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

AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE BANANA EM BIOPROCESSO INTEGRADO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

LAURA BEATRIZ DIAS FAGUNDES

PROF. DR. MARIANO MICHELON
Orientador

PROFA. DRA. JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2026

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

AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS DA CASCA DE BANANA EM BIOPROCESSO INTEGRADO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

LAURA BEATRIZ DIAS FAGUNDES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

PROF. DR. MARIANO MICHELON
Orientador

PROFA. DRA. JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2026

F156a

Fagundes, Laura Beatriz Dias
Avaliação de pré-tratamentos da casca de banana em bioprocesso integrado para produção de xilanases e xilo-oligossacarídeos / Laura Beatriz Dias Fagundes -2026.
66f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2026.

Orientador: Dr. Mariano Michelon
Co-orientadora: Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert

1. Engenharia e Ciência de Alimentos. 2. Complexo xilanolítico. 3. Enzimas fúngicas. 4. Prebiótico. 5. Resíduo lignocelulósico. 6. Xilana. I. Michelon, Mariano. II.Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros. III. Título.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Brenda Sequeira CRB10/1979

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Laura Beatriz Dias Fagundes, com orientação do Prof. Dr. Mariano Michelon e coorientação da Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, aprovada em 26 de fevereiro de 2026, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

gov.br
Documento assinado digitalmente
MARIANO MICHELON
Data: 02/03/2026 11:28:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Mariano Michelon – FURG

gov.br
Documento assinado digitalmente
CAROLINA SIQUEIRA FRANCO PICONE
Data: 02/03/2026 11:19:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Carolina Siqueira Franco Picone – UNICAMP

gov.br
Documento assinado digitalmente
LARINE KUPSKI
Data: 27/02/2026 16:01:28-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Larine Kupski – FURG

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Deise, por me permitir acreditar, por ser minha melhor amiga, por nunca duvidar de mim, mesmo quando eu duvidava. Muito obrigada por todos os abraços e todas as palavras de incentivo. Ao meu pai, Cleiton, por ser meu maior exemplo de força e me ensinar a ter coragem. Te ver lutar e superar os obstáculos me faz querer ter força de lutar também. Aos dois, serei eternamente grata, por me proporcionarem a vontade de voar e por me transmitir a certeza de que eu sempre terei um lugar seguro para retornar. Eu amo vocês.

À minha tia Ni, por nunca hesitar em ajudar. Às minhas madrinhas Cris e Lia, agradeço por me ensinarem o conceito de família e por todo o suporte ao longo dos anos. Ao meu afilhado, Enzo, que mesmo sem saber me inspira a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Aos meus amigos Cassio, Pedro e Lucas. Espero que saibam que ter pessoas tão singulares ao meu lado me inspira. Obrigada pelos nossos encontros, conversas e brincadeiras. Obrigada pela confiança que vocês projetam em mim. Quem tem um amigo tem tudo.

À minha dupla, Maria Alice. Desde o início, sabíamos que a pós-graduação era um trabalho individual (rs), mas isso nunca nos impediu de ajudarmos uma à outra. A rotina fica mais divertida na tua companhia, sou muito grata pela nossa amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mariano Michelon, expresso imensa gratidão por todo o apoio ao longo destes dois anos. Agradeço também, profundamente, à minha co-orientadora, Profª. Drª. Janaína Burkert.

À minha iniciante científica Giovanna, agradeço por sempre estar disposta a ajudar. Obrigada por se interessar pelo meu trabalho.

Aos professores do PPGECA, por todo o conhecimento e atenção fornecidos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram do meu desenvolvimento acadêmico, meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

RESUMO

A casca de banana é um resíduo agroindustrial abundante com potencial aplicação na obtenção de enzimas do complexo xilanolítico que, por sua vez, degradam a xilana liberando xilo-oligossacarídeos (XOS), compostos prebióticos. Assim, o objetivo deste trabalho é produzir, em bioprocesso integrado, endo-β-1,4-xilanase e XOS a partir da casca de banana residual por meio do fungo *Aureobasidium pullulans*. As cascas de banana foram secas, moídas e caracterizadas quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e composição lignocelulósica. Ademais, foi caracterizada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A despectinização foi realizada com solução oxalato de amônio a 0,5% (m/v), já a deslignificação foi conduzida por quatro pré-tratamentos distintos: NaOH a 1% (m/v) em autoclave (#1), H_2O_2 a 7,5% (v/v) em agitação orbital (#2), NaOH a 1% (m/v) em ultrassom (#3) e NaOH a 1% (m/v) em autoclave seguido de ultrassom (#4). O material pré-tratado foi caracterizado em termos de composição lignocelulósica, FTIR e MEV. O cultivo foi realizado com a casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #2 e #3, nas concentrações de 10, 30 e 50 g/L. Foram medidas as atividades enzimáticas de endo-β-1,4-xilanase e β-xilosidase, e os XOS foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O rendimento de despectinização foi de 16,3%. Os percentuais de deslignificação foram de 43,2% (#2) e 12,5% (#3). Os pré-tratamentos #1 e #4 resultaram em compactação do material, limitando sua utilização. A maior atividade enzimática foi observada no cultivo com 30 g/L de substrato lignocelulósico. As maiores atividades enzimáticas de endo-β-1,4-xilanase foram encontradas para os cultivos realizados com a casca de banana despectinizada (4,13 ± 0,17 U/mL) e deslignificada #2 (4,00 ± 0,24 U/mL), no tempo de 4 h. A partir deste tempo, a atividade tendeu ao seu decréscimo. Para a β-xilosidase, a atividade máxima foi observada para o cultivo com a casca de banana deslignificada pelo pré-tratamento #2, sendo esta de 4,00 ± 0,14 U/mL, em 36 h de cultivo. Este comportamento sugere alternância funcional entre as enzimas do complexo xilanolítico, visto que a β-xilosidase demonstrou-se de maneira tardia. Em cultivos com 10 g/L, a quantidade de hemicelulose foi insuficiente e, para 50 g/L, a carga sólida elevada limitou a transferência de oxigênio. Para a casca de banana submetida pelo pré-tratamento de deslignificação #2, a produção de XOS foi de 0,39 ± < 0,01 mg/mL, com fator de conversão de hemicelulose em XOS de 12,6 ± 2,3%. Sumariamente, o presente estudo evidenciou o potencial da casca de banana como substrato lignocelulósico, reforçando sua aplicação na biorrefinaria, de modo a obter produtos de valor agregado. Ademais, destacou a possibilidade de obtenção de enzimas do complexo xilanolítico e XOS em bioprocesso integrado, desprezando etapas de extração de enzima e purificação.

Palavras-chave: Complexo xilanolítico. Enzimas fúngicas. Prebiótico. Resíduo lignocelulósico. Xilana.

ABSTRACT

EVALUATION OF BANANA PEEL PRETREATMENTS IN AN INTEGRATED BIOPROCESS FOR THE PRODUCTION OF XYLANASES AND XYLO-OLIGOSACCHARIDES

Banana peel is an abundant agro-industrial residue with potential application in obtaining xylanolytic complex enzymes that, in turn, degrade xylan, releasing xylo-oligosaccharides (XOS), prebiotic compounds. Thus, the objective of this work is to produce, in a single bioprocess, endo-β-1,4-xylanase and XOS from residual banana peel using the fungus *Aureobasidium pullulans*. The banana peels were dried, ground, and characterized in terms of moisture, ash, protein, lipid content, and lignocellulosic composition. Furthermore, they were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Depectinization was performed with a 0.5% (w/v) ammonium oxalate solution, while delignification was conducted using four distinct pretreatments: 1% (w/v) NaOH in autoclave (#1), 7.5% (v/v) H_2O_2 in orbital agitation (#2), 1% (w/v) NaOH in ultrasound (#3), and 1% (w/v) NaOH in autoclave followed by ultrasound (#4). The pretreated material was characterized in terms of lignocellulosic composition, FTIR, and SEM. Cultivation was carried out with banana peel depectinized and delignified by pretreatments #2 and #3, at concentrations of 10, 30, and 50 g/L. The enzymatic activities of endo-β-1,4-xylanase and β-xylosidase were measured, and XOS were evaluated by High-Performance Liquid Chromatography. The depectinization yield was 16.3%. The delignification percentages were 43.2% (#2) and 12.5% (#3). Pretreatments #1 and #4 resulted in material compaction, limiting their use. The highest enzymatic activity was observed in the cultivation with 30 g/L of lignocellulosic substrate. The highest endo-β-1,4-xylanase enzymatic activities were found for the cultivations performed with depectinized banana peel (4.13 ± 0.17 U/mL) and delignified #2 (4.00 ± 0.24 U/mL), at 4 h. From this point onward, the activity tended to decrease. For β-xylosidase, the maximum activity was observed for the cultivation with banana peel delignified by pretreatment #2, being 4.00 ± 0.14 U/mL, at 36 h. This behavior suggests functional alternation between the enzymes of the xylanolytic complex, since β-xylosidase showed late activity. In cultivations with 10 g/L, the amount of hemicellulose was insufficient and, for 50 g/L, the high solid load limited oxygen transfer. For banana peel subjected to delignification pretreatment #2, XOS production was 0.39 ± < 0.01 mg/mL, with a hemicellulose to XOS conversion factor of 12.6 ± 2.3%. In summary, this study highlighted the potential of banana peel as a lignocellulosic substrate, reinforcing its application in biorefineries to obtain value-added products. Furthermore, it emphasized the possibility of obtaining xylanolytic complex and XOS enzymes in a single bioprocess, eliminating enzyme extraction and purification steps.

Keywords: Fungal enzymes. Lignocellulosic residue. Prebiotic. Xylan. Xylanolytic complex.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição proximal e lignocelulósica da casca de banana 32
Tabela 2 – Composição lignocelulósica da casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #1 NaOH a 1% em autoclave, #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, #3 NaOH a 1% em ultrassom e #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom..... 36
Tabela 3 – Rendimento mássico e percentual de deslignificação para os pré-tratamentos #1 NaOH a 1% em autoclave, #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, #3 NaOH a 1% em ultrassom e #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom..... 37
Tabela 4 – Atividade enzimática máxima de endo-β-xilanase e β-xilosidase para os cultivos de *A. pullulans* com a casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital e #3 NaOH a 1% em ultrassom, nas concentrações de 10, 30 e 50 g/L..... 50
Tabela 5 – Produção de XOS e fator de conversão de hemicelulose em XOS em 72 h de cultivo de *Aureobasidium pullulans* com casca de banana pré-tratada 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação das enzimas do complexo xilanolítico 14
Figura 2 – Estrutura de xilo-oligossacarídeos 16
Figura 3 – *Aureobasidium pullulans* 20
Figura 4 – Diagrama esquemático das etapas do projeto 24
Figura 5 – Diagrama esquemático das etapas de deslignificação 26
Figura 6 – Casca de banana (a) seca e moída, (b) despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom 34
Figura 7 – Pectina extraída da casca de banana 35
Figura 8 – Espectro de FTIR para a casca de banana bruta, despectinizada e para a pectina extraída 39
Figura 9 – Espectro de FTIR para as cascas de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom 40
Figura 10 – Micrografias da casca de banana (a) seca e moída, (b) despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom 42
Figura 11 – Cinética de variação de pH durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (b) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (c) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L 44
Figura 12 – Atividades enzimática e específica de endo-β-1,4-xilanase durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a, b) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (c, d) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (e, f) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L 46
Figura 13 – Atividades enzimática e específica de β-xilosidase durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a, b) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (c, d) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (e, f) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L 49
Figura 1.1 – Curva padrão de xilose para atividade enzimática de endo-β-1,4-xilanase 65
Figura 1.2 – Curva padrão de açúcares para composição lignocelulósica – 4 a 100 µg/mL .. 65
Figura 1.3 – Curva padrão de açúcares para composição lignocelulósica – 400 a 5000 µg/mL 65
Figura 1.4 – Curva padrão de BSA para método de Lowry 66
Figura 1.5 – Curva padrão de pNP para atividade enzimática de β-xilosidase 66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11

2. OBJETIVOS 13

2.1. OBJETIVO GERAL 13

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

3.1. ENZIMAS DO COMPLEXO XILANOLÍTICO 14

3.2. XILO-OLIGOSSACARÍDEOS 15

3.2.1. Síntese de xilo-oligossacarídeos 17

3.3. SÍNTESE DE ENZIMAS POR MICRORGANISMOS 18

3.3.1. Síntese de endo-β-1,4-xilanases por *Aureobasidium pullulans* 19

3.4. RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS 20

3.4.1. Pré-tratamentos 21

3.5. BIOPROCESSO INTEGRADO DE ENDO-β-1,4-XILANASE E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS 23

4. MATERIAL E MÉTODOS 24

4.1. MATERIAL 24

4.2. MÉTODOS 24

4.2.1. Preparo e caracterização do material lignocelulósico 24

4.2.2. Pré-tratamentos 25

4.2.3. Cultivo 27

4.2.3.1. Preparo do inóculo 27

4.2.3.2. Condições de cultivo 27

4.2.4. Determinações analíticas 28

4.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 28

4.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 28

4.2.4.3. Composição lignocelulósica 28

4.2.4.4. Atividade enzimática do complexo xilanolítico 30

4.2.4.5. Atividade específica 30

4.2.4.6. Quantificação dos produtos de hidrólise 30

4.2.5. Análise estatística 31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 32

5.2. DESPECTINIZAÇÃO E DESLIGNIFICAÇÃO 33

5.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR 38
5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 41
5.3. CULTIVO 42
5.3.1. pH 42
5.3.2. Atividade enzimática 45
5.3.3. Produção de xilo-oligossacarídeos 50

6. CONCLUSÃO 53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

APÊNDICE 1 65

1. INTRODUÇÃO

A destinação usual da maior parte dos resíduos gerados, como aterros sanitários ou queima, resulta em danos ambientais imensuráveis, bem como em perdas financeiras. Dessa forma, cresce expressivamente a carência de desenvolvimento de uma gestão sustentável, com utilização de recursos renováveis e implementação da bioeconomia circular. A biorrefinaria tem se destacado neste contexto, consistindo no processamento de biomassa cujo objetivo é obter múltiplos produtos de alto valor agregado como ingredientes alimentícios, rações, produtos químicos e energia (Liguori; Faraco, 2016; Venkatramanan *et al.*, 2021).

A escolha da biomassa é essencial para a biorrefinaria, visto que esta deve apresentar alta disponibilidade e baixo custo. Sendo assim, a biomassa lignocelulósica, oriunda dos setores agrícola, florestal e industrial, é considerada uma fonte rentável com potencial aplicação em processos químicos e/ou biotecnológicos (Morales *et al.*, 2020). Os compostos lignocelulósicos são majoritariamente empregados na indústria de combustíveis, porém, também podem ser matérias-primas na fabricação de enzimas, oligômeros, glicerol, xilitol, acetoína, entre outros (Ienczak *et al.*, 2021). As cascas de frutas são um exemplo de matérias-primas lignocelulósicas, sendo constituídas basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (Orozco *et al.*, 2014).

A casca de banana, uma das biomassas residuais mais abundantes, é considerada aplicável em bioprocessos (Singh *et al.*, 2023; Zehra; Syed; Sohail, 2020). Diversos estudos foram conduzidos para avaliar sua utilização como substrato: na produção de xilitol pela levedura *Komagataella pastoris* (Araújo; Costa; Freitas, 2021); na otimização da conversão em biobutanol por sistema de fermentação de co-cultura (Mishra *et al.*, 2020); na produção de lacase por *Trametes pubescens* (Osma; Herrera; Couto, 2007); na obtenção de ácido cítrico por fermentação de Koji (Karthikeyan; Sivakumar, 2010); entre outros. Contudo, pesquisas acerca de sua utilização na obtenção de enzimas do complexo xilanolítico e de xilo-oligossacarídeos são incipientes, com exemplo da sua utilização para obtenção de pectinases e xilanases a partir do cultivo de *Aspergillus fumigatus* (Zehra; Syed; Sohail, 2020) e para produção de enzimas degradadoras da parede celular utilizando *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (Rehman *et al.*, 2014).

As enzimas do complexo xilanolítico atuam na quebra da estrutura da xilana, um polissacarídeo composto de ligações β-1,4-glicosídicas entre monômeros de D-xilose. As endo-β-1,4-xilanases clivam estas ligações, liberando xilo-oligossacarídeos (XOS). Os XOS são ingredientes alimentares prebióticos, isto é, não são digeríveis e, no trato intestinal, apresentam

efeito benéfico em razão de seu metabolismo seletivo. Além disso, possuem propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e antialérgicas, não conferindo características sensoriais indesejáveis aos produtos alimentícios (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017).

Os fungos se destacam na produção de enzimas. Destes, o *Aureobasidium pullulans*, um fungo saprofítico e dimórfico extensivamente distribuído no mundo, é notável por produzir endo-β-1,4-xilanases com baixa atividade de β-xilosidases, responsáveis por liberar xilose, monossacarídeos com efeito inibitório na geração de XOS (Gautério *et al.*, 2018; Nieto-Domínguez *et al.*, 2017; Prasongsuk *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022). Entretanto, a utilização de substratos lignocelulósicos como a casca de banana na obtenção de enzimas pode apresentar como desafio a baixa acessibilidade dos microrganismos à hemicelulose. Esta encontra-se fortemente ligada com a lignina e pode ser mascarada pela pectina, sendo necessários pré-tratamentos para facilitar o processo (Huang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2017).

Os pré-tratamentos de deslignificação envolvem processos químicos e/ou físicos, sendo o alcalino diluído mais recomendado por não danificar a estrutura da hemicelulose e por não necessitar de condições severas de operação (Yegin, 2022). Já a despectinização se fundamenta na extração sequencial das frações pécticas, com água e soluções ácidas, alcalinas e salinas (Chen *et al.*, 2014). Os compostos oriundos destas etapas podem ser empregados em outras aplicações. A lignina pode ser submetida à despolimerização, resultando em produtos químicos finos, como compostos monoméricos fenólicos (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2021). Já a pectina é altamente utilizada como aditivo no setor alimentício devido a sua capacidade de formar gel (Zoghi *et al.*, 2021).

Geralmente, o processo de produção de XOS ocorre em duas etapas, onde a primeira consiste na obtenção e purificação da enzima e a segunda na hidrólise da xilana por ação desta. À vista disso, a aplicação do bioprocesso simultâneo pode ser vantajosa no que tange a diminuição do tempo e dos custos atrelados e o aumento do rendimento (Gong *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2022), Reddy e Krishnan (2014) e Gong *et al.* (2018) exploraram a obtenção de endo-β-1,4-xilanase e XOS através de um bioprocesso único. O primeiro estudo utilizou, como substratos, farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. Já o segundo aplicou distintas fontes de carbono – glicerol, glicose, arabinose, xilose, xilitol, xilana, XOS, celobiose e carboximetilcelulose. Contudo, estudos acerca deste processo ainda são incipientes. Por conseguinte, demonstram oportunidade de aprofundamento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o bioprocesso único de obtenção de endo-β-1,4-xilanase e xilo-oligossacarídeos (XOS), a partir da casca de banana residual pré-tratada, por ação do fungo *Aureobasidium pullulans*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a aplicação de diferentes pré-tratamentos de deslignificação e despectinização na casca de banana;
- Explorar o emprego da casca de banana como substrato lignocelulósico;
- Elucidar a obtenção de bioprodutos em cultivo submerso utilizando *Aureobasidium pullulans*;
- Avaliar a obtenção de endo-β-1,4-xilanases e XOS em bioprocesso integrado.

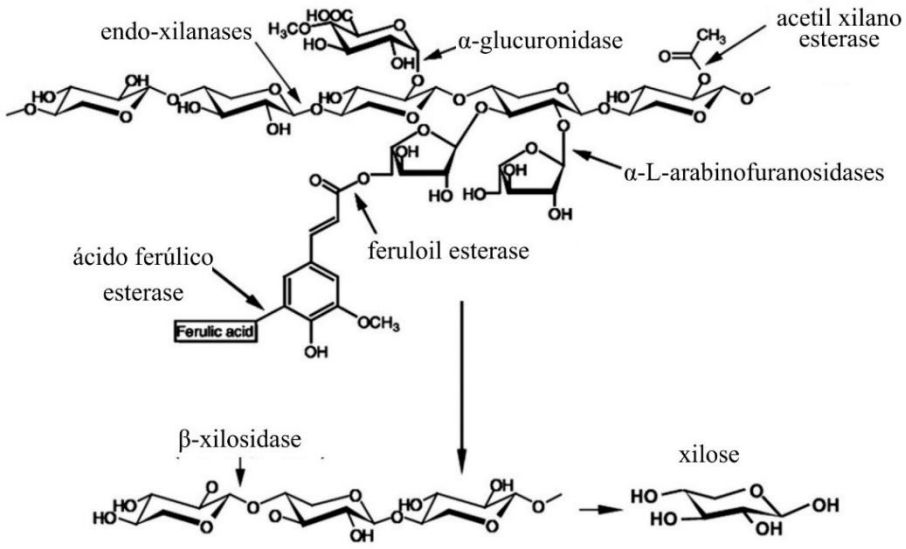
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ENZIMAS DO COMPLEXO XILANOLÍTICO

Enzimas são definidas como biocatalisadores altamente específicos que atuam na aceleração de reações químicas através da diminuição de sua energia de ativação (Kaushal *et al.*, 2021). Apresentam a capacidade de conversão do substrato em produto mantendo-se inalteradas ao fim do processo, sendo extensivamente utilizadas nas indústrias de papel, alimentos, rações, têxtil, farmacêutica, entre outras (Richhariya *et al.*, 2022). Segundo Grand View Research (2023), o mercado global de enzimas foi estimado em US$60,48 bi em 2023, com expansão prevista a uma taxa composta de crescimento anual de 4,9% de 2024 a 2030.

As enzimas do complexo xilanolítico compõem um sistema de enzimas específicas com modos particulares de ação. As endo-β-1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) e as β-xilosidases (EC 3.2.1.37), juntamente com enzimas acessórias α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α-glucosiduronase (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72) e feruloil esterase (EC 3.1.1.73) são pertencentes ao complexo (Gautério *et al.*, 2018; Yegin, 2022). Este conjunto de enzimas têm como função a quebra da estrutura complexa da xilana, um heteropolissacarídeo formado basicamente por ligações β-1,4-glicosídicas entre unidades de D-xilose. As endo-β-1,4-xilanases são responsáveis pelo rompimento de ligações internas da cadeia, enquanto as demais enzimas atuam nas cadeias laterais, conforme demonstrado na Figura 1. Como resultado, tem-se frações de xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilo-oligossacarídeos (XOS) (Martins *et al.*, 2023; Sohail *et al.*, 2022).

Figura 1 – Ação das enzimas do complexo xilanolítico



Fonte: Adaptado de Sun *et al.* (2012)

As xilanases demonstram, em sua maioria, atividade máxima nas faixas de pH e temperatura de 4,0 a 6,5 e 40 a 80ºC, respectivamente, com ponto isoelétrico de 4,0 a 10,3 e massa molar de 8,5 a 85 kDa (Moura *et al.*, 2021). Estas destacam-se em função de suas propriedades tecnológicas como a resistência ao etanol e a diversos íons metálicos, estabilidade em larga faixa de pH – 3,0 a 8,0 – e tolerância a soluções de cloreto de sódio de até 20% (Souza *et al.*, 2022). Dessa forma, possuem diversas aplicações na indústria alimentícia, atuando, por exemplo, na melhora de características sensoriais de sucos de fruta por meio da clarificação. Adicionalmente, em produtos fermentados, auxiliam na degradação do material lignocelulósico das paredes celulares dos cereais, liberando açúcares fermentescíveis e reservas nutricionais (Moura *et al.*, 2021).

Em produtos de panificação, as endo-β-1,4-xilanases são promissoras na diminuição de aditivos químicos como bromato de potássio e azodicarbonamida. Atuam substituindo-os como melhoradoras da massa, aprimorando características reológicas e de qualidade dos produtos assados, além de enriquecer nutricionalmente farelos e pães (Souza *et al.*, 2022). Recentemente, têm sido empregadas em estudos acerca da produção de XOS, oligômeros com potencial aplicação como ingredientes alimentares. Para além dos alimentos, podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis, como o etanol e no branqueamento de polpa de madeira na indústria de celulose e papel (Kaushal *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2022).

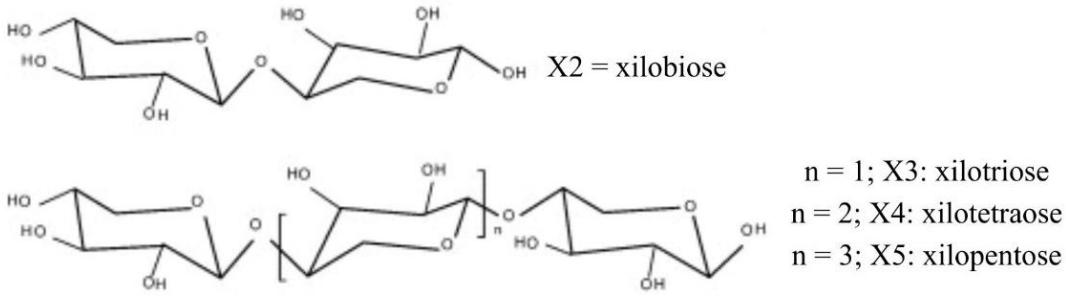
3.2. XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são produtos da degradação física, química ou enzimática da xilana. Sua estrutura é oligomérica, com cerca de 2 a 10 resíduos de D-xilose, unidos por ligações β-1,4-glicosídicas (Figura 2). Estes oligossacarídeos funcionais não digeríveis são considerados prebióticos, ou seja, substratos seletivamente utilizados por microrganismos hospedeiros de forma a conferir benefícios para a saúde (Chen *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2023).

Os XOS, após ingeridos, chegam intactos ao intestino grosso, onde são utilizados como fonte de energia pelas bifidobactérias *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei*, bactérias benéficas da microbiota intestinal (Huang *et al.*, 2022). Como consequência, promovem a síntese de metabólitos benéficos como os ácidos graxos de cadeia curta. Estes metabólitos regulam o metabolismo de lipídios e glicose, a absorção de minerais e atuam na diminuição do risco de câncer de cólon. Para mais, os XOS auxiliam na regulação intestinal e na melhora de respostas imunológicas, mitigam o crescimento de microrganismos patogênicos e previnem infecções e

alergias. Suas vantagens incluem ainda os efeitos anti-inflamatório, antiobesidade, antitumoral e antidiabetes (Yang *et al.*, 2023; Yegin, 2022).

Figura 2 – Estrutura de xilo-oligossacarídeos



Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2013)

Os prebióticos são utilizados principalmente no tratamento de doenças digestivas, por atuarem como moduladores dos probióticos no organismo humano e animal. Contudo, estudos demonstram que estes compostos podem fornecer efeitos positivos na saúde mental. Pesquisas documentam a eficácia dos prebióticos na supressão de espécies reativas de oxigênio, associadas a diversas doenças mentais incluindo ansiedade, depressão, esquizofrenia e Alzheimer, bem como a influência destes no eixo cérebro-intestino, impactando indiretamente em funções cerebrais (Divyashri *et al.*, 2021). De acordo com Palaniappan, Antony e Emmambux (2021), o mercado global de ingredientes prebióticos foi avaliado em US$3,4 bi em 2018, devendo seguir uma taxa composta de crescimento anual de 10,1%, chegando a US$8,34 bi até 2026.

Os fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e a inulina são, geralmente, os prebióticos com maior demanda. Contudo, os XOS adquiriram maior destaque em razão de suas propriedades vantajosas frente aos demais, como maior estabilidade em uma ampla faixa de pH – 2,5 a 8,0 – e altos valores de temperatura – até 100ºC (Yegin, 2022). Em adição às vantagens, os XOS não conferem características sensoriais indesejáveis, o que favorece sua aplicação como ingredientes funcionais (Nieto-Domínguez *et al.*, 2017).

No que diz respeito à dose diária efetiva, pesquisas em humanos adultos demonstram que, para XOS, o valor é de 1,4 g/dia, inferior aos valores de fruto- e galacto-oligossacarídeos, cuja dose efetiva mínima é de 10 g/dia. Dessa forma, os riscos de efeitos colaterais e os custos envolvidos na aquisição são menores (Lyu *et al.*, 2020). Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2018), os XOS são seguros para a população em geral como ingredientes sob

os usos e níveis de uso propostos. Além disso, são considerados GRAS – *Generally Recognized as Safe* – pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2019).

3.2.1. Síntese de xilo-oligossacarídeos

Os XOS podem ser sintetizados via auto-hidrólise, hidrólise química ou enzimática, cultivo microbiano ou ainda pela combinação entre estes métodos. A auto-hidrólise é um processo que se fundamenta no tratamento térmico com água líquida ou vapor d'água sob altas temperaturas e pressões. Como resultado tem-se a autoionização da água, que acarreta na geração de íons hidrônio e, consequentemente, no efeito de despolimerização da hemicelulose, formando XOS. Este método tem como vantagem a baixa ou nula necessidade de produtos químicos corrosivos, porém, necessita de altos níveis energéticos e equipamentos específicos, além de gerar hidrolisados com teores expressivos de xilose e lignina, acarretando em etapas extensas de purificação (Amorim *et al.*, 2019; Guido; Silveira; Kalil, 2019; Santibáñez *et al.*, 2021).

A hidrólise ácida tem como vantagens baixo tempo de reação, baixo custo e alta eficiência, empregando diversos ácidos, com destaque aos ácidos sulfúrico, acético e glucônico. Os principais efeitos negativos dos processos químicos envolvem a obtenção de subprodutos indesejáveis, como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos fórmico, levulínico, acético e compostos fenólicos. Estes provocam desafios em etapas posteriores de purificação e reduzem as propriedades prebióticas do produto, visto que inibem o crescimento de certos microrganismos benéficos (Amorim *et al.*, 2019; Guido; Silveira; Kalil, 2019; Santibáñez *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

Por sua vez, a hidrólise enzimática tem adquirido relevância por se tratar de um processo controlado, reprodutível, de alto rendimento, sem necessidade de equipamentos especiais, com condições amenas de pressão e temperatura e sem formação de compostos indesejáveis. Ademais, este método é vantajoso visto que gera XOS com menores graus de polimerização (2 a 6), o que potencializa seu consumo pela microbiota intestinal. A xilana representa uma considerável fração hemicelulósica em materiais de baixo custo, sendo reconhecida como uma fonte promissora na síntese de XOS (Divyashri *et al.*, 2021; Martins *et al.*, 2023). As principais enzimas utilizadas neste processo são as endo-β-1,4-xilanases. De forma a aumentar o rendimento de XOS, a atividade de β-xilosidases deve ser mínima, gerando a menor concentração possível de xilose, que apresenta efeito negativo na síntese dos xilo-oligômeros (Gautério *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2023; Palaniappan; Antony; Emmambux, 2021).

3.3. SÍNTESE DE ENZIMAS POR MICRORGANISMOS

A aplicação de enzimas de origem bacteriana e fúngica sofreu admirável expansão nos setores industriais graças a fatores como o custo-benefício, o tempo inferior de produção e a praticidade na otimização dos processos. Existem diversas espécies de microrganismos com potencial de síntese de enzimas do complexo xilanolítico, resultando na degradação da xilana em açúcares mais simples que são consumidos como fontes de carbono para seu próprio desenvolvimento (Dikson; Pinontoan, 2020; Pasin *et al.*, 2021).

As enzimas fúngicas, particularmente, apresentam considerável potencial para aplicações industriais devido à capacidade dos fungos de produzi-las em maior escala, com secreção extracelular que favorece o processo de recuperação. Ademais, estas enzimas possuem características físico-químicas específicas, com maior resistência a solventes orgânicos e estabilidade superior frente a temperaturas mais severas e amplas faixas de pH (Mousa *et al.*, 2022; Pasin *et al.*, 2021).

O rendimento da síntese enzimática por fungos é dependente das condições da fermentação e da necessidade de otimização para reduzir os custos atrelados à produção. A fermentação normalmente é conduzida de forma submersa ou em estado sólido (Mousa *et al.*, 2022). O cultivo em estado sólido tem como vantagens a ausência de água livre, visto que o próprio substrato fornece a umidade necessária para o crescimento do fungo; processamento posterior simplificado, pois descarta a necessidade de etapas adicionais como a desidratação; menor risco de contaminação e ambiente semelhante ao *habitat* natural do fungo resultando em maiores rendimentos à vista de uma taxa de produção superior (Barbieri *et al.*, 2022; Tyagi; Sharma, 2021).

Em contrapartida, o cultivo submerso apresenta como atributos eficácia expressiva no controle dos parâmetros de níveis de aeração e agitação, qualidade do oxigênio dissolvido, temperatura e pH do meio, propiciando a otimização e ampliação da escala de produção. O controle das condições operacionais é primordial, tendo em vista que a distribuição homogênea dos nutrientes e o fornecimento constante de oxigênio são indispensáveis. Atualmente, a maior parte das enzimas industriais são produzidas por meio do cultivo submerso, visto que o cultivo em estado sólido encarece a fabricação por exigir biorreatores específicos, além de limitar a transferência de oxigênio (Barbieri *et al.*, 2022; Thomas *et al.*, 2017).

Em relação à potencialização do processo, a seleção do substrato é de extrema importância, uma vez que as enzimas são estimuladas pelos produtos intermediários resultantes

de sua própria atividade. A xilana, o melhor indutor de enzimas do complexo xilanolítico, não apresenta capacidade de entrar em células microbianas por ser um polímero de alta massa molar. Em virtude disso, uma pequena porção de enzima gerada constitutivamente acarreta na degradação da xilana em fragmentos de menor massa molar, incluindo xilose, xilobiose, XOS, heterodissacarídeos, entre outros. Estes fragmentos atuam na regulação da biossíntese da xilanase, permitindo o acesso dos microrganismos e induzindo o aumento no rendimento (Bhardwaj; Kumar; Verma, 2019; Kulkarni; Shendye; Rao, 1999).

Adicionalmente, a otimização do meio de cultura é essencial para o rendimento do processo. O nitrogênio é indispensável para o funcionamento do metabolismo microbiano, sendo a escolha da fonte deste elemento determinante para seu desenvolvimento. A necessidade deste é dependente da espécie do microrganismo, sendo consideradas adequadas fontes como peptona, triptona, extrato de levedura e farelo de soja. O ajuste de aminoácidos, vitaminas e outros elementos também é influente na regulação da produção enzimática (Bhardwaj; Kumar; Verma, 2019).

3.3.1. Síntese de endo-β-1,4-xilanases por *Aureobasidium pullulans*

Embora fungos se destaquem na produção de altos teores de endo-β-1,4-xilanases, algumas espécies secretam, em conjunto, celulases e β-xilosidases, enzimas desvantajosas em certas aplicações, por exemplo, quando o objetivo é obter XOS. As β-xilosidases podem diminuir a síntese de XOS em consequência do acúmulo de xilose no meio, inibindo as xilanases. Todavia, o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* se sobressai por produzir endo-β-1,4-xilanases ao passo que secreta baixas atividades de β-xilosidases, resultando em maior rendimento de XOS e menor conteúdo de xilose residual (Gautério *et al.*, 2018).

A. pullulans (Figura 3) é caracterizado como um fungo saprofítico semelhante à levedura amplamente distribuído no mundo, em águas doces e marinhas, folhas e flores de plantas, solo e superfícies rochosas e artificiais. Este fungo apresenta capacidade de sintetizar melanina e armazená-la em suas paredes celulares, o que o faz ser conhecido popularmente como levedura preta. Além disso, esta espécie é reconhecida por sintetizar e secretar altas concentrações de pululana, um biopolímero formado por ligações glicosídicas α-1,6 entre unidades de maltotriose. O polímero possui alta solubilidade em água e solventes orgânicos, com numerosas aplicações nas indústrias farmacêutica, química, ambiental, cosmética e alimentícia (Prasongsuk *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

Figura 3 – *Aureobasidium pullulans*



Fonte: *University of Adelaide* (2025)

Os isolados ou linhagens de *A. pullulans* produzem ampla variedade de produtos naturais, a partir de diferentes substratos, com potenciais aplicações na área biotecnológica. Sendo assim, o fungo é considerado um notório produtor de biocompostos além da pululana e das xilanases, como amilases, proteases e lipases. Outrossim, tem como vantagem a resistência frente a bacteriófagos e a condições de estresse (Gautério *et al.*, 2021; Prasongsuk *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022)

3.4. RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

O descarte inadequado e o acúmulo de resíduos agrícolas e industriais afetam negativamente o ecossistema, agravando problemas de poluição. A fabricação de enzimas em larga escala tem como limitação o alto custo dos substratos necessários para a multiplicação dos microrganismos, visto que cerca de ⅓ do custo é atribuído ao meio de cultura. De modo a mitigar estas problemáticas, os resíduos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono para a síntese de xilanases e XOS. Posto isto, satisfazem os tópicos de consumo e produção responsáveis, ação contra a mudança global do clima e vida terrestre dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Estes consistem em um plano de ação global que visa, dentre outras questões socioambientais, promover a sustentabilidade, além de eliminar a fome e a pobreza extrema até 2030 (Bhardwaj; Kumar; Verma, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019; UNICEF, 2024).

A hemicelulose e a celulose representam mais da metade do peso seco de resíduos agroindustriais, constituindo o principal conteúdo de polissacarídeos desta biomassa, o que possibilita seu uso na fabricação de enzimas, biocombustíveis e outros metabólitos. Na fração

de hemicelulose, a xilana é o polissacarídeo mais abundante, favorecendo a obtenção de enzimas xilanolíticas (Phukon *et al.*, 2024; Rodrigues *et al.*, 2019).

Gautério *et al.* (2018) avaliou diferentes resíduos como substratos lignocelulósicos para obtenção de enzimas do complexo xilanolítico e XOS por meio do cultivo de *A. pullulans*, sendo estes: farelo de arroz, casca de arroz, casca de soja, engaço de uva e pergaminho de café. Para este fim, além dos resíduos citados, podem ser considerados substratos de baixo custo: sementes e cascas de frutas, bagaço de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho, farelo de trigo e efluentes da indústria de papel (Nasr *et al.*, 2013; Viayaraghayan *et al.*, 2019). Entretanto, desafios relacionados à sazonalidade, variação da composição e adequação do resíduo para ser empregado como matéria-prima ainda devem ser superados (Amorim *et al.*, 2019).

A banana é uma das frutas mais apreciadas globalmente em decorrência de seu valor nutricional, custo-benefício e digestibilidade. Segundo o IBGE (2025), foram produzidas 7,05 milhões de toneladas de banana no território brasileiro no ano de 2024. Como resultado de seu consumo doméstico e industrial expressivo, milhares de toneladas de casca de banana são descartadas. Esta é considerada um dos resíduos alimentares mais numerosos, sendo gerados em média 417 kg para cada tonelada de banana processada. A casca de banana é renovável e de baixo custo, além de apresentar altos teores de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais. Quantidades significativas de componentes lignocelulósicos são encontrados neste resíduo, em torno de 6 a 12% de lignina, 10 a 21% de pectina, 7 a 10% de celulose e 6 a 9,4% de hemicelulose, o que o torna um possível substrato na fermentação por diversos microrganismos (Silva *et al.*, 2024; Singh *et al.*, 2023; Zehra; Syed; Sohail, 2020).

Singh *et al.* (2023) avaliaram estratégias de produção de celulases microbianas fazendo uso de casca de banana como substrato. Zehra, Syed e Sohail (2020) estudaram a aplicação deste resíduo como substrato na síntese de xilanases e pectinases sob as fermentações submersa e em estado sólido de *Aspergillus fumigatus*. Além disso, Shah *et al.* (2005) relataram que resíduos provenientes da banana podem ser empregados em substituição de outros substratos na produção de enzimas celulolíticas. Existem trabalhos acerca da aplicação da casca de banana na produção de celulases, como os apresentados por Shah, Kalia e Patel (2015), bem como por Singh *et al.* (2023). Contudo, as informações de seu uso para xilanases não são exploradas satisfatoriamente, mostrando-se como oportunidade de aprofundamento dos estudos.

3.4.1. Pré-tratamentos

A xilana hemicelulósica está naturalmente presente na parede celular de vegetais em interações com a lignina, o que dificulta o acesso dos microrganismos à fração de hemicelulose. Outrossim, estes complexos impossibilitam a ação hidrolítica das enzimas na xilana para a formação de XOS. Por conseguinte, a fim de aumentar o rendimento destes processos, é recomendado realizar tratamentos, previamente à etapa de fermentação, que visam possibilitar a acessibilidade a estas frações (Huang *et al.*, 2022; Machado *et al*, 2021).

O pré-tratamento ácido pode ser realizado fazendo uso de ácidos orgânicos ou inorgânicos, diluídos ou concentrados. Sua duração geralmente está relacionada com a temperatura, podendo ser de 1 a 5 min acima de 180ºC e de 30 a 90 min para temperaturas abaixo de 120ºC. O objetivo é a hidrólise da hemicelulose, com solubilização e precipitação da lignina. Considerando a geração de produtos tóxicos e a corrosividade, não se recomenda este método para produzir XOS de grau alimentício, sendo necessárias extensivas lavagens para sua remoção antes da fermentação. Ademais, a hidrólise completa da xilana impossibilita a produção das xilanases (Kumar; Sharma, 2017; Yegin, 2022).

Já o pré-tratamento alcalino diluído é comumente empregado antes da hidrólise enzimática para fabricação de XOS, sendo conhecido como um processo de deslignificação. Este demonstra alta eficácia na quebra das ligações éster xilana-lignina e pode ser realizado em condições amenas de temperatura e pressão. Múltiplos reagentes podem ser aplicados, como amônia, peróxido de hidrogênio e hidróxidos de potássio, cálcio e sódio. A utilização de peróxido de hidrogênio é expressiva em indústrias de papel, por retirar grande parte da lignina e reter a celulose de maneira seletiva. No entanto, remove também parte da hemicelulose. A deslignificação com hidróxido de sódio, por outro lado, é considerada mais favorável devido à liberação da hemicelulose evitando sua fragmentação, aumentando ainda a porosidade da biomassa (Li *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2016; Yegin, 2022).

Os pré-tratamentos físicos têm como objetivo o incremento da área de superfície acessível de materiais lignocelulósicos. Suas estratégias envolvem a redução no tamanho da partícula ou a perturbação na regularidade da estrutura da biomassa. Dentre estes, destaca-se o ultrassom, cujos efeitos são sonoquímicos e mecanoacústicos. No primeiro, a geração de radicais oxidantes acarreta no ataque químico dos componentes lignocelulósicos. Já no segundo, a estrutura da superfície do material é modificada (Bhutto *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016).

Do mesmo modo, a pectina está presente de forma abundante na parede celular vegetal, representando cerca de 15,89 a 24,08% (Khamsucharit *et al.*, 2017). Na biomassa, a pectina se agrega à rede celulose-hemicelulose, mascarando os compostos lignocelulósicos através de

ligações de hidrogênio. Como resultado, impossibilita o acesso das enzimas, tornando o substrato recalcitrante à degradação. Dessa maneira, sua remoção é considerada fundamental para a utilização do material lignocelulósico no bioprocesso (Zhou *et al.*, 2017). De modo geral, a despectinização pode ocorrer por métodos físicos, biológicos ou químicos. Em escala laboratorial, geralmente se dá por extração sequencial das frações pécticas com água, soluções aquosas de sais de oxalato, solução diluída quente de ácido clorídrico e solução diluída fria de hidróxido de sódio (Chen *et al.*, 2014).

3.5. BIOPROCESSO INTEGRADO DE ENDO-β-1,4-XILANASE E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Wang *et al.* (2022) avaliaram a geração de xilanase e a degradação de xilana, simultaneamente, por meio de *Escherichia coli* recombinante, obtendo um produto sem xilose, eliminando operações de purificação subsequentes. Reddy e Krishnan (2014) estudaram a síntese simultânea de xilanase e XOS utilizando materiais lignocelulósicos como substrato por *Bacillus subtilis* KCX006 por meio da fermentação em estado sólido. Como resultado, a linhagem secretou endo-β-1,4-xilanases livre de β-xilosidases em resíduos agrícolas com acúmulo de XOS, e os níveis de xilanase obtida foram diretamente proporcionais aos níveis de XOS.

Gong *et al.* (2018) analisaram os mecanismos subjacentes associados à degradação da xilana por enzimas excretadas por *Aspergillus niger* concluindo que, apesar de a xilose ser o indutor principal das enzimas xilanolíticas, os XOS apresentam maior eficiência em desencadear a ativação de XlnR. Este é um ativador transcricional responsável por regular a expressão das xilanases, resultando em maiores atividades e menores tempos de produção. Dessa forma, é possível comprovar que a síntese simultânea de endo-β-1,4-xilanases e XOS oferece potencial para melhorar a expressão específica do microrganismo, o rendimento enzimático e o tempo de fermentação. Contudo, tendo em vista que o número de trabalhos neste contexto ainda é baixo, não sendo avaliada a utilização de *Aureobasidium pullulans* ou de biomassa lignocelulósica, principalmente casca de banana, como substrato, a exploração do tema representa potencial na otimização da obtenção destes produtos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

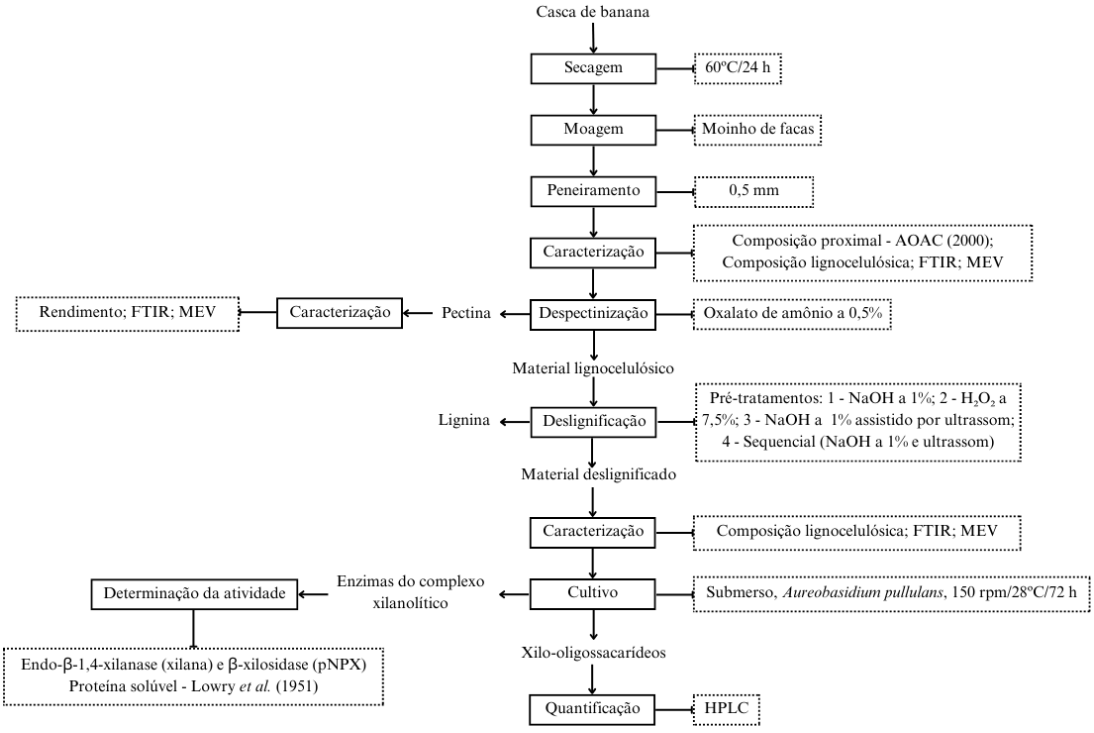
4.1. MATERIAL

A linhagem de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello e armazenada sob refrigeração em ágar Batata Dextrose no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações (FURG). As cascas de banana prata (*Musa* × *paradisiaca* L.) foram obtidas a partir de resíduos domésticos e armazenadas em sacos de polietileno sob congelamento. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. MÉTODOS

A Figura 4 representa o diagrama esquemático das metodologias realizadas no trabalho, desde o preparo do inóculo e do substrato ao emprego no bioprocesso de obtenção de endo-β-1,4-xilanase e xilo-oligossacarídeos.

Figura 4 – Diagrama esquemático das etapas do projeto



4.2.1. Preparo e caracterização do material lignocelulósico

As cascas de banana, mantidas previamente em sacos de polietileno sob congelamento a -18ºC, foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 60ºC durante 24 h

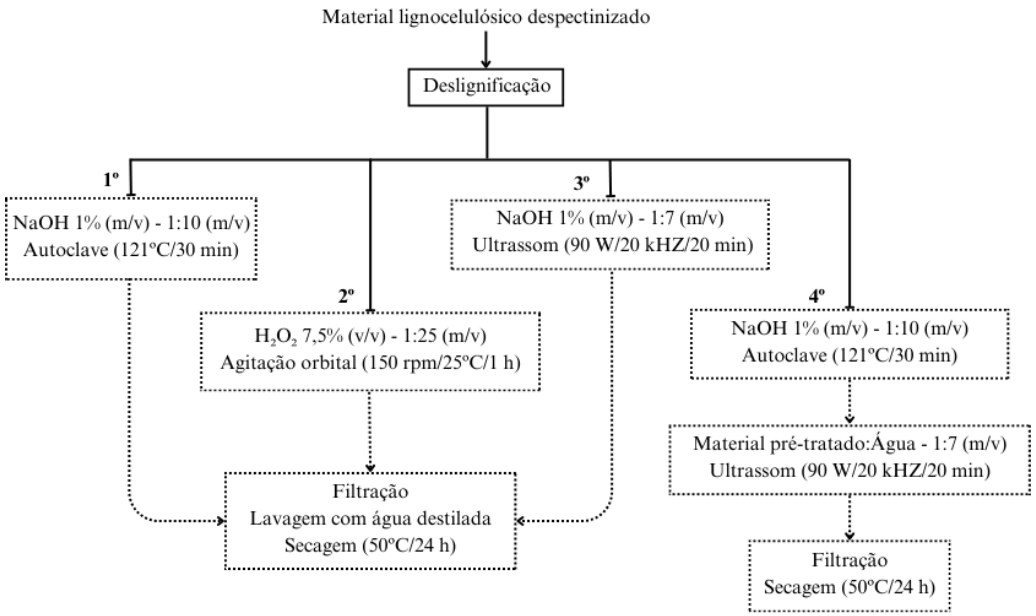
(Shakir *et al.*, 2020). Posteriormente, seu tamanho foi reduzido em moinho de facas até a obtenção de partículas de tamanho menor ou igual a 0,5 mm (Tyler 32) (Gautério *et al.*, 2018). O pó obtido foi armazenado a -18ºC. O material lignocelulósico foi analisado quanto a composição proximal de acordo com a metodologia disposta pela AOAC (2000): umidade (nº 950.46), proteínas (nº 920.87), lipídios (nº 920.85) e cinzas (nº 923.03). Os carboidratos foram estimados por diferença. Ademais, foram realizadas caracterizações quanto aos grupos funcionais, por FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier), conforme item 4.2.4.1 e quanto à composição lignocelulósica, em termos de celulose, hemicelulose e lignina, conforme item 4.2.4.2.

4.2.2. Pré-tratamentos

O pré-tratamento de despectinização foi realizado por extração sequencial com água destilada e solução de oxalato de amônio 0,5% (m/v). Ambas extrações tiveram proporção sólido/líquido de 1:30 (m/v) e foram conduzidas a 60 ºC durante 2 h, com agitação magnética. Além disso, cada agente de extração foi aplicado duas vezes. Ao fim de cada processo, o extrato líquido, com alto teor de pectina, foi separado do resíduo lignocelulósico por filtração (Chen *et al.*, 2014; Habibi *et al.*, 2004; Taboada *et al.*, 2010). Os extratos foram dialisados contra água destilada durante três dias, com membranas de diálise de 12 a 16 kDa, filtrados com membrana de 0,45 μm e, em seguida, liofilizados (Taboada *et al.*, 2010). O processo foi realizado em triplicata e avaliado em termos de rendimento, por meio da relação entre a massa inicial e a massa residual obtida. A pectina foi caracterizada em função dos grupos funcionais por FTIR e morfologia por MEV, conforme itens 4.2.4.1 e 4.2.4.2, respectivamente.

A deslignificação do substrato foi conduzida por quatro pré-tratamentos distintos, representados na Figura 2, sendo estes ultrassônico e alcalino, com hidróxido de sódio (NaOH) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme descrito por Machado *et al.* (2021).

Figura 5 – Diagrama esquemático das etapas de deslignificação



O primeiro pré-tratamento (#1) foi realizado com solução de NaOH 1% (m/v). Recipientes plásticos contendo casca de banana e a solução (1:10 m/v) foram submetidos à autoclave a 121ºC durante 30 min. O segundo pré-tratamento (#2) foi conduzido com H_2O_2 7,5% (v/v) e pH 11,5, ajustado com solução de NaOH 3 M. A casca de banana, juntamente com a solução (1:25 m/v), foi transferida para um frasco Erlenmeyer e submetida à agitação orbital a 150 rpm, a 25ºC, por 1 h. O terceiro pré-tratamento (#3) consistiu na utilização de NaOH, assistido por ultrassom. A solução de NaOH 1% (m/v) foi adicionada à casca de banana (1:7 m/v) e a mistura foi transferida para um homogeneizador ultrassônico Sonic 250 (Omni International Inc., Estados Unidos). As condições do banho ultrassônico foram 90 W, 20 kHz e 20 min, com etapas intercaladas de 2 min de ultrassom e 2 min de repouso. Após cada pré-tratamento, o resíduo sólido foi separado por filtração, lavado com água destilada até neutralidade e seco em estufa a 50ºC por 24 h. O último pré-tratamento (#4) consistiu em uma sequência, onde primeiramente foi aplicada a solução de NaOH 1% (m/v) à casca de banana (1:10 m/v) e a mistura foi autoclavada a 121ºC durante 30 min. Em seguida, foi preparada uma mistura com a casca de banana pré-tratada e água destilada (1:7 m/v). Esta foi submetida ao ultrassom nas mesmas condições citadas anteriormente. O resíduo sólido foi separado por filtração e seco em estufa a 50ºC por 24 h. Todos os pré-tratamentos foram realizados em triplicata. Ao fim, os resíduos sólidos foram submetidos à caracterização em termos de grupos funcionais por FTIR, morfologia por MEV e composição lignocelulósica, conforme itens 4.2.4.1, 4.2.4.2 e 4.2.4.3, respectivamente.

4.2.3. Cultivo

4.2.3.1. Preparo do inóculo

Inicialmente, o pré-inóculo foi obtido por meio da transferência de uma alçada de células de *A. pullulans* para tubos contendo 5 mL de caldo estéril composto de 10,0 g/L de xilose, 6,7 g/L de base nitrogenada de levedura, 5,0 g/L de sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$], 2,0 g/L de asparagina e 5,0 g/L de fosfato de potássio (KH_2PO_4). A esterilização do meio foi efetivada em autoclave, a 121ºC por 15 min, com exceção da xilose, que foi esterilizada por filtração de membrana de acetato de celulose de 0,22 μm (Millipore, Burlington, Estados Unidos). O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 1 M e os tubos com pré-inóculo foram incubados por 24 h a 28ºC. Para obtenção do inóculo, o volume do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL com 45 mL do mesmo caldo estéril. O desenvolvimento do inóculo foi conduzido em agitação orbital, a 150 rpm e 28ºC, por 24 h (Gautério *et al.*, 2021).

4.2.3.2. Condições de cultivo

O cultivo submerso foi conduzido em condições previamente estabelecidas por Gautério *et al.* (2021) e Machado *et al.* (2021). Em frascos Erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 150 mL de meio estéril com 10, 30 ou 50 g/L do substrato lignocelulósico pré-tratado, 1,0 g/L de extrato de levedura, 5,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$. O meio teve seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico (HCl) 1 M. Quatro cultivos foram realizados fazendo uso da casca de banana despectinizada submetida aos diferentes processos de deslignificação. Além destes, foi feito um ensaio controle, com a casca de banana submetida apenas à despectinização. Posteriormente, os Erlenmeyers foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121ºC e inoculados com 2% (v/v) do inóculo com densidade óptica de 0,8 a 620 nm. Após, foram mantidos em agitação orbital a 150 rpm e 28ºC, por 72 h. Alíquotas de 5 mL foram coletadas assepticamente em intervalos nos tempos de 4, 8 e 12 h e, posteriormente, de 12 em 12 h, sendo centrifugadas a 2948 × g, a 4ºC, por 10 min e o sobrenadante foi coletado. A partir deste, foi determinado o pH em potenciômetro digital (Quimis Q400MT, São Paulo, Brasil). Determinou-se, também, a atividade enzimática e a quantificação dos produtos de hidrólise, segundo os itens 4.2.4.4 e 4.2.4.5, respectivamente.

4.2.4. Determinações analíticas

4.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais e as estruturas químicas da pectina, celulose, hemicelulose e lignina presentes no material lignocelulósico antes e após os pré-tratamentos de despectinização e deslignificação foram avaliados por espectrofotômetro FTIR (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão). O material em pó foi preparado como *pellets* com brometo de potássio (KBr) e os espectros foram coletados na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} a uma resolução de 4 cm^{-1}, com 40 scans. Os espectros formados foram então comparados aos dispostos na literatura, de modo a identificar os grupos funcionais e avaliar os efeitos dos pré-tratamentos (Mirzaee *et al.*, 2023; Orozco *et al.*, 2014).

4.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características microestruturais da farinha de casca de banana bruta e submetida aos tratamentos de despectinização e deslignificação foram analisadas por meio de microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610LV, Jeol, Japão), segundo metodologia proposta por Machado *et al.* (2021). No preparo das amostras, estas foram pulverizadas com ouro (Sputter, Denton Vacuum Desk V, Estados Unidos), a tensão de operação foi de 15 kV e as micrografias foram obtidas com ampliação de 1000×.

4.2.4.3. Composição lignocelulósica

A fim de determinar a composição lignocelulósica, as farinhas da casca bruta e submetida aos pré-tratamentos de despectinização e deslignificação foram submetidas à hidrólise ácida, com emprego de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 72% (m/m), seguindo a proporção de 1:10 (m/v). No decorrer da hidrólise, a mistura foi mantida em banho termostático com agitação vigorosa a 30ºC por 1 h. Após esta etapa, o ácido foi diluído, com água deionizada, a 4% (m/m) e, em seguida, a solução resultante foi autoclavada a 121ºC durante 1 h. Como resultado, obteve-se um hidrolisado ácido, posteriormente filtrado em membrana previamente tarada Whatman nº 1 (Milipore, Burlington, Estados Unidos) e o conteúdo retido, isto é, a lignina insolúvel, foi transferida para secagem em estufa a 80ºC, até atingir peso constante (Machado *et al.*, 2021). A lignina solúvel presente no filtrado foi determinada pela medida da absorbância em espectrofotômetro da amostra diluída, nos comprimentos de onda de 215 e 280

nm (Goldschmid, 1971). Os teores de lignina solúvel e insolúvel foram calculados a partir das Equações 1 e 2, respectivamente. O conteúdo de lignina total foi determinado pela soma destes.

$$LS\ (\%) = \frac{\left((4{,}538\ .\ A_{215}) - A_{280}\right).\ FD\ .\ 100}{300\ .\ M_{i,\ amostra}} \qquad (1)$$

$$LI\ (\%) = \frac{M_{f,\ amostra}\ .\ 100}{M_{i,\ amostra}} \qquad (2)$$

Onde LS e LI correspondem aos teores de lignina solúvel e insolúvel, respectivamente; FD ao fator de diluição, $M_{i,\ amostra}$ e $M_{f,\ amostra}$ às massas inicial e final do resíduo sólido, respectivamente; e A_{215} e A_{280} às absorbâncias lidas a 215 e 280 nm.

Os açúcares redutores contidos no filtrado foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de coluna (CTO-20A). A fração solúvel inicialmente foi filtrada fazendo uso de membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,22 μm (Millipore, Estados Unidos). Desta, foram injetados 20 μL de maneira automática. A coluna Aminex (HPX-87H) (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) foi eluída no modo isocrático com fluxo de 0,6 mL/min de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM (Mili-Q, Milipore, Estados Unidos) a 45ºC com tempo de corrida de 15 min. Curvas de calibração foram elaboradas com padrões de glicose, celobiose, xilose e arabinose (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Os conteúdos de hemicelulose, como xilose e arabinose, e celulose, como glicose e celobiose, foram estimados a partir de uma correção anidra de 0,88 para as pentoses, 0,90 para hexoses e 0,95 para celobiose, conforme Equações 3 e 4 (Gautério *et al.*, 2018).

$$C_{anidro} = C_x\ .\ CR_{anidro} \qquad (3)$$

$$\text{Hemicelulose ou celulose } (\%) = \frac{C_{anidro}\ .\ V_{filtrado}\ .\ \frac{1\ g}{1000\ mg}}{M_{i,\ substrato}} \qquad (4)$$

Onde C_{anidro} corresponde à concentração de hemicelulose ou de celulose corrigida, em mg/mL; C_x à concentração dos monossacarídeos e dissacarídeo, em mg/mL; CR_{anidro} ao fator

de conversão dos açúcares; $V_{filtrado}$ ao volume de filtrado; e $M_{i,\ substrato}$ à massa inicial do substrato.

4.2.4.4. Atividade enzimática do complexo xilanolítico

As atividades enzimáticas da endo-β-1,4-xilanase e da β-xilosidase foram determinadas segundo Gautério *et al.* (2021). A atividade da endo-β-1,4-xilanase foi analisada por incubação, a 50ºC por 5 min, de 1,2 mL de xilana de faia a 1% (m/v) em tampão citrato 50 mM e pH 5,3, bem como 0,3 mL de preparação enzimática diluída. Em sucessão à ocorrência da reação enzimática, adicionou-se ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), sendo a mistura submetida a 100ºC por 5 min. Os açúcares redutores resultantes da hidrólise da xilana foram quantificados por análise espectrofotométrica com comprimento de onda de 540 nm, tomando a xilose como padrão. À vista disso, definiu-se uma unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima necessária na liberação de 1 μmol de xilose por minuto nas condições descritas.

A atividade da β-xilosidase foi avaliada através da incubação, a 50ºC por 30 min, de 0,2 mL de solução enzimática diluída e 0,8 mL de ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX) a 2% (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) em tampão de acetato de sódio 50 mM a pH 4,8. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (m/v). A quantificação do ρ-nitrofenol (pNP) liberado deu-se por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 410 nm e correlação com a respectiva curva de calibração. Por conseguinte, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária na liberação de 1 μmol de pNP por minuto nas condições descritas.

4.2.4.5. Atividade específica

Para determinação da atividade específica das enzimas endo-β-1,4-xilanase e β-xilosidase, em U/mg, foi realizada a razão entre a atividade enzimática obtida no item anterior, em U/mL, e o conteúdo de proteína solúvel (mg/mL). Este foi determinado através do método de Lowry *et al.* (1951), considerando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.2.4.6. Quantificação dos produtos de hidrólise

A quantificação dos produtos de hidrólise seguiu o método descrito por Gautério *et al.* (2021), por HPLC (Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de coluna (CTO-20A). Neste método, 20 μL do hidrolisado previamente filtrado foram injetados de maneira automática (SIL-20AHT). A coluna Aminex (HPX-42A) (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) foi eluída no modo isocrático com fluxo de 0,4 mL/min de água ultrapura (Mili-Q, Milipore, Estados Unidos) a 50ºC com tempo de corrida de 40 min. Foram construídas curvas de calibração, na faixa de 1 a 10 mg/mL, para xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose (Megazyme, Irlanda). Além disso, foi calculado o fator de conversão de hemicelulose em XOS, considerando o conteúdo de hemicelulose adicionado no meio e o teor de XOS produzido após 72 h de cultivo.

4.2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e à comparação por meio do teste de Tukey, ou ao teste *t* a 95% de confiança ($p < 0,05$), a partir do *software* Statistica 7.0 (Statsoft, Estados Unidos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A caracterização proximal e lignocelulósica da casca de banana é fundamental de modo a avaliar seu potencial de aplicação em cultivos para obtenção de bioprodutos. À vista disso, a Tabela 1 apresenta a composição deste resíduo.

Tabela 1 – Composição proximal, lignocelulósica e percentual de pectina da casca de banana residual

Composição*	**Média ± Desvio padrão (%)**
Umidade	2,12 ± 0,21
Lipídios	6,44 ± 0,76
Proteínas	8,55 ± 0,35
Cinzas	13,8 ± 0,71
Carboidratos	71,2
Celulose	15,2 ± 1,58
Hemicelulose	7,98 ± 1,37
Lignina	21,5 ± 6,49
Pectina	16,3 ± 0,29

*Resultados em base seca, com exceção da umidade

O baixo conteúdo de umidade, de 2,12 ± 0,21%, foi resultante do processo de secagem no preparo do material lignocelulósico, vantajoso para etapas posteriores, como a moagem, visando favorecer a reprodutibilidade, e para evitar degradação microbiológica. A fração de lipídios, de 6,44 ± 0,76%, situou-se dentro da faixa apresentada por Emaga *et al.* (2007), que determinou valores entre 2,2 e 10,9% para diferentes variedades de cascas de banana e de banana-da-terra. Sahoo e Lenka (2024) apresentaram um teor lipídico semelhante, de 6,7%, para a farinha da casca. No que se refere à composição proteica, o valor determinado de 8,55 ± 0,35% foi corroborado pela faixa de 6,3 a 11,2%, determinada por Emaga *et al.* (2007).

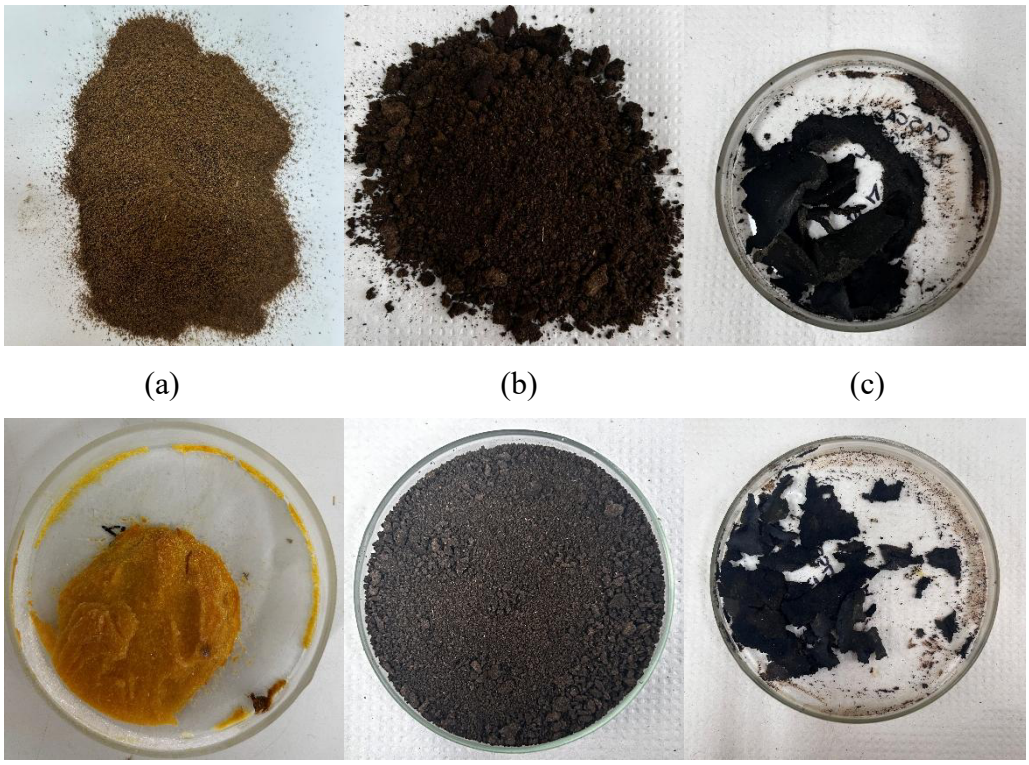
Ademais, Khan *et al.* (2024) apresentou um resultado de 8,1% de proteínas em cascas de banana.

O teor de cinzas foi de 13,8 ± 0,71%, resultado próximo aos determinados por Esonu *et al*. (2024), de 12,1 ± 0,09% e por Araújo, Costa e Freitas (2021), de 13,4 ± 1,7%. Segundo Esonu *et al.* (2024), este valor sugere rica composição mineral, podendo conter elementos essenciais como cálcio, potássio e magnésio. De acordo com Ndarubu *et al.* (2021), o percentual de carboidratos determinado para a casca de banana foi de 70,8%, mostrando-se em consonância com o valor determinado no presente trabalho, de 71,2%. Tendo em vista que a fração hemicelulósica, pertencente aos carboidratos, é a principal precursora na obtenção de enzimas do complexo xilanolítico e xilo-oligossacarídeos, a abundância deste componente reforça o potencial da casca de banana como substrato. Abdullah e Amalia (2023) apresentaram resultados semelhantes para carboidratos, com faixa variando de 62,6 a 87,9%, a depender da variedade da banana. Dentro dos carboidratos, a composição lignocelulósica demonstrou-se alinhada à apresentada em estudos prévios. Valores próximos de celulose e hemicelulose foram observados por Laothanachareon, Bunterngsook e Champreda (2022), com teores de 11,4% e 7,28%, respectivamente. Dhyani e Bhaskar (2018), relataram percentuais respectivos de 13,2%, 14,8% e 14,0% para celulose, hemicelulose e lignina de resíduos de banana. De acordo com este estudo, para a biomassa lignocelulósica, foram reportados conteúdos de lignina de até 40%. Segundo Emaga *et al.* (2010), diferenças nos cultivares e grau de maturação influenciam na fração de carboidratos, explicando a variação nos teores apresentados. Fatores como condições de cultivo e alterações na etapa de secagem também são influentes.

5.2. DESPECTINIZAÇÃO E DESLIGNIFICAÇÃO

As Figuras 6, (a) a (f), apresentam a casca de banana resultante do preparo por secagem, moagem e pré-tratamentos de despectinização e deslignificação, respectivamente.

Figura 6 – Casca de banana (a) seca e moída, (b) despectinizada com $(NH_4)_2C_2O_4$ a 0,5% e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom



(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

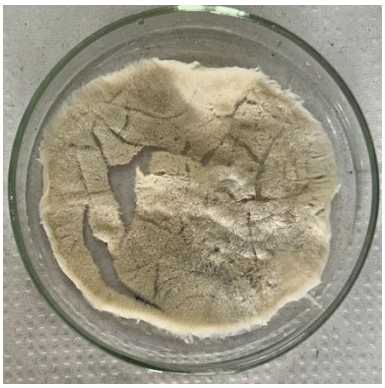
O resultado do processo de secagem e moagem da casca de banana foi um pó fino de coloração marrom. A diminuição da granulometria em partículas de tamanho uniforme favorece a aplicação dos pré-tratamentos posteriores, aumentando a área superficial de acesso dos agentes químicos e físicos ao material lignocelulósico. Os pré-tratamentos de despectinização e deslignificação acarretaram no escurecimento do material, com exceção do tratamento de deslignificação #2 conduzido com H_2O_2. A coloração amarela, observada na Figura 6 (d) pode ser explicada pela ação descolorante do peróxido de hidrogênio, cujas soluções em pH alcalino são altamente utilizadas para o branqueamento de polpas de madeira (Cabrera *et al.*, 2014). Conforme relatam Vera-Loor *et al.* (2023), as estruturas responsáveis pela coloração da polpa reagem com o radical hidroperoxil em temperaturas moderadas, acarretando em sua oxidação seletiva e, consequentemente, quebra dos compostos cromóforos.

As cascas de banana submetidas ao pré-tratamento de deslignificação com hidróxido de sódio em autoclave, por sua vez, tornaram-se compactas e de notável rigidez, como mostram

as Figuras 6 (c) e (f), impossibilitando a redução de sua granulometria por maceração e moagem. O hidróxido de sódio atua quebrando as ligações entre a lignina e a matriz polissacarídica, aumentando a porosidade e a área superficial da biomassa. Em conjunto com altas temperaturas, este auxilia na diminuição das estruturas amorfas, expondo a celulose cristalina, o que pode explicar a mudança na integridade física do material (Obeng; Premjet; Premjet, 2019).

A etapa de despectinização conduzida com água destilada foi ineficaz, não havendo pectina recuperável após o processo de liofilização. Contudo, o rendimento da segunda etapa de extração, conduzida com oxalato de amônio a 0,5% (m/v) foi de 16,3 ± 0,29% (Tabela 1). Este resultado é considerado satisfatório, visto que Emaga *et al.* (2008) apresentou rendimentos variando de 10,3 a 21,7% para o substrato lignocelulósico. Pectinas de alta metoxilação, geralmente alocadas na lamela média das paredes celulares, são facilmente extraídas com água, logo, a insuficiência na remoção pode indicar baixa concentração destas na amostra. Em contrapartida, os íons oxalato agem como quelantes, solubilizando as frações de pectina de baixa metoxilação por meio da quelação de íons cálcio (Taboada *et al.*, 2010). A pectina liofilizada pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 – Pectina extraída da casca de banana



Em relação à composição lignocelulósica, os resultados para as cascas de banana pré-tratadas estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição lignocelulósica da casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #1 NaOH a 1% em autoclave, #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, #3 NaOH a 1% em ultrassom e #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom

Pré-tratamento	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Despectinização	$15,5 \pm 0,88^{a}$	$9,27 \pm 0,45^{a}$	$49,0 \pm 4,53^{b}$
Deslignificação			
#1	$15,2 \pm 4,15^{a}$	$7,23 \pm 0,61^{b}$	$49,2 \pm 10,78^{b}$
#2	$13,3 \pm 1,81^{a}$	$10,3 \pm 0,31^{a}$	$27,8 \pm 3,97^{c}$
#3	$15,7 \pm 0,31^{a}$	$10,1 \pm 0,22^{a}$	$42,9 \pm 5,29^{b}$
#4	$11,1 \pm 0,99^{a}$	$7,47 \pm 0,29^{b}$	$78,0 \pm 6,82^{a}$

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores da mesma coluna ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

A partir da Tabela 2 foi possível observar que o conteúdo de celulose se manteve estatisticamente igual em todas as amostras. Isto indica maior resistência deste polissacarídeo. Segundo Kim (2018), a combinação do tratamento alcalino com o tratamento térmico atua na extração de lignina ao passo que pode aumentar o teor de celulose. Outrossim, pré-tratamentos alcalinos, de acordo com Obeng, Premjet e Premjet (2019) podem acarretar no aumento da área superficial e porosidade da celulose e na diminuição de sua cristalinidade, interferindo apenas em sua estrutura, tornando-a menos recalcitrante, e não em seu conteúdo. No que se refere à hemicelulose, os teores para as amostras deslignificadas pelos pré-tratamentos #2 e #3 não se diferiram significativamente da amostra despectinizada. Estes pré-tratamentos foram realizados em condições brandas de pressão e temperatura, sendo assim, não danificaram sua estrutura. Em contrapartida, a fração hemicelulósica das amostras dos pré-tratamentos de deslignificação #1 e #4 diminuíram significativamente. As hemiceluloses constituem um grupo de polissacarídeos amorfos, de baixa massa molar e ramificados, demonstrando maior sensibilidade ao ataque alcalino em comparação com a celulose (Xu *et al.*, 2010).

No que se refere à composição de lignina, notavelmente, o pré-tratamento 2 foi eficiente em sua redução significativa. Os pré-tratamentos #1 e #3 não demonstraram diferença significativa, ao passo que o pré-tratamento #4 apresentou um conteúdo superior. Esta superestimação é atribuída à rigidez do material pré-tratado, oriunda da combinação dos tratamentos alcalino e ultrassônico com condições severas de pressão e temperatura. No decorrer da análise de lignina insolúvel, o material apresentou-se com compactação excessiva, o que dificultou o acesso do ácido sulfúrico concentrado na etapa de hidrólise ácida. Como resultado, a degradação das frações polissacarídicas foi insuficiente. Sendo assim, o valor

obtido não reflete um aumento real desta composição, consistindo na consequência de uma limitação analítica. O rendimento mássico dos pré-tratamentos e o percentual de deslignificação, calculado a partir do teor de lignina do material despectinizado, estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento mássico e percentual de deslignificação para os pré-tratamentos #1 NaOH a 1% em autoclave, #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, #3 NaOH a 1% em ultrassom e #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom

Pré-tratamento	Rendimento mássico (%)	Deslignificação (%)
#1	$29,1 \pm 11,1^{b}$	-
#2	$79,2 \pm 3,44^{a}$	$43,2^{a}$
#3	$83,1 \pm 1,31^{a}$	$12,5^{b}$
#4	$30,2 \pm 2,77^{b}$	-

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores da mesma coluna ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

O rendimento mássico refere-se à quantidade de material obtido após a deslignificação, correlacionando as massas inicial e final. Este foi menor para os pré-tratamentos #1 e #4, considerando que sua severidade acarretou na alteração da estrutura e na perda de material, que ficou aderido à superfície das placas de Petri, onde foi submetido à secagem. Para mais, estes tratamentos podem ter resultado na remoção de outros compostos, como a hemicelulose, conteúdo de cinzas, compostos fenólicos, dentre outros. Os rendimentos mássicos dos pré-tratamentos #2 e #3 foram considerados satisfatórios, havendo maior recuperação de material pré-tratado.

A aplicação de peróxido de hidrogênio no processo de deslignificação tem como vantagem a utilização de produtos químicos facilmente disponíveis, não prejudicando o meio ambiente em baixas concentrações. Adicionalmente, possibilitam a operação em condições brandas de temperatura e pressão, sem necessidade de reatores específicos (Cabrera *et al.*, 2014). Estudos prévios demonstram que, de modo a aumentar a eficácia do tratamento, o pH ótimo é de 11,5. Nesta reação, os radicais derivados da decomposição do H_2O_2, em meio alcalino, atuam nas cadeias laterais da lignina, fragmentando sua macroestrutura e, por

consequência, resultam na despolimerização desta molécula em compostos de menor peso molecular (Sun *et al.*, 2000).

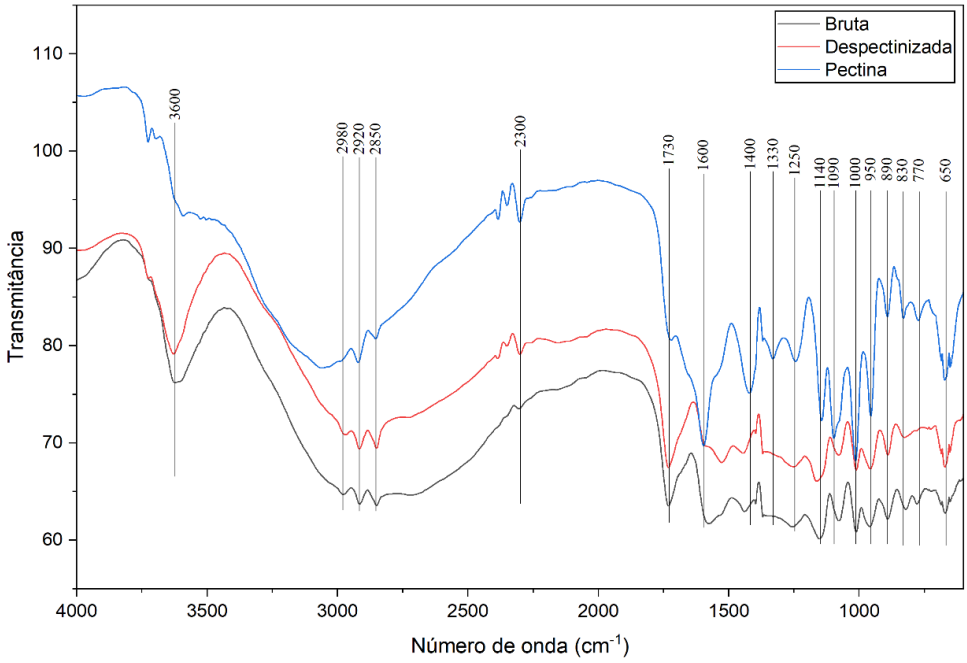
O pré-tratamento com hidróxido de sódio, em condições brandas, se baseia na dissociação deste em íons hidróxido e sódio, que atuam atacando a ligação complexa lignina-hemicelulose, aumentando a hidrofilicidade da lignina (Machado *et al.*, 2021). Contudo, conforme previamente citado, a combinação de hidróxido de sódio com altas temperaturas, apesar de relatado por estudos como eficiente na deslignificação, pode remover juntamente a hemicelulose, logo, não é desejável para bioprocessos que visam sua utilização. O percentual de deslignificação para os pré-tratamentos #1 e #4 não foram apresentados, uma vez que, para o pré-tratamento #1, apesar de estatisticamente equivalente, o teor de lignina final foi numericamente superior ao inicial. Já para o pré-tratamento 4, o conteúdo de lignina foi superestimado devido a restrições analíticas, impossibilitando seu cálculo, conforme já discutido.

5.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A análise de FTIR foi utilizada de maneira a identificar os grupos funcionais presentes nas amostras e, por meio da comparação, avaliar possíveis alterações provenientes dos pré-tratamentos. A Figura 8 apresenta os espectros obtidos por FTIR para as amostras de casca de banana bruta, despectinizada e para a pectina extraída, ao passo que a Figura 9 compara os espectros obtidos para o material despectinizado e deslignificado.

O espectro resultante para a pectina extraída foi semelhante ao apresentado por Owusu *et al.* (2023). As bandas principais relativas a esta molécula foram 2920 cm^{-1}, 2300 cm^{-1}, 1600 cm^{-1}, 1330 cm^{-1} e 1140 cm^{-1}, relacionadas às vibrações de estiramento C-H, ligações C≡C, ao grupo carboxilato (COO^-), ao estiramento C-N e ao estiramento C-O de álcool terciário, respectivamente. Além disso, outras bandas demonstraram-se mais intensas na pectina, corroborando com os resultados apresentados por Oliveira *et al.* (2016), sendo estas 1250 cm^{-1}, referente ao estiramento CH_3CO^-, 1090 cm^{-1}, ao estiramento C-O, 1000 cm^{-1}, ao estiramento C-H, 950 cm^{-1}, ao curvamento de ligações C-O e 890 cm^{-1}, referente aos curvamentos CCH^- e COH^- na posição C-6.

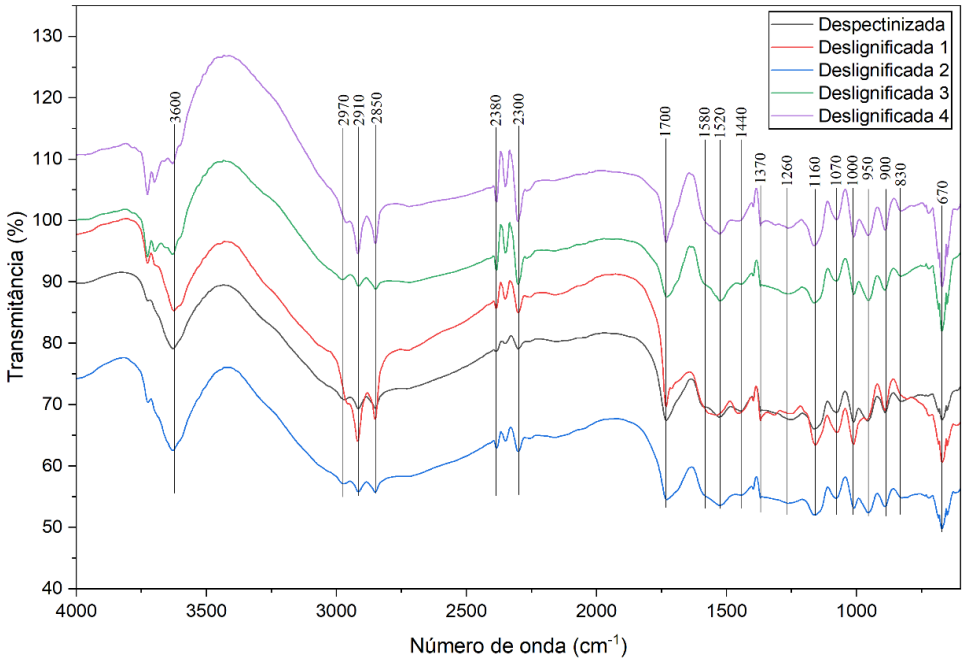
Figura 8 – Espectro de FTIR para a casca de banana bruta, despectinizada e para a pectina extraída



A região espectral entre 3800 e 3000 cm^{-1} está relacionada à estrutura cristalina da celulose, indicando que sua estrutura foi mantida no tratamento de despectinização, não estando presente no espectro da pectina (Shivalingamurthy; Kuppusamy, 2021). A banda de 650 cm^{-1} está relacionada ao grupo COOH, estando presente em todos os espectros de polissacarídeos lignocelulósicos (Costa *et al.*, 2015). Em suma, a predominância destas bandas no espectro da pectina, em comparação com os espectros da casca de banana bruta e despectinizada, indica eficácia em sua extração.

Adicionalmente, a partir do espectro da pectina, pode-se estimar seu grau de metoxilação, de modo a corroborar com o resultado de rendimento de despectinização, previamente discutido. Sua análise qualitativa sugere que a pectina apresenta baixo grau de metoxilação, uma vez que a intensidade da banda de 1600 cm^{-1} é significativamente maior à banda de 1730 cm^{-1}. A primeira banda refere-se aos íons carboxilato, característico de pectinas de baixa metoxilação, ao passo que a segunda se refere aos grupos éster metílicos, indicativos de pectinas de alta metoxilação (Kyomugasho *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2020).

Figura 9 – Espectro de FTIR para as cascas de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom



A partir da Figura 9 é possível notar a suave diminuição na banda de 1520 cm^{-1}, correspondente ao estiramento C=C no anel aromático da lignina, nos espectros da casca de banana submetida aos pré-tratamentos de deslignificação #1 e #2 (Shivalingamurthy; Kuppusamy, 2021). Ademais, ambos tratamentos provocaram a redução da intensidade da banda de 1700 cm^{-1}, comumente associada a presença de grupos funcionais oxigenados, como a carbonila, presentes na molécula de lignina (Fumoto *et al.*, 2022).

A faixa espectral de 1200 a 1000 cm^{-1}, referente às estruturas da hemicelulose e celulose, foi preservada em todos os tratamentos avaliados (Shivalingamurthy; Kuppusamy, 2021). De acordo com Chandel *et al.* (2014) e Mohamed *et al.* (2023), as bandas 2970 a 2850 cm^{-1} são atribuídas aos grupos CH e CH_2, característicos da celulose. Posto isto, o aumento notável de sua intensidade no espectro gerado para as cascas submetidas aos tratamentos de deslignificação #1 e #4 sugere alteração relativa da fração celulósica na amostra, possivelmente proveniente da remoção de outros compostos. Novamente, este comportamento pode explicar a alta compactação do material pré-tratado.

Sumariamente, os pré-tratamentos de deslignificação #1 e #2 acarretaram em maiores alterações nos grupos funcionais relativos à lignina, sugerindo maior degradação de sua estrutura. Entretanto, o pré-tratamento #1, juntamente com o #4, resultou em mudanças

estruturais na celulose, o que pode ter interferido na morfologia do material pré-tratado, conferindo maior rigidez e limitando aplicações futuras. Dessa forma, pode-se atribuir eficiência superior na remoção de lignina, combinada com a preservação de hemicelulose, ao pré-tratamento #2, realizado com peróxido de hidrogênio. Esta afirmação é reforçada pelo percentual de deslignificação obtido, de 43,2%. Embora Machado *et al.* (2021) tenham relatado melhor desempenho dos pré-tratamentos #1 e #4, conduzidos com hidróxido de sódio em autoclave, as diferenças observadas podem estar correlacionadas à natureza distinta dos resíduos lignocelulósicos.

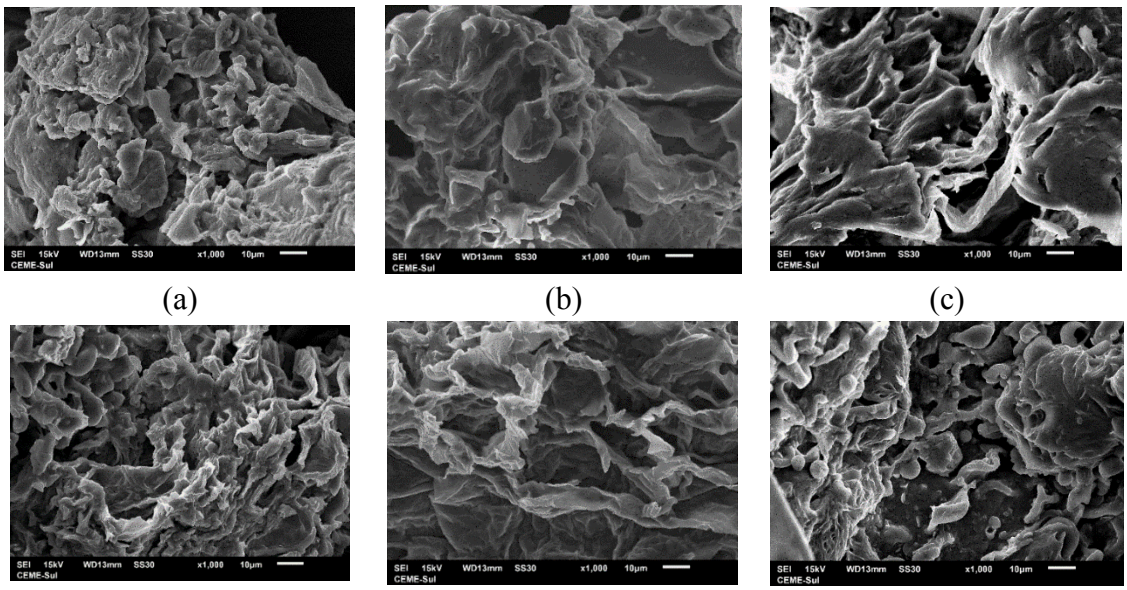
5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura é empregada na análise e comparação da morfologia do resíduo lignocelulósico, a fim de detectar possíveis alterações decorrentes de diferentes pré-tratamentos de deslignificação, bem como da despectinização. As Figuras 10, (a) a (f), mostram as micrografias resultantes desta técnica, na ampliação de 1000×.

A Figura 10 (a), correspondente à casca de banana sem pré-tratamentos, apresenta morfologia ordenada e compacta, além de fibrilas rígidas. Este resultado é semelhante aos relatados por Gautério *et al.* (2018), que analisaram diversos substratos agroindustriais. No que se refere à microscopia do substrato submetido ao tratamento de despectinização, disposta na Figura 10 (b), esta mostra-se semelhante à exibida por Liu *et al.* (2017), para a remoção de pectina em bagaço. A micrografia evidencia uma superfície mais solta e volumosa, decorrente da quebra de ligações intramoleculares de hidrogênio das microfibrilas.

As Figuras 10 (c), (e) e (f) referem-se aos tratamentos alcalinos conduzidos com hidróxido de sódio, realçando estruturas disformes, desordenadas e com fibrilas rompidas, estando em conformidade com o descrito por Gautério *et al.* (2018). Dentre estas, as Figuras 10 (c) e (f) apresentaram deformidades mais acentuadas, o que pode ser atribuído à severidade das condições empregadas. Por fim, a Figura 10 (b), referente ao tratamento conduzido com peróxido de hidrogênio, demonstra fibrilas sobrepostas, com resultados análogos aos de Machado *et al.* (2021).

Figura 10 – Micrografias da casca de banana (a) seca e moída, (b) despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos (c) #1 NaOH a 1% em autoclave, (d) #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital, (e) #3 NaOH a 1% em ultrassom e (f) #4 NaOH a 1% em autoclave seguido de ultrassom



(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

Em síntese, a análise visual das micrografias obtidas por MEV ressaltam maior desorganização das fibrilas na casca de banana submetida aos pré-tratamentos de deslignificação com hidróxido de sódio, principalmente aos conduzidos com autoclave. Em contraste, o pré-tratamento realizado com peróxido de hidrogênio gerou alterações moderadas, reafirmando que este propicia menores danos à integridade da matriz.

5.3. CULTIVO

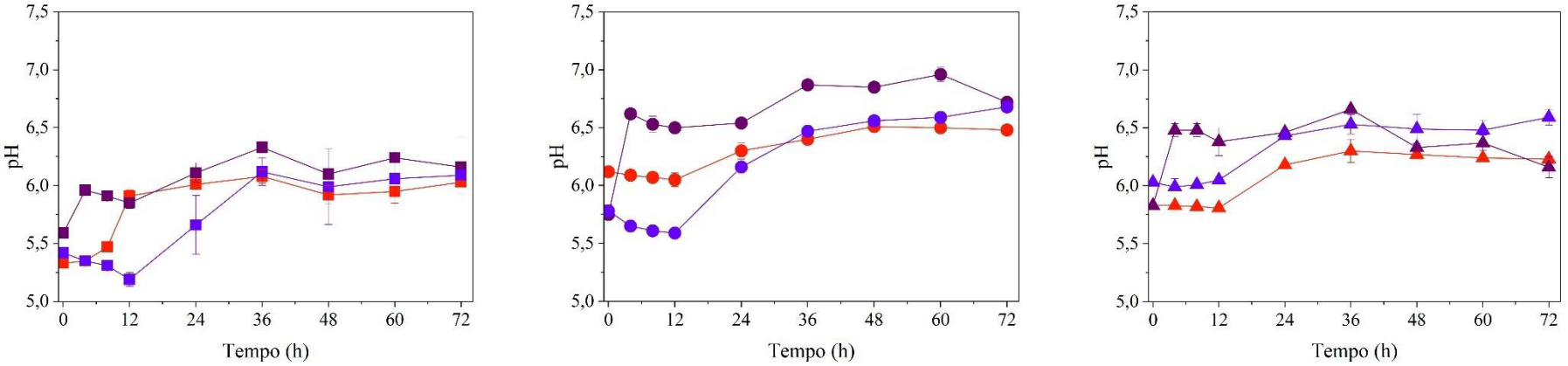
O cultivo submerso de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, visando a obtenção de endo-β-1,4-xilanase e xilo-oligossacarídeos, foi realizado fazendo uso da casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #2 e #3. As condições empregadas nos pré-tratamentos de deslignificação #1 e #4 causaram danos à estrutura do resíduo, além de diminuir significativamente a fração hemicelulósica, logo, optou-se por não prosseguir o cultivo com os substratos resultantes destes processos.

5.3.1. pH

O pH apresenta considerável influência em termos de acessibilidade das enzimas às ligações xilanolíticas, sendo dependente da natureza da biomassa lignocelulósica (Yegin, 2016). A endo-β-1,4-xilanase apresenta atividade ótima na faixa de pH de 4,0 a 6,5 (Polizeli *et al.*, 2005). A Figura 11 apresenta as variações de pH durante os cultivos. De modo geral, houve redução no pH até 12 h de cultivo. Esta ocorrência relaciona-se com a atividade de xilanase, uma vez que, conforme mais carboidratos solúveis suscetíveis à metabolização se tornam disponíveis no meio de cultura, mais metabólitos ácidos são liberados no meio extracelular, decorrente de seu consumo, levando a redução do pH (Gautério *et al.*, 2021). Contudo, conforme os açúcares redutores são consumidos, há uma redução considerável em sua concentração, fazendo com que o microrganismo assimile os ácidos orgânicos. Consequentemente, o pH tende a aumentar, fenômeno observado a partir de 24 h de cultivo (Botella *et al.*, 2007).

Gautério *et al.* (2018) relataram uma faixa de pH de 3,5 a 5,7 durante o cultivo com diferentes linhagens de *Aureobasidium pullulans*, sendo estas CCT 1261, CCT 7521 e CCT 4154. Neste, o substrato utilizado foi a xilana de faia comercial, comumente utilizada na obtenção de enzimas do complexo xilanolítico em razão de seu alto teor de hemicelulose. Contudo, ao realizar o cultivo com resíduos lignocelulósicos, como casca de soja, de aveia e de arroz, bem como farelo de arroz, engaço de uva e pergaminho de café, observou-se um aumento na faixa de pH para 5,3 – 6,4. Estes valores estão associados a uma menor atividade enzimática, considerando a diminuição da fração hemicelulósica do substrato e a presença de lignina.

Figura 11 – Cinética de variação de pH durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (b) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (c) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L



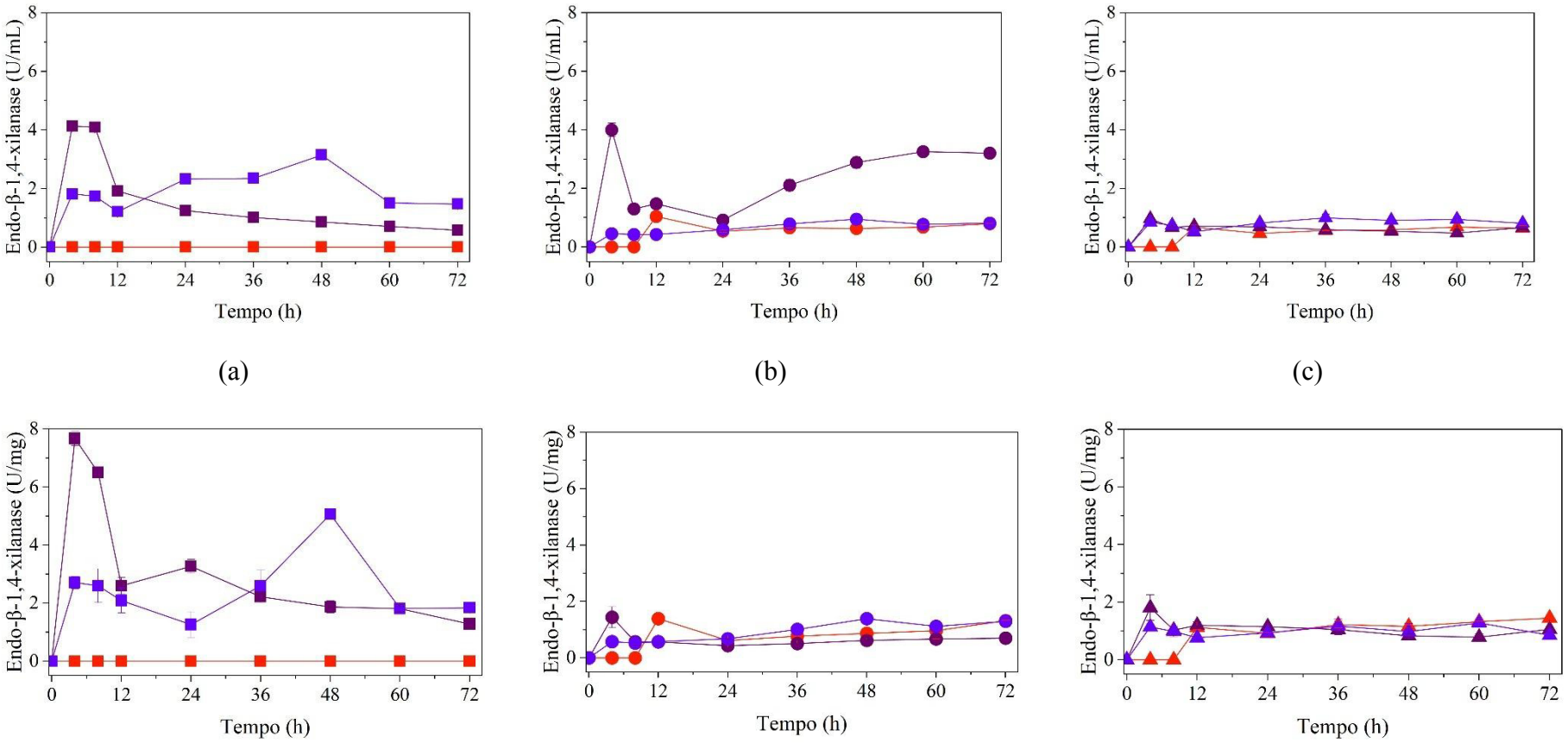
(a) (b) (c)

5.3.2. Atividade enzimática

Em relação à concentração de 10 g/L, a atividade enzimática de endo-β-1,4-xilanase foi relativamente baixa, com valores abaixo de 1,0 para U/mL e U/mg. Para mais, o cultivo realizado utilizando a casca de banana despectinizada, nesta concentração, não apresentou atividade. Isso se deve ao fato de que a concentração de substrato fornece quantidades insuficientes do indutor, isto é, de hemicelulose, para que o microrganismo possa se desenvolver e secretar a enzima. Para a concentração de 50 g/L, observou-se um comportamento atípico em comparação com as demais, com um pico de atividade tardio, em 48 h de cultivo para os cultivos realizados com as cascas despectinizada e deslignificada pelo pré-tratamento #2, e em 60 h para a submetida ao pré-tratamento de deslignificação #3. Este fenômeno pode ser correlacionado com a alta concentração de carga sólida no meio, que limita a transferência de oxigênio e a acessibilidade aos nutrientes do meio, levando ao retardo no metabolismo do *A. pullulans*. Apesar da maior concentração relativa de hemicelulose, este fator pode ter influenciado negativamente na obtenção das enzimas do complexo xilanolítico, acarretando em valores abaixo de 3 U/mL, para a amostra despectinizada, e próximos de 1 U/mL, para as demais.

No que se refere à concentração de 30 g/L, os cultivos realizados com as cascas de banana despectinizada e deslignificada pelo pré-tratamento #2 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes de atividade nas primeiras 4 h, sendo estas de 4,13 e 4,0 U/mL, respectivamente. Contudo, em termos de atividade específica, o valor calculado para a amostra com casca despectinizada foi significativamente maior, sendo de 7,67 U/mg, ao passo que, para a casca deslignificada pelo pré-tratamento #2, foi de 1,44 U/mg. Tendo em vista que a atividade específica é dependente do teor de proteínas solúveis, sendo estas inversamente proporcionais, pode-se associar um conteúdo superior de proteínas ao cultivo conduzido com a casca deslignificada #2, tendo a possibilidade de produção de outras enzimas, como as proteases.

Figura 12 – Atividades enzimática e específica de endo-β-1,4-xilanase durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a, d) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (b, e) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (c, f) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L



Ademais, no cultivo realizado com a casca deslignificada por meio do pré-tratamento #2, em 30 g/L, pode-se observar um pico inicial seguido de queda na atividade e, em seguida, elevação até 3,3 U/mL no decorrer das 72 h. Esse perfil é característico de cultivos onde inicialmente tem-se produção de enzima, que irá hidrolisar a hemicelulose, atuando como fonte de carbono para que a síntese enzimática tenha continuidade. O cultivo conduzido com a casca de banana submetida ao pré-tratamento de deslignificação #3 apresentou resultados inferiores de atividade enzimática, o que pode ser atribuída à menor eficiência na extração de lignina, que impede o acesso do microrganismo à hemicelulose.

Gautério *et al.* (2018) obtiveram valores semelhantes para substratos pré-tratados com soluções alcalinas, como 0,34 ± 0,08 U/mL para cascas de soja, 2,89 ± U/mL para cascas de arroz, 1,53 ± 0,07 U/mL para pergaminho de café e 0,96 ± 0,01 U/mL para engaço de uva. Ainda neste estudo, certos resíduos lignocelulósicos apresentaram resultados inferiores após o pré-tratamento, em comparação com sua versão bruta, o que evidencia a imprevisibilidade de aplicação desta biomassa.

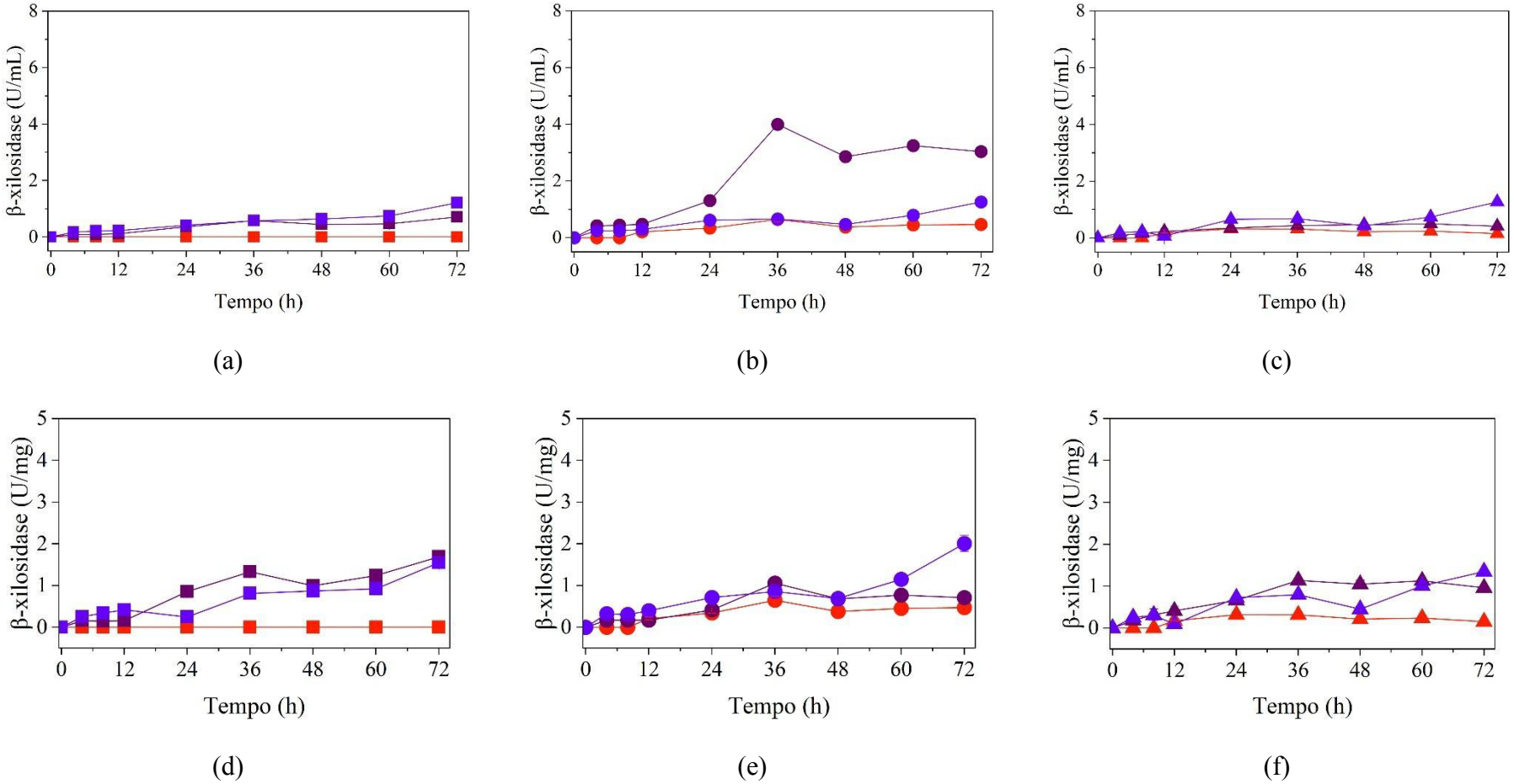
A produção de β-xilosidase tende a crescer no decorrer do cultivo, visto que, inicialmente, a fração hemicelulósica é hidrolisada pela endo-β-1,4-xilanase, liberando xilo-oligossacarídeos que são subsequentemente hidrolisados pela β-xilosidase, gerando monômeros de xilose (Bankeeree *et al.*, 2017). Este comportamento pode ser observado na Figura 13, que apresenta as atividades enzimática e específica da β-xilosidase nos cultivos com a casca de banana despectinizada e submetida aos pré-tratamentos de deslignificação #2 e #3, nas concentrações de 10, 30 e 50 g/L.

Assim como para a endo-β-1,4-xilanase, para a amostra despectinizada a 10 g/L, não houve atividade enzimática de β-xilosidase. Tal correlação atribui, igualmente, menores valores desta atividade para as amostras de casca de banana submetidas à despectinização, nas concentrações de 30 e 50 g/L, e ao pré-tratamento de deslignificação 3, onde as atividades de endo-β-1,4-xilanase foram menores, havendo menor disponibilidade de XOS.

A observação das Figuras 13 (c) e (d), em comparação com as Figuras 12 (c) e (d), evidenciam a atuação complementar das enzimas do complexo xilanolítico. Em 24 h de cultivo, a atividade de endo-β-1,4-xilanase sofreu uma queda, enquanto a β-xilosidase, em 36 h, atingiu seu valor máximo, de 4,0 U/mL. Ou seja, a clivagem de ligações aleatórias da xilana, presente na hemicelulose, resultou no acúmulo de XOS, induzindo a β-xilosidase. Posteriormente às 36 h, a atividade de xilanase voltou a sofrer elevação, ao passo que a xilosidase reduziu, representando uma alternância funcional.

Ohta *et al.* (2010), fazendo uso de *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 e xilana comercial de aveia, relataram valor de atividade específica de β-xilosidase de 4,88 U/mg. Neste estudo, as condições de cultivo foram semelhantes às empregadas no presente trabalho, com pH 5,0 e temperatura de 30ºC. Bankeeree *et al.* (2017) obtiveram 2,36 U/mg empregando *A. pullulans* CBS 135684. Apesar de não aplicarem resíduos lignocelulósicos como substrato, estes valores são semelhantes ao encontrado no presente estudo, comprovando que este fungo secreta baixas quantidades da enzima. Para a obtenção de XOS com baixa ou nula concentração de xilose, tais resultados são considerados satisfatórios.

Figura 13 – Atividades enzimática e específica de β-xilosidase durante o cultivo de *Aureobasidium pullulans* a 28ºC e 150 rpm por 72 h utilizando como substrato a casca de banana (a, d) despectinizada a ■ 10 g/L, ■ 30 g/L e ■ 50 g/L, (b, e) deslignificada #2 a ● 10 g/L, ● 30 g/L e ● 50 g/L e (c, f) deslignificada #3 a ▲ 10 g/L, ▲ 30 g/L e ▲ 50 g/L



A Tabela 4 apresenta os resultados de atividade enzimática máxima de endo-β-xilanase e β-xilosidase.

Tabela 4 – Atividade enzimática máxima de endo-β-xilanase e β-xilosidase para os cultivos de *A. pullulans* com a casca de banana despectinizada e deslignificada pelos pré-tratamentos #2 H_2O_2 a 7,5% em agitação orbital e #3 NaOH a 1% em ultrassom, nas concentrações de 10, 30 e 50 g/L

Pré-tratamento	Concentração (g/L)	Atividade enzimática (U/mL)	
		Endo-β-1,4-xilanase	β-xilosidase
Despectinização	10	-	-
	30	$4,13 \pm 0,17^{a}$ (4 h)	$0,71 \pm 0,10^{c}$ (72 h)
	50	$3,14 \pm 0,03^{b}$ (48 h)	$1,21 \pm 0,12^{b}$ (72 h)
#2	10	$1,04 \pm 0,15^{c}$ (12 h)	$0,65 \pm 0,09^{c}$ (36 h)
	30	$4,00 \pm 0,24^{a}$ (4 h)	$4,00 \pm 0,14^{a}$ (36 h)
	50	$0,81 \pm 0,02^{c}$ (72 h)	$1,26 \pm 0,11^{b}$ (72 h)
#3	10	$0,68 \pm 0,07^{c}$ (12 h)	$0,32 \pm 0,02^{d}$ (24 h)
	30	$0,96 \pm 0,04^{c}$ (4 h)	$0,47 \pm 0,05^{cd}$ (60 h)
	50	$0,99 \pm 0,13^{c}$ (36 h)	$1,27 \pm 0,09^{b}$ (72 h)

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores da mesma coluna ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

A Tabela 4 evidencia o que foi discutido previamente, onde as maiores atividades de endo-β-1,4-xilanase foram resultantes dos cultivos conduzidos com a casca de banana submetida à despectinização e à deslignificação #2, na concentração de 30 g/L, nas primeiras 4 h de cultivo. Ademais, evidencia atividade máxima tardia para a concentração de 50 g/L. Em relação à β-xilosidase, o maior valor de atividade foi observado para o cultivo realizado com a casca de banana submetida ao pré-tratamento de deslignificação #2. Este fenômeno pode ser atribuído à maior produção de xilo-oligossacarídeos neste cultivo, que irão induzir a produção de β-xilosidase de modo a converte-los em xilose.

5.3.3. Produção de xilo-oligossacarídeos

A Tabela 5 apresenta os resultados de produção de XOS após 72 h de cultivo, bem como o fator de conversão de hemicelulose em XOS. Em termos de XOS totais, isto é, a soma de xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose, o cultivo realizado com a casca de banana submetida à deslignificação #2, na concentração de 30 g/L, resultou em um valor significativamente superior, sendo este de 0,39 ± <0,01 mg/mL. Considerando o teor de hemicelulose de 10,3%, citado previamente, o fator de conversão desta fração em XOS foi de 12,6 ± 2,3%, resultado estatisticamente maior em comparação com os demais. Esta maior produção de XOS pode estar diretamente relacionada com as atividades de endo-β-1,4-xilanase e β-xilosidase.

O estudo realizado por Ribeiro, Duarte e Michelon (2025), cujo objetivo era a obtenção de xilo-oligossacarídeos a partir da xilana extraída de bagaços de malte tipo Pilsen e Indian Pale Ale, apresentou fatores de conversão de 10,9 ± 0,20% e 9,4 ± 0,17%, com 38,2% e 31,7% de hemicelulose, respectivamente. Dado que, neste, foi utilizado o complexo xilanolítico comercial *Hemicellulase Amano*, é possível afirmar que o resultado exposto no presente trabalho foi satisfatório, considerando o emprego de uma enzima fúngica e a aplicação de um bioprocesso único, onde não houveram etapas de extração e purificação da enzima.

Gautério *et al.* (2021) avaliaram a obtenção de XOS por meio da aplicação de enzima produzida por *A. pullulans*, posteriormente purificada, utilizando xilana comercial de madeira de faia. O maior resultado de fator de conversão foi de 27,0 ± 0,2%, em 32 h. Dessa forma, o valor obtido de 12,6 ± 2,3% foi inferior, contudo, vale ressaltar que a xilana de madeira de faia apresenta fração hemicelulósica superior. Além disso, a endo-β-1,4-xilanase foi sintetizada, extraída e parcialmente purificada, o que amplia sua atividade enzimática. Cabe mencionar que a utilização de substratos comerciais emprega maior custo ao processo. Em contrapartida, a utilização de resíduos agroindustriais torna-se destaque por favorecer conceitos preconizados pela sustentabilidade.

Tabela 5 – Produção de XOS e fator de conversão de hemicelulose em XOS em 72 h de cultivo de *Aureobasidium pullulans* com casca de banana pré-tratada

Pré-tratamento	Concentração (g/L)	Carboidratos (mg/mL)			Conversão (%)
		XOSp	XOSg	XOSt	
Despectinizada	10	ND	ND	ND	ND
	30	$0,05 \pm 0,01^{c}$	$0,07 \pm <0,01^{b}$	$0,12 \pm 0,02^{b}$	$4,41 \pm 0,64^{b}$
	50	$0,10 \pm <0,01^{bc}$	$0,08 \pm <0,01^{b}$	$0,18 \pm <0,01^{b}$	$3,78 \pm 0,15^{b}$
#2	10	ND	ND	ND	ND
	30	$0,18 \pm 0,03^{a}$	$0,21 \pm 0,04^{a}$	$0,39 \pm <0,01^{a}$	$12,6 \pm 2,26^{a}$
	50	$0,13 \pm <0,01^{ab}$	ND	$0,13 \pm <0,01^{b}$	$2,52 \pm 0,01^{b}$
#3	10	ND	ND	ND	ND
	30	$0,12 \pm <0,01^{b}$	ND	$0,12 \pm <0,01^{b}$	$3,80 \pm 0,23^{b}$
	50	ND	$0,07 \pm <0,01^{b}$	$0,07 \pm 0,01^{b}$	$1,39 \pm 0,28^{b}$

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores da mesma coluna ($p < 0,05$) pelo teste t de Student. XOSp: xilobiose + xilotriose; XOSg: xilotetraose + xilopentose; XOSt: soma total; ND: Nenhum pico de XOS detectado.

6. CONCLUSÃO

Em síntese, o presente estudo demonstrou a capacidade de emprego da casca de banana como substrato para obtenção de enzimas do complexo xilanolítico e xilo-oligossacarídeos em um bioprocesso único. A caracterização proximal demonstrou alto teor de carboidratos, fator imprescindível para possibilitar sua aplicação biotecnológica.

O pré-tratamento de despectinização mostrou-se eficaz não somente por tornar a biomassa menos recalcitrante, como também por atuar na obtenção de pectinas de baixa metoxilação, propiciando sua aplicação futura. Os pré-tratamentos de deslignificação envolvendo condições severas não apresentaram potencial frente o resíduo utilizado, visto que danificou a integridade do material, impossibilitando análises posteriores e, consequentemente, sua utilização no cultivo submerso de *Aureobasidium pullulans*.

O pré-tratamento de deslignificação com hidróxido de sódio e ultrassom, em condições brandas de pressão e temperatura, não danificou a estrutura da hemicelulose, contudo, apresentou baixa eficiência de deslignificação. A aplicação de peróxido de hidrogênio, por sua vez, foi altamente promissora, com percentual de deslignificação de 43,2%. A partir deste tratamento, foram obtidas as maiores atividades de endo-β-1,4-xilanases, sendo possível observar o comportamento entre esta e a β-xilosidase.

O cultivo submerso fazendo uso da casca de banana deslignificada pelo pré-tratamento #2, isto é, com aplicação de peróxido de hidrogênio em agitação orbital, apresentou um fator de conversão de hemicelulose em XOS de 12,6%, valor satisfatório quando comparado a trabalhos que empregam enzimas purificadas. Sendo assim, os dados apresentados sugerem que a obtenção do resultado desejado é dependente da sinergia entre diversos fatores, como o pré-tratamento aplicado, o microrganismo, o teor de hemicelulose no substrato, tempo, temperatura e pH de cultivo.

Dessa forma, afirma-se que é possível obter, em um bioprocesso único, enzimas do complexo xilanolítico e xilo-oligossacarídeos, sendo este um fator promissor por eliminar a necessidade de aplicação de etapas de extração e purificação de enzimas. Para mais, este estudo contribui para a avaliação da utilização de resíduos agroindustriais como substratos lignocelulósicos, reforçando seu potencial de aplicação na biorrefinaria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A.; AMALIA, Y. Lactic acid fermentation of banana peel using *Lactobacillus plantarum*: effect of substrate concentration, inoculum concentration, and various nitrogen sources. **Reaktor**, v. 22, n. 3, p. 92-101, 2023. http://dx.doi.org/10.14710/reaktor.22.3.92-101.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; GONÇALVES, R. F. S.; PINHEIRO, A. C.; SILVA, S.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A.; PRATHER, K. L. J.; RODRIGUES, L. R. From lignocellulosic residues to market: production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 176-183, 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

ARAÚJO, D.; COSTA, T.; FREITAS, F. Biovalorization of Lignocellulosic Materials for Xylitol Production by the Yeast *Komagataella pastoris*. **Applied Sciences**, v. 11, n. 12, p. 5516, 2021. http://dx.doi.org/10.3390/app11125516.

BANKEEREE, W.; AKADA, R.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H.; PRASONGSUK, S. Enzymatic Hydrolysis of Black Liquor Xylan by a Novel Xylose-Tolerant, Thermostable β-Xylosidase from a Tropical Strain of *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 919-934, 2017. http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2598-x.

BARBIERI, G. S.; BENTO, H. B. S.; OLIVEIRA, F.; PICHELI, F. P.; DIAS, L. M.; MASARIN, F.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Xylanase Production by *Talaromyces amestolkiae* Valuing Agroindustrial Byproducts. **Biotech**, v. 11, n. 2, p. 15-26, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/biotech11020015.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2019. http://dx.doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2.

BHUTTO, A. W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A. A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724-745, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025.

CABRERA, E.; MUÑOZ, M. J.; MARTÍN, R.; CARO, I.; CURBELO, C.; DÍAZ, A. B. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 1-7, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.103.

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**, v. 51, n. 1, p. 75-85, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F.; ANJOS, V.; BELL, M.; RODRIGUES, L. N; POLIKARPOV, I.; AZEVEDO, E. R.; BERNARDINELLI, O. D; A ROSA, C.; PAGNOCCA, F. C; SILVA, S. S. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology For Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 63, 2014. http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-7-63.

CHEN, J.; LIANG, R.; LIU, W.; LUO, S.; LIU, C.; WU, S.; WANG, Z. Extraction of pectin from *Premna microphylla* turcz leaves and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 376-384, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.069.

CHEN, Y.; XIE, Y.; AJUWON, K. M.; ZHONG, R.; LI, T.; CHEN, L.; ZHANG, H.; BECKERS, Y.; EVERAERT, N. Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: a review. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 731930, 2021. http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.731930.

COSTA, L.; ASSIS, D.; GOMES, G.; SILVA, J.; FONSÊCA, A.; DRUZIAN, J. Extraction and Characterization of Nanocellulose from Corn Stover. **Materials Today**: Proceedings, v. 2, n. 1, p. 287-294, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.045.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, v. 129, p. 695-716, 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.035.

DIKSON; PINONTOAN, R. Bioinformatics Analyses of Endo-1,4-beta-xylanase from *Bacillus* sp. SS3.4. **Kne Life Sciences**, v. 2020, p. 10-17, 2020. http://dx.doi.org/10.18502/kls.v5i2.6435.

DIVYASHRI, G.; SADANANDAN, B.; MURTHY, K. N. C.; SHETTY, K.; MAMTA, K. Neuroprotective Potential of Non-Digestible Oligosaccharides: an overview of experimental evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 712531, 2021. http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.712531.

EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Safety of xylo-oligosaccharides (XOS) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **EFSA Journal**, v. 16, n. 7, 2018.

EMAGA, T. H.; ANDRIANAIVO, R. H.; WATHELET, B.; TCHANGO, J.; PAQUOT, M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 590-600, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006.

EMAGA, T. H.; BINDELLE, J.; AGNEESENS, R.; BULDGEN, A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Ripening influences banana and plantain peels composition and energy content. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 1, p. 171-177, 2010. http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9671-6.

EMAGA, T. H.; ROBERT, C.; RONKART, S. N.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4346-4354, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.030.

ESONU, C. E.; IHEME, C. I.; NJOKU, O. C.; AGWU, L. O.; EDOM, C. V.; GODIAN, C. I.; EZERIOHA, C. C.; AIRAODION, A. I.; UJOWUNDU, C. Investigation of Proximate Composition and Bioactive Components in Banana (*Musa acuminata*) Peels Using Advanced Analytical Techniques. **Nutrition and Food Processing**, v. 7, n. 10, p. 01-09, 2024. http://dx.doi.org/10.31579/2637-8914/256.

FDA. **GRAS Notice No. GRN 000816**. U.S. Food and Drug Administration, 2019.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J.; ERDOCIA, X.; ALRIOLS, M. G.; LABIDI, J. Techno-economic analysis of different integrated biorefinery scenarios using lignocellulosic waste streams as source for phenolic alcohols production. **Journal of Cleaner Production**, v. 285, p. 124829, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124829.

FUMOTO, E.; SATO, S.; KAWAMATA, Y.; KOYAMA, Y.; YOSHIKAWA, T.; NAKASAKA, Y.; TAGO, T.; MASUDA, T. Determination of carbonyl functional groups in lignin-derived fraction using infrared spectroscopy. **Fuel**, v. 318, p. 123530, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123530.

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolitic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335-345, 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.011.

GAUTÉRIO, G. V.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; RIBEIRO, T. R.; KALIL, S. J. Xylooligosaccharides production by crude and partially purified xylanase from *Aureobasidium pullulans*: biochemical and thermodynamic properties of the enzymes and their application in xylan hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 104, p. 161-170, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2021.03.009.

GAUTÉRIO, G. V.; HÜBNER, T.; RIBEIRO, T. R.; ZIOTTI, A. P. M.; KALIL, S. J. Xylooligosaccharide Production with Low Xylose Release Using Crude Xylanase from *Aureobasidium pullulans*: effect of the enzymatic hydrolysis parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 2, p. 862-881, 2022. http://dx.doi.org/10.1007/s12010-021-03658-x.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley Interscience, p. 241–266, 1971.

GONG, W.; DAI, L.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; WANG, L. A Highly Efficient Xylan-Utilization System in *Aspergillus niger* An76: a functional-proteomics study. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-15, 2018. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00430.

GRAND VIEW RESEARCH. **Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Carbohydrase, Proteases, Polymerases & Nucleases), By Type (Industrial,**

Specialty), By Source (Plants, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2024 - 2030. 2023. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry. Acesso em: 09 out. 2024.

GUIDO, E. S.; SILVEIRA, J. T.; KALIL, S. J. Enzymatic production of xylooligosaccharides from beechwood xylan: effect of xylanase preparation on carbohydrate profile of the hydrolysates. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 713-721, 2019.

HABIBI, Y.; HEYRAUD, A.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1119-1127, 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.005.

HUANG, C.; YU, Y.; LI, Z.; YAN, B.; PEI, W.; WU, H. The preparation technology and application of xylo-oligosaccharide as prebiotics in different fields: a review. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1-13, 2022. http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2022.996811.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção de Banana no Brasil**. 2025. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br. Acesso em: 25 nov. 2025.

IENCZAK, J. L.; POLETTO, P.; ROBL, D.; RABELO, S. C. Transforming the Lignocellulosic Biomass into High Value-Added Bioproducts. In: SHAH, S.; VENKATRAMANAN, V.; PRASAD, R. **Bio-valorization of Waste**: trends and perspectives. Singapore: Springer, 2021. Cap. 2. p. 21-52.

KARTHIKEYAN, A.; SIVAKUMAR, N. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5552-5556, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.063.

KAUSHAL, J.; KHATRI, M.; SINGH, G.; ARYA, S. K. A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: an elaborate review on xylanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1350-1361, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.194.

KHAMSUCHARIT, P.; LAOHAPHATANALERT, K.; GAVINLERTVATANA, P.; SRIROTH, K.; SANGSEETHONG, K. Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 623-629, 2017. http://dx.doi.org/10.1007/s10068-017-0302-0.

KHAN, A. R.; AHMAD, B.; KHAN, M.; KHAN, M. A.; SULTAN, S.; SULTANA, K.; HASSAN, S. Production of Single Cell Protein (SCP) from the Peel Waste of Pea, Potato, and Banana by *Aspergillus flavus* NRRL 21882 as an Efficient Organic Poultry Supplement. **ACS Omega**, v. 9, n. 36, p. 37763-37770, 2024. http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.4c03317.

KIM, S. Enhancing Bioethanol Productivity Using Alkali-Pretreated Empty Palm Fruit Bunch Fiber Hydrolysate. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1-8, 2018. http://dx.doi.org/10.1155/2018/5272935.

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

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2017. http://dx.doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9.

KYOMUGASHO, C.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v. 176, p. 82-90, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.033.

LAOTHANACHAREON, T.; BUNTERNGSOOK, B.; CHAMPREDA, V. Profiling multi-enzyme activities of *Aspergillus niger* strains growing on various agro-industrial residues. **3 Biotech**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2021. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-021-03086-y.

LI, H.; XIONG, L.; CHEN, X.; LUO, M.; CHEN, X.; WANG, C.; HUANG, C.; CHEN, X. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw via a combination of alkaline hydrogen peroxide and lithium chloride/N,N-dimethylacetamide pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 137, n. 1, p. 332-338, 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.027.

LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 13-20, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.054.

LIU, X.; JIANG, Y.; YANG, S.; MENG, X.; SONG, X.; WU, M. Effects of pectinase treatment on pulping properties and the morphology and structure of bagasse fiber. **Bioresources**, v. 12, n. 4, p. 7731-7743, 2017. http://dx.doi.org/10.15376/biores.12.4.7731-7743.

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

LYU, Y.; DEBEVERE, S.; BOURGEOIS, H.; RAN, M.; BROECKX, B. J. G.; VANHAECKE, L.; WIELE, T.; HESTA, M. Dose-Dependent Effects of Dietary Xylooligosaccharides Supplementation on Microbiota, Fermentation and Metabolism in Healthy Adult Cats. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 1-14, 2020. http://dx.doi.org/10.3390/molecules25215030.

MACHADO, T. B.; CORRÊA JUNIOR, L. C. S.; MATTOS, M. V. C. V.; GAUTÉRIO, G. V.; KALIL, S. J. Sequential Alkaline and Ultrasound Pretreatments of Oat Hulls Improve Xylanase Production by *Aureobasidium pullulans* in Submerged Cultivation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 11, p. 5991-6004, 2021. http://dx.doi.org/10.1007/s12649-021-01425-x.

MARTINS, M.; SGANZERLA, W. G.; FORSTER-CARNEIRO, T.; GOLDBECK, R. Recent advances in xylo-oligosaccharides production and applications: a comprehensive review and bibliometric analysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, 2023. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102608.

MIRZAEE, N.; NIKZAD, M.; BATTISTI, R.; ARAGHI, A. Isolation of cellulose nanofibers from rapeseed straw via chlorine-free purification method and its application as reinforcing agent in carboxymethyl cellulose-based films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, p. 126405, 2023. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126405.

MISHRA, R. R.; SAMANTARAY, B.; BEHERA, B. C.; PRADHAN, B. R.; MOHAPATRA, S. Process optimization for conversion of Waste Banana peels to biobutanol by a yeast Co-Culture fermentation system. **Renewable Energy**, v. 162, p. 478-488, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.045.

MOHAMED, G. R.; MAHMOUD, R. K.; SHABAN, M.; FAHIM, I. S.; EL-SALAM, H. M. A.; MAHMOUD, H. M. Towards a circular economy: valorization of banana peels by developing bio-composites thermal insulators. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2023. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-37994-1.

MORALES, A.; HERNÁNDEZ-RAMOS, F.; SILLERO, L.; FERNÁNDEZ-MARÍN, R.; DÁVILA, I.; GULLÓN, P.; ERDOCIA, X.; LABIDI, J. Multiproduct biorefinery based on almond shells: impact of the delignification stage on the manufacture of valuable products. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123896, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123896.

MOURA, S. C.; ARAUJO, A. R. B.; SALES, R. M. M.; BARBOSA, M. F.; SOUTO, B. M.; QUIRINO, B. F. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. **Embrapa Agroenergia**, Brasília, v. 38, p. 1-53, 2021.

MOUSA, A. A. A.; ABO-DAHAB, N. F.; HASSANE, A. M. A.; GOMAA, A. E. F.; ALJURISS, J. A.; DAHMASH, N. D. Harnessing *Mucor* spp. for Xylanase Production: statistical optimization in submerged fermentation using agro-industrial wastes. **Biomed Research International**, v. 2022, p. 1-17, 2022. http://dx.doi.org/10.1155/2022/3816010.

NASCIMENTO, V. M.; MANRICH, A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ROCHA, G. J. M.; GIORDANO, R. L. C. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, p. 112-125, 2016. http://dx.doi.org/10.1515/bioeth-2016-0008.

NASR, S.; SOUDI, M. R.; SALMANIAN, A. H.; GHADAM, P. Partial Optimization of Endo-1,4-β-Xylanase Production by *Aureobasidium pullulans* Using Agro-Industrial Residues. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, p. 1245-1253, 2013.

NDARUBU, T. A.; ROSEMARY, O. N.; GBOKE, J. A.; DAVID, G.; BINTA, S.; RUKIYA, Z.; ZUNGERU, S. I. Proximate, Minerals, and Amino Acid Compositions of Banana and Plantain Peels. **Biomed Natural and Applied Science**, v. 01, n. 01, p. 32-42, 2021. http://dx.doi.org/10.53858/bnas01013242.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I.; YORK-DURÁN, M. J.; RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; PLOU, F. J.; CHENOLL, E.; PARDO, E.; CODOÑER, F.; MARTÍNEZ, M. J. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. **Food Chemistry**, v. 232, p. 105-113, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149.

OBENG, A. K.; PREMJET, D.; PREMJET, S. Combining Autoclaving with Mild Alkaline Solution as a Pretreatment Technique to Enhance Glucose Recovery from the Invasive Weed *Chloris barbata*. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 120, 2019. http://dx.doi.org/10.3390/biom9040120.

OHTA, K.; FUJIMOTO, H.; FUJII, S.; WAKIYAMA, M. Cell-associated β-xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal Of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 152-157, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.008.

OLIVEIRA, T. Í. S.; ROSA, M. F.; CAVALCANTE, F. L.; PEREIRA, P. H. F.; MOATES, G. K.; WELLNER, N.; MAZZETTO, S. E.; WALDRON, K. W.; AZEREDO, H. M. C. Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 198, p. 113-118, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080.

OROZCO, R. S.; HERNÁNDEZ, P. B.; MORALES, G. R.; NÚÑEZ, F. U.; VILLAFUERTE, J. O.; LUGO, V.; RAMÍREZ, N. F.; DÍAZ, C. E. B.; VÁZQUEZ, P. C. Characterization of Lignocellulosic Fruit Waste as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. **Bioresources**, v. 9, n. 2, p. 1873-1885, 2014. http://dx.doi.org/10.15376/biores.9.2.1873-1885.

OSMA, J. F.; HERRERA, J. L. T.; COUTO, S. R. Banana skin: a novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 32-37, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.021.

OWUSU, F. W. A.; ACQUAH, P. G.; BOAKYE-GYASI, M. E. L.; JOHNSON, R.; YEBOAH, G. N.; ARCHER, M.; ANTWI, M. B.; ASARE, S. O. Pharmaceutical Assessment of the Impact of the Method of Extraction on the Suitability of Pectin from Plantain (*Musa paradisiaca*) Peels as a Suspending Agent in Oral Liquid Formulations. **The Scientific World Journal**, v. 2023, p. 1-11, 2023. http://dx.doi.org/10.1155/2023/8898045.

PALANIAPPAN, A.; ANTONY, U.; EMMAMBUX, M. N. Current status of xylooligosaccharides: production, characterization, health benefits and food application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 506-519, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.047.

PASIN, T. M.; SCARCELLA, A. S. A.; LUCAS, R. C.; OLIVEIRA, T. B.; CEREIA, M.; POLIZELI, M. L T. M. An Eco-Friendly Production of a Novel and Highly Active Endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus clavatus*. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, v. 9, n. 3, p. 20-33, 2021. http://dx.doi.org/10.9734/ajbgmb/2021/v9i330219.

PHUKON, L. C.; ABEDIN, M. M.; CHOURASIA, R.; SINGH, S. P.; TAYUNG, K.; RAI, A. K. Valorization of agro-wastes by *Bacillus altitudinis* XYL17 through simultaneous production of xylanase, xylooligosaccharides, and antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 213, p. 118395, 2024. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118395.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENZI, 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. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7.

PRASONGSUK, S.; LOTRAKUL, P.; ALI, I.; BANKEEREE, W.; PUNNAPAYAK, H. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 2, p. 129-140, 2017. http://dx.doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of xylooligosaccharides in SSF by *Bacillus subtilis* KCX006 producing β-xylosidase-free endo-xylanase and multiple xylan debranching enzymes. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 49-55, 2014. http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2014.970694.

REHMAN, S.; ASLAM, H.; AHMAD, A.; KHAN, S. A.; SOHAIL, M. Production of plant cell wall degrading enzymes by monoculture and co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* under SSF of banana peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1485-1492, 2014. https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400045.

RIBEIRO, L. S.; DUARTE, S. H.; MICHELON, M. Exploring brewer's spent grain for xylo-oligosaccharide production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 66, p. 103608, 2025. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103608.

RICHHARIYA, J.; SHARMA, T. K.; DASSANI, S. Microbial Xylanases: A review. **Flora and Fauna**, v. 28, n. 2, p. 231-240, 2022. http://dx.doi.org/10.33451/florafauna.v28i2pp231-240.

RODRIGUES, I. S. V.; BARRETO, J. T.; MOUTINHO, B. L.; OLIVEIRA, M. M. G.; SILVA, R. S.; FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Production of xylanases by *Bacillus* sp. TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 91-97, 2019. http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2019.1663536.

SAHOO, A.; LENKA, C. A Comparative Study on Proximate Composition of Odisha's Local Bantal Variety Banana Peel (*Musa paradisiaca*) Flour with Cereals Flour for Their Value Addition. **Asian Food Science Journal**, v. 23, n. 10, p. 17-27, 2024. http://dx.doi.org/10.9734/afsj/2024/v23i10745.

SANTIBÁÑEZ, L.; HENRÍQUEZ, C.; CORRO-TEJEDA, R.; BERNAL, S.; ARMIJO, B.; SALAZAR, O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117118, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118.

SANTOS, E. E.; AMARO, R. C.; BUSTAMANTE, C. C. C.; GUERRA, M. H. A.; SOARES, L. C.; FROES, R. E. S. Extraction of pectin from agroindustrial residue with an ecofriendly solvent: use of ftir and chemometrics to differentiate pectins according to degree of methyl esterification. **Food Hydrocolloids**, v. 107, p. 105921, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105921.

SHAH, M. P.; REDDY, G. V.; BANERJEE, R.; BABU, P. R.; KOTHARI, I.L. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 445-451, 2005. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.020.

SHAH, S. P.; KALIA, K. S.; PATEL, J. S. Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* using banana agrowaste as a substrate. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 35-43, 2015. https://doi.org/10.2323/jgam.61.35.

SHAKIR, H. A.; ANWAR, A.; IRFAN, M.; KHAN, M.; ALI, S.; QAZI, J. I. Statistical Optimization of Xylanase from *Bacillus licheniformis* Using Banana Peels in Submerged Fermentation. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A**: Science, v. 44, n. 4, p. 981-991, 2020. http://dx.doi.org/10.1007/s40995-020-00933-0.

SHIVALINGAMURTHY, S. G.; KUPPUSAMY, H. Comparative evaluation of xylan extraction methods and product characterization from sugarcane bagasse. **Journal Of Sugarcane Research**, v. 11, n. 2, p. 158-171, 2021. http://dx.doi.org/10.37580/jsr.2021.2.11.158-171.

SILVA, R. D.; PACHECO, T. F.; SANTI, A. D.; BOZZO, B. R.; MANARELLI, F.; BRIENZO, M.; OTONI, C. G.; AZEREDO, H. M. C. D. From bulk banana peels to active materials: slipping into bioplastic films with high UV-blocking and antioxidant properties. **SSRN Electronic Journal**, v. 438, p.140709, 2024. http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4657859.

SINGH, R.; SAATI, A. A.; FAIDAH, H.; BANTUN, F.; JALAL, N. A.; HAQUE, S.; RAI, A. K.; SRIVASTAVA, M. Prospects of microbial cellulase production using banana peels wastes for antimicrobial applications. **International Journal of Food Microbiology**, v. 388, p. 110069, 2023. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110069.

SOHAIL, M.; BARZKAR, N.; MICHAUD, P.; JAHROMI, S. T.; BABICH, O.; SUKHIKH, S.; DAS, R.; NAHAVANDI, R. Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes from Yeasts: properties and industrial applications. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3783, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/molecules27123783.

SOUZA, H. F.; BORGES, L. A.; GONÇALVES, V. D. P.; SANTOS, J. V.; BESSA, M. S.; CAROSIA, M. F.; CARVALHO, M. V.; BRANDI, I. V.; KAMIMURA, E. S. Recent advances in the application of xylanases in the food industry and production by actinobacteria: a review. **Food Research International**, v. 162, p. 112103, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112103.

SUN, J.; TIAN, C.; DIAMOND, S.; GLASS, N. L. Deciphering Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated with Hemicellulose Degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 4, p. 482-493, 2012. http://dx.doi.org/10.1128/ec.05327-11.

SUN, R.C.; TOMKINSON, J.; WANG, Y.X.; XIAO, B. Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. **Polymer**, v. 41, p. 2647-2656, 2000.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061.

TABOADA, E.; FISHER, P.; JARA, R.; ZÚÑIGA, E.; GIDEKEL, M.; CABRERA, J. C.; PEREIRA, E.; GUTIÉRREZ-MORAGA, A.; VILLALONGA, R.; CABRERA, G. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 669-678, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.030.

THOMAS, L.; JOSEPH, A.; SINGHANIA, Reeta R.; PATEL, A.K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, p. 127-148, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63662-1.00006-3.

TYAGI, D.; SHARMA, D. Production and Industrial Applications of Xylanase: a review. **International Journal of Scientific Research & Engineering Trends**, v. 7, n. 3, p. 1866-1876, 2021.

UNICEF. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. 2024. Disponível em: https://unicef.org/brazil/objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel. Acesso em: 15 out. 2024.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. ***Aureobasidium pullulans***. 2025. Disponível em: https://mycology.adelaide.edu.au/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/aureobasidium. Acesso em: 09 dez. 2025.

VENKATRAMANAN, V.; SHAH, Shachi; PRASAD, Ram; SHAH, Mrinalini. Life Cycle Assessment of Lignocellulosic Waste Biorefinery. In: SHAH, Shachi; VENKATRAMANAN, V.; PRASAD, Ram. **Bio-valorization of Waste**: trends and perspectives. Singapore: Springer, 2021. Cap. 15. p. 327-347.

VERA-LOOR, A.; WALGER, E.; MORTHA, G.; MARLIN, N. Oxidation of fully bleached paper-grade kraft pulps with H_2O_2 activated by Cu(Phen) and the effect of the final pH. **Bioresources**, v. 18, n. 3, p. 5222-5241, 2023. http://dx.doi.org/10.15376/biores.18.3.5222-5241.

VIAYARAGHAVAN, P.; KUMAR, S. J.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A. Simultaneous production of commercial enzymes using agro industrial residues by statistical approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2685-2696, 2019. http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9436.

WANG, J.; ZHANG, S.; LI, C.; LIU, X.; XU, Z.; WANG, T. Efficient secretion of xylanase in *Escherichia coli* for production of prebiotic xylooligosaccharides. **LWT**, v. 162, n. 1, p. 113481, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113481.

WANG, P.; JIA, S.; LIU, G.; CHI, Z.; CHI, Z. *Aureobasidium* spp. and their applications in biotechnology. **Process Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 72-83, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.006.

XU, J.; CHENG, J. J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BURNS, J. C. Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2113-2119, 2010. http://dx.doi.org/10.1021/ef9014718.

YANG, S.; WU, C.; YAN, Q.; LI, X.; JIANG, Z. Nondigestible Functional Oligosaccharides: enzymatic production and food applications for intestinal health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 297-322, 2023. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-052720-114503.

YEGIN, S.; BUYUKKILECI, A. O.; SARGIN, S.; GOKSUNGUR, Y. Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase: screening, bioprocess optimization and scale up. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 999-1010, 2016. http://dx.doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6.

YEGIN, S. Microbial xylanases in xylooligosaccharide production from lignocellulosic feedstocks. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 5, p. 3619-3658, 2022. http://dx.doi.org/10.1007/s13399-022-03190-w.

ZEHRA, M.; SYED, M. N.; SOHAIL, M. Banana Peels: a promising substrate for the coproduction of pectinase and xylanase from *Aspergillus fumigatus* MS16. **Polish Journal of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 19-26, 2020. http://dx.doi.org/10.33073/pjm-2020-002.

ZHANG, Q.; LIAN, Z.; ZHOU, X.; XU, Y. Kinetic studies and predictions for xylo-oligosaccharide production by acidic hydrolysis of xylan with various acids. **Fuel**, v. 333, p. 126325, 2023. http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126325.

ZHOU, M.; GUO, P.; WANG, T.; GAO, L.; YIN, H.; CAI, C.; GU, J.; LÜ, X. Metagenomic mining pectinolytic microbes and enzymes from an apple pomace-adapted compost microbial community. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2017. http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0885-y.

ZOGHI, A.; VEDADI, S.; ESFAHANI, Z. H.; GAVLIGHI, H. A.; KHOSRAVI-DARANI, K. A review on pectin extraction methods using lignocellulosic wastes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 7, p. 5577-5589, 2021. http://dx.doi.org/10.1007/s13399-021-02062-z.

APÊNDICE 1

Figura 1.1 – Curva padrão de xilose para atividade enzimática de endo-β-1,4-xilanase

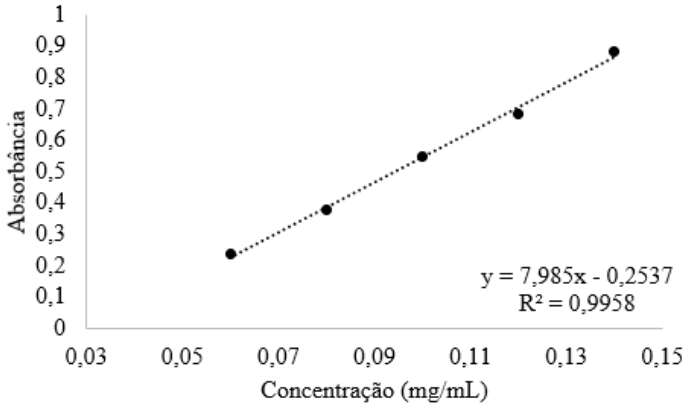


Figura 1.2 – Curva padrão de açúcares para composição lignocelulósica – 4 a 100 µg/mL

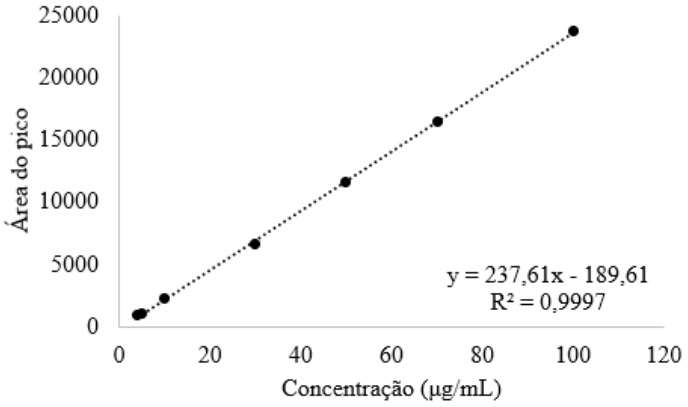


Figura 1.3 – Curva padrão de açúcares para composição lignocelulósica – 400 a 5000 µg/mL

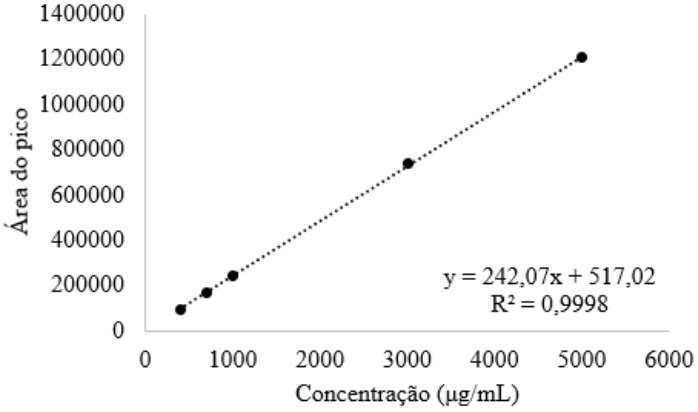


Figura 1.4 – Curva padrão de BSA para método de Lowry

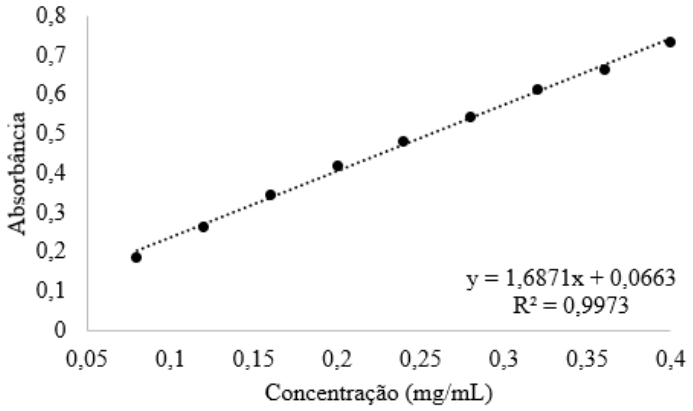


Figura 1.5 – Curva padrão de pNP para atividade enzimática de β-xilosidase

