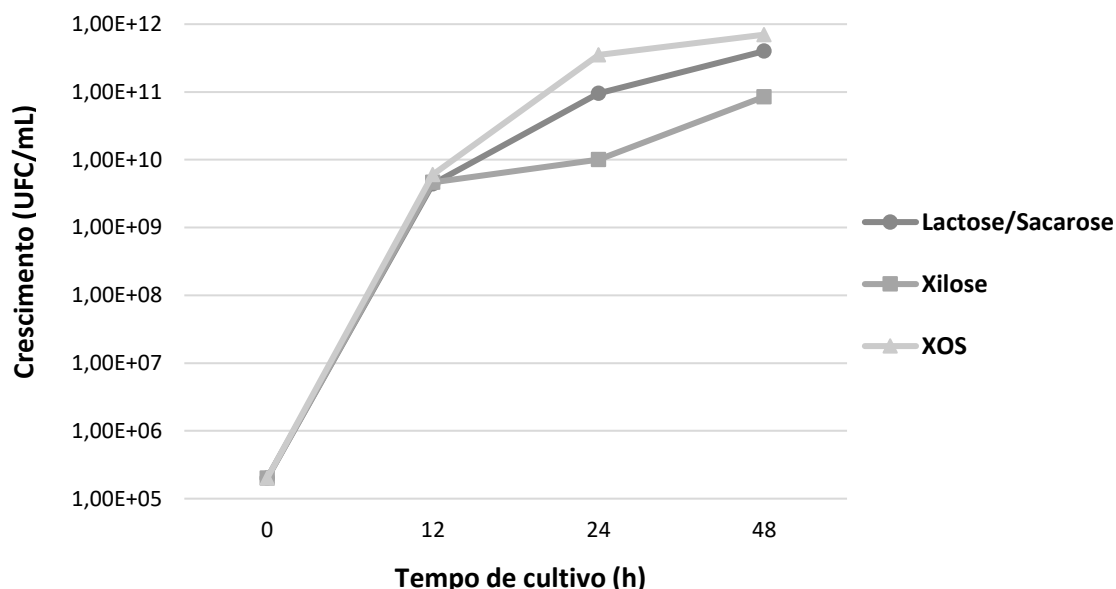
Em estudo realizado por Li et al (2015), observou-se o crescimento de diferentes cepas de *L. plantarum* e *L. fermentum* na presença de diferentes concentrações de XOS comercial (LifeBridge International Corporation). Com 25g/L, a maioria das cepas apresentou crescimento moderado a intenso, resultado obtido através da comparação de opacidade entre as colônias. Além disso, segundo Jatap et al (2017), o crescimento de *L. fermentum* foi significativamente maior do que de *L. plantarum* em meio contendo 0,35% de XOS proveniente de casca de trigo. O mesmo não ocorreu no presente trabalho, já que o crescimento de *L. plantarum* foi ligeiramente maior do que de *L. fermentum* e ambas

foram capazes de utilizar com sucesso os XOS disponibilizados para seu crescimento com sucesso.

Um fenômeno interessante que pode ter ocorrido no crescimento de ambos os *Lactobacillus* na presença de XOS é a diauxia, um crescimento ocasionado pela presença de duas fontes de carbono no meio de cultura, sendo que uma delas é mais facilmente metabolizada pela bactéria e é consumida primeiro levando a um crescimento rápido, seguido de uma nova fase lag em que a segunda fonte de carbono é metabolizada. Como pode ser observado nos gráficos, após 48 horas o crescimento com XOS aumenta, enquanto que o crescimento com glicose permanece na fase estacionária, possivelmente indicando que os componentes do meio facilmente metabolizáveis foram consumidos primeiro e após esse período foram consumidos os mais complexos como os XOS.

A *E. coli* também apresentou melhor performance com XOS no meio de cultura, embora o crescimento da cultura na presença de lactose/sacarose tenha sido semelhante, 7×10^{11} UFC/mL e 4×10^{11} UFC/mL, respectivamente, e o crescimento na presença de xilose foi menor (**Figura 19**). Após 24 horas, a bactéria atingiu o início da fase estacionária com todas as fontes de carbono testadas. Resultado semelhante, em que a mesma bactéria teve melhor crescimento com XOS como fonte de carbono do que lactose/sacarose, foi obtido por Figueiredo (2016). Até 12 horas, o crescimento foi semelhante nos três meios utilizados, o que pode indicar que até esse período a bactéria cresceu às custas dos outros componentes do meio, independente da fonte de carbono utilizada.

Figura 19. Crescimento de *E. coli* em meios contendo glicose, xilose e XOS (produzidos na hidrólise enzimática da hemicelulose do pseudocaule de bananeira) como fonte de carbono.



Apesar da bactéria patogênica ter crescido de forma semelhante às bactérias probióticas na presença de XOS, existem estudos como de Ananieva et al (2012), que demonstram a atividade antimicrobiana de algumas espécies de *Lactobacillus* como *L. plantarum* e *L. brevis* em relação a *E.coli* e outras bactérias patogênicas quando ambas são crescidas na presença de XOS, a qual foi determinada através de alo de inibição. Porém, o potencial inibitório dos *Lactobacillus* não foi objeto de estudo no presente trabalho.

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; GIBSON, 1998; CRITTENDEN; PLAYNE, 1997; SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001; FIGUEIREDO, 2016).

6. CONCLUSÕES

A extração de hemicelulose foi maior após o pré-tratamento/lavagem alcalino com NaOH, pois a análise dessas amostras apontou maior rendimento e teor de xilose e arabinose, o que indica maior quantidade de hemicelulose presente.

É possível afirmar que a amostra de enzima utilizada estava livre de β -xilosidase, já que não houve atividade da mesma e produção de xilose após as hidrólises. A maioria dos XOS produzidos em todas as hidrólises enzimáticas realizadas foram de maior grau de polimerização, como xilopentoses e xilohexoses.

Com uma quantidade de enzima relativamente baixa, de 30 UI/g, e 2% de substrato foi possível obter 11 g/L de XOS e uma conversão de aproximadamente 61%. Para se obter maior concentração de XOS, o substrato (hemicelulose) de 8% foi melhor, porém o rendimento foi menor que com 2% de substrato, obtendo-se uma conversão de apenas 32%. Quanto ao tempo de reação, o período de 24 horas foi o que resultou em maior conversão. A hidrólise enzimática do substrato solúvel levou a maior produção de XOS, principalmente aqueles de maior grau de polimerização como xilotetrose, xilopentose e xilohexose. Através da hidrólise enzimática do substrato insolúvel também foi possível obter XOS, porém outros tipos, principalmente xilotriose. Após a hidrólise utilizando as melhores condições dos parâmetros estudados, foi possível produzir cerca de 20g/L de XOS, a maioria com maior grau de polimerização.

Ambas as cepas probióticas utilizadas, *L. plantarum* e *L. fermentum*, demonstraram habilidade em utilizar XOS de cadeia longa para seu crescimento, e este foi maior na presença de XOS como fonte de carbono em comparação com os monossacarídeos. Deste modo fica evidenciada a produção de compostos prebióticos (XOS) via hidrólise enzimática de hemicelulose de pseudocaule de bananeira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p.991-995, 2009.

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p.2-16, 2010.

AKPINAR, O. et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p.119-125, 2010.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 5, p.660-666, 2009.

ANANIEVA, M et al. Utilization of xylooligosaccharides from different *Lactobacillus* strains. **Journal Bioscience Biotechnology**, p.147-150, 2012.

ÁLVAREZ, C. et al. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p.41-48, 2017.

ARAGON, C. C. et al. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized–stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p.8-14, 2013.

ARO, N., PAKULA, T., PENTTILÄ. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, p. 719-739, 2005.

BAKER, S.; BENNETT, J. An Overview of the Genus *Aspergillus*. **Mycology**, p.3-13, 2007.

BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. **Renewable Energy**, 61p, 2018.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. v. 52 p. 858-875, 2011.

BARLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: A Review. **Scientific Bulletin: Series F. Biotechnologies**, v. 20, n. 1, p.335-342, 2016.

BARRETO, A. R.; ZANCAN, L. R.; MENEZES, C. R. Obtenção de Xilooligossacarídeos por resíduos lignocelulósicos: alternativa para produção de compostos funcionais para alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p.821-836, 2015.

BATTAN, B. et al. Biodiversity of Hemicellulose Degrading Microorganisms and their Enzymes. In: KUHAD, R. C.; SINGH, A. (Ed.). **Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects**. 2007. p. 121.

BRIENZO, M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeo. 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo- SP.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p.199-204, 2009.

BRIENZO, M.; MONTE, J. R.; MILAGRES, A. M. F. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p.113-119, 2012.

BRIENZO, M. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. In: RILEY, G. L. **Food Waste**. Nova Science Publishers, 2016. Cap. 8. p. 155-188.

BRIENZO, M. et al. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p.271-280, 2017.

CANTU-JUNGLES, T. M. et al. Isolation and characterization of a xylan with industrial and biomedical applications from edible açai berries (*Euterpe oleracea*). **Food Chemistry**, v. 221, p.1595-1597, 2017.

CARMONA, Eleonora Cano et al. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, n. 6, p.387-393, 1997.

CARMONA, E. C. et al. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **Fems Microbiology Letters**, v. 166, n. 2, p.311-315, 1998.

CARMONA, E. C. et al. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p.359-364, 2005.

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, n. 1, p.75-85, 2013.

CENSONI, L. B. Dinâmica moléculas e redes complexas no estudo da difusão térmica em xilanases da família 11. 2013. 100 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada Biomolecular) – Instituto de física da São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

CHAPLA, D. et al. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p.215-221, 2012.

CHEN, X. et al. Probiotic Yeast Inhibits VEGFR Signaling and Angiogenesis in Intestinal Inflammation. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

CHEN, Z. et al. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. **Protein Expression and Purification**, v. 154, p.91-97, 2019.

COELHO, et al. Alterações dos componentes nutricionais do pseudocaule de bananeira quando processado visando sua transformação em palmito. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 2001. v.3. 21-30.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p.3-23, 2005.

CORDEIRO, N et al. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 2, p.147-154, 2004.

CREMON, C. et al. Pre- and probiotic overview. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 43, p.87-92, 2018.

CRITTENDEN, R.G., PLAYNE, M.J. Production properties and applications of food grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n.11, p.353-361, 1997.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p.1627-1640, 2012.

DINIZ, T. et al. Uso de subprodutos da bananicultura na alimentação animal. **Revista Colombiana Ciência Animal**, v. 1, n. 6, p.194-212, 2014.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Gcb Bioenergy**, v. 1, n. 1, p.2-17, 2009.

DUTTA, S. K.; CHAKRABORTY, S. Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose of xylan type. **Bioresource Technology**, v. 198, p.642-650, 2015.

FARHAT, W. et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p.370-377, 2017.

FARHAT, W. et al. A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications. **Chemsuschem**, v. 10, n. 2, p.305-323, 2017.

FERIOTTI, D. G. **Proposta de aproveitamento do pseudocaule de bananeira**. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Engenharia de Mauá, São Caetano do Sul, 2010. Disponível em: <<http://maua.br/files/dissertacoes/proposta-de-aproveitamento-do-pseudocaule-da-bananeira-musa-cavendish.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

FIGUEIREDO, F C. **Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço decana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanases fúngicas**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

FILHO, E.X.F. Xilanases. In: SAID, S., PIETRO, R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. v. 1, p. 137-148, 2004.

FILHO, L. C. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2011.

FOMICHEVA, G. M.; VASILENKO, O. V.; MARFENINA, O. E. Comparative morphological, ecological, and molecular studies of *Aspergillus versicolor* tiraboschi strains isolated from different ecotopes. **Microbiology**, v. 75, n. 2, p.186-191, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAO Technical Meeting on Prebiotics: Food Quality and Standards Service. 2007.

FORSTER-CARNEIRO, T. et al. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p.78-88, 2013.

FRANCISCO, M. R. C. M. **Caracterização de isolados de *Aspergillus* provenientes de ambiente hospitalar – identificação molecular e determinação dos padrões de susceptibilidade aos antifúngicos**. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Humana e Ambiente, Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p.1-19, 2010.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GOBINATH, D. et al. Beneficial effect of xylo-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 01, p.40-47, 2010.

GOSWAMI, G K; RAWAT, S. Microbial Xylanase and their applications - A review. **Internacional Journal of Current Research and Academic Review**, v. 3, n. 6, p.436-450, 2015.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p.10-18, 2009.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 1, n. 44, p.121-129, 2001.

IDREES, M et al. Enzymatic saccharification and lactic acid production from banana pseudo-stem through optimized pretreatment at lowest catalyst concentration. *EXCLI Journal*. 12^a ed. 2013. p. 269-281.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil*. v. 29, n. 12, p. 1-82. 2016.

JAGTAP, S. et al. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. **Bioresource Technology**, v. 245, p.283-288, 2017.

JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian J Exp Biol**, v. 3, n. 53, p.131-142, 2015.

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

KALIM, B. et al. Xylanases—from Microbial Origin to Industrial Application. **British Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p.1-20, 2015.

KATCHALSKI-KATZIR, E. et al. Enzyme diffusion and action on soluble and insoluble substrate biopolymers. **Biopolymers**, v. 24, n. 1, p.257-277, 1985.

KERRY, R. G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p.927-939, 2018.

KERSTERS-HILDERSON H, CLAEYSSSENS M, VAN DOORSLAER E, SAMAN E, DE BRUYNE CK. beta-D-Xylosidase from *Bacillus pumilus*. **Methods in Enzymology**, v. 83, p. 631–639, 1982.

KOBYLIAK, N. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, n. 1, p.1-13, 2016

KUMAR, D. et al. Xylanases and their industrial applications: A review. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 17, n. 1, p.353-360, 2017.

KUMAR, S., RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a b-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microb.Lett.**, Amsterdam, v.135, p.287-293, 1996.

LADEIRA, S. A. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *bacillus sp.* 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

LI, K. et al. Analysis of the chemical composition and morphological structure of banana pseudo-stem. **Bioresources**, v. 5, n. 2, p.576-585, 2010. Disponível em: <http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_05_2_0576_Li_FZZL_Anal_Chem_Struc_Banana_Pseudostem>. Acesso em: 23 ago. 2017.

LI, Z et al. In vitro study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp. **International Journal Of Food Sciences And Nutrition**, v. 66, n. 8, p.919-922, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, J. **Banana pseudostem**: properties, nutricional composition and use as food. 252 f. Dissertação (Mestrado) - Chemical Engineering, University Of New South Wales, Australia, 2016.

MAALEJ-ACHOURI, I. et al. Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p.145-152, 2009.

MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus**: Molecular Biology and Genomics. 2010. 238 p.

MADEIRA JUNIOR, J. V. et al. Agro-Industrial Residues and Microbial Enzymes: An Overview on the Eco-Friendly Bioconversion into High Value-Added Products. In: BRAHMACHARI, Goutam; DEMAIN, Arnold L.; ADRIO, José L. (Ed.). **Biotechnology of Microbial Enzymes**: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. 2017. p. 475-500.

MADHUKUMAR, M. S.; MURALIKRISHNA, G. Fermentation of xylo-oligosaccharides obtained from wheat bran and Bengal gram husk by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 6, p.745-752, 2011.

MANDELLI, F. et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p.770-775, 2014.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, p.37-46, 2002.

MEDINA, J.C. Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 3.ed. 1990. 302p.

MENEZES, C. R. Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos. 2007. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

MICHELIN, M. et al. Cellulose from Lignocellulosic Waste. **Polysaccharides**, p.1-33, 2014.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p.461-470, 2005.

MOREIRA, L. R. S.; F. FILHO, E. X. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p.5205-5214, 2016.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, p.251-276, 2013

NGUYEN, Jennifer. **Bifidobacterium vs. Lactobacillus probiotics: what's the difference?** 2018. Disponível em: <<https://www.mygenefood.com/bifidobacterium-vs-lactobacillus-strains/>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

NIGAM, P.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization: Utilization of Agro-Residues. 1st ed. Springer, 2009.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, L et al. Chemical composition of different morphological parts from “Dwarf Cavendish” banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. **Industrial Crops and Products**, v.26, p. 163-172, 2007.

PAËS, G.; BERRIN, J.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p.564-592, 2012.

PALM, M., ZACCHI, G. Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 617–623, 2003

PAMER, Eric G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, v. 352, n. 6285, p.535-538, 2016.

PASANEN, P et al. Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. **Environment International**, v. 23, n. 4, p.425-432, 1997.

PASTOR, J et al. Xylanases: molecular properties and applications. In: **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. p. 65-82, 2007.

PETROVA, P.; PETROV, K. Prebiotic–Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera. **Food Bioconversion**, p.237-278, 2017.

PINEIRO, Maya et al. FAO Technical Meeting on Prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p.156-159, 2008

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. 1997. 523 p.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 67, n.5, p. 577-591, 2005.

PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 13, p. 100-131, 1995.

PREETHI, C.; MURTHY B. G. Physical and Chemical Properties of Banana Fibre Extracted from Commercial Banana Cultivars Grown in Tamilnadu State. **Agrotechnology**, v. 01, n. 11, p.1-3, 2013.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1-4, p.34-43, 2008.

RAHMAN, M. M. et al. Variation of chemical and morphological properties of different parts of banana plant (*Musa paradisiaca*) and their effects on pulping. **International Journal of Lignocellulosic Products**, v. 2, n. 1, p.93-103, 2014.

REID, G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p.3763-3766, 1999.

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.

ROSA et al. Valorização de resíduos da agroindústria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 2., 2011, Foz do Iguaçu. **Palestra**. 2011. p. 98 – 105.

ROJA, M. L.; NEVES, J. M. Caracterização de fibras de bananeira “nanicão” como possível matéria-prima para produção de pasta celulósica para fabricação de papel. In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN CELULOSA Y PAPEL, 2002, Campinas.

SAMALA, A et al. In vitro prebiotic bacterial growth properties of xylooligosaccharides produced by autohydrolysis of corn fiber. **International Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 6, p.305-311, 2015.

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p.62-71, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p.185-194, 2009.

SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; BRIENZO, M. The influence of the heterogeneity, physicochemical and structural properties on the recalcitrance and conversion of sugarcane bagasse. In: Sugarcane: Production, Consumption and Agricultural Management Systems, p. 1-34, 2014.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

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

SINGH, K. et al. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p.287-290, 2011.

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

SOMERA, A. F. et al. Effect of glycosylation on the biochemical properties of β -xylosidases from *Aspergillus versicolor*. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p.270-276, 2009.

SUN, J. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p.195-204, 2004.

TERRONE, C. C. Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas, Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

TOMÉ, R. Atlas Micologia: *Aspergillus versicolor*. 2011. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com.br/2011/07/aspergillus-versicolor.html>>. Acesso em: 26 set. 2017.

VALENTE, J. R. S. Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose.: Possíveis implicações

na Saúde Pública. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia e Segurança Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

VÁZQUEZ, M. J., et al. Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11, p. 387–393, 2000.

WYMAN, C. et al. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: **Polysaccharides: Structural, Diversity and Functional Versatility**. 2005.

XUE, Jian-long et al. A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p.130-138, 2016.

YILMAZ, H. C. et al. Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimisation for industrial processes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 12, p.2597-2605, 2012.

ZANCAN, L. R.; BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. de. Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, pg. 850-860, 2015.

ZHANG, W. et al. Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p.250-258, 2016.

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, n. 5-6, p.473-479, 1998.