

LUCAS FILIPE ALMEIDA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS COM ATIVIDADE
PREBIÓTICA *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A447p
2022 Almeida, Lucas Filipe, 1994-
Produção enzimática de xilooligossacarídeos com atividade
prebiótica *in vitro* / Lucas Filipe Almeida. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gabriela Pícolo Maitan-Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 55-67.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.208>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Enzimas de fungos. 2. Tecnologia de alimentos. 3. Prebióticos.
4. Biomassa. 5. Hidrólise. I. Maitan-Alfenas, Gabriela Pícolo, 1986-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 660.634

Bibliotecário(a) responsável: Euzebio Luiz Pinto CRB 6/3317

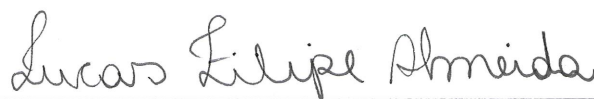
LUCAS FILIPE ALMEIDA

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS COM ATIVIDADE
PREBIÓTICA *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de janeiro de 2022

Assentimento:



Lucas Filipe Almeida
Autor



Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas
Orientadora

Aos meus pais, irmãs, avós e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A toda minha família pelo amparo, apoio e crédito.

Aos amigos pelas discussões científicas, momentos de descontração e reflexão.

A minha orientadora pelo impecável apoio intelectual e orientação.

Aos laboratórios de pesquisas, técnicos, professores e alunos pesquisadores que contribuíram para obtenção dos resultados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso (FAPEMAT), pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Às agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

RESUMO

ALMEIDA, Lucas Filipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Produção enzimática de xilooligossacarídeos com atividade prebiótica *in vitro***. Orientadora: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas.

Os xilooligossacarídeos (XOS) são ingredientes prebióticos potencialmente valiosos para alimentos e rações que podem ser obtidos a partir de biomassas lignocelulósicas de baixo custo e abundantes. Para a produção de XOS, a hidrólise enzimática é comumente preferida pois não produz subprodutos indesejáveis, nem requer condições especiais de temperatura e pressão. Portanto, diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para a obtenção de xilanases com maior eficiência catalítica e características ideais para a produção de XOS. Com isso, as xilanases recombinantes de *Orpinomyces* sp. PC-2 (SM2), estruturalmente otimizada, e *Aspergillus nidulans* (AN1818 e AN3613) são potenciais produtoras de XOS a partir da hidrólise de sabugo de milho, farelo de arroz, casca de soja e resíduos de café. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de produção de xilooligossacarídeos (XOS) via hidrólise enzimática por três enzimas fúngicas recombinantes e um coquetel comercial, individualmente, e estudar o potencial efeito prebiótico *in vitro* destes açúcares. Para isso, as biomassas *in natura* e pré-tratadas com NaOH 1 % foram caracterizadas quanto à sua composição química. Os teores de extrativos, proteínas, lipídios e cinzas foram determinados por técnicas gravimétricas e titulométricas, enquanto lignina e carboidratos por cromatografia de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria. A xilanase SM2 foi expressa em *Escherichia coli*, enquanto AN1818 e AN3613 em *Pichia pastoris* e empregadas na sacarificação das biomassas por 72 horas a 50 °C. Alíquotas foram coletadas para avaliar o perfil de XOS por CLAE. Por fim, os XOS obtidos substituíram as fontes de carbonos em meios de crescimento específicos para *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. As curvas de crescimento microbiano foram obtidas por DO em 600 nm, além da quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por CLAE. Entre as biomassas *in natura*, os resíduos de café e sabugo de milho apresentaram os maiores teores de hemicelulose, 27,85 e 21,37 %, respectivamente. Já o farelo de arroz apresentou o maior teor de lignina, 36,69 %. Após pré-tratamento alcalino, as biomassas apresentaram teor de recuperação entre 46,27 e 64,99 %, com o enriquecimento de carboidratos e a redução de lignina para a posterior etapa de sacarificação. A xilanase SM2 apresentou atividade catalítica, 21853,10 (\pm 106,73) U/mL, e rendimentos de XOS equiparáveis ao coquetel Multifect® XL em todas as biomassas testadas, além de ter sido superior as

xilanases de *A. nidulans* (AN1818 e AN3613 com 14,37 e 20,41 U/mL, respectivamente) na produção de XOS em cada fonte de carbono. Observou-se que, após 6 h de hidrólise do sabugo de milho, a liberação de XOS totais foram de 6,21 ($\pm 0,37$) e 7,36 ($\pm 0,57$) g/L, produzidos pela xilanase SM2 e pelo coquetel comercial, respectivamente. Após hidrólise do farelo de arroz, a xilanase SM2 produziu um perfil mais diversificado de XOS, com xilobiose, xilotriose, xiliopentose e xiloexose, em 48 h de reação. Além disso, o *L. acidophilus* foi capaz de metabolizar os XOS produzidos e fermentá-los, parâmetro indicado pela liberação de ácidos graxos de cadeia curta, como acético, propiônico e isobutírico. Já os patógenos não tiveram o crescimento favorecido na presença dos XOS como fonte de carbono. Com isso, os oligossacarídeos são fermentescíveis aos probióticos e estimulam o crescimento seletivo de bactérias benéficas. Portanto, os resultados são promissores para um teste *in vivo* e expandem as aplicações da xilanase SM2.

Palavras-chave: Xilanases recombinantes. Xilooligossacarídeos. Prebióticos. Biomassas lignocelulósicas.

ABSTRACT

ALMEIDA, Lucas Filipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2022. **Enzymatic production of xylooligosaccharides with prebiotic activity *in vitro***. Adviser: Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas.

Xylooligosaccharides (XOS) are potential valuable food and feed prebiotic ingredients that can be obtained from cheap and abundant lignocellulosic biomasses. For XOS production, enzymatic hydrolysis is commonly preferred because it does not produce undesirable by-products neither requires special conditions of temperature and pressure. Therefore, several molecular techniques have been developed to obtain xylanases with greater catalytic efficiency and ideal characteristics for XOS production. Thus, recombinant xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 (SM2) and *Aspergillus nidulans* (AN1818 and AN3613) are potential XOS producers after the hydrolysis of corn cob, rice bran, soybean husk and coffee residues. The aim of this study was to evaluate the production profile of xylooligosaccharides (XOS) via enzymatic hydrolysis by recombinant fungal enzymes and a commercial cocktail, and to study the potential *in vitro* prebiotic effect of these sugars. For this, *in natura* and pre-treated biomasses with NaOH 1 % were characterized concerning their chemical composition. Extractives, proteins, lipids and ash were determined by gravimetric and titrimetric techniques, while lignin and carbohydrates by high performance chromatography (HPLC) and spectrophotometry. SM2 xylanase was expressed in *Escherichia coli*, while the xylanases AN1818 and AN3613 were expressed in *Pichia pastoris* and they were employed in the saccharification of biomasses for 72 hours at 50 °C. Aliquots were collected to determine the XOS profile by HPLC. Finally, XOS were able to substitute the carbon sources in specific growth media for *Lactobaccillus acidophilus*, *E. coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbial growth curves were performed by OD at 600 nm, in addition to the quantification of short chain fatty acids (SCFA). Among the *in natura* biomasses, coffee and corn cob residues showed the highest hemicellulose contents, 27.85 and 21.37%, respectively. Rice bran had the highest lignin content, 36.69 %. After alkaline pretreatment, the biomasses showed yields between 46.27 and 64.99 %, with carbohydrate enrichment and lignin reduction for the next saccharification step. SM2 xylanase showed catalytic activity, 21853.10 (\pm 106.73) U/mL, and XOS yields comparable to the Multifect® XL cocktail for all tested biomasses, it also was superior to *A. nidulans* xylanases (AN1818 and AN3613 with 14.37 and 20.41 U/mL, respectively) in the production of XOS in each carbon source. After hydrolysis of corn cob for 6 h, the total XOS

yields were 6.21 (± 0.37) and 7.36 (± 0.57) g/L by the xylanase SM2 and the commercial xylanase, respectively. Whereas the hydrolysis of rice bran by SM2 produced a more diversified profile of XOS, like xylobiose, xylotriose, xyliopentose and xylohexose, after 48 h of reaction. Furthermore, *L. acidophilus* was able to metabolize the XOS produced and to ferment them, which was indicated by the release of short-chain fatty acids, such as acetic, propionic and isobutyric. On the other hand, pathogens did not have favored growth in the presence of XOS as carbon sources. Thus, oligosaccharides are fermentable by probiotics and stimulate the selective growth of beneficial bacteria. Therefore, the results are promising for an in vivo test and to expand the applications of SM2 xylanase.

Keywords: Recombinant xylanases. Xylooligosaccharides. Prebiotics. Lignocellulosic biomasses.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Resíduos lignocelulósicos.....	13
2.2 Xilanases.....	15
2.3 Xilooligossacarídeos.....	19
2.4 Aplicação biotecnológica de xilooligossacarídeos (XOS).....	21
3 OBJETIVOS.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Biomassas.....	23
4.2 Caracterização química das biomassas.....	23
4.2.1 Preparo das amostras.....	23
4.2.2 Teor de umidade.....	23
4.2.3 Determinação de extrativos.....	23
4.2.4 Determinação de carboidratos totais.....	24
4.2.5 Determinação de lignina solúvel e insolúvel.....	25
4.2.6 Teor de cinzas.....	25
4.2.7 Determinação de proteínas totais.....	26
4.3 Expressão de xilanases recombinantes.....	26
4.3.1 Cultivo e manutenção de <i>Pichia pastoris</i>	26
4.3.1 Cultivo e manutenção de <i>Escherichia coli</i>	27
4.3.2 Dosagem de proteínas totais e confirmação da expressão das xilanases.....	28
4.4 Medida da atividade de xilanase pelo método do DNS.....	28
4.5 Pré-tratamento alcalino das biomassas.....	28
4.6 Hidrólise enzimática.....	28
4.8 Quantificação de xilooligossacarídeos (XOS) por cromatografia líquida de alta performance (CLAE).....	29
4.9 Teste <i>in vitro</i> do efeito prebiótico.....	29
4.9.1 Microrganismos.....	29
4.9.2 Cultivo dos organismos probióticos.....	29
4.9.3 Cultivo dos organismos patogênicos.....	30
4.9.5 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curtas.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização química das biomassas.....	32

5.2 Expressão das xilanases recombinantes.....	35
5.6 Hidrólise enzimática das biomassas para produção de xilooligossacarídeos (XOS).....	37
5.6.1 Sabugo de milho.....	37
5.6.2 Farelo de arroz.....	39
5.6.3 Casca de soja	41
5.7 Perfil de xilooligossacarídeos (XOS) liberados após sacarificação de biomassas lignocelulósicas por xilanase	42
5.8 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial prebiótico dos XOS	46
5.8. 1 Ação prebiótica <i>in vitro</i>	46
5.8.2 Indicativos de fermentação.....	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são, normalmente, proteínas com função catalítica e o seu mercado mundial foi responsável por um capital de U\$ 9,9 bilhões em 2019 e projeta-se um crescimento de 7,1 % ao ano até 2027; apenas no Brasil, estima-se um crescimento para este setor de 4,9 % até o ano de 2025 (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Tais projeções se justificam pela alta demanda por estas biomoléculas em diversas áreas comerciais, dentre as quais o setor de alimentos e bebidas lidera o consumo por diferentes enzimas, seguido pelos setores de biocombustíveis e agropecuária (SINGH et al., 2016).

Dentre as enzimas, as carboidrases são proeminentemente solicitadas para diversos fins, e, entre elas, pode-se destacar as xilanases, justamente pela função de converter o polímero hemicelulose em açúcares solúveis, como xilose e xilobiase, por exemplo. As xilanases podem ser obtidas por meio da extração de tecidos vegetais e animais ou por microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CHADHA et al., 2019). No entanto, há grande vantagem em se empregar microrganismos para a produção de xilanases, devido às suas características de fácil cultivo e manutenção do meio de cultura, bem como velocidade de crescimento relativamente rápida, com destaque para os fungos, que são capazes de secretar suas enzimas, o que facilita seu processo de purificação (MELLITZER et al., 2012).

Com isso, enzimas fúngicas são cotadas para serem utilizadas em diversos processos biotecnológicos e industriais, pois apresentam vantagens e versatilidade na preparação de vários produtos, principalmente alimentícios, como molhos, cervejas, pães, frutas processadas e outros itens do cotidiano da população (PERSISTENCE MARKET RESEARCH, 2020). Além disso, pode-se obter produtos de interesse comercial e biotecnológico via hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais lignocelulósicos de baixo valor econômico, como casca de soja, palha de milho, sobras da produção cafeeira, dentre outros.

Em contrapartida, o agronegócio brasileiro tem crescido, principalmente pelo setor agrícola, e tornou-se fundamental para o desenvolvimento do país. Segundo a Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária (2020), bens e serviços gerados no agronegócio alcançaram R\$ 1,55 trilhão ou 21,4 % do PIB do país, e a exportação e produção de grãos com maior faturamento nos dois últimos anos é ranqueada pela soja, milho, cana-de-açúcar e café. Com isso, o Brasil tem se destacado como grande produtor de alimentos; no entanto, a abundante quantidade de resíduos gerados durante o processamento de toda matéria-prima vegetal pode ser um fator complicador. Concomitante a esse problema, a alternativa pode ser o aproveitamento dessas fontes de carbono de baixo custo em aplicações biotecnológicas que utilizam enzimas para geração de produtos interesse comercial.

Estudos apontam o interesse da indústria alimentícia para o uso de xilooligossacarídeos de baixo grau de polimerização, como xilobiose, xilotriose e xilotetraose, como ingredientes para seus produtos (MANO et al, 2018). Esse fato se deve às propriedades físico-químicas de resistência e aos efeitos biológicos, como o potencial prebiótico destes oligossacarídeos (JAIN et al., 2015; MANO et al, 2018). Portanto, há uma necessidade crescente de obtenção de novas xilanases capazes de produzir, via hidrólise enzimática, xilooligossacarídeos de baixo grau de polimerização com bom rendimento e alta especificidade. Tudo isso, atrelado a estudos de uma estratégia eficiente, de baixo custo, sustentável e renovável para uma aplicação biotecnológica de interesse social e econômico.

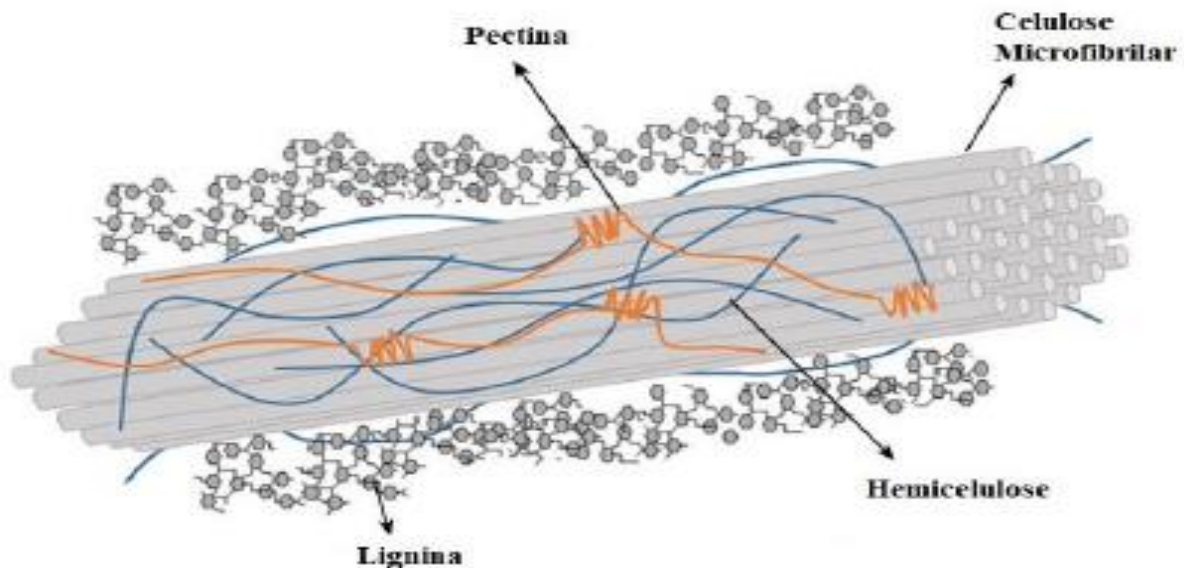
Assim, este trabalho objetivou avaliar o perfil de produção de xilooligossacarídeos a partir da hidrólise de três biomassas lignocelulósicas - sabugo de milho, casca de soja e farelo de arroz - por três enzimas fúngicas recombinantes e um coquetel comercial; e estudar o potencial efeito prebiótico destes açúcares para posterior aplicação biotecnológica. Embora, os resíduos de café tenham sido caracterizados quimicamente, não foi realizada avaliação da produção enzimática de XOS, devido a indisponibilidade de biomassa no período de experimentação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos são biomassas ou matérias orgânicas provenientes da parede vegetal, diretamente de plantas ou resultantes do seu processamento, constituindo um recurso amplo e renovável de fonte de carbono para diversos bioprocessos. A parede vegetal é constituída de estruturas fibrosas compostas, principalmente, pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, que correspondem a aproximadamente 70 % da massa seca, intercalados por lignina, uma macromolécula composta de álcoois aromáticos, e também pelo polímero de pectina e proteínas (BEHERA et al., 2016; OBENG et al., 2017) (FIGURA 1). Essa matriz molecular complexa forma a estrutura lignocelulósica e apresenta característica inerte e recalcitrante, que concede ao tecido vegetal resistência contra degradações e integridade estrutural (CRAGG et al., 2015; ISKIGOR et al., 2015).

FIGURA 1 – Esquema representativo da estrutura molecular da parede vegetal lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Gupta et al., 2016.

A celulose é o polímero mais abundante no resíduo lignocelulósico, compondo cerca de 35 a 50 % da biomassa (GE, et al., 2018). É um homopolissacarídeo formado por repetições de monômeros de D-glicose unidos por ligações β -1,4-O-glicosídicas, dispostos de forma linear em conformação de cadeira, sem ramificações. As longas cadeias de celulose se interagem e são unidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas características concedem à celulose rigidez, estrutura altamente empacotada e cristalina, constituindo uma região de difícil acesso por enzimas; porém, há também regiões amorfas, nas quais as fibras se encontram

mais espaçadas entre si e, portanto, mais suscetíveis à hidrólise enzimática (GE et al., 2018; LYND, 2002).

Entrelaçadas às fibras de celulose, encontram-se as fibras de hemicelulose, que correspondem de 20 a 35 % da constituição da biomassa (GE et al., 2018). Essa porção é uma estrutura amorfa presente em todas as camadas da parede vegetal, altamente ramificada e formada por heteropolissacarídeos contendo unidades de D-xilose, D-glicose, D-manose, D-arabinose ou D-galactose. A cadeia principal da hemicelulose é formada por um monômero específico unido por ligações β -1,4-O-glicosídicas, que se ramifica com padrões diferenciados por grupos laterais curtos de açúcares (GE et al., 2018). A hemicelulose é classificada com base na constituição da cadeia carbônica principal e dos grupos laterais (PALMA, 2003). A xilana é o principal polímero constituinte da hemicelulose, sendo composta por unidades de β -D-xilopiranoses unidas por ligações do tipo β -1,4 enquanto os substituintes da cadeia lateral são grupos de O-acetil, α -L-arabinofuranosil e 4-O-metilglicurônico (CUNHA et al., 2018; POLIZELI et al., 2005). O grau de polimerização e os substituintes da cadeia lateral das xilanas variam entre as biomassas.

Já a lignina, com 10 a 25 % da constituição lignocelulósica, encontra-se covalentemente unida aos polissacarídeos ou interagindo com eles por ligações de hidrogênio (GE et al., 2018). Trata-se de um polímero complexo que contém cadeias de monômeros quimicamente distintos, derivados de compostos fenólicos e não-fenólicos (SUN et al., 2002; WANG et al., 2008). Além disso, a lignina apresenta resistência à degradação biológica, age como um escudo limitando a taxa de hidrólise das porções digeríveis e pode adsorver proteínas importantes do meio reacional, razão pela qual é um interferente nos processos de sacarificação enzimática (LI et al., 2003; YANG et al., 2014; CHEN et al., 2007; WAGNER et al., 1999). Dependendo da origem do material lignocelulósico, podem ainda ser encontradas pequenas quantidades de resinas, ácidos graxos, taninos, minerais, entre outros, sendo necessária uma etapa de remoção desses interferentes para utilização da biomassa.

A composição da biomassa lignocelulósica é variável conforme a espécie vegetal, características do solo, clima e safra em que foi colhida, entre outros; portanto uma análise composicional pode auxiliar na decisão de trabalho e emprego daquele material. Contudo, os resíduos lignocelulósicos são uma fonte renovável, sustentável e infinita de insumos e servem como matéria prima para diversos processos industriais, como produção de biocombustíveis, de ingredientes para a indústria de alimentos e bebidas, reagentes e precursores para a indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2016). Eles também recebem destaque por categorizarem uma alternativa de baixo custo, pois são subprodutos ou resíduos descartáveis de

processos da agroindústria, tais como a casca de soja, melaço da soja, bagaço da cana-de-açúcar, sabugo de milho e diversos outros. Assim, é possível converter resíduos agroindustriais lignocelulósicos em produtos de interesse biotecnológico e comercial com valor econômico agregado (PINTO et al., 2005).

Entretanto, devido à característica de recalcitrância da biomassa, antes da sua hidrólise enzimática, é necessária uma etapa de pré-tratamento para desconstruir as fibras de polissacarídeos e abrir poros na estrutura fibrosa. Assim, as celulasas e hemicelulasas podem penetrar e atuar de forma eficiente na conversão desses polímeros em açúcares fermentescíveis (JONSSON et al., 2013). Além disso, o pré-tratamento também visa retirar os interferentes das biomassas, tais como a lignina, e favorecer o enriquecimento da porção de carboidratos; por isso é necessário escolher o melhor tipo de pré-tratamento para o objetivo proposto.

É desejável que o pré-tratamento aumente a disponibilidade dos monômeros de açúcares, não promova sua degradação, evite a formação de inibidores enzimáticos e seja de baixo custo (SUN et al., 2002). Para este fim, os principais pré-tratamentos empregados são os que utilizam ácido diluído e o alcalino. O pré-tratamento com ácido diluído é empregado para promover melhor hidrólise da celulose, desmontando as fibras e aumentando a porosidade com a degradação da porção hemicelulósica; entretanto gera inibidores de fermentação, como o hidroximetilfurfural e o furfural (ZEEMAN et al., 2009; KUMAR et al., 2009; Liu et al., 2009). Já o pré-tratamento alcalino objetiva solubilizar a lignina, promover o aumento da porosidade da fibra e manter intacta uma fração significativa, tanto de hemicelulose, quanto de celulose (SUN et al., 2002; CARDONA et al., 2010). A grande vantagem é o processo com menor número de inibidores, embora ainda haja os fenóis, e ácidos fortes, porém consome considerável quantidade de água para realizar lavagens da lignina e sais da biomassa (CHATURVEDI et al., 2013). O recomendável é comparar vários métodos de pré-tratamento para cada tipo de biomassa e o propósito final do processo, para determinar a metodologia mais adequada para pré-tratar a fonte de carbono (HARRISON et al., 2013).

2.2 Xilanases

As xilanases são classificadas como glicosil hidrolases, pertencentes à sub-classe de glicosilases, que hidrolisam compostos O- e S-glicosídicos, também denominadas de endo-1,4- β -xilanases (E.C 3.2.1.8) (VIEIRA, 2007). Estas enzimas, entre as demais de origem microbiana, apresentam grande relevância devido à sua variedade de aplicação na indústria, como de alimentos e biocombustíveis, principalmente pela sua capacidade de biodegradação da xilana (GOWDHAMAN et al., 2019). As xilanases catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 da cadeia principal da hemicelulose xilana e liberam como produto oligossacarídeos formados por

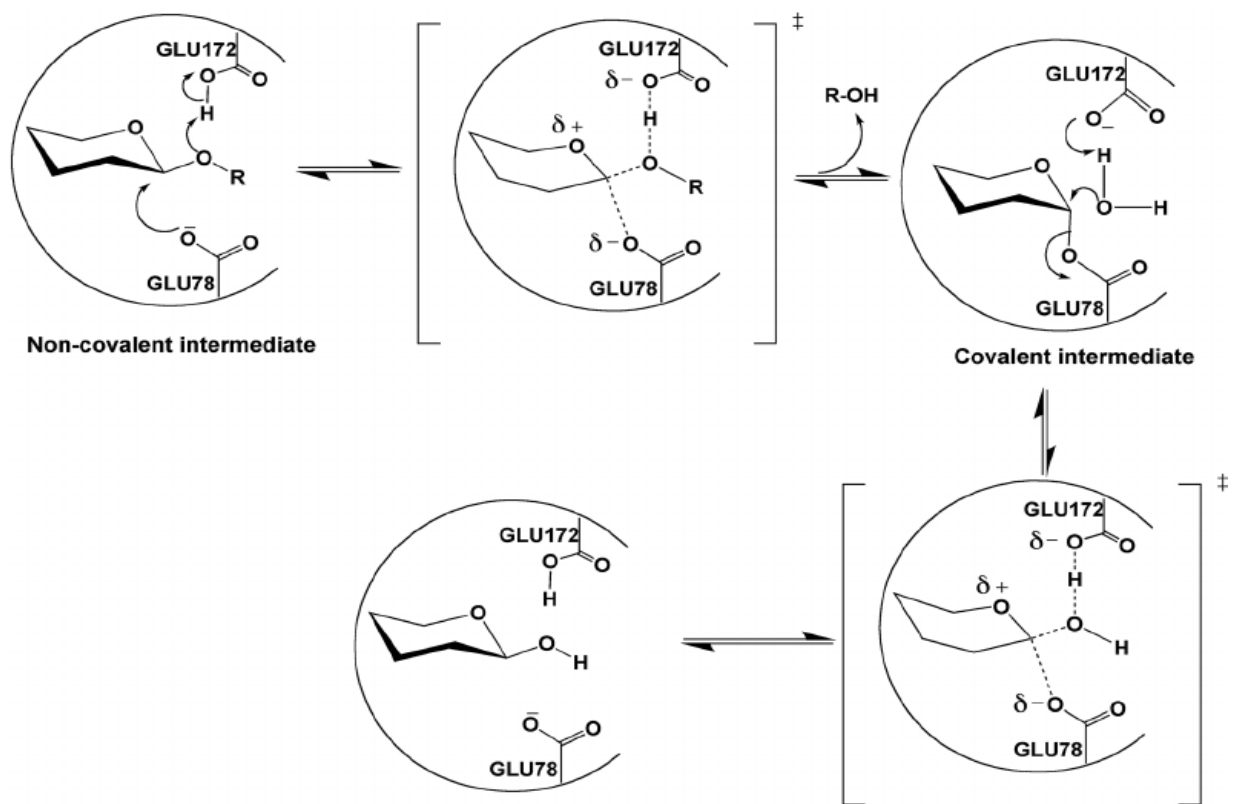
unidades de xilose (POLIZELLI et al., 2005; MOTTA et al., 2013). Os microrganismos fitopatogênicos produtores de xilanases geralmente secretam estas enzimas para degradar a hemicelulose da parede celular vegetal e liberar açúcares assimiláveis, que permitem ao patógeno se desenvolver e infectar a planta (KULKARNI et al.; 1999).

O banco de dados Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy - <http://www.cazy.org/>) categoriza as enzimas em famílias com base em seus domínios catalíticos e sequência de aminoácidos, nas quais as xilanases se agrupam, principalmente, em duas importantes famílias, GH10 e GH11. Além dessas, a família GH30 vem ganhando destaque por agrupar xilanases com especificidade para glucuronoxilanas, mas outras especificidades vêm sendo relatadas e diferenças catalíticas têm sido descritas quando obtidas de um procaríoto ou um eucarioto (PUCHART et al., 2021). As GH30 apresentam maior capacidade de hidrolisar xilanas substituídas, quando comparadas às GH10 e 11 (KARLSSON et al., 2018). As xilanases pertencentes à família GH10 são que apresentam estruturas mais complexas, com topologia de barril (β/α) em 8 repetições, possuem alguns representantes altamente glicosilados, menores massas moleculares, apresentam ponto isoelétrico (pI) em torno de 8-9,5 e englobam também as endo-1,3- β -xilanas (E.C 3.2.1.32) (BIELY et al., 1997, KULKARIN et al., 1999, SUBRAMANIYAN et al., 2002; DOOD et al., 2009). Além disso, as enzimas pertencentes a esta família têm especificidade mais ampla por diversos tipos de cadeias de xilana, como arabinoxilana; com isso seu emprego é importante na degradação completa, incluindo os substituintes, da porção hemicelulósica de biomassas (BIELY et al., 1997; MOTTA et al., 2013). Já a família GH11 é composta principalmente por enzimas de maior peso molecular, com estruturas que apresentam topologia de *jellyroll*, de menor tamanho, normalmente sem glicosilação, valores de pI em faixas mais baixas de pH, e maior especificidade por xilanas formadas exclusivamente por resíduos de D-xilose (BIELY et al., 1997, DOOD et al., 2009, VAN DEN BRINK et al. 2011; PAES et al, 2012, MOTTA et al., 2013). A família GH11, segundo GOWDHAMAN et al. (2019), possui enzimas que são descritas com maior estabilidade e atividade em diferentes valores de pH e temperatura, tornando-a mais adequada na escolha para aplicações biotecnológicas e processos industriais.

As xilanases de ambas as famílias realizam a catálise enzimática por um mesmo mecanismo de reação que ocorre por ataque nucleofílico e envolve dois resíduos de glutamato, 78 e 176, do sítio catalítico com retenção da configuração do carbono anomérico (BIELY et al., 1997, VIEIRA, 2007; MOTTA et al., 2013) (Figura 2). Em comparação, as xilanases de ambas as famílias são capazes de clivar ligações não-glicosídicas de grupos laterais de aril- β -glicosídeos na parte aglicona de xilobioses e xilotrioses; porém a família G11 apresenta fendas

maiores de ligação a carboidratos, o que favorece sua atuação em cadeias de xilooligossacarídeos com maior grau de ramificação (COLLINS et al., 2005, MOTTA et al., 2013). Já a família G10 é composta por xilanases mais ativas em cadeias menores de xilooligossacarídeos, já que possuem fendas menores e apresentam cerca de 4 a 5 sítios de ligação a carboidratos (BIELY et al., 1997, MOTTA et al., 2013). Devido às particularidades de cada família, as xilanases podem ser produzidas para serem empregadas em diversos bioprocessos e foram escolhidas com base nas suas características e facilidade de obtenção.

FIGURA 2 – Representação do mecanismo catalítico de clivagem das xilanases GH10 e GH11 com formação de ligações covalente transitórias.



Fonte: Adaptado de MHLONGO et al., 2015.

Alguns fungos filamentosos, principalmente os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, juntamente com certas bactérias e leveduras são conhecidos por serem grandes produtores de xilanases, e os fungos detêm a capacidade de secretarem essas enzimas hidrolíticas de interesse comercial para o meio extracelular (FITZPATRICK et al., 2010; VAN DEN BRINK, 2014). Estudos com o fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* mostram a sua capacidade de produção e secreção de xilanases, por fermentação em estado sólido, mais termoresistentes e com alta atividade enzimática (FALKOSKI et al., 2013, GOMES et al.; 2016). O extrato composto por xilanases e outras celulasas produzidas por este fungo

apresentou maior capacidade de hidrólise de biomassas lignocelulósicas para produção de açúcares monoméricos do que o coquetel comercial Multifect® CL (FALKOSKI et al., 2013), inclusive podendo ser empregado para suplementar outros coquetéis enzimáticos comerciais (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

Algumas ferramentas para produção de enzimas podem ser empregadas para atender às exigências e à demanda do mercado, tal como a tecnologia do DNA recombinante (POLIZELI et al., 2005). O uso da engenharia genética para melhoramento de enzimas é uma metodologia recorrente para obtenção de enzimas com maior eficiência. De acordo com Trevizano et al. (2012), uma das xilanase mutantes provenientes do fungo *Orpinomyces* sp. PC-2, a M2 do gene *xynA*, foi selecionada a partir de um estudo de evolução dirigida, após seu sequenciamento ela foi otimizada com a retirada de 27 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal. Por fim, ela foi clonada e expressa em *Escherichia coli* e verificou um ganho de atividade e estabilidade térmica em relação à sua versão selvagem. Essa variante de xilanase de menor tamanho, denominada SM2, mostrou grande eficiência na hidrólise de arabinoxilana, indicando seu potencial para aplicação em indústrias de panificação, já que várias farinhas são compostas por esse polímero (VENTORIM et al., 2018; PASSARINHO et al., 2018). Além de se obter enzimas melhoradas, também é desejável a produção em quantidades consideráveis para atender às necessidades de consumo da indústria.

O emprego de leveduras como hospedeiros de vetores de expressão heteróloga, principalmente *Pichia pastoris*, tornou-se comum para obter xilanases que apresentam um certo grau de glicosilação, já que seres eucariontes são capazes de fazerem modificações pós-traducionais (DALY et al., 2005; AHMED et al., 2009). Além disso, elas apresentam as vantagens de crescerem em densidades elevadas de células por inóculo e secretarem razoáveis quantidades de proteínas recombinantes no meio extracelular; com isso, em certos casos, dispensa-se processos de purificação do extrato, o que reduz custos com o processo (TOLNER et al., 2006; MELLITZER et al., 2012). Maitan-Alfenas et al. (2016) demonstraram que dois genes de xilanases de *Aspergillus nidulans*, XlnB (GH10) e XlnC (GH11), foram clonados em *P. pastoris* e as xilanases apresentaram valores de pH e temperaturas ótimos de 7,5 e 60 °C e 6,0 e 50 °C, respectivamente, e com atividade e resistência em uma faixa ampla de pH e temperatura. Além disso, estas proteínas recombinantes mostraram potencial para suplementação dos coquetéis enzimáticos Multifect® CL e Accellerrase® 1500, uma vez que incrementaram consideravelmente a concentração de açúcares redutores após a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalinamente (MAITAN-ALFENAS et al., 2016).

A aplicação de xilanases em diversos setores para fins industriais é recorrente e aumentou notoriamente na última década (KUMMAR et al, 2017). Xilanases, preferencialmente aquelas com maior estabilidade e eficiência catalítica, são empregadas em diversos processos biotecnológicos (QIU, et al., 2010; TAIBI et. al, 2012), tais como: clarificação de sucos e sacarificação do amido em processos de panificação pela indústria de alimentos (LI et al., 2000; SHI et al., 2013); preparação de ração animal pela indústria agropecuária; branqueamento da polpa de celulose pela indústria de papel e têxtil (SUBRAMANIYAN et al, 2002); bioconversão de matéria lignocelulósica em açúcares fermentescíveis de interesse tanto do setor de biocombustíveis, quanto do setor de alimentos (BUTT et al, 2008; HUANG et al.; 2014); e, principalmente, para produção de xilooligossacarídeos (XOS) com diferentes graus de ramificação para indústria alimentícia, de ração animal, química e farmacêutica, devido ao seu potencial prebiótico (FITZPATRICK et al., 2010; LANFOND et al., 2012; BUCKERDGE et al., 2012). Por fim, sabe-se que uma única xilanase não atende a todos os requisitos necessários nos diversos processos industriais e, por isso, constantes estudos de bioprospecção e obtenção de enzimas com maior eficiência catalítica são necessários (GOWDHAMAN et al., 2019).

2.3 Xilooligossacarídeos

Xilooligossacarídeos (XOS) são produtos provenientes da hidrólise da xilana presente nas biomassas lignocelulósicas por ação de xilanases (WANG et al, 2014), mas também podem ser adquiridos de fontes naturais, como frutas, vegetais, brotos de bambus, leites e mel. (VASQUEZ et al., 2000; MOURE et al., 2006; MANO et al.; 2018). Normalmente, estes oligossacarídeos são estruturalmente formados por resíduos de D-xilose, que podem variar em grau de polimerização com base no número de monômeros que os compõem. Assim, começando pelo menor dos XOS, tem-se a xilobiose, formada por duas unidades de xilose, seguido por xilotriose (3 unidades), xilotetraose (4 unidades), xilopentose (5 unidades), xiloexose (6 unidades) e assim por diante, até 20 unidades de monômeros de D-xilose, o qual ainda pode ser considerado como um dos XOS (MÄKELÄINEN et al., 2010, MONIZ et al., 2014; SAMANTA et al., 2015). Com isso, as unidades de xilose permanecem unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) O-glicosídicas, o que confere a estes açúcares a característica de não-digestibilidade, devido à falta de enzimas capazes de clivar esse tipo de ligação no trato intestinal de animais e humanos (MUSSATO et al, 2007; QIANG et al. 2009; PATEL et al., 2012, NERI-NUMA et al., 2016).

Além disso, os XOS apresentam propriedades físico-químicas que garantem resistência a diversas condições, como variações de temperatura até 100 °C e mudanças amplas de pH entre

2,5 a 8,0, sem que estes açúcares sofram alterações em sua estrutura, características ou função (MANO et al., 2018). Estas propriedades favorecem sua passagem quase intacta pelo trato intestinal, exceto pela ação de microrganismos probióticos, que utilizam destes compostos como fonte de carbono, para se desenvolverem e assim manterem o equilíbrio da microbiota do trato gastrointestinal (OLIVEIRA, 2014).

Os oligossacarídeos não-digeríveis agem como prebióticos, pois estimulam o crescimento seletivo da microbiota intestinal, principalmente bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que promovem a fermentação destes açúcares para liberação de ácidos graxos de cadeia curta, tais como acetato, butirato e propionato, que melhoram a saúde do hospedeiro e inibem a proliferação de patógenos (GIBSON et al., 1995; HUTKINS et al., 2016, GIBSON et al., 2017). Os ácidos graxos de cadeia curta diminuem o pH do lúmen intestinal e influenciam, diretamente, o crescimento de enteropatógenos sensíveis a ambientes ácidos, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp e outras; e, indiretamente, evitam a produção de citocinas inflamatórias (CHEN et al., 2012; KRUMBECK et al., 2016; WILSON et al., 2017). Outros estudos sugerem que os XOS atuam como prebióticos emergentes e associam esse efeito com a proteção contra o desenvolvimento de câncer do colón, prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção contra distúrbios metabólicos, imunomodulação, ação antioxidante e moderada atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* (CHRISTAKOPOULOS et al., 2003; Di BARTOLOMEO et al., 2013; LAM et al., 2013; SLAVIN, 2013; JAIN et al., 2015).

Para se obter XOS a partir de xilana, três métodos são normalmente utilizados: a hidrólise química, a auto-hidrólise e hidrólise enzimática (JAIN et al., 2015; Samanta et al., 2015). A hidrólise química pode ser realizada tanto por clivagem ácida, quanto por extração alcalina, e, apesar de levar à obtenção de um maior rendimento, normalmente ocorre com a produção de monômeros de xilose e geração de co-produtos indesejados, como o hidroximetilfurfural e furfural (XUE et al., 2016). No processo de auto-hidrólise, os XOS são produzidos sob pressão e temperaturas elevadas, em contato com a água, o que exige maior controle do meio reacional e maiores despesas devido ao uso de água; além disso, este processo também gera produtos indesejados como lignina insolúvel e grande quantidade de monossacarídeos diversos (AKPINAR et al., 2010; HO et al., 2014; KUMAR et al., 2015, XUE et al., 2016). Por fim, a hidrólise enzimática consiste na obtenção de XOS por meio do emprego de enzimas hemicelulolíticas, principalmente xilanases, e destaca-se pelos benefícios de ser realizada em condições brandas de reações, ter alta especificidade e bons rendimentos de produtos (JAIN et al., 2015, KUMAR et al., 2015). A grande desvantagem deste processo

consiste na necessidade de um pré-processamento da biomassa, geralmente alcalino, de forma a permitir uma maior e melhor atuação das enzimas sobre o material vegetal (AZEELÉ et al., 2016). Contudo, estudos para otimizar esse processo ainda são necessários, com o intuito de torná-lo mais eficiente, simples, sustentável e de baixo custo, permitindo sua produção e aplicação em larga escala e de forma atrativa (MORENO et al., 2017).

2.4 Aplicação biotecnológica de xilooligossacarídeos (XOS)

Devido à sua propriedade de resistência à acidez e às altas temperaturas, os XOS se tornam mais vantajosos quando comparados com inulina e frutooligossacarídeos, açúcares comumente usados como ingredientes prebióticos pela indústria de alimentos. Com esta estabilidade, os XOS podem ser aplicados em diversos processos do setor alimentício, como pasteurização, autoclave e esterilização em baixos valores de pH (VASQUEZ et al., 2000; COURTIN et al., 2009; WANG et al., 2009). Além disso, com seus potenciais efeitos benéficos para a saúde, os XOS têm sido empregados como prebióticos não somente no setor de alimentos e bebidas, mas também no setor farmacêutico e de cosméticos, na suplementação dietética e na produção de ração animal (KOTHARI et al., 2014). Com isso, a aplicabilidade do XOS é diversa e abre perspectivas para diversas áreas.

Considerando os potenciais dos XOS, o mercado global de prebióticos foi estimado em U\$ 4,07 bilhões em 2017, com perspectivas para um crescimento expansivo, podendo captar cerca de U\$ 10,55 bilhões até 2025, correspondente a 12,7 % do crescimento do setor (RESEARCH AND MARKETS, 2017). Além disso, os XOS podem ser obtidos a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, sendo esta uma via de produção de baixo custo e sustentável, simultânea à obtenção de um produto de alto valor agregado.

Alguns estudos com endo- e exo-xilanases recombinantes e nativas de fungos e bactérias mostraram diferenças nas concentrações e no perfil de XOS obtidos a partir da hidrólise de diferentes biomassas (MANO et al., 2018; JAIN et al., 2015). Segundo Mano et al. (2018), XOS de baixo grau de polimerização, X2, X3 e X4, são os almejados pela indústria devido às suas propriedades físico-químicas e, portanto, a crescente demanda por estratégias mais eficientes de produção destes prebióticos requer novos estudos para obtenção de sistemas de enzimas xilanolíticas, condições de reações, características de biomassas e pré-tratamentos que otimizem principalmente a produção de XOS de baixo grau de polimerização, com boa relação custo-benefício e compatível industrialmente.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o perfil de produção de xilooligosacarídeos (XOS) a partir de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas via hidrólise enzimática por três enzimas fúngicas recombinantes distintas e um coquetel comercial, e estudar o potencial efeito prebiótico destes açúcares produzidos.

3.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Determinar a composição química das biomassas utilizadas na sacarificação enzimática para comparação da composição da biomassa *versus* perfil de XOS liberados;
- Produzir duas xilanases de *A. nidulans* expressas em *P. pastoris* e uma xilanase de *Orpinomyces* sp PC-2 expressa em *E. coli* BL21;
- Comparar o uso das xilanases recombinantes com o coquetel comercial Multifect® XL no processo de hidrólise das biomassas pré-tratadas sabugo de milho, farelo de arroz e casca de soja;
- Determinar o perfil de produção de XOS pela xilanase comercial Multifect® XL e pelas xilanases expressas em *P. pastoris* e *E. coli* BL21 a partir do experimento de sacarificação enzimática das biomassas;
- Verificar se há uma relação entre o perfil de XOS produzidos pelas enzimas empregadas nas hidrólises;
- Avaliar o potencial prebiótico *in vitro* dos XOS produzidos pelas hidrólises enzimáticas a partir do cultivo de bactérias probióticas e da análise do perfil de ácidos graxos de cadeia curta produzidos por estas bactérias;
- Verificar o crescimento microbiano das bactérias patogênicas *E. coli* e *S. entérica* na presença de XOS como fonte de carbono.

4 METODOLOGIA

4.1 Biomassas

As biomassas utilizadas no trabalho - casca de soja, farelo de arroz e sabugo de milho - foram adquiridas no comércio ou agricultura local do município de Viçosa - MG. Elas foram trituradas em moinho de facas e as partículas peneiradas em malha de 20 mesh para as análises de composição química e hidrólise enzimática. As biomassas que não passaram por processamento químico após o moinho foram denominadas de biomassas *in natura*, enquanto as demais biomassas foram denominadas de biomassas pré-tratadas.

4.2 Caracterização química das biomassas

4.2.1 Preparo das amostras

As biomassas com granulometria inferior a 20 mesh foram secas a 45 °C por 12 horas, para garantir a padronização dos tratamentos subsequentes.

4.2.2 Teor de umidade

O teor de umidade da biomassa previamente seca foi mensurado utilizando um Analisador de Umidade Ohaus MB25 (Cheeselab, São Paulo). Foram pesados 3 g de cada biomassa em um prato de amostra para analisador de umidade e este foi acomodado no forno do analisador para secagem por infravermelho a 105 °C. A umidade foi determinada na função automática, quando não houve variação superior a 0,5 % do peso durante 60 segundos. O teor de sólidos totais, ou seja, a quantidade de matéria remanescente após o aquecimento no forno do analisador, foi usado para corrigir a massa de cada biomassa antes dos procedimentos analíticos de cada etapa. O teor de umidade foi mensurado para as biomassas *in natura* e pré-tratadas.

4.2.3 Determinação de extrativos

A remoção de extrativos das biomassas *in natura* e pré-tratadas foi realizada por extração exaustiva com água quente e etanol, conforme NREL (2008). Para isso, foi pesado 1 g de cada biomassa seca em cartuchos de papel filtro 11 x 5 cm, em triplicata, e estes foram transferidos para o extrator de Soxhlet. Os valores exatos das massas de biomassas e dos cartuchos foram registrados.

A extração ocorreu por 22 h consecutivas, das quais as primeiras 6 h de extração foram feitas com 200 mL de água quente e as outras 16 horas usando 200 mL de álcool etílico 96 °GL como solvente, ambos sobre sistema de refluxo. Após o término da extração, os cartuchos foram secos a 45 °C por 24 h ou até peso constante.

Os extrativos foram determinados pela diferença de peso da biomassa antes e após a extração, empregando a equação 1. Os cartuchos foram resfriados dentro do dessecador antes da pesagem em balança analítica devidamente calibrada.

$$\% \text{ extrativos} = \frac{(P1 - P2) \times \% \text{ sólidos totais}}{100} \quad \text{eq. 1}$$

Em que:

P1 = peso do cartucho + amostra inicial

P2 = peso do cartucho + amostra final

% sólidos totais = obtido no analisador de umidade

As biomassas livres de extrativos foram empregadas na determinação de carboidratos totais, lignina solúvel e insolúvel e proteínas.

4.2.4 Determinação de carboidratos totais

A determinação de carboidratos foi efetuada conforme NREL (2012), a partir da hidrólise ácida dos principais polissacarídeos componentes da biomassa em seus monômeros, geralmente glicose, xilose, arabinose, galactose e manose. A primeira hidrólise ácida foi realizada com 3 mL de H₂SO₄ 72 % em um tubo de ensaio contendo 0,3 g de biomassa livre de extrativos em banho a 30 °C, por 1 hora. O meio reacional foi homogeneizado a cada 10 min por bastão de vidro. O processo foi realizado para as biomassas *in natura* e pré-tratadas.

Em seguida, o hidrolisado foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL e diluído com água deionizada para uma concentração de 4 % de H₂SO₄. Os Erlenmeyer foram vedados e autoclavados por 1 h a 121 °C.

Após resfriadas, as soluções foram filtradas a vácuo em cadinho de placa sinterizada previamente pesado. Um volume de 20 mL do filtrado foi vertido em um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água deionizada. Uma alíquota dessa solução foi separada para determinação dos carboidratos totais. Os sólidos retidos no cadinho de placa sinterizada e a solução do balão foram empregados para quantificação de lignina insolúvel e solúvel.

Os monômeros de açúcares foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, as amostras foram diluídas 10 vezes em água deionizada e passadas em filtros de seringa 0,45 µm para serem aplicadas no cromatógrafo. A cromatografia líquida de alta performance foi executada no cromatógrafo modelo CBM-20A/20Alite (Shimadzu) com detector de índice de refração RID - 20A (Shimadzu).

A quantificação de açúcares monoméricos após hidrólise ácida utilizou a coluna Aminex7 HPX-87H (BioRad) com fluxo 0,6 mL/min, temperatura de forno de 45 °C e eluição isocrática com solução de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, conforme descrito por Ferraz et al.,

(2000), para separação e detecção por índice de refração. A curva analítica foi construída com padrões de glicose, xilose, arabinose, manose, galactose e ácido acético em concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 10,0 g/L. Os valores de glicose e xilose foram corrigidos e convertidos em teor de celulose e hemicelulose pelos fatores 0,9 e 0,88, respectivamente.

4.2.5 Determinação de lignina solúvel e insolúvel

A lignina solúvel em ácido foi determinada por espectrofotometria e convertida em porcentagem pela equação 2, conforme NREL (2008). A solução diluída em balão volumétrico de 50 mL foi lida no espectrofotômetro em cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm) nos comprimentos de 215 e 280 nm. Diluições para obter valores de absorvância entre 0,7 e 1,0 foram realizadas quando necessárias.

$$\text{Lignina solúvel (\%)} = \frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{100} \quad \text{eq. 2}$$

Em que:

A_{280} = valores de absorvância da solução a 280 nm

A_{215} = valores de absorvância da solução a 215 nm

Os sólidos retidos no cadinho de placa sinterizada foram lavados com 30 mL de água quente e secos a 105 °C por 12 h antes de aferir o peso. A lignina insolúvel ou lignina de Klason, ou seja, o resíduo retido no cadinho insolúvel em ácido após as duas etapas de hidrólise ácida, foi determinada pela equação 3.

$$\text{Lignina insólúvel (\%)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

Em que:

m_1 = massa, em gramas, de lignina Klason insolúvel seca;

m_2 = massa, em gramas, de biomassa inicial previamente seca em estufa 105 °C.

4.2.6 Teor de cinzas

Segundo NREL (2008), para a determinação do teor de cinzas, devem ser pesados 0,1 g de biomassas livres de extrativos secadas a 105 °C provenientes da hidrólise diretamente no cadinho. O cadinho, previamente calcinado por 5 h, foi acondicionado na mufla e mantido por 2 h a 300 °C, em seguida a temperatura foi ajustada para 575 °C por 4 horas. Por fim, o cadinho foi resfriado no dessecador e o teor de cinzas calculado pela equação 4. O procedimento foi realizado em triplicata.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{(RC_{final} - RC) \times 100}{m_A} \quad \text{eq. 4}$$

Em que:

RC_{final} = massa, em gramas, do cadinho calcinado na mufla com a amostra.

RC = massa, em gramas, do cadinho calcinado na mufla sem a amostra.

m_A = massa da amostra seca livre de extrativos.

4.2.7 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl que quantifica a concentração de nitrogênio total da biomassa. O método, segundo a NREL (2008), considera que o 16 % do nitrogênio é proveniente de proteína e adota como fator de conversão o valor 6,25. Caso a biomassa de trabalho tivesse composição de aminoácidos conhecida, esse fator de conversão seria corrigido para o especificado em literatura.

A etapa de digestão foi realizada com 0,3 g de biomassas livres de extrativos em papel filtro e acondicionados dentro do tubo de Kjeldahl contendo 10 mL de solução catalisadora. Após 2,5 h de digestão a 340 °C, os tubos foram resfriados e adicionados de 1 mL de peróxido de hidrogênio seguido por aquecimento a 340 °C por 40 min. O volume da reação foi vertido para tubo de ensaio ao qual foram adicionados 10 mL de água destilada em banho de gelo.

O tubo de Kjeldahl foi acoplado ao digestor modelo TE-036E (Tecnal) juntamente com um Erlenmeyer contendo 25 ml de solução indicadora e ácido bórico 4 % posicionado no bico do condensador. Em seguida, foi adicionada lentamente a solução hidróxido de sódio 50 % no tubo, até a solução atingir um tom escuro. A destilação foi interrompida após a mudança de coloração para verde e o volume atingir a marca de 100 a 125 mL na vidraria, com o intuito de garantir uma completa destilação da amônia.

A titulação foi realizada com solução de ácido clorídrico 0,5 N até o ponto de viragem do indicador com mudança de coloração da solução. A porcentagem de proteínas foi determinada pela equação 5.

$$\text{Proteínas totais (\%)} = \frac{V \times f \times N \times 0,0014 \times 6,25}{m_A} \times 100 \quad \text{eq. 5}$$

Em que:

V = volume, em mL, gasto de HCl 0,05 N

f = fator de correção do HCl 0,05 N

N = normalidade da solução

m_A = massa, em gramas, da amostra.

4.3 Expressão de xilanases recombinantes

4.3.1 Cultivo e manutenção de *Pichia pastoris*

Os clones de *P. pastoris* contendo os constructos com os genes de xilanases de *Aspergillus nidulans*, AN1818.2 e AN3613.2, foram crescidos em meio GYP (peptona 1,0 %; extrato de levedura 0,5 %; glicose 2,0 % e ágar 1,5 %) em BOD a 28 °C por 48 h (Oliveira,

2015). Um estoque foi preparado a partir destas colônias em glicerol 20 % para ser armazenado a -80 °C.

Após o crescimento, as colônias foram pré-inoculadas em 250 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1,0 %; peptona 2,0 %; YNB 1,34 %; glicerol 1,0 %; biotina 4×10^{-5} %; tampão fosfato de sódio pH 6,0 100 mM) e acondicionadas a 28 °C sob agitação de 250 rpm, por cerca de 16 h. Em seguida, foi aferida a medida de densidade ótica (D.O.) a 600 nm e calculado o volume necessário para obtenção de uma D.O. de 1,0, para um volume final de 250 mL de meio indutor da expressão (BMGY acrescido de metanol 0,5 % (v/v)). O volume de pré-inoculo calculado foi diluído e centrifugado a 2500 g por 5 minutos a 20 °C. O pellet foi ressuscitado e vertido em Erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio indutor; em seguida, eles foram colocados sob agitação de 250 rpm a 28 °C, por 72 h. A cada 24 h foram adicionados 1,25 mL de metanol. Decorrido o tempo, o meio foi centrifugado a 2500 g por 5 min a 20 °C e o sobrenadante recolhido como sendo o extrato enzimático foi acondicionado em alíquotas a -20 °C.

4.3.1 Cultivo e manutenção de *Escherichia coli*

O clone de *E. coli* BL21 contendo o gene otimizado de xilanase de *Orpinomyces* sp. PC-2 foi cultivado em meio LB ágar (triptona 1,0 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 % e ágar 1,5 %) contendo 0,1 mg/mL de canamicina por 24 h a 37 °C (VENTORIM, 2017). Um estoque foi preparado a partir destas colônias em glicerol 20 % para ser armazenado a -80 °C.

Em seguida, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB (triptona 1,0 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 %) com 0,1 mg/mL de canamicina e acondicionada a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 14 h. Após esse período, 1 mL do pré-inoculo foi adicionado em 40 mL de LB com canamicina em Erlenmeyer de 125 mL e mantido sob agitação de 250 rpm por 14 h, a 37 °C. Na sequência, 40 mL deste meio foram adicionados em 1 L de meio SOB (triptona 2,0 %; extrato de levedura 0,5 % e 0,05 % de NaCl), acrescentado de 0,1 mg/mL de canamicina, 10 mL de KCl 0,25 M, 5 mL de MgSO₄ 2 M e 100 µL de NaOH 5 M, mantido sob agitação de 250 rpm a 37 °C até a obtenção da D.O. de 1,0 em 660 nm.

Para a indução da expressão, foi usado soro de leite, contendo 5 mM de açúcares redutores aferidos pelo método do DNS (Miller, 1959), como substituinte do isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG). O crescimento continuou sob agitação de 250 rpm por 4 h a 37 °C. Após o tempo decorrido, o meio foi resfriado em banho de gelo por 30 min e centrifugado a 4000 rpm por 30 min a 4 °C. O pellet foi recuperado e ressuscitado com 25 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5. Por último, as células foram levadas ao sonicador, configurado com 20 de amplitude, 10 s de tempo de pulso e 10 s de tempo de parada, por 5 minutos a 13 °C. A

solução foi centrifugada a 4000 rpm, a 4 °C, por 20 min e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C como sendo o extrato enzimático.

4.3.2 Dosagem de proteínas totais e confirmação da expressão das xilanases

As proteínas totais dos extratos obtidos foram dosadas conforme descrito pelo método de Bradford (1976) e a presença da enzima foi confirmada pela medida de atividade por meio de uma detecção colorimétrica, o método do DNS.

4.4 Medida da atividade de xilanase pelo método do DNS

A atividade de xilanase foi realizada de acordo com o método descrito por Miller (1959), em tubos de ensaio contendo 230 µl de xilana beechwood 1 % (p/v) diluída em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 20 µL da enzima diluída ou não. Os tubos foram homogeneizados e incubados em banho a 50 °C por 15 min. A reação foi interrompida com 250 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os tubos foram colocados em banho fervente por 5 min. Ao final, foram adicionados 500 µL de água destilada e aliqotados 200 µL da mistura reacional para microplaca de 96 poços de fundo chato. A leitura de absorbância foi realizada em 540 nm no espectrômetro Multiskan Go (Thermo Scientific).

O ensaio de atividade enzimática foi realizado em triplicata mais um controle branco, no qual o DNS foi adicionado no início da reação enzimática. A atividade enzimática foi calculada pela diferença de concentração de açúcar redutor final e inicial multiplicado pelo volume da reação e normalizado pelo tempo de reação. Uma unidade enzimática (U) de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

A concentração de açúcar redutor foi obtida pela equação da curva padrão analítica que foi construída com concentrações crescentes de 0 a 1 g/L de solução padrão de xilose.

4.5 Pré-tratamento alcalino das biomassas

O pré-tratamento alcalino das biomassas sabugo de milho, casca de soja, farelo de arroz e resíduos do café foi realizado com 10 % de sólidos em solução de NaOH 1 %. Os materiais foram autoclavados por 1 hora a 120 °C e, em seguida, as biomassas foram lavadas com 4 L de água destilada até sua clarificação e armazenadas em -20 °C. A massa exata de sólidos antes e após o pré-tratamento foi aferida e registrada para o cálculo de recuperação do método.

4.6 Hidrólise enzimática

A eficiência das enzimas recombinantes e do coquetel comercial Multifect® XL na produção de xilooligossacarídeos (XOS) foi verificada pela sacarificação das biomassas pré-tratadas sabugo de milho, farelo de arroz e casca de soja. A hidrólise enzimática foi realizada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e foram adicionados 10 mM de ázida de sódio e 40 µg/mL de tetraciclina para evitar contaminação microbiana. Os ensaios foram feitos com 10

% de sólidos e 20 U de xilanase por grama de biomassa pré-tratada, em Erlenmeyers de 25 mL incubados a 50 °C, sob agitação de 150 rpm, em incubadora *shaker* refrigerada M380 (Marconi). A reação foi monitorada nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h, em triplicata, e um controle sem enzimas independente para cada ponto foi realizado para cada uma das biomassas. Após cada tempo pré-determinado, a reação foi interrompida em banho de água fervente por 5 min e os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min a 8 °C. O sobrenadante foi estocado a -20 °C para quantificação de xilooligossacarídeos (XOS).

4.8 Quantificação de xilooligossacarídeos (XOS) por cromatografia líquida de alta performance (CLAE)

As amostras da hidrólise enzimática foram diluídas 5 vezes em água deionizada e passadas em filtros de seringa 0,45 µm para serem aplicadas no cromatógrafo. A cromatografia líquida de alta performance foi executada no cromatógrafo modelo CBM-20A/20Alite (Shimadzu) com detector de índice de refração RID - 20A (Shimadzu).

A separação dos XOS foi realizada pela coluna Aminex 7 HPX-87P (BioRad) a 80 °C com fluxo 0,6 mL/min e eluição com água deionizada e detectados por índice de refração. A curva analítica foi construída com padrões de xilobiose, xilotriose, xilotetrose, xilopentose e xiloexose (Megazyme) em concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0 g/L.

4.9 Teste *in vitro* do efeito prebiótico

4.9.1 Microrganismos

Uma cultura pura de bactéria probiótica, gentilmente cedida pelo Laboratório de Inovação no Processamento de Alimentos (LIPA - Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV), de *Lactobacillus acidophilus* e bactérias patogênicas *E. coli* BL21 e *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFV), foram selecionadas para avaliar o efeito prebiótico dos XOS.

Esses microrganismos foram crescidos em meios específicos, descritos adiante, substituindo a fonte de carbono pelos XOS produzidos na etapa de hidrólise enzimática. As bactérias patogênicas estavam armazenadas em -80 °C e foram ativados em meio líquido, enquanto o probiótico foi obtido de capsulas.

4.9.2 Cultivo dos microrganismos probióticos

L. acidophilus foi ativado em caldo MRS comercial (KASVI - peptona especial 10,0 g/L, extrato de carne 10,0 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, glicose 20,0 g/L, fosfato de hidrogênio dipotássio, 2,0 g/L, acetato de sódio 5,0 g/L, citrato de triamônico 2,0 g/L, sulfato de magnésio 0,2 g/L) suplementado com glicose 20 g/L (DE MAN, ROGOSA, SHARP, 1960)

por 24 h a 37 °C; em seguida, um inóculo com 10 mL foi preparado para os testes *in vitro*. A partir de 10 mL da cultura ativa, foram realizadas diluições seriadas em solução salina peptonada (0,85 % de NaCl e 1 % de peptona) até obtenção de 0,1 de D.O. a 600 nm. Considerando o microrganismo probiótico em questão, esse valor de absorvância equivale a uma população de 10⁵ UFC/mL o que foi constatado por plaqueamento em ágar MRS pelo método de microgotas (KRIEG & HOLT, 1984).

A curva de crescimento microbiana foi construída em microplaca de fundo chato com 96 poços por meio de leituras a 600 nm a cada 1 h, por 23 h, a 37 °C, sob agitação antes de cada leitura. Para avaliação do potencial prebiótico dos XOS, o meio MRS foi solubilizado em solução de XOS obtida a partir da hidrólise por 6 h do farelo de arroz pela xilanase SM2 e pelo coquetel comercial Multifect® XL, e a solução obtida pela hidrólise do sabugo de milho pela xilanase SM2. Esses meios foram esterilizados em filtros de membrana de 0,22 µm. Como controle positivo foi empregado o meio MRS acrescido de glicose 20 g/L, enquanto o controle negativo consistiu no meio MRS sem adição de carboidrato. O branco de cada meio foi preparado sem a presença do microrganismo probiótico *L. acidophilus*. O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

4.9.3 Cultivo dos microrganismos patogênicos

E. coli foi cultivada em meio EMB líquido (glicose 10 g/L, peptona 10 g/L, fosfato dipotássio 5 g/L, lactose 5 g/L e sacarose 5 g/L – modificado) (HOLT-HARRIS, TEAGUE, 1916) por 16 h a 37 °C. Já o cultivo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 foi realizado em meio BG líquido (extrato de levedura 3 g/L, peptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, lactose 10 g/L e sacarose 10 g/L) (KAUFFMANN, 1935) também a 37 °C por 16 h. As suspensões de célula dos patógenos também foram padronizadas em D.O. de 600 nm, com 0,1 de absorvância, e o número de células viáveis foram contabilizadas para garantir o inóculo inicial de 10⁵ UFC/mL.

Para verificar o efeito dos XOS no crescimento dos patógenos, os carboidratos dos meios EMB e BG foram trocados pelos XOS produzidos a partir da hidrólise enzimática do farelo de arroz pela xilanase SM2 e pelo coquetel Multifect® XL e os XOS obtidos da hidrólise do sabugo de milho pela xilanase SM2. Os meios contendo os XOS foram esterilizados em filtros de membrana de 0,22 µm. O controle positivo foi realizado com os meios contendo glicose 20 g/L, o controle negativo foi feito com os meios sem carboidratos e o branco consistiu em cada meio sem a presença do microrganismo patogênico. Assim, a curva de crescimento microbiana foi construída em microplacas de fundo chato com 96 poços, por meio de leituras a

600 nm, a cada 1 h por 23 h, a 37 °C, sob agitação antes de cada leitura. O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

4.9.5 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta

Alíquotas do tempo de 23 h dos testes *in vitro* com o microrganismo *L. acidophilus* foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante filtrado com filtros de seringa, porosidade de 0,22 µm, para remoção de células suspensas. Essas amostras foram usadas na quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta por CLAE. Devido ao pequeno volume proveniente de cada poço da placa, as duplicatas técnicas e biológicas foram homogeneizadas e injetadas juntas. Essas amostras foram aplicadas no cromatógrafo modelo CBM-20A/20Alite (Shimadzu), com detector de índice de refração RID - 20A (Shimadzu). A corrida cromatográfica ocorreu com injeção de 20 µL da amostra na coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300,0 x 7,8 mm), usando 0,6 mL.min⁻¹ de ácido sulfúrico 5 mM no modo isocrático por 40 min a 40 °C (MESQUITA et al, 2013).

A curva analítica foi construída com padrões de ácidos acético, propiônico e butírico em uma faixa de concentrações de 0,1 a 8 g/L. Já os ácidos fórmico, isobutírico e isovalérico foram avaliados apenas qualitativamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química das biomassas

O conhecimento da composição da biomassa possibilita destiná-la para um uso de maior potencial e aproveitamento dos seus componentes (VASSILEV et al, 2010). Com isso, a Tabela 1 apresenta os dados referentes à análise química dos resíduos lignocelulósicos casca de soja, sabugo de milho, farelo de arroz e resíduos do café, que foram escolhidos para serem avaliados quanto à sua potencialidade como fonte de carbono alternativa para a produção de XOS a partir de xilanases fúngicas.

TABELA 1 – Composição das biomassas *in natura* em base seca livre de extraíveis.

%	<i>Biomassas in natura</i>							
	Casca de soja		Farelo de arroz		Sabugo de milho		Resíduos do café	
Lignina total	20,16	(±0,09)	38,69	(±1,37)	28,53	(±0,06)	26,02	(±0,23)
<i>Lignina solúvel</i>	1,47	(±0,07)	0,26	(±0,26)	2,56	(±0,02)	0,85	(±0,02)
<i>Lignina insolúvel</i>	18,73	(±0,17)	38,47	(±1,47)	25,98	(±0,12)	25,17	(±0,25)
Carboidratos totais	57,42	nd	41,09	nd	52,14	nd	47,81	nd
<i>Celulose</i>	36,14	(±0,34)	26,52	(±1,23)	30,77	(±0,30)	19,95	(±0,96)
<i>Hemicelulose</i>	21,28	(±0,16)	14,57	(±1,14)	21,37	(±0,06)	27,85	(±0,81)
Lipídios	0,52	(±0,25)	0,67	(±0,03)	0,30	(±0,15)	0,74	(±0,13)
Proteínas	16,50	(±0,15)	4,89	(±0,12)	5,47	(±0,54)	16,64	(±0,76)
Cinzas totais	4,28	(±0,01)	15,08	(±0,28)	2,36	(±0,04)	7,48	(±0,24)
<i>Cinzas de Klasson</i>	0,00	(±0,00)	12,75	(±0,13)	0,27	(±0,13)	0,05	(±0,02)
Balanço de massa	98,37		99,75		88,81		98,68	

O desvio padrão está representado entre parênteses; nd = não determinando

É importante ressaltar que a caracterização foi determinada sobre a base seca, afinal a massa de água extra, proveniente da umidade, pode alterar os resultados das análises químicas, principalmente pela diluição dos reagentes e dos solventes empregados. Além disso, uma biomassa com alto teor de umidade está mais suscetível à deterioração por microrganismos (SLUITER et al., 2008). Portanto, todas as biomassas analisadas apresentaram teor de umidade inferior a 7 % e a massa inicial em cada etapa analítica foi corrigida para se ter 100 % de sólidos totais.

Também foi realizado um processo de remoção de possíveis interferentes ou contaminantes, tais como agrotóxicos, resinas, pigmentos, entre outros componentes derivados do resíduo vegetal (resquícios de galhos, folhas, raízes e solos, por exemplo), denominados de extraíveis ou extrativos (SILVÉRIO et al., 2006; SLUITER et al., 2008). Então, os valores

apresentados na tabela acima foram padronizados para biomassas livres de extraíveis. O maior valor de extraíveis entre as biomassas *in natura* pertencem aos resíduos de café, com 26,01 ($\pm 0,40$) %, seguido pela casca de soja, 14,08 ($\pm 0,10$) %, sabugo de milho, 9,04 ($\pm 0,55$) %, e farelo de arroz, 6,48 ($\pm 1,05$) %.

Considerando os objetivos do trabalho, nota-se que os resíduos do café constituem a biomassa mais rica em teor de hemicelulose, seguida pelo sabugo de milho *in natura*. Afinal, uma das vias de produção de XOS é a clivagem da xilana, o principal constituinte da hemicelulose, por meio da ação de endoxilanasas. Portanto, espera-se que os rendimentos de produção de XOS sejam altos quanto maior for a disponibilidade deste polímero de xilose no substrato de carbono. Logo, avaliando apenas os valores de hemicelulose, os resíduos de café e sabugo de milho são duas potenciais fontes para obtenção de XOS por hidrólise enzimática, e espera-se liberação de altas concentrações desses oligossacarídeos em relação às demais biomassas.

Contudo, é necessário avaliar a presença de outros componentes, já que o sabugo de milho também apresenta a segunda maior fração de lignina total, sendo o farelo de arroz a biomassa com maior conteúdo deste polímero. Diferentemente das vantagens oriundas da presença abundante dos polissacarídeos, segundo Santos et al. (2019), a lignina constitui uma barreira ao processo de hidrólise enzimática uma vez que ela é capaz de inibir a atividade de celulases e hemicelulases, além de diminuir a eficiência catalítica por adsorção inespecífica das enzimas do meio reacional. Além disso, a lignina juntamente com outros componentes estruturais, tais como lipídeos e proteínas, auxilia na formação de uma estrutura fechada e organizada, que age como barreira física contra a penetração das enzimas e bloqueia seu caminho até o sítio de clivagem nos carboidratos estruturais (SANTOS et al., 2019).

A determinação do teor de proteínas é interessante para avaliar o uso da biomassa como suplementação animal ou humana, além auxiliar no fechamento do balanço de massa da composição química. Conforme estabelece Townsend et al. (2001), biomassas com valores de concentração superiores 7 % (m/m) de proteínas são adequadas e recomendadas para uso na alimentação animal. Assim, a casca de soja e os resíduos de café seriam interessantes para suplementação alimentar, devido ao alto teor proteico que apresentaram. Entretanto, outros aspectos devem ser considerados antes da destinação para esse fim, tais como a presença de fatores antinutricionais.

Por sua vez, as cinzas representam o teor de minerais fixos e podem ser relacionadas com o crescimento e desenvolvimento microbiano, quando a biomassa é empregada como fonte de carbono para fermentação sólida ou semi-sólida. Os minerais são importantes fontes de íons

inorgânicos, essenciais para o metabolismo, já que atuam com cofatores enzimáticos. Desta forma, observa-se que o farelo de arroz se sobressai no teor de cinzas, com 17,08 ($\pm 0,28$) %, enquanto as demais biomassas apresentaram teores inferiores a 10 %.

É importante ressaltar, que o balanço de massa indica o quanto da composição do material em estudo foi caracterizada, sendo comumente inferior a 100 %. Afinal, há erros técnicos e carência de etapas metodológicas mais sensíveis que levam perdas na quantificação, além de componentes que não foram avaliados pela metodologia descrita, como a pectina

Considerando apenas as biomassas *in natura*, a melhor fonte de carbono seria os resíduos de café, devido ao alto teor de hemicelulose, enquanto o farelo de arroz apresenta baixo teor desse polímero. No entanto, um pré-tratamento pode ser aplicado e uma nova avaliação composicional pode apontar uma outra biomassa como potencial para produção de XOS.

O pré-tratamento alcalino é empregado visando à solubilização de lignina e ao beneficiamento dos carboidratos da biomassa *in natura*, principalmente da porção hemicelulolítica (SUN et al., 2002; CARDONA et al., 2010). Após essa etapa, o material sofre uma redução de massa devido às severidades do método utilizado; com isso, as frações recuperadas após o procedimento de lavagem podem ser aferidas e avaliadas quanto ao seu rendimento de massa por material (TABELA 2).

TABELA 2 – Rendimento de massa das biomassas lignocelulósicas após pré-tratamento alcalino com NaOH 1 %, a 121 °C por 1 h.

%	Casca de Soja	Farelo de arroz	Sabugo de milho	Resíduos do café
Rendimento	55,37 ($\pm 0,59$)	51,79 ($\pm 2,93$)	46,27 ($\pm 0,72$)	64,99 (nd)

O desvio padrão está representado entre parênteses; nd = não determinando

Analisando os dados da Tabela 2, observa-se que todas as biomassas sofreram perdas significativas de massa inicial, com destaque para o sabugo de milho que apresentou perda de aproximadamente 54 g em massa para cada 100 g pré-tratadas. Logo, espera-se que o pré-tratamento tenha sido eficiente para desconstrução das biomassas e tenha provocado quedas significativas no teor de lignina total. No entanto, para confirmar a eficácia do pré-tratamento alcalino e analisar as alterações provocadas nos componentes dos materiais lignocelulósicos foi realizada uma caracterização química das biomassas pré-tratadas (TABELA 3).

TABELA 3 – Composição das biomassas pré-tratadas em base seca livre de extraíveis.

%	<i>Biomassas pré-tratadas</i>							
	Casca de soja		Farelo de arroz		Sabugo de milho		Resíduos do café	
Lignina total	10,40	(±1,53)	25,46	(±4,29)	19,41	(±0,95)	20,23	(±0,23)
<i>Lignina solúvel</i>	0,17	(±0,02)	0,05	(±0,01)	0,00	(±0,00)	0,2	(±0,02)
<i>Lignina insolúvel</i>	10,24	(±2,64)	25,38	(±4,30)	19,41	(±1,57)	19,93	(±1,25)
Carboidratos totais	79,07	nd	54,03	nd	62,45	nd	63,24	nd
<i>Celulose</i>	51,34	(±0,91)	36,37	(±0,80)	30,34	(±0,22)	25,93	(±0,92)
<i>Hemicelulose</i>	27,72	(±0,19)	17,67	(±0,50)	32,11	(±0,68)	37,31	(±1,96)
Lipídios	0,13	(±0,05)	0,43	(±0,03)	0,28	(±0,18)	nd	
Proteínas	1,67	(±0,14)	3,46	(±0,20)	0,78	(±0,18)	3,79	(±0,06)
Cinzas totais	2,79	(±0,08)	12,71	(±0,23)	1,31	(±0,03)	4,11	nd
<i>Cinzas de Klasson</i>	0,80	(±0,02)	2,92	(±0,00)	0,00	(±0,00)	0,19	(±0,00)
Balanço de massa	95,06		96,10		84,24		91,38	

O desvio padrão está representado entre parênteses; nd = não determinando

Nota-se que todas as biomassas pré-tratadas tiveram uma redução de vários componentes, como lipídeos, proteínas e, principalmente, lignina total. Então, ao perder alguns componentes estruturais, a porção de carboidratos foi concentrada, conforme observado nos teores de carboidratos totais em todas as biomassas. Ainda, os teores de hemicelulose foram enriquecidos no sabugo de milho e nos resíduos do café, sobressaindo aos valores de celulose. Já os teores de hemicelulose da casca de soja e do farelo de arroz foram favorecidos em relação à biomassa *in natura*, observa-se que eles passaram de 21,28 (±0,16) % e 14,57 (±1,14) % para 27,72 (±0,19) % e 17,67 (±0,50) %, respectivamente. Logo, pode-se dizer que o pré-tratamento químico alcalino foi eficiente, pois foi capaz de reduzir, perceptivelmente, a lignina em todas as biomassas pré-tratadas. Além disso, favoreceu os teores de hemicelulose, que é o polímero de maior interesse para os objetivos deste trabalho, quando se compara os teores deste polissacarídeo entre as biomassas *in natura* e pré-tratadas.

Por fim, as biomassas pré-tratadas apresentaram potencial para serem utilizadas como substratos devido a presença de hemicelulose para uma possível hidrólise enzimática para produção de XOS. Então, espera-se uma boa conversão da xilana das biomassas pelas xilanases fúngicas recombinantes, fornecendo altos rendimentos de XOS, sobretudo a partir do sabugo de milho e dos resíduos do café pré-tratados.

5.2 Expressão das xilanases recombinantes

O principal empecilho nos processos industriais que utilizam biocatalisadores como enzimas é a obtenção dessas biomoléculas, pois trata-se um processo oneroso (CHEN, 2012). Portanto, os estudos e as propostas de metodologias que diminuam gastos e tempo na produção de enzimas são interessantes para tornar seu uso mais atrativo e competitivo em relação a outras metodologias e produtos disponíveis no mercado.

As enzimas recombinantes de fungos filamentosos obtidas neste trabalho mostraram atividades significativas em até 72 h de indução, com destaque para a SM2, uma xilanase mutante otimizada, cuja maior atividade se deu no menor período de expressão (TABELA 4).

TABELA 4 – Expressão heteróloga das xilanases recombinantes de *Aspergillus nidulans* (AN 1818 e AN 36123) e *Orpinomyces* sp. PC-2 (SM2).

	AN1818	AN3613	SM2
<i>U/mL</i>	14,37 ($\pm 0,01$)	20,41 ($\pm 20,41$)	21853,10 ($\pm 106,73$)
<i>U/mg</i>	98,59 ($\pm 0,04$)	126,43 ($\pm 0,16$)	3551,77 ($\pm 17,35$)
<i>Proteínas (mg/mL)</i>	0,15 ($\pm 0,00$)	0,16 ($\pm 0,00$)	6,15 ($\pm 0,15$)
<i>Tempo de indução (h)</i>	72	72	4

O desvio padrão está representado entre parênteses.

A Tabela 4 demonstra que as xilanases de *A. nidulans* apresentaram alta atividade específica. A atividade específica é um dos parâmetros para avaliação das etapas de um processo de purificação, já que relaciona a quantidade de proteínas totais presentes no extrato em um dado volume com a atividade enzimática de interesse. Ou seja, quanto maior a atividade específica, mais pura se encontra a enzima no extrato, e maior será sua atividade catalítica por quantidade de proteína. Afinal, a quantidade de proteínas foi recuperada do sobrenadante, o que indica que esse sistema de expressão secreta pouca proteína e apresenta a vantagem de uma fácil recuperação da proteína de interesse.

Além disso, a atividade da xilanase SM2 é equiparável àquela do coquetel comercial Multifect® XL, cujo valor é 27704,15 U/mL. Segundo MAITAN-ALFENAS et al (2015), esta mistura enzimática comercial apresenta outras hemicelulases, celulasas e enzimas acessórias que complementam a ação de xilanase em um processo de hidrólise enzimática. Em contrapartida, embora a atividade de SM2 seja menor em valores absolutos, observa-se que ambas estão na mesma ordem de grandeza, e a atividade de xilanase de SM2 é proveniente de um extrato puro, ou seja, ausente do cooperativismo de outras enzimas. Portanto, a xilanase SM2 é um potencial candidata para ser empregada em um bioprocessos como alternativa de

baixo custo e rápida obtenção para a produção de XOS a partir da hidrólise de resíduos lignocelulósicos.

5.6 Hidrólise enzimática das biomassas para produção de xilooligossacarídeos (XOS)

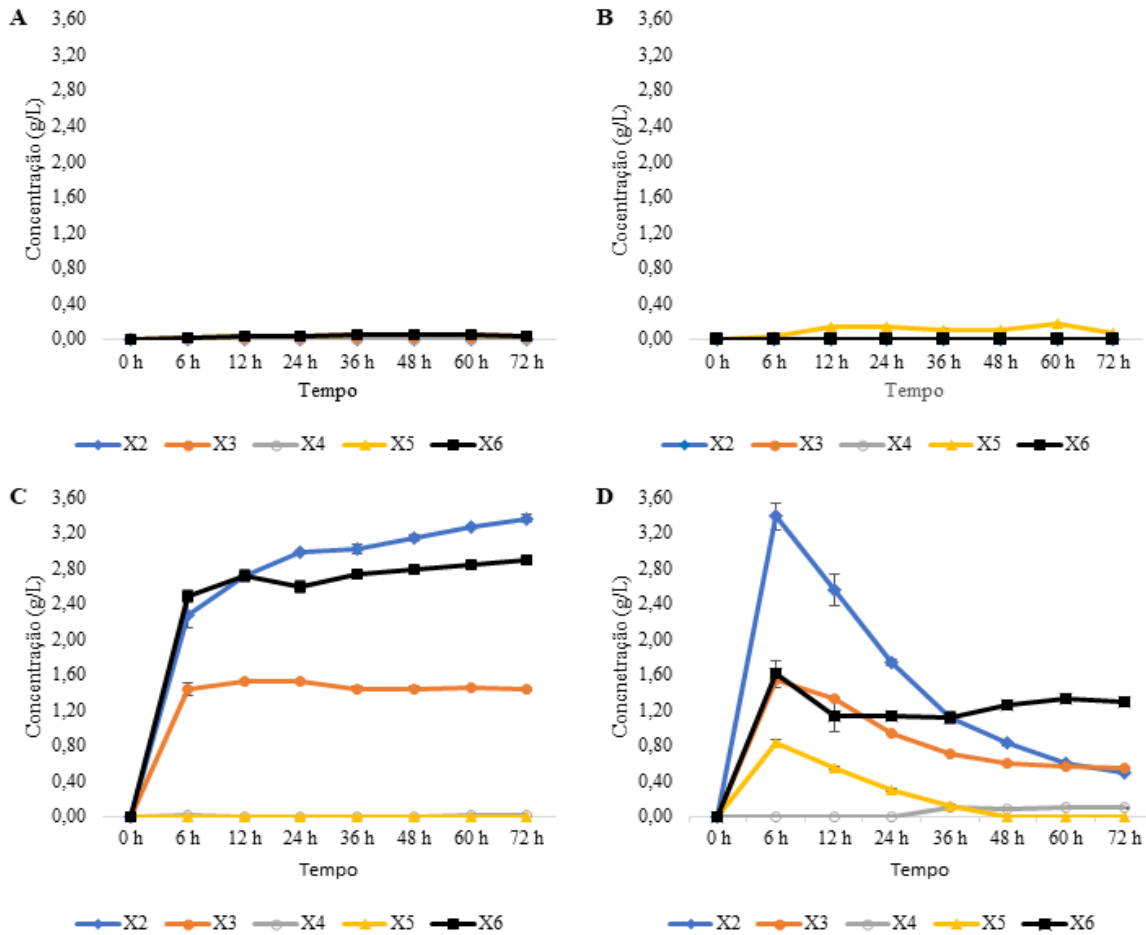
A hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas foi realizada por cada uma das xilanases recombinantes obtidas e pelo coquetel comercial Multifect® XL. O perfil de XOS produzidos pelas xilanases após sacarificação de cada uma das biomassas foi avaliado ao longo de 72 h de reação e mostrou-se diverso em termos de concentração e composição dos oligossacarídeos.

Conforme demonstrado anteriormente, os resíduos do café seriam um potencial candidato para avaliação da produção de XOS, devido à quantidade de hemicelulose desta biomassa. No entanto, devido à sazonalidade das culturas de café, não foi possível continuar o trabalho com essa biomassa devido à baixa disponibilidade no período dos experimentos. Por este motivo, ela não consta nesta etapa do trabalho.

5.6.1 Sabugo de milho

A biomassa que mais se destacou para a produção de XOS, em termos de concentrações liberadas, foi o sabugo de milho, conforme já era esperado, visto que esta biomassa apresentou maior teor de hemicelulose quando comparada às demais (FIGURA 3). Além disso, a maior diversidade no grau de polimerização de XOS foi obtida a partir do sabugo de milho hidrolisado pelo coquetel comercial e pela xilanase SM2 (FIGURA 3 – C e D). Ressalta-se que as enzimas recombinantes expressas em leveduras não foram capazes de liberar concentrações perceptíveis dos XOS a partir da sacarificação do sabugo de milho.

FIGURA 3 – Produção de XOS a partir do sabugo de milho pré-tratado (32,11 % de hemicelulose, 30,34 % de celulose e 19,41 % de lignina total) após hidrólise pelas xilanases: **A** – AN1818; **B** – AN3613; **C** – SM2 e **D** – Multifect® XL.



O coquetel Multifect® XL foi capaz de liberar em apenas 6 h de reação, 4 dos 5 XOS avaliados, mas as concentrações de todos estes açúcares decaíram após esse tempo. Como essas espécies continuaram disponíveis no meio reacional, acredita-se que houve um avanço para uma monomerização ao longo do tempo, com a produção de xilose. A concentração de xilose era de 6,63 g/L no tempo de 6 h e cresceu ao longo da reação, atingindo 15,02 g/L ao final das 72 h de reação. Por outro lado, a SM2 também foi capaz de produzir xilobiose, xilotriose e xiloexose em concentrações elevadas, e manteve os valores de concentração crescentes ou constantes ao longo das 72 h de reação.

As xilanases AN1818 e AN3613 não apresentaram resultados significativos na produção dos XOS a partir da hidrólise do sabugo de milho, tanto em termos de concentrações, quanto no tipo de oligossacarídeo analisado, embora tenham sido capazes de liberar uma pequena quantidade de xilopentose (FIGURA 3 – A e B). Assim, pode-se apontar que essas

enzimas são mais seletivas quanto ao seu substrato, ou não conseguiram acessar efetivamente a hemicelulose presente no sabugo de milho.

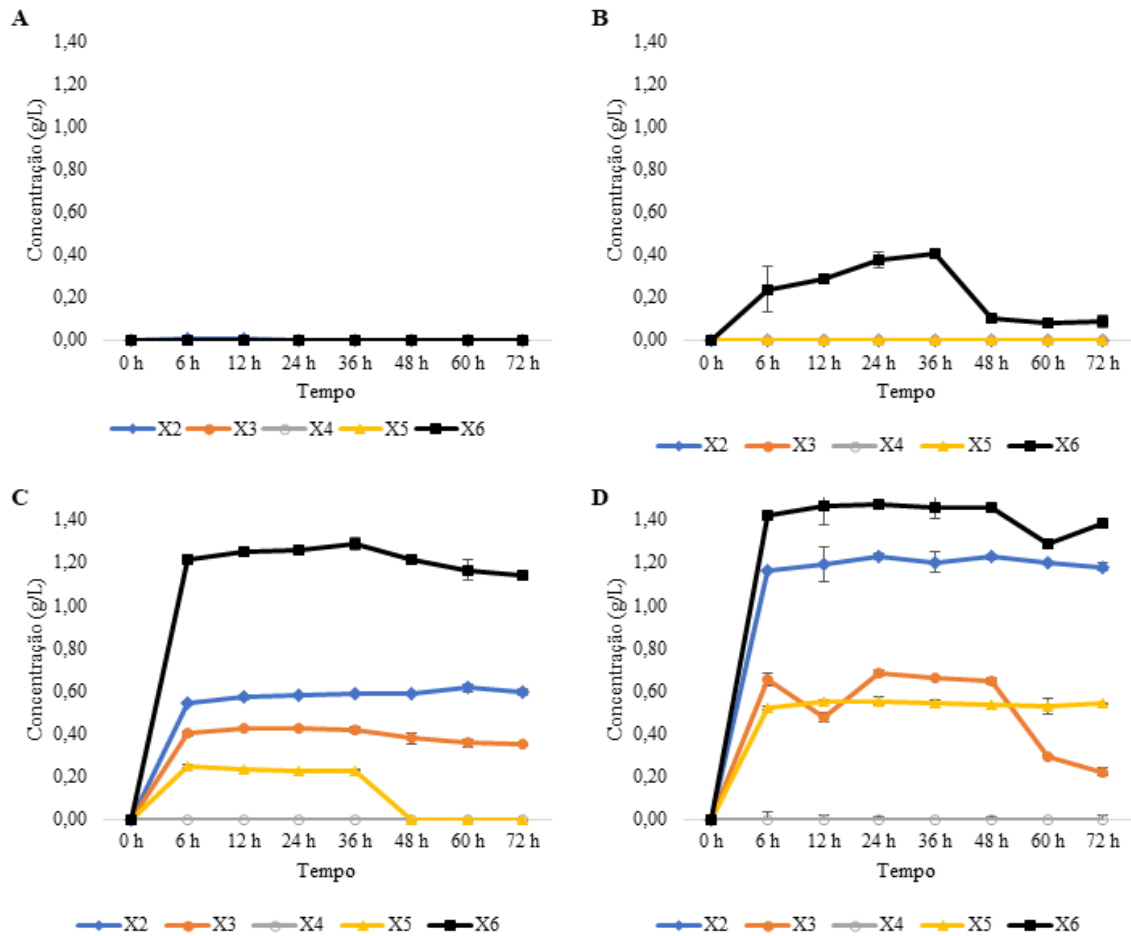
Ressalta-se que a xilopentose foi um dos açúcares não produzidos pela SM2 e liberado em menor quantidade pelo Multifect® XL, contudo foi totalmente consumido em 48 h de reação. Com isso, um estudo do sinergismo entre essas enzimas poderia apresentar uma complementação na produção de XOS, pois as xilanases de *Aspergillus nidulans* suplementariam ação da SM2 ou do coquetel comercial. Assim, espera-se que haja uma cooperação entre as enzimas (ALVIRA et al, 2011; ROBAK & BALCEREK, 2020) favorável à liberação de todos os XOS, já que as enzimas SM2 ou Multifect® XL realizariam o trabalho de clivagem direta da hemicelulose, enquanto a AN1818 ou AN3613 teriam melhor acesso e disponibilidade para atuarem em substratos de menor tamanho e grau de polimerização com consequente liberação de xilopentose.

Em suma, o sabugo de milho pré-tratado alcalinamente mostrou-se uma potencial fonte de carbono de baixo custo para produção dos XOS, principalmente com o emprego da xilanase SM2 e do coquetel comercial Multifect® XL. Já nas primeiras 6 horas de reação, observa-se a liberação de quase todos os oligossacarídeos analisados pela xilanase SM2, portanto esta enzima é uma alternativa interessante pelo baixo tempo de formação dos produtos de interesse, baixo grau de monomerização dos XOS e baixo custo de obtenção da enzima.

5.6.2 Farelo de arroz

A hidrólise enzimática do farelo de arroz produziu o segundo maior rendimento de XOS, embora esta biomassa tenha apresentado o menor teor de hemicelulose quando comparada às demais (FIGURA 4). Com isso, pode-se inferir que as xilanases tiveram uma boa acessibilidade ao polissacarídeo e conseguiram uma conversão significativa da xilana em XOS de baixo grau de polimerização, formados por 2 a 6 resíduos de xilose.

FIGURA 4 –Produção de XOS a partir do farelo de arroz pré-tratado (17,67 % de hemicelulose, 36,37 % de celulose e 25,46 % de lignina total) após hidrólise pelas xilanases: **A** – AN1818; **B** – AN3613; **C** – SM2 e **D** – Multifect® XL.



Observa-se que as maiores concentrações e diversidade de oligossacarídeos foram liberadas pela hidrólise realizada pela xilanase SM2 e pelo coquetel Multifect® XL, porém não foi detectada a presença de xilotetraose no período e condições avaliados (FIGURA 4 – C e D). Além disso, a eficiência da hidrólise foi novamente equiparável entre a xilanase recombinante e o coquetel comercial, conforme também observado na sacarificação do sabugo de milho. No entanto, não houve uma tendência de consumo do XOS com o decorrer do tempo pela mistura Multifect® XL na reação de sacarificação do farelo de arroz, enquanto uma possível monomerização da xilopentose pela SM2 pode ser observada a partir de 48 h de reação. No entanto, as concentrações de xilose durante a hidrólise do farelo de arroz permaneceram praticamente constantes ao longo das 72 h de reação. Esse fato permite teorizar uma possível atividade de síntese de XOS com polimerização superior a 6 unidades de resíduos de xilose. No entanto, carece de outras metodologias para avaliar e comprovar essa atividade, que pode ter ocorrido após um tempo devido à alta disponibilidade de XOS presentes no meio reacional.

Nestes experimentos também foi possível observar que as concentrações de xiloexose obtidas pelas hidrólises do farelo de arroz foram superiores às concentrações dos demais XOS, seguido pela xilobiose, xilotriose e xilopentose, durante as primeiras 48 h de reação. Entretanto isso não foi observado anteriormente, pois o perfil de XOS obtidos pelas hidrólises do sabugo de milho foi diferente (FIGURA 3). Para a sacarificação do sabugo de milho a maior concentração foi obtida para a xilobiose, seguida pela xiloexose, apenas nas primeiras horas de reação.

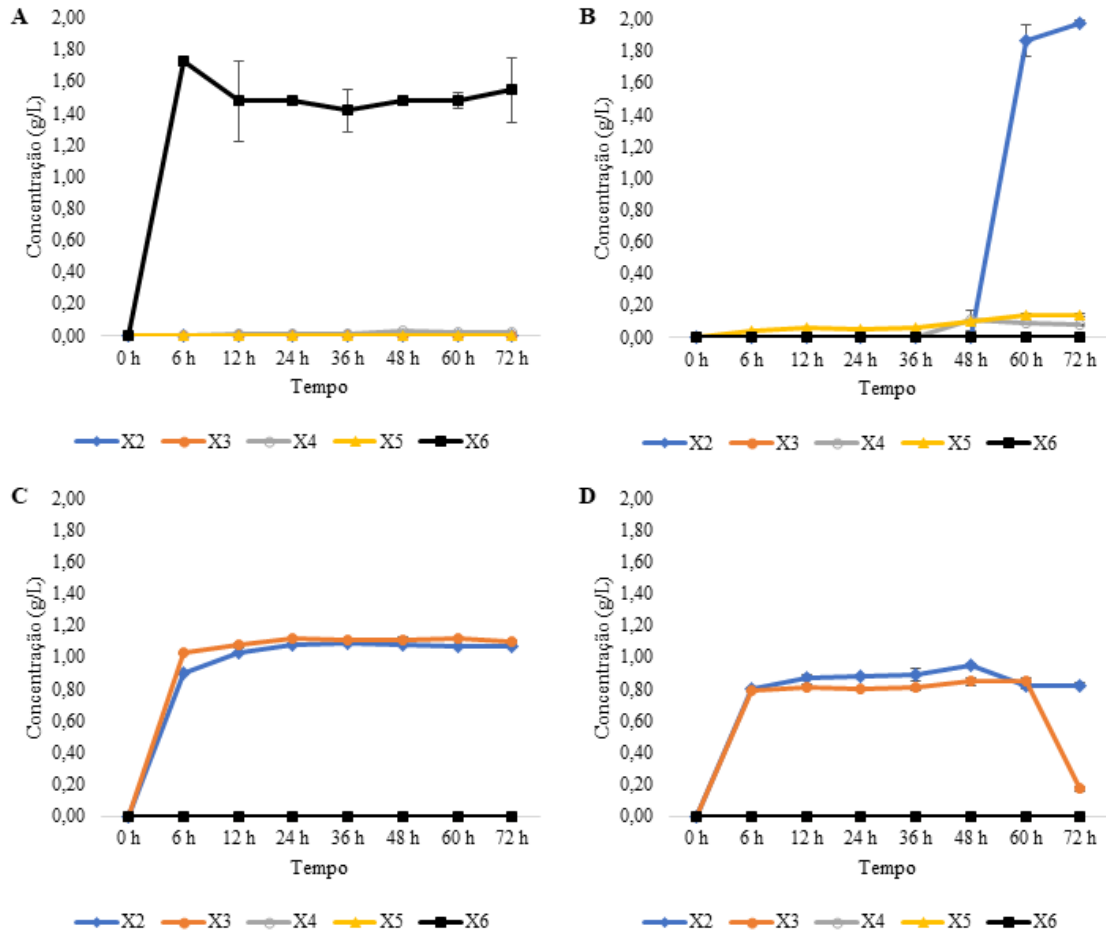
As xilanases recombinantes de *A. nidulans* mantiveram uma baixa atividade catalítica, também observada na hidrólise do sabugo de milho. Embora a concentração de açúcares liberados não ultrapassou 0,3 g/L em ambas as biomassas hidrolisadas por essas enzimas, o açúcar predominante liberado do farelo de arroz foi a xiloexose pela ação da AN3613; em contrapartida a xilopentose foi o açúcar proeminente após ação da enzima no sabugo de milho (FIGURA 4 – A e B). Esse resultado pode indicar uma certa capacidade das enzimas AN1818 e AN3613 em produzir preferencialmente XOS com 5 ou mais resíduos de xilose.

Assim, o farelo de arroz também se apresentou como uma fonte de carbono alternativa para produção de XOS, dentre as biomassas testadas, com destaque para ação do coquetel Multifect® XL e da xilanase SM2. Além disso, a xilanase SM2 foi capaz de liberar xilopentose a partir de 6 até 36 h de reação, exibindo, portanto, uma vantagem em relação à sua hidrólise do sabugo de milho, em que xilotetraose e xilopentose não foram detectadas.

5.6.3 Casca de soja

A hidrólise enzimática da casca de soja obteve os valores mais baixos de rendimento e diversidade na produção dos XOS, embora esta biomassa tenha apresentado alto teor de hemicelulose, maior do que o farelo de arroz (FIGURA 5). Além disso, houve uma ruptura da tendência observada nas sacarificações anteriores, pois o coquetel comercial Multifect® XL e a xilanase SM2 não foram capazes de gerar um perfil de XOS diversificado, mas suas eficiências na clivagem permaneceram similares, com liberação de aproximadamente 1,0 g/L de xilobiose e xilotriose (FIGURA 5 – C e D). Não houve detecção dos demais XOS nos tempos analisados para essas enzimas.

FIGURA 5 – Produção de XOS a partir da casca de soja pré-tratada (27,72 % de hemicelulose, 51,34 de celulose e 10,40 % de lignina total) após hidrólise pelas xilanases: **A** – AN1818; **B** – AN3613; **C** – SM2 e **D** – Multifect® XL.



De modo geral, as xilanases recombinantes de *A. nidulans* liberaram as maiores concentrações de açúcares, em comparação com as suas hidrólises anteriores. Também, as duas xilanases seguiram a tendência de gerar XOS com 5 ou mais resíduos de xilose, e a enzima AN1818 rendeu concentrações mais elevadas de xiloxose, em torno de 1,5 g/L. Enquanto isso, a xilanase AN3613 foi capaz de produzir xilopentose e xilotetraose, em baixas concentrações, além da xilobiose.

Com isso, a casca de soja mostrou-se uma fonte promissora de carbono renovável para produção de xiloxose por meio da hidrólise enzimática pela xilanase AN1818, em um curto tempo de reação. O rendimento desse açúcar foi o segundo melhor entre todas as condições de hidrólise, sendo inferior apenas ao observado após a hidrólise do sabugo de milho pela xilanase SM2 (FIGURA 6 – C).

5.7 Perfil de xilooligossacarídeos (XOS) liberados após sacarificação de biomassas lignocelulósicas por xilanase

A produção de XOS via hidrólise enzimática é crescente no mercado, com grande interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica em aplicar esses compostos funcionais nos seus produtos (VALLS et al., 2018; WU et al., 2019). Logo, importantes trabalhos buscam correlacionar o perfil de XOS produzidos com as biomassas utilizadas para obtenção destes oligossacarídeos e ainda com os microrganismos produtores das xilanases empregadas, que geralmente são provenientes de fungos (ALMEIDA & MAITAN-ALFENAS, 2021). A Tabela 5 apresenta algumas dessas xilanases e o grau de polimerização dos XOS que elas preferencialmente liberam após hidrólise de diferentes substratos.

TABELA 5 – Produção de xilooligossacarídeos (XOS) por enzimas xilanolíticas fúngicas*

Fungo	Substrato	Principais XOS
<i>Aspergillus flavus</i>	Xilana de Beechwood	Xilobiose e xilopentose
<i>Aspergillus foetidus</i>	Espiga de milho	Xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose
<i>Trichoderma inhamatum</i>	Xilana Oat Spelts	Xilobiose, xilotriose e xilotetraose
<i>Penicillium funiculosum</i>	Arabinoxilana de trigo	Xilotetraose, xilopentose e xiloexose
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	Xilana de Birchwood	Xilobiose e xitetraose

*Adaptado de ALMEIDA & MAITAN-ALFENAS, 2021.

No entanto, há uma dificuldade em traçar esse perfil, pois existem vários fatores que afetam a produção dos XOS. Por exemplo, o substrato utilizado irá influenciar na liberação desses açúcares durante a hidrólise, uma vez que cada enzima tem sua seletividade por um tipo de xilana. Além disso, quando se trata de resíduos lignocelulósicos, tais como o sabugo de milho, farelo de arroz e casca de soja, a complexidade é ainda maior, pois nestas biomassas há diversos componentes estruturais; inclusive alguns destes compostos precisam ser removidos para garantir a acessibilidade das enzimas ao resíduo durante a reação, conforme discutido na seção de caracterização química.

A influência do tempo que decorre a ação enzimática também deve ser considerada, pois esse fator interfere diretamente nas concentrações de cada um dos XOS liberados. Como já foi observado anteriormente, os rendimentos de açúcares podem aumentar, permanecer constantes ou diminuir com o decorrer da reação de hidrólise (FIGURA 1 a 3).

Portanto, para correlacionar qualitativamente as xilanases empregadas nas hidrólises efetuadas neste trabalho com o perfil de XOS produzidos por biomassa, considerou-se o menor tempo de reação propriamente, 6 h, e estipulou-se a concentração de 1 g/L como ponto de corte,

ou seja, apenas valores acima de 1 g/L foram considerados para comparação dos resultados obtidos (TABELA 6).

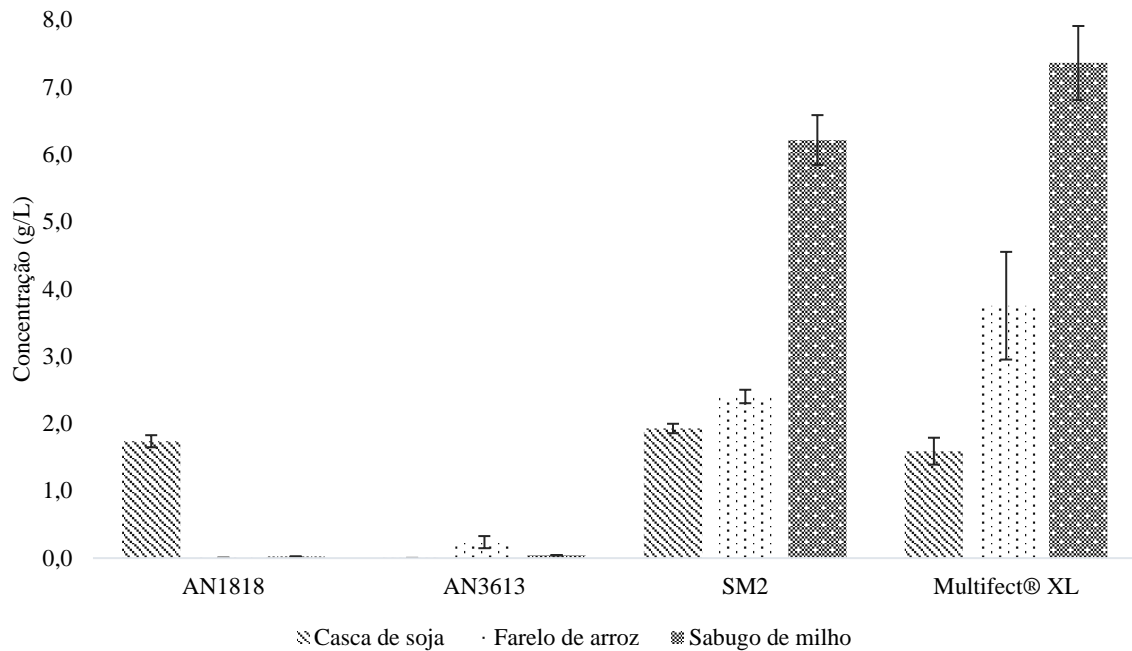
TABELA 6 – Perfil qualitativo dos principais xilooligossacarídeos (XOS) produzidos pelas xilanases recombinantes e pelo coquetel comercial Multifect® XL a partir da hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

Xilanases	Biomassas		
	<i>Casca de soja</i>	<i>Farelo de arroz</i>	<i>Sabugo de milho</i>
<i>AN1818</i>	Xiloexose	–	–
<i>AN3616</i>	–	–	–
<i>SM2</i>	Xilotriose	Xiloexose	Xilobiose, xilotriose e xiloexose
<i>Multifect® XL</i>	–	Xilobiose e xiloexose	Xilobiose, xilotriose e xiloexose

Assim, percebe-se que a xiloexose foi o oligossacarídeo majoritariamente liberado pelas xilanases recombinantes e pelo coquetel comercial, enquanto nenhuma parece ter preferência pela produção de xilotetraose nas condições avaliadas. É importante ressaltar que esse resultado não exclui a formação de outros XOS, afinal eles podem ter sido liberados e simultaneamente consumidos pelo meio reacional. Por exemplo, a xilotetraose pode ter sido liberada e clivada em 2 moléculas de xilobiose ou em 1 molécula de xilose e uma de xilotriose, e, portanto, não foi detectada. Ainda, eles podem também simplesmente não ter sido formados em concentrações detectáveis no tempo avaliado.

O maior rendimento total de XOS no intervalo de 6 horas de reação, foi obtido pelo Multifect® XL, seguido pela xilanase recombinante SM2, a partir da hidrólise do sabugo de milho e do farelo de arroz (FIGURA 6). Após a sacarificação da casca de soja, a liberação de XOS total pela xilanase SM2 superou o coquetel comercial em termos de concentração, porém ambas as fontes enzimáticas produziram apenas xilobiose e xilotriose a partir deste substrato (FIGURA 5 – C e D).

FIGURA 6 – Rendimento total de xilooligossacarídeos (XOS) após 6 horas de hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas.



As xilanases de *A. nidulans*, AN 1818 e AN 3613, apresentaram menor capacidade em converter as biomassas em XOS. Em contrapartida, a xilanase SM2 e a mistura enzimática Multifect® XL liberaram as maiores concentrações desses açúcares após hidrólise de todas as biomassas, além da maior diversidade de XOS. Assim, observa-se que os resultados foram favoráveis à xilanase SM2, já que se trata de uma proteína otimizada e com alta atividade catalítica, que foi eficiente na hidrólise dos três resíduos lignocelulósicos testados.

Alguns trabalhos demonstram a produção de XOS com bons rendimentos, por meio de outros métodos, em comparação ao de hidrólise enzimática, no entanto algumas ponderações podem ser feitas. Segundo Buruiana et al. (2017), é possível obter até 11,67 g/L de XOS a partir de pré-tratamentos hidrotérmicos sequenciais da palha de milho. Contudo, foram necessárias etapas posteriores de purificação, tanto para recuperar e concentrar o produto de interesse, quanto para retirar os coprodutos formados durante o processo. É importante ressaltar que o acréscimo de operações no processo de produção de XOS pode ser desfavorável para a planta industrial, já que encarece a aplicação do método em larga escala. Assim, o emprego de xilanases para a reação de hidrólise é vantajosa por torná-la específica e seletiva, o que reduz a formação de subprodutos, além de ser executada em condições brandas de temperatura e pressão (CARVALHO et al. 2013; CHAPMAN et al., 2018).

Já Amorim et al. (2018), conseguiram produzir XOS em uma única etapa de fermentação do bagaço de malte por *Bacillus subtilis* 3610. O microrganismo modificado geneticamente contendo o gene *xyn2* de uma xilanase de *Trichoderma reesei* foi capaz de gerar

27,5 (± 0.8) mg/g de açúcar total, em 12 h de fermentação, em um meio otimizado. A grande desvantagem do processo foi a manutenção do microrganismo, que necessitou de meio de cultura específico para o crescimento inicial, além de outros fatores associados à metodologia, como o risco de contaminação biológica, necessidade de um método de esterilização, maior tempo para obtenção do produto, formação de inibidores do crescimento, entre outros (BAI et al, 2008; SRIVASTAVA et al, 2019). Portanto, o processo de hidrólise utilizando enzimas recombinantes puras apresenta a vantagem de operação simplificada e melhores rendimentos em intervalos inferiores ao tempo de crescimento microbiano.

Também foi relatada a obtenção de XOS por hidrólise enzimática com uma mistura de endo-xilanase e α -L-arabionfuranosidase de *Aspergillus niger* (GH11 e GH51, respectivamente) e feruloil esterase de *Clostridium thermocellum* (CE1) com rendimentos de 10,23 ($\pm 0,56$) g/L, a partir da palha de cana e 8,45 ($\pm 0,65$) g/L a partir da casca de café, em 48 h de reação (ÁVILA et al, 2020). Embora os rendimentos sejam superiores aos valores apresentados neste trabalho, Ávila et al (2020) utilizaram enzimas comerciais e consideraram no seu somatório de XOS as concentrações de xilose. No entanto, trata-se de um monossacarídeo, ou seja, a xilose não deveria fazer parte dos XOS, por definição. Em comparação, a produção de XOS pela xilanase SM2, tanto pela hidrólise do sabugo de milho, quanto do farelo de arroz, ainda se mostrou mais vantajosa devido ao menor tempo de hidrólise, com rendimento em torno de 4 g/L a partir da sacarificação do sabugo de milho, sem contabilizar a xilose, além do baixo custo e rápida obtenção desta xilanase recombinante.

Portanto, a xilanase recombinante de *Orpinomyces* sp. PC-2 expressa em *E. coli* destacou-se na liberação de XOS a partir da hidrólise do sabugo de milho e do farelo de arroz, com um perfil diversificado e rendimentos comparáveis aos apresentados pelo coquetel comercial Multifect® XL. Então, trata-se de uma potencial alternativa de baixo custo e alta atividade enzimática para produção de XOS com propriedades prebióticas para serem aplicados na indústria, principalmente alimentícia e farmacêutica.

5.8 Avaliação *in vitro* do potencial prebiótico dos XOS

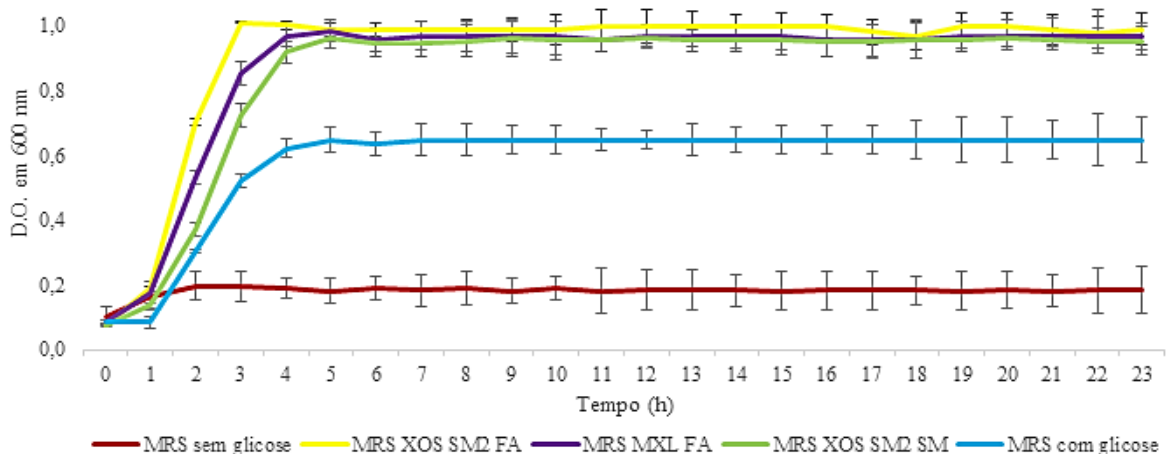
Os testes *in vitro* são interessantes ferramentas avaliativas para confirmar uma hipótese, pois além de mitigar os riscos financeiros, apresentam menor onerosidade e diminuem o uso de animais (ARGYRI et al, 2013; GHALLAB, 2013). Embora apresentem algumas desvantagens relevantes, já que não mimetizam as interações que ocorrem no modelo *in vivo*, são úteis como prova de conceito e são utilizados para indicar o potencial prebiótico dos compostos (GHALLAB, 2013).

5.8. 1 Ação prébiótica *in vitro*

Os prebióticos são definidos como compostos não-digeríveis que estimulam o crescimento de microrganismos benéficos ao hospedeiro, os então denominados probióticos. No entanto, um prebiótico necessita preencher alguns requisitos para ser classificado como tal, são eles: a estimulação seletiva de microrganismos probióticos, ser fermentescível para as bactérias benéficas à saúde do hospedeiro e apresentar resistência à degradação pelo trato intestinal do animal (BINNS, 2014; GIBSON et al., 2017).

A avaliação das propriedades prebióticas foi realizada com base na curva de crescimento microbiano da bactéria *L. acidophilus* na presença dos XOS produzidos pela hidrólise do farelo de arroz pela xilanase SM2 e pelo coquetel Multifect® XL e pela hidrólise do sabugo de milho pela xilanase SM2 (FIGURA 7). Os oligossacarídeos produzidos pela xilanase SM2 substituíram as fontes de carbono convencionais do meio rico na concentração 0,24 % (m/v) para o farelo de arroz e 0,62 % (m/v) para o sabugo, enquanto os XOS produzidos pelo Multifect® XL a partir do farelo de arroz foram empregados na concentração de 0,38 % (m/v). Esses valores correspondem à concentração máxima obtida a partir da sacarificação de cada uma das biomassas pelas xilanases avaliadas, após 6 h de hidrólise.

FIGURA 7 – Crescimento do microrganismo *Lactobacillus acidophilus* na presença dos XOS produzidos na etapa de hidrólise enzimática por xilanases. A sigla MRS se refere ao meio comercial de cultura específico para bactérias lácticas. Os nomes SM2 e Multifect® XL (MXL) se referem às xilanases empregadas na hidrólise, enquanto as siglas FA e SM são farelo de arroz e sabugo de milho, respectivamente.



Todos os XOS avaliados foram capazes de estimular o crescimento do probiótico, com destaque para os açúcares obtidos a partir da hidrólise do farelo de arroz pela xilanase SM2. Observa-se que o tempo de crescimento para atingir a fase estacionária foi menor que o controle

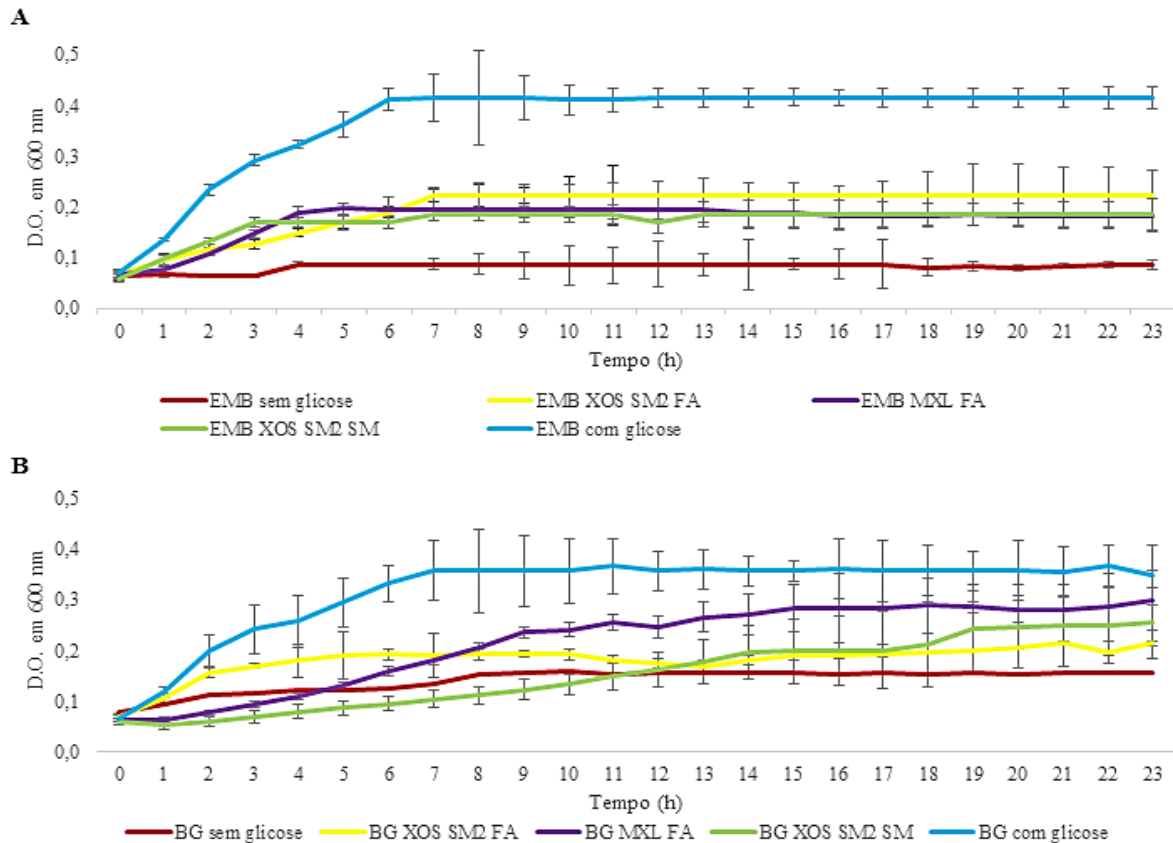
positivo para o probiótico e quase o dobro da população. Ressalta-se que mesmo na presença de uma concentração de 2 % de glicose do controle, superior às concentrações dos XOS utilizadas, os oligossacarídeos foram preferíveis na absorção pelo *L. acidophilus* e mais eficientes em induzir o crescimento microbiano.

Os microrganismos probióticos são capazes de colonizar o trato intestinal nas regiões de microvilosidades e se adaptam às fontes de carbono disponíveis na dieta do hospedeiro. Estudos elucidaram o metabolismo de prebióticos em certas espécies bacterianas e mostraram a existência de proteínas transportadoras, normalmente permeases transmembranas específicas, para a entrada destes oligossacarídeos (ANDERSEN et al., 2011; GÄNZLE, 2015, BINTSIS, 2018). Além disso, há hidrolases endocelulares capazes de catalisar a quebra das ligações glicosídicas desses açúcares incorporados ao metabolismo e promover a fermentação. Segundo Bintsis (2018), o gênero *Lactobacillus* é capaz de consumir hexoses e pentoses via fermentação homolática para geração de energia, enquanto algumas espécies do gênero também utilizam pentoses no processo fermentativo utilizando a via da fosfocetolase. No último, a espécies são consideradas heterofermentativos.

Uma outra característica desses organismos é a fermentação de hexoses, em que bactérias e leveduras geralmente ocorre pela via Emden–Meyerhof, na qual a glicose é preferencialmente absorvida e transportada pelo sistema de fosfotransferases (PTS) (GÄNZLE & FOLLADOR, 2015). Já em bactérias lácticas (BAL), o metabolismo de oligossacarídeos é preferido ao monômero e o sistema PTS normalmente não é funcional (GÄNZLE et al., 2015). Também são descritas diferenças metabólicas entre as BAL homo e heterofermentativas no catabolismo de pentoses para obtenção de energia (GÄNZLE, 2015; WANG et al., 2021). Todas essas particularidades garantem a esses microrganismos características únicas e diferenciais que são importantes para proporcionarem suas propriedades funcionais na alimentação. Essas características também favorecem seu desenvolvimento no epitélio intestinal a partir do aproveitamento de fibras alimentares não-digeríveis, em detrimento dos patógenos (WANG et al., 2021).

Portanto, avaliou-se a capacidade de estímulo seletivo dos XOS obtidos perante a presença de enteropatógenos, como *E. coli* e *S. enterica*. A Figura 8 apresenta a curva de crescimento destes patógenos quando a fonte de carbono disponível foi exclusivamente constituída pelos XOS produzidos pelas xilanases SM2 e Multifect® XL a partir da hidrólise do farelo de arroz e do sabugo de milho.

FIGURA 8 – Crescimento dos patógenos na presença dos XOS produzidos na etapa de hidrólise enzimática por xilanases. **A** – *E. coli* BL21 **B** – *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. As siglas EMB e BG se referem aos meios seletivos para *E. coli* e Salmonella, respectivamente. Os nomes SM2 e Multifect® XL (MXL) se referem às xilanases empregadas na hidrólise, enquanto as siglas FA e SM são farelo de arroz e sabugo de milho, respectivamente.



Os XOS produzidos a partir do farelo de arroz foram escolhidos para serem avaliados por apresentarem maior diversidade quando comparados àqueles obtidos a partir da hidrólise do sabugo de milho (FIGURAS 3 e 4), contudo o sabugo produziu maiores concentrações de XOS totais (FIGURA 6). E nenhum dos XOS avaliados foi capaz de aumentar o crescimento das bactérias patogênicas dentro do prazo de 23 horas, em comparação ao controle. Também é importante ressaltar que monômeros e outros açúcares podem ser produzidos durante a hidrólise, como glicose e xilose, portanto também podem ser metabolizados pelas bactérias patogênicas. Isso explicaria o porquê de *S. enterica* ter crescido na presença dos hidrolisados de biomassas, já que os produtos das hidrólises enzimáticas foram usados diretamente nesta avaliação, sem nenhuma estratégia prévia de purificação.

Para que os XOS sejam aplicados na indústria alimentícia, é requerido um certo grau de pureza, pelo menos superior a 75 %, o que pode ser obtido por técnicas cromatográficas como a gel filtração, ou filtração por membrana, com o intuito de remover produtos indesejáveis e

recuperar XOS com baixo grau de polimerização (GULLON et al., 2010; NACHARY & PRAPULLA, 2011; SANTIBÁÑEZ, et al. 2021). Observa-se, na Tabela 7, que o farelo de arroz apresentou uma concentração inferior de açúcar redutor total quando comparado ao sabugo de milho, apesar de serem muito próximas as concentrações de XOS totais produzidos. A menor diferença entre a quantidade de açúcar redutor total e XOS totais indica uma menor quantidade dos demais carboidratos que não são XOS. Assim, a solução de XOS produzida a partir da hidrólise do farelo de arroz pela xilanase SM2 se mostrou vantajosa, por apresentar menor quantidade de açúcar redutor, ou seja, maior pureza quando comparada às demais soluções de XOS, o que provavelmente diminui a ação de interferentes na avaliação *in vitro*.

TABELA 7 – Concentração de açúcar redutor total nas soluções de XOS obtidas a partir da hidrólise das biomassas empregadas nos testes *in vitro*.

	Farelo de arroz + SM2	Farelo de arroz + Multifect XL	Sabugo de milho + SM2
<i>Açúcar redutor (g/L)</i>	3,81 (±0,13)	4,62 (±0,22)	13,63 (±0,85)

Pode-se também concluir que mesmo em solução de XOS com concentrações de açúcar redutor superiores às de XOS totais (FIGURA 6), não foi observado aumento na curva de crescimento dos patógenos *E. coli* ou Salmonella em comparação ao controle positivo. Portanto, os oligossacarídeos foram seletivos, pois favoreceram o crescimento dos probióticos em detrimento do crescimento de patógenos, em todas as condições testadas.

Com isso, os XOS obtidos a partir do sabugo de milho e farelo de arroz possuem um dos principais requisitos de prebióticos: o estímulo seletivo no crescimento apenas de bactérias benéficas. Ressalta-se que esses compostos com propriedade prébiótica são emergentes biomoléculas solicitadas no combate a infecções e redução do uso de antibióticos na pecuária (JAIN et al., 2015; SOLIS-CRUZ et al., 2019), uma vez que a proliferação de probióticos, como algumas espécies de bactérias lácticas, dificultam a colonização do tecido por patógenos (PATEL & GOYAL, 2012).

5.8.2 Indicativos de fermentação

As bactérias lácticas apresentam vias metabólicas importantes, tais como de degradação de proteínas, lipólise, glicólise e via de fermentação do citrato, que promove a fermentação e libera compostos de interesse em diversos bioprocessos. Esse catabolismo associado à liberação de ácidos concede a esses microrganismos um grande valor biotecnológico, como a produção de alimentos, produção de flavorizantes, vitaminas, álcoois e outros componentes orgânicos de interesse econômico (BINTSIS, 2018).

Observa-se que o probiótico *L. acidophilus* foi capaz de desenvolver-se no substrato contendo XOS e promoveu maior liberação de ácidos graxos de cadeia curta no meio suplementado com XOS produzidos pela xilanase SM2 a partir da hidrólise do sabugo de milho (TABELA 8).

TABELA 8 – Ácidos graxos de cadeia curta liberados em 23 h de fermentação dos XOS pela bactéria *L. acidophilus* em cada condição de meio suplementado com XOS.

<i>L. acidophilus</i>	Ácidos graxos de cadeia curta (g/L)*		
	Acético	Butírico	Propiônico
XOS obtidos do farelo de arroz pela xilanase SM2	2,73	0,00	0,53
XOS obtidos do farelo de arroz pelo coquetel Multifect® XL	2,56	0,00	0,19
XOS obtidos do sabugo de milho pela xilanase SM2	2,82	0,00	2,60
Controle positivo - MRS com glicose	1,99	0,00	0,26
Controle negativo - MRS sem glicose	1,70	0,00	0,00

*Os valores são referentes a uma mistura homogênea das replicatas.

O próbio também foi capaz de produzir ácido isobutírico em todos os meios suplementados com XOS, além do controle positivo com glicose. No entanto, não houve detecção da presença de ácido butírico, isovalérico ou fórmico em nenhuma das amostras. Também é possível observar que os XOS produzidos pelas enzimas recombinantes apresentaram maior capacidade de induzir a liberação de ácidos graxos de cadeia curtas no *L. acidophilus*, principalmente de ácido acético e propiônico, do que os XOS produzidos pela xilanase comercial. Contudo, a presença de ácido acético no meio MRS sem glicose precisa ser investigada, já que pode consistir em produtos vindo de vias catabólicas de outros compostos, como oxidação de lipídeos. Para confirmar a indução da fermentação será necessário investigar a liberação de ácido láctico, um produto advindo direto do processo homofermentativo a partir de hexoses ou pentoses (BINTSIS, 2018).

Comumente, o efeito inibitório do crescimento de patógenos pelo uso de prebióticos é associado ao estímulo do crescimento dos probióticos, que competem por espaço no epitélio do intestino e evitam a proliferação dos patógenos (HOOPER, LITTMAN & MACPHERSON, 2012). Entretanto, este efeito inibitório também pode estar associado à liberação de ácidos graxos de cadeia curta, que abaixam o pH do lúmen intestinal e proporcionam um ambiente inóspito para os enteropatógenos de maior ocorrência (JAIN et al., 2015, MANO et al., 2018).

Portanto, os XOS obtidos de biomassas lignocelulósicas, que são fontes de carbono alternativas, a partir da ação de xilanases fúngicas recombinantes se mostram competentes no processo de fermentação do probiótico *L. acidophilus*. Com isso, os resultados criam a perspectivas de diversas aplicações biotecnológicas, tais como a direta incrementação da funcionalidade de alimentos e bebidas para alimentação animal e humana, a obtenção de compostos orgânicos de interesse econômico por microrganismos suplementados com XOS ou sua aplicação no uso preventivo de infecções intestinais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os XOS apresentam grande interesse econômico e podem ser obtidos a partir de resíduos lignocelulósicos, fontes de carbono de baixo valor econômico e abundantes devido à sua alta geração proveniente da cadeia primária de produção, como sabugo de milho, com alto teor de xilana, resíduos de café, farelo do arroz e casca de soja. Neste trabalho, mostrou-se que o sabugo de milho (entre as biomassas testadas na hidrólise enzimática), após o pré-tratamento químico alcalino, apresentou o maior enriquecimento da fração hemicelulósica, se mostrando um grande potencial para obtenção de XOS a partir da ação de xilanases fúngicas recombinantes.

As xilanases de alto poder catalítico são visadas nos processos industriais pelas suas características de termoestabilidade, resistência ao pH, capacidade de clivar polímeros e gerar açúcares fermentescíveis. Assim, xilanases recombinantes, como a SM2 proveniente do fungo *Orpinomyces* sp. PC-2, e expressa em sistema de procarioto de forma otimizada, é uma alternativa para atender à alta demanda por XOS, com menor tempo e custo de produção e alta eficiência. Neste trabalho, foi demonstrado que essa proteína recombinante apresentou atividade enzimática comparável ao coquetel enzimático Multifect® XL, com a mesma capacidade de clivagem e geração de XOS na hidrólise das biomassas testadas.

A hidrólise do sabugo de milho pela xilanase SM2 apresentou os maiores rendimentos do produto, enquanto a sacarificação do farelo de arroz trouxe o perfil mais diversificado de XOS, com o segundo melhor rendimento entre as xilanases recombinantes. Já as xilanases recombinantes de *A. nidulans*, AN1818 AN3616, mostraram-se mais eficientes na obtenção de xiloxose a partir da hidrólise da casca de soja, biomassa com menor rendimento de XOS totais. Com isso, pode-se teorizar que estudos de sinergia entre essas xilanases seriam capazes de melhorar os rendimentos de XOS com baixo grau de polimerização, na qual uma enzima poderia suplementar a deficiência da outra. Por isso é importante avaliar o perfil de XOS e correlacioná-lo ao tipo e fonte de enzima utilizada, para permitir sua melhor empregabilidade em bioprocessos.

A xilanase SM2 foi capaz de gerar o segundo melhor rendimento de XOS totais na hidrólise das três biomassas em comparação às xilanases AN1818 e AN3613 e gerou maior concentração de XOS do que a mistura comercial após hidrólise da casca de soja. Ainda, a xilanase SM2 forneceu concentrações de XOS equivalentes em diversidade ao do coquetel comercial e com maior grau de pureza, ou seja, menor concentração de açúcar redutor total, que apresentaram potencial prebiótico nos testes *in vitro* com *L. acidophilus*.

Os XOS obtidos pela xilanase SM2, tanto na hidrólise do sabugo de milho, quanto do farelo de arroz, foram capazes de estimular de forma seletiva o crescimento do probiótico no prazo de 23 horas e os patógenos não responderam da mesma forma a nenhum dos XOS avaliados. Além disso, os oligossacarídeos obtidos pela xilanase SM2 após hidrólise do farelo de arroz foram capazes de induzir uma melhor liberação de ácidos graxos de cadeia curta do que o coquetel enzimático comercial.

A liberação de ácidos graxos de cadeia curta é um indício que a bactéria láctica foi capaz de metabolizar os XOS e liberar produtos importantes para aumentar a funcionalidade e produção de alimentos, melhorar a saúde intestinal e combater infecções. Com isso o trabalho deixa perspectivas para uma avaliação *in vivo* do efeito prebiótico destes açúcares, na qual será possível avaliar as interações que ocorrem entre os XOS, a microbiota e fisiologia do animal. Além disso, expande-se as possibilidades de processos para aplicação da xilanase SM2 nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- AACHARY, A.A.; PRAPULLA, S.G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2-16, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 84, p. 19–35, 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 Sci Technol.**, v. 43, p.119–125, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.025>
- ALMEIDA, M. N.; MAINTAN-ALFENAS, G. P. Production of oligosaccharides by fungi ou fungal enzymes. **Encyclopedia of Mycology**, v. 2, p 385-393, 2021.
- ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 6, p. :4552–4558, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.112>
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 199, p. 546-554, nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.017>.
- ANDERSEN, J. M.; RODOLPHE BARRANGOU, M A HACHEM, M. A.; SAMPO LAHTINEN, S.; GOH, BIRTE, Y. G.; SVENSSON, B.; KLAENHAMMER. T. D. Transcriptional and functional analysis of galactooligosaccharide uptake by lacS in *Lactobacillus acidophilus*. **PNAS**, v. 108, n. 3, p. 17785-17790; 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114152108>.
- ARGYRI, A. A; POPOULOU, G. Z.; KARATZAS, K. A. G.; SAKALIDOU. E.; NYCHAS, G. J. E.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v.33, n. 2, p. 282-291, abr. 2013.

ÁVILA, P. F.; MARTINS, M.; COSTA, F. A. A.; GOLDBECK, R. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [S.L.], v. 24, p. 100234, out. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100234>.

AZELEE, N. I. W.; JAHIM, J. M.; ISMAIL, A. F., FUZI, S. F. Z. M.; RAHMAN, R. A.; ILLIAS, R. M. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. **Ind. Crop. Prod.**, v. 81, p. 11–19, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.038>

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 89-105, jan. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M., TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151–166, 1997.

BINNS, N. Probióticos, Prebióticos e a Microbiota Intestinal. **ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**, p. 33, 2014.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: na update in their metabolismo and genetics, **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 665-684, 2018.

<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

BUCKERIDGE, M. S., et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a ‘midway’ strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 4, p. 119–126, 2012.

BURUIANA, C. T.; GÓMEZ, B.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G. Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. **Lwt**, [S.L.], v. 77, p. 449-459, abr. 2017.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.083>.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; SULTAN, M. T. Xylanases in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22–31, 2008.

CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P.; 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**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 75-85, abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8060238>.

CHEN, G. Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. **Microbial Cell Fact**, v. 11, n. 111, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-111>

CHEN, H. H.; CHEN, Y. K.; CHANG, H. C.; LIN, S. Y. Immuno modulatory effects of xylooligosaccharides. **Food. Sci. Technol. Res.**, v. 18, p. 195, 2012

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylooligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **Int. J. Bio. Macromol.**, v. 31, p. 171, 2003.

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

DALY, R.; HEARN, M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.**, v. 18, p. 119–138, 2005.

Di BARTOLOMEO, F.; STARTEK, J. B.; VAN DEN ENDE, W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? **Phytother. Res.**, v.7, p. 1457–1473, 2013. <https://doi.org/10.1002/ptr.4901>

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 18, p. 2–17, 2009.

FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., DE REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201 – 212, 2000.

FERREIRA, J. G. **Purificação parcial e caracterização bioquímico-cinética de α -galactosidase de *Aspergillus terreus***. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. E. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915–8923, 2010.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current opinion in Food Science**, v 2, p. 106-117, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. p. 340 – 354, 2012.

GÄNZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiol**, v. 24, p. 128-138, 2007.

GE, X.; CHANG, C.; ZHANG, L.; CUI, S.; LUO, X.; HU, S.; LI, Y. **Conversion of Lignocellulosic Biomass Into Platform Chemicals for Biobased Polyurethane Application**. *Advances in Bioenergy*, 161–213, p. 2018. doi:10.1016/bs.aibe.2018.03.002

GHALLAB, AHMED. In vitro test systems and their limitations. **EXCLI J.**; v. 12, p. 1024–1026, dez. 2013.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401–1412, 1995. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>

GOMES, K. S.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; ANDRADE, L. G. A.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALFENAS, A. C.; REZENDE, S. T. Purification and Characterization of Xylanases from the Fungus *Chrysosporthe cubensis* for Production of Xylooligosaccharides and Fermentable Sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, p. 13, 2016.

GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Xylanases: A Biotechnological Potential Enzyme In: Hari, B. N. V.; Ramyadevi (Eds). **Phytopharmaceuticals and Drug Delivery Approaches**. 1 ed. Thanjavur, 2019, p. 13-15.

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size Worth \$17.2 Billion By 2027 | CAGR 7.1%. 2020. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market>> Acessado em: 27 de março de 2020.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; HIRSCH, J.; EBRINGEROVÁ, A. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3632-3641, 2010. A. <https://doi.org/10.1021/jf904508g>

GUPTA, V.K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, jul. 2016.

HO, A. L.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B.; CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 526–529, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.114>

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012. doi:10.1126/science.1223490

HUANG, J.; CHEN, D.; WEI, Y.; WANG, Q.; LI, Z.; CHEN, Y.; HUANG, R. Direct ethanol production from lignocellulosic sugars and sugarcane bagasse by a recombinant *Trichoderma reesei* strain HJ48. **The Scientific World Journal**, ID. 798683, 2014.

HUTKINS, R.W.; KRUMBECK, J. A.; BINDELS, L. B.; CANI, P. D.; FAHEY, G.; GOH, Y. J.; HAMAKER, B.; MARTENS, E. C.; MILLS, D. A.; RASTAL, R. A.; VAUGHAN, E.;

- SANDERS, M. E. Prebiotics: why definitions matter. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 37, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.001>
- JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Xylooligosaccharides: An economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 131-142, 2015.
- KARLSSON, E. N.; SCHMTIZ, E.; LINEARES-PASTÉN, J. A.; ADLERCREUTZ. Endoxylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 102, p. 9081–9088, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9343-4>.
- KRUMBECK, J. A.; MALDONADO-GOMEZ, M. X.; RAMER-TAIT, A. E.; HUTKINS, R, W. Prebiotics and synbiotics. **Curr. Opin. Gastroenterol**, p. 32, p.110– 119, 2016. <https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000249>
- KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Willians & Wilkins Inc, ed. 9, v. 1,2,3, 1984.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. FEMS. **Microbiol. Reviews**, v 23, p. 1093, 1999.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411–456, 1999.
- KUMAR, D.; KUMAR, S. S.; KUMAR, J., KUMAR, O. M.; MISHRA, S. V.; KUMAR, R.; MALYAN, S. K. Xylanases and their industrial applications: a review. **Biochem. Cell. Arch.**, v. 17, n. 1, p. 353-360, 2017.
- KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Applicability of thermos-alkali-stable and cellulose free xylanase from a novel thermos-halo-alkaliphilic *Bacillus haloduransin* producing xylooligosaccharides. **Biotechnol. Lett.**, v. 33, p. 2279–2285, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0698-1>
- KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Generation of xylooligosaccharides from microwave irradiated agroresidues using recombinant thermos-alkali-stable endoxylanase of the olyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* expressed in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 382–389, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.049>

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

LAM, K. L.; CHEUNG, P. C. K. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre**, v. 2, p. 45–64, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.09.001>

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J. Relationships between activities of xylanases and xylan structures, **Enzyme Microb. Technol**, v. 27, p. 89–94, 2000.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E., COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Res** 42:D490–D495, 2014.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEMC, R. A. P.; DE VRIESB, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60–67, 2016.

MÄKELÄINEN, 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. **Benefic Microbes**, v. 1, p. 81–91, 2010.

<https://doi.org/10.3920/BM2009.0025>

MANO, M. C. R.; NERI-NUMA, I. A.; SILVA, J. B.; PAULINO, B. N.; PESSOA, M. G.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 17-37, 20187.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>.

MELLITZER, A.; WEIS, R.; GLIEDER, A.; FLICKER, K. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. **Microb. Cell Fact**, v. 11, p. 61–71, 2012.

MESQUITA, P. L.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F.; LEITE, G.S. Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 295-302, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522013000400001>.

MHLONGO, N. N.; EBRAHIM, M.; SKELTON, A. A.; KRUGER, G. Dynamics of the thumb-finger regions in a GH11 xylanase *Bacillus circulans*: comparison between the Michaelis and covalent intermediate †. *RSC Advances*, v. 5, p. 82361-82394, set. 2015.

MONIZ, P.; PEREIRA, H.; DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. **Ind. Crop. Prod.**, v. 62, p. 460–465, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.020>

MORENO, F. J.; CORZO, N.; MONTILLA, A.; VILLAMIEL, M.; OLANO, A. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. **Curr. Opin. Food Sci.**, v. 13, p. 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.009>

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel, A. K. E Silva, S. S. (Eds). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass—techniques, applications and commercialization**: InTech, 2013, cap. 10.

MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosachharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochem.**, v. 41, p. 1913, 2006.

MUSSATO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, p. 587–597, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>

NERI-NUMA, I. A.; PAULINO, B. N.; PESSOA, M. G.; ABRAHÃO, M. R. E.; BUTION, M. L.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. Industrial additives obtained through microbial biotechnology: biosurfactants and prebiotic carbohydrates. In: GUPTA, V. K.; SHARMA, G. D.; TUOHY, M. G.; GAUR, R. (Eds). **The handbook of microbial bioresources**. CABI, Oxfordshire, 2003, p. 528–548. <https://doi.org/10.1079/9781780645216.0528>

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Ash in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42622)

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Extractives in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42619)

NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Protein Content in Biomass**. Ohio, 2008. (Technical Report NREL/TP-510-42625)

- NREL Laboratory Analytical Procedure (LAP). **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Colorado, 2012. (Technical Report NREL/TP-510-42618)
- OLIVEIRA, L. **Dossiê Técnico - Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC, Março/2014.
- OLIVEIRA, MARIANA BICALHO. **EXPRESSÃO DE XILANASES DE ASPERGILLUS NIDULANS EM *Pichia pastoris*: purificação, caracterização e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. 2015. Dissertação. (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- PAES, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications, **Biotechnol. Adv.**, v.30 p. 564–592, 2012.
- PASSARINHO, A. T. P.; VENTORIM, R. Z.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, E. B.; GUIMARÃES, V. M. Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. **J. Sci. Food Agric.**, v. [s.n], p. 7, 2018.
- PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotech.**, v. 2, p. 115–125, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x>
- PERSISTENCE MARKET RESEARCH. Xylanase Market: Global industry analysis and forecast 2016 – 2024. Disponível em: <<https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/xylanase-market.asp>>. Acesso em: 1 de agosto de 2020.
- POLIZELI, M. L. T. M., RIZZATTI, A. C. S., MONTIR, R., TERENCEZI, 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.
- PUCHART, V.; ŠUCHOVÁ, K.; BIELY, P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. **Biotechnology Advances**, v. 47, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107704>.
- QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 77, p. 435–441, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.016>

QIU, Z.; SHI, P.; LUO, H.; BAI, Y. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 46, p. 506–512, 2010.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174-187, 2018. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural byproducts: production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 62–71, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>

SANTIBÁÑEZ, L.; HENRÍQUEZ, C.; CORRO-TEJADA, R.; BERNAL, B. A.; SALAZR, O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, n. 117118, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118>.

SHI, H.; ZHANG, W.; LI, X.; HUANG, Y. A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca²⁺ from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. **Biotechnol. Biofuels**, v. 6, p. 26, 2013.

SILVERIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; GOMIDE, J. L.; REIS, F. P.; PILÓ-VELOSO, Dorila. Metodologia de extração do teor de extrativos em madeiras de Eucalipto. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.1009-1016, 2006.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, 6:174, 2016.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, p. 1417–1435, 2013. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass**. In: Laboratory Analytical Procedure – Technical Report NREL/TP-510-42619 January 2008.

SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples**. In: Laboratory Analytical Procedure – Technical Report NREL/TP-510-42621 March 2008.

SOLIS-CRUZ, B.; HERNANDEZ-PATLAN, D.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Use of Prebiotics as an Alternative to Antibiotic Growth Promoters in the Poultry Industry. IntchOpen, In: FRANCO-ROBELS, ELENA (org). **Prebiotics and Probiotics: Potential Benefits in Nutrition and Health**. [s/l]: Food Microbiology, 2019, p. DOI: 10.5772/intechopen.89053.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K. Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: an overview. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, [S.L.], p. 345-354, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63504-4.00023-2>

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33–64, 2002.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33–64, 2002.

TAIBI, Z.; SAOUDI, B.; BOUDELAA, M.; TRIGUI, H. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura sp*: strain Cpt20 isolated from poultry compost. **Appl. Biochem. Biotech**, v. 166, p. 663–679, 2012.

TOLNER, B.; SMITH, L.; BEGENT, R. H.; CHESTER, K A. Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 1006–1021, 2006.

TREVIZANO, L.M.; VENTORIM, R. Z.; DE REZENDE, S. T.; SILVA JUNIOR, F. P.; GUIMARÃES, V.M. Thermostability improvement of *Orpinomyces sp.* xylanase by directed evolution. **J. Mol. Catal. B.**, v. 81, p. 12–18, 2012.

VALLS, C.; PASTOR, J. F.I.; VIDAL, T.; RONCERO, B. M.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; VALENZUELA S. V. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylanby Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v.194, p. 43–50, 2018.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1477–1492, 2011.

VAN DEN BRINK, J.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; ZOU, G.; WANG, C.; ZHOU, Z.; GUIMARÃES, V. M.; VRIES, R. P. Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma*

reesei enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse.

Biotechnology Journal, v. 9, p. 1329–1338, 2014.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 913-933, mai. 2010..

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>.

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

Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 11, p. 387, 2000.

VENTORIM, R.Z.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; TREVIZANO, L.M.; DOS SANTOS CAMARGOS, A. M.; GUIMARÃES, V. M. Impact of the removal of N-terminal non-structured amino acids on activity and stability of xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 106, p. 312–319, 2018.

VENTORIM, RAFAELA ZANDONADE. **Aumento da estabilidade térmica da xilanase (XynA) de *Orpinomyces* sp. PC-2 por desenho racional**. Tese. (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

VIEIRA, D. S. **Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

WANG, G.; HUANG, X.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. Y. High phylogenetic diversity of glycosyl hydrolase Family 10 and 11 Xylanases in the sediment of lake Dabusu in China. **PLoS One**, v. 9, p. 112798, 2014.

WILSON, B; WHELAN, K. Prebiotic inulin-type fructans and galactooligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. **J. Gastroenterol Hepatol.**, v. 32, p. 64–68, 2017. <https://doi.org/10.1111/jgh.13700>

WU, B.; YU, Q.; CHANG, S.; PEDROSO, M. M.; GAO, Z.; HEB, B.; SCHENK, G. Expansin assisted bio-affinity immobilization of endoxylanase from *Bacillus subtilis* onto corncob residue: Characterization and efficient production of xylooligosaccharides. **Food Chemistry**, 282, 101–108, 2019.

XUE, J. L.; ZHAO, S.; LIANG, R. M.; YIN, X.; JIANG, S. X. L. H. S.; YANG, Q.; DUAN, C. J.; LIU, J. L.; FENG, J. X. A biotechnological process efficiently coproduces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 204, p. 130–138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.082>