República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

BR102024013626A2

(21) BR 102024013626-8 A2

(22) Data do Depósito: 02/07/2024

(43) Data da Publicação Nacional: 13/01/2026

(54) Título: PROCESSO COMBINADO PARA A PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

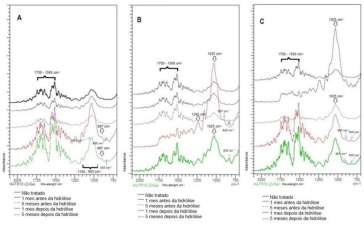
(51) Int. Cl.: C13K 13/00.

(52) CPC: C13K 13/00.

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

(72) Inventor(es): MICHEL BRIENZO; JEFFERSON POLES FELIPUCI; DERLENE ATTILI ANGELIS.

(57) Resumo: PROCESSO COMBINADO PARA A PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS. O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Agricultura e Saúde, mais especificamente a área de alimentos como composto prebiótico e nutracêuticos, compreende um processo combinado para a produção de celo-oligossacarídeos (COS) com bagaço de cana-de-açúcar, que combina pré-tratamento biológico, com fungos das espécies Coniophora puteana (CBMAI 0870), Gloeophyllum trabeum (CBMAI 0872) ou Pleurotus ostreatus (CCIBt 2338), com físico para diminuir a cristalinidade e resistência da biomassa a etapa de hidrólise enzimática.



PROCESSO COMBINADO PARA A PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção, refere-se a um processo combinado para a produção de celo-oligossacarídeos (COS) com bagaço de cana-de-açúcar, por meio do pré-tratamento biológico com fungos das espécies *Coniophora puteana* (CBMAI 0870), *Gloeophyllum trabeum* (CBMAI 0872) ou *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2338), seguido de tratamentos físicos e enzimáticos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O campo de aplicação está relacionado com a Agricultura e Saúde, mais especificamente a área de alimentos como composto prebiótico, nutracêuticos e na área de fármacos para produção de estimulante de microrganismos probióticos.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] As possibilidades de utilização de materiais lignocelulósicos podem ser ampliadas desde a geração de energia térmica e etanol até a produção de subprodutos e moléculas de valor agregado. Para atingir a molécula de interesse, usualmente, a biomassa lignocelulósica é geralmente submetida a um processo para reduzir sua recalcitrância, que é a resistência do material a um pré-tratamento ou hidrólise enzimática. Os principais pré-tratamentos para superar a recalcitrância de um material são químicos, físicos e biológicos, e uma combinação deles, sendo que cada um tem seus limites e vantagens. Os pré-tratamentos físicos e químicos são mais rápidos, porém, demandam mais energia e geram compostos indesejáveis, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento biológico é mais barato e não gera compostos indesejáveis, porém requer um isolamento adequado, sem contaminantes e tempo para o processo. Esses pré-tratamentos podem ser combinados para produzir um material de baixo custo com as mesmas propriedades, uma vez que o processo químico ou físico, que são a parte mais cara do processo, pode ser parcialmente substituído por um pré-tratamento biológico.

Com isso, a tendência atual é utilizar pré-tratamentos biológicos e químicos ou físicos para alcançar melhores resultados com menor custo.

[004] A estrutura da celulose é composta por dímeros de glicose denominados celobiose, e a xilana é a principal hemicelulose presente no bagaço da cana-de-açúcar. A estrutura dos materiais lignocelulósicos geralmente apresenta alta recalcitrância devido à sua organização complexa com a lignina, a qual protege a celulose e a hemicelulose. Na natureza, certos microrganismos são capazes de degradar o complexo lignocelulósico com sua maquinaria enzimática, como bactérias e fungos. A hidrólise enzimática utiliza as enzimas isoladas desses microrganismos para quebrar a estrutura lignocelulósica em unidades menores, liberando xilo-oligossacarídeos (XOS) e celo-oligossacarídeos (COS), a partir de xilana e celulose, respectivamente.

[005] Os pré-tratamentos modificam a estrutura lignocelulósica para facilitar a hidrólise enzimática. Uma característica de um pré-tratamento ácido é solubilizar hemicelulose, enquanto o pré-tratamento alcalino solubiliza hemicelulose e lignina, reduzindo a cristalinidade da celulose. Outros pré-tratamentos, como explosão de vapor e auto-hidrólise são usados para hidrolisar a hemicelulose. O pré-tratamento biológico depende do microrganismo envolvido no processo: fungos de podridão branca, por exemplo, são conhecidos por degradar lignina, enquanto fungos de podridão marrom degradam celulose e hemicelulose.

[006] XOS são produtos não digeríveis da xilana considerados saudáveis devido à sua capacidade de prevenir distúrbios na nutrição humana/animal, tais como distúrbios gastrointestinais e infecções, controle da obesidade e melhor absorção de nutrientes. Além disso, os XOS podem ser utilizados como suplementação alimentar, otimizando os sistemas imunológico e cardiovascular, e atua nas atividades antialérgicas e anti-inflamatórias. XOS apresentam vários graus de polimerização, de 2 a 10 unidades monoméricas, e uma característica que torna este açúcar uma boa molécula prebiótica é sua ampla faixa de pH em termos de estabilidade.

[007] Os COS são oligômeros formados por unidades de D-glicose ligadas por ligações β-1,4, com poucos números de glicose, começando com 2, denominada celobiose. O COS com menor DP (de 3 a 6 unidades de glicose) são solúveis em água, enquanto os COS mais longos tendem a ser insolúveis. Os COS solúveis não são digeríveis pelos seres humanos e podem apresentar efeito prebiótico. *In vitro* estimula o crescimento de bactérias saudáveis, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Essa característica pode ser interessante para a saúde humana, uma vez que nossa microbiota pode ser estimulada pelos COS. Na indústria, os COS são considerados um produto de alto valor, devido à sua baixa disponibilidade e propriedades saudáveis, mas principalmente devido à necessidade de hidrólise para a produção do COS. Existem outros oligossacarídeos não digeríveis, como frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS), de galactose e frutose, respectivamente, conhecidos por serem saudáveis.

[008] A produção de produtos de valor agregado tem sido aprimorada na última década e propõe que diferentes tecnologias sejam estudadas para encontrar formas sustentáveis de produzir mais com menor impacto ambiental. Experimentos usando material pré-tratado biologicamente seguido de hidrólise enzimática têm um enorme potencial para uma produção ecologicamente correta.

[009] O documento "*Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview*" refere-se ao pré-tratamento e uma etapa importante envolvida na produção de bioetanol a partir de biomassa lignoceluósica. Embora vários regimes de pré-tratamento estejam disponíveis, o pré-tratamento biológico parece ser promissor por ser um processo ecologicamente correto e não há geração de inibidores durante o processo. No cenário atual existem poucas limitações na utilização desta estratégia para processos em escala piloto. O primeiro e mais importante é o longo tempo de incubação para uma deslignificação eficaz. Isto pode ser minimizado até certo ponto usando um consórcio microbiano adequado. Há uma necessidade urgente de atividades de pesquisa e desenvolvimento e de ajuste fino do processo para o desenvolvimento de uma metodologia economicamente mais

viável. Esta revisão apresenta uma visão geral de vários aspectos do pré-tratamento biológico, enzimas envolvidas no processo, parâmetros que afetam pré-tratamento biológico, bem como perspectivas futuras.

[010] O documento "*Biomass for bioenergy recent trends and future challenges (fungal pretreatment of lignocellulosic materials)*" refere-se a biomassa que deve ser convertida em carboidratos fermentáveis através de processo de pré-tratamento para quebrar a estrutura complexa em seus constituintes antes da fermentação. Para materiais lignocelulósicos, a porção de lignina é extremamente resistente à degradação devido à ligação cruzada de hidrogênio entre a celulose e a hemicelulose. O pré-tratamento biológico usando fungos de podridão branca é um método ecologicamente correto como método de desconstrução de biomassa em comparação com outros convencionais. Esses fungos podem excretar enzimas ligninolíticas para degradar a lignina, embora a taxa de desconstrução seja lenta. O artigo de revisão citado se concentra nos fungos e processo de pré-tratamento ou deslignificação utilizando espécies de podridão branca, pois é uma etapa importante para aumentar a conversão da matéria-prima.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[011] O presente pedido de patente, tem por objetivo promover a hidrólise da celulose, liberando celo-oligossacarídeos (COS) para aplicação em alimentos como composto prebiótico, nutracêuticos, e na área de fármacos para produção de estimulante de microrganismos probióticos.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção tem como vantagem fornecer um pré-tratamento biológico, que apresenta a capacidade de diminuir a recalcitrância da biomassa, combinado as etapas moagem e hidrólise enzimática, aumentando, assim, o rendimento da conversão da matéria-prima (bagaço de cana-de-açúcar, ou outras biomassas contendo celulose) no produto celo-oligossacarídeos (COS).

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[013] A Figura 1 apresenta gráficos que ilustram os espectros FTIR-ATR das amostras, em que: a Figura 1A ilustra os espectros FTIR-ATR de amostras de bagaço pré-tratado com *C. puteana* (CBMAI 0870) e não tratadas; a Figura 2B ilustra os espectros FTIR-ATR de amostras de bagaço pré-tratado com *G. trabeum* (CBMAI 0872) e não tratadas; a Figura 2C ilustra os espectros FTIR-ATR de *amostras de bagaço* pré-tratado com *P. ostreatus* (CCIBt 2338) e não tratadas.

[014] A Figura 2 ilustra as imagens do microscópio eletrônico de varredura do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e biologicamente pré-tratado.

[015] Na Figura 3 encontram-se gráficos que ilustram a difração de raios-x do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento biológico e moinho de bolas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Materiais e métodos

[016] O bagaço de cana foi fornecido por uma fábrica local (Usina São João, Araras, SP, Brasil). O bagaço industrial foi umidificado a 75% e transferido para sacos de polipropileno. Um tubo “falcon” foi colocado na parte central de saco como abertura para introdução do inóculo fúngico após o conjunto ser autoclavado duas vezes a 121 °C por 1 h. A amostra controle foi preparada da mesma forma, porém não foram inoculados fungos. Foram preparadas 15 bolsas/sacos para cada cepa fúngica.

[017] Os microrganismos utilizados neste pedido de patente foram *Coniophora puteana* (CBMAI 0870) e *Gloeophyllum trabeum* (CBMAI 0872) (Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e da Indústria, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil) e *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2338) (do Instituto Botânico de São Paulo). Podem ser utilizados outros microrganismos com potencial de ação sobre a lignina ou sobre a recalcitrância da biomassa.

[018] Os microrganismos foram cultivados por 7 a 15 dias a 25 ºC em ágar batata-dextrose (BDA), para posterior inoculação na bolsa de polipropileno com o bagaço umedecido. Dentro da bolsa de polipropileno, cada cultura cresceu por 1 a 5 meses a 25 ºC. Mensalmente, um saco foi coletado como amostra, e o bagaço pré-tratado

biologicamente foi seco à temperatura ambiente, moído a 20-*mesh* e seco em estufa a 60 °C por 24 h. Uma fração do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente foi moída em moagem de bolas por 1 h para experimentos posteriores. As amostras foram separadas de acordo com o fungo aplicado no pré-tratamento.

[019] Após o pré-tratamento biológico, e também a amostra controle, foi realizada a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar (CQ) da seguinte forma: em frasco “Schott” de 100 mL foram adicionados 0,3 g de bagaço (base seca) com 3 mL de ácido sulfúrico a 72 % e deixado reagir em banho-maria a 45 °C por 7 min. Após o tempo de reação, 84 mL de água destilada foram adicionados e então autoclavados por 30 min a 121 ºC. Em seguida, uma etapa de filtração utilizando um cadinho (com poro de cerca de 16 µm), separou as frações líquida e sólida. A fração líquida foi utilizada para determinar a lignina solúvel e os açúcares e ácido acético, enquanto a fração sólida foi seca por 24 h em estufa a 105 °C para determinação da lignina insolúvel. A lignina solúvel foi medida em espectrofotômetro a 215 e 208 nm, utilizando-se um método padrão. A lignina total foi relatada, significando a soma de lignina solúvel e insolúvel.

[020] No presente pedido de patente, foram utilizadas duas enzimas: coquetel de celulase (Cellic Ctec2 – Novozymes, com 1455 UI/mL de endoglucanase) e xilanase. A xilanase foi produzida a partir de um isolado de *Aspergillus versicolor*, o qual foi cultivado em trigo aveia e a xilanase purificada por cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 (20 x 1,8 cm) equilibrada com o tampão de diálise e coluna Sephadex G-75 (70 x 1,8 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A endoxilanase purificada apresentou atividade de 414,4 UI/mL.

[021] Para todos os experimentos, a hidrólise enzimática foi realizada com 0,1 g de material, em 5 mL de solução tampão acetato de sódio em pH 5,2. Foi realizada por 24 h a 50 ºC (para celulase) ou 55 ºC (para xilanase) em agitador a 150 rpm. Após hidrólise, as amostras foram fervidas por 7 min, filtradas em filtros de 0,22 µm e passaram por HPLC para determinação dos açúcares. A hidrólise enzimática foi

realizada em três diferentes etapas, diferindo quanto ao método de moagem, enzima e carga enzimática. O primeiro experimento foi a hidrólise enzimática com celulase, utilizando material moído em moinho de facas (20-*mesh*) e três cargas/atividades diferentes: 20 UI/g, 50 UI/g e 100 UI/g. O segundo utilizou coquetel de celulase, com o material moído em moagem de bolas, utilizando carga enzimática intermediária (50 UI/g). Neste experimento, as amostras cultivadas por 1 e 5 meses foram hidrolisadas. A moagem das bolas foi realizada em reator de 150 mL, utilizando-se esfera metálica de 110 g com 617 golpes por minuto, em moinho de bolas modelo MA 350 (MARCONI Equipamentos para Laboratórios Ltda.). No terceiro experimento, as amostras foram moídas com moinho de faca, e a hidrólise foi realizada com xilanase com carga enzimática intermediária (50 UI/g).

[022] Bagaço triturado sem tratamento e biologicamente pré-tratado antes e após hidrólise enzimática com celulase com 50 UI/g foi analisado por reflectância total atenuada (ATR) no infravermelho (FTIR), usando espectrofotômetro Shimadzu FTIR-IRAffinity-1S. As amostras pré-tratadas foram analisadas por FTIR-ATR foram provenientes apenas do primeiro e último mês de cultivo, uma vez que o objetivo deste experimento foi estudar a diferença causada pelo pré-tratamento biológico e hidrólise enzimática na estrutura lignocelulósica.

[023] As amostras moídas com 20-*mesh* não tratadas e pré-tratadas biologicamente por três meses consecutivos foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura.

[024] As amostras analisadas foram do primeiro e último mês de cultivo para cada microrganismo, e também com material não tratado. Para todas as amostras foi comparada a moagem com moinho de bolas e o material selecionado a 20-*mesh*. Utilizou-se difratômetro de raio-x equipado com ânodo de cobre (Cu). Operado a tensões de 40 kV e 30 mA em uma varredura normal de 10 ° - 100 ° a uma velocidade de 2 °/min, e os difratogramas de raios-x das amostras foram registrados para 2θ. A proporção de regiões cristalinas nas amostras foi determinada a partir do índice de cristalinidade (CrI), com a Equação 1:

$$CrI = \left[\frac{I20 - Iam}{I20}\right] * 100$$ Equação 1

[025] Onde I20 é a intensidade da difração plana a 2θ = 20°, e Iam representa a intensidade de espalhamento de fundo.

[026] A análise estatística foi realizada no software DX3Trial-expert. A ANOVA foi utilizada para comparar as diferenças estatísticas entre o material não tratado com o material biologicamente pré-tratado. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[027] O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à caracterização química para determinação da porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 1).

[028] É importante ressaltar que, na tabela de composição química, foi realizado o teste ANOVA comparando-se apenas as amostras não tratadas com as amostras correspondentes a cada microrganismo, não comparando os microrganismos propriamente ditos.

[029] A porcentagem de lignina aumentou após o pré-tratamento biológico com *G. trabeum* e *C. puteana*, atingindo 60,49% e 25,24% após um mês de cultivo, respectivamente, enquanto as amostras não tratadas apresentaram 21,55% de lignina. Neste caso, ambos os fungos alteraram a porcentagem (relativa aos demais componentes) de lignina da biomassa. Entretanto, manteve-se estatisticamente semelhante para *P. ostreatus*, exceto para a amostra pré-tratada biologicamente no quarto mês, atingindo 34,60% de teor de lignina. O aumento da porcentagem de lignina está relacionado às modificações na estrutura lignocelulósica, uma vez que os fungos tendem a consumir primeiramente açúcares mais prontamente disponíveis do que a lignina que apresenta uma molécula mais complexa, tridimensional e aromática.

[030] Para o teor de celulose, quase todas as amostras foram estatisticamente semelhantes à amostra não tratada, exceto aquela que foi pré-tratada

biologicamente com *C. puteana* após 5 meses. O maior teor de celulose foi observado após 2 meses de pré-tratamento biológico com *G. trabeum*, atingindo 45,40%, enquanto o menor foi no último mês de cultivo com *C. puteana*: 30,69%. Para hemiceluloses totais, observou-se decréscimo *para G. trabeum* e *C. puteana*, de 27,66% para amostras não tratadas para 16,7% após um mês de cultivo com *G. trabeum*, e 15,17% para *C. puteana* após quatro meses do pré-tratamento biológico. Entretanto, a porcentagem de hemiceluloses aumentou após 5 meses de cultivo com *P. ostreatus,* chegando a 38,86%. De modo geral, o conteúdo de hemicelulose variou em quase todas as amostras, exceto naquelas de 1 mês de cultura com *C. puteana* e *P. ostreatus.* O mesmo padrão para o conteúdo de celulose e hemicelulose após pré-tratamento biológico com esses fungos foi relatado na literatura.

[031] A preferência pelos açúcares ou lignina está relacionada ao arsenal enzimático de microrganismos. Os fungos de podridão branca preferem degradar a lignina, enquanto os fungos de podridão marrom degradam polissacarídeos. Entretanto, independentemente de qual macromolécula foi consumida, uma consequência da degradação é a alteração na estrutura lignocelulósica e sua recalcitrância. Embora os valores de caracterização química mostrem as porcentagens (proporção) de cada macromolécula na biomassa após pré-tratamento biológico, este trabalho visa a produção de COS e XOS, consequentemente, a redução da recalcitrância tem um grande impacto nos resultados finais.

Tabela 1: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado biologicamente.

Microrganismo	Tempo de Crescimento (meses)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina total (%)
Tratada	0	$40.53 \pm 5.41^{a,b}$	27.66 ± 3.15^{a}	21.55 ± 0.20^{a}
Gloeophyllum trabeum (CBMAI 0872)	1	37.60 ± 1.63^{a}	16.7 ± 1.74^{b}	60.49 ± 1.70^{b}
	2	45.40 ± 0.96^{b}	20.08 ± 2.09^{b}	53.06 ± 4.62^{b}
	3	37.14 ± 1.07^{a}	17.57 ± 4.72^{b}	$33.57 \pm 1.65^{a,d}$
	4	$42.42 \pm 2.94^{a,b}$	16.06 ± 1.75^{b}	57.70 ± 1.41^{b}
	5	$43.30 \pm 1.16^{a,b}$	15.66 ± 0.25^{b}	34.95 ± 3.91^{d}
Coniophora puteana (CBMAI 0870)	1	41.55 ± 0^{a}	$22.12 \pm 5.44^{a,c}$	$25.24 \pm 0.38^{a,c}$
	2	43.27 ± 0.06^{a}	$16.22 \pm 0.08^{b,c}$	41.58 ± 0.77^{b}
	3	41.21 ± 1.53^{a}	$17.98 \pm 0.46^{b,c}$	$38.09 \pm 7.91^{b,c}$
	4	32.81 ± 1.72^{c}	15.17 ± 0.11^{b}	42.75 ± 2.74^{b}
	5	30.69 ± 0.00^{c}	15.24 ± 0.19^{b}	$36.63 \pm 1.86^{b,c}$
Pleurotus ostreatus (CCIBt 2338)	1	35.84 ± 0.54^{a}	$32.33 \pm 3.58^{A,C}$	$26.43 \pm -^{a,b}$
	2	40.12 ± 0.06^{a}	$35.79 \pm 3.85^{b,c}$	$29.72 \pm 4.86^{a,b}$
	3	39.51 ± 0.36^{a}	$38.35 \pm 1.74^{b,c}$	$26.07 \pm 2.19^{a,b}$
	4	41.29 ± 0.92^{a}	$38.34 \pm 0.63^{b,c}$	34.60 ± 3.17^{b}
	5	40.28 ± 1.00^{a}	38.86 ± 0.80^{b}	$26.47 \pm 0.52^{a,b}$

Diferenças estatísticas significativas (p-valor menor que 0,05) foram simbolizadas por letras distintas na mesma coluna para cada microrganismo.

[032] A hidrólise enzimática ocorreu tanto em amostras de bagaço de cana-de-açúcar não tratadas quanto em pré-tratadas biologicamente, incluindo moinhos de bolas e facas. Neste pedido de patente, três diferentes tipos de produção de COS e XOS por hidrólise enzimática foram testados: bagaço moído em moinho de facas (20-*mesh*) não tratado e pré-tratado biologicamente usando 20, 50 e 100 UI/g de celulase (endoglucanase); bagaço moído em bola, não tratado e pré-tratado biologicamente, utilizando 50 UI/g de celulase em dois períodos de cultivo; e bagaço moído com 20-*mesh* não tratado e pré-tratado biologicamente com 50 UI/g de xilanase. O objetivo de diferenciar as cargas enzimáticas foi comparar sua eficácia sobre o bagaço moído com 20-*mesh*, após o pré-tratamento biológico. Além disso, foi feita uma comparação utilizando o material após a moagem em moinho de bolas. A análise estatística comparou as amostras não tratadas com cada

microrganismo (coluna da tabela 2) e, em seguida, as cargas enzimáticas (linha da tabela 2).

[033] A Tabela 2 apresenta o bagaço moído a 20-*mesh*, hidrolisado por celulase a 20, 50 e 100 UI/g, e a tabela que representa a quantidade de glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose, celohexaose e maiores que celohexaose, individualmente, está na tabela 3. Para a maioria das amostras, o rendimento de COS foi melhor usando 100 UI/g de celulase. No entanto, a diferença entre 50 e 100 UI/g não foi significativa. O melhor resultado foi de 26,39% de produção de COS no quinto mês de pré-tratamento biológico com *Coniophora puteana* utilizando 50 UI/g de carga enzimática.

[034] O material tratado com *G. trabeum* e hidrólise enzimática produziu mais COS do que o não tratado, porém a maioria das amostras foi estatisticamente semelhante, exceto aquelas cultivadas por 5 meses (20 UI/g), atingindo 14,47% de COS; 1, 3 e 5 meses (50 UI/g), atingindo 12,37%, 12,76% e 11,38% de COS, respectivamente; e 1 mês (100 UI/g), atingindo 16,91% de COS. *C. puteana* seguiu o mesmo padrão de *G. trabeum.* Neste caso, as amostras diferentes foram cultivadas por 5 meses (20 UI/g e 100 UI/g) e 4 e 5 meses (50 UI/g). Um padrão diferente foi mostrado por *P. ostreatus* quando hidrolisado enzimaticamente com celulose 50 e 100 UI/g: a maioria dos resultados apresentou menor rendimento de COS em relação à biomassa não tratada, atingindo apenas 3,52% de rendimento de COS usando 50 UI/g de celulase no material cultivado por dois meses.

[035] Considerando a comparação da produção de COS entre os próprios fungos, é importante ressaltar que algumas amostras apresentaram diferenças significativas durante todos os meses, como o quinto mês para *G. trabeum* e o terceiro mês para *P. ostreatus* quando se utilizou 20 UI/g, e o quinto mês para *C. puteana* com 50 e 100 UI/g de celulase.

Tabela 2: Conversão de COS (%) após hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente utilizando três diferentes cargas enzimáticas de celulase.

Amostras (moídas com 20-mesh)	Tempo de cultivo (meses)	Carga Enzimática		
		20 UI/g	50 UI/g	100 UI/g
Tratada	-	2.42 ± 2.57^{aA}	5.65 ± 1.56^{aA}	9.39 ± 4.15^{aA}
Gloeophyllum trabeum (CBMAI 0872)	1	4.61 ± 0.64^{aA}	12.37 ± 0.04^{bA,B}	16.91 ± 5.33^{bB}
	2	4.10 ± 2.51^{aA}	7.04 ± 2.12^{aA}	10.11 ± 0.83^{a,bA}
	3	6.52 ± 2.50^{aA}	12.76 ± 2.10^{bB}	14.97 ± 0.08$^{a, bB}$
	4	5.96 ± 1.55^{aA}	8.08± 2.11^{a,cA}	9.17 ± 0.66^{aA}
	5	14.47 ± 1.63^{bA}	11.38 ± 0.62^{b,cA}	11.51 ± 3.98^{a,bA}
Coniophora puteana (CBMAI 0870)	1	2.30 ± 0^{aA}	4.87 ± 0.96^{aA}	6.58 ± 2.69^{aA}
	2	4.70 ± 0^{aA}	9.77 ± 0.88^{a,cA}	10.86 ± 3.58^{aA}
	3	5.79 ± 1.58^{aA}	9.01 ± 2.98^{a,cA,B}	13.22 ± -^{aB}
	4	10.07 ± 2.08^{aA}	12.46 ± 0.81^{b,cA}	11.78 ± 1.96^{aA}
	5	21.79 ± 7.09^{bA}	26.39 ± 3.29^{dA}	25.22 ± 7.29^{bA}
Pleurotus ostreatus (CCIBt 2338)	1	5.24 ± -^{a,bA}	5.93 ± 0.13^{aA}	6.21 ± 1.30^{a,bA}
	2	5.61 ± -^{a,bA}	3.52 ± 1.39^{aA}	5.60 ± 0.75^{a,bA}
	3	7.80 ± 1.14^{bA}	4.69 ± 1.14^{aB}	4.77 ± -^{bA,B}
	4	4.09 ± 1.29^{aA}	6.40± 1.72^{aA}	6.32 ± 0.62^{a,bA}
	5	5.24 ± 0.71^{a,bA}	4.68 ± 1.03^{aA}	4.53 ± 1.10^{bA}

Diferenças estatísticas significativas (p-valor menor que 0,05) foram simbolizadas por letras distintas na mesma coluna e linha para cada microrganismo.

[036] A Tabela 3 mostra a conversão (%) de COS da celulase aplicada ao bagaço de cana pré-tratado biologicamente após moagem de bola, incluindo as quantidades de glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose, celohexaose e açúcares maiores que celohexaose, individualmente, nas mesmas condições. Neste experimento, foram selecionados apenas dois meses de cultivo. A amostra não tratada apresentou o menor rendimento de COS (8,87%). Para o material pré-tratado biologicamente com *G. trabeum* o melhor resultado foi de 22,58%, cultivado por 1 mês. Para *Coniophora puteana* e *Pleurotus ostreatus*, o melhor resultado foi no quinto (36,65%) e quarto mês (16,11%) de cultivo, respectivamente. O valor de 36,65% de rendimento de COS para *C. puteana* foi o melhor resultado para este experimento: mais que o dobro de conversão de COS

em relação à amostra correspondente ao primeiro mês. Uma similaridade estatística foi observada apenas para as amostras representadas pelo mês 5 para *G. trabeum* e mês 1 para *P. ostreatus.* Já as demais amostras apresentaram diferenças significativas.

[037] O resultado da conversão de COS (tabela 3), onde todas as amostras foram moídas com moagem de bolas, foi maior do que qualquer outra amostra moída a 20-*mesh*, incluindo aquelas em que a hidrólise enzimática usou 100 UI/g de celulase. A moagem de bolas provavelmente reduziu a recalcitrância da biomassa, então a carga enzimática intermediária foi suficiente para alcançar uma maior conversão de COS.

[038] A moagem de bolas já era utilizada como potencializador para hidrólise enzimática de materiais celulósicos. O objetivo destes estudos foram produção de glicose, açúcar monomérico, diferente da presente proposta. MAIS *et al (*2002) utilizaram a moagem de bolas para aumentar a hidrólise da celulose *em Pseudotsuga menziesii* (*Pinophyta, Plantae*) tanto em temperatura ambiente (25 ºC) quanto a 45 ºC. Neste caso, foi relatado um pré e pós-tratamento na remoção da lignina. WU*, et al, (*2021) utilizaram a moagem de bolas para aumentar a hidrólise enzimática *em Populus tremuloides* (Magnoliophyta, Plantae) e relataram 66,5% de glicose em baixa dose enzimática (10 FPU/g). A diferença neste trabalho veio da etapa de moagem: as amostras foram moídas intermitentemente para otimizar a hidrólise enzimática, enquanto neste pedido de patente a moagem e a hidrolisação foram realizadas em diferentes etapas.

[039] Embora esses experimentos não tenham como objetivo produzir COS, o efeito da moagem de bolas usada em conjunto com a hidrólise enzimática foi claro. De fato, a combinação da moagem de bolas com outros métodos para melhorar processos enzimáticos ou produção de algum produto à base de biomassa são comuns na literatura. No entanto, há uma escassez de literatura sobre experimentos usando moagem de bolas e pré-tratamento biológico para aumentar a hidrólise enzimática para produção de COS. Os resultados mostram o grande

potencial desta técnica, sendo que a moagem de bolas após pré-tratamento biológico pode ser utilizada em conjunto para outros fins.

Tabela 3: Conversão de COS (%) após hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente moído com bola utilizando 50UI/g de celulase.

Amostras (moídas com moinho de bolas)	tempo de cultivo	Carga enzimática							
		50 UI/g							
Parede celular	Mês	Glicose	C2	C3	C4	C5	C6	>C6	COS
Tratada		33.24	7.21	0	0.1	0	1.58	0	8.87± 0.28[a]
G. trabeum	1	46.26	15.28	1.29	0.1	1.48	4.44	0	22.58 ± 1.64[b]
	5	30.28	5.24	0	0.44	0.39	3.50	0	9.56 ± 0.36[a]
C. puteana	2	32.55	10.12	0.98	0.09	1.11	3.35	0.01	15.64 ± 1.34[b]
	5	64.13	22.83	1.97	0.13	1.6	10.12	0.01	36.65 ± 2.52[c]
P. ostreatus	1	38.83	6.66	0	0.11	0	2.10	0	8.86 ± 0.87[a]
	4	48.58	11.39	0.69	0.25	0.72	3.08	0	16.11 ± 1.11[b]

Diferenças estatísticas significativas (p-valor menor que 0.05) foram simbolizadas por letras distintas na mesma coluna para cada microrganismo. *C1* glicose; *C2* celobiose; *C3* celotriose; *C4* celotetraose; *C5* celopentaose; *C6* celohexaose; > C6 cadeias maiores que a celohexaose. *COS* glico-oligossacarídeos = C2 + C3 + C4 + C5 + C6 + > C6

[040] A produção de XOS foi avaliada utilizando-se xilanase (50 UI/g) aplicada em material com partícula de 20-*mesh* não tratado e biologicamente pré-tratado (Tabela 4). A amostra não tratada atingiu 2,95% de conversão de XOS. Nos inóculos com *G. trabeum e* C. puteana quase todas as amostras converteram mais de 40% de XOS, atingindo 78,56% na amostra pré-tratada com o primeiro, após um mês de cultivo. As amostras pré-tratadas com *C. puteana*, apresentam o melhor resultado com 5 meses de cultivo, atingindo 66,26% de produção de XOS. O pré-tratamento biológico com *P. ostreatus* obteve a menor conversão de XOS de XOS no primeiro mês de cultivo, 9,17%. Para a produção de XOS, a comparação estatística revelou diferenças significativas entre todas as amostras em relação à não tratada, o que significa que todos os tratamentos melhoram o processo.

[041] A produção de XOS ocorre através da quebra da ligação glicosídica na cadeia xilana. Para a produção de XOS, existem poucos estudos na literatura utilizando uma técnica de moagem e um pré-tratamento biológico em conjunto. Usualmente, é realizada por meio de pré-tratamentos químicos, físico-químicos, ou hidrólise enzimática, visando as indústrias alimentícia, médica e farmacêutica. Os experimentos com XOS alcançaram 67,43% de conversão de XOS utilizando endoxilanase de *Aspergillus versicolor*, com 65 UI/g de carga enzimática por 24 h a 55 °C em bagaço de cana-de-açúcar e folha, enquanto este experimento obteve melhores resultados (78,12 % após 1 mês de cultivo com *Gloeophyllum trabeum)* utilizando menos enzima, porém, neste caso foi utilizada a enzima diretamente na xilana, o que pode otimizar os resultados.

Tabela 4: Produção de XOS após hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado biologicamente.

Amostras (20 malhas)	Epoca de cultivo	Carga enzimática							
		50 UI/g							
Parede celular	Mês	Xilose	X2	X3	X4	X5	X6	>X6	XOS
Tratada		45.38	0	0	0.06	0	0	2.90	2.95 ± 0.10^{a}
G. trabeum	1	98.16	21.41	9.68	0.12	0	0	47.35	78.56 ± 0.03^{b}
	2	71.55	16.39	6.55	0.08	0	0	31.74	54.75 ± 0.43^{c}
	3	36.13	0	3.63	0.08	0.07	0	38.22	41.99 ± 5.92^{d}
	4	106.31	0	3.56	0.11	0	0	38.45	42.12 ± 6.18^{d}
	5	49.22	0	10.96	0.11	0	0	39.02	50.08 ± 5.61^{c,d}
C. puteana	1	74.00	0	0	0.08	0	4.86	10.37	15.31 ± 0.01^{b}
	2	88.36	0	9.39	1.19	1.34	0	39.13	51.05± 1.02^{c}
	3	80.57	0	6.80	1.72	0	0	36.63	45.15 ± 1.20^{d}
	4	102.94	0	6.71	0.50	0	0	41.58	48.78 ± 1.82^{d}
	5	117.46	0	4.43	0.11	0	0	61.73	66.26± 10.41^{c}
P. ostreatus	1	48.76	0	0	0.05	0	0	9.13	9.17 ± 0.001^{b}
	2	45.12	0	0	0.04	0	0	7.40	7.44 ± 0.03^{c}
	3	47.42	0	0	0.04	0	0.92	7.77	8.72 ± 0.44^{b}
	4	44.21	0	0	0.04	0	0	9.05	9.09 ± 0.46^{b}
	5	42.52	0	0	0.04	0	0.76	6.94	7.73 ± 0.44^{c}

Diferenças estatísticas significativas (p-valor menor que 0,05) foram simbolizadas por letras distintas na mesma coluna para cada microrganismo. *X1 xilose*; *x2* xilobiose; *X3* xilotriose; *X4* xilotetraose; *X5* xilopentaose; *X6* xilohexaose; > X6 cadeias maiores que a xilohexaose. Xilo-oligossacarídeos XOS = X2 + X3 + X4 + X5 + X6 + > X6

[042] A FTIR-ATR foi aplicada em material não tratado e pré-tratado biologicamente em diferentes períodos de cultivo e antes e após hidrólise enzimática utilizando

celulase com 50 UI/g de carga enzimática (Figura 1). Todas as amostras foram moídas em 20-*mesh*. A Tabela 5 apresenta os comprimentos de onda correspondentes aos grupos funcionais no bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5: Bandas de absorbância FTIR-ATR em biomassa lignocelulósica.

Número da onda	Grupo funcional	Polímero	Referência
1735	C = O alongamento	Hemicelulose	42, 43
	Estiramento da ligação éster-carbonila da unidade de ácido p-cumárico	Lignina	44
1600	Vibração do anel aromático	Lignina	45
1510			
1425			
1245	C–O do grupo acetila	Hemicelulose	46
	Vibrações das unidades de siringil e guaiacil	Lignina	47
1161	Anel de piranose por vibração C–O–C	Celulose hemicelulose	48, 49
1050	Vibrações C–O–C na região anomérica das xilanas	Hemicelulose	50, 51
897	Estiramento C–O–C de ligações β-glicosídicas	Celulose hemicelulose	52, 53, 54
833	C–H fora do plano em unidades p-hidroxifenila	Lignina	55

[043] Ambas as amostras de *C. puteana* e *P. Ostreatus* mostraram as bandas entre 1750 – 1500 cm^{-1} após hidrólise enzimática. Sabe-se que esta região corresponde ao grupo funcional de estiramento C=O não conjugante da hemicelulose e C=C que se estica da vibração dos anéis aromáticos da lignina, respectivamente. As bandas em torno de 1510 cm^{-1} são evidentes em todas as amostras após hidrólise enzimática, mostrando uma modificação na estrutura da lignina após a hidrólise enzimática com celulase, uma vez que a lignina e os açúcares estão estritamente ligados na parede celular da planta. A banda 835 cm^{-1} também diz respeito à lignina (C-H fora do plano em unidades p-hidroxifenila) e é evidente em todas as amostras após hidrólise enzimática.

[044] Todas as amostras hidrolisadas enzimaticamente também apresentaram um pico no comprimento de onda de 1025 cm^{-1}. Essa banda está entre uma região (897 e 1159 cm^{-1}) que indica a presença de hemicelulose e celulose no material, especificamente as ligações C-O-C β-glicosídicas entre as unidades de açúcar em celulose e hemiceluloses, mostrando modificação na estrutura dos polissacarídeos,

especificamente uma formação de ligação glicosídica. Essa região também abrange a banda de 897 cm^{-1}, que é atribuída a vibrações pertencentes a polissacarídeos, o que também é evidente em todas as amostras após hidrólise enzimática.

[045] Todas as amostras não hidrolisadas enzimaticamente apresentaram os mesmos padrões da amostra não tratada, exceto a banda de 1025 cm^{-1} no *P. ostreatus.* Nesse caso, a estrutura dos polissacarídeos pode sofrer modificações pela ação do próprio microrganismo. A similaridade do material antes da hidrólise enzimática com o material não tratado demonstra que a principal modificação na estrutura lignocelulósica foi feita somente após a hidrólise enzimática.

[046] Microscópio eletrônico de varredura foi aplicado para comparar o grau de modificação física entre bagaço de cana-de-açúcar não tratado e biologicamente pré-tratado (Figura 2). Três meses foram analisados em sequência em comparação com a biomassa não tratada para mostrar a modificação contínua provocada pela ação do fungo. As setas mostram clareiras formadas pelo crescimento dos fungos, além da degradação contínua durante o experimento.

[047] O bagaço de cana-de-açúcar não tratado apresentou estrutura mais homogênea e estrutura preservada. Percebeu-se que a degradação da biomassa pelos fungos iniciou-se na parede celular, onde ocorre a modificação estrutural, alterando sua recalcitrância e composição química. Na parede celular, os componentes (lignina, celulose e hemicelulose) são degradados por enzimas fúngicas, que podem ser mais ou menos específicas para cada macromolécula. Cada microrganismo possui seu próprio arsenal enzimático, com formas particulares de degradar a biomassa: alguns fungos de podridão branca não degradam completamente o complexo lignina para atingir os açúcares, uma vez que apenas uma modificação estrutural parcial na parede celular pode permitir que enzimas de maior tamanho molecular acessem os polissacarídeos.

[048] A degradação da biomassa por *G. trabeum,* C. puteana *e P. ostreatus* pode ser observada na Figura 2, principalmente quando comparado o início e o final do crescimento fúngico. Essas imagens esclarecem como os microrganismos

modificam a estrutura lignocelulósica para acessar a celulose e a hemicelulose durante o processo de degradação. As setas evidenciam a modificação estrutural na parede celular, enquanto a biomassa não tratada permanece intacta.

[049] A difração de raios-x foi aplicada para observar a cristalinidade na estrutura lignocelulósica, comparando a moagem de facas e bolas (Figura 3). A análise da difração de raios-x revela o pico, ou seja, as amostras possuem um índice de cristalinidade.

[050] Dois picos foram observados em todas as amostras utilizando moagem por faca: o primeiro acima de 16 θ e o segundo acima de 21-22 θ. Seiwert *et al* (2021) relataram que o 18,2 θ está relacionado ao xilana organizado, o que pode ser o caso no pico a 16º. O pico em 21-22 θ está relacionado à estrutura organizada da celulose em ~22,8 θ. Comparando-se a curva referente às amostras moídas com esferas, não foi possível determinar a cristalinidade, incluindo as não tratadas. Neste caso, o pico não estava mais em 22 θ. Essa característica da curva indica baixa cristalinidade da cadeia de celulose, o que significa que o método de moagem de bolas foi, de fato, eficiente na desconstrução da estrutura lignocelulósica. Esse padrão foi mostrado por todas as amostras.

REIVINDICAÇÃO

1. PROCESSO COMBINADO PARA PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS, com bagaço de cana-de-açúcar, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- Pré-tratamento biológico da matéria-prima (bagaço de cana-de-açúcar) umidificada a 75%, com os fungos *Coniophora puteana* (CBMAI 0870), *Gloeophyllum trabeum* (CBMAI 0872) e *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2338) durante 1 a 5 meses a 25 °C;

- Tratamento físico em moinho de facas (20-mesh) ou moagem de bolas (aspecto em pó), seguido de secagem em estufa a 60 °C por 24 h;

- Tratamento enzimático para hidrólise com coquetel de celulase (20, 50 e 100 UI/g) ou xilanase (50 UI/g), em que a hidrólise enzimática foi realizada com 0.1 g de material, em 5 mL de solução tampão acetato de sódio em pH 5,2, então foi realizada por 24 h a 50 ºC (para celulase) ou 55 ºC (para xilanase) em agitador a 150 rpm, após hidrólise, as amostras foram fervidas por 7 min, filtradas em filtros de 0,22 µm e passaram por HPLC para determinação dos açúcares.

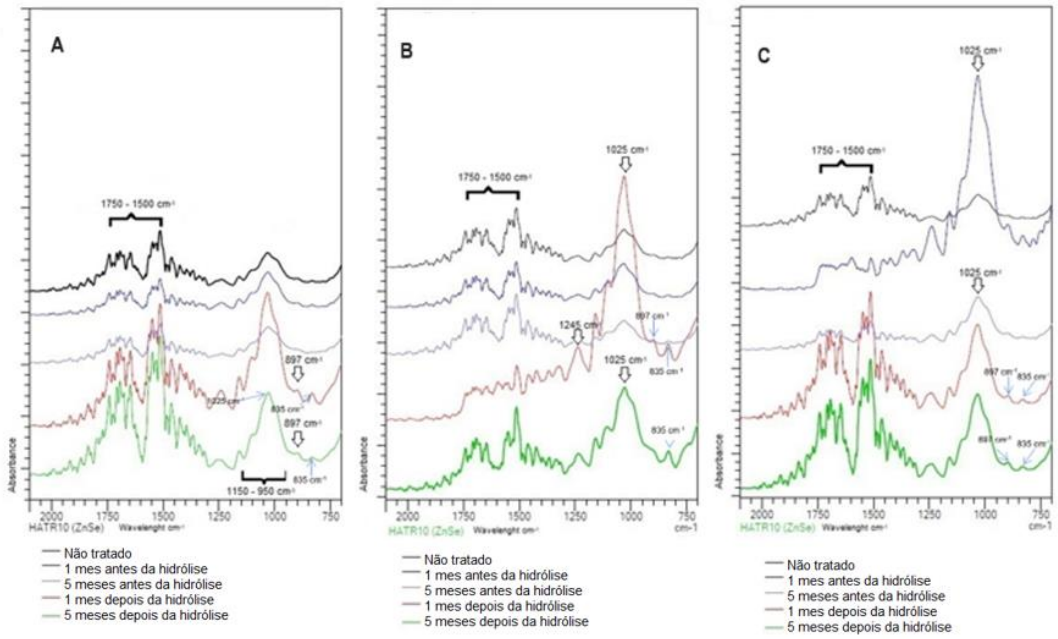

A
B
C
1750 - 1500 cm-1
1150 - 950 cm-1
1025 cm-1
1245 cm-1
897 cm-1
835 cm-1
Absorbance
HATR10 (ZnSe) Wavelenght cm-1
cm-1
Não tratado
1 mes antes da hidrólise
5 meses antes da hidrólise
1 mes depois da hidrólise
5 meses depois da hidrólise

FIGURA 1

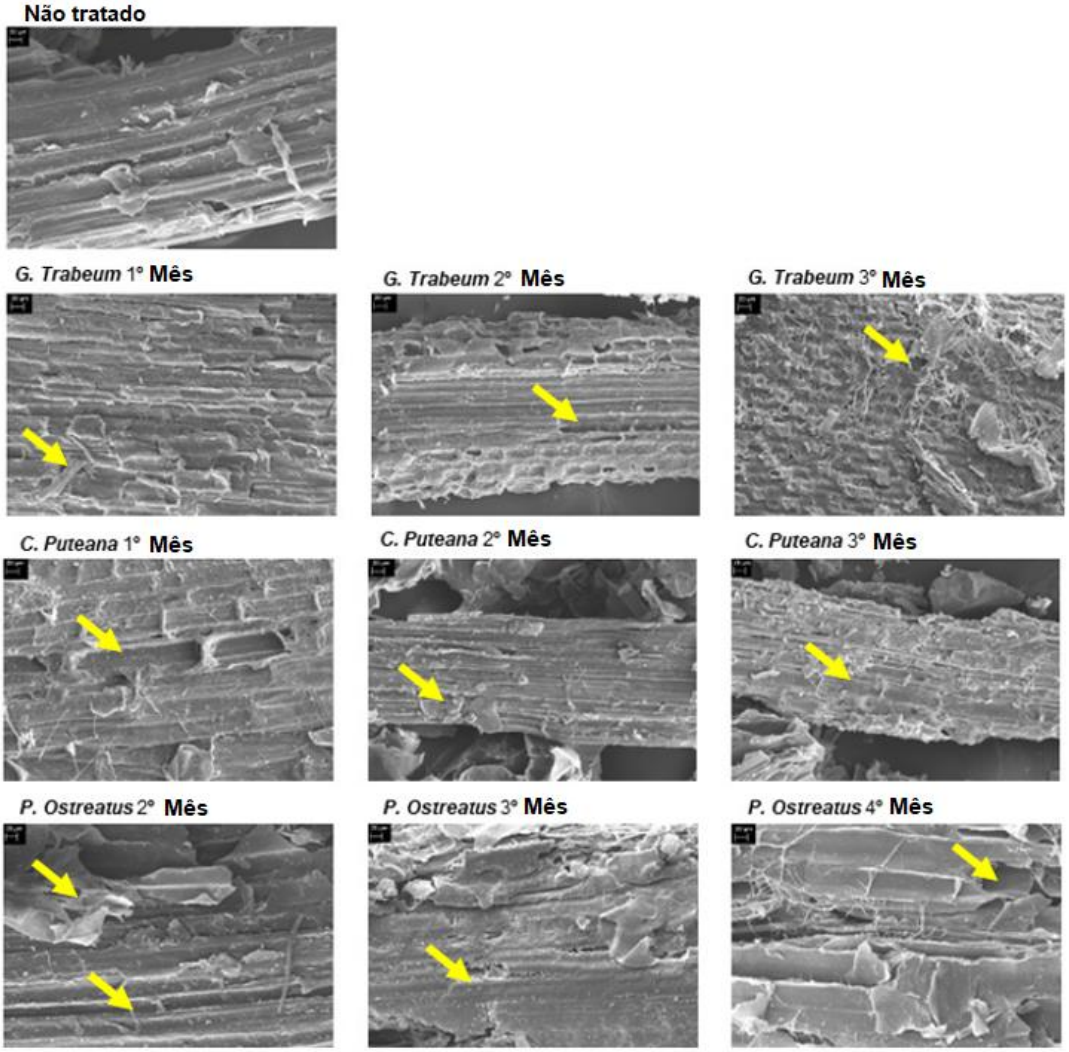

Não tratado
G. Trabeum 1° Mês
G. Trabeum 2° Mês
G. Trabeum 3° Mês
C. Puteana 1° Mês
C. Puteana 2° Mês
C. Puteana 3° Mês
P. Ostreatus 2° Mês
P. Ostreatus 3° Mês
P. Ostreatus 4° Mês

FIGURA 2

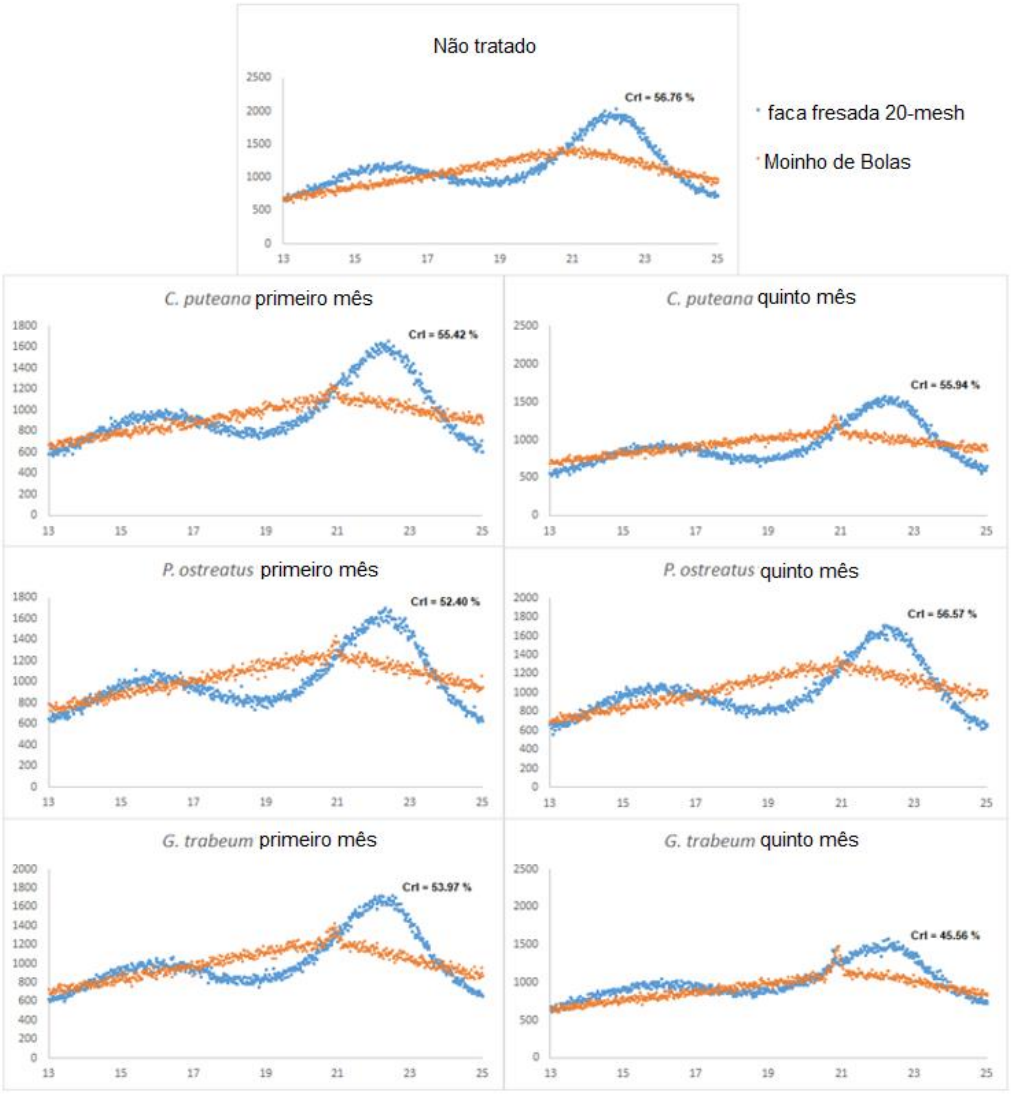

Não tratado
Crl = 56.76 %
faca fresada 20-mesh
Moinho de Bolas
C. puteana primeiro mês
Crl = 55.42 %
C. puteana quinto mês
Crl = 55.94 %
P. ostreatus primeiro mês
Crl = 52.40 %
P. ostreatus quinto mês
Crl = 56.57 %
G. trabeum primeiro mês
Crl = 53.97 %
G. trabeum quinto mês
Crl = 45.56 %

FIGURA 3

RESUMO

PROCESSO COMBINADO PARA A PRODUÇÃO DE CELO-OLIGOSSACARÍDEOS

O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Agricultura e Saúde, mais especificamente a área de alimentos como composto prebiótico e nutracêuticos, compreende um processo combinado para a produção de celo-oligossacarídeos (COS) com bagaço de cana-de-açúcar, que combina pré-tratamento biológico, com fungos das espécies *Coniophora puteana* (CBMAI 0870), *Gloeophyllum trabeum* (CBMAI 0872) ou *Pleurotus ostreatus* (CCIBt 2338), com físico para diminuir a cristalinidade e resistência da biomassa a etapa de hidrólise enzimática.