



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DE XILANAS

ELIDA SIMONE GUIDO
Tecnóloga em Alimentos

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DE XILANAS

ELIDA SIMONE GUIDO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
doutor em Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

Ficha catalográfica

G942p	Guido, Elida Simone. Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática de xilanas / Elida Simone Guido. – 2016. 126 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016. Orientadora: Dr^a. Susana Juliano Kalil. 1. Oligossacarídeos prebióticos 2. Enzimas xilanolíticas 3. Caracterização enzimática 4. Parâmetros de reação enzimática 5. Materiais lignocelulósicos 6. Endo-xilanases I. Kalil, Susana Juliano II. Título. CDU 664
-------	--

APROVAÇÃO

Tese defendida por Elida Simone Guido e aprovada em 24 de agosto de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



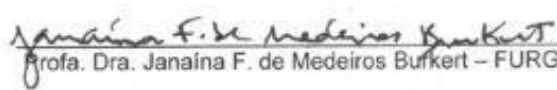
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Prof. Dr. Adriano Brandelli – UFRGS



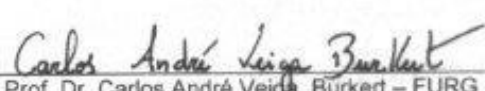
Profa. Dra. Eliana Badiale Eurlong – FURG



Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Christiane Saraiva Ogradowski – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

Aos que dão sentido a minha vida:
Felipe, Lauro, Geine, Silvana e Leonardo,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me abençoar, proteger, sustentar e guiar em todos os dias da minha vida.

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Ao meu esposo **Felipe**, por ter sido o meu porto seguro, o meu melhor amigo e o meu parceiro de “guerra” nos últimos anos. Você me faz acreditar que o amanhã será melhor, e isso me dá forças para continuar, sem pensar em desistir. Obrigada por lutar incansavelmente por nós e pelos nossos sonhos. Eu te amo tanto e hoje, mais do que nunca, tenho certeza que sempre e para sempre é com você que eu quero estar.

Aos meus pais **Lauro** e **Geine**, por tudo desde sempre. Vocês são os meus exemplos de vida e determinação. À minha irmã **Silvana** e ao meu doce **Leo**, pelo amor e pela torcida. Cada ausência foi sentida e a saudade fez parte dos nossos dias, mas nos fortaleceu ainda mais.

Sempre juntos, mesmo que longe. Eu os amo.

À professora **Susana**, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e dedicação. Foram seis anos longos anos de convívio e aprendizados, que me fizeram crescer como pessoa e profissional. Muito obrigada por tudo e por me possibilitar chegar até aqui.

À, quase filha, **Jéssica**, por ter sido a melhor IC que alguém pode ter. Pela amizade e pelas muitas vezes que acreditou (e me fez acreditar, de qualquer jeito) que ia dar certo. Obrigada pela oportunidade de conviver com alguém tão especial.

À **Ana Sanzo**, pela amizade e ajuda na realização do trabalho. Pelos conselhos, cuidados e muitos bons momentos vividos.

Aos **colegas do LMB**, Thaís, Dai, Luisa, Gabi, Joana, Ailton, Samuel e Rafa, por toda ajuda e pelos bons e inesquecíveis momentos (e cafés) que compartilhamos.

À minha sogra **Dionéia**, pela amizade e torcida. Muito obrigada, por tudo.

À querida amiga **Eliane**, pela amizade, pelo apoio, pela torcida e parceria de sempre. Você continua fazendo parte disso tudo. À **Fabi**, pela amizade de uma vida toda. À **Cris**, pela amizade e torcida.

Aos **amigos** que eu fiz por aqui, em especial **Sandri**, **Carol**, **Adriano** e **Lucia**, pela amizade, pelo apoio e pelos momentos tão bons que passamos. À **Sandri**, por tudo, sempre.

Aos professores **Eliana** e **André**, pelos ensinamentos e por toda ajuda no decorrer do doutorado. À **Ana Paula Manera**, pela ajuda e torcida.

Ao **Laboratório de Engenharia de Bioprocessos**, pelo auxílio técnico. Um agradecimento especial ao **Bruno**, pelo apoio e pela torcida.

Aos **membros da banca**, Prof. Dr. Adriano Brandelli, Prof^a. Dr^a. Christiane Ogrodowski, Prof^a. Dr^a. Eliana Furlong, Prof. Dr. André Burkert e Prof^a. Dr^a. Janaína Burkert, pela disponibilidade e pelas indispensáveis contribuições para a concretização deste trabalho.

À **Islanda**, pelo auxílio sempre que foi preciso.

À **FURG** e ao **Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos**, pela oportunidade de realizar o mestrado e o doutorado e pelo ensino de qualidade.

À **FAPERGS**, à **CAPES** e ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem...
Quem acredita sempre alcança.*

(Mais uma vez, Legião Urbana)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Composição química parcial de materiais lignocelulósicos agroindustriais (MLCAs)	28
Tabela 2 - Características de endo- β -1,4-xilanases de diferentes fontes microbianas	33
Tabela 3 - Produção de XOs por hidrólise enzimática de xilana de materiais lignocelulósicos	38

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO DE ENDO- β -1,4-XILANASES E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS

Tabela 1 - Atividades xilanolíticas e celulolítica dos preparados enzimáticos comerciais	52
Tabela 2 - Estabilidade térmica a 50°C e parâmetros cinéticos de endo- β -1,4-xilanases comerciais de fungos filamentosos	55
Tabela 3 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Shearzyme [®] de <i>Aspergillus oryzae</i>	56
Tabela 4 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Spring Mono [®] de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	57
Tabela 5 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Hemicellulase Amano [®] de <i>Aspergillus niger</i>	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Esquema estrutural simplificado das fibras dos materiais lignocelulósicos	27
Figura 2 - Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas	31
Figura 3 - Especificidade da endo- β -1,4-xilanase	32
Figura 4 - Estrutura esquemática de xilose e xilo-oligossacarídeos	34
Figura 5 - Representação esquemática da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de materiais lignocelulósicos	37

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO DE ENDO- β -1,4-XILANASES E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS

Figura 1 - Sistema reacional para a produção de XOs por hidrólise enzimática de xilana de faia. (1) Controle de temperatura, (2) Sistema de agitação e (3) Reatores de mistura	50
Figura 2 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade de endo- β -1,4-xilanases comerciais: Shearzyme ^a (■), Spring Mono ^b (●) e Hemicellulase Amano ^c (◇).....	54
Figura 3 - Conversão da xilana de faia em XOs com diferentes preparados xilanolíticos.....	58
Figura 4 - Produção de xilose (■), xilobiose (●) e xilotriose (▲) usando endo- β -1,4-xilanases comerciais: Shearzyme [®] de <i>A. oryzae</i> (A), Spring Mono [®] de <i>T. lanuginosus</i> (B) e Hemicellulase Amano [®] de <i>A. niger</i> (C). Média $\pm$ erro padrão.....	59
Figura 5 - Micrografias obtidas por MEV da xilana de faia original (A); e após 36 h de hidrólise com endo- β -1,4-xilanases dos preparados xilanolíticos: Shearzyme [®] de <i>A. oryzae</i> (B); Spring Mono [®] de <i>T. lanuginosus</i> (C) e Hemicellulase Amano [®] de <i>A. niger</i> (D)	61

ARTIGO 2 - MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS COM POTENCIAL PREBIÓTICO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA XILANA DE FAIA

Figura 1 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) com: 1,0% (A); 1,5% (B); 3,0% (C); 4,5% (D) e 6,0% (E) de xilana de faia	74
Figura 2 - (A) Efeito da concentração de xilana de faia sobre a produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)	75
Figura 3 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) com diferentes relações E:S: 133 U/g (A) e 266 U/g (B) com 4,5% de xilana; 133 U/g (C) e 266 U/g (D) com 6,0% de xilana.....	76
Figura 4 - (A) Efeito da relação enzima:substrato na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)	77
Figura 5 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) com diferentes pHs de reação: 4,5 (A); 5,5 (B) e 6,5 (C).....	78
Figura 6 - (A) Efeito do pH na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■).....	79

Figura 7 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) em diferentes temperaturas de reação: 40°C (A), 50°C (B) e 60°C (C)	80
Figura 8 - (A) Efeito da temperatura na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)	81
Figura 9 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) em 48 h de hidrólise enzimática.....	82
Figura 10 - (A) Efeito do tempo reacional na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)	83
Figura 11 - Cromatograma do meio reacional da produção de xilo-oligossacarídeos.....	84

ARTIGO 3 - EXTRAÇÃO DE XILANAS DE SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS REGIONAIS E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Figura 1 - Fluxogramas das etapas para a extração alcalina de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais por diferentes métodos químicos.....	95
Figura 2 - Extração de xilanas de casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), casca de soja (CS) e engaço de uva (EN) por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2).....	98
Figura 3 - Rendimento de xilanas de casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), casca de soja (CS) e engaço de uva (EN) extraídas por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2).....	99
Figura 4 - Aspecto visual das xilanas extraídas de casca de arroz (1), farelo de arroz (2), casca de soja (3) e engaço de uva (4) por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2).....	100
Figura 5 - Produção de XOs e xilose em 12 h e 24 h de hidrólise das xilanas extraídas com os métodos M1 (A, B) e M2 (C, D). Casca de arroz: CA, farelo de arroz: FA, casca de soja: CS e engaço de uva: EN	101

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
 CAPÍTULO I.....	17
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 GERAL.....	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
 CAPÍTULO II.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	27
3.1.1 Subprodutos e resíduos lignocelulósicos agroindustriais.....	27
3.2 XILANAS.....	29
3.3 ENZIMAS XILANOLÍTICAS.....	30
3.3.1 Endo- β -1,4-xilanases: características e aplicações.....	31
3.4 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	34
3.4.1 Produção de xilo-oligossacarídeos	36
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
 CAPÍTULO III	41
 ARTIGO 1	43
Caracterização de endo- β -1,4-xilanases e sua aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos potencialmente prebióticos	45
RESUMO	45
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 MATERIAL	47
2.2 MÉTODOS.....	47
2.2.1 Determinação das atividades xilanolíticas dos preparados enzimáticos.....	47
2.2.2 Caracterização enzimática de endo- β -1,4-xilanases	48
2.2.2.1 Determinação do pH e temperatura ótimos	48
2.2.2.2 Determinação da estabilidade térmica a 50°C.....	48
2.2.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos	49
2.2.3 Hidrólise da xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos	49
2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura	50
2.2.5 Análise estatística.....	50
2.2.6 Métodos analíticos.....	50
2.2.6.1 Determinação da atividade de endo- β -1,4-xilanase.....	50
2.2.6.2 Determinação da atividade de β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e β - glicosidase	51
2.2.6.3 Determinação da atividade de celulasas totais	51
2.2.6.4 Análise dos hidrolisados por CLAE	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 ATIVIDADES XILANOLÍTICAS DOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS	52

3.2 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE ENDO- β -1,4-XILANASES.....	53
3.3 HIDRÓLISE DA XILANA DE FAIA E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS	55
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	60
4 CONCLUSÃO	61
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ARTIGO 2.....	67
Maximização da produção de xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico por hidrólise enzimática da xilana de faia	69
RESUMO	69
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 MATERIAL	71
2.2 MÉTODOS	71
2.2.1 Hidrólise da xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos.....	71
2.2.2 Estudo dos efeitos de parâmetros reacionais na produção de xilo-oligossacarídeos.....	72
2.2.3 Análise estatística	72
2.2.4 Métodos analíticos	72
2.2.4.1 Determinação da atividade de endo- β -1,4-xilanase	72
2.2.4.2 Análise dos hidrolisados por CLAE.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1 ESTUDO DOS EFEITOS DE PARÂMETROS REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE XO _s	73
4 CONCLUSÃO	85
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ARTIGO 3.....	89
Extração de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais regionais e produção enzimática de xilo-oligossacarídeos	91
RESUMO	91
1 INTRODUÇÃO	92
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1 MATERIAL	93
2.2 MÉTODOS	94
2.2.1 Extração de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais.....	94
2.2.2 Hidrólise das xilanas e produção de xilo-oligossacarídeos	94
2.2.3 Análise estatística	94
2.2.4 Métodos analíticos	96
2.2.4.1 Determinação da atividade de endo- β -1,4-xilanase	96
2.2.4.2 Análise dos hidrolisados por CLAE.....	96
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 EXTRAÇÃO DE XILANAS DE SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	96
3.2 HIDRÓLISE DAS XILANAS E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	100
4 CONCLUSÃO	103
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
CAPÍTULO IV.....	109
4 CONCLUSÃO GERAL	111

CAPÍTULO V	113
5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
 CAPÍTULO VI	 117
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE XILANAS

RESUMO

Xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligossacarídeos não digeríveis e fermentáveis que possuem propriedades prebióticas, além de outros potenciais efeitos benéficos à saúde humana. Os XOs apresentam ainda maior estabilidade à temperatura e ao pH quando comparados aos demais oligossacarídeos. O processo industrial mais empregado para a produção de XOs é a hidrólise enzimática de xilanas extraídas de materiais lignocelulósicos (MLCs), sendo que a endo- β -1,4-xilanase é a principal enzima responsável pela catálise desta reação. Com o atual aumento da demanda por compostos funcionais é cada vez mais necessário o desenvolvimento de estudos voltados para a produção viável de oligossacarídeos. Neste contexto, a presente tese buscou produzir XOs potencialmente prebióticos por hidrólise enzimática de diferentes xilanas com endo- β -1,4-xilanases de fungos filamentosos. Para tal, os preparados xilanolíticos comerciais oriundos de *Aspergillus oryzae* (Shearzyme[®]), *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) e *Aspergillus niger* (Hemicellulase Amano[®]) foram avaliados quanto à atividade de enzimas xilanolíticas e as endo- β -1,4-xilanases presentes foram caracterizadas e utilizadas na hidrólise da xilana de madeira de faia. Os resultados obtidos sugerem que o grau de polimerização (GP) e o rendimento dos XOs foram influenciados pela composição do preparado xilanolítico e pelas propriedades da endo- β -xilanase, e a produção de xilose foi maior para os extratos xilanolíticos com atividade de β -xilosidase. A hidrólise da xilana de faia com endo- β -1,4-xilanases de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) produziu mais de 90% de XOs, representados principalmente por xilobiose (X2) e xilotriose (X3), e apenas 6,47% de xilose nos hidrolisados, o que evidencia o potencial do extrato enzimático na obtenção de XOs prebióticos. Em seguida, os parâmetros de hidrólise enzimática foram estudados a fim de maximizar a produção de XOs de baixo GP (X2+X3), em razão do seu elevado efeito prebiótico. A concentração de substrato e temperatura tiveram maior influência no rendimento dos XOs produzidos por endo- β -1,4-xilanases de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]), sendo que na melhor condição de hidrólise (6,0% de xilana de faia, 133 U/g de enzima, pH 5,5, 60°C por 24 h) foram obtidos 17,48 mg/mL de X2+X3, o que corresponde a um incremento de 83% em relação à hidrólise inicial (9,55 mg/mL de XOs), e apenas 0,65 mg/mL de xilose. Tais hidrolisados são potencialmente prebióticos e promissores para a aplicação em alimentos. Posteriormente, as xilanas de casca (CA) e farelo (FA) de arroz, casca de soja (CS) e engaço de uva (EN) foram extraídas por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2) e usadas em substituição à xilana de faia na condição de hidrólise enzimática predefinida. Os melhores rendimentos de xilana foram alcançados com o M1 e M2 para a CA (43 e 28%), e M2 para o EN (20%). A hidrólise da xilana de CA por endo- β -1,4-xilanases de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) rendeu a maior quantidade de XOs de baixo GP (5,67 mg/mL), seguido pela xilana extraída de EN (2,91 mg/mL). No presente estudo, foi demonstrado que é possível obter XOs com potencial prebiótico por hidrólise de xilanas com endo- β -1,4-xilanases. Além disso, o uso de xilanas de materiais lignocelulósicos agroindustriais pouco explorados do Estado do Rio Grande do Sul, vem ao encontro da necessidade de agregar valor à cadeia produtiva e tornar viável a produção de XOs em larga escala.

Palavras-chave: Oligossacarídeos prebióticos. Enzimas xilanolíticas. Endo- β -1,4-xilanases. Caracterização enzimática. Parâmetros de reação enzimática. Materiais lignocelulósicos.

PRODUCTION OF XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM ENZYMATIC HYDROLYSIS OF XYLANS

ABSTRACT

Xylooligosaccharides (XOs) are non-digestible and fermentable oligosaccharides that have prebiotic properties, besides several other beneficial health effects. XOs also present increased temperature and pH stability when compared to other oligosaccharides. The most widely used industrial process for XOs production is the enzymatic hydrolysis of xylan derived from lignocellulosic materials (LCMs), and endo-1,4- β -xylanase is the major enzyme responsible for catalyzing this reaction. With the current increase in demand for functional compounds, it is strongly necessary the development of studies aimed to viable production of oligosaccharides. In this context, the present thesis aimed to produce XOs with prebiotic potential by enzymatic hydrolysis of xylans from different sources using endo-1,4- β -xylanases from filamentous fungi. To achieve this goal, xylanolytic preparations derived from *Aspergillus oryzae* (Shearzyme[®]), *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) and *Aspergillus niger* (Hemicellulase Amano[®]) were evaluated for activity of xylanolytic enzymes, and the endo-1,4- β -xylanases present in the extracts were characterized and used for beechwood xylan hydrolysis. The results suggest that the degree of polymerisation (DP) and yield of XOs were influenced by the composition of xylanolytic preparation and by the properties of endo-1,4- β -xylanase, and the xylose production was higher for xylanolytic extracts with β -xylosidase activity. Hydrolysis of beechwood xylan with endo-1,4- β -xylanases from *T. lanuginosus* produced more than 90% of XOs, represented mainly by xylobiose (X2) and xylotriose (X3), and only 6.47% of xylose in the hydrolysates, which highlights the good potential of this enzyme in obtaining XOs prebiotics. Next, the enzymatic hydrolysis parameters were studied to maximize the production of low-DP XOs (X2 and X3), because of their high prebiotic effect. The substrate concentration and temperature had higher influence on XOs yield produced by endo- β -xylanase of *T. lanuginosus*, whereas in the best hydrolysis condition (6% beechwood xylan, 133 U/g enzyme, pH 5.5, 60°C for 24 h) were obtained 17.48 mg/mL of X2+X3, which corresponds to an increase of 83% compared to the initial hydrolysis (9.55 mg/mL), and only 0.65 mg/mL of xylose. These hydrolysates are potentially prebiotics and promising for the application in functional foods. Next, xylans were extracted from rice hulls (RH), rice bran (RB), soybean hulls (SH) and grape stalks (GS) using different alkaline methods (M1 and M2) and were used to replace the beechwood xylan in the same conditions of hydrolysis previously applied. The higher xylan yields were achieved through M1 and M2 for RH (43% and 28%), and M2 for GS (20%). Hydrolysis of RH xylan by endo-xylanases from *T. lanuginosus* gives the higher quantity of low-DP XOs (5.67 mg/mL), followed by GS xylan (2.91 mg/mL). In this work, it was demonstrated that it is possible to obtain XOs with prebiotic potential by hydrolysis of xylans with endo-1,4- β -xylanases. Furthermore, the use of xylans from underexploited LCMs from the state of Rio Grande do Sul come to meet the need to add value to the productive chain and making viable the large-scale production of XOs.

Key words: Prebiotic oligosaccharides. Xylanolytic enzymes. Endo-1,4- β -xylanases. Enzymatic characterization. Enzymatic reaction parameters. Lignocellulosic materials.

1 INTRODUÇÃO

A busca por um estilo de vida saudável é crescente entre as pessoas, e os cuidados com a alimentação têm impulsionado o interesse no consumo de alimentos funcionais, que são aqueles que possuem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas. Em resposta à grande demanda dos consumidores pelos alimentos funcionais, um grande número de compostos alternativos tem surgido desde o início dos anos 80, entre eles os oligossacarídeos. Os oligossacarídeos são carboidratos que contêm de 2 a 10 unidades de monossacarídeos, sendo naturalmente encontrados em muitos alimentos, incluindo frutas, vegetais, leite e mel. Estes compostos são considerados ingredientes funcionais, uma vez que a sua ingestão traz inúmeros benefícios à saúde.

Dentre os oligossacarídeos com propriedades funcionais, galacto-oligossacarídeos (GOs) e fruto-oligossacarídeos (FOs) são os mais comumente utilizados em alimentos, mas os xilo-oligossacarídeos (XOs) têm merecido grande destaque, devido a seus benefícios potenciais à saúde humana. Os XOs são oligossacarídeos não digeríveis constituídos basicamente por 2 a 10 unidades de xilose unidas por ligações do tipo β -1,4, e que podem ter proporções variáveis de substituintes, tais como grupos acetila, ácidos urônicos e arabinose, dependendo da estrutura da xilana da matéria-prima original e do processo de produção (CARVALHO et al., 2013; KABEL et al., 2002).

Os XOs podem ser utilizados como adoçantes de baixa caloria e fibras alimentares solúveis porque não são metabolizados pelo sistema digestivo. Além disso, têm propriedades fisiológicas importantes, incluindo não toxicidade (SAMANTA et al., 2015), melhora na função intestinal, na absorção de cálcio e no metabolismo de lipídeos (IINO et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1991), redução do risco de câncer de cólon (WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001), e efeito prebiótico por estimular a proliferação e/ou atividade das populações de bactérias benéficas no cólon, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (GÚLLON; MUÑOZ; PARAJO, 2011; OKAZAKI; FUJIKAWA; MASTUMOTO, 1990).

De acordo com Wang et al. (2009), no processamento de alimentos funcionais os XOs são mais promissores que os FOs quanto à estabilidade à temperatura e ao pH. Em países como o Japão os XOs com potencial prebiótico são adicionados em vários produtos alimentícios para humanos e animais (BRIENZO, 2010).

Na indústria biotecnológica, os XOs são produzidos preferencialmente por hidrólise enzimática de xilana previamente extraída de biomassas lignocelulósicas, devido aos inúmeros problemas associados às demais tecnologias de produção, como auto-hidrólise (NABARLATZ

et al., 2007) e hidrólise ácida (SAMANTA et al., 2012). Nestes métodos, os XOs são facilmente convertidos em xilose e os hidrolisados contêm grande quantidade de compostos indesejáveis (monossacarídeos e lignina), demandando etapas complexas de purificação (ZHU et al., 2006). A hidrólise enzimática não produz resíduos tóxicos e não requer um reator especial para operar em temperatura e pressão elevadas (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009).

A endo- β -1,4-xilanase é a principal enzima envolvida na catálise da hidrólise de xilanas para XOs. Portanto, para a produção de XOs via enzimática são desejados os preparados xilanolíticos com alta atividade de endo- β -xilanases e baixa atividade de exo-xilanases e/ou β -xilosidases, uma vez que estas enzimas hidrolisam os XOs em xilose (CHEN et al., 2009). Além disso, a endo- β -1,4-xilanase deve ser ativa e estável nas condições de operação e os parâmetros reacionais de hidrólise têm de ser estudados, de modo que a produção de XOs seja maximizada e passível de ampliação de escala. A hidrólise enzimática controlada de xilanas possibilita a obtenção de XOs mais puros, em maior quantidade e com grau de polimerização (GP) definido, sendo que para a aplicação em alimentos funcionais são preferidos os XOs com GP de 2 a 3, em razão do seu efeito prebiótico e sabor adocicado (JIANG et al., 2004; TOSHIO et al., 1990).

Os XOs são uns dos poucos compostos funcionais que podem ser obtidos a partir de materiais lignocelulósicos (MLCs) amplamente disponíveis e de baixo custo, como resíduos florestais e agroindustriais, o que reduz os custos do processo biotecnológico e proporciona um melhor aproveitamento de biomassas pouco exploradas. Os MLCs mais usados para a produção de XOs são: sabugo de milho (AACHARY; PRAPULLA, 2009), bagaço de cana (BIAN et al., 2013), cascas (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013), farelos (MANISSERI; GUDIPATI, 2010), palhas (FARYAR et al., 2015) e madeiras (FALCK et al., 2013).

Embora existam inúmeros estudos na literatura relacionados à produção de XOs por hidrólise de xilanas provenientes de MLCs, são escassos os que enfocam a aplicação da casca e do farelo de arroz e da casca de soja, e não foram encontrados relatos com o engaço de uva, o que torna essa abordagem um campo promissor para novas pesquisas. O uso de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais, gerados na região Sul do Rio Grande do Sul, como matéria-prima para a extração de xilanas, vem ao encontro da necessidade de agregar valor à cadeia produtiva e tornar rentável a produção enzimática de XOs.

Com base no exposto, a presente tese buscou sobretudo produzir XOs com potencial prebiótico por hidrólise enzimática de diferentes xilanas utilizando endo- β -xilanases comerciais de fungos filamentosos, a fim de contribuir com o desenvolvimento dos estudos voltados para os compostos funcionais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico por hidrólise enzimática de diferentes xilanas utilizando endo- β -1,4-xilanases comerciais de fungos filamentosos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das principais enzimas xilanolíticas nos extratos enzimáticos comerciais de *Aspergillus oryzae* (Shearzyme[®]), *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) e *Aspergillus niger* (Hemicellulase Amano[®]), e caracterizar as endo- β -1,4-xilanases presentes em relação ao pH e a temperatura ótimos, à estabilidade térmica a 50°C e aos parâmetros cinéticos;
- Investigar as endo- β -1,4-xilanases quanto à capacidade de produzir XOs de baixo grau de polimerização a partir da hidrólise da xilana de faia;
- Estudar os efeitos dos parâmetros reacionais de hidrólise enzimática, tais como concentração de substrato, relação enzima:substrato, pH, temperatura e tempo de reação, no rendimento e grau de polimerização dos XOs produzidos pela hidrólise da xilana de faia com endo- β -1,4-xilanase comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]);
- Obter XOs potencialmente prebióticos a partir das xilanas de casca e farelo de arroz, casca de soja e engaço de uva, utilizando endo- β -xilanase comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]).

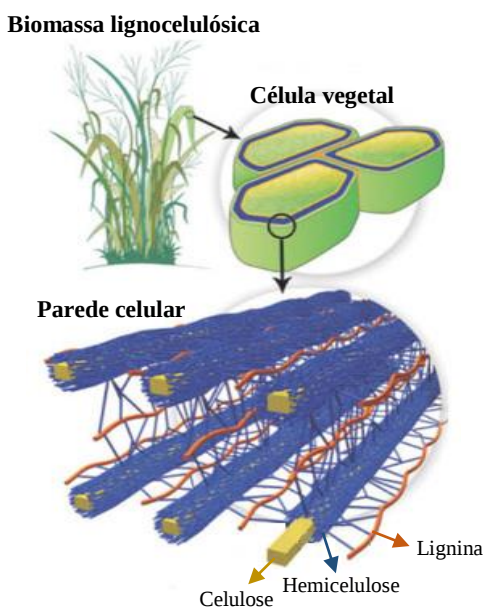
CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos (MLCs) representam os subprodutos e/ou resíduos orgânicos mais abundantes do mundo (CARVALHO et al., 2013). Além dos componentes não-estruturais, tais como as cinzas e os extrativos, os MLCs são constituídos basicamente por três biopolímeros: a celulose, polímero linear formado por unidades de glicose ligadas em β -1,4; as hemiceluloses, heteropolissacarídeos lineares ou ramificados compostos por uma variedade de monossacarídeos, incluindo xilose, arabinose, glicose, ramnose, galactose e ácidos urônicos; e a lignina, polímero ramificado com natureza fenólica (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; VÁZQUEZ et al., 2000). A parede de células vegetais é uma fonte de MLCs, e a sua estrutura é representada pela interação físico-química entre celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1).

Figura 1 - Esquema estrutural simplificado das fibras dos materiais lignocelulósicos



Fonte: Adaptado de KONDO (1997)

3.1.1 Subprodutos e resíduos lignocelulósicos agroindustriais

A celulose é o componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos gerados na agroindústria, seguido por hemiceluloses e lignina (Tabela 1). A biomassa lignocelulósica tem composição variável e sua estrutura é complexa. Nos MLCs, a celulose está embebida em uma matriz hemicelulose-lignina, sendo que a hemicelulose integra a estrutura da parede celular

vegetal com interações químicas covalentes e não-covalentes (SAHA, 2003). As hemiceluloses são heteropolissacarídeos, definidas como materiais solúveis em álcali após remoção de pectina e/ou lignina. Posteriormente à extração alcalina, as hemiceluloses são, em sua maioria, solúveis em água (SUN; TOMKISON; LIANG, 2000).

Tabela 1 - Composição química parcial de materiais lignocelulósicos agroindustriais (MLCAs)

MLCA	Composição % (m/m)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Casca de arroz	30,0	28,0	18,0	MANSILLA et al., 1998
Farelo de arroz	27,0	37,0	5,0	BAIG; ZETZL; BRUNNER, 2006
Casca de soja	38,4	10,2	2,8	MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009
Engaço de uva	30,3	21,0	17,4	PROZIL et al., 2013

A casca de arroz é um resíduo lignocelulósico agroindustrial que apresenta uma fração hemicelulósica rica em xilanas, possível de ser convertida em XOs. De acordo com os dados da CONAB (2013), a produção de arroz nas safras de 2012 e 2013 foi de 11.858,33 mil toneladas, sendo o Estado do Rio Grande do Sul (RS) o maior produtor brasileiro, responsável por 67% da produção total. Em dados mais recentes da CONAB (2015), o RS continua como o principal produtor de arroz no Brasil, respondendo por cerca de 68% da produção nacional. O beneficiamento industrial do arroz gera grande quantidade de subprodutos e resíduos, tais como farelo, palha e casca, que são amplamente disponíveis e de baixo custo, o que os torna bastante atrativos para o emprego em processos biotecnológicos (HICKERT, 2010).

Conforme o IBGE (2016), o Rio Grande do Sul se destaca também na produção de uva, soja, aveia e milho. No processo de vinificação são gerados resíduos tais como o bagaço e o engaço de uva e, apesar de não serem considerados materiais perigosos, o seu elevado teor de matéria orgânica e a sua produção sazonal podem contribuir para potenciais problemas ao meio ambiente. Portanto, o uso destes MLCs como fonte de biomassa lignocelulósica para a obtenção de produtos com alto valor agregado representa uma alternativa viável de aproveitamento, uma vez que as aplicações, principalmente do engaço de uva, estão limitadas à fertilizantes (PROZIL et al., 2013). Outro resíduo agroindustrial gerado em grande quantidade e com potencial para a produção de bioprodutos é a casca de soja, pois apresenta em sua fração hemicelulósica a xilana possível de ser convertida em XOs por hidrólise enzimática (RATNADEWI et al., 2016).

3.2 XILANAS

A xilana é o principal componente das hemiceluloses na parede celular de plantas terrestres, representando cerca de 30% a 35% da massa seca total, e é a segunda fonte renovável mais abundante na natureza com um elevado potencial para a produção tecnológica de diversos produtos, como por exemplo xilose, xilitol e XOs (BEG et al., 2001; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; POLIZELI et al., 2005). Vários subprodutos e resíduos, agrícolas e agroindustriais, possuem quantidades relativamente elevadas de hemiceluloses como a xilana, e que têm sido submetidas à transformações enzimáticas a fim de obter produtos mais valiosos, com destaque para os XOs (TERRASAN et al., 2010).

A cadeia principal da xilana é estruturalmente semelhante à celulose, mas ao invés de D-glicose é constituída por resíduos D-xilopiranosil unidos por ligações do tipo β -1,4. Além disso, enquanto a celulose é um polímero linear formado apenas por glicose, a xilana apresenta estrutura e composição variável, dependendo de sua fonte. A estrutura varia de uma cadeia não substituída quase linear, como em gramíneas, para heteropolissacarídeos altamente ramificados em sementes de cereais. O prefixo hetero indica a presença de outros monossacarídeos que não a xilose, e a cadeia principal é geralmente substituída em diferentes graus por resíduos de ácidos 4-O-metil-D-glucurônico e D-glucurônico, L-arabinofuranose, e esterificada com grupos acetil, entre outros (BIELY, 2003; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

O grau de polimerização das xilanas varia de 70 a 200 resíduos de β -xilopiranosose, dependendo da espécie (POLIZELI et al., 2005). As ramificações da cadeia principal de xilana determinam a conformação física da molécula com os demais componentes lignocelulósicos, a solubilidade da molécula em meio aquoso, e têm influência no modo e na extensão da hidrólise enzimática. Portanto, o conhecimento da estrutura e composição química da xilana sobre a qual as endo- β -1,4-xilanases irão atuar é essencial para obter maiores rendimentos do(s) produto(s) de interesse (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; POLIZELI et al., 2005).

Com base nos substituintes comumente encontrados na cadeia principal, as xilanas são classificadas em homoxilanas, arabinoxilanas, glucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (BIELY, 2003). Porém, em cada categoria existe uma microheterogeneidade com respeito ao tipo e grau de ramificação. Em várias plantas as xilanas estão presentes na forma parcialmente acetilada, onde os grupos O-acetil localizados nas posições C2 e C3 dos resíduos xilopiranosil inibem as xilanases de degradar por completo as acetilxilanas, provavelmente por impedimento estérico. Assim, a atuação sinérgica de acetil xilana esterases e endo-xilanases é necessária para a hidrólise do polímero (BEG et al., 2001; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

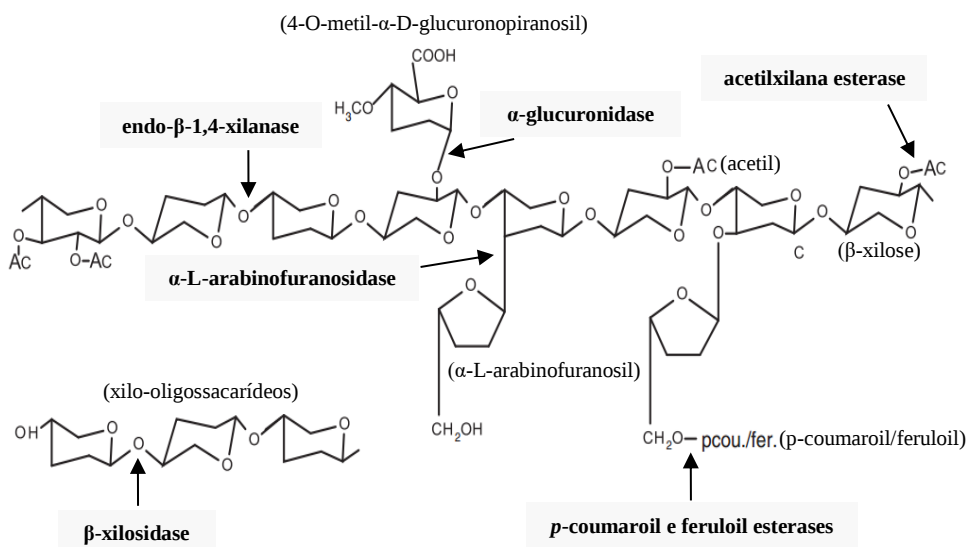
A xilana de madeira de faia (O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana) consiste de uma cadeia principal de resíduos de D-xilopirranose unidos por ligações $\beta(1,4)$, com cadeias laterais de ácido 4-O-metil-glucurônico ligadas à posição C-2 da xilose e grupos acetil nas posições C-2 ou C-3. Neste tipo de xilana são encontrados traços de arabinose e glicose (FREIXO; PINHO, 2002; PULS et al., 1991), sendo que o produto comercial tem mais de 90% de xilose e pode ser utilizado como substrato para a produção enzimática de XOs (SIGMA, 2016). Em se tratando de resíduos lignocelulósicos, a xilana de casca de arroz (glucuronoarabinoxilana), por exemplo, consiste de uma cadeia principal de unidades de D-xilopirranose unidas por ligações $\beta(1,4)$, que pode ser substituída por diferentes grupos, tais como arabinofuranosil, 4-O-metil-glucurônico, O-acetil e/ou fenólicos (GULLÓN et al., 2010; VEGAS et al., 2008; VEGAS et al., 2004).

3.3 ENZIMAS XILANOLÍTICAS

Conforme descrito anteriormente, devido à sua estrutura heterogênea a degradação completa das xilanas requer a atuação de enzimas que são denominadas sistema ou complexo xilanolítico (BEG et al., 2001; BIELY, 1985). Portanto, quanto maior a complexidade estrutural dos polímeros mais componentes enzimáticos do sistema xilanolítico são necessários (BIELY, 2003). A Figura 2 ilustra a atuação das enzimas xilanolíticas sobre a cadeia de xilana. A endo- β -1,4-xilanase (β -1,4-xilana xilanhidrolase, EC 3.2.1.8) é essencial para despolimerização da xilana pois atua na cadeia principal e libera os XOs; a β -xilosidase (β -1,4-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.37) produz xilose a partir de xilobiose e outros XOs; e as enzimas auxiliares, tais como α -arabinofuranosidases, β -glicosidases, α -glucuronidases, acetil xilana, *p*-coumaroil e feruloil esterases, são responsáveis pela remoção dos substituintes da cadeia (BIELY, 2003; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HALTRICH et al., 1996).

Diferentes tipos de sinergismo têm sido relatados para as enzimas xilanolíticas, e o mais importante se refere à cooperação entre as enzimas que atuam na cadeia principal e aquelas que liberam os substituintes da cadeia lateral, como os resíduos de O-acetil (BIELY et al., 1986) e arabinofuranosil (COUGHLAN et al., 1993). A atuação de endo- β -1,4-xilanasas produz XOs substituídos, que são os substratos mais adequados para as enzimas acessórias. Estas enzimas, por sua vez, removem os substituintes da cadeia lateral e criam novos sítios na cadeia principal para a ação de endo- β -1,4-xilanasas (BIELY, 2003). Existem enzimas acessórias (ou auxiliares) que removem apenas os grupos substituintes de XOs gerados por endo-xilanasas (POUTANEN et al., 1991; TUOHY; LAFFEY; COUGHLAN, 1994).

Figura 2 - Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanólíticas



Fonte: Adaptado de SUNNA; ANTRANIKIAN (1997)

Segundo Yan et al. (2008), que pesquisaram o sinergismo entre a endo- β -xilanase e a β -xilosidase, quando as enzimas foram adicionadas separadamente em um meio a base de xilana a endo-xilanase produziu XOs e a β -xilosidase não foi capaz de liberar xilose. Porém, ao serem acrescentadas simultaneamente, a β -xilosidase hidrolisou os XOs formados pela endo- β -xilanase em xilose, o que não é vantajoso do ponto de vista reacional e tecnológico.

Com base nos relatos da literatura, fica evidente que para a produção de XOs são desejados os complexos xilanólíticos com alta atividade de endo-xilanases e baixa atividade de exo-xilanases e/ou β -xilosidasas, de modo a evitar a formação de xilose que apresenta efeitos de inibição na obtenção de XOs. Logo, para a produção via enzimática destes oligossacarídeos é de grande importância tecnológica e econômica selecionar os sistemas enzimáticos com tais propriedades (CHEN et al., 2009; VÁZQUEZ et al., 2002).

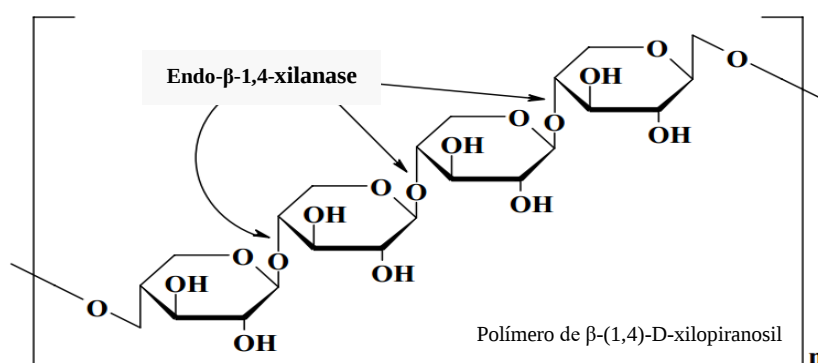
3.3.1 Endo- β -1,4-xilanases: características e aplicações

Endo- β -1,4-xilanases são glicosidasas responsáveis principalmente pela hidrólise de ligações β -1,4 presentes na xilana (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993). A Figura 3 mostra a atuação da endo- β -1,4-xilanase baseada na sua especificidade.

As β -xilanases são classificadas em duas famílias principais de glicosil-hidrolases (GHs): a GH10 e a GH11, que diferem em relação às propriedades físico-químicas, ao modo de ação, às sequências primárias de aminoácidos e à especificidade de substratos (COLLINS;

GERDAY; FELLER, 2005). As endo-xilanases da família GH10 não são totalmente específicas para as xilanas e podem atuar sobre outros substratos. Os membros desta família têm uma massa molar maior que 30 kDa e baixo ponto isoelétrico, enquanto os da família GH11 apresentam uma baixa massa molar e alto ponto isoelétrico. A família GH11 consiste de endo- β -xilanases verdadeiras que são ativas apenas sobre substratos contendo xilose e/ou longas cadeias de XOs, e os produtos de sua ação podem ser hidrolisados pelas enzimas da família GH10 (CARVALHO et al., 2013; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Figura 3 - Especificidade da endo- β -1,4-xilanase



Fonte: MOTTA (2008)

Muitos trabalhos abordam a produção e a caracterização de endo- β -1,4-xilanases a partir de fungos filamentosos (CHEN et al., 2009; DOBREV et al., 2007; LAFOND et al., 2011) e bactérias (HADDAR et al., 2012; KUMAR et al., 2011), mas a produção e a natureza de endo-xilanases de leveduras são pouco exploradas (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009; LIU; LU; MA, 1999). Fungos filamentosos geralmente secretam endo- β -xilanases em conjunto com celulasas, o que pode afetar a qualidade e a pureza do produto final nos processos de fabricação de celulose e papel (BALAKRISHNAN et al., 1992). Por outro lado, leveduras podem produzir endo- β -1,4-xilanases livres de celulasas, uma característica importante para a sua aplicação na indústria de papel e têxtil (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009; LIU; LU; MA, 1999).

Os fungos filamentosos são particularmente interessantes como produtores de endo- β -1,4-xilanases do ponto de vista industrial, pois os níveis de enzima das culturas de fungos são tipicamente mais altos do que aqueles de leveduras e bactérias. Além disso, fungos filamentosos produzem enzimas auxiliares necessárias à hidrólise de ramificações da cadeia de xilana, e as endo- β -xilanases apresentam uma maior versatilidade catalítica (HALTRICH et al., 1996).

Em alguns micro-organismos, tais como bactérias não-celulolíticas e leveduras, as enzimas xilanolíticas são, na maioria das vezes, indutivas, ou seja, xilanases e β -xilosidases são

secretadas em quantidades elevadas durante o seu crescimento em meio à base de xilana e a sua síntese sofre repressão catabólica por açúcares facilmente assimiláveis, como a xilose e glicose. A regulação da síntese de endo- β -1,4-xilanases em fungos filamentosos não é totalmente estabelecida devido à diversidade dos mecanismos de controle celular nestes organismos (BIELY, 1985).

Quanto às condições de atuação, grande parte das endo- β -1,4-xilanases conhecidas até o momento são otimamente ativas em temperaturas acima de 50°C e em pHs ácido ou neutro (HADDAR et al., 2012). A Tabela 2 mostra as propriedades de endo- β -1,4-xilanases oriundas de bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Tabela 2 - Características de endo- β -1,4-xilanases de diferentes fontes microbianas

Fonte microbiana	Massa molar (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
Bactérias				
<i>Bacillus</i> sp.	99	6,0	75	BATAILLON et al., 2000
<i>Streptomyces</i> sp.	24 - 38	6,0 - 8,0	55 - 60	GEORIS et al., 2000
Fungos filamentosos				
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	5,0	60	KITAMOTO et al., 1999
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	25	6,0 - 6,5	70	SINGH et al., 2000
<i>Aspergillus</i> sp.	26	5,0	50	KHANNA et al., 1995
Leveduras				
<i>Cryptococcus</i> sp.	22	2,0	40	IEFUJI et al., 1996
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	4,4	54	LI et al., 1993

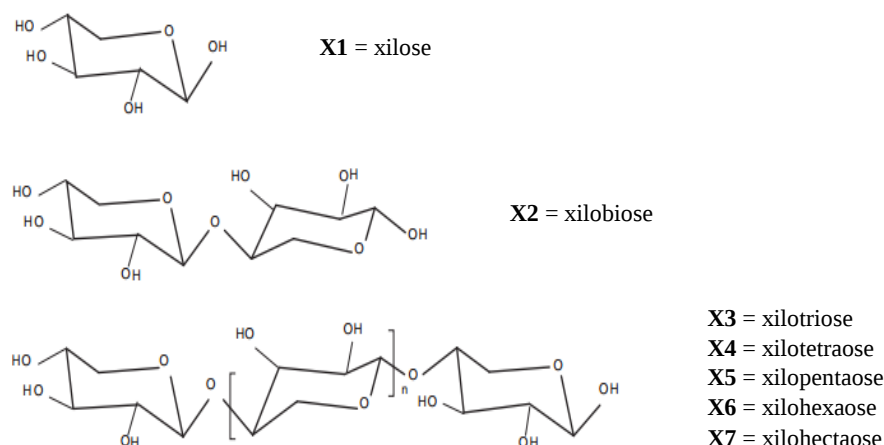
As endo- β -1,4-xilanases têm atraído grande interesse de pesquisas em razão de suas muitas aplicações industriais potenciais, tais como: facilitam a extração da lignina e reduzem o consumo de produtos químicos tóxicos necessários para o branqueamento da polpa de celulose e/ou papel (MADLALA et al., 2001); melhoram os processos de panificação e modificam os produtos cozidos (MAAT et al., 1992); aprimoram a qualidade nutricional e a digestibilidade de forragens para ruminantes quando aplicadas no pré-tratamento de culturas forrageiras, além de facilitar a compostagem (YANG et al., 2001); produzem os XOs com atividade prebiótica (VÁZQUEZ et al., 2000); e são úteis na bioconversão de MLCs em produtos fermentescíveis, na clarificação de sucos e na melhoria da consistência de cervejas (BEG et al., 2001). Grande destaque tem sido dado ao uso da enzima para a produção de XOs, uma vez que tais compostos apresentam inúmeros benefícios potenciais à saúde (SAMANTA et al., 2015).

3.4 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Oligossacarídeos não digeríveis (ONDs) são carboidratos de baixa massa molecular que estimulam o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no cólon, principalmente as bifidobactérias e os lactobacilos, e, por isso, são reconhecidos como prebióticos (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Os ONDs não são digeridos porque o organismo de humanos não possui as enzimas necessárias para hidrolisar as ligações do tipo β que se formam entre as unidades de monossacarídeos presentes nestes carboidratos. Sendo assim, os ONDs não são degradados no sistema digestivo e atingem intactos o intestino grosso onde causam efeitos prebióticos através da modulação da microbiota do cólon (MOURE et al., 2006; MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Tal propriedade tem promovido um crescente interesse em novos prebióticos incluindo os XOs.

Comercializados na forma de um pó branco, os XOs são ONDs que contêm de 2 a 10 unidades de D-xilose unidas por ligações β -1,4 (Figura 4), mas as moléculas com um grau de polimerização (GP) menor ou igual a 20 têm sido consideradas como XOs (MAKELAINEN et al., 2010; MOURE et al., 2006; VÁZQUEZ et al., 2000). XOs podem ter proporções variáveis de substituintes, sendo que a sua composição depende da estrutura da xilana da matéria-prima original e do processo de produção (KABEL et al., 2002).

Figura 4 - Estrutura esquemática de xilose e xilo-oligossacarídeos



Fonte: Adaptado de CARVALHO et al. (2013)

Os XOs podem ser utilizados como adoçantes dietéticos em alimentos para dietas de baixa caloria e são adequados para o consumo de pessoas com diabetes (NABARLATZ et al., 2007; VÁZQUEZ et al., 2000). Além disso, apresentam inúmeros benefícios potenciais à

saúde, tais como: melhora na função intestinal, absorção de cálcio e metabolismo de lipídeos; prevenção de cáries dentárias; proteção contra doenças cardiovasculares; redução do risco de câncer de cólon devido à formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (GROOTAERT et al., 2007; WANG et al., 2009); e efeito prebiótico por estimular seletivamente a proliferação e atividade de bactérias benéficas, que inibem o desenvolvimento de bactérias patogênicas e/ou putrefativas no cólon humano (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Os XOs ainda têm atividade antioxidante e antimicrobiana, e propriedades antialérgicas, anti-infecções e anti-inflamatórias (AACHARY; PRAPULLA, 2009).

A atividade biológica dos XOs vai depender da distribuição de sua massa molar (HUGHES et al., 2007), sendo que os XOs com menos de quatro unidades monoméricas, como xilobiose (X2) e xilotriose (X3), são usados para as aplicações prebióticas, já que apresentam efeito estimulatório sobre o crescimento de bifidobactérias que são importantes na manutenção de uma microbiota intestinal saudável (JIANG et al., 2004).

No processamento de alimentos funcionais, os XOs são mais promissores que os FOs em relação à estabilidade à temperatura e ao pH (WANG et al., 2009). A estabilidade dos ONDs, tais como XOs e FOs, é dependente de sua estrutura molecular (COURTIN et al., 2009). As ligações β são mais fortes que as ligações α , e as hexoses e piranoses estão mais intimamente ligadas do que as pentoses e furanoses. Muitos oligossacarídeos podem ser hidrolisados em pHs inferiores a 4,0 quando tratados em temperaturas elevadas por um curto período de tempo, e/ou se armazenados por um longo período de tempo sob condições ambiente, resultando na perda de suas propriedades nutricionais e físico-químicas (VORAGEM, 1998).

Courtin et al. (2009) relataram que as ligações glicosídicas de FOs foram sensíveis à hidrólise em pH ácido, sendo que 67% e 60% das ligações β -2,1 entre as unidades de frutose foram clivadas nos pHs 2,0 e 3,0, respectivamente, após 60 min a 100°C. Os resultados para os XOs foram muito promissores, uma vez que apenas 21% e 9% das ligações glicosídicas foram hidrolisadas nos pHs 2,0 e 3,0, respectivamente. De acordo com Bhat (1998), os XOs são bem estáveis em uma ampla faixa de pH (2,5 a 8,0) e em temperaturas de até 100°C, o que é uma vantagem em relação a outros ONDs, tais como FOs e inulina.

No estudo desenvolvido por Wang et al. (2009), os XOs também apresentaram uma maior estabilidade durante os processos de pasteurização ou esterilização em baixos valores de pH, se comparados aos FOs. Nas condições de pasteurização (60 a 100°C e pH 2,0 por 30 min) cerca de 3% dos XOs sofreram degradação e 35% dos FOs foram degradados. Nas condições de esterilização (121°C e pH 2,0 por 50 min) apenas 16% dos XOs sofreram degradação e os FOs foram completamente degradados. Segundo Wang et al. (2009), a estabilidade térmica dos

oligossacarídeos em condições ácidas é um fator de fundamental importância no processamento de alimentos funcionais, uma vez que o efeito prebiótico na proliferação de bactérias benéficas é perdido se os compostos são convertidos em monossacarídeos, como a xilose.

Convém ressaltar que os XOs têm a vantagem de serem obtidos a partir de fontes disponíveis e de baixo custo, tais como resíduos florestais e agroindustriais, e de apresentarem efeito prebiótico semelhante ou superior aos outros oligossacarídeos (MENEZES; DURRANT, 2008). As matérias-primas mais utilizadas para a produção de XOs são: madeiras, sabugo de milho, bagaços, palhas, cascas, farelos, tortas de malte, amêndoas e olivas (VÁZQUEZ et al., 2000).

3.4.1 Produção de xilo-oligossacarídeos

Os XOs são encontrados na natureza em diversas fontes, tais como broto de bambu, frutas, vegetais, leite e mel. Em escala industrial a sua produção têm sido realizada a partir de materiais lignocelulósicos (CARVALHO et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2000).

De acordo com Vázquez et al. (2000), três abordagens distintas são utilizadas para a produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos, sendo estas: (a) tratamento enzimático de MLCs contendo as xilanas nativas; (b) fracionamento químico de um material adequado para isolar ou solubilizar a xilana, seguido de hidrólise enzimática do polissacarídeo em XOs; e (c) degradação hidrolítica da xilana para XOs através do uso de vapor, água e/ou soluções diluídas de ácidos minerais. Carvalho et al. (2013) ressaltam duas etapas: (a) extração da xilana de MLC por meio de pré-tratamentos como a auto-hidrólise e hidrólise ácida ou alcalina; e (b) hidrólise enzimática ou ácida da xilana em XOs. Segundo Samanta et al. (2015), tendo em vista a elevada demanda de prebióticos, os pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de um processo eficiente e econômico para a produção de XOs de biomassa vegetal diversificada, com destaque para os métodos de auto-hidrólise, hidrólise enzimática ou ácida (Figura 5).

A auto-hidrólise é um tratamento hidrotérmico realizado em temperaturas entre 150 e 220°C, em reatores de batelada com controle de temperatura e pressão. O reator é preenchido com o material no estado sólido adicionado de água e as reações são conduzidas em temperatura e tempo pré-fixados. Neste tipo de tratamento ocorre o fracionamento dos MLCs, sendo que a hemicelulose pode ser totalmente solubilizada, grupos acetil são clivados e pequenas alterações são causadas na lignina e celulose. Tradicionalmente a auto-hidrólise é aplicada em subprodutos e resíduos agroindustriais nos quais as hemiceluloses são, sobretudo, xilanas (BRIENZO, 2010; GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999).

Na indústria de alimentos os XOs são produzidos preferencialmente por hidrólise enzimática, devido aos problemas associados às demais estratégias de produção (AACHARY; PRAPULLA, 2009). XOs obtidos por auto-hidrólise, por exemplo, são facilmente convertidos em xilose e os hidrolisados deste tipo de processo contêm um grande número de componentes indesejáveis, tais como lignina solúvel, monossacarídeos, produtos da degradação de açúcares e lignina, ácidos orgânicos e cinzas, tornando necessário realizar longas e/ou complexas etapas de purificação. Além disso, o processo de auto-hidrólise requer um reator especial para operar em temperatura e pressão elevadas (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009; ZHU et al., 2006). Alternativamente, os XOs são obtidos por hidrólise via enzimática de xilanas, onde a principal enzima envolvida é a endo- β -1,4-xilanase (ZHU et al., 2006).

Figura 5 - Representação esquemática da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de materiais lignocelulósicos



Fonte: Adaptado de SAMANTA et al. (2015)

Para uma produção eficiente de XOs a xilana deve ser exposta à atuação de endo- β -xilanases, e nos MLCs o polímero geralmente se encontra na forma de um complexo xilana-lignina, resistente ao ataque pelas enzimas (AACHARY; PRAPULLA, 2009; ZHU et al., 2006). Sendo assim, os processos comerciais são realizados em duas etapas: extração alcalina da xilana de biomassa lignocelulósica, seguido por hidrólise enzimática ou ácida do polímero dissolvido (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009). A Tabela 3 apresenta os estudos relacionados à produção de XOs com xilanas provenientes de MLCs.

O uso de endo-xilanases na hidrólise de MLCs é vantajoso, devido principalmente à alta especificidade da enzima, às condições amenas de reação e à pouca geração de produtos

indesejáveis. A hidrólise enzimática não resulta na formação de resíduos tóxicos da catálise, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (BRIENZO, 2010). A purificação dos XOs obtidos por via enzimática é facilitada pelo pré-tratamento aplicado à biomassa lignocelulósica e a ação específica de endo- β -1,4-xilanases (MOURE et al., 2006).

Conforme Vázquez et al. (2002), para a produção de XOs o complexo xilanolítico deve ter baixa atividade de exo-xilanases e/ou β -xilosidases para atenuar ou evitar a formação de xilose que inibe a endo- β -xilanase responsável pela conversão de xilana em XOs. O sistema xilanolítico oriundo de *Pichia stipitis* apresentou tal característica e produziu hidrolisados ricos em xilobiose (X2) e xilotriose (X3) (YANG et al., 2011). Uma maior concentração da enzima de interesse pode ser alcançada através de técnicas de purificação (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012), como precipitação com sais (PAL; KHANUM, 2011) e solventes orgânicos (CORTEZ; PESSOA, 1999), separação por membranas (PRAKASH et al., 2012) e cromatografia de troca iônica (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009).

Tabela 3 - Produção de XOs por hidrólise enzimática de xilana de materiais lignocelulósicos

MLC	Extração de xilana	Fonte de endo-xilanase	Reação enzimática	Produção de XOs (g/L)	Referência
Sabugo de milho	Tratamento alcalino	<i>Aspergillus oryzae</i>	6% de xilana, 233 U/g, pH 5,4, 50°C, 14 h	10,2	AACHARY; PRAPULLA, 2009
Sabugo de milho	Tratamento alcalino	<i>Aspergillus foetidus</i>	1% de xilana, 20 U/g, pH 5,3, 45°C, 8 h	6,7	CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012
Bagaço de cana	Tratamento alcalino	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	2,6% de xilana, 60 U/g, pH 5,0, 50°C, 96 h	5,8	BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010
Bagaço de cana	Tratamento alcalino	<i>Trichoderma viridae</i>	2% de xilana, 1,3 U/g, pH 4,0, 40°C, 8 h	1,8	JAYAPAL et al., 2013
Casca de arroz	Tratamento alcalino	<i>Aspergillus niger</i>	15% de xilana, 13 U/g, pH 5,0, 40°C, 120 h	5,4	KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013
Caule de tabaco	Tratamento alcalino	<i>Aspergillus niger</i>	2% de xilana, 20 U/g, pH 5,5, 40°C, 24 h	2,8	AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009
<i>Populus tomentosa</i>	Tratamento alcalino	<i>Pichia stipitis</i>	2% de xilana, 25 U/g, pH 5,4, 50°C, 14 h	3,9	YANG et al., 2011
Folhas de palmeira	Auto-hidrólise	<i>Trichoderma viride</i>	1% de xilana, 80 U/g, pH 5,0, 40°C, 24 h	3,1	SABIHA-HANIM; NOOR; ROSMA, 2011
Gramma	Tratamento alcalino	<i>Trichoderma viridae</i>	2% de xilana, 66 U/g, pH 5,0, 40°C, 16 h	2,3	SAMANTA et al., 2012

A produção de XOs com processos enzimáticos é influenciada por fatores críticos, ou seja, o rendimento, a produtividade e os tipos de oligossacarídeos produzidos dependem da xilanase, fonte microbiana, estabilidade e atividade em diferentes pHs e/ou temperaturas. Além disso, devem ser considerados o tipo e a concentração de substrato, os parâmetros reacionais, como pH, temperatura e tempo de incubação, o pré-tratamento para a extração das xilanas e as etapas de *downstream* (AACHARY; PRAPULLA, 2009; CARVALHO et al., 2013). O estudo de tais fatores deve ser feito visando principalmente incrementar o rendimento e a qualidade dos XOs, de modo à ampliar o seu uso como ingredientes funcionais (SAMANTA et al., 2015).

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os XOs têm merecido inúmeros estudos devido ao seu potencial prebiótico e outros benefícios à saúde humana. A maioria dos trabalhos abordam a produção de XOs por hidrólise enzimática, mas ainda há vários fatores a serem explorados para que seja possível produzir estes compostos de forma viável. Neste sentido, se faz necessário incrementar as pesquisas através da investigação de diferentes preparados xilanolíticos e xilanas, incluindo as endo- β -xilanases de *A. oryzae*, *T. lanuginosus* e *A. niger* e a xilana de madeira de faia que são pouco avaliadas. Em se tratando de subprodutos e resíduos lignocelulósicos, não há relatos sobre a obtenção de XOs a partir de xilana extraída do engaço de uva e as pesquisas com xilanas de casca e farelo de arroz e casca de soja são escassas, o que torna essa abordagem bastante promissora na área de Bioprocessos em Alimentos.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**CARACTERIZAÇÃO DE ENDO- β -1,4-XILANASES E SUA APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POTENCIALMENTE PREBIÓTICOS**

Caracterização de endo- β -1,4-xilanases e sua aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos potencialmente prebióticos

RESUMO

Neste estudo, três diferentes preparados enzimáticos comerciais (Shearzyme[®], Spring Mono[®] e Hemicellulase Amano[®]) oriundos de fungos filamentosos foram avaliados quanto à atividade das principais enzimas xilanolíticas, e as endo- β -xilanases presentes foram caracterizadas em relação ao pH e à temperatura ótimos, à estabilidade térmica a 50°C e aos parâmetros cinéticos. Posteriormente, as endo- β -1,4-xilanases foram utilizadas na hidrólise da xilana de faia em XOs. Os resultados alcançados indicam que o grau de polimerização dos XOs e o rendimento de XOs e xilose são influenciados pela composição do preparado xilanolítico e propriedades da endo- β -1,4-xilanase. A hidrólise da xilana de faia com endo- β -xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) produziu mais de 90% de XOs nos hidrolisados, o que equivale a 9,55 mg/mL em 36 h de reação. O XO liberado em maior concentração foi a xilobiose (68,15%) seguido pela xilotriose (22,24%), e apenas uma pequena quantidade de xilose (6,47%) foi gerada em simultâneo, o que sugere o potencial da enzima na produção de XOs prebióticos para o uso em alimentos.

Palavras-chave: Enzimas xilanolíticas. pH ótimo. Temperatura ótima. Estabilidade térmica. Parâmetros cinéticos. Hidrólise enzimática.

1 INTRODUÇÃO

Xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros formados por unidades de xilose e que podem ter proporções variáveis de substituintes dependendo da estrutura da xilana da matéria-prima original e processo de obtenção. Os XOs podem ser usados como prebióticos e alimentos funcionais. Uma vez que tais compostos são não digeríveis, eles contribuem para a manutenção da saúde intestinal estimulando o desenvolvimento e a atividade das bactérias benéficas, como as bifidobactérias e os lactobacilos (CARVALHO et al., 2013; KABEL et al., 2002; MOURE et al., 2006). XOs com um grau de polimerização (GP) de 2 a 5 são empregados na produção de alimentos funcionais pois são consumidos pelas bactérias probióticas (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013), sendo que xilobiose (X2) e xilotriose (X3) possuem um maior efeito prebiótico (GULLÓN; GONZÁLEZ-MUÑOZ; PARAJO, 2011; JIANG et al., 2004). Além disso, o grau de doçura da xilobiose é equivalente a 30% em relação à sacarose, o que permite o seu uso em alimentos para dietas com restrição de glicose (GOLDMAN, 2009).

A produção de XOs por auto-hidrólise, também chamada de processo hidrotérmico ou hidrotermólise, de biomassa lignocelulósica resulta em hidrolisados contendo uma variedade de componentes indesejáveis (lignina, monossacarídeos e seus produtos de degradação), o que torna necessário realizar etapas extensas e complexas de purificação (ZHU et al., 2006). Como alternativa, os XOs podem ser produzidos por hidrólise enzimática ou ácida de xilanas extraídas de biomassas lignocelulósicas (AKPINAR et al., 2010; SAMANTA et al., 2015). A hidrólise enzimática é preferida na indústria biotecnológica porque não produz subprodutos indesejáveis e não requer um reator especial para operar em temperatura e pressão elevadas, como no método de auto-hidrólise (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009).

A hidrólise enzimática é realizada por endo- β -xilanases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 da xilana. Portanto, para a produção de XOs são desejados os preparados xilanolíticos com alta atividade de endo- β -1,4-xilanases e baixa atividade de exo-xilanases e/ou β -xilosidases, a fim de evitar a formação de xilose que pode inibir a atividade de endo-xilanases (VÁSQUEZ et al., 2000), e não deve estar presente em hidrolisados prebióticos (ESCARNOT; AGUEDO; PAQUOT, 2012). Convém ressaltar que as endo- β -xilanases devem apresentar atividade satisfatória nas condições de operação da hidrólise enzimática, sendo que a determinação do pH e temperatura ótimos de atuação, da termoestabilidade e dos parâmetros cinéticos da β -xilanase é um fator importante a ser considerado na sua aplicação em processos biotecnológicos, para que haja um bom rendimento do bioproduto de interesse e torne viável produzi-lo em larga escala.

A indústria de alimentos tem investido na produção de oligossacarídeos prebióticos, porém devido aos processos dispendiosos e/ou demorados o valor destes compostos é bastante elevado. O rápido desenvolvimento do setor de alimentos funcionais aliado ao crescimento do número de aplicações dos XOs aumentou o interesse em investigar diferentes fontes de endo- β -xilanases, tipos de xilana e tecnologias de produção, visando obter produtos mais puros e com um grau de polimerização definido (MOURE et al., 2006; VEGAS et al., 2008). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a relação entre as enzimas xilanolíticas de preparados enzimáticos com o perfil de carboidratos dos hidrolisados obtidos, além de caracterizar as endo- β -xilanases e avaliar a sua capacidade de produzir XOs de baixo GP a partir da xilana de faia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A xilana de faia e os substratos sintéticos (p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo/pNPX, p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo/pNPAF e p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo/pNPG) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os extratos xilanolíticos Shearzyme[®] e Spring Mono[®] foram doados pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), e Hemicellulase Amano[®] foi adquirido da Amano Enzymes Inc. (Nagoya, Japão). Os padrões de XOs (xilobiose: X2, xilotriose: X3, xilotetraose: X4 e xilopentaose: X5) foram obtidos da Megazyme (Bray, Irlanda) e o padrão de xilose foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A coluna para separação de XOs (Aminex HPX- 42A, 300 mm x 7,8 mm) foi obtida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação das atividades xilanolíticas dos preparados enzimáticos

Os preparados xilanolíticos comerciais de fungos filamentosos foram inicialmente caracterizados em termos de atividade das seguintes enzimas: endo- β -xilanases, β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases e β -glicosidases, a fim de avaliar melhor seu desempenho hidrolítico sobre a estrutura da xilana de madeira de faia. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme descrito no item 2.2.6.

2.2.2 Caracterização enzimática de endo- β -1,4-xilanases

2.2.2.1 Determinação do pH e temperatura ótimos

O efeito do pH sobre a atividade das endo- β -1,4-xilanases a 50°C foi determinado na faixa de pH de 3,5 a 7,0 (pH 3,5 a 5,5: tampão citrato de sódio 50 mM; pH 6,0 a 7,0: tampão fosfato de sódio 50 mM), usando xilana de faia como substrato. A influência da temperatura na atividade das enzimas foi verificada na faixa de 35 a 90°C, com intervalos de 5°C, mantendo o pH fixo em 5,3 (tampão citrato de sódio 50 mM) e a xilana de faia como o substrato. A atividade relativa foi expressa em percentual em relação à atividade máxima. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2.2 Determinação da estabilidade térmica a 50°C

A estabilidade térmica foi estudada pela incubação de endo- β -1,4-xilanases a 50°C, uma vez que a reação de hidrólise para a produção de XOs geralmente ocorre nesta temperatura (AACHARY; PRAPULLA, 2009). Alíquotas foram retiradas e resfriadas em banho de gelo em intervalos de tempo predefinidos até a enzima perder 50% de sua atividade inicial. A atividade residual foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A constante de desnaturação térmica (K_d) foi calculada a partir de um gráfico logarítmico semi-natural da atividade residual vs. tempo (Equação 1), e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi determinado de acordo com a Equação 2. O tempo de meia-vida corresponde ao tempo decorrido no qual a enzima perdeu 50% de sua atividade inicial.

$$\ln\left(\frac{U}{U_0}\right) = -K_d \cdot t \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (2)$$

Onde, U é a atividade enzimática no tempo t; U_0 é a atividade enzimática inicial; U/U_0 é a atividade relativa; K_d é a constante de desnaturação; t é o tempo e $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida.

2.2.2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo de Michaelis-Menten (Equação 3). A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação ($v_{m\acute{a}x}$) foram calculadas a partir de um gráfico duplo-recíproco ($1/v$ vs. $1/S$) de acordo com o método de Lineweaver-Burk (Equação 4), utilizando como substrato a xilana de faia em diferentes concentrações (1 a 20 mg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

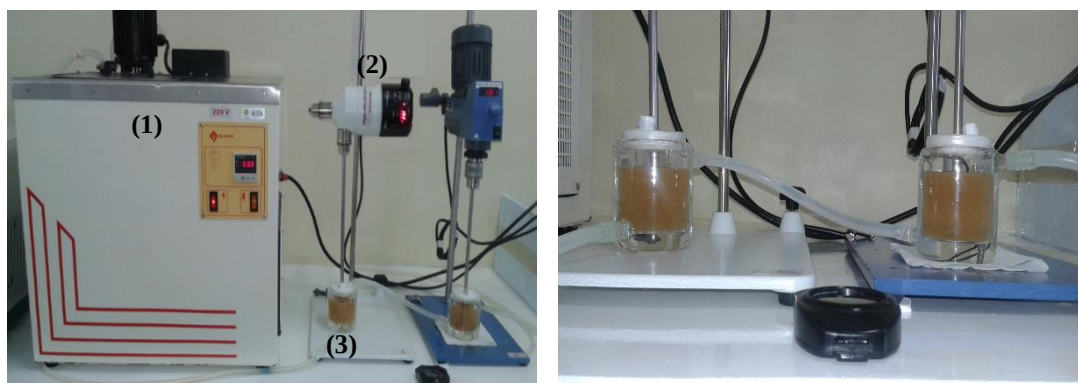
Onde, v é a velocidade de reação; $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação; K_m é a constante de Michaelis-Menten e $[S]$ é a concentração de substrato.

2.2.3 Hidrólise da xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos

Os XOs foram produzidos por hidrólise enzimática da xilana de faia usando endo- β -xilanases de grau alimentar. As reações de hidrólise foram conduzidas em reatores de mistura encamisados (Figura 1) contendo 75 mL da mistura reacional, que consistiu de 2,25 g de xilana de faia e 200 U/g de endo- β -xilanases (AACHARY; PRAPULLA, 2009). A solução de xilana foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,3. As reações foram mantidas a 50°C e 180 rpm por 36 h. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo predefinidos e imersas em banho de água fervente a 100°C por 5 min para a completa inativação da enzima. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g/10°C por 10 min (Mega 17R, Hanil) e os sobrenadantes filtrados através de membranas de fluoreto de polivinilideno, com poros de 0,22 μ m. Os filtrados foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência para determinar o rendimento e o GP dos XOs e o teor de xilose nos hidrolisados. A conversão de xilana de faia em XOs foi calculada de acordo com a Equação 5. As hidrólises foram realizadas em duplicata.

$$\text{Convers\~ao de xilana em XOs (\%)} = \frac{XOs_{\text{totais}}}{Xilana_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (5)$$

Figura 1 - Sistema reacional para a produção de XOs por hidrólise enzimática de xilana de faia. (1) Controle de temperatura, (2) Sistema de agitação e (3) Reatores de mistura



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Biosseparações (2015).

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Os hidrolisados, após 36 h de reação, foram previamente liofilizados e padronizados até um tamanho de partícula menor que 0,300 mm de diâmetro. As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610LV, Jeol) operado a 15 kV. As micrografias foram obtidas com um aumento de 700x.

2.2.5 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

2.2.6 Métodos analíticos

2.2.6.1 Determinação da atividade de endo- β -1,4-xilanase

A atividade de endo- β -xilanase foi determinada segundo o método de Bailey, Biely e Poutanen (1992), empregando xilana de madeira de faia 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,3. A mistura reacional, composta por 0,9 mL da solução de substrato e 0,1 mL do extrato enzimático (convenientemente diluído) foi incubada a 50°C por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e os açúcares redutores liberados na reação foram quantificados conforme Miller (1959). Uma unidade (U) de atividade enzimática

foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto, sob as condições do ensaio.

2.2.6.2 Determinação da atividade de β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e β -glicosidase

As atividades enzimáticas de β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e β -glicosidase foram determinadas utilizando os substratos sintéticos pNPX (0,2%, m/v), pNPAF (0,1%, m/v) e pNPG (0,2%, m/v), respectivamente, preparados em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). A mistura reacional, composta por 0,8 mL da solução de substrato e 0,2 mL do extrato enzimático (convenientemente diluído) foi incubada a 50°C por 30 min. Após, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 10% (m/v) e o p-nitrofenol (pNP) liberado foi quantificado a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por minuto, sob as condições do ensaio.

2.2.6.3 Determinação da atividade de celulasas totais

A atividade de celulasas totais foi determinada de acordo com Mandels, Andreotti e Roche (1976) utilizando o papel filtro Whatman[®] n.1, contendo 95% de α -celulose, como substrato. Em 50 mg (tiras de 1,0 cm x 6,0 cm) de papel filtro foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 50°C por 60 min, e, após, foi retirado 1,0 mL do meio e acrescentado a 1,0 mL de ácido DNS. Os açúcares redutores liberados na reação foram dosados segundo Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto, nas condições do ensaio.

2.2.6.4 Análise dos hidrolisados por CLAE

O rendimento e GP dos XOs e o teor de xilose nos hidrolisados foram determinados em cromatógrafo líquido (Prominence[®], Shimadzu), equipado com um detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu) e forno de colunas (CTO-20A, Shimadzu). Alíquotas de 20 μL foram automaticamente injetadas (SIL-20AHT, Shimadzu) e eluídas utilizando água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore), a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, como fase móvel de uma coluna para separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad), mantida a 50°C. O tempo de corrida

foi de 40 min. Os padrões de XOs e xilose foram usados como referência, sendo que as curvas de calibração (1 a 10 mg/mL) foram previamente construídas nas condições descritas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADES XILANOLÍTICAS DOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS

Conforme mostra a Tabela 1, os três preparados enzimáticos comerciais de fungos filamentosos apresentaram diferentes valores para atividades xilanolíticas e baixa atividade de celulase total. Devido à estrutura química complexa de xilanas, os micro-organismos produzem múltiplas formas de xilanases simultaneamente para obter monossacarídeos assimiláveis extras, necessários ao seu crescimento e manutenção (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Portanto, os preparados xilanolíticos comerciais contêm uma mistura de enzimas xilanolíticas, tais como endo- β -xilanases, β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, β -glicosidases, α -glucuronidases e acetil xilana esterases. O conhecimento da presença destas enzimas nos preparados xilanolíticos possibilita uma melhor avaliação da sua performance hidrolítica sobre as xilanas com diferentes estruturas, principalmente aquelas com ramificações.

As celulasas podem ser encontradas ocasionalmente nos preparados xilanolíticos se a produção de β -xilanases for feita em meio contendo xilana contaminada por celulose (BIELEY, 1985). De acordo com Srinivasan e Rele (1995), nas indústrias de celulose e papel são utilizadas endo- β -1,4-xilanases livres de celulasas para remover seletivamente a hemicelulose, com danos mínimos para a celulose. As celulasas não interferem na produção de XOs pois não atuam sobre a cadeia de xilana.

Tabela 1 - Atividades xilanolíticas e celulolítica dos preparados enzimáticos comerciais

Atividade enzimática	Shearzyme ^a (U/mL)	Spring Mono ^b (U/g)	Hemicellulase Amano ^c (U/g)
Endo- β -1,4-xilanases	4436,63 $\pm$ 59,57	21961,89 $\pm$ 558,73	34895,74 $\pm$ 1465,33
β -xilosidases	28,57 $\pm$ 0,41	ND	0,38 $\pm$ 0,01
α -L-arabinofuranosidases	1,30 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,01	9,68 $\pm$ 0,28
β -glicosidases	0,70 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	79,54 $\pm$ 0,49
Celulasas totais	0,93 $\pm$ 0,08	1,70 $\pm$ 0,33	ND
β -xilosidase/endo-xilanase	0,01000	-	0,00001

^a *Aspergillus oryzae*, ^b *Thermomyces lanuginosus*, ^c *Aspergillus niger*; Média $\pm$ desvio padrão; ND: não detectada.

Em relação ao modo de atuação das enzimas xilanolíticas, as endo- β -1,4-xilanases são essenciais para despolimerização da xilana porque atuam na cadeia principal e geram XOs, enquanto as β -xilosidases hidrolisam xilobiose e outros XOs em xilose. As enzimas auxiliares, como α -arabinofuranosidases e β -glicosidases, são responsáveis pela clivagem dos substituintes da cadeia de xilana (BIELEY, 2003; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005), facilitando o acesso das endo- β -xilanases à cadeia principal (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Para a produção enzimática de XOs são preferidos os extratos xilanolíticos com alta atividade de endo-xilanases e baixa atividade de exo-xilanases e β -xilosidases (CHEN et al., 2009; VÁSQUEZ et al., 2002), e dependendo do tipo de xilana a ser hidrolisada são necessárias as enzimas auxiliares (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

Os preparados xilanolíticos avaliados apresentam atividade de endo- β -1,4-xilanases e β -xilosidases, porém a sua relação β -xilosidase/endo-xilanase é muito baixa (Tabela 1), o que evidencia o seu potencial para a hidrólise da xilana de faia em XOs, com mínima liberação de xilose. As enzimas auxiliares, mesmo que com baixa atividade, podem ter removido os grupos substituintes da xilana de madeira de faia aumentando a acessibilidade das endo- β -xilanases à cadeia principal. Em comparação a outros tipos de processos para produção de XOs, a hidrólise enzimática apresenta vantagens que incluem: condições amenas de reação, alta especificidade, maior rendimento e/ou não geração de produtos indesejáveis (SADAF; KHARE, 2014). Porém, para ser viável o uso de enzimas, as endo- β -xilanases devem ser livres ou ter baixa atividade de β -xilosidases e ativas nas condições operacionais.

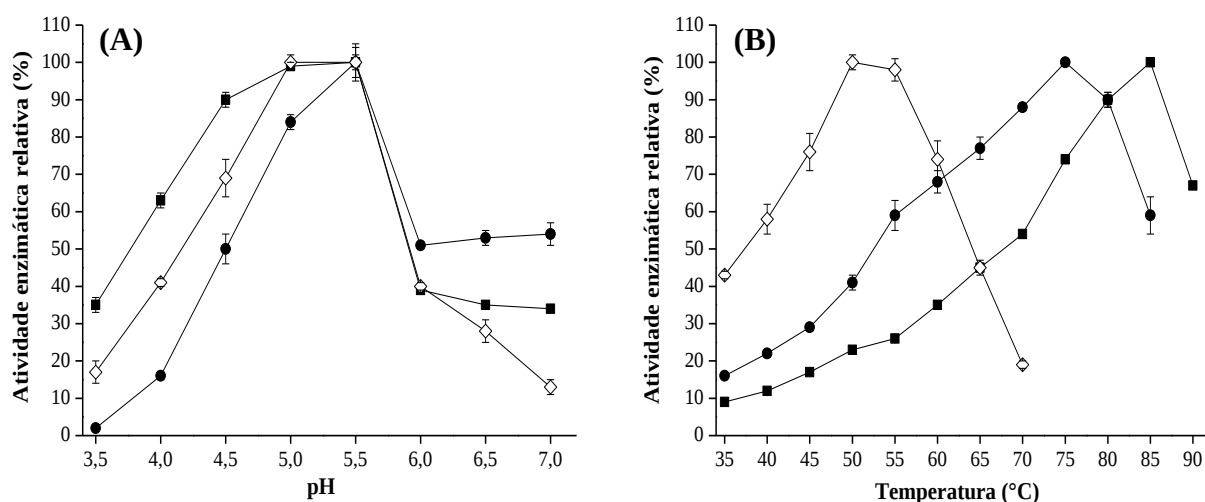
3.2 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE ENDO- β -1,4-XILANASES

As endo- β -1,4-xilanases dos preparados xilanolíticos apresentaram atividade ótima na faixa de pH de 5,0 a 5,5 (Figura 2A). Os resultados são consistentes com relatos na literatura, que informam que o pH ótimo da maioria das β -xilanases fúngicas varia de 5,0 a 6,0 (CHEN et al., 2009; CHIDI et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012; PAL; KHANUM, 2011). Além disso, em grande parte dos estudos sobre a produção de XOs, os melhores valores são alcançados na faixa de pH 4,6 a 6,0 (AACHARY; PRAPULLA, 2009; PENG et al., 2012; ZHU et al., 2006).

A Figura 2B mostra que as enzimas têm comportamentos distintos com respeito à temperatura. As endo- β -xilanases de *A. oryzae* (Shearzyme[®]) e *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) exibiram temperaturas ótimas elevadas, 85°C e 75°C, respectivamente, enquanto a β -xilanase de *A. niger* (Hemicellulase Amano[®]) foi mais ativa na faixa de 50°C a 55°C. A atividade ótima das endo- β -xilanases de *A. oryzae* e *T. lanuginosus* em temperaturas elevadas sugere que estas

enzimas são termoestáveis. Na literatura, há estudos que relatam temperaturas ótimas elevadas para as endo- β -xilanases fúngicas (CHEN et al., 2009; KOCABAS; GUDER; OZBEN, 2015). Em se tratando dos preparados xilanolíticos comerciais, a maioria deles apresenta estabilizantes e/ou conservantes na sua composição, o que contribui para a manutenção de suas propriedades enzimáticas sob condições adversas de reação.

Figura 2 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade de endo- β -1,4-xilanases comerciais: Shearzyme^a (■), Spring Mono^b (●) e Hemicellulase Amano^c (◇)



^a *Aspergillus oryzae*, ^b *Thermomyces lanuginosus*, ^c *Aspergillus niger*; Média $\pm$ desvio padrão.

A produção enzimática de XOs geralmente não é realizada a altas temperaturas, o que não impede o uso das endo- β -1,4-xilanases com temperatura ótima elevada na hidrólise da xilana de madeira de faia a 50°C, uma vez que as enzimas permanecem ativas e mantêm uma atividade parcial nesta temperatura. As endo- β -1,4-xilanases, livres de celulasas, que são ativas e estáveis em altas temperaturas podem ser aplicadas no processo de branqueamento da celulose e/ou do papel, que ocorre em torno de 60°C e meio alcalino (BEG et al., 2001).

A estabilidade térmica das endo- β -1,4-xilanases foi determinada a 50°C, devido aos resultados promissores que têm sido alcançados para os XOs em tal temperatura (AACHARY; PRAPULLA, 2009). A xilanase de *A. oryzae* (Shearzyme[®]) apresentou boa termoestabilidade, mantendo mais de 50% de sua atividade inicial após 240 h de incubação a 50°C; portanto, não foi possível calcular o K_d e a meia-vida desta enzima. A endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) também foi estável a 50°C e sua meia-vida foi de 210 h, enquanto a endo- β -1,4-xilanase de *A. niger* (Hemicellulase Amano[®]) exibiu baixa termoestabilidade, tendo perdido 50% de sua atividade inicial em 0,3 h (Tabela 2), o que pode limitar a aplicabilidade da enzima

em reações longas. A termoestabilidade da xilanase é um fator importante a ser considerado na produção de XOs em razão do tempo de hidrólise.

A fim de compreender melhor a afinidade das endo- β -1,4-xilanases pelo substrato e o perfil de velocidade da reação foi feita a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $v_{m\acute{a}x}$ que são apresentados na Tabela 2. Dentre as enzimas avaliadas, o K_m da endo- β -xilanase de *A. oryzae* (Shearzyme[®]) foi o menor, o que indica a sua maior afinidade com a xilana de faia. O valor de K_m é inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato, portanto, um baixo valor de K_m se refere a uma elevada afinidade para um dado substrato, neste caso a xilana de faia, pois uma baixa concentração de substrato é necessária para atingir metade da velocidade máxima ($v_{m\acute{a}x}$) (WHITAKER, 1994).

Tabela 2 - Estabilidade térmica a 50°C e parâmetros cinéticos de endo- β -1,4-xilanases comerciais de fungos filamentosos

Caracterização	Parâmetro	Shearzyme ^a	Spring Mono ^b	Amano ^c
Estabilidade térmica	K_d	-	0,0033 h ⁻¹	2,2440 h ⁻¹
	$t_{1/2}$	> 240 h	210 h	0,3 h
	R^2	-	0,984	0,991
Parâmetros cinético	K_m	8,0 mg/mL	15,0 mg/mL	20,0 mg/mL
	$v_{m\acute{a}x}$	10.000 U/mL	50.000 U/g	100.000 U/g
	R^2	0,980	0,981	0,990

^a *Aspergillus oryzae*, ^b *Thermomyces lanuginosus*, ^c *Aspergillus niger*.

A atividade de endo- β -xilanases é influenciada por fatores ambientais, tais como pH, temperatura, tipo e/ou concentração de substrato, que podem afetar fortemente a estrutura tridimensional específica e a conformação espacial das proteínas, interferindo diretamente no rendimento dos processos enzimáticos (JURADO et al., 2004). A caracterização enzimática que antecede a aplicação da enzima em um dado processo é essencial para se ter o conhecimento das melhores condições para a sua atuação, e tornar possível a produção de hidrolisados com níveis elevados de XOs e baixo teor de monossacarídeos.

3.3 HIDRÓLISE DA XILANA DE FAIA E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

O perfil de carboidratos e a concentração de XOs totais (X2 a X5) obtidos com a endo- β -1,4-xilanase de *A. oryzae* (Shearzyme[®]) são apresentados na Tabela 3. Ao término de 2 h de reação, a quantidade de XOs gerados foi de $11,76 \pm 0,05$ mg/mL, que corresponde a

96,71% dos carboidratos totais no hidrolisado, enquanto a xilose representou apenas 3,29%. O percentual de XOs com GP de 3 a 5 diminuiu significativamente com o tempo, indicando claramente que eles foram hidrolisados para xilobiose (X2) e xilose. O aumento do teor de xilose no hidrolisado pode ser explicado pelo fato do preparado xilanolítico ter β -xilosidase (Tabela 1), que hidrolisa a xilobiose e/ou outros XOs em xilose. Kiran, Akpinar e Bakir (2013), ao utilizar um preparado xilanolítico similar (Shearzyme[®] 500 L), verificaram que a endo- β -1,4-xilanase foi eficiente na hidrólise de xilanas porém não o consideraram adequado para a produção de XOs, uma vez que a presença de β -xilosidase resultou na liberação de uma maior quantidade de xilose (25 mg de xilose/g de xilana) se comparada à concentração de xilose obtida (15 mg de xilose/g de xilana) com um preparado enzimático sem atividade desta enzima.

Após 36 h, ocorreu uma diminuição no percentual de XOs totais de 96,71% para 83,51%, e o percentual de xilose no hidrolisado aumentou para cerca de 16,49%, que equivale a $2,52 \pm 0,01$ mg/mL. Xilobiose (X2) foi o XO produzido em maior concentração, alcançando um máximo de $10,75 \pm 0,04$ mg/mL.

Tabela 3 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Shearzyme[®] de *Aspergillus oryzae*

Tempo de reação (h)	Perfil de carboidratos (%) do hidrolisado					XOs totais ^b (mg/mL)
	Xilose	X2 ^a	X3 ^a	X4-X5 ^a	XOs totais ^b	
2	3,29	55,80	22,78	18,14	$96,71 \pm 0,01$	$11,76 \pm 0,05$
4	7,23	58,93	18,13	15,72	$92,77 \pm 0,03$	$12,13 \pm 0,12$
6	9,47	60,21	16,08	14,24	$90,53 \pm 0,10$	$12,33 \pm 0,05$
8	10,98	61,79	13,80	13,43	$89,02 \pm 0,02$	$12,33 \pm 0,11$
10	11,60	64,54	12,04	11,82	$88,41 \pm 0,35$	$12,04 \pm 0,20$
12	11,92	66,54	10,99	10,54	$88,08 \pm 0,02$	$11,82 \pm 0,12$
14	12,91	66,68	10,06	10,35	$87,10 \pm 0,31$	$12,08 \pm 0,35$
16	13,59	65,44	10,02	10,95	$86,41 \pm 0,03$	$12,59 \pm 0,16$
20	14,49	68,55	9,11	7,85	$85,51 \pm 0,09$	$12,25 \pm 0,18$
24	14,93	66,97	8,49	9,60	$85,07 \pm 0,04$	$12,62 \pm 0,01$
36	16,49	70,47	6,23	6,82	$83,51 \pm 0,02$	$12,74 \pm 0,09$

^a X2: xilobiose, X3: xilotriose, X4: xilotetraose, X5: xilopentaose; ^b Média $\pm$ erro padrão.

Os resultados da produção de XOs utilizando endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) são mostrados na Tabela 4. Ao final de 2 h, o percentual de XOs produzidos foi de 99,11% dos carboidratos totais no hidrolisado, o que equivale a $6,70 \pm 0,01$ mg/mL. Nesta hidrólise, o percentual de XOs com GP de 3 a 5 também diminuiu com o aumento do

tempo, em razão da sua hidrólise em oligossacarídeos de menor GP. No tempo de 36 h, a concentração de XOs foi igual a $9,55 \pm 0,17$ mg/mL e a de xilose foi menor que 0,70 mg/mL, uma vez que a β -xilosidase não estava presente no extrato xilanolítico comercial, conforme mostra a Tabela 1. Xilobiose (X2) e xilotriose (X3) foram produzidos em maior quantidade no hidrolisado, sendo que X2 aumentou (2,59 a 6,96 mg/mL) e X3 diminuiu (2,73 a 2,27 mg/mL) com o tempo de reação. Convém ressaltar ainda que, em todo o tempo de hidrólise, os XOs representam mais de 90% dos carboidratos nos hidrolisados.

Tabela 4 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Spring Mono[®] de *Thermomyces lanuginosus*

Tempo de reação (h)	Perfil de carboidratos (%) do hidrolisado					XOs totais ^b (mg/mL)
	Xilose	X2 ^a	X3 ^a	X4-X5 ^a	XOs totais ^b	
2	0,89	38,27	40,41	20,43	$99,11 \pm 0,01$	$6,70 \pm 0,01$
4	1,45	48,69	37,32	12,55	$98,55 \pm 0,01$	$7,50 \pm 0,07$
6	1,90	54,02	34,60	9,49	$98,10 \pm 0,03$	$7,76 \pm 0,14$
8	2,26	57,63	33,39	6,72	$97,74 \pm 0,06$	$8,01 \pm 0,01$
10	2,62	59,75	31,69	5,94	$97,38 \pm 0,01$	$8,19 \pm 0,04$
12	2,97	61,49	30,42	5,12	$97,03 \pm 0,06$	$8,34 \pm 0,01$
14	3,31	62,79	29,22	4,68	$96,69 \pm 0,01$	$8,47 \pm 0,02$
16	3,60	63,74	28,38	4,28	$96,40 \pm 0,02$	$8,56 \pm 0,04$
20	4,11	65,57	26,48	3,84	$95,89 \pm 0,05$	$8,86 \pm 0,12$
24	4,97	66,46	25,10	3,47	$95,03 \pm 0,21$	$9,18 \pm 0,03$
36	6,47	68,15	22,24	3,13	$93,53 \pm 0,08$	$9,55 \pm 0,17$

^a X2: xilobiose, X3: xilotriose, X4: xilotetraose, X5: xilopentaose; ^b Média $\pm$ erro padrão.

Após 2 h de reação, a concentração de XOs produzida pela endo- β -xilanase de *A. niger* (Amano[®]) foi de $7,31 \pm 0,21$ mg/mL, o que equivale a 96,95% dos carboidratos totais no hidrolisado (Tabela 5). O rendimento de xilobiose (X2) aumentou gradativamente com o tempo e menor variação foi observada para a produção de xilotriose (X3). O percentual de XOs totais diminuiu no decorrer da reação, devido, sobretudo, à degradação dos XOs com GP de 4 a 5 em xilose. A concentração de xilose no final da reação foi baixa ($1,73 \pm 0,08$ mg/mL), uma vez que o preparado xilanolítico apresentou baixa atividade de β -xilosidase (Tabela 1).

O nível de conversão da xilana de faia (Figura 3), o tipo e/ou a quantidade de XOs formados nas reações de hidrólise variaram com cada preparado xilanolítico porque eles exibem composição e mecanismos de ação bastante específicos. Por exemplo, o preparado Shearzyme[®] apresentou a maior atividade de β -xilosidase e, consequentemente, produziu um maior teor de

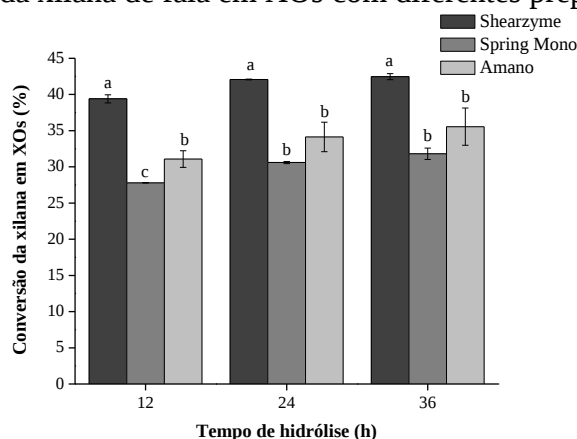
xilose; enquanto o extrato Spring Mono[®], que não possui atividade de β -xilosidase, gerou pouca xilose. Por outro lado, a endo- β -xilanasase do preparado Shearzyme[®] tem um baixo valor de K_m e foi capaz de hidrolisar de forma mais eficiente a xilana de faia. Além disso, é possível que as enzimas auxiliares tenham tido alguma influência sobre a hidrólise da xilana de faia, embora sua cadeia seja pouco ramificada. As enzimas puras permitem controlar a hidrólise e obter os produtos desejados, mas os extratos enzimáticos comerciais contêm uma mistura de diferentes enzimas que atuam na hidrólise da cadeia de xilana. Sendo assim, o tipo de XOs formados dá informações sobre a especificidade do substrato (MAKARAVICIUS et al., 2012).

Tabela 5 - Produção de xilo-oligossacarídeos e xilose a partir da xilana de faia usando o preparado xilanolítico Hemicellulase Amano[®] de *Aspergillus niger*

Tempo de reação (h)	Perfil de carboidratos (%) do hidrolisado				XOs totais ^b (mg/mL)
	Xilose	X2 ^a	X3 ^a	X4-X5 ^a	
2	3,05	35,70	38,82	22,43	96,95 $\pm$ 0,08
4	4,35	40,99	38,93	15,74	95,65 $\pm$ 0,03
6	5,33	43,87	38,43	12,37	94,67 $\pm$ 0,02
8	6,77	45,04	37,38	10,80	93,23 $\pm$ 0,04
10	8,10	46,10	36,72	9,08	91,90 $\pm$ 0,07
12	9,29	47,28	37,26	6,17	90,71 $\pm$ 0,09
14	10,38	47,89	36,35	5,38	89,62 $\pm$ 0,09
16	11,26	48,24	35,15	5,35	88,74 $\pm$ 0,02
20	11,80	49,47	34,26	4,47	88,20 $\pm$ 0,00
24	12,44	50,32	33,18	4,06	87,56 $\pm$ 0,03
36	13,96	51,96	30,90	3,19	86,04 $\pm$ 0,06

^a X2: xilobiose, X3: xilotriose, X4: xilotetraose, X5: xilopentaose; ^b Média $\pm$ erro padrão.

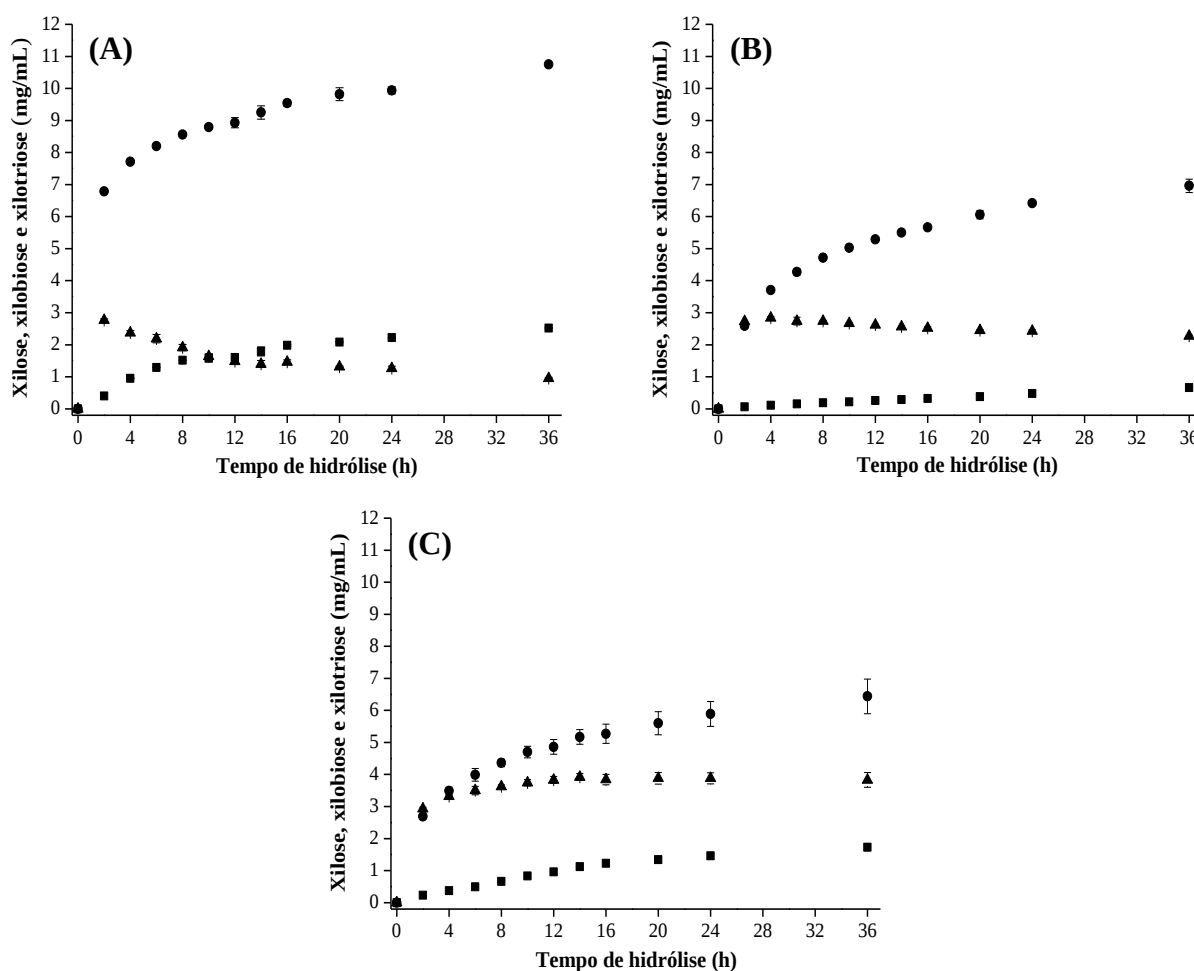
Figura 3 - Conversão da xilana de faia em XOs com diferentes preparados xilanolíticos



* Média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes para o mesmo tempo de reação indicam que há diferença significativa a 95% de confiança ($p < 0,05$).

A aplicação potencial dos XOs obtidos por hidrólise enzimática é definida com base no perfil de carboidratos do hidrolisado, sendo que para fins prebióticos é importante restringir o teor de monossacarídeos, como xilose e/ou arabinose, pois eles são digeríveis (ESCARNOT; AGUEDO; PAQUOT, 2012). Além disso, os XOs de baixo GP, principalmente xilobiose (X2) e xilotriose (X3), devem ser priorizados devido ao seu rápido consumo por bactérias probióticas (LOO et al., 1999). Com tal finalidade, as endo- β -1,4-xilanases foram avaliadas em relação à sua capacidade de produzir hidrolisados contendo XOs de baixo GP (X2 e X3), com pouca ou nenhuma geração de xilose (Figura 4).

Figura 4 - Produção de xilose (■), xilobiose (●) e xilotriose (▲) usando endo- β -1,4-xilanases comerciais: Shearzyme® de *A. oryzae* (A), Spring Mono® de *T. lanuginosus* (B) e Hemicellulase Amano® de *A. niger* (C). Média $\pm$ erro padrão



A maior produção de xilobiose foi atingida com a endo- β -1,4-xilanase de *A. oryzae* (Shearzyme®). As endo-xilanases de *T. lanuginosus* (Spring Mono®) e *A. niger* (Hemicellulase Amano®) apresentaram um comportamento semelhante para xilobiose, porém a endo-xilanase de *A. niger* (Hemicellulase Amano®) produziu mais xilotriose. A quantidade de xilose liberada

pelos três preparados xilanolíticos obedece a seguinte sequência: Shearyzyme[®] > Hemicellulase Amano[®] > Spring Mono[®], que está de acordo com a sua atividade de β -xilosidase. No presente estudo, a endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) se mostrou a mais promissora para a produção de hidrolisados contendo XOs com potencial prebiótico e baixo teor de xilose, que são características necessárias para a sua incorporação no meio de crescimento de bactérias probióticas (SABIHA-HANIM; NOOR; ROSMA, 2011).

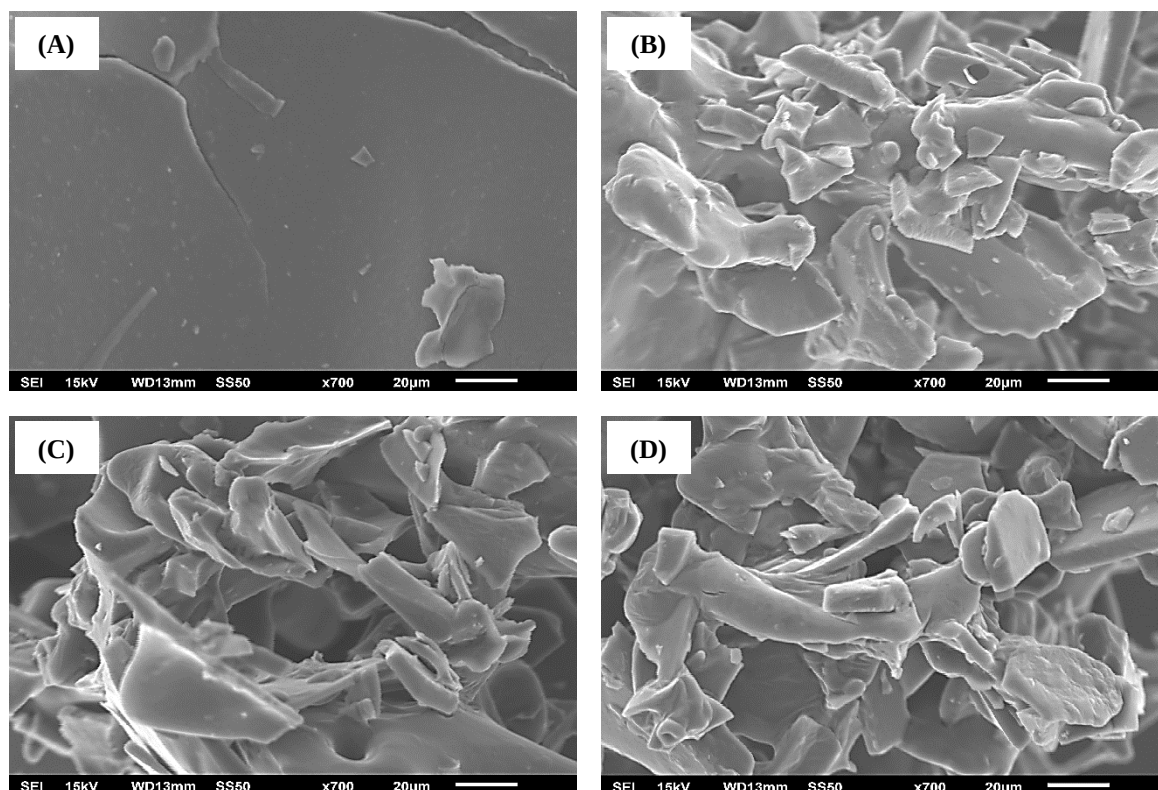
Em comparação a outros trabalhos descritos na literatura, a hidrólise enzimática da xilana de madeira de faia com endo- β -1,4-xilanases comerciais de fungos filamentosos rendeu bons resultados. Aachary e Prapulla (2009) usaram endo-xilanase de *Aspergillus oryzae* MTCC 5154 para produzir XOs a partir de sabugo de milho pré-tratado, e obtiveram hidrolisados com cerca de 81% de XOs totais (10,2 mg/mL) e 73% de xilobiose. Brienzo, Carvalho e Milagres (2010) relataram que as diferentes cargas de endo- β -1,4-xilanase de *Thermoascus aurantiacus* produziram de 2,8 a 6,4 mg/mL de XOs (14% a 33% de xilobiose) por hidrólise do bagaço de cana pré-tratado. A endo- β -1,4-xilanase de *Trichoderma viridae* foi utilizada para a conversão da xilana de capim e produziu 2,8 mg/mL de XOs totais, com 1,7 mg/mL de xilobiose (61%) e 1,1 mg/mL (39%) de xilotriose (SAMANTA et al., 2012).

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias da Figura 5 mostram as microestruturas da xilana de faia original, e após ter sido submetida à hidrólise com endo- β -xilanases comerciais de fungos filamentosos. Conforme pode ser visto na Figura 5A, a xilana de madeira de faia possui uma estrutura intacta antes do tratamento enzimático e, posteriormente, apresenta mudanças estruturais significativas (Figuras 5B, 5C e 5D) devido à atuação de enzimas xilanolíticas. Portanto, os resultados obtidos com as micrografias corroboraram que as endo- β -xilanases foram ativas na hidrólise da xilana de madeira de faia e, conseqüentemente, liberaram XOs nos hidrolisados.

Kocabas, Guder e Ozben (2015) observaram mudanças estruturais significativas na xilana de sabugo de milho após o tratamento enzimático, e relacionaram tal fato com o nível de XOs gerados durante a hidrólise deste substrato com as endo- β -1,4-xilanases de *Scytalidium thermophilum* ATCC 16454.

Figura 5 - Micrografias obtidas por MEV da xilana de faia original (A); e após 36 h de hidrólise com endo- β -1,4-xilanases dos preparados xilanolíticos: Shearzyme[®] de *A. oryzae* (B); Spring Mono[®] de *T. lanuginosus* (C) e Hemicellulase Amano[®] de *A. niger* (D)



* Micrografias obtidas com um aumento de 700x.

No presente estudo, foi possível demonstrar experimentalmente que a composição enzimática dos preparados xilanolíticos e as propriedades das endo- β -1,4-xilanases são fatores determinantes na produção de XOs com um GP definido, sobretudo os com GP de 2 a 3, e baixo teor de xilose. Hidrolisados contendo predominantemente xilobiose e xilotriose e uma pequena quantidade de xilose foram obtidos com endo- β -xilanase de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]). A concentração de XOs atingiu um máximo de 9,55 mg/mL (72,87% de xilobiose e 23,76% de xilotriose), e somente 0,66 mg/mL de xilose foi simultaneamente liberada, o que evidencia o potencial da enzima na produção de XOs prebióticos a partir da xilana de faia.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática da xilana de faia produziu XOs com potencial prebiótico, sendo que xilobiose e xilotriose foram os componentes em maior quantidade na mistura de XOs produzidos por conversão enzimática da xilana de faia, usando endo- β -1,4-xilanases comerciais de fungos filamentosos. A composição do preparado xilanolítico e as propriedades da endo- β -1,4-xilanase influenciaram diretamente no tipo e na quantidade de XOs formados e no teor de

xilose nos hidrolisados. A endo- β -1,4-xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) produziu a maior concentração de XOs e o menor teor de xilose, o que a torna promissora para o uso em aplicações alimentares.

5 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, p. 991-995, 2009.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 119-125, 2010.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145-151, 2009.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2003. cap. 71.

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

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, p. 75-85, 2013.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5230-5236, 2009.

- CHIDI, S. B.; GODANA, B.; NCUBE, I.; RENSBURG, E. J. V.; CRONSHAW, A.; ABOTSI, E. K. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- ESCARNOT, E.; AGUEDO, M.; PAQUOT, M. Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 243-253, 2012.
- GOLDMAN, N. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. **Basic Biotechnology**, v. 5, p. 31-36, 2009.
- GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P. S.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; LEME, A. F. P.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293-299, 2012.
- GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJO, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6112-6119, 2011.
- JIANG, Z. Q.; DENG, W.; ZHU, Y. P.; LI, L. T.; SHENG, Y. J.; HAYASHI, K. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 207-213, 2004.
- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33-40, 2004.
- KABEL, M. A.; CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; AVGERINOS, E.; KOUKIOS, E.; PARAJO, J. C.; GÍRIO, F. M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 47-56, 2002.
- KIRAN, E. U.; AKPINAR, O.; BAKIR, U. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 565-574, 2013.
- KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.
- LOO, J. V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T. V.; HEUVEL, E. V. D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII-AIRII-CT94 -1095). **British Journal of Nutrition**, v.81, p. 121-132, 1999.

MAKARAVICIUS, T.; BASINSKIENE, L.; JUODEIKIENE, G.; GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A. Production of oligosaccharides from extruded wheat and rye biomass using enzymatic treatment. **Catalysis Today**, v. 196, n. 1, p. 16-25, 2012.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 21-33, 1976.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOURE, A.; GULLON, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913-1923, 2006.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 879-887, 2011.

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

SABIHA-HANIM, S.; NOOR, M. A. M.; ROSMA, A. Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1234-1239, 2011.

SADAF, A.; KHARE, S. K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosaccharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126-130, 2014.

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

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*). **Bioresource Technology**, v. 112, p. 199-205, 2012.

SRINIVASAN, M. C.; RELE, M. V. Cellulase-free xylanases from microorganisms and their application to pulp and paper biotechnology: an overview. **Indian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 93-101, 1995.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of *Eucalyptus wood*. **Food Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 91-105, 2002.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C.

Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387-393, 2000.

VEGAS, R.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Enzymatic processing of rice husk autohydrolysis products for obtaining low molecular weight oligosaccharides. **Food Biotechnology**, v. 22, p. 31-46, 2008.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

ZHU, Y.; KIM, T. H.; LEE, Y. Y.; CHEN, R.; ELANDER, R. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 586-598, 2006.

ARTIGO 2

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS COM POTENCIAL
PREBIÓTICO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA XILANA DE FAIA**

Maximização da produção de xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico por hidrólise enzimática da xilana de faia

RESUMO

Para aplicações em alimentos são preferidos os XOs com um baixo grau de polimerização (GP) devido ao seu maior potencial prebiótico e capacidade adoçante. Portanto, neste estudo, foram analisados os efeitos dos parâmetros de hidrólise, tais como concentração de substrato, relação enzima:substrato, pH, temperatura e tempo de reação, visando maximizar a produção de XOs com potencial prebiótico por hidrólise enzimática da xilana de faia. Os resultados mostram que a concentração de xilana de faia e a temperatura foram os parâmetros reacionais que tiveram uma maior influência sobre o rendimento dos XOs de baixo GP, principalmente xilobiose (X2) e xilotriose (X3), sendo que na melhor condição de hidrólise (6% de xilana de faia, 133 U/g de endo- β -xilanase, pH 5,5 e 60°C por 24 h) foram produzidos cerca de 17,48 mg/mL de X2+X3 e menos de 1,0 mg/mL de xilose. Os XOs de maior GP, como xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5), foram liberados em pouca quantidade, igual a 0,53 e 0,26 mg/mL, respectivamente. Os hidrolisados obtidos possuem XOs potencialmente prebióticos e são promissores para o uso em alimentos.

Palavras-chave: Endo- β -1,4-xilanase. Parâmetros reacionais. Xilobiose. Xilotriose. Xilose.

1 INTRODUÇÃO

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros constituídos por unidades de xilose considerados como ingredientes alimentares não digeríveis. Os XOs exibem efeitos prebióticos quando consumidos como parte da dieta porque eles não são hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal superior e estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, promovendo a saúde (OKAZAKI; FUJIKAWA; MASTUMOTO, 1990; VÁSQUEZ et al., 2000). A importância dos XOs como um ingrediente alimentar valioso é cada vez maior, uma vez que possuem efeitos potencialmente benéficos à saúde, como: redução do risco de câncer do cólon (WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001), redução do colesterol (NA; KIM, 2007), aumento da disponibilidade biológica de cálcio (KOBAYASHI et al., 1991), além de atividade antioxidante (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015) e antimicrobiana (AACHARY; PRAPULLA, 2009).

As aplicações potenciais mais importantes dos XOs, em termos de mercado, são como ingredientes para alimentos funcionais ou componentes ativos de preparações simbióticas (MOURE et al., 2006). Para tal fim, são preferidos os XOs com grau de polimerização de 2 a 4 (LOO et al., 1999), sendo que as bifidobactérias utilizam sobretudo xilobiose e xilotriose para o seu desenvolvimento (OKAZAKI; FUJIKAWA; MASTUMOTO, 1990). Além disso, o grau de doçura da xilobiose é equivalente a 30% em relação à sacarose, enquanto os XOs maiores não têm gosto doce (GOLDMAN, 2009). XOs possuem um baixo valor calórico o que permite o seu uso em dietas com restrição de glicose (TOSHIO et al., 1990).

Na indústria de alimentos os XOs são produzidos, preferencialmente, por hidrólise enzimática, devido aos inúmeros problemas associados às outras tecnologias de produção. A endo- β -1,4-xilanase é responsável pela catálise da hidrólise de ligações glicosídicas β (1-4) entre as unidades de xilopiranosil da cadeia principal das xilanas e liberação de XOs. As endo- β -1,4-xilanases são, em sua maioria, estáveis ao pH e à temperatura e possuem um grande potencial para as diversas aplicações biotecnológicas (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; HARRIS; RAMALINGAM, 2010). A endo- β -1,4-xilanase comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) foi avaliada e mostrou propriedades adequadas para a produção de XOs, com destaque para o pH ótimo ácido (pH 5,5) e estabilidade a 50°C, além da capacidade de catalisar a hidrólise da xilana de faixa gerando XOs de baixo GP (SILVEIRA; GUIDO; KALIL, 2015).

O uso eficiente de enzimas depende das variáveis do processo enzimático, tais como concentração de substrato, concentração de enzima (ou relação enzima:substrato), temperatura, pH, tempo de reação, intensidade de agitação e presença de espécies químicas que podem inibir

ou acelerar a taxa de reação. Sendo assim, para o processo enzimático ser realizado com elevada eficiência é imprescindível a otimização das condições de hidrólise (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Os parâmetros reacionais de hidrólise podem influenciar no rendimento e grau de polimerização dos XOs e, portanto, devem ser avaliados a fim de maximizar a produção dos produtos de interesse.

Há vários relatos na literatura sobre a maximização da produção de XOs a partir de diferentes xilanas, mas os trabalhos com a xilana de faia são escassos, o que aumenta o interesse em investigar a reação de hidrólise deste substrato por endo- β -xilanases de fungos filamentosos pouco exploradas, buscando uma maior produção dos XOs de baixo GP. Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a influência dos parâmetros reacionais de hidrólise na produção de XOs com potencial prebiótico utilizando xilana de faia e endo- β -1,4-xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

No presente estudo, foi utilizada a endo- β -1,4-xilanase comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) com grau alimentar, cedida pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). A xilana de faia foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os padrões de XOs e xilose foram adquiridos da Megazyme (Bray, Irlanda) e Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), respectivamente. A coluna para a separação de XOs (Aminex HPX-42A) foi obtida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Hidrólise da xilana de faia e produção de xilo-oligossacarídeos

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas em duplicata em reatores de mistura encamisados com agitação mecânica de 180 rpm. O sistema reacional foi composto por xilana de madeira de faia dissolvida em tampões citrato ou fosfato de sódio (50 mM) e enzima, totalizando um volume de 50 mL. As quantidades de substrato e enzima adicionadas, o pH e a temperatura de reação foram estabelecidos de acordo com o estudo dos efeitos de parâmetros reacionais na produção de XOs. Alíquotas de 2,0 mL foram retiradas em intervalos de tempo

predefinidos (0, 3, 6, 9, 12 e 24 h) e a reação enzimática foi interrompida pelo aquecimento do meio a 100°C por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min (Mega 17R, Hanil), e os sobrenadantes foram filtrados através de membranas de fluoreto de polivinilideno (poros de 0,22 µm) e caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência para determinar o GP e a concentração dos XOs e o teor de xilose nos hidrolisados. A conversão de xilana em XOs foi calculada pela relação entre a massa de XOs gerados pela massa inicial de xilana.

2.2.2 Estudo dos efeitos de parâmetros reacionais na produção de xilo-oligossacarídeos

Para o estudo, foi utilizada a técnica univariável onde foi avaliado um fator por vez, mantendo-se as outras variáveis do processo constantes. O efeito da concentração de substrato na produção de XOs foi estudado através da realização de hidrólises variando a concentração de xilana de madeira de faia (1 a 6%, m/v), sendo fixados a carga de enzima (300 U), o pH (5,3) e a temperatura (50°C). O efeito da carga de endo-β-1,4-xilanase foi avaliado pela variação da relação enzima:substrato (133 e 266 U/g) em duas concentrações de xilana de faia (4,5 e 6,0%), e foram fixados o pH (5,3) e a temperatura (50°C). O efeito do pH foi investigado variando-se o pH do meio reacional (4,5; 5,5 e 6,5) com 6,0% de xilana de faia e 133 U/g de endo-β-xilanase, mantido a 50°C. O efeito da temperatura (40, 50 e 60°C) foi estudado utilizando 6,0% de xilana, 133 U/g de enzima e pH 5,5. Após, com os parâmetros reacionais selecionados (6,0% de xilana, 133 U/g de enzima, pH 5,5 e 60°C) foi avaliada a produção de XOs também em maiores tempos de hidrólise, 36 e 48 h. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

2.2.3 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. Em seguida, os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

2.2.4 Métodos analíticos

2.2.4.1 Determinação da atividade de endo-β-1,4-xilanase

A atividade de endo-β-xilanase foi determinada segundo o método de Bailey, Biely e Poutanen (1992), empregando xilana de madeira de faia 1% (m/v) em tampão citrato de sódio

50 mM pH 5,3. A mistura reacional, composta por 0,9 mL da solução de substrato e 0,1 mL do extrato enzimático (convenientemente diluído), foi incubada a 50°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os açúcares redutores (AR) liberados na reação foram quantificados segundo Miller (1959). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, sob as condições do ensaio.

2.2.4.2 Análise dos hidrolisados por CLAE

Os produtos de hidrólise da xilana foram analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence[®], Shimadzu), equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de colunas (CTO-20A). As alíquotas de 20 μ L foram injetadas com um amostrador automático (SIL-20AHT) e eluídas utilizando água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore) como fase móvel da coluna para a separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad). A coluna foi usada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min e mantida a 50°C, e o tempo de corrida foi de 40 min. A identificação e a quantificação de XOs (X2-X5) e xilose (X1) foram realizadas utilizando os tempos de retenção e as curvas de calibração, respectivamente. As curvas de calibração foram construídas com o *pool* de padrões (XOs e xilose), em concentrações de 1 a 10 mg/mL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

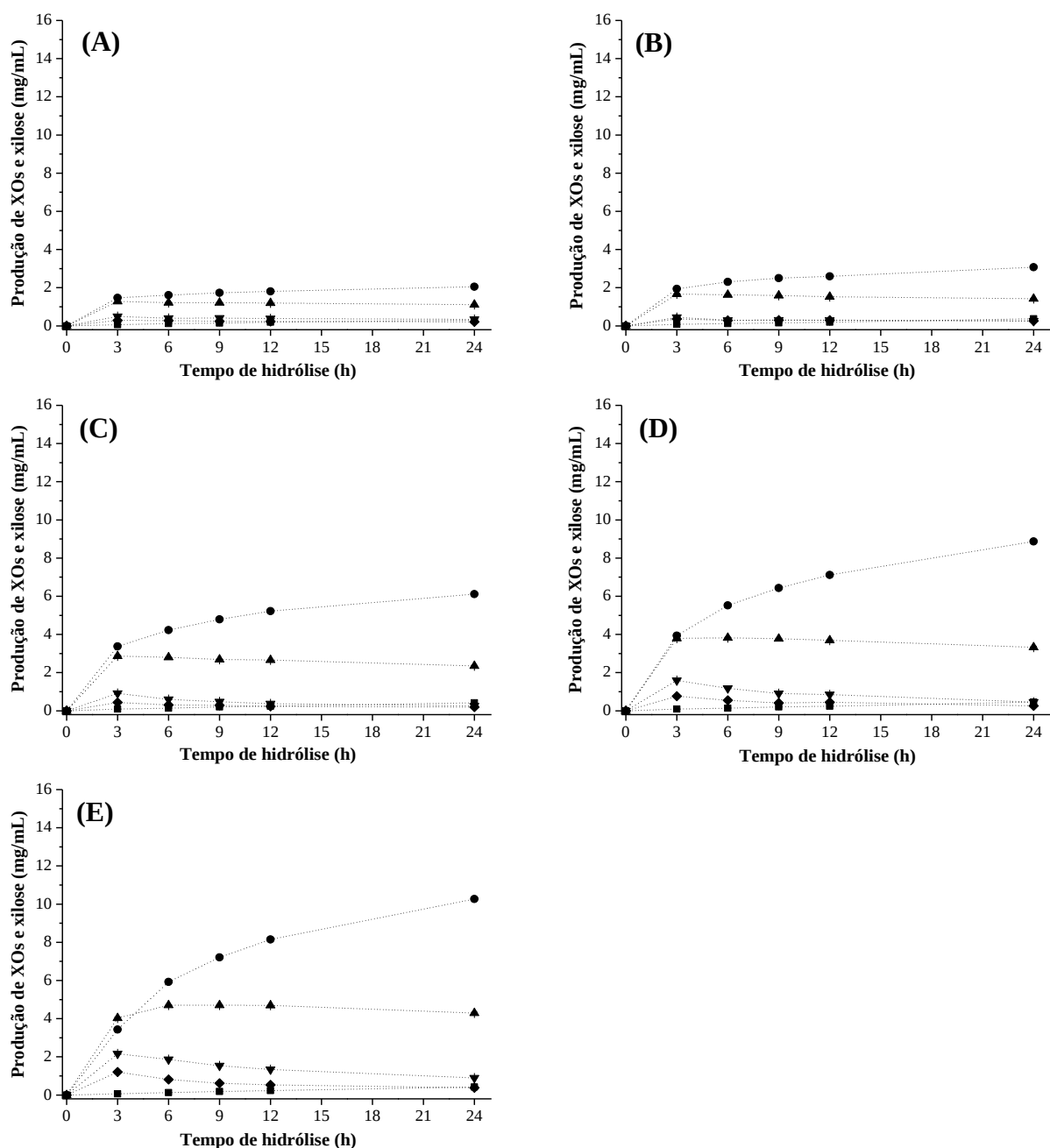
3.1 ESTUDO DOS EFEITOS DE PARÂMETROS REACIONAIS NA PRODUÇÃO DE XOs

Neste trabalho, os parâmetros reacionais foram estudados de modo a estabelecer as condições que conduzem a máxima conversão da xilana de faia em XOs, sobretudo xilobiose e xilotriose, com mínima liberação de monossacarídeos. O efeito da variação da concentração de substrato (1,0 a 6,0%) sobre a produção de XOs foi avaliado usando uma endo- β -1,4-xilanase (300 U) de *T. lanuginosus*. Não foi possível empregar concentrações de substrato acima de 6,0% porque foi verificado experimentalmente que esse valor se encontra próximo ao limite de solubilidade da xilana de faia em meio aquoso. Além disso, de acordo com Akpınar et al. (2007) a utilização de uma alta concentração de substrato pode diminuir o rendimento de XOs devido à inibição da enzima por impurezas presentes e o aumento da viscosidade e densidade do meio.

Conforme se pode observar na Figura 1, o comportamento cinético das reações de hidrólise com diferentes concentrações de substrato foi semelhante, sendo que no decorrer do

tempo os oligossacarídeos de maior GP, tais como xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5), foram parcialmente hidrolisados em XOs de menor GP, principalmente xilobiose (X2), e houve um leve incremento na liberação de monômeros de xilose. Um perfil cinético similar foi observado por Achary e Prapulla (2009), que relatam um decréscimo no percentual de XOs no hidrolisado com o aumento do tempo reacional devido à hidrólise dos XOs maiores em oligossacarídeos de baixo GP e xilose. De acordo com os autores, durante a fase inicial da reação ocorre a hidrólise randômica da xilana que resulta na formação de longas cadeias de xilooligossacarídeos, as quais são posteriormente hidrolisadas em oligossacarídeos menores e monossacarídeos.

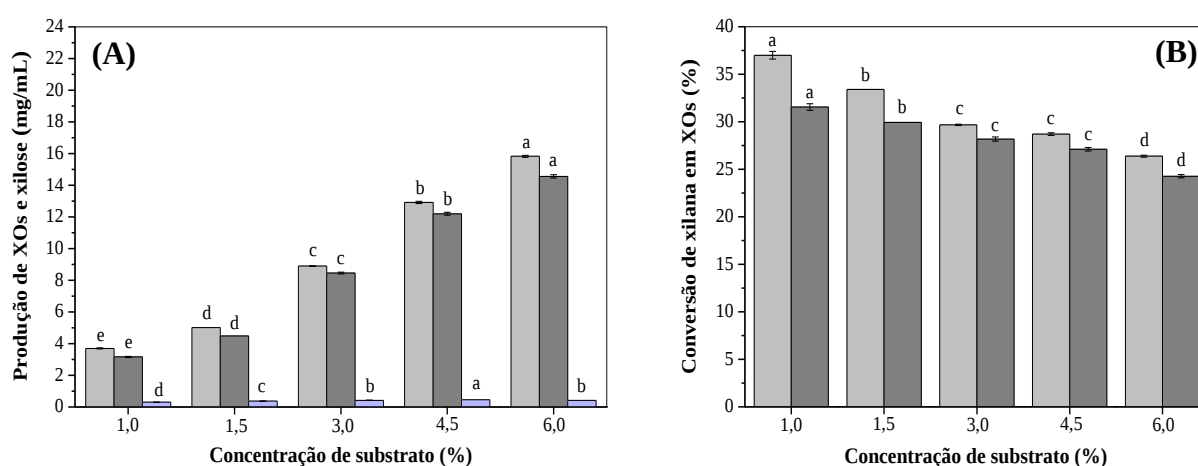
Figura 1 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) com: 1,0% (A); 1,5% (B); 3,0% (C); 4,5% (D) e 6,0% (E) de xilana de faia



Na Figura 1, verifica-se que em baixas concentrações de xilana de faia (Figuras 1A e 1B) a taxa de hidrólise é menor e tende a decair entrando em uma fase quase-estacionária após 12 h de reação, enquanto que em concentração intermediária (Figura 1C) e altas concentrações de substrato (Figuras 1D e 1E) a taxa de hidrólise é maior nas primeiras horas e decresce mais lentamente ao longo do tempo reacional. Aparentemente, o incremento na concentração de XOs foi proporcional com o aumento da concentração de xilana de faia e, ao final das 24 h de reação, os hidrolisados apresentaram uma maior quantidade de xilobiose e xilotriose, e o percentual de xilose não passou de 8% dos carboidratos totais. Ainda analisando a Figura 1, se constata que os melhores resultados para os XOs de baixo GP foram obtidos em 24 h de hidrólise, e, portanto, esse tempo reacional foi selecionado para avaliar os efeitos da concentração de xilana de faia e dos demais parâmetros reacionais sobre a produção de XOs.

Na Figura 2A pode ser visto que o aumento da concentração substrato de 1,0% para 6,0% resultou em um aumento significativo da produção dos XOs de baixo GP (X2 e X3) de $3,16 \pm 0,04$ mg/mL para $14,56 \pm 0,10$ mg/mL, sem ocorrer um acréscimo considerável no teor de xilose, que ficou entre $0,30 \pm 0,01$ mg/mL e $0,46 \pm 0,01$ mg/mL. A produção de XOs totais (X2, X3, X4 e X5) apresentou um comportamento bastante similar à dos XOs de baixo GP, e variou de $3,70 \pm 0,04$ mg/mL a $15,83 \pm 0,06$ mg/mL. Nos ensaios com 4,5% e 6,0% de xilana, o percentual de XOs de baixo GP foi de 94,42% e 91,98%, respectivamente, dos XOs totais.

Figura 2 - (A) Efeito da concentração de xilana de faia sobre a produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). **(B)** Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)



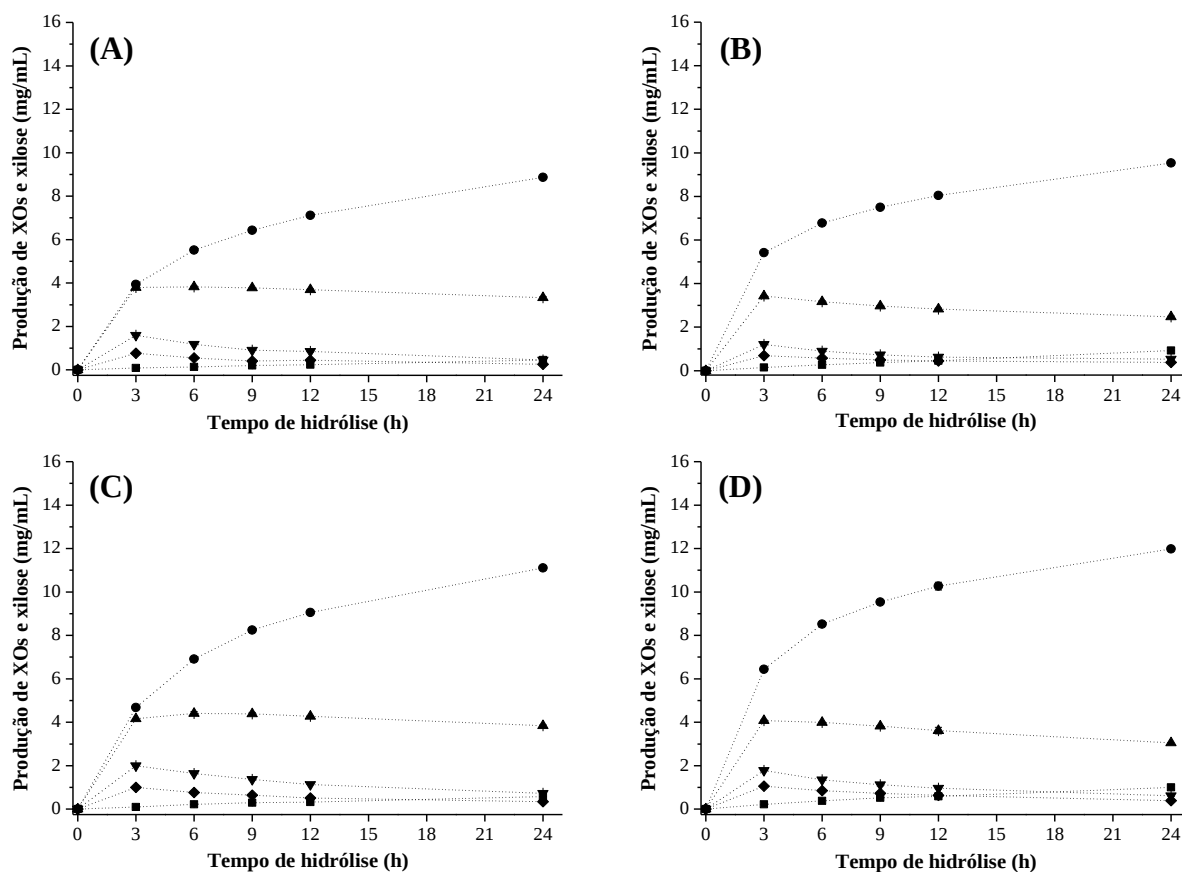
* Média $\pm$ erro padrão. Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

A Figura 2B mostra que houve uma diminuição na conversão da xilana de faia em XOs com o aumento da concentração de substrato de 1,0% para 6,0%. A menor eficiência de

conversão observada nas maiores concentrações de substrato pode ser ocasionada pela menor disponibilidade de água no meio, o que reduz a velocidade de hidrólise (YOON; WOODAMS; HANG, 2006), saturação com o substrato, presença de inibidores e/ou aumento da viscosidade do meio. Porém, considerando os resultados promissores alcançados com 4,5% e 6,0% de xilana de faia e a possibilidade de aumentar a conversão em XOs através da maximização dos outros parâmetros reacionais, o estudo foi continuado com estas concentrações de substrato.

O efeito da carga de endo- β -1,4-xilanase na produção de XOs foi estudado usando relações enzima:substrato de 133 U/g e 266 U/g e duas concentrações de xilana de madeira de faia (4,5% e 6,0%). A relação E:S de 133 U/g foi selecionada a partir dos ensaios iniciais (4,5% de xilana de faia e 6 U/mL de enzima) e dobrada para 266 U/g com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de enzima sobre a produção de XOs. Na Figura 3 é apresentado o perfil cinético das reações, onde pode ser visto que o aumento da relação E:S para ambas as concentrações de xilana resultou em um incremento da produção de xilobiose (X2); decréscimo dos XOs de maior GP, como xilotriose (X3) e xilotetraose (X4); e liberação do dobro de xilose. Comportamentos similares foram relatados por Akpinar et al. (2010) e Samanta et al. (2012).

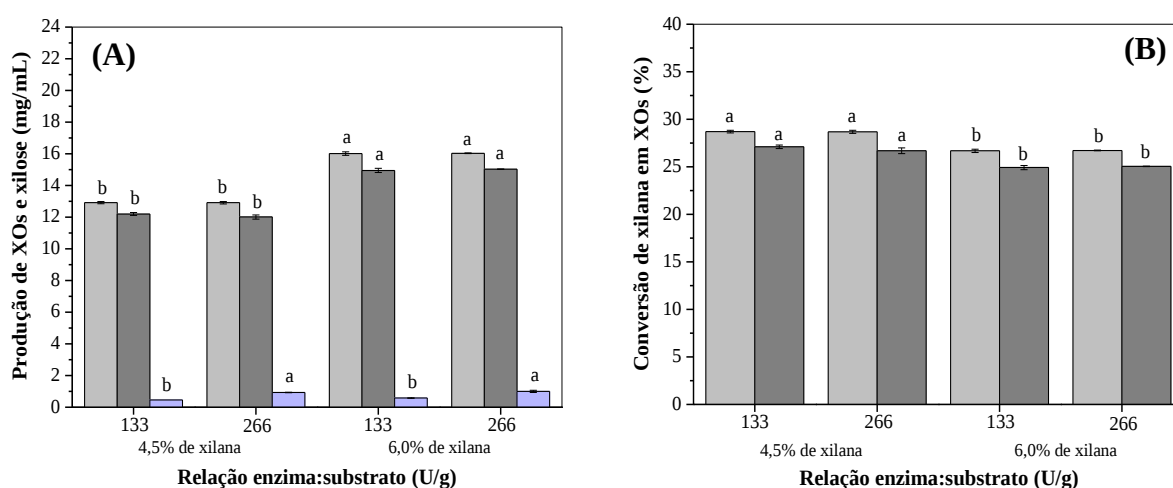
Figura 3 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) com diferentes relações E:S: 133 U/g (A) e 266 U/g (B) com 4,5% de xilana; 133 U/g (C) e 266 U/g (D) com 6,0% de xilana



Assim como descrito anteriormente, ao longo do tempo ocorreu a hidrólise parcial dos XOs de maior GP em XOs de menor GP, sobretudo xilobiose, além do aumento da produção de xilose. A taxa de hidrólise foi maior para a relação E:S de 266 U/g, o que era esperado, uma vez que a velocidade da reação enzimática é proporcional à concentração de enzima no meio (BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Entretanto, a incubação prolongada com uma carga elevada de endo- β -xilanases não aumentou o rendimento de XOs totais e XOs de baixo GP. Segundo Boraston et al. (2002), a capacidade de ligação da enzima à cadeia de xilana atinge um patamar em uma determinada relação enzima:xilana.

Na Figura 4A, observa-se que a concentração de XOs de baixo GP e XOs totais não foi afetada pelo incremento da relação E:S, mas a liberação de xilose foi maior com 266 U/g. Quando se usou 4,5% de substrato e 133 U/g de enzima foram produzidos $12,20 \pm 0,09$ mg/mL de X2+X3 e $0,46 \pm 0,01$ mg/mL de xilose, e com a mesma concentração de xilana e 266 U/g foram obtidos $12,01 \pm 0,13$ mg/mL de X2+X3 e $0,93 \pm 0,01$ mg/mL de xilose. Ao se utilizar 6% de substrato e 133 U/g alcançou-se $14,95 \pm 0,13$ mg/mL de X2+X3 e houve pouca liberação de xilose (0,58 mg/mL), e com 6% de xilana e 266 U/g foram produzidos $15,03 \pm 0,01$ mg/mL de X2+X3 e $1,00 \pm 0,07$ mg/mL de xilose. A Figura 4B mostra que a conversão da xilana em XOs não foi significativamente aumentada pelo uso de uma maior carga de endo-xilanase. Tais resultados evidenciam que a concentração de xilana é a variável que afeta o rendimento de XOs.

Figura 4 - (A) Efeito da relação enzima:substrato na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). **(B)** Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)



* Média $\pm$ erro padrão. Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

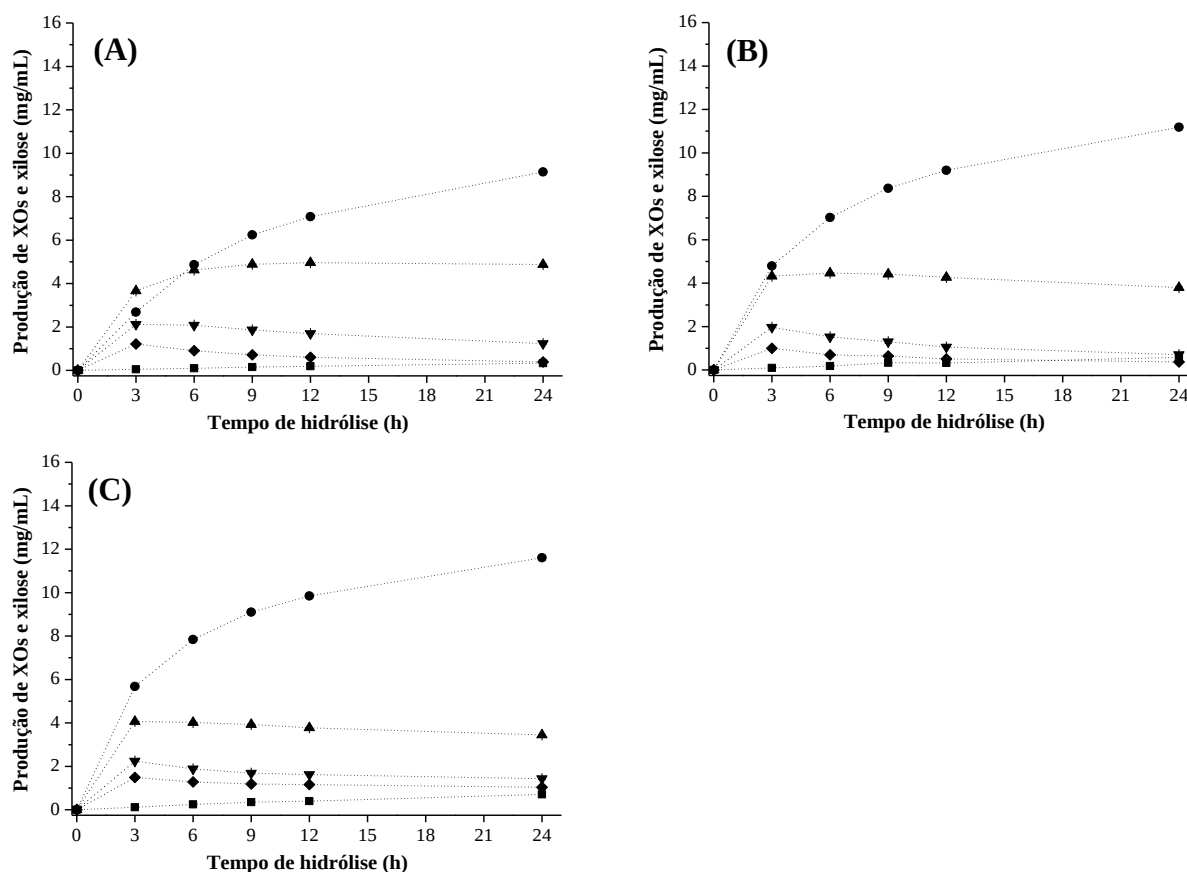
A razão XOs/E, que indica a quantidade de XOs formada por unidade de atividade enzimática, para a reação de hidrólise conduzida com 6,0% de xilana de faia e 133 U/g (8 U/mL)

foi de 1,87 mg/U, e com 6,0% de substrato e 266 U/g (16 U/mL) foi igual a 0,94 mg/U. Portanto, usando 133 U/g foi possível atingir cerca de 99% da quantidade produzida com 266 U/g. Neste estudo, foi verificado que a limitação da produção de XOs não está relacionada somente com a concentração de endo- β -xilanasases, pois o aumento da relação E:S para uma dada concentração de xilana não foi proporcional ao rendimento de XOs de menor e maior GP. Considerando que a enzima contribui significativamente no custo do processo em larga escala, o uso de uma menor concentração deste biocatalisador representa uma redução de custos, e sem perdas importantes no rendimento (LISBOA et al., 2012).

No trabalho de Zhu et al. (2006), a eficiência da enzima (rendimento de XOs/carga de enzima) também diminuiu com o aumento da carga enzimática, e por tal motivo foi escolhida uma relação E:S intermediária levando-se em consideração os custos da enzima na hidrólise.

Visto que o aumento da relação E:S para ambas as concentrações de xilana de faixa testadas não teve um efeito significativo na produção de XOs, para o estudo do pH foi escolhida a condição com 6,0% de substrato e relação E:S de 133 U/g. Neste ensaio, o percentual de XOs de baixo GP foi igual a 93,37% dos XOs totais no hidrolisado. A influência do pH na produção de XOs foi avaliada na faixa de 4,5 a 6,5 e a Figura 5 mostra o perfil cinético das reações.

Figura 5 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentose (◆) com diferentes pHs de reação: 4,5 (A); 5,5 (B) e 6,5 (C)

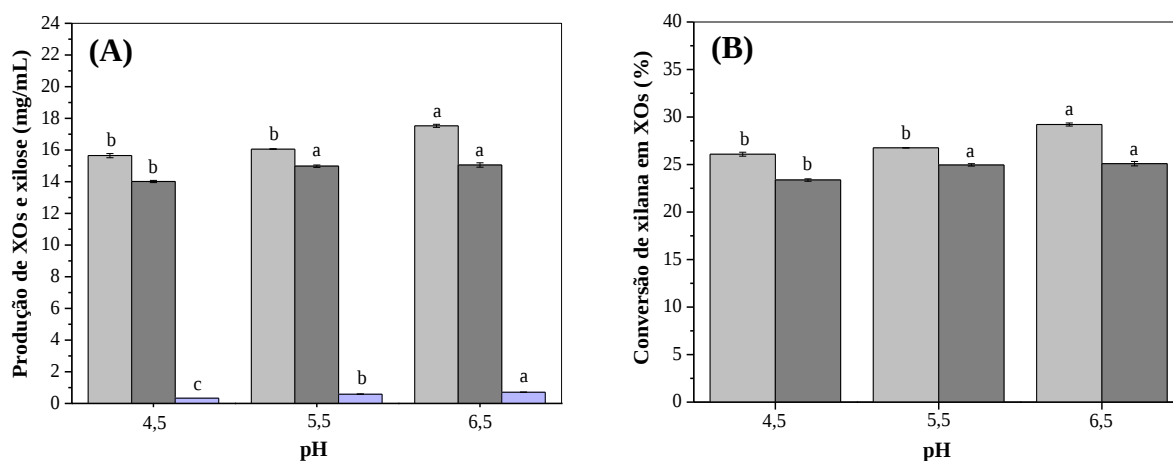


A Figura 5 mostra que a menor taxa de hidrólise ocorreu no pH de 4,5 (Figura 5A), o que provavelmente está relacionado à diminuição da eficiência e/ou estabilidade da β -xilanase em pHs mais ácidos. Nos pHs de 5,5 e 6,5 a taxa de hidrólise foi maior (Figuras 5B e 5C), sendo que no pH de 6,5 houve um aumento da produção dos XOs de cadeias mais longas, tais como xilotetraose e xilopentaose, e xilose. A endo- β -xilanase comercial de *T. lanuginosus* apresenta atividade ótima em pH 5,5 (SILVEIRA; GUIDO; KALIL, 2015), correspondendo aos valores promissores alcançados neste pH. Convém ressaltar que em todas as reações ocorreu a hidrólise parcial dos XOs maiores em XOs de baixo GP e maior produção de xilose no decorrer do tempo.

Uma vez que as enzimas possuem vários grupos ionizáveis, mudanças no pH afetam o sítio catalítico (ou sítio ativo) e a conformação espacial destes biocatalisadores. Em geral, as enzimas são ativas numa faixa limitada de pH e em muitos casos existe um pH ótimo de atuação (WHITAKER, 1994). No estudo de Tull e Withers (1994), a perda da atividade enzimática foi atribuída à ionização do sítio ativo da enzima em condições ácidas.

Na Figura 6A, observa-se que a menor concentração de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) foi alcançada em pH de 4,5 ($14,02 \pm 0,07$ mg/mL), e as maiores produções de XOs de baixo GP foram alcançadas nos pHs 5,5 e 6,5, $14,98 \pm 0,08$ mg/mL e $15,06 \pm 0,14$ mg/mL, respectivamente, sendo que não houve diferença significativa entre elas. Considerando que no pH de 6,5 ocorreu a máxima liberação de xilose ($0,71 \pm 0,01$ mg/mL), o pH 5,5 foi selecionado para dar sequência ao estudo de maximização. Nos pHs de 5,5 e 6,5 o percentual de XOs de baixo GP foi em torno de 93,27% e 85,91%, respectivamente, dos XOs totais nos hidrolisados, corroborando que o pH 5,5 é o mais promissor para a produção de xilobiose e xilotriose.

Figura 6 - (A) Efeito do pH na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). (B) Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)

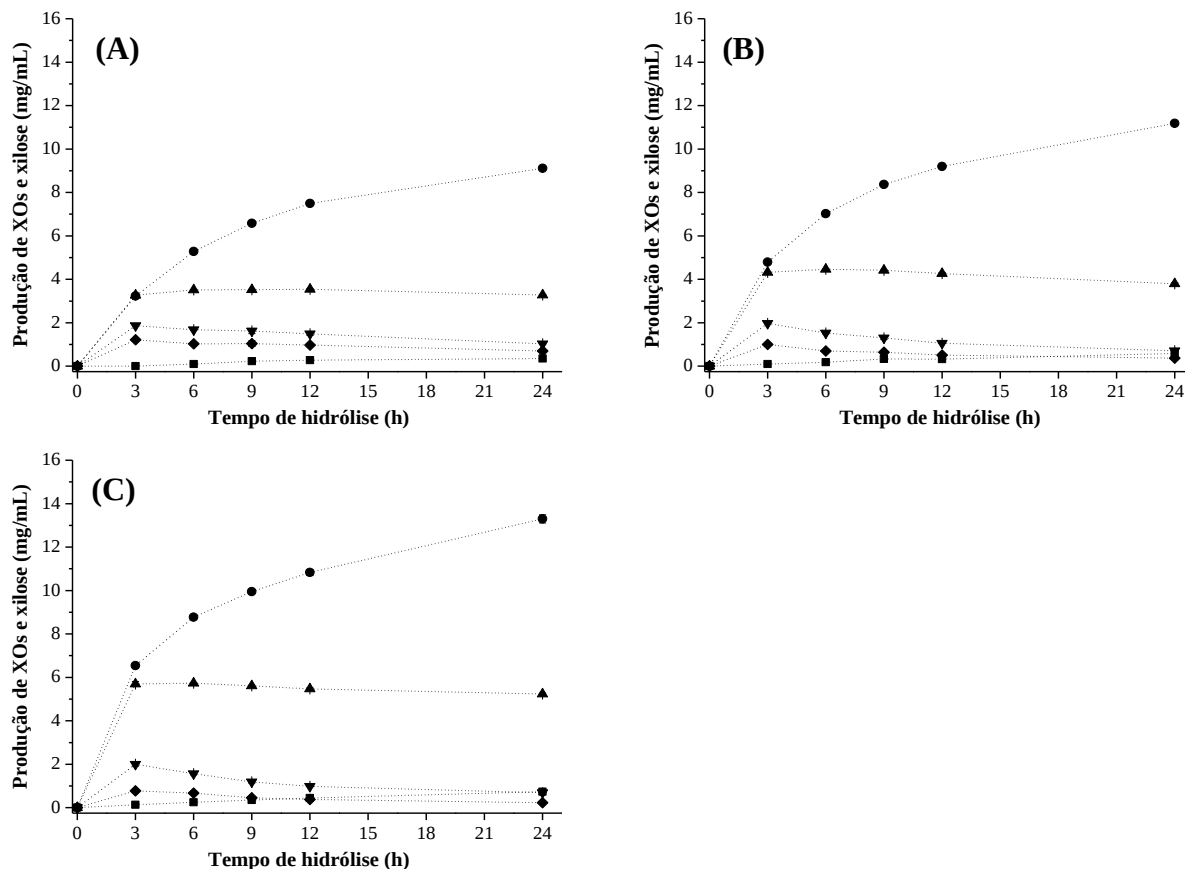


* Média $\pm$ erro padrão. Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatos na literatura, onde o pH ótimo da maioria das endo- β -xilanases fúngicas está entre 5,0 e 6,0 e a máxima produção de XOs foi obtida na mesma faixa de pH (AACHARY; PRAPULLA, 2009; AKPINAR et al., 2010). Os percentuais de conversão da xilana de faia em XOs (Figura 6B) foram maiores para os pHs 5,5 e 6,5, e não houve diferença estatisticamente significativa entre estes pHs quanto à conversão de xilana em XOs de baixo GP, mais especificamente xilobiose e xilotriose.

A temperatura é um dos parâmetros reacionais importantes para atuação da enzima em processos biotecnológicos, e por essa razão foi investigado o efeito da temperatura sobre a produção de XOs na faixa de 40 a 60°C. O perfil cinético das reações de hidrólise em diferentes temperaturas está apresentado na Figura 7. Conforme pode ser visto nas Figuras 7A, 7B e 7C, a taxa de hidrólise enzimática aumentou consideravelmente com a elevação da temperatura, o que resultou em um incremento da produção de XOs, sobretudo os XOs de baixo GP, e maior liberação de xilose nos hidrolisados. No decorrer do tempo, independente da temperatura usada, ocorreu a hidrólise parcial dos XOs de maior GP em XOs de menor GP e o aumento de xilose.

Figura 7 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentose (◆) em diferentes temperaturas de reação: 40°C (A), 50°C (B) e 60°C (C)

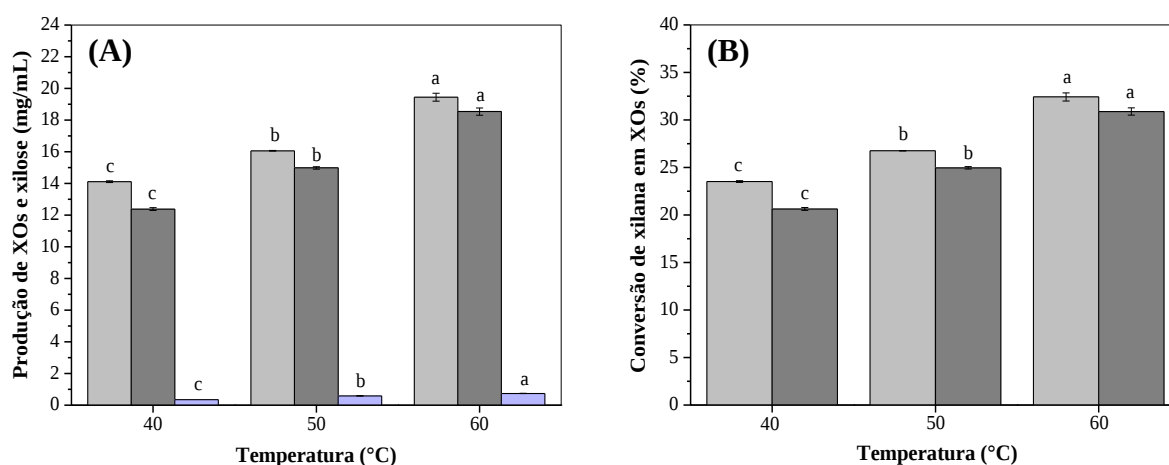


Chapla, Pandit e Shah (2012) relataram um comportamento distinto com respeito à temperatura, sendo que a produção de XOs foi máxima em 45°C e retardada a 50°C. De acordo com os autores, tais resultados se devem à inativação da enzima em temperaturas mais elevadas por longos períodos de tempo, uma vez que em estudos prévios a enzima não foi estável a 50°C.

A endo- β -xilanase de *T. lanuginosus* tem atividade ótima a 75°C e apresenta boa estabilidade a 50°C, se caracterizando como uma xilanase termoestável (SILVEIRA; GUIDO; KALIL, 2015), o que, possivelmente, lhe confere a capacidade de atuar em altas temperaturas sem perda de sua atividade catalítica. Além disso, a solubilidade da xilana de faia foi melhorada com o aumento da temperatura facilitando o contato entre enzima e substrato. Porém, não foram testadas temperaturas acima de 60°C devido à menor estabilidade enzimática, maior evaporação do meio reacional e o custo energético em temperaturas muito elevadas.

Na Figura 8A, verifica-se que a quantidade de XOs de baixo GP (X2+X3) formados a 40°C foi de $12,38 \pm 0,09$ mg/mL, que aumentou para $18,54 \pm 0,23$ mg/mL a 60°C. Na temperatura de 50°C, a produção de XOs de baixo GP e XOs totais atingiu $14,98 \pm 0,08$ mg/mL e $16,06 \pm 0,02$ mg/mL, respectivamente. O aumento da temperatura de 40°C para 60°C resultou em um incremento significativo da produção de XOs e xilose (X1), mas a quantidade de xilose liberada não passou de 0,75 mg/mL, o que representa menos de 4% dos carboidratos totais nos hidrolisados. Portanto, considerando a composição em XOs do hidrolisado e o aumento de 24% na conversão da xilana de faia em XOs de baixo GP (Figura 8B) foi selecionada a temperatura de 60°C. Nesta temperatura o percentual de X2+X3 foi igual a 95,30% dos XOs totais.

Figura 8 - (A) Efeito da temperatura na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). **(B)** Conversão da xilana de faia em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)



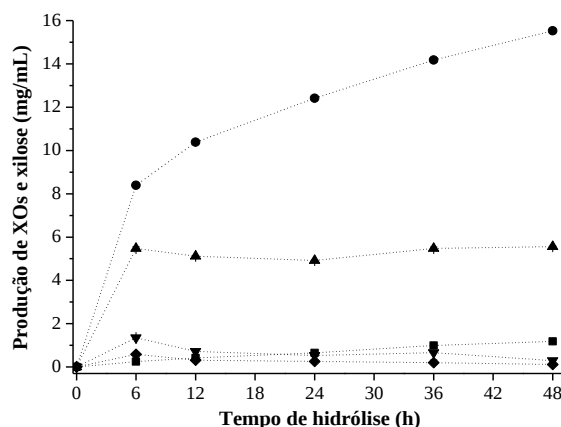
* Média ± erro padrão. Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

A Figura 9 apresenta o perfil cinético da reação de hidrólise conduzida por 48 h, na condição anteriormente definida (6,0% de xilana, 133 U/g de endo- β -xilanasas, pH 5,5 e 60°C) para a conversão da xilana em XOs, onde se verifica que os maiores tempos reacionais resultam em hidrólise parcial dos XOs de maior GP em XOs de baixo GP, principalmente xilobiose que têm a sua produção aumentada, e xilose. Ainda na Figura 9, se observa que a taxa de hidrólise enzimática tende a diminuir com o passar do tempo o que afeta a produtividade de XOs.

Tal como outras enzimas usadas em processos biotecnológicos, as endo- β -xilanasas podem sofrer inibição pelo produto final, como a xilose; ser desnaturadas devido às condições operacionais; apresentar dificuldades de acesso ao substrato que se modifica estruturalmente durante a reação, e/ou hidrolisar os produtos preferencialmente em relação ao substrato. Estes fatores influenciam no rendimento e GP dos XOs; portanto, é importante estabelecer um tempo ideal de reação em que a produção de XOs de baixo GP seja maximizada (BRIENZO, 2010).

De acordo com Akpinar et al. (2010), quando o período de hidrólise foi maior que 8 h a quantidade, principalmente, de xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5) começou a diminuir. Por isso, os autores enfatizam que um tempo ótimo de hidrólise deve ser determinado com base no GP requerido para o(s) produto(s) de interesse e indicam um tempo reacional entre 8 e 24 h. Após este período, a hidrólise da xilana foi retardada, o que evidencia que a atividade da endo- β -xilanase comercial de *Aspergillus niger* diminuiu devido à inibição pelo produto final e/ou à redução do número de sítios de hidrólise facilmente acessíveis na cadeia de xilana extraída a partir de talos de tabaco.

Figura 9 - Cinética da produção de xilose (■), xilobiose (●), xilotriose (▲), xilotetraose (▼) e xilopentaose (◆) em 48 h de hidrólise enzimática

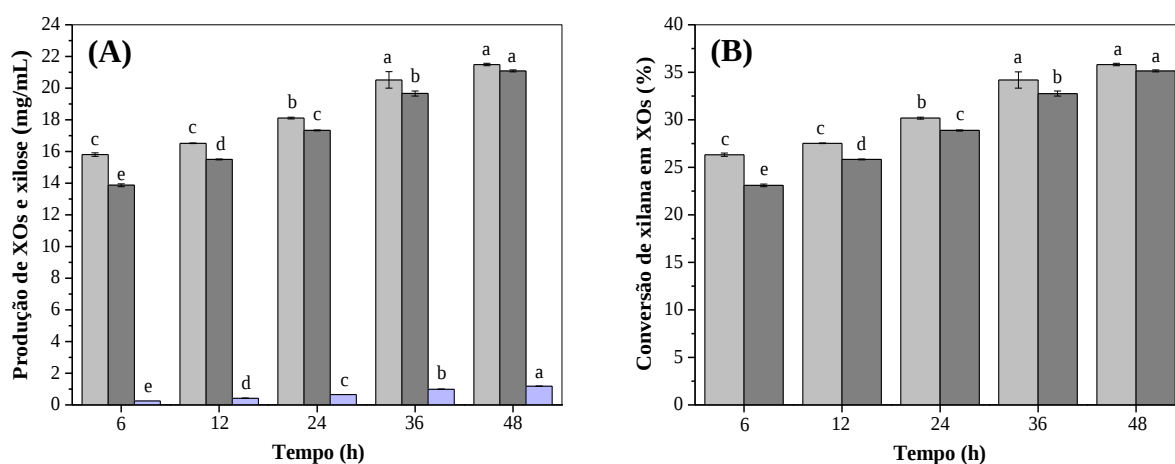


* Condições experimentais: 6,0% de xilana de faia, 133 U/g de endo- β -1,4-xilanasas, pH 5,5 e 60°C.

A máxima produção dos XOs de baixo GP ($21,09 \pm 0,06$ mg/mL) foi observada em 48 h de hidrólise (Figura 10A). Porém, após 36 h o incremento da concentração de XOs totais

e XOs de baixo GP não foi proporcional ao aumento do tempo reacional, provavelmente devido à perda de eficiência da enzima ocasionada por fatores anteriormente mencionados. Além disso, em comparação a 24 h, a produção de xilose foi 81% maior no tempo de 48 h, enquanto a de XOs de baixo GP (X2+X3) aumentou 22%. A produtividade de XOs de baixo GP em 24 h foi de 0,73 mg/mL.h, e em 48 h igual a 0,44 mg/mL.h. Portanto, não se considera vantajoso em termos de rendimento e/ou produtividade de XOs conduzir as reações por tempos superiores a 24 h. O percentual de conversão da xilana de faia em XOs de baixo GP (Figura 10B) variou de 23,11% a 35,15%, sendo que em 24 h de reação 28,88% da xilana foi convertida para X2+X3.

Figura 10 - (A) Efeito do tempo reacional na produção de XOs totais (■), xilobiose + xilotriose (■) e xilose (■). **(B)** Conversão da xilana em XOs totais (■) e xilobiose + xilotriose (■)



* Média ± erro padrão. Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

A conversão total da xilana de faia em XOs de baixo GP não foi atingida nos ensaios realizados no presente estudo, sendo que em todas as hidrólises houve a formação de compostos não identificados mas que provavelmente são oligossacarídeos de cadeias mais longas, uma vez que a xilana de faia apresenta elevado grau de pureza. Na Figura 11 é mostrado o cromatograma resultante da análise de um hidrolisado por cromatografia líquida de alta eficiência, onde podem ser visualizados os picos referentes aos XOs e a xilose.

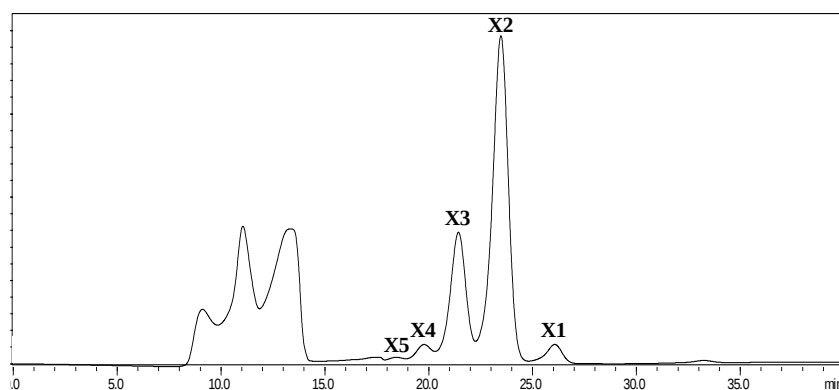
Gowdhaman e Ponnusami (2015) utilizaram xilana de sabugo de milho extraída por método alcalino e endo- β -1,4-xilanases de *Bacillus aerophilus* KGJ2 para a produção de XOs, e avaliaram os efeitos da concentração de substrato (1,0-5,0%) e enzima (5-25 U) e do tempo de reação (6-24 h) a fim de incrementar o rendimento de XOs. Os autores verificaram que todos os parâmetros estudados tiveram influência na obtenção de XOs, e a máxima produção, igual a

3,6 mg/mL, foi alcançada nas seguintes condições: 5,0% de xilana e 20 U de xilanase por 12 h. Xilobiose, xilotriose e xilotetraose foram os XOs em maior quantidade nos hidrolisados.

Yang et al. (2011) investigaram os efeitos dos parâmetros reacionais de hidrólise, tais como concentração de enzima (15-45 U), temperatura (40-50°C), pH (3,6-6,0) e tempo de reação (2-24 h), sobre a produção de XOs com xilana de *Populus tomentosa* (2,0%) e endo- β -xilanase de *Pichia stipitis*. Os autores constataram que a máxima conversão de xilana em XOs ocorreu quando a reação foi conduzida com 25 U/g de enzima a 50°C e pH 5,4 por 14 h. Nesta condição, 37% da xilana foi convertida para XOs, o que equivale a 3,9 mg/mL, representados principalmente por xilobiose, xilotriose e xilotetraose.

No trabalho de Chapla, Pandit e Shah (2012) os XOs foram produzidos por hidrólise da xilana extraída de sabugo de milho usando uma endo- β -1,4-xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898. O estudo dos parâmetros reacionais de hidrólise, entre eles, tempo de reação (2-48 h), concentração de enzima (20-100 U), concentração de substrato (0,1-3,0%) e temperatura (40-50°C), possibilitou maximizar o rendimento de XOs, que atingiu 6,7 mg/mL após as 8 h de reação com 20 U de endo- β -xilanase e 2,0% de xilana a 45°C. Xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose foram os XOs em maior concentração nos hidrolisados.

Figura 11 - Cromatograma do meio reacional da produção de xilo-oligossacarídeos



* Condições experimentais: 6,0% de xilana de faia, 133 U/g de endo- β -1,4-xilanases, pH 5,5 e 60°C por 24 h.

Neste estudo, a produção de XOs de baixo GP (X2+X3) aumentou 20% em relação ao valor de 14,56 mg/mL alcançado na condição inicialmente avaliada (6,0% de xilana de faia, 100 U/g de endo- β -1,4-xilanases, pH 5,3 e 50°C por 24 h), após a maximização dos parâmetros reacionais. Além disso, a conversão da xilana de faia em XOs totais e XOs de baixo GP também foi incrementada em 15 e 20%, respectivamente. Se comparada à primeira hidrólise com xilana de faia e endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus*, onde foram produzidos 9,55 mg/mL de XOs, a maximização das condições de hidrólise resultou em um aumento de 83% da produção de

XOs. Convém ressaltar que o processo aqui empregado para a obtenção de XOs apresenta a distinta vantagem de gerar hidrolisados contendo predominantemente xilobiose e xilotriose, e baixo teor de xilose, sendo que tais compostos são reconhecidos por seu potencial prebiótico e outros potenciais efeitos benéficos à saúde humana.

4 CONCLUSÃO

O estudo dos efeitos dos parâmetros reacionais de hidrólise possibilitou maximizar a produção de XOs de baixo GP (X2+X3) potencialmente prebióticos, com mínima geração de xilose, por hidrólise da xilana de faia com endo- β -xilanases comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]). A concentração de substrato e a temperatura foram as variáveis que tiveram uma maior influência na produção de XOs de baixo GP (X2+X3) e a melhor condição operacional para a sua obtenção foi determinada como sendo: 6,0% de xilana de faia, 133 U/g de endo- β -xilanases, pH 5,5 e 60°C por 24 h de reação, onde foram alcançados 17,48 mg/mL de XOs de baixo GP e a conversão da xilana de faia em X2+X3 foi de 28,88%. Através dos resultados obtidos neste trabalho se pode verificar a potencialidade de endo- β -1,4-xilanases de fungos filamentosos para produção de XOs a partir de xilana de faia, corroborando a importância da hidrólise enzimática como processo biotecnológico na indústria de alimentos.

5 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, p. 991-995, 2009.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 119-125, 2010.
- AKPINAR, O.; OZLEM, A. K.; KAVAS, A.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544-5551, 2007.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BORASTON, A. B.; MCLEAN, B. W.; CHEN, G.; LI, A.; WARREN, R. A.; KILBURN, D. G. Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 187-194, 2002.

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

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

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

GOLDMAN, N. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. **Basic Biotechnology**, v. 5, p. 31-36, 2009.

GOWDHAMAN, D; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595-600, 2015.

HARRIS, A.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Science**, v. 1, n. 7, p. 1-11, 2010.

KOBAYASHI, T.; OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; KOGA, K. Effect of xylooligosaccharides on feces of men. **Journal of Japanese Society of Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1651-1653, 1991.

LISBOA, C. R.; COSTA, F. A. A.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Synthesis of galactooligosaccharides from lactose using commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2012.

LOO, J. V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T. V.; HEUVEL, E. V. D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII-AIRII-CT94 -1095). **British Journal of Nutrition**, v.81, p. 121-132, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOURE, A.; GULLON, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913-1923, 2006.

NA, M. H.; KIM, W. K. Effects of xylooligosaccharide intake on fecal bifidobacteria, lactic acid and lipid metabolism in Korean young women. **Korean Journal of Nutrition**, v. 40, p. 154-161, 2007.

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MASTUMOTO, N. Effects of xylooligosaccharides on growth of *Bifidobacteria*. **Bifidobacteria Microflora**, v. 9, n. 2, p. 77-86, 1990.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*). **Bioresource Technology**, v. 112, p. 199-205, 2012.

SILVEIRA, J. T.; GUIDO, E. S.; KALIL, S. J. Caracterização de endo- β -1,4-xilanases para produção de xilo-oligossacarídeos. In: Mostra da Produção Universitária, 14., 2015, Rio Grande. **Anais...**Rio Grande: FURG, 2015.

TOSHIO, I.; NORIYOSHI, I.; TOSHIKI, K.; TOSHIYUKI, N.; KUNIMASA, K. **Production of xylobiose**. Japanese Patent, JP n. 2119790, 1990.

TULL, D.; WITHERS S. G. Mechanisms of cellulases and xylanases: A detailed kinetic study of the exo- β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. **Biochemistry**, v. 33, n. 20, p. 6363-6370, 1994.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 387-393, 2000.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 451S-455S, 2001.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

YANG, H. Y.; WANG, K.; SONG, X. L.; XU, F. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7171-7176, 2011.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 388-392, 2006.

ZHU, Y. M.; KIM, T. H.; LEE, Y. Y.; CHEN, R. G.; ELANDER, R. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p. 586-598, 2006.

ARTIGO 3

**EXTRAÇÃO DE XILANAS DE SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
REGIONAIS E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Extração de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais regionais e produção enzimática de xilo-oligossacarídeos

RESUMO

No presente estudo, foram utilizados dois métodos alcalinos (M1 e M2) para extrair as xilanas a partir de casca e farelo de arroz, casca de soja e engaço de uva, que são subprodutos e resíduos lignocelulósicos agroindustriais de baixo custo e largamente disponíveis na região Sul do Rio Grande do Sul. As xilanas extraídas foram submetidas à hidrólise com a endo- β -1,4-xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Spring Mono[®]) visando à obtenção de XOs de baixo GP, sobretudo xilobiose (X2) e xilotriose (X3), potencialmente prebióticos. Ambos os métodos de extração alcalina foram eficientes na recuperação de xilanas das biomassas lignocelulósicas, sendo que os maiores rendimentos de xilana foram alcançados com o M1 e M2 para a casca de arroz (43 e 28%) e M2 para o engaço de uva (20%). A hidrólise da xilana de casca de arroz com endo- β -xilanases resultou na maior quantidade de XOs de baixo GP (5,67 mg/mL), seguido pelas xilanas do engaço de uva (2,91 mg/mL) e da casca de soja (0,94 mg/mL). Os resultados obtidos corroboram a possibilidade de produzir XOs com potencial prebiótico por hidrólise enzimática de xilanas extraídas a partir de materiais lignocelulósicos da agroindústria regional, e contribuem para o desenvolvimento dos estudos voltados para a produção tecnológica e economicamente viável de XOs.

Palavras-chave: Extração alcalina. Casca de arroz. Farelo de arroz. Casca de soja. Engaço de uva. Prebióticos.

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios atuais é aumentar a produção de alimentos saudáveis que sejam economicamente acessíveis e disponibilizados para grande parte da população mundial. No entanto, o aumento na produção de alimentos deve ser sustentável e evitar o desmatamento das florestas e demais formas de vegetação nativa. Com tal objetivo, os estudos sobre o uso de subprodutos e resíduos agroindustriais na produção de alimentos vêm sendo intensificados, uma vez que são comumente subutilizados e bilhões de toneladas são descartadas inadequadamente, gerando prejuízos às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente. Uma grande quantidade de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais pode ser utilizada também na produção de produtos com alto valor agregado, tais como: enzimas (TERRASAN et al., 2010), biocombustíveis (LIU et al., 2015), polímeros (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013), vitaminas (KALINGAN; KRISHNAN, 1997) e ácidos orgânicos (ADSUL; VARNA; GOKHALE, 2007).

Os subprodutos e resíduos agroindustriais estão entre as maiores fontes de biomassa vegetal do mundo, sendo que somente no Brasil são gerados anualmente cerca de 290 milhões de toneladas destes materiais (MMA, 2011). A biomassa vegetal é constituída basicamente por celulose, hemiceluloses e lignina (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; VÁZQUEZ et al., 2000). Na parede celular vegetal, celulose, hemiceluloses e lignina estão fortemente associadas e são referidas como materiais lignocelulósicos (MLCs) (CARVALHO et al., 2013).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, e é formada por heteropolissacarídeos amorfos que constituem de 14 a 50% da massa seca dos MLCs, sendo que a hemicelulose encontrada em maior quantidade nas madeiras e resíduos agroindustriais é a xilana, constituída principalmente por unidades de xilose (RUIZ et al., 2013). Recentemente, a produção de xilo-oligossacarídeos (XOs) a partir de xilana oriunda de subprodutos e resíduos agroindustriais é um mercado que vem ganhando destaque, devido às potencialidades dos XOs e o baixo custo e disponibilidade da biomassa vegetal. Os XOs apresentam efeitos prebióticos comprovados e outros benefícios potenciais à saúde e são um dos poucos produtos nutracêuticos que podem ser obtidos a partir de biomassa lignocelulósica (SAMANTA et al., 2015).

O Rio Grande do Sul, o principal Estado produtor de arroz, é responsável por cerca de 68% da produção nacional (CONAB, 2015), além de se destacar na produção de uva, soja, aveia e milho (IBGE, 2016). O processamento industrial destas culturas gera grande quantidade de biomassa lignocelulósica, portanto, o seu uso para obtenção de bioprodutos é de importância econômica e ecológica, e tem sido bastante explorado na área de Bioprocessos em Alimentos. A casca de arroz é o resíduo mais expressivo gerado no beneficiamento do arroz, e o seu volume

representa de 20% a 30% da massa total do arroz em casca (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2010). O engaço é um dos principais resíduos oriundos do processo de vinificação e representa de 3% a 7% da massa do cacho de uva (CATALUÑA, 1984). Segundo Restle et al. (2004), a casca de soja gerada na extração do óleo representa de 7% a 8% da massa do grão, e estima-se que no Brasil sejam produzidas 3,7 milhões de toneladas.

Embora os subprodutos e/ou resíduos da agroindústria sejam quase que totalmente destinados à alimentação animal, queima nas caldeiras industriais, compostagem e fertilizantes, a hemicelulose neles contida, sobretudo a xilana, pode ser usada para obtenção de produtos de maior valor agregado, como os XOs. No entanto, para uma produção eficiente destes compostos a xilana deve ser exposta à atuação das endo- β -xilanases, e nos MLCs a xilana se encontra na forma de um complexo xilana-lignina, bastante resistente à hidrólise enzimática (AACHARY; PRAPULLA, 2009; ZHU et al., 2006). Por esse motivo, a produção de XOs em escala industrial é realizada em duas etapas: extração alcalina da xilana de biomassa lignocelulósica seguido por hidrólise enzimática ou ácida do polímero (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009).

Convém ressaltar que não há relatos sobre o uso da xilana do engaço de uva para a obtenção de XOs prebióticos, e são escassos os estudos com os demais subprodutos e resíduos agroindustriais e as endo- β -1,4-xilanases de *T. lanuginosus*. Levando-se em consideração que a utilização de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais do Estado do Rio Grande do Sul vem ao encontro da necessidade de agregar valor à cadeia produtiva e tornar rentável a produção de XOs, o objetivo do trabalho foi extrair as xilanas de subprodutos e resíduos lignocelulósicos da agroindústria regional e aplicar na produção de XOs com potencial prebiótico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

No presente estudo, foi utilizada a endo- β -1,4-xilanase comercial de *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) com grau alimentar, cedida pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Os subprodutos e resíduos agroindustriais (casca e farelo de arroz, casca de soja e engaço de uva) foram gentilmente fornecidos por indústrias da região Sul do Rio Grande do Sul. Os padrões de XOs (xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentaose) foram obtidos da Megazyme (Bray, Irlanda) e o padrão de xilose foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A coluna para separação de XOs (Aminex HPX-42A, 300 mm x 7,8 mm) foi obtida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA). Todos os demais reagentes são de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Extração de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais

Inicialmente, a casca e o farelo de arroz, a casca de soja e o engaço de uva foram secos em estufa e as sujidades removidas manualmente. As xilanas foram extraídas usando dois métodos químicos diferentes, a fim de verificar qual das estratégias de extração alcalina é mais eficiente na recuperação de xilanas com potencial para a produção de XOs. Na Figura 1, são apresentadas as etapas realizadas em cada método de extração. Os métodos 1 e 2 são similares ao de Sun et al. (2002) e Hauli et al. (2013), respectivamente, com pequenas modificações. A eficiência dos métodos de extração foi determinada em termos de rendimento (em base seca), calculado de acordo com a Equação 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Rendimento de xilana (\%)} = \frac{\text{massa seca da xilana extraída (g)}}{\text{massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

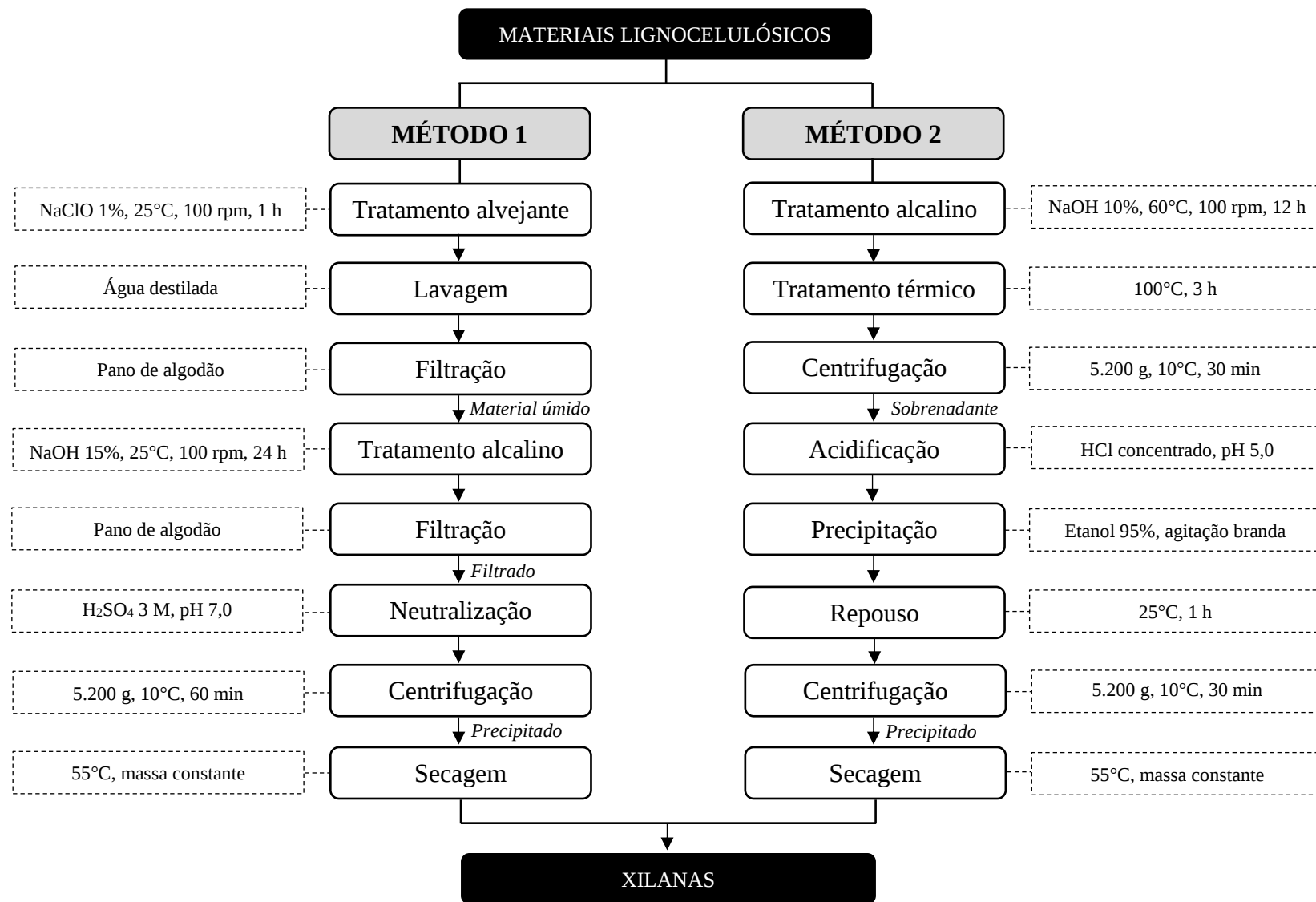
2.2.2 Hidrólise das xilanas e produção de xilo-oligossacarídeos

As reações de hidrólise das xilanas extraídas da casca e do farelo de arroz, da casca de soja e do engaço de uva (Figura 1), foram conduzidas em reatores de mistura encamisados mantidos a 180 rpm (agitação mecânica) e 60°C por 24 h. O sistema reacional foi composto por xilana (6,0%, m/v), dissolvida em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,5, e enzima (133 U/g), totalizando um volume de 30 mL. As condições operacionais das hidrólises enzimáticas foram previamente maximizadas por Guido, Silveira e Kalil (2016), usando xilana de madeira de faia como substrato. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos (0, 12 e 24 h), e o meio foi aquecido a 100°C por 5 min para a completa inativação das enzimas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min (Mega 17R, Hanil), filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (poros de 0,22 µm) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar a concentração e o GP dos XOs e o teor de monossacarídeos nos hidrolisados. As hidrólises foram realizadas em duplicata.

2.2.3 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ou teste t-Student, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Figura 1 - Fluxogramas das etapas para a extração alcalina de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais por diferentes métodos químicos



2.2.4 Métodos analíticos

2.2.4.1 Determinação da atividade de endo- β -1,4-xilanase

A atividade de endo- β -1,4-xilanase foi avaliada segundo o método de Bailey, Biely e Poutanen (1992), empregando xilana de madeira de faia 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,3. A mistura reacional, composta por 0,9 mL da solução de substrato e 0,1 mL do extrato enzimático (convenientemente diluído), foi incubada a 50°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os açúcares redutores liberados foram quantificados conforme Miller (1959). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de xilose por minuto, sob as condições do ensaio.

2.2.4.2 Análise dos hidrolisados por CLAE

Os produtos da hidrólise da xilana foram analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence[®], Shimadzu), equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno para colunas (CTO-20A). Alíquotas de 20 μ L foram automaticamente injetadas (SIL-20AHT) e eluídas usando água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore) como fase móvel da coluna para separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad). A coluna foi utilizada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min e mantida a 50°C, sendo o tempo de corrida de 40 min. A identificação e a quantificação de XOs e xilose foram realizadas usando os tempos de retenção e as curvas de calibração, respectivamente. As curvas de calibração foram previamente construídas com o *pool* de padrões (XOs e xilose), em concentrações de 1 a 10 mg/mL, nas condições descritas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DE XILANAS DE SUBPRODUTOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Há vários relatos na literatura que mencionam a extração de xilanas de subprodutos e resíduos agroindustriais, tais como sabugo de milho (GOWDHAMAN; PONUSAMI, 2015), bagaço de cana (JAYAPAL et al., 2013), palha de trigo (FARYAR et al., 2015), talo de algodão (AKPINAR et al., 2007) e talos de tabaco (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009). Por isto, no presente estudo optou-se por extrair as xilanas de materiais lignocelulósicos gerados no

beneficiamento do arroz (casca e farelo), na fabricação do óleo e outros produtos derivados da soja (casca) e no processo de vinificação (engaço), uma vez que estudos relacionados à extração de xilanas destes materiais típicos da região Sul do Rio Grande do Sul são escassos e não foram encontrados relatos sobre a utilização da xilana do engaço de uva para produção de XO's.

A xilana é a hemicelulose mais abundante na maioria dos materiais lignocelulósicos agroindustriais e sua composição é bastante variável. Por exemplo, a xilana da casca de arroz (glucuronoarabinoxilana) é constituída por cerca de 67% de xilose, 14% de arabinose, 9% de glicose e 10% de ácidos urônicos (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013), enquanto que a xilana do farelo de arroz (arabinoxilana) contém, em média, 46% de xilose, 45% de arabinose, 6% de galactose, 2% de glicose e 1% de ácidos urônicos (SHIBUYA; IWASAKI, 1985). A xilana da casca de soja (glucuronoxilana) é composta sobretudo por xilose e 3% a 4% de ácidos urônicos (ASPINALL; HUNT; MORRISON, 1966). A xilana do engaço de uva (glucuronoxilana) tem cerca de 89% de xilose, 6% de glicose, 5% de ácidos urônicos e traços de arabinose, galactose e ramnose (PROZIL et al., 2013).

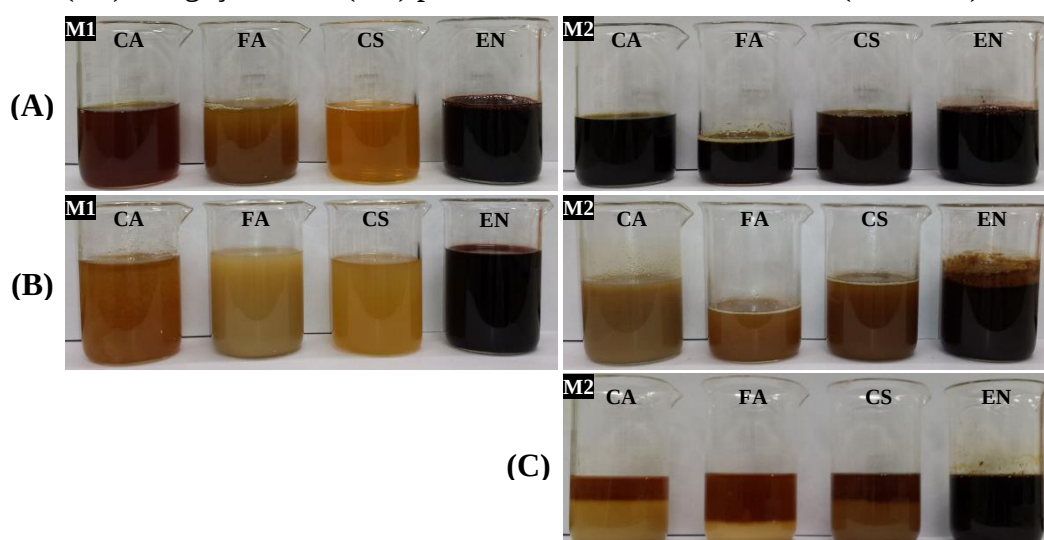
Uma vez que as xilanas são polissacarídeos heterogêneos e a sua composição varia de acordo com a biomassa lignocelulósica na qual estão presentes, considera-se de fundamental importância o conhecimento da composição química da xilana para uma melhor compreensão do seu efeito na hidrólise enzimática e da sua interação com o preparado xilanolítico (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

Na biomassa lignocelulósica, a xilana se encontra na forma de um complexo xilana-lignina resistente ao ataque enzimático, tornando necessário extraí-la previamente à hidrólise. Dentre os métodos usados para extração de xilanas a partir de MLCs o tratamento alcalino tem merecido destaque, devido à elevada recuperação de xilanas e condições reacionais moderadas (PENG et al., 2012; SAMANTA et al., 2015). Com base nestas informações, no presente estudo foram testados dois métodos de extração alcalina, visando obter as xilanas dos subprodutos e resíduos agroindustriais típicos da região Sul do Rio Grande do Sul.

Conforme mostra a Figura 2A, após o tratamento alcalino, acoplado com tratamento térmico no M2, dos materiais lignocelulósicos agroindustriais foram gerados extratos alcalinos de diferentes colorações, o que possivelmente esteja relacionado à composição do material, às reações entre carboidratos e proteínas da matriz e às etapas do método de extração. Fengel e Wegener (1989) relataram que a cor escura do extrato alcalino é oriunda de grupos funcionais cromóforos, como quinonas e fenólicos, resultantes da degradação da lignina e que são solúveis em meios alcalinos. Na Figura 2B, observa-se uma mudança da cor dos extratos alcalinos nas etapas de neutralização (M1) ou acidificação (M2), devido à queda acentuada de pH dos meios

e a precipitação parcial das xilanas. Na Figura 2C, podem ser vistos os precipitados formados após a adição de etanol (95%) nos extratos acidificados (M2). O etanol é utilizado como agente precipitante pois remove a água de solvatação da molécula, promovendo a sua desidratação e, consequente, precipitação (DALONSO et al., 2009). A Figura 2 mostra que ambos os métodos testados possibilitaram a extração de xilanas de casca e farelo de arroz, casca de soja e engaço de uva. Portanto, tendo em vista à obtenção de xilanas em escala industrial, estes métodos são considerados promissores.

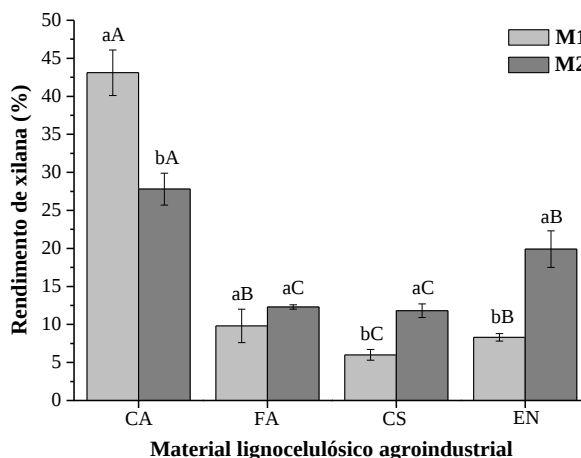
Figura 2 - Extração de xilanas de casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), casca de soja (CS) e engaço de uva (EN) por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2)



(A) Extratos alcalinos de materiais lignocelulósicos; **(B)** Alteração da cor durante a mudança de pH na neutralização (M1) ou acidificação (M2); **(C)** Precipitados formados após a precipitação com etanol 95% (M2).

A Figura 3 mostra que os métodos de extração renderam diferentes quantidades de xilana para os materiais lignocelulósicos, e os maiores rendimentos de xilana foram alcançados com o M2 (engaço de uva: 20%, farelo de arroz e casca de soja: 12%), exceto para a xilana da casca de arroz. Tal fato pode estar relacionado à aplicação de tratamento térmico e precipitação etanólica no M2, uma vez que estas etapas de processo provavelmente contribuíram para uma melhor solubilização e separação das xilanas. O maior rendimento de xilana da casca de arroz com o M1 (43%) pode ser devido à presença de lignina e/ou outros compostos residuais. Apesar do engaço apresentar um bom teor de xilana, o baixo grau de substituição da mesma com grupos acetil e ácidos metil-glucurônicos resultam em uma forte ligação com a celulose, o que dificulta a sua extração em meios alcalino e ácido. Um grau elevado de substituição favorece a remoção da xilana em razão da maior solubilidade de xilanas ramificadas (PING et al., 2011).

Figura 3 - Rendimento de xilanas de casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), casca de soja (CS) e engaço de uva (EN) extraídas por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2)



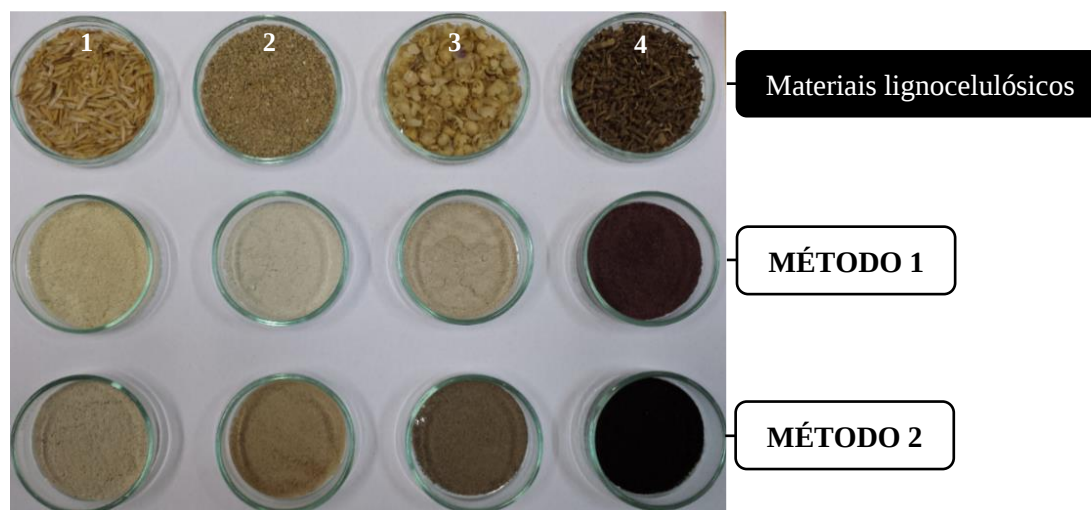
* Média $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas iguais para o material lignocelulósico e letras maiúsculas iguais para o método de extração não diferem ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) pelos testes t-Student ou Tukey.

A principal característica do tratamento alcalino consiste na remoção da lignina sem praticamente afetar os demais componentes. O tratamento alcalino da biomassa lignocelulósica com NaOH tende a causar o seu inchamento, levando a um aumento da área superficial interna, à diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, à separação de ligações estruturais entre lignina e carboidratos, e ao rompimento e solubilização da estrutura da lignina, o que facilita a recuperação da xilana (GOKHALE; PATIL; BASTAWDE, 1998; OKEKE; OBI, 1995). Balat, Balat e Oz (2008) relatam que, devido à dilatação da biomassa lignocelulósica, a área superficial é aumentada permitindo a penetração das moléculas de água nas camadas internas, o que causa a quebra de ligações entre a hemicelulose e a lignina.

Chapla, Pandit e Shah (2012) avaliaram diferentes métodos físico-químicos para a extração de xilana contida no sabugo de milho e o rendimento de xilanas (% m/m) obedeceu a seguinte sequência: extração alcalina (18%) > auto-hidrólise (7%) > tratamento com hipoclorito de sódio (4%) > tratamento ácido (3%), corroborando que a extração alcalina é o método mais promissor na obtenção de xilanas a partir de biomassa lignocelulósica.

Na Figura 4 está ilustrado o aspecto das xilanas extraídas após a secagem e redução de tamanho, onde é possível observar que, aparentemente, o método de extração teve influência na coloração do produto, uma vez que as xilanas do M1 apresentam uma tonalidade mais clara que as xilanas do M2. Tal resultado podem estar relacionados à maior remoção dos compostos coloridos no M1, devido ao pré-tratamento com hipoclorito de sódio. Verifica-se ainda que não houve completa remoção de cor das xilanas, o que pode limitar a sua aplicabilidade industrial, (BRIENZO, 2010).

Figura 4 - Aspecto visual das xilanas extraídas de casca de arroz (1), farelo de arroz (2), casca de soja (3) e engaço de uva (4) por diferentes métodos alcalinos (M1 e M2)



3.2 HIDRÓLISE DAS XILANAS E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

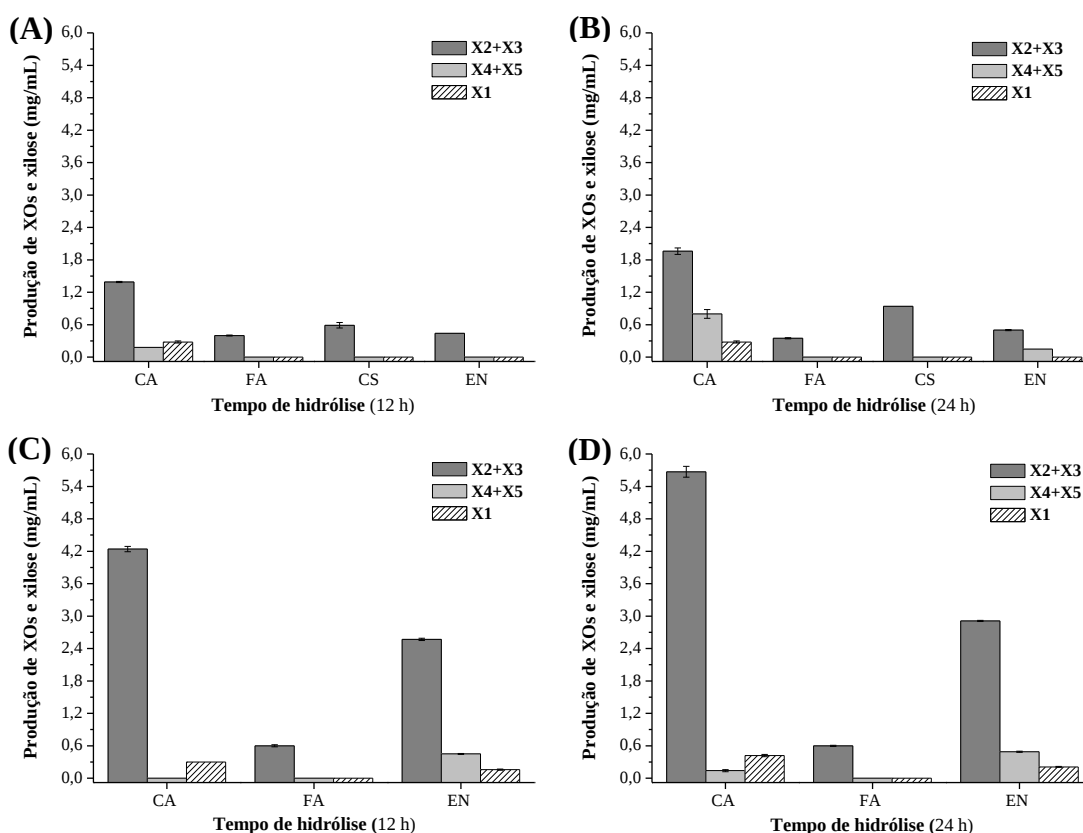
As xilanas extraídas foram submetidas à hidrólise por endo- β -1,4-xilanases de *T. lanuginosus* visando à obtenção de hidrolisados com maior concentração de XOs de baixo grau de polimerização (GP) e reduzido teor de xilose. A produção dos XOs de baixo GP, sobretudo xilobiose (X2) e xilotriose (X3), tem ganhado importância devido a sua rápida fermentação por bactérias probióticas, o que promove a saúde intestinal de humanos (GULLÓN; GONZÁLEZ-MUÑOZ; PARAJO, 2011).

Conforme mostra a Figura 5D, a hidrólise via enzimática da xilana da casca de arroz extraída com o M2 rendeu a maior quantidade de XOs de baixo GP ($5,67 \pm 0,10$ mg/mL), seguido pela xilana do engaço de uva ($2,91 \pm 0,01$ mg/mL), extraída com o mesmo método. Na Figura 5B pode ser visto que a hidrólise da xilana da casca de soja extraída com o M1 mostrou valores promissores para a produção de XOs de baixo GP ($0,94 \pm 0,01$ mg/mL), enquanto que a hidrólise da xilana do farelo de arroz extraída por ambos os métodos foi bastante reduzida, e o rendimento de XOs de baixo GP (X2+X3) não passou de 0,60 mg/mL após 24 h de reação. Não foi possível avaliar o perfil dos hidrolisados produzidos a partir da xilana da casca de soja extraída com o M2 devido a problemas operacionais, provavelmente relacionados à presença de lipídios e/ou outros contaminantes nas amostras injetadas.

Aparentemente, o tempo de 24 h de hidrólise (Figuras 5B e 5D) foi mais adequado para a produção de XOs do que o tempo de 12 h (Figuras 5A e 5C), uma vez que o rendimento dos XOs de baixo GP (X2+X3) foi incrementado no decorrer do tempo. Convém ressaltar ainda

que, apesar do M1 ter extraído a maior quantidade de xilana da casca de arroz, a hidrólise desta xilana (Figuras 5A e 5B) liberou menos XOs nos hidrolisados ($1,96 \pm 0,06$ mg/mL), o que pode estar relacionado à presença de mais contaminantes no substrato. Os resultados aqui alcançados corroboram para demonstrar que a composição química e a estrutura das xilanas, assim como o método alcalino pelo qual as xilanas são extraídas da biomassa lignocelulósica, influenciam no grau de hidrólise enzimática e rendimento dos XOs de baixo GP.

Figura 5 - Produção de XOs e xilose em 12 h e 24 h de hidrólise das xilanas extraídas com os métodos M1 (A, B) e M2 (C, D). Casca de arroz: CA, farelo de arroz: FA, casca de soja: CS e engaço de uva: EN



* Média $\pm$ erro padrão. X1: xilose; X2: xilobiose, X3: xilotriose, X4: xilotetraose e X5: xilopentaose.

É conhecido que, para a produção dos XOs por hidrólise enzimática de xilanas, o preparado xilanolítico deve ter alta atividade de endo- β -1,4-xilanases e baixa atividade de exo-xilanases e β -xilosidases, uma vez que alta atividade destas enzimas produz elevada quantidade de xilose que apresenta efeitos de inibição na obtenção de XOs (VÁSQUEZ et al., 2000), e sua presença em hidrolisados potencialmente prebióticos não é desejada (ESCARNOT; AGUEDO; PAQUOT, 2012). Além de endo- β -1,4-xilanases, dependendo do tipo de xilana a ser hidrolisada é imprescindível que o preparado xilanolítico comercial possua as enzimas auxiliares, tais como

α -L-arabinofuranosidase e β -glicosidase, que removem os substituintes das xilanas facilitando o acesso de endo- β -xilanasases à cadeia principal, com consequente liberação de XOs.

De acordo com Akpinar, Erdogan e Bostanci (2009), a maioria das endo- β -xilanasases são estericamente impedidas pelos substituintes das cadeias de xilanas e preferem hidrolisar os polissacarídeos não substituídos. Por exemplo, as endo- β -1,4-xilanasases da família GH11 atuam sobre as xilanas cuja cadeia principal é constituída de xilose e são capazes de clivar as ligações mais afastadas das ramificações (BRIENZO, 2010).

Purchart e Biely (2008) relataram que *T. lanuginosus* secreta endo- β -1,4-xilanasases da família GH11 e atividades muito baixas de α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidasases e β -xilosidasases, o que pode resultar em pouca hidrólise e/ou levar à produção de XOs ramificados. No presente estudo, foi utilizado o preparado xilanolítico de *T. lanuginosus* que apresenta alta atividade de endo- β -1,4-xilanasases (21961,89 U/g) e baixa atividade de α -L-arabinofuranosidase (0,03 U/g) e β -glicosidase (0,09 U/g). Não foi detectada atividade de β -xilosidase neste extrato. Portanto, é possível que a composição do preparado xilanolítico esteja relacionada à hidrólise reduzida das xilanas ramificadas devido à sua baixa atividade de enzimas auxiliares. Em estudos prévios, foi visto que a endo- β -1,4-xilanasase de *T. lanuginosus* hidrolisa mais eficientemente as xilanas pouco ramificadas, como a xilana de faia (GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2015).

Outro fator a ser considerado são as impurezas presentes nas xilanas extraídas, tais como lignina residual, taninos e/ou sais, que causam a inibição da atividade de endo- β -xilanasase. Segundo Wyman et al. (2005), as ligações éster entre a lignina e as hemiceluloses diminuem a biodegradabilidade enzimática da hemicelulose. Além disso, a solubilidade limitada das xilanas em meio aquoso (tampão citrato de sódio) pode ter interferido de forma negativa no contato da enzima com o substrato, contribuindo para a baixa conversão de xilana em XOs. O tratamento alcalino com NaOH é eficiente na exposição de xilanas para a atuação enzimática mas apresenta a desvantagem de não preservar os grupos acetil das moléculas, o que limita a sua solubilidade em água (NABARLATZ et al., 2007). Há relatos de melhora na solubilidade das xilanas com o uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino (SUN et al., 2002), e o emprego de um menor teor de xilana também reduz os efeitos de inibição (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

A hidrólise via enzimática das xilanas extraídas da casca de arroz, do engaço de uva e da casca de soja rendeu resultados promissores em comparação a outros estudos relacionados à produção de XOs a partir de xilanas de diferentes materiais lignocelulósicos. Kiran, Akpinar e Bakir (2013) utilizaram uma endo- β -xilanasase comercial de *Aspergillus niger* para a hidrólise da xilana de casca de arroz extraída por métodos alcalinos, e obtiveram 5,4 mg/mL de XOs com 15% de xilana, 0,2 U/mL de endo- β -xilanasases, pH 5,0 e 40°C por 120 h. A xilana extraída do

bagaço de cana por álcali foi hidrolisada com 13,3 U/g de endo- β -1,4-xilanases de *Trichoderma viridae* a 40°C e pH 4,0 por 8 h, e rendeu cerca de 1,7 mg/mL de XOs (JAYAPAL et al., 2013). Aachary e Prapulla (2009) usaram uma endo- β -1,4-xilanase de *Aspergillus oryzae* MTCC 5154 (233 U/g) e o sabugo pré-tratado (6,0%) para produzir XOs, e alcançaram um rendimento de 10,2 mg/mL após 14 h de reação a 50°C e pH 5,4.

Quando se utilizou a xilana de faia e condições de hidrólise enzimática similares ao do presente estudo, a produção de XOs de baixo GP foi de 17,48 mg/mL. Em comparação à estes resultados, o rendimento de X2+X3 utilizando as xilanas extraídas de MLCs foi menor, mais especificamente 5,67 mg/mL para a xilana da casca de arroz e 2,91 mg/mL para a xilana do engaço de uva. Porém, há de se considerar que as xilanas extraídas de MLCs não apresentam pureza elevada como a xilana de faia comercial, e o baixo custo das mesmas aliado ao melhor aproveitamento de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais amplamente disponíveis no Rio Grande do Sul torna esta abordagem bastante promissora.

4 CONCLUSÃO

Os materiais lignocelulósicos da agroindústria regional são fontes de xilanas com potencial para a produção de XOs. Ambos os métodos de extração alcalina (M1 e M2) foram eficientes na extração das xilanas, mas o M2 proporcionou os maiores rendimentos de extração, exceto para a xilana da casca de arroz, que foi melhor extraída com o M1. Dentre as xilanas avaliadas, a hidrólise via enzimática da xilana da casca de arroz rendeu a maior concentração de XOs de baixo GP (X2+X3), alcançando cerca de 5,67 mg/mL em 24 h. A xilana dos engaços também foi hidrolisada em xilobiose e xilotriose (2,91 mg/mL), porém em menor quantidade que a xilana da casca de arroz e maior quantidade que a xilana da casca de soja (0,94 mg/mL). Os resultados promissores sugerem que é possível otimizar as condições de extração alcalina e parâmetros reacionais de hidrólise para que a produção de XOs com potencial prebiótico seja tecnológica e economicamente viável.

5 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.

- ADSUL, M. G.; VARMA, A. J.; GOKHALE, D. V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 58-62, 2007.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145-151, 2009.
- AKPINAR, O.; OZLEM, A. K.; KAVAS, A.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544-5551, 2007.
- ASPINALL, G. O.; HUNT, K.; MORRISON, I. M. Polysaccharides of soybeans. Part II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan. **Journal of the Chemical Society**, v. 21, p. 1945-1949, 1966.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligosacarídeos**. 2010. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. D.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. 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.
- CATALUÑA, E. V. **As uvas e os vinhos**. 3. ed. São Paulo: Globo, 1991.
- CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do arroz**. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf. Acesso em: 03 de marc. 2016, 16:40:00.
- DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C. M. A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T. M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, D. A. K. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 793-797, 2009.
- ESCARNOT, E.; AGUEDO, M.; PAQUOT, M. Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 243-253, 2012.

FARYAR, R.; LINARES-PASTÉN, J. A.; IMMERZEEL, P.; MAMO, G.; ANDERSSON, M.; STALBRAND, H.; MATTIASSON, B.; KARLSSON, E. N. Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 1-10, 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

GOKHALE, D. V.; PATIL, S. G.; BASTAWDE, K. B. Potential application of yeast cellulase free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 187-191, 1998.

GOWDHAMAN, D; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corn cob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595-600, 2015.

GUIDO, E. S.; SILVEIRA, J. T.; KALIL, S. J. Influência dos parâmetros reacionais na produção enzimática de xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 12., 2016, Caxias do Sul. **Anais...Caxias do Sul: UCS**, 2016.

GUIDO, E. S.; SILVEIRA, J. T.; KALIL, S. J. Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática de xilana de madeira de faia. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 7., 2015, Alegrete. **Anais...Alegrete: UNIPAMPA**, 2015.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJO, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6112-6119, 2011.

HAULI, I.; SARKAR, B.; MUKHERJEE, T.; CHATTOPADHYAY, A.; MUKHOPADHYAY, S. K. Alkaline extraction of xylan from agricultural waste, for the cost effective production of xylooligosaccharides, using thermoalkaline xylanase of thermophilic *Anoxybacillus* sp. Ip-C. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 1, n. 6, p. 126-131, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2016. Disponível em: http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publ_completa.shtm Acesso em: 03 de marc. 2016, 16:30:00.

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

KALINGAN, A. E.; KRISHNAN, M. R. V. Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 226-230, 1997.

KIRAN, E. U.; AKPINAR, O.; BAKIR, U. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 565-574, 2013.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; XU, J.; SUN, Y.; YUAN, Z.; XIE, J. Consolidated bioprocess for bioethanol production with alkali-pretreated sugarcane bagasse. **Applied Energy**, v. 157, n. 1, p. 517-522, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Plano nacional de resíduos sólidos**. 2011. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/253/_publicacao/253_publicacao02022012041757.pdf Acesso em: 03 de marc. 2016, 17:30:00.

NABARLATZ, D.; TORRAS, C.; GARCIA-VALLS, R.; MONTANE, D. Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 3, p. 235-243, 2007.

OKEKE, B. C.; OBI, S. K. C. Saccharification of agrowaste materials by fungal cellulases and hemicellulases. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 23-27, 1995.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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

PING, L.; BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Evaluation of grape stalks as a Bioresource. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 200-204, 2011.

PROZIL, S. O.; MENDES, J. A.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Chemical and structural characterization of grape stalks and evaluation of its potential as lignocellulosic raw materials. **Millenium**, v. 44, p. 23-40, 2013.

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

RESTLE, J.; FATURI, C.; ALVES, D. C. F.; BRONDANI, I. L.; SILVA, J. H. S.; KUSS, F.; SANTOS, C. V. M.; FERREIRA, J. J. Substituição do grão de sorgo por casca de soja na dieta de novilhos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1009-1015, 2004.

RUIZ, H. A.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35-51, 2013.

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

SHIBUYA, N.; IWASAKI, T. Structural features of rice bran hemicellulose. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 285-289, 1985.

SUN, H. J.; YOSHIDA, S.; PARK, N. H.; KUSAKABE, I. Preparation of (1-4)- β -D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1-4)- β -D-xylooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 657-661, 2002.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139-4143, 2010.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005.

ZHU, Y. M.; KIM, T. H.; LEE, Y. Y.; CHEN, R. G.; ELANDER, R. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p. 586-598, 2006.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

As endo- β -1,4-xilanases comerciais de *A. oryzae* (Shearzyme[®]), *T. lanuginosus* (Spring Mono[®]) e *A. niger* (Hemicellulase Amano[®]) são capazes de catalisar eficientemente a hidrólise de xilanas oriundas de fontes distintas e produzir xilo-oligossacarídeos com potencial prebiótico.

Os preparados xilanolíticos dos três fungos filamentosos apresentaram atividade de endo- β -xilanases, β -xilosidases, α -arabinofuranosidases e β -glicosidases em diferentes níveis. As endo- β -1,4-xilanases foram mais ativas na faixa de pH de 5,0 a 5,5 e temperaturas acima de 50°C. Endo- β -xilanases de *A. oryzae* e *T. lanuginosus* mostraram boa termoestabilidade a 50°C e elevada afinidade com a xilana de madeira de faia. A composição do preparado xilanolítico e as propriedades da endo- β -xilanase influenciaram no grau de polimerização (GP) e rendimento dos XOs, e a quantidade de xilose liberada nos hidrolisados foi proporcional à atividade de β -xilosidase dos extratos xilanolíticos.

A endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus* se destacou na produção de XOs de baixo GP a partir da xilana de faia e produziu 9,55 mg/mL de XOs em 36 h de reação. Os XOs formados em maior concentração foram xilobiose (X2) e xilotriose (X3), e conforme o desejado pouca xilose foi gerada em simultâneo, o que sugere o potencial promissor desta xilanase na obtenção de XOs prebióticos para aplicação em alimentos funcionais.

O estudo dos parâmetros reacionais de hidrólise possibilitou maximizar a produção de XOs de baixo GP por hidrólise da xilana de faia com endo- β -xilanases de *T. lanuginosus*. A concentração de substrato e a temperatura tiveram uma maior influência no rendimento de XOs, e a melhor condição de hidrólise foi definida como sendo: 6% (m/v) de xilana de faia, 133 U/g de endo- β -1,4-xilanases, pH 5,5 e 60°C por 24 h, onde foram atingidos 17,48 mg/mL de XOs de baixo GP, mais especificamente xilobiose e xilotriose, e menos de 1,0 mg/mL de xilose.

Os métodos de extração alcalina possibilitam maiores recuperações de xilanas de casca e farelo de arroz, casca de soja e engaço de uva, sendo que os melhores rendimentos de xilana (% m/m) foram alcançados para a casca de arroz (43%) e o engaço de uva (20%). Ao se utilizar as xilanas extraídas em substituição à xilana de madeira de faia na condição de hidrólise maximizada, a endo- β -xilanase de *T. lanuginosus* produziu 5,67 mg/mL e 2,91 mg/mL de XOs de baixo GP a partir da xilana de casca de arroz e engaço de uva, respectivamente, evidenciando a possibilidade de se obter XOs com potencial prebiótico por hidrólise enzimática das xilanas de biomassas lignocelulósicas de baixo custo e disponíveis no Estado do Rio Grande do Sul.

CAPÍTULO V
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Validação do método para identificação e quantificação de XOs por CLAE;
- Produção de preparados xilanolíticos de leveduras e aplicação na obtenção de XOs;
- Imobilização de endo- β -1,4-xilanases para produção enzimática de XOs;
- Estudo dos processos de extração e purificação de xilanas de materiais lignocelulósicos;
- Maximização da produção de XOs com xilanas extraídas de materiais lignocelulósicos;
- Purificação de XOs obtidos por hidrólise enzimática de diferentes xilanas;
- Avaliação do efeito prebiótico *in vitro* e atividade antioxidante de XOs produzidos a partir de diferentes xilanas.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 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.

ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6488-6495, 2009.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145-151, 2009.

BAIG, M. N.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. Conversion of extracted rice bran and isolation of pure bio-ethanol by means of supercritical fluid technology. In: International Symposium of Supercritical Fluids, 8., 2006, Kyoto. **Anais...Kyoto: ISASF**, 2006. Disponível em: <http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Colmar/Paper/N3.pdf>. Acesso em: 03 de marc. 2016, 18:00:00.

BALAKRISHNAN, H.; DUTTACHOUDHURY, M.; SRINIVASAN, M. C.; RELE, M. V. Cellulase-free xylanase production from an alkalophilic *Bacillus* species. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 627-631, 1992.

BATAILLON, M.; CARDINALI, A. P. N.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 187-192, 2000.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BHAT, M. K. Oligosaccharides as functional food ingredients and their role in improving the nutritional quality of human food and health. **Recent Research Development in Agricultural & Food Chemistry**, v. 2, p. 787-802, 1998.

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

BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. cap. 71.

BIELY, P.; MACKENZIE, C. R.; PULS, J.; SCHNEIDER, H. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. **Nature Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 731-733, 1986.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. D.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. 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.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5230-5236, 2009.

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

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do arroz**. 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf. Acesso em: 03 de marc. 2016, 16:40:00.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. 11. ed. Brasília: CONAB, 2013.

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3-4, p. 277-283, 1999.

COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, p. 259-289, 1993.

COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; CLAYESSENS, M.; VRSANSKA, M.; HUGHES, M. H. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press, 1993. p. 53-84.

COURTIN, C. M.; SWENNEN, K.; VERJANS, P.; DELCOUR, J. A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 831-837, 2009.

- DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2671-2678, 2007.
- FALCK, P.; PRECHA-ATSAWANAN, S.; GREY, C.; IMMERZEEL, P.; STALBRAND, H.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E. N. Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7333-7340, 2013.
- FARYAR, R.; LINARES-PASTÉN, J. A.; IMMERZEEL, P.; MAMO, G.; ANDERSSON, M.; STALBRAND, H.; MATTIASSON, B.; KARLSSON, E. N. Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 1-10, 2015.
- FREIXO, M. R.; PINHO, M. N. Enzymatic hydrolysis of beechwood xylan in a membrane reactor. **Desalination**, v. 149, p. 237-242, 2002.
- GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1101-1109, 1999.
- GEORIS, J.; GIANNOTTA, F.; BUYL, E.; GRANIER, B.; FRÈRE, J. M. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 178-186, 2000.
- GROOTAERT, C.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M.; BROEKAERT, W. F.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 64-71, 2007.
- GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; PARAJO, J. C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6112-6119, 2011.
- GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; HIRSCH, J.; EBRINGEROVA, A.; PARAJO, J. C. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3632-3641, 2010.
- HADDAR, A.; DRISS, D.; FRIKHA, F.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; NASRI, M. Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21: production and generation of xylooligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 647-656, 2012.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137-161, 1996.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Ambiental e Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HUGHES, S. A.; SHEWRY, P. R.; LI, L.; GIBSON, G. R.; SANZ, M. L.; RASTALL, R. A. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4589-4595, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2016. Disponível em: http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publ_completa.shtm Acesso em: 03 de marc. 2016, 16:30:00.

IEFUJI, H.; CHINO, M.; KATO, M.; IIMURA, Y. Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 1331-1338, 1996.

IINO, T.; NISHIJIMA, Y.; SAWADA, S.; SASAKI, H.; HARADA, H.; SUWA, Y.; KISO, Y. Improvement of constipation by small amount of xylooligosaccharides ingestion in adult women. **Journal of Japanese Association of Dietary Fibre Research**, v. 1, n. 1, p. 19-24, 1997.

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

JIANG, Z. Q.; DENG, W.; ZHU, Y. P.; LI, L. T.; SHENG, Y. J.; HAYASHI, K. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 4-6, p. 207-213, 2004.

KABEL, M. A.; CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; AVGERINOS, E.; KOUKIOS, E.; PARAJO, J. C.; GIRIO, F. M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 1, p. 47-56, 2002.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KIRAN, E. U.; AKPINAR, O.; BAKIR, U. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 565-574, 2013.

KITAMOTO, N.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 6310, p. 1791-1794, 1999.

KOBAYASHI, T.; OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; KOGA, K. Effect of xylooligosaccharides on feces of men. **Journal of Japanese Society of Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1651-1653, 1991.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 35, n. 4, p. 717-723, 1997.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3-4, p. 170-177, 2012.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E. H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 20, 2011.

LI, X. L.; ZHANG, Z.; DEAN, I. F. D.; ERIKSSON, K. L.; LJUNGDAHL, L. G. Purification and characterization of a new xylanase APX-II from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-23111. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 59, p. 3212-3218, 1993.

LIU, W.; LU, Y. L.; MA, G. R. Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 67-72, 1999.

MAAT, J.; ROZA, M.; VERBAKEL, J.; STAM, H.; DASILVA, M. J. S.; BOSSE, M.; EGMOND, M. R.; HAGEMANS, M. L. D.; VONGORCOM, R. F. M.; HESSING, J. G. M.; VANDERHONDEL, C. A. M. J. J.; VONROTTERDAM, C. Xylanases and their application in bakery. **Xylans and Xylanases**, v. 7, p. 349-360, 1992.

MADLALA, A. M.; BISSOON, S.; SINGH, S.; CHRISTOV, L. Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 5, p. 345-351, 2001.

MAKELAINEN, H.; FORSSTEN, S.; SAARINEN, M.; STOWELL, J.; RAUTONEN, N.; OUWEHAND, A. C. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 81-91, 2010.

MANISSERI, C.; GUDIPATI, M. Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 421-430, 2010.

MANSILLA, H. D.; BAEZA, J.; URZÚA, S.; MATURANA, G.; VILLASEÑOR, J.; DURAN, N. Acid catalysed hydrolysis of rice hulls: evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 189-193, 1998.

MENEZES, C. R. D.; DURRANT, L. R. Xilooligosacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, p. 587-592, 2008.

MIELENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532-3539, 2009.

MOTTA, F. B. **Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MOURE, A.; GÜLLON, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1913-1923, 2006.

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

NABARLATZ, D.; TORRAS, C.; GARCIA-VALLS, R.; MONTANE, D. Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 3, p. 235-243, 2007.

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MASTUMOTO, N. Effects of xylooligosaccharides on growth of *Bifidobacteria*. **Bifidobacteria Microflora**, v. 9, n. 2, p. 77-86, 1990.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 879-887, 2011.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POUTANEN, K.; TENKANEN, M.; KORTE, H.; PULS, J. Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In: LEATHAM, G. E.; HIMMEL, M. E. **Enzymes in Biomass Conversion**. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 426-436.

PRAKASH, B.; VIDYASAGAR, M.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp TPSV 101. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3-4, p. 192-198, 2012.

PROZIL, S. O.; MENDES, J. A.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Chemical and structural characterization of grape stalks and evaluation of its potential as lignocellulosic raw materials. **Millenium**, v. 44, p. 23-40, 2013.

PULS, J.; TENKANEN, M.; KORTE, H. E.; POUTANEN, K. Products of hydrolysis of beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and a acetyl xylan esterase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 6, p. 483-486, 1991.

RATNADEWI, A. A. I.; HANDAYANI, W.; OKTAVIANAWATI, I.; SANTOSO, A. B.; PUSPANINGSIH, N. N. T. Isolation and hydrolysis xylan from soybean waste with endo- β -1,4-D-Xylanase of *Bacillus* sp. from soil termite abdomen. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 371-377, 2016.

SABIHA-HANIM, S.; NOOR, M. A. M.; ROSMA, A. Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1234-1239, 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

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

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*). **Bioresource Technology**, v. 112, p. 199-205, 2012.

SIGMA-ALDRICH. 2016 (January, 25). **Xylan from beechwood**. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com>.

SINGH, S.; REDDY, P.; HAARHOFF, J.; BIELY, P.; JANSE, B.; PILLAY, B.; PILLAY, D.; PRIOR, B. A. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 119-128, 2000.

SUN, R. C.; TOMKISON, J.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 111-122, 2000.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139-4143, 2010.

TUOHY, M. G.; LAFFEY, C. D.; COUGHLAN, M. P. Characterization of the individual components of the xylanolytic enzyme-system of *Talaromyces emersonii*. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 37-42, 1994.

TOSHIO, I.; NORIYOSHI, I.; TOSHIKI, K.; TOSHIYUKI, N.; KUNIMASA, K. **Production of xylobiose**. Japanese Patent, JP n. 2119790, 1990.

VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of *Eucalyptus wood*. **Food Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 91-105, 2002.

- VÁZQUEZ, M. J.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.
- VEGAS, R.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Enzymatic processing of rice husk autohydrolysis products for obtaining low molecular weight oligosaccharides. **Food Biotechnology**, v. 22, n. 1-2, p. 31-46, 2008.
- VEGAS, R.; ALONSO, J. L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7311-7317, 2004.
- VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 8-9, p. 328-335, 1998.
- WANG, J.; SUN, B. G.; CAO, Y. P.; TIAN, Y. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816-821, 2009.
- WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 451S-455S, 2001.
- YAN, Q. J.; WANG, L.; JIANG, Z. Q.; YANG, S. Q.; ZHU, H. F.; LI, L. T. A xylose-tolerant β -xylosidase from *Paecilomyces thermophila*: characterization and its co-action with the endogenous xylanase. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5402-5410, 2008.
- YANG, H. Y.; WANG, K.; SONG, X. L.; XU, F. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7171-7176, 2011.
- YANG, X. X.; CHEN, H. Z.; GAO, H. L.; LI, Z. H. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 277-280, 2001.
- ZHU, Y. M.; KIM, T. H.; LEE, Y. Y.; CHEN, R. G.; ELANDER, R. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p. 586-598, 2006.